



クラスⅡ α 型 PI3-キナーゼの血管内皮細胞における新しい生理機能

1. はじめに

胎生期の発生、生後の組織修復及びリモデリング、腫瘍増殖において、「脈管形成 (vasculogenesis)」及び「血管新生 (angiogenesis)」から成る血管形成プロセスは必須である。最初に脈管形成によって作られた未成熟な原始血管網は、動員された壁細胞 (血管平滑筋及び周皮細胞) と会合することにより、安定的な血管へと成熟していく¹⁾。静止期の安定した血管においては、強固なバリア機能が保たれており健全な循環機能が維持される。

ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol: PI) 3-キナーゼ (PI3K) はイノシトールリン脂質のイノシトール環の3位をリン酸化する酵素である。そのリン酸化PIを介して細胞分裂、増殖、分化、遊走、アポトーシス制御やがん化、細胞内小胞輸送など多岐に渡る細胞応答に関与している²⁾。クラスⅠ型PI3Kの他に、細胞内小胞輸送調節に関与するクラスⅢ型PI3K (Vps34) と、最近まではほとんど機能が不明であったクラスⅡ型PI3Kが見いだされている。本稿では、はじめに三つのPI3Kクラスにおける生理機能の相違点を解説し、更に遺伝子改変マウスを用いて個体レベルでのクラスⅡ α 型PI3K (PI3K-C2 α) 機能を詳細に解析した我々の研究成果^{3,4)}を中心に、クラスⅡ型PI3Kによる血管新生の調節機能に関する最近の知見を概説する。

2. PI3K ファミリーの分類と特性

PI3Kは哺乳類において、ドメイン構造や薬理学的特性の違いにより、三つのクラス (Ⅰ, Ⅱ及びⅢ)、八つのアイソフォームに分類されている (図1A)。クラスⅠの触媒サブユニットは四つのアイソフォーム (p110 α /β/γ/δ) か

ら成り、これらは多くのチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) やGタンパク質共役型受容体 (GPCR) の刺激によって活性化され、細胞膜においてPI(3,4)P₂およびPI(3,4,5)P₃を産生し、下流に情報を伝える。哺乳類のクラスⅡ型PI3Kには、図1に示すPI3K-C2 α 、-C2 β 、-C2 γ の三つのアイソフォームの存在が知られているが、これらの活性化機序及び生理機能はほとんど不明であった。1995年、イギリスのWaterfieldらのグループは、まずショウジョウバエからPI3K_68Dをクローニングし、さらにマウス、ヒトC2 α 及びC2 β がクローニングされ、その生化学的な特性が解析された。クラスⅡ酵素はクラスⅠ酵素とは異なり、細胞内においてはPIを主要な基質としてPI(3)Pを産生することが示された。C2 α 及びC2 β は全身に広汎に発現し、中でもC2 α は心臓、胎盤、子宮、腸管 (上皮細胞) 及び血管 (内皮・平滑筋細胞) に、C2 β は皮膚、胸腺及び胎盤に比較的多く発現しているのに対し、C2 γ の発現は主として肝臓に局限している。一方、クラスⅢ酵素Vps34 (Vacuolar protein sorting-34) は、その名の通り酵母において細胞内小胞輸送に関係した働きを持つ酵素として同定され、ヒトでの相同体であるhVps34もまた生体内の様々な細胞において、PI(3)Pを恒常的に産生して細胞内小胞輸送調節、とりわけオートファジーに関わっていると考えられている。

3. シグナル情報伝達、生理機能及び血管機能との関連

PI3Kは、その生成物であるPI(3)P、PI(3,4)P₂及びPI(3,4,5)P₃を介して、下流にシグナルを伝達する。このうち、主に細胞膜上で生成されるPI(3,4)P₂とPI(3,4,5)P₃に対しては、これらに高い親和性を有するPH (pleckstrin homology) ドメインを有する様々な分子が結合しシグナルが伝達される。タンパク質リン酸化酵素Aktは、PHドメインを持つセリン/トレオニン・キナーゼであり、タンパク質合成促進、グルコース輸送、細胞増殖、アポトーシス抑制、遺伝子転写制御、細胞遊走等、多種多様な生理作用に関与している。また、最近ではクラスⅠ型PI3Kの下流ターゲットとしてAktの他に、低分子量Gタンパク質にも注目が集まっている。PI3Kファミリーは、Ras、Rhoファミリー (Rho, Rac, cdc42) 及びArfファミリーに対して、それぞれ特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) やGTPase活性化因子 (GAP) を調節して活性を制御することが示されている (図1B)。

p110 α 及びp110 β のノックアウト (KO) マウスはそれぞれ胎仔期の比較的早期 (E9.5~10.5, E3.5~7.5) に致

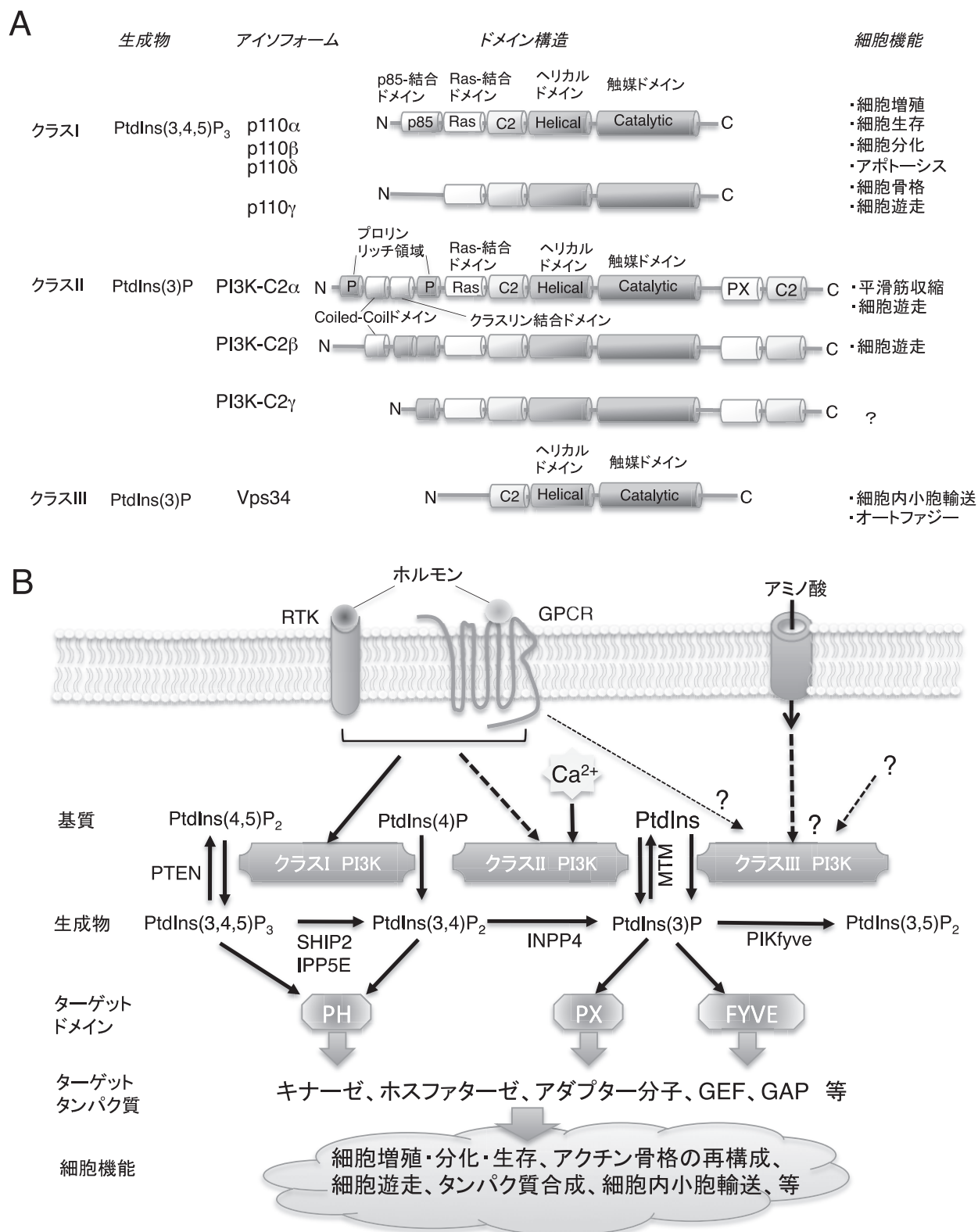


図1 PI3 キナーゼ・ファミリーの分類(A)とホスファチジルイノシトール (PtdIns) 情報伝達経路(B)

死となることから、器官形成以前の細胞の増殖や分化過程に必須な酵素であることは間違いなさそうである^{5,6)}。これらクラス I-A 型 PI3K はがん細胞の分裂・増殖能力の制御に深く関わっているものと考えられる。p110δ は免疫系細胞に広く分布し、その KO マウスは正常に発生・発達する。最近、Vanhaesebroeck らのグループがエンドトキシン・ショックに関係する TLR4 シグナル伝達系において p110δ が重要な調節因子であることを報告した⁷⁾。クラス I-B に属する p110γ の KO マウスは正常に生まれてくるものの、p110γ は生後の免疫系、心機能調節における役割が示唆されている⁸⁾。血管内皮機能における p110α の役割を解析する目的で、内皮細胞特異的コンディショナル KO マウスが作製され、その表現型が報告された⁹⁾。内皮細胞での p110α 欠損は、血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) による Akt・Rho 依存的な内皮細胞遊走を障害し、胎生期血管新生を著しく障害して胎生致死をもたらした。このことから、内皮細胞の p110α は *in vivo* においても VEGF-Akt・Rho 経路に必須な PI3K アイソフォームであることが示された。

一方、クラス II 及び III 酵素が産生する PtdIns(3)P に特異的に結合する FYVE ドメインは、エンドソームに特異的に発現する EEA1 (early endosome antigen-1) をはじめとする幾つかの細胞内膜輸送に関わるタンパク質に多く見られるモチーフである。また、C2α はクラスリン結合ドメインを有することからも、クラスリンに依存したエンドサイトーシスに関わる PI3K と考えられる¹⁰⁾。受容体などの膜タンパク質が活性化に伴って細胞内に移行するエンドサイトーシスは、従来から考えられていた細胞内シグナルの終結メカニズム (脱感作) の一つであると同時に、最近ではある種の細胞や刺激においてエンドソームを介したシグナルの局在化や持続的シグナル産生に関わっている証拠が多数見つかっており¹¹⁾、この点において C2α の機能的役割を解明することは重要な課題である。C2α は細胞内においてトランス・ゴルジネットワークやクラスリン陽性小胞に比較的豊富に存在しており、クラスリン依存的エンドサイトーシス、あるいは細胞内膜小胞のソーティング、及び分泌顆粒のエキソサイトーシス等に関係していることが *in vitro* 系で示されていることから、生体においてもこれらの機能を司る可能性は高い。一方、C2β は上皮細胞に比較的多く発現していることから、その KO マウスは皮膚上皮細胞分化・生存に異常を来すことが予想されたが、C2β KO マウスは正常に出生し、皮膚上皮細胞には全く異常がなかった¹²⁾。また、*in vitro* 細胞系において、LPA に

よる C2β 活性化が細胞遊走に関与することが RNA 干渉 (RNAi) 法を用いた検討から示唆されている¹³⁾。

4. クラス II α 型 PI3K-C2α による血管新生の調節

1) C2α の血管新生における役割

我々のグループが作製した全身型 C2α 遺伝子ホモ欠損 KO (C2α^{-/-}) マウスは、胎生 (E) 8.5 日から発育不全となり、E10.5~E11.5 の間に血管形成不全により胎生致死となった (図 2A)³⁾。この C2α ホモ KO マウスで見られた表現型が、どの細胞に発現する C2α に依存しているのかを明らかにするために、細胞特異的コンディショナル KO (CKO) マウスを作製した結果、平滑筋細胞特異的 (SM22α-Cre; C2α^{flox/flox}) あるいは心筋細胞特異的 (Nkx2-5-Cre; C2α^{flox/flox}) CKO マウスは正常に発達し、メンデルの法則に従って出生したのに対して、血管内皮細胞特異的 C2α^{iEC} (Tie2-Cre; C2α^{flox/flox}) CKO マウスは血管形成不全を含む多臓器の障害により出生前に胎生致死となった (図 2B)³⁾。これらのことから、血管内皮細胞に発現する C2α が正常な血管形成及び個体発生に必須であることが示された。C2α^{iEC} マウスは胎生致死であることから、生後の C2α 機能解析を行うために我々はタモキシフェン誘導型内皮細胞特異的 C2α-CKO マウス [*Cdh5*(PAC)-CreER^{T2}; C2α^{flox/flox} = C2α^{iEC}] を作製した。この C2α^{iEC} マウスの網膜血管新生モデルを用いて、生後の生理的血管新生に及ぼす内皮 C2α 欠損の効果を調べた。生後 3 日目 (P3) のマウスにタモキシフェンを投与し、P6 における網膜血管新生 (血管面積、先端細胞数、糸状仮足数) を観察したところ、C2α^{iEC} マウスにおいて著しく低下していた。以上のことから、血管内皮細胞に発現する C2α は胎生期血管新生及び生後の生理的な網膜血管新生に必須な PI3K アイソフォームであることが明らかとなった³⁾。

次に我々は、病的血管新生における C2α の役割を明らかにするために、虚血性及び腫瘍血管新生の二つの *in vivo* モデルを用いて検討した。C2α^{iEC} マウスにおいて、大腿動脈切除による下肢虚血後の血流回復は、同腹野生型と比べ術後 14~28 日で有意に減弱していた。C2α^{iEC} マウスの虚血筋組織における新生血管密度は野生型マウスに比較して術後 28 日で約 50% 減少していた。また、マウス背側皮下組織に Lewis 肺がん細胞 (LLC) 及び B16 メラノーマ細胞 (B16-BL6) を移植する腫瘍評価モデルにおいて、C2α^{iEC} マウスの腫瘍増殖速度及び移植 14 日後の腫瘍重量は野生型と比べ有意に減少していた。腫瘍組織の新生血管密度は C2α^{iEC} マウスにおいて低下し、C2α^{iEC} マウス腫瘍の新生

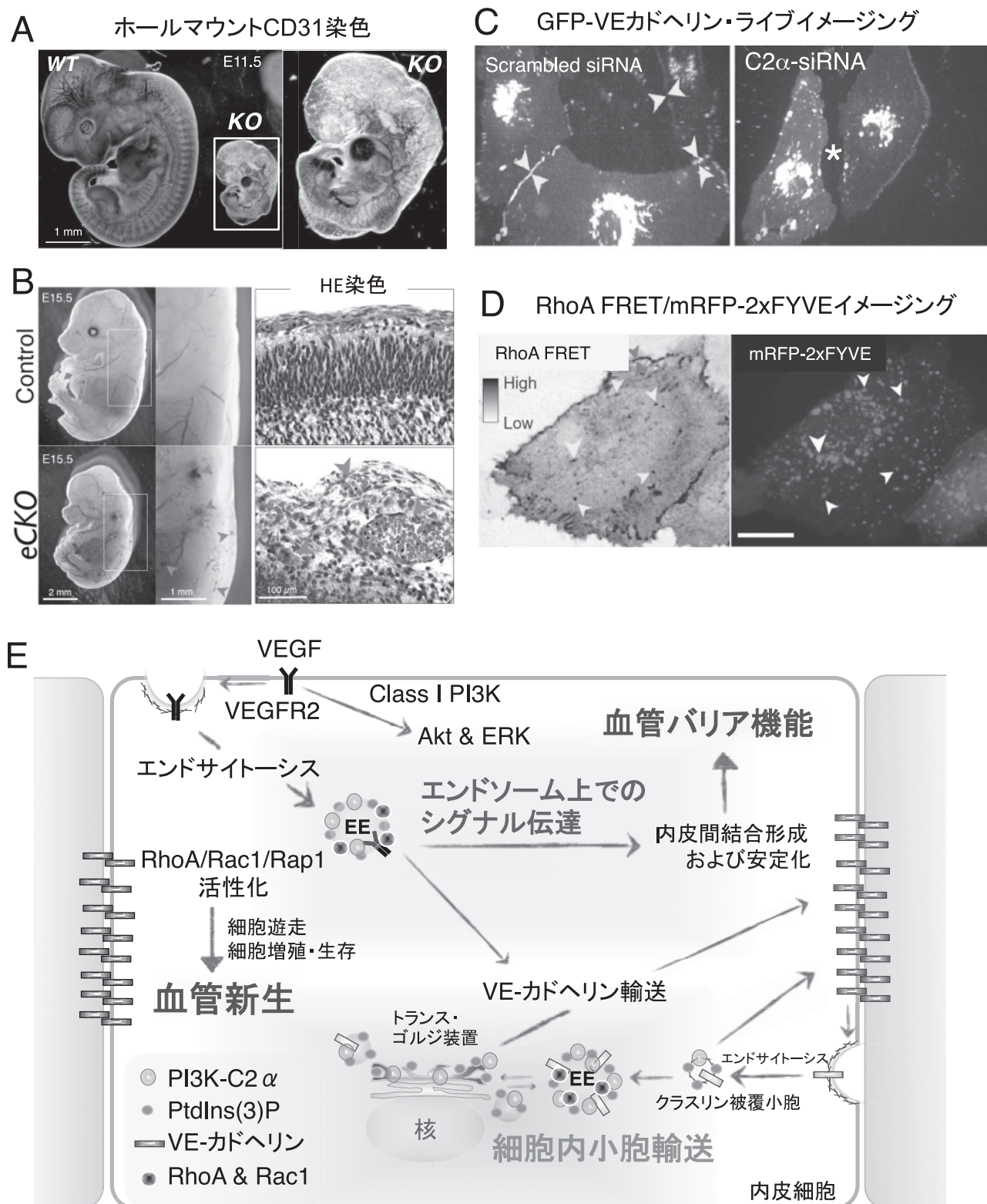


図2 PI3K-C2αによる細胞内小胞輸送制御を介した血管内皮細胞の血管新生及びバリア機能調節メカニズム

血管では NG2 陽性周皮細胞の血管壁への集積が著しく不良であることが明らかとなった³⁾。

2) 内皮細胞内シグナル伝達系における C2 α の役割

RNAi 法により C2 α 発現をノックダウンしたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) では、VEGF-A による細胞遊走及びマトリゲル上での管腔形成が阻害された。既報と一致して、p110 α ノックダウン細胞では VEGF-A による管腔形成能は阻害された⁹⁾。しかし、他の PI3K アイソフォーム (p110 β , C2 β , Vps34) の発現抑制は影響しなかった。更に、C2 α ノックダウン HUVEC では、VEGF-A による VEGF 受容体チロシンリン酸化及びその後の細胞内シグナル伝達経路である Akt, MAP キナーゼ (ERK), PAK2 及び NO 合成酵素 (eNOS) のリン酸化は、全く影響を受けなかった。これらの VEGF シグナル伝達経路は、クラス I 型 PI3K p110 α に強く依存していることがよく知られている。興味深いことに C2 α ノックダウン細胞において、低分子量 G タンパク質 RhoA の活性化と、RhoA により活性化される Rho キナーゼ標的基質であるミオシン脱リン酸化酵素サブユニット (MYPT1) のリン酸化の著しい減弱が観察された。また更に、VEGF-A あるいはスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) による Rac1 の活性化、FGF2 による Rap1 の活性化も、C2 α ノックダウン細胞で有意に減弱していたことから、C2 α は低分子 G タンパク質を介した内皮細胞の形態形成に必須の役割を持つことが示された⁴⁾。

3) C2 α の内皮細胞内小胞輸送における役割

細胞内エンドソーム輸送における C2 α の役割を明らかにするために、まず C2 α 活性産物である PI(3)P の特異的蛍光プローブ (mRFP 標識 2xFYVE ドメイン) を用いた生細胞イメージングによる PI(3)P の細胞内局在の可視化を試みた。正常細胞において PI(3)P は主にエンドソームに局在していた。しかし、C2 α ノックダウン細胞では FYVE 陽性エンドソーム数の減少とエンドソーム運動の減弱が見られた。一方で、p110 α 及び Vps34 ノックダウン細胞では、全く変化が見られなかった。これらのことから、C2 α はエンドソーム上での PI(3)P 産生とエンドソーム輸送に必要な酵素であると考えられた。また C2 α ノックダウン細胞において、TGN から細胞間接着部位への PI(3)P 陽性エンドソームを介した GFP 標識 VE カドヘリン輸送が著しく傷害された (図 2C)。この VE カドヘリンのエンドソーム輸送における C2 α -RhoA 系の関与を調べる目的で、RhoA の蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) プローブ・Raichu-RhoA を用いたライブイメージングを試み、RhoA 活性化の時空間変化を可視化した。正常内皮細胞におい

て、VEGF-A 刺激による RhoA 活性化が細胞内小胞膜及び細胞間接着部位において強く観察された。この RhoA 活性化が見られた細胞内小胞の一部は、初期エンドソーム抗原 (EEA1) 陽性エンドソームであり、C2 α ノックダウンによりエンドソーム及び細胞間接着部位の RhoA 活性化は殆ど消失した (図 2D)。このことは、PI(3)P 陽性エンドソームと細胞膜での RhoA 活性化に C2 α が必要であることを示している。更に我々は、エンドソーム上での RhoA 活性化の上流にあたる VEGF 受容体 2 (VEGFR2) の内在化に着目した。VEGF-A 刺激による VEGFR2 の FYVE 陽性エンドソームへの内在化は、C2 α ノックダウンにより消失した。興味深いことに、C2 α ノックダウン細胞においても VEGF-A 刺激 2 分後の細胞膜上での VEGFR2 リン酸化は正常細胞と同様に観察されたが、刺激後 30 分で見られるリン酸化 VEGFR2 のエンドソームへの内在化は C2 α ノックダウンで抑制された。更に、ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤である Dynasore の前処置において、VEGF-A 刺激による RhoA 活性化、細胞間接着部位への VE-カドヘリン集積、及びマトリゲル上管腔形成が減弱していた。これらの結果から、C2 α は活性化 VEGFR2 のエンドソームへの内在化と、その後の RhoA 活性化を含むエンドソーム上でのシグナル伝達、VE カドヘリンのエンドソーム輸送とその細胞間接着部位集積に必須であると考えられた。

血管内皮は、GPCR に属する S1P 受容体 S1P₁ を強く発現する。そこで、内皮細胞の S1P シグナル伝達系における C2 α の役割を検討した。S1P₁ は三量体 G タンパク質 Gi を介して Rac1 を活性化し、細胞遊走及び血管新生を亢進する¹⁴⁾。前述の VEGF による RhoA 活性化と同様に、S1P による Rac1 活性化は、FRET 法で EEA1 陽性初期エンドソーム上及び細胞間接着部位で強く観察された⁴⁾。C2 α ノックダウンにより初期エンドソーム上及び細胞間接着部位の Rac1 活性化は減弱した。また更に、S1P₁ 受容体の S1P 刺激による内在化は、推測通り C2 α ノックダウン細胞において著しく抑制された。以上の結果より、内皮細胞における C2 α は、クラスリン依存性エンドサイトーシスを調節する新たな PI3K アイソフォームであることが示され、VEGF-A, S1P 等による形態形成、細胞遊走、脈管形成といった内皮機能にとって必須な細胞内膜輸送調節因子であることが示唆された。

5. お わ り に

内皮細胞に高発現するクラス II 型 PI3K-C2 α は発生期の

血管新生, 生後の病的血管新生に欠かすことのできない役割を持つことが明らかとなった. 紙面の都合上, 詳細は割愛したがC2 α は安定血管においてもバリア機能維持に必須な役割を果たすPI3Kであることも明らかにした³⁾. 内皮細胞においてC2 α は, その活性産物であるPI(3)Pを介して細胞内小胞輸送を制御し, 膜タンパク質の配送, エンドサイトーシス, リサイクリング, 及び細胞内小胞(エンドソーム)上でのシグナル伝達に関与している(図2E). 内皮細胞におけるこのC2 α 機能が血管新生及びバリア機能維持を支えていると考えられる. 内皮細胞におけるC2 α とクラスI型PI3Kは, 全く異なる細胞内機序により内皮の血管新生機能を調節している. すなわち, p110 α / β などのクラスI型PI3KはAkt活性化を介して内皮細胞の増殖, 生存及び遊走に深く関与しているが, 細胞内小胞輸送の制御やVE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積には関与しない. また, 哺乳類のエンドサイトーシス系は, 酵母や線虫に比べ非常に多様で複雑なシステムに進化している. 古典的な「初期エンドソーム→後期エンドソーム→リソソーム」による分解系に加え, リサイクリング・エンドソームによるタンパク質メンテナンス, 最近ではAPPLエンドソーム¹⁵⁾, SARAエンドソーム¹⁶⁾のように機能的に分化したエンドソームがシグナル伝達をダイナミックに調節することが明らかになりつつある¹⁷⁾. おそらく, これらエンドソームの機能は, Vps34の他に, クラスIやクラスII型PI3Kによっても調節されていると考えられる. どのPI(3)PプールがVps34あるいはクラスII型PI3Kによる調節を受けるのかは不明であり, まだ多くの謎が存在する. 本研究から明らかになったC2 α の生理機能は, 血管生物学におけるPI3Kファミリーの新たな作用を見出したものであり, 今後多くの血管新生療法と組み合わせることができる新しい治療標的となることが期待される.

- 1) Adams, R.H. & Alitalo, K. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 329–341.
- 2) Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 329–341.
- 3) Yoshioka, K., Yoshida, K., Cui, H., Wakayama, T., Takuwa, N., Okamoto, Y., Du, W., Qi, X., Asanuma, K., Sugihara, K., Aki, S., Miyazawa, H., Biswas, K., Nagakura, C., Ueno, M., Iseki, S., Schwartz, R.J., Okamoto, H., Sasaki, T., Matsui, O., Asano, M., Adams, R.H., Takakura, N., & Takuwa, Y. (2012) *Nat. Med.*, 10, 1560–1569.
- 4) Biswas, K., Yoshioka, K., Asanuma, K., Okamoto, Y., Takuwa, N., Sasaki, T., & Takuwa, Y. (2013) *J. Biol. Chem.*, 288, 2325–2339.
- 5) Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A., & Nuss-

- baum, R.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 10963–10968.
- 6) Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., & Nussbaum, R.L. (2002) *Mamm. Genom.*, 13, 169–172.
- 7) Aksoy, E., Taboubi, S., Torres, D., Delbauve, S., Hachani, A., Whitehead, M.A., Pearce, W.P., Berenjeno-Martin, I., Nock, G., Filloux, A., Beyaert, R., Flamand, V., & Vanhaesebroeck, B. (2012) *Nat. Immunol.*, 13, 1045–1054.
- 8) Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H.Y., Rybin, V.O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., Benovic, J.L., Kahn, C.R., Izumo, S., Steinberg, S.F., Wymann, M.P., Backx, P.H., & Penninger, J. M. (2002) *Cell*, 110, 737–749.
- 9) Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L.C., Phng, L.K., Cain, R.J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cuatillas, P.R., Smith, A.J., Ridley, A.J., Ruhrberg, C., Gerhardt, H., & Vanhaesebroeck, B. (2008) *Nature*, 453, 662–666.
- 10) Domin, J., Gaidarov, I., Smith, M.E., Keen, J.H., & Waterfield, M.D. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 11943–11950.
- 11) Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006) *Nature*, 443, 651–657.
- 12) Harada, K., Truong, A.N., Cai, T., & Khavari, P.A. (2005) *Mol. Cell Biol.*, 25, 11122–11130.
- 13) Domin, J., Harper, L., Aubyn, D., Wheeler, M., Florey, O., Haskard, D., Yuan, M., & Zicha, D. (2005) *J. Cell Physiol.*, 205, 452–462.
- 14) Ryu, Y., Takuwa, N., Sugimoto, N., Sakurada, S., Usui, S., Okamoto, H., Matsui, O., & Takuwa, Y. (2002) *Circ. Res.*, 90, 325–332.
- 15) Zoncu, R., Perera, R.M., Balkin, D.M., Pirruccello, M., Toomre, D., & De Camilli, P. (2009) *Cell*, 136, 1110–1121.
- 16) Kang, J.S., Liu, C., & Derynck, R. (2009) *Trends Cell Biol.*, 19, 385–394.
- 17) Gould, G.W. & Lippincott-Schwartz, J. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 287–292.

吉岡 和晃¹, 多久和 典子^{1,2},
岡本 安雄¹, 多久和 陽¹

(¹ 金沢大学医薬保健研究域医学系血管分子生理学,
² 石川県立看護大学看護学部健康科学)

Physiological roles of Class II PI3 kinase-C2 α in endothelial cells

Kazuaki Yoshioka¹, Noriko Takuwa^{1,2}, Yasuo Okamoto¹ and Yoh Takuwa¹ (¹Department of Physiology, Kanazawa University School of Medicine, 13-1 Takaramachi, Kanazawa, Ishikawa 920-8640, Japan, ²Department of Health and Medical Sciences, Ishikawa Prefectural Nursing University)