

## 総説

## 血管平滑筋機能における フォスファチジルイノシトール3-キナーゼの役割

木下 浩之\*

## 要約

フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) は多くの細胞内シグナル経路の上流に位置し、心血管系の恒常性維持のほか、代謝制御、免疫機構、血管新生や発ガンに関与することが知られている。活性化 PI3K は、細胞質から細胞膜へと移動(リクルートメント)し、細胞膜上でその作用を発現する。心血管系では PI3K のうちクラス I PI3K の作用が比較的良好に知られ、セリン/スレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼあるいは small GTPase のアダプター蛋白や制御物質など PH ドメインを持つ各種効果蛋白を活性化し、その典型が Akt の活性化である。

PI3K-Akt 経路は、血管内皮のほか血管平滑筋にも存在し、リモデリング、高血圧や糖尿病などの心血管病態の発生に関わっている。各種 PI3K 活性の特異性をうまく応用すれば、薬物流出性ステントに見られるような、本経路に関連する新しい治療の展開につながる可能性もあると考えられる。

## フォスファチジルイノシトール3-キナーゼとは

フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) は多くの細胞内シグナル経路の上流に位置し、心血管系の恒常性維持のほか、代謝制御、免疫機構、血管新生や発ガンに関与することが知られている<sup>1-3)</sup>。PI3K は、活性化すると細胞質から細胞膜へと移動(リクルートメント)し、細胞膜上でその作用を発現する(図1)。活性化した PI3K は、その触媒作用により細胞膜構成成分の一つである

フォスファチジルイノシトールリン脂質(フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルイノシトール4リン酸およびフォスファチジルイノシトール4,5リン酸の三種)のイノシトールリングの3ヒドロキシグループをリン酸化することが知られている<sup>2)</sup>。次いで、リン酸化されたこれらの3-フォスフォイノシタイドは、プレクストリン相同ドメイン(PHドメインなど)をはじめとする特定の脂質結合ドメインに結合したのち、さらに下流のカスケードを活性化し細胞内シグナルを発生させる<sup>2)</sup>。

PI3K は、そのアミノ酸配列や基質特異性を基に、クラス I, II および III の大きく3つに分類されている(図2)。クラス I PI3K は、p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$ あるいは p110 $\delta$ のいずれかの活性サブユニットを中心に構築されているのに対し、クラス II PI3K は、PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$ あるいは PI3K-C2 $\gamma$ の活性サブユニット、クラス III PI3K は vacuolar protein sorting 34 活性サブユニットを要する<sup>3)</sup>。今までのところ、クラス II および III PI3K の細胞内シグナル伝達における役割やその生理的意義は明らかにされていない<sup>3-5)</sup>。したがって、本稿では以下、クラス I PI3K に的を絞って話を進めることとする。

クラス IA PI3K の活性サブユニットは、クラス IA グループ(p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ および p110 $\delta$ )とクラス IB グループ(p110 $\gamma$ )に分類され、その違いは p85 タイプの調節サブユニットに結合できるかどうかであり、クラス IA は p85 タイプに結合可能である<sup>3)</sup>。一方で、クラス IB グループは、p101 調節サブユニットと p87 調節サブユニットに結合することが知られている<sup>3)</sup>。これまでのところ、クラス IA グループ PI3K 活性化のための上流シグナルとしては、

\*愛知医科大学医学部麻酔科学講座

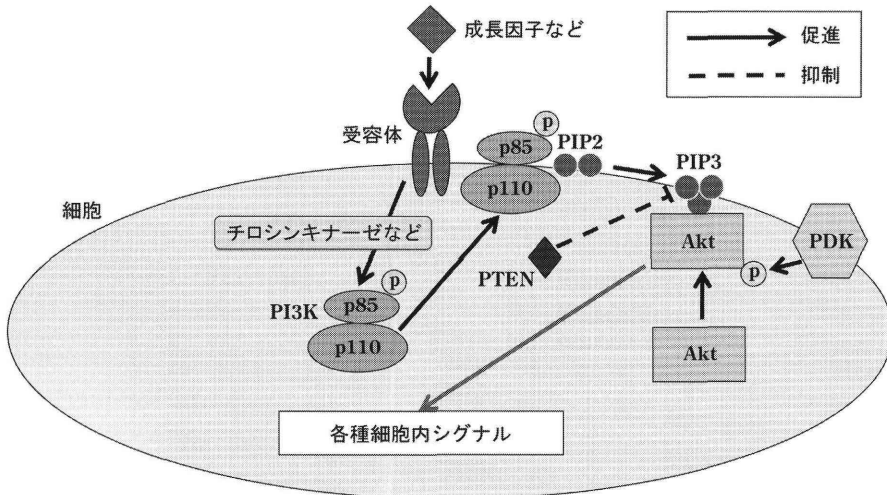


図1 PI3K(クラス IA)-Akt 経路の活性化の概要(木下浩之 Anesthesia 21 Century 2010; 12: 2309-16. 一部改変)  
 PI3K: フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ, PIP2: フォスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸, PIP3: フォスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸, PKD: 3-フォスフォイノシタイド依存キナーゼ-1, -2, PTEN: tension homolog on chromosome ten

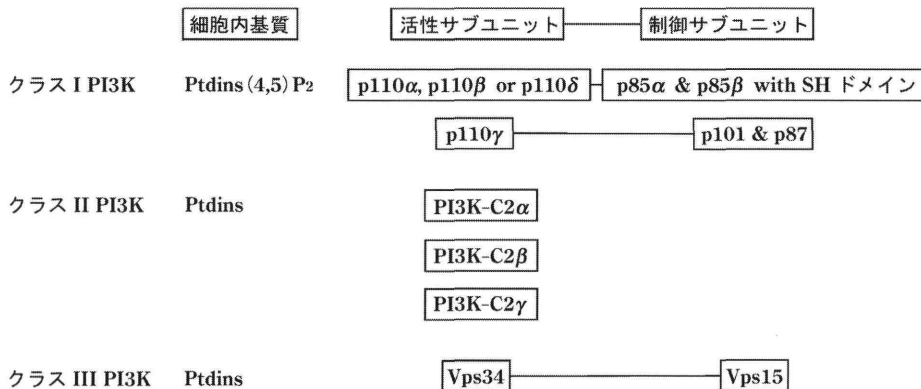


図2 PI3K 分類(Vanhaesebroeck, et al: Nature Rev Mol Cell Biol 2010; 11: 329-41. 一部改変)  
 PI3K: フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ, Ptdins (4,5) P<sub>2</sub>: フォスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸, Ptdins: フォスファチジルイノシトール

チロシンキナーゼ, Ras をはじめとする small GTPase および G 蛋白結合受容体活性物質とされ, クラス IB では G 蛋白結合受容体活性物質のみと考えられている<sup>3)</sup>. クラス IA グループは, 調節サブユニットに, リン酸化チロシンを結合する Src homology 2(SH2) ドメインを持つことから, チロシンキナーゼ活性との強い関与が示唆される<sup>3)</sup>. クラス I PI3K が活性化, すなわち, フォスファチジルイノシトール 4,5 リン酸がフォスファチジルイノシトール 3,4,5 リン酸へとリン酸化を受けると, PH ドメインを持つ各種効果蛋白(セリン/スレオニ

ンキナーゼ, チロシンキナーゼあるいは small GTPase のアダプター蛋白や制御物質など)を活性化することが知られている<sup>3)</sup>. これらのうち古くから知られている経路は, Akt 活性化であり, 不活時に細胞質内に存在する Akt は, 細胞膜へ移動してフォスファチジルイノシトール 3,4,5 リン酸により活性化され, その後遊離して細胞質へ再び移動し, 細胞の生存, 周期, 糖代謝あるいは蛋白合成など様々な生理活性に関与する(図1)<sup>3,6,7)</sup>. 細胞内クラス I PI3K 調節機構としては, フォスファチジルイノシトール 3,4,5 リン酸を脱リン酸化する酵素

PTEN (tension homolog on chromosome ten)の存在が知られている。PTENは血管内皮あるいは平滑筋細胞をはじめとする心血管系の様々な細胞に広く分布しており、クラスI PI3K活性化に拮抗してPI3K-Akt経路を制御すると考えられている<sup>4)</sup>。

### 血管平滑筋細胞のPI3K

PI3K活性化により内皮型酵素による一酸化窒素合成が促進される血管内皮細胞に対し<sup>8,9)</sup>、血管平滑筋細胞では、G蛋白共役受容体活性化薬(フェニレフリンなど)をはじめ種々の刺激が、PI3K-Akt活性化を促して収縮反応を惹起するという内皮細胞と正反対の特色がある<sup>10)</sup>。血管平滑筋ではこのほか、PI3K活性化に呼応する増殖反応の発生がよく知られており、そのことは、血管平滑筋のリモデリングや平滑筋細胞の遊走などをはじめとする血管壁の肥厚や動脈硬化の病理に血管平滑筋でのPI3K活性が関与する可能性を強く示唆するものである<sup>6,11)</sup>。

これまで血管平滑筋細胞で明らかにされてきたPI3K活性化を惹き起こすファクターとして、血小板依存性成長因子、アンジオテンシンII、ノルエピネフリン、エンドセリンなどがあげられる<sup>12~14)</sup>。この中で、血小板依存性成長因子、アンジオテンシンIIは、それぞれp110 $\beta$ あるいはp110 $\gamma$ 活性サブユニットに特異性があり、クラスIAおよびクラスIB PI3Kの関与が示唆される<sup>12,13,15)</sup>。

クラスI PI3KはクラスIA、IBに拘らず、血管平滑筋の電位依存性L-型カルシウムチャネルと強くリンクすることが明らかになった<sup>12)</sup>。クラスI PI3K活性化はこのチャネルを介して血管平滑筋細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルを上昇させ、平滑筋収縮を惹起すると考えられる<sup>12,13,16)</sup>。

### 血管平滑筋PI3K経路が関与する主な血管病態

#### A. リモデリング

血管平滑筋細胞活性化とそれに引き続くマトリックスの蓄積、サイトカインの分泌や細胞分裂が、血管リモデリングの際にその細胞病理として発生することがよく知られている<sup>11)</sup>。このうち、血管平滑筋細胞の増殖は、インターベンションを施した血管部位やベアメタルステントの再狭窄の病態として特に重要視されている<sup>11)</sup>。ラパマイシンで

抑制されるセリン・スレオニンキナーゼの一種エムトール (the mammalian target of rapamycin; mTOR)は血管平滑筋増殖に関与することが知られているが、この経路をPI3Kの非選択的阻害薬ワルトマニンが抑制することが明らかにされた<sup>17)</sup>。冠動脈ステント閉塞および狭窄を抑制する目的で用いられてるシロリムスは、mTOR阻害薬であり、実際にこの研究結果を応用したものである<sup>18)</sup>。さらに、クラスI PI3K活性化に拮抗するPTENの過剰発現は、機械的血管損傷後の新生内膜の増殖を抑制することが明らかにされている<sup>4,19)</sup>。したがって、クラスI PI3K活性の制御は、リモデリングの進行を遅らせる上で重要な役割を果たしていると考えられる。

#### B. 高血圧

デオキシコルチコステロン酢酸-食塩および一酸化窒素合成酵素阻害薬誘発性高血圧ラットでは、血管平滑筋細胞でp110 $\delta$ 活性化が認められる<sup>20)</sup>。アンジオテンシンIIは、p110 $\delta$ 活性を介して血管平滑筋を収縮させる<sup>21)</sup>。これらの研究結果は、血管平滑筋細胞のp110 $\delta$ が様々なタイプの高血圧症発症に関与することを示唆しており、その制御が高血圧治療の新しい方法論となるかもしれない。

#### C. 糖尿病

I型糖尿病ラットでは、血管でのp85およびp110 $\delta$ の発現が増大しており、そのうちp110 $\delta$ の増大は2週間のインスリン治療に抵抗性であった<sup>21)</sup>。これらの結果は、高血糖あるいは糖尿病による平滑筋機能障害へのクラスIA PI3K活性の関与を示唆している。

これまで、ラット血管平滑筋細胞ではAkt活性を介して活性酸素種が発生する可能性が示唆されていた<sup>22)</sup>。そこで我々は、摘出ヒト内皮除去大網動脈で、25.5mmol/Lの高濃度D-ブドウ糖60分暴露によりスーパーオキシド産生が増大するか否か、また、その産生にPI3K-Akt経路の活性化が関与するか否かを検討した<sup>23)</sup>。ヒト血管平滑筋では、高濃度ブドウ糖60分暴露でp85 $\alpha$ 調節サブユニットの細胞膜レベルのみ増大し(図3)、その増大はセリン473およびスレオニン308でのAktリン酸化を伴っていた<sup>23)</sup>。さらに、このクラスIA PI3K活性化に伴い、血管平滑筋でのスーパーオキシド産生が増大することも明らかになった<sup>23)</sup>。我々の研究

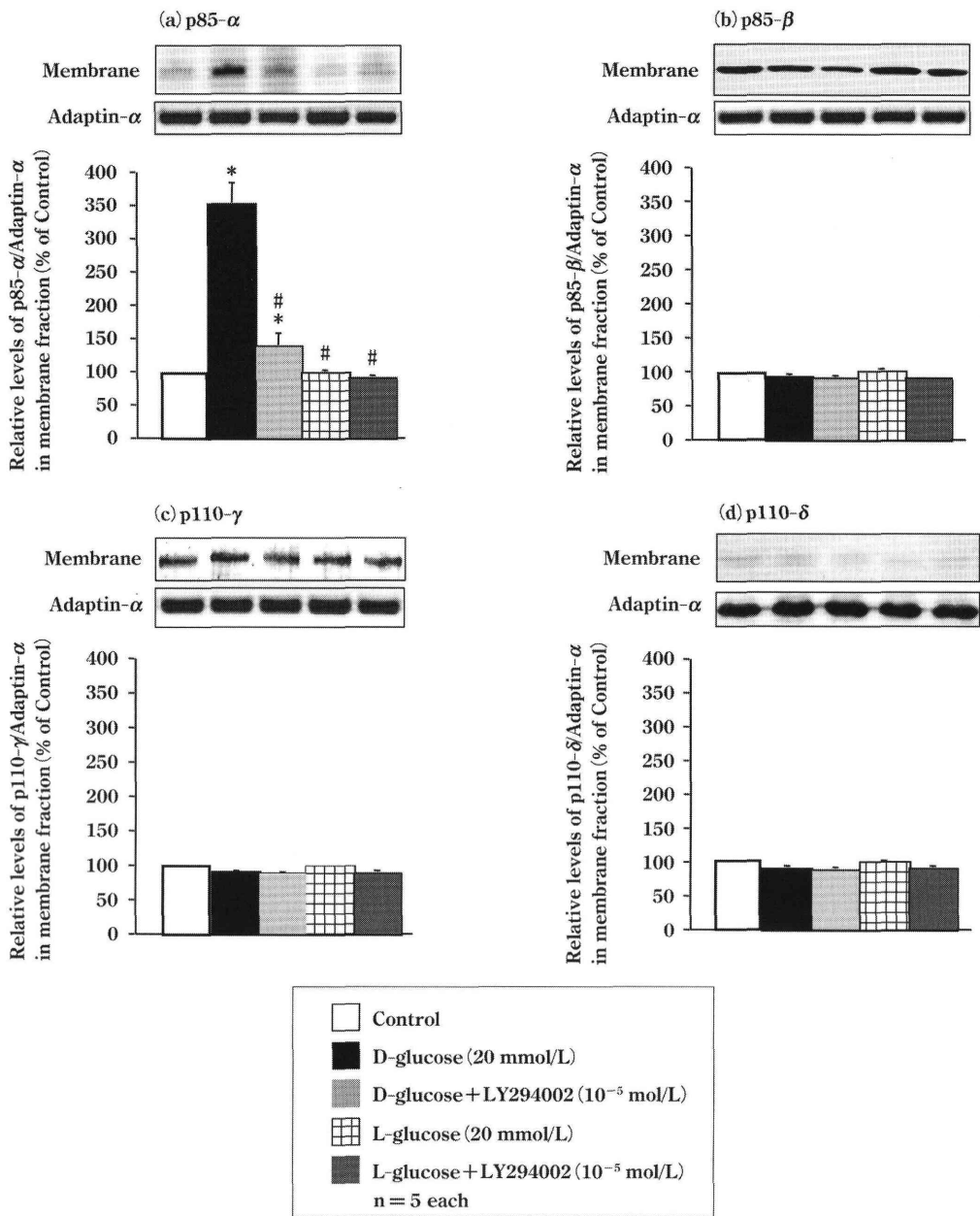


図3 ヒト血管平滑筋への高濃度グルコース暴露と各種 PI3K サブユニットの細胞膜レベル (LY294002 は非特異的 PI3K 阻害薬) (Kinoshita, et al: 2008.一部改変)

では、I型糖尿病ラットでみられた p110 $\delta$ サブユニットの発現増大は認められなかった<sup>21,23</sup>。このことは、ヒト血管組織を用いた研究の有用性を示すことはもとより、ヒトでの高血糖に伴う酸化ストレスの軽減における血管平滑筋の p85 $\alpha$  制御の有用性を示唆しているものと考えられる。

### まとめ

リモデリング、高血圧や糖尿病などの心血管病態における血管平滑筋での PI3K の役割は、様々なサブタイプが存在が故に研究結果の解釈や臨床応用について困難な側面があることは否めない。しかし、その特異性をうまく応用すれば、薬物流出

性ステントに見られるような、この経路に関連する新しい治療の展開につながる可能性もあると考えられる。

## 文 献

- 1) 木下浩之: ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ-Akt 経路と血管病態生理. *Anesthesia 21 Century* 2010; 12: 2309-16.
- 2) Cantley LC: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-7.
- 3) Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, et al: The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 329-41.
- 4) Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, et al: The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 449-71.
- 5) Yoshioka K, Sugimoto N, Takuwa N, et al: Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase  $\alpha$ -isoform in  $Ca^{2+}$ -induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 912-20.
- 6) Sata M, Nagai R: Phosphatidylinositol 3-kinase: a key regulator of vascular tone? *Circ Res* 2002; 91: 273-5.
- 7) Shiojima I, Walsh: Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 90: 1243-50.
- 8) Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597-601.
- 9) Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, et al: Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 17625-8.
- 10) Budzyn K, Marley PD, Sobey CG: Opposing roles of endothelial and smooth muscle phosphatidylinositol 3-kinase in vasoconstriction: effects of rho-kinase and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 1248-53.
- 11) Morello F, Perino A, Hirsch E: Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res* 2009; 82: 261-71.
- 12) Macrez N, Mironneau C, Carricaburu V, et al: Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type  $Ca^{2+}$  channel. *Circ Res* 2001; 89: 692-9.
- 13) Quignard JF, Mironneau J, Carricaburu V, et al: Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 32545-51.
- 14) Clarke CJ, Ohanian V, Ohanian J: Norepinephrine and endothelin activate diacylglycerol kinases in caveolae/rafts of rat mesenteric arteries: agonist-specific role of PI3-kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2248-56.
- 15) Vecchione C, Patrucco E, Marino G, et al: Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K $\gamma$ . *J Exp Med* 2005; 201: 1217-28.
- 16) Viard P, Exner T, Maier U, et al:  $G\beta\gamma$  dimmers stimulate vascular L-type  $Ca^{2+}$  channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J* 1999; 13: 685-94.
- 17) Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, et al: Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1152-8.
- 18) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, et al: Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 103: 192-5.
- 19) Huang J, Niu XL, Phippen AM, et al: Adenovirus-mediated intraarterial delivery of PTEN inhibits neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 354-8.
- 20) Northcott CA, Poy MN, Najjar SM, et al: Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Circ Res* 2002; 91: 360-9.
- 21) Kobayashi T, Hayashi Y, Taguchi K, et al: ANG II enhances contractile responses via PI3-kinase p110 $\delta$  pathway in aortas from diabetic rats with systemic hyperinsulinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H846-53.
- 22) Krieg T, Landsberger M, Alexeyev MF, et al: Activation of Akt is essential for acetylcholine to trigger generation of oxygen free radicals. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 196-202.
- 23) Kinoshita H, Matsuda N, Kaba H, et al: Roles of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and NADPH oxidase in adenosine 5'-triphosphate-sensitive  $K^{+}$  channel function impaired by high glucose in the human artery. *Hypertension* 2008; 52: 507-13.