

審査の結果の要旨

氏名 田中 将之

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) は、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、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。LPA の産生酵素としてオートタキシン (Autotaxin, ATX) が同定されていた。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た。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、田中は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 で致死となることを明らかにした。

2. ATX ノックアウトマウスの血管新生異常

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囊上の血管が全く観察されなかった。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、田中は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 *f1k1*<sup>+/-</sup> 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ることを見出した。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を明らかにした。

### 3. ATX の胎生期における発現部位の解析

次に、ATX の胎生期における発現部位を明らかにするため、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 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* に発現していることを明らかにした。

### 4. LPA によるVE-cadherin を介した内皮細胞間接着の負の制御

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、田中は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った。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トしたプレートへの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。

以上、本研究において、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を明らかにした。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 を介することを明らかにした。

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。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。これらの成果は、博士 (薬学)の値するものと評価できる。