

リゾホスファチジン酸による血管新生の分子メカニズム

安田 大恭, 石井 聡

秋田大学大学院医学系研究科 生体防御学講座

(令和2年5月1日掲載決定)

Molecular mechanism of lysophosphatidic acid-induced developmental angiogenesis

Daisuke Yasuda and Satoshi Ishii

Department of Immunology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : LPA4, LPA6, YAP, TAZ, DLL4, Sprouting angiogenesis

はじめに

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、特異的な6つのGタンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して、細胞の増殖、遊走、神経突起の退縮、サイトカイン産生など多彩な機能を発揮するリズリン脂質メディエーターである。さまざまな臓器でLPAは検出され、血中においては数百 nM 存在していることが報告されている¹⁾。これまでに我々の研究室では、Gタンパク質 α サブユニットのG α 12/G α 13を強く活性化するLPA受容体として、LPAの第4受容体(LPA4)^{2,3)}と第6受容体(LPA6)⁴⁾を同定し、その後の解析からLPA4欠損マウスは胎生期における血管・リンパ管形成異常により約3割が胎生致死となることを見出してきた⁵⁾。一方、G α 12/G α 13を介したLPAシグナルに関連するオートタキシン⁶⁾、G α 12/G α 13⁷⁾、およびROCKI/ROCKII⁸⁾の遺伝子欠損マウスは、血管形成異常のために胎生10.5日前後で100%致死となることが報告されている(図1)。このようにLPAが発生期の血管新生に必須であることは知られていたが、この際にLPAが作用する受容体は、その細胞内シグナルとともに未解明のまま

であった。LPA1/LPA2/LPA3のトリプル欠損マウスは胎生致死にならないという報告もあることから⁹⁾、我々はLPA4以外のG α 12/G α 13共役型LPA受容体(LPA5とLPA6)も胎生期の血管新生に寄与する可能性を考え、複数のLPA受容体を介したLPAによる新規の血管新生分子機構の解明を目指して検討を行った。

1. LPA4とLPA6の二重欠損マウス(Lpa4; Lpa6 DKO)は血管形成異常により胎生致死になる

本研究ではまず、LPA4と共にマウスの出生に必須の役割を果たすLPA受容体を明らかにするため、LPA4, LPA5, LPA6それぞれの遺伝子欠損マウスを交配させ、出生した仔マウスの遺伝子型解析を行った。その結果、Lpa5 KOマウスやLpa6 KOマウスは正常に生まれ発育した。しかしながら、Lpa4 KOかつLpa6ヘテロ型(Lpa6 Het)の雌雄を交配させると、Lpa4; Lpa6 DKOマウスはメンデル比に従えば約25%の確率で産まれるはずだが、全く産まれなかった。一方、Lpa4; Lpa5 DKOやLpa5; Lpa6 DKOマウスはどちらもメンデル比に従い正常に生まれ発育することから、LPA5は出生に寄与しないことが示唆された。以上の結果はマウスの出生にLPA4とLPA6の両者が重要であることを示唆している。

そこで、LPA4とLPA6が胎生期においてどのような役割があるかを明らかにするために、胎生8.5日か

Corresponding Author : Daisuke Yasuda
Department of Immunology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6090
Fax : 81-18-884-6444
E-mail : dyasuda@gipc.akita-u.ac.jp
*令和2年2月12日 秋田医学会学術奨励賞記念講演

(12)

LPAによる血管新生の分子メカニズム

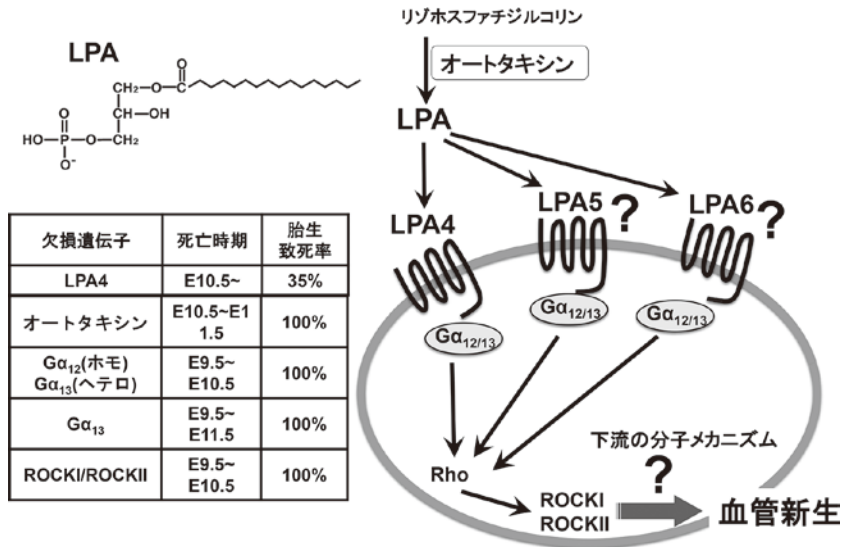


図1. LPA4以外のLPAシグナル関連遺伝子の欠損マウスは、血管形成不良により胎生11.5日までに全て死亡する。

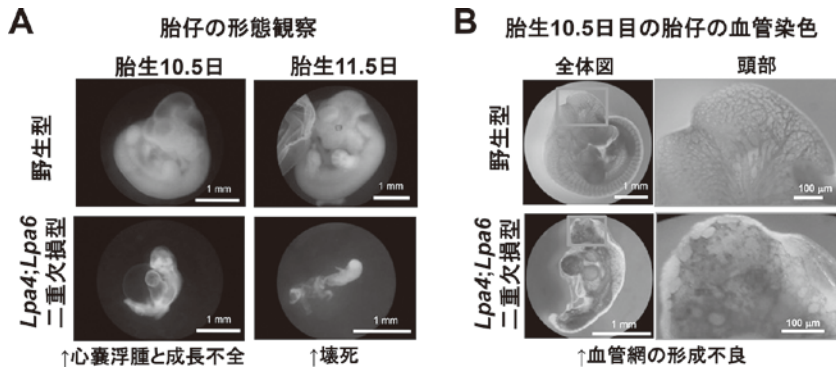


図2. *Lpa4*; *Lpa6*二重欠損マウスは血管形成不全により胎生11.5日までに全て死亡する。(文献16より引用、一部改変)

ら11.5日までの卵黄嚢と胎仔の形態を観察した。胎生8.5日では両者に形態学的な違いは認められなかったが、胎生9.5日以降の野生型(WT)マウスで見られる卵黄嚢の血管形成は、*Lpa4*; *Lpa6* DKOマウスの胎仔では観察されず、胎仔の成長はWTマウスに比べて大きく損なわれていた(図2A)。胎生11.5日になると*Lpa4*; *Lpa6* DKOマウスは全て死亡していた。また、PECAM-1抗体を用いた胎児血管のホルマウント染色では、WTマウスの頭部や体節間領域における緻密な血管網の形成が³、*Lpa4*; *Lpa6* DKOマウスでは損な

われていることを見出した(図2B)。また、胎生9.5日の*Lpa4*; *Lpa6* DKOマウスはWTマウスに比べて背側大動脈が拡張していた(図3)。

2. 血管内皮細胞特異的にLPA4とLPA6を欠損させると、新生仔網膜の血管新生が低下する

血管内皮細胞(EC)特異的にGα₁₃を欠損させたマウスが*Lpa4*; *Lpa6* DKOマウスの血管形成異常を示してほぼ全て胎生致死となる報告があったことから¹⁰、

PECAM-1抗体を用いた胎仔切片の血管染色

胎生9.5日目

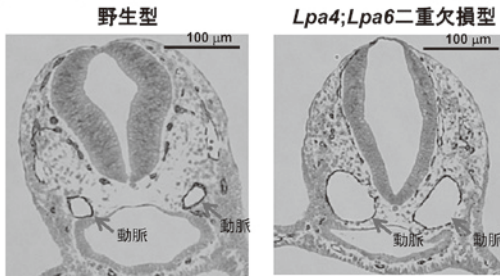


図3. *Lpa4*; *Lpa6* 二重欠損マウスの胎仔は、背側大動脈が拡張している。(文献16より引用、一部改変)

LPA4 と LPA6 も EC で機能すると予想した。そこで我々は *Cdh5-CreERT^{tg}*; *Lpa4^{lox}*; *Lpa6^{lox}* マウスと *Lpa4^{lox}*; *Lpa6^{lox}* マウスを交配させて、タモキシフェン投与依存性的かつ EC 特異的に LPA4 と LPA6 を二重欠損させるマウス (*Lpa4*; *Lpa6^{iAEC}* マウス) を作製した。解析には同腹子の Cre 陰性の Control マウス (*Lpa4^{lox}*; *Lpa6^{lox}* マウス) と Cre 陽性の *Cdh5-CreERT^{tg}*; *Lpa4^{lox}*; *Lpa6^{lox}* マウスを用いた。出生1日目から3日目までタモキシフェンを1回ずつ投与し、出生5日目に網膜を固定、単離して、血管を

Isolectin B4 で染色した。 *Lpa4*; *Lpa6^{iAEC}* マウスは Control マウスに比べて網膜の血管伸長の程度、EC の占める割合、血管先端領域における血管分岐数や血管先端の萌出数がそれぞれ有意に低下していた (図4A)。さらに拡大した高解像度解析で観察される血管先端から萌出するフィロポディアの平均長と数が、 *Lpa4*; *Lpa6^{iAEC}* マウスは Control マウスに比べて有意に低下していた (図4B)。以上の結果は、EC における LPA4 と LPA6 が、萌出性の血管新生に重要であることを示唆している。

3. EC における LPA4 と LPA6 は LPA 刺激により $G\alpha12/G\alpha13$ -Rho-ROCK シグナルを活性化させる

そこで次に、EC において ROCK 下流のシグナルが血管新生を促す分子メカニズムを検証した。まず、ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) の内因性 LPA 受容体の発現量を RT-qPCR で確認したところ、LPA6 が高発現している他、LPA1 や LPA4 も発現していることがわかった (図5A)。SRF-RE ルシフェラーゼレポーター解析で検出される LPA 刺激依存的な $G\alpha12/G\alpha13$ 活性化シグナルは、LPA1 と LPA3 のアンタゴニストである Ki16425 では抑制されなかったが、ROCK1/II

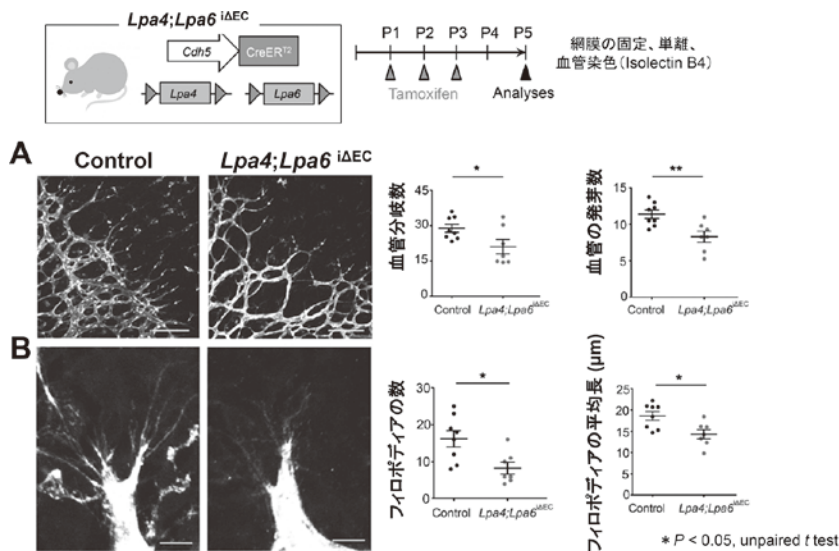


図4. 血管内皮細胞特異的 LPA4/LPA6 二重欠損は、血管の分岐数、発芽数、フィロポディア形成を低下させる。(文献16より引用、一部改変)

(14)

LPAによる血管新生の分子メカニズム

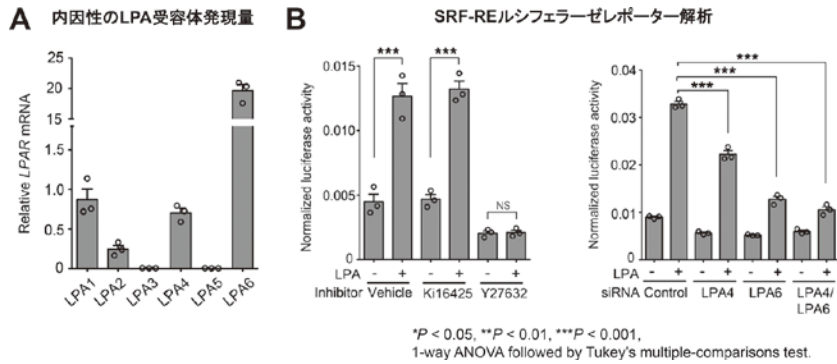


図5. HUVECにおいてLPAはLPA4とLPA6を介してGα12/Gα13-Rho-ROCKシグナルを活性化させる。(文献16より引用, 一部改変)

の阻害剤であるY27632で完全に抑制された。また、LPA4とLPA6、および両方のsiRNA処理は、control siRNA処理で見られたLPA刺激依存的なGα12/Gα13活性化シグナルをそれぞれ抑制した(図5B)。なお、Gαq活性化に伴う細胞内Ca²⁺濃度の測定や、GasやGai活性化の指標となるcAMP産生量の解析では、HUVECにおいてLPA刺激の応答は見られなかった。以上の結果は、ECにおいてLPAがLPA4とLPA6を介してGα12/Gα13活性化シグナルを流すことを示唆している。

4. LPAはLPA4/LPA6-Gα12/Gα13-Rho-ROCKシグナルによりDLL4の発現を抑制させる

次に、LPA刺激により発現が変動する分子を様々な既知血管制御因子の中からPCRスクリーニングした。その結果、幾つかの血管制御因子の発現がLPA刺激により変動することがわかり、中でもNotch受容体のリガンドとして知られるDLL4の発現量がLPA刺激により有意に低下することがわかった。胎生期において、このDll4の過剰発現マウスは心嚢浮腫や卵黄血管の形成不良、および背部大動脈の拡張が報告されており¹¹⁾、これは*Lpa4*; *Lpa6* DKOマウスの表現型と類似していた。タンパク質の発現レベルでも、LPAは刺激時間依存的にDLL4を低下させ、一方、LPA4/LPA6やGα12/Gα13のsiRNA処理は逆にDLL4発現を増加させた(図6A)。また、Gα12/Gα13の下流シグナルであるRho、Rock1/IIおよびアクチン重合に対するそれぞれの阻害剤を処理して検証したところ、

DLL4の発現は各阻害剤で増加し、LPAによるDLL4発現の抑制効果も各阻害剤を処理すると見えなくなった(図6B)。

さらに、網膜の新生血管でもLPA-LPA4/LPA6シグナル低下によるDll4発現の増加が起こるかを検証するために、血管とDll4を共染色して蛍光強度を比較したところ、*Lpa4*; *Lpa6*^{ΔEC}マウスはControlマウスに比べて、網膜の新生血管に検出されるDll4の蛍光強度が有意に高いことがわかった。この結果は*in vitro*だけでなく*in vivo*においても、ECのLPA4とLPA6はDll4発現の抑制に働くことを示唆している。

5. ECにおけるYAP/TAZの不活性化は、DLL4の発現を増加させる

次に、LPAによるDLL4発現抑制作用のより詳細な分子メカニズムの解明のため、Gα12/Gα13活性化シグナルにより機能制御される転写共役因子YAPとTAZの報告に注目した。核内のYAP/TAZは標的遺伝子の発現を制御することにより、細胞の増殖、分化、接触阻害などの機能を発揮して、器官サイズの制御やがん抑制に働くことが知られている¹²⁾。ヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞において、LPA4やLPA6の活性化はGα12/Gα13-Rho-ROCKシグナル下流でアクチン重合を引き起こし、LATS1/LATS2というYAP/TAZのキナーゼが抑制されてYAP/TAZのリン酸化が抑制することで、脱リン酸化されたYAP/TAZが増加して核内移行することが報告されていた¹³⁾。実際、HUVECにYAP/TAZのsiRNA、およびYAPの阻害剤であるイベルメクチンを処理すると、DLL4の発現は有意に増加した

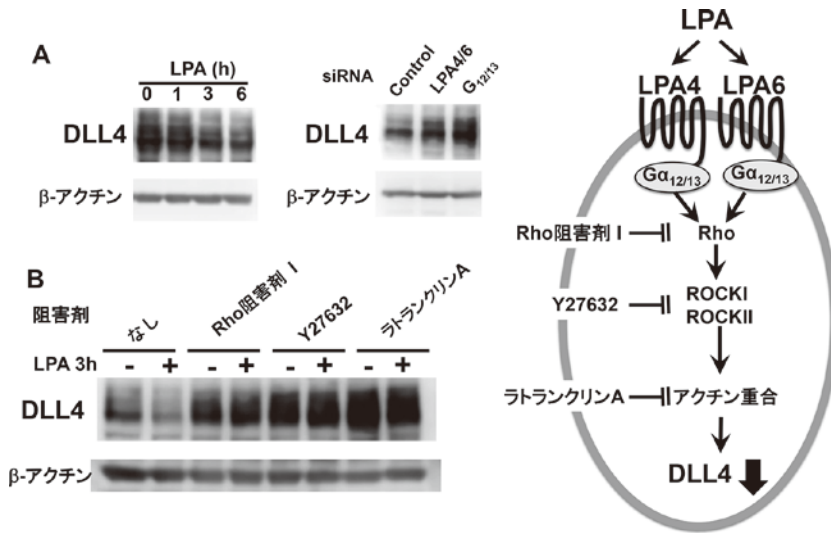
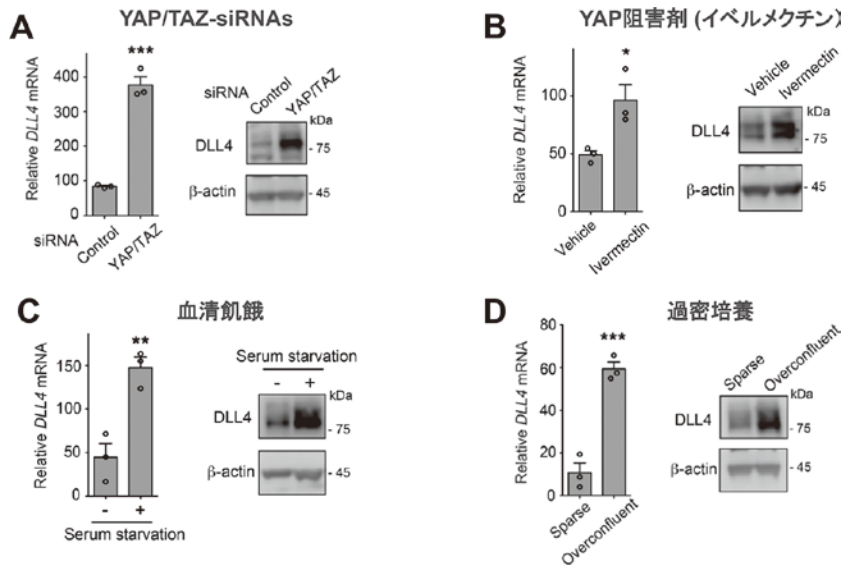


図6. LPA4/LPA6 を介した LPA シグナルの阻害により DLL4 発現が上昇する。(文献 16 より引用, 一部改変)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, unpaired t test.

図7. YAP/TAZ の不活性化により DLL4 発現は増加する。(文献 16 より引用, 一部改変)

(図 7A, 7B). また, YAP/TAZ の不活性化を誘導する方法として, 細胞の血清飢餓や過密培養を行っても DLL4 の発現はそれぞれ有意に増加した (図 7C, 7D).

6. EC における LPA-LPA4/LPA6 活性化シグナルは YAP を核へ移行させる

次に, 実際に EC において LPA が YAP を核内に移行させるかを検証するために, YAP と核をそれぞれ共染色して LPA 刺激による YAP の細胞内局在を観察

したところ、LPA刺激して1時間後にYAPが核移行した細胞が増加し、これはROCK阻害剤であるY27632の前処理により抑制された。また、そのLPAによるYAPの核移行はLPA4/LPA6のsiRNA処理により抑制された。同様の現象はマウスの肺から単離したECにおいても観察された。

さらに、細胞で確認したYAPの核移行が新生血管でも起こるかを検証するため、*Lpa4*; *Lpa6*^{ΔEC}マウスの網膜を固定、単離して、血管、YAP、およびECの核マーカーであるERGを共染色したところ、Controlマウスの網膜の血管先端領域ではYAPと核が共局在していたが、*Lpa4*; *Lpa6*^{ΔEC}マウスでは共局在していないことがわかった。この結果は、網膜の新生血管においてLPA4とLPA6がYAPの核移行に重要であることを示唆している。

7. LPA-LPA4/LPA6 活性化シグナルの破綻は、DLL4の発現増加によるECの萌出低下を引き起こす

次に、LPA4とLPA6のECにおける機能を明らかにするために、3次元ビーズ細胞萌出解析を行った。具体的には、siRNAを処理したHUVECをビーズにコートし、フィブリンゲルの中で数日培養して観察さ

れるビーズからの細胞の萌出を蛍光染色して観察し、その長さや数を定量解析した。LPA4/LPA6, *Gα12*/*Gα13*, YAP/TAZのsiRNA処理は、細胞萌出の長さや数をそれぞれ有意に低下させた(図8)。この低下が過剰なDLL4発現のためと考えて、DLL4の作用を抑制する目的でNotchシグナル阻害剤であるDAPTを処理したところ、これらsiRNA処理による細胞萌出の抑制が解除され、Control処理と同程度に回復した(図8)。この結果から、LPA4/LPA6-*Gα12*/*Gα13*-YAP/TAZシグナルの低下によるDLL4の過剰な発現が、内皮細胞の細胞萌出を抑制していることが示唆された。

さらにこのDAPTの回復効果は生体の新生血管においても認められた。すなわち、*Lpa4*; *Lpa6*^{ΔEC}マウスにDAPTを前処理すると、網膜の新生血管の分岐数や発芽数、フィロポディア形成の低下がControlマウスと同程度に回復した(図9)。以上の結果は、ECのLPA4とLPA6は、YAPの核移行を促し、DLL4発現を低下させることにより、*in vitro*と*in vivo*の両面で血管新生に寄与することを示唆している。

8. YAP/TAZはβ-カテニンとNICDを介したDLL4発現誘導を抑制させる

次に、核に移行したYAPがどのようにDLL4発現

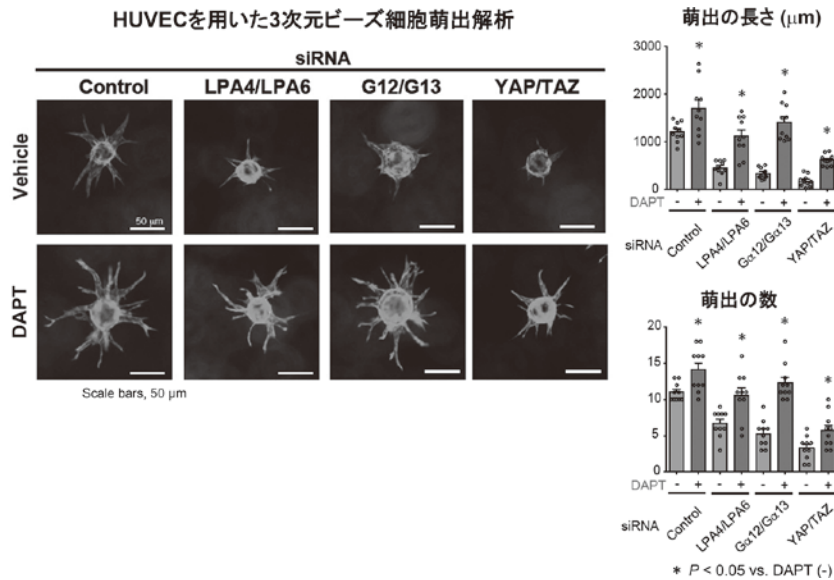


図8. LPA-*Gα12*/*Gα13*シグナルの破綻は血管内皮細胞の萌出を低下させるが、これはNotchシグナル経路の阻害剤により回復する。(文献16より引用、一部改変)

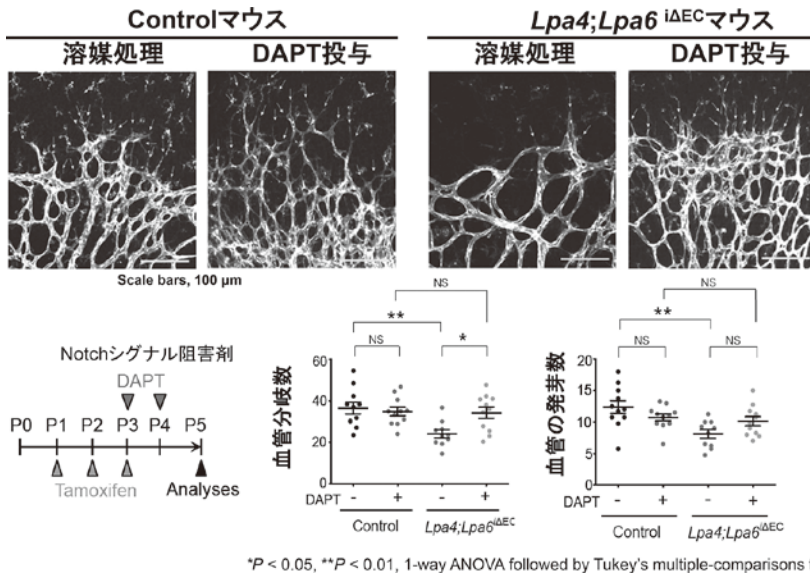


図9. EC 特異的な LPA4 と LPA6 の二重欠損による網膜の新生血管の分岐数と発芽数の低下は、Notch シグナル阻害剤の投与により改善する。(文献 16 より引用、一部改変)

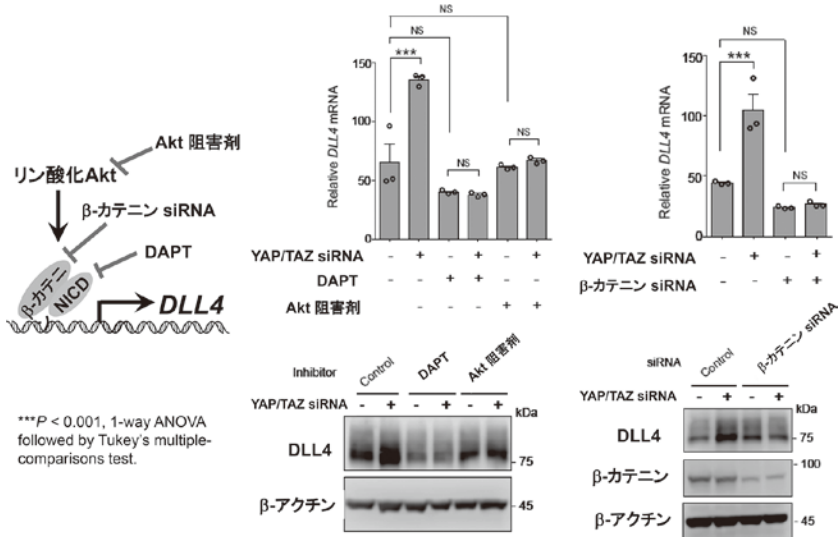


図10. YAP/TAZ は β -カテニンと NICD が促す DLL4 発現を抑制する。(文献 16 より引用、一部改変)

を抑制させるのかを検証するにあたり、リン酸化された Akt が β -カテニンを核移行させ、Notch 細胞内ドメイン (NICD) と協調して DLL4 発現を誘導する報告に着目した^{14,15}。そこで、Akt をリン酸化させることが知られているアンジオポエチン 1、血管内皮細胞増殖

因子 VEGF、ウシ胎児血清 FBS で HUVEC をそれぞれ刺激したところ、YAP/TAZ siRNA の前処理は、それぞれの Akt リン酸化を増強させたことから、YAP/TAZ は血管形成制御因子による Akt 活性化を抑制することが示唆された。さらに、YAP/TAZ の siRNA 処

理によるDLL4発現誘導に、Akt, NICD, β -カテニンがそれぞれ関わるのかを明らかにするために、NICD産生阻害剤であるDAPTやAkt阻害剤、 β -カテニンのsiRNAをそれぞれ処理したところ、YAP/TAZ siRNAによるDLL4の発現誘導は各種阻害剤の投与によりmRNA、およびタンパク質レベルでどれも顕著に抑制された(図10)。以上の結果は、核移行したYAP/TAZがAkt活性化を抑制し、 β -カテニンとNICDによるDLL4遺伝子発現の誘導を抑制することを示唆している。

9. さいごに

本研究により、ECのLPA-LPA4/LPA6シグナルはYAP/TAZの核内移行を促し、DLL4遺伝子の発現を抑制することにより正常な血管新生に寄与することが示唆された¹⁶⁾(図11)。この発見は、従来から知られていたLPAの血管新生作用を担う受容体を同定し、その下流の分子メカニズムを明らかにしたものである。本研究では、核移行したYAP/TAZが核内においてDLL4の発現を抑制させる分子機構を明らかにする目

的で、YAP, NICD, および β -カテニンの直接的な相互作用を検証したが、それを示す明確な実験データは得られなかった。その後、核移行したYAP/TAZが、血管新生制御因子によるAktリン酸化を抑制することを見出したが、その詳細な抑制機構は不明であり今後の課題である。近年、複数の研究グループにより、YAP/TAZが血管新生を制御することが明らかにされているが¹⁷⁻²⁰⁾、本研究によるYAP/TAZ活性化を介したLPAの血管新生の分子機構は、このようなYAP/TAZによる血管新生の制御メカニズムを部分的に説明できるものであり、また、GPCRにより活性化されたYAP/TAZの新たな生理機能を提示するものと思われる。

謝 辞

本研究は本学生体防衛学講座の石井聡教授のご指導の下、教室員の小林さんをはじめ多くの先生方による実験のご助言とご協力を頂き、今回の論文報告に至りました。皆様に心より感謝を申し上げます。

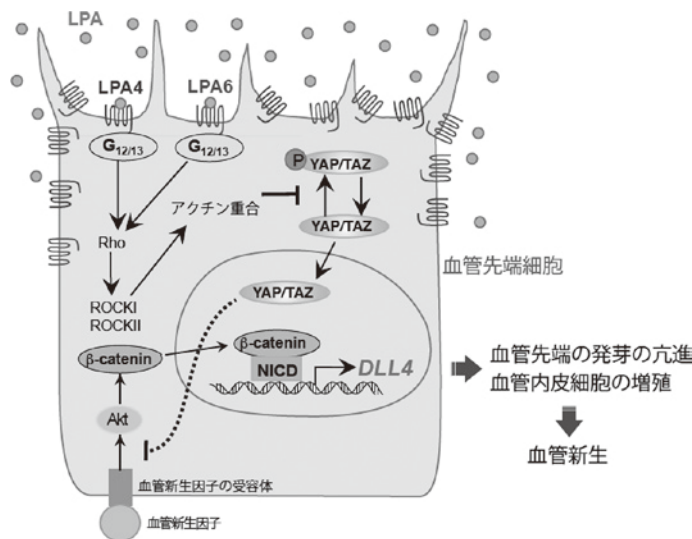


図11. LPA4/LPA6を介したLPAによる血管新生の分子メカニズム

文 献

- 1) van Meeteren, L.A. and Moolenaar, W.H. (2007) Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog. Lipid Res.*, **46**, 145-160.
- 2) Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25600-25606.
- 3) Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., *et al.* (2007) LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J. Biol. Chem.*, **282**, 5814-5824.
- 4) Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., *et al.* (2009) Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J. Biol. Chem.*, **284**, 17731-17741.
- 5) Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., *et al.* (2010) LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*, **116**, 5060-5070.
- 6) Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., *et al.* (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **281**, 25822-25830.
- 7) Gu, J.L., Muller, S., Mancino, V., *et al.* (2002) Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 9352-9357.
- 8) Kamijo, H., Matsumura, Y., Thumkeo, D., *et al.* (2011) Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II. *Genes Cells*, **16**, 1012-1021.
- 9) Ye, X., Skinner, M.K., Kennedy, G., *et al.* (2008) Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biol. Reprod.*, **79**, 328-336.
- 10) Ruppel, K.M., Willison, D., Kataoka, H., *et al.* (2005) Essential role for Galpha13 in endothelial cells during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 8281-8286.
- 11) Trindade, A., Kumar, S.R., Scehnet, J.S., *et al.* (2008) Overexpression of delta-like 4 induces arterIALIZATION and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood*, **112**, 1720-1729.
- 12) Piccolo, S., Dupont, S. and Cordenonsi, M. (2014) The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.*, **94**, 1287-1312.
- 13) Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., *et al.* (2012) Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, **150**, 780-791.
- 14) Zhang, J., Fukuhara, S., Sako, K., *et al.* (2011) Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin. *J. Biol. Chem.*, **286**, 8055-8066.
- 15) Shah, A.V., Birdsey, G.M., Peghaire, C., *et al.* (2017) The endothelial transcription factor ERG mediates Angiopoietin-1-dependent control of Notch signaling and vascular stability. *Nat. Commun.*, **8**, 16002.
- 16) Yasuda, D., Kobayashi, D., Akahoshi, N., *et al.* (2019) Lysophosphatidic acid-induced YAP/TAZ activation promotes developmental angiogenesis by repressing Notch ligand Dll4. *J. Clin. Invest.*, **130**, 4332-4349.
- 17) Kim, J., Kim, Y.H., Kim, J., *et al.* (2017) YAP/TAZ regulates sprouting angiogenesis and vascular barrier maturation. *J. Clin. Invest.*, **127**, 3441-3461.
- 18) Wang, X., Freire Valls, A., Schermann, G., *et al.* (2017) YAP/TAZ Orchestrate VEGF Signaling during Developmental Angiogenesis. *Dev. Cell*, **42**, 462-478 e467.
- 19) Sakabe, M., Fan, J., Odaka, Y., *et al.* (2017) YAP/TAZ-CDC42 signaling regulates vascular tip cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, 10918-10923.
- 20) Neto, F., Klaus-Bergmann, A., Ong, Y.T., *et al.* (2018) YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development. *eLife*, **7**, e31037.