

論文の内容の要旨

論文題目

リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの

血管系における機能解析

氏名 田中 将之

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA)は、*in vitro* において癌細胞の増殖と運動性の促進、アポトーシス抑制、細胞内カルシウム動員といった多彩な細胞応答を引き起こす生理活性脂質である。LPA の作用を仲介する G 蛋白質共役型受容体が現在までに 5 つ同定されており (LPA₁₋₅)、LPA 受容体ノックアウトマウスの表現型から、LPA の *in vivo* における機能が次々と判明している。しかし、LPA の産生機構とその意義については不明な点が多く残されていた。

このような状況の中、当教室で LPA の産生酵素としてオートタキシン (Autotaxin, ATX) が同定された。ATX は細胞外分泌型の酵素であり、リゾホスファチジルコリンに作用して LPA を産生する。また、様々な癌組織で高発現していることから、LPA を産生することにより癌の悪性度に寄与していると考えられている。一方、正常組織においても広範に発現が認められ、血液や脳脊髄液、精液と言った様々な体液に豊富に存在することから、生理的にも重要な機能を有している可能性が示唆されていた。

本研究において、私は ATX による LPA 産生の生理的意義を明らかにするために ATX ノックアウトマウスを解析した。その結果、ATX-LPA シグナリングが胎生期の血管形成に必須であることを明らかにした。また、LPA が血管内皮細胞間の接着を負に制御することで血管新生に寄与している可能性を見出した。

1. ATX ノックアウトマウスの表現型解析

ATX ヘテロ欠損マウスは、外見上は正常に発育するが、血漿中における ATX 発現量、酵素活性、LPA 濃度がいずれも野生型の半分であった。この結果から、ATX が実際に生体内で LPA を産生していることが示された。次に、ヘテロ欠損マウス同士を掛け合わせてホモ欠損マウスの作出を試みたが、生まれてきたマウスにホモ欠損型は存在しなかったことから、ATX ノックアウトマウスは胎生致死であることがわかった。各発生段階におけるホモ欠損型の胎仔の外観を観察すると、交尾後 8.5 日目 (E8.5)では、野生型と比べて遜色なく発生している個体が見られる一方で、頭部に水腫状の空胞が見られる個体が観察された。E9.5 では、明確な形態の異常が全ての個体で見られ、心臓の膨張や反転の異常、神経管の未閉鎖などが生じていた。E10.5 以降はホモ欠損型が得られないことから、ATX ノックアウトマウスは E10.5 で致死となることがわかった。

2. ATX ノックアウトマウスは血管新生に異常を来す

ATX ノックアウトマウスでは、胎仔を包んでいる膜の一つである卵黄嚢上の血管が全く観察されなかった。また血管内皮細胞のマーカーである CD31 に対する抗体を用いたホルマウント免疫染色の結果から、胎仔の血管系にも異常が生じていることがわかった。更に、E9.5 における ATX ノックアウトマウスの胎盤をヘマトキシリン-エオジン染色したところ、ラビリンス層の形成異常、尿膜の空洞化が観察された。以上の結果から、ATX ノックアウトマウスでは胎生期のあらゆる血管系に異常が生じることがわかった。

血管形成には、脈管形成 (vasculogenesis)と血管新生 (angiogenesis)という二つの過程がある。中胚葉細胞から分化してできた血管内皮細胞が互いに結合して、管腔の *de novo* 合成を行う過程を脈管形成と呼び、E7.5~E8.5 で起こる。一方、脈管形成により出来た既存の血管から新たな血管が伸長する過程を血管新生と呼び、E8.5 以降に起こる。そこで、次に血管形成過程のどの段階で異常が生じるかを調べることにした。血管内皮細胞特異的に lacZ を発現し、微小血管の可視化が可能な *flk1*^{+/+}マウスと ATX ノックアウトマウスを交配し、x-gal により胎仔の血管を可視化した。その結果、交尾後 8.5 日目では野生型と同様な網目状の血管が観察されたが、交尾後 9.5 日目では野生型で見られる微細な血管構造がほぼ完全に消失していた。この結果から、ATX ノックアウトマウスでは血管の *de novo* 合成 (脈管形成)は正常に起こるものの、その後起こる血管リモデリング (血管新生)に異常が生じることが明らかとなった。

3. ATX の胎生期における発現部位の解析

次に、E8.5~E10.5 の胎仔に対しホルマウント *in situ* hybridization を行った。E8.5 で

は、ATX は前脳と中脳の境界付近に発現が認められた。E9.5 以降はこの発現は消失し、代わりに大顎、耳胞、鼻突起 (以上 E9.5)、後脳、鰓弓、神経管の底板 (以上 E10.5) に発現が検出された。

次に、E8.5 の yolk sac における ATX の発現部位をパラフィン切片・凍結切片の *in situ* hybridization により調べた。その結果、ATX は yolk sac の endodermal layer に発現していた。従って、yolk sac で発現している ATX が yolk sac の血管形成に寄与している可能性がある。また、母側の胎盤組織や、ホールマウント *in situ* hybridization でも検出された embryo の頭部にも発現が認められた。

4. LPA は VE-cadherin を介した内皮細胞間接着を負に制御する

LPA が血管新生に関わる分子メカニズムを明らかにするため、血管内皮由来培養細胞である HUVEC を用いて解析を行った。単層培養した HUVEC を LPA で刺激した後の形態変化をタイムラプス観察したところ、血清中に存在すると考えられる数百 nM のレベルで血管内皮細胞同士が速やかに解離することがわかり、LPA は内皮細胞間の接着を弱める作用を有するものと考えられた。血管内皮細胞間の接着には vascular endothelial (VE)-cadherin が重要であるが、興味深いことに、VE-cadherin ノックアウトマウスは ATX ノックアウトマウスとほぼ同じ表現型を示して致死となる。そこで HUVEC を LPA 刺激し、VE-cadherin の局在を調べたところ、通常は内皮細胞間接着部位に局在する VE-cadherin が、細胞間接着部位以外の場所へ移行することがわかった。また、VE-cadherin の細胞外ドメインをコーティングしたプレートへの HUVEC の接着が、LPA 存在下で有意に抑制された。以上の結果から、LPA は血管内皮細胞の VE-cadherin を介した細胞間接着を負に制御することが明らかとなった。

次に、この LPA の効果がどのようなシグナル経路を介して発揮されるのかに関して、各種阻害剤を用いた検討を行った。その結果、LPA の VE-cadherin 接着抑制効果は Gi 阻害剤の百日咳毒素では阻害されず、ROCK 阻害剤の Y27632 によって阻害された。従って、この効果は ROCK 経路を介して発揮されることがわかった。

ROCK は $G_{12/13}$ 経路で活性化されるキナーゼであり、myosin light chain phosphatase をリン酸化してそのホスファターゼ活性を抑制し、ミオシンのリン酸化体を増加させることにより、アクチンストレスファイバー形成を促進させると言われている。そこで、LPA 刺激した HUVEC におけるアクチン構造をファロイジンにより染色した。その結果、LPA 刺激により、細胞の端から端へ伸びるアクチンストレスファイバーの形成が促進されることがわかった。また、この作用は ROCK 阻害剤 Y27632 の前処理により抑制されることが確認された。

カドヘリンは、細胞内で β -catenin や α -catenin といった足場タンパク質を介して、アクチンフィラメントと結合している。アクチンフィラメントは、界面活性剤として Triton のみを含む lysis バッファー中では不溶性画分へと回収されるため、あるタンパク質のアクチンフィラメントとの結合が強まった場合、Triton 不溶性画分へ回収されるタンパク量が増加すると考えられている。そこで、LPA 刺激により Triton 不溶性画分へ回収される VE-cadherin 量が増加するかどうかを検討した。その結果、LPA 刺激により濃度依存的・時間依存的に Triton 不溶性画分へ回収される VE-cadherin が増加することがわかった。従って、LPA 刺激により、アクチンフィラメントと相互作用する VE-cadherin 量が増加したと考えられた。

5. まとめと考察

ATX ノックアウトマウスの表現型解析から、ATX-LPA シグナリングが胎生期の血管新生に必須であることが明らかとなった。更に HUVEC を用いた解析から、LPA は VE-cadherin を介した内皮細胞間の接着を負に制御すること、またこの作用は百日咳毒素に非感受性であり ROCK を介することが明らかとなった。LPA 受容体のうち、これまで LPA₁~LPA₃ のノックアウトマウスが報告されているが、いずれも胎生致死とはならず、また LPA₄ や LPA₅ は血管内皮細胞における発現が認められなかった。従って、血管内皮細胞上に発現し内皮細胞同士の接着を抑制する未知の LPA 受容体の存在が想定される。そして、ROCK は G12/13 によって活性化されることから、この受容体は G12/13 と共役していると考えられる。

通常、血管内皮細胞同士は密に接着しており、増殖や遊走が抑制された状態にあるが (contact inhibition)、血管新生時には局所的に細胞間接着が解離し、血管新生が誘導されると考えられている。本研究により、ATX と LPA は血管内皮細胞間の接着を解離することで血管新生に寄与している可能性が提起された。ATX は様々な癌組織で高発現していることから、LPA 産生を介して癌細胞の増殖や運動性を促進することにより癌の浸潤・転移に寄与していると考えられてきた。血管新生は癌の生存戦略の一つであるが、今回の結果から、ATX は更に血管新生を促進することによっても癌の進行に関与するという新たな概念が想定された。ATX 阻害薬は「癌細胞の増殖・転移」と「血管新生」の両方を阻害する有望な抗癌剤となることが期待される。