

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09152

研究課題名(和文)肺高血圧症におけるPIAS1/SUMO化による血管平滑筋分化誘導機構の解明

研究課題名(英文)The role of PIAS1/SUMO1 on pulmonary hypertension

研究代表者

小和瀬 桂子(Kowase, Keiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50594264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肺動脈高血圧症の発症と進展における血管平滑筋細胞分化誘導の調節異常の観点から、PIAS1やSUMO化の機構を解明することを目的とした。肺動脈平滑筋細胞を用いたreal-time PCR法やルシフェラーゼアッセイ法にて、TGFbetaやNotchシグナルが平滑筋分化マーカーを誘導する機序に、PIAS1やSUMO化が関与していることを示した。また、osteoprotegerine(OPG)の発現にもPIAS1やSRFが関与していることを示した。肺高血圧モデルマウスにおいて、TGFbRII、Notch1の発現は肺動脈中膜に多く発現し、OPGやSUMO1の発現は気道上皮細胞に強く認められた。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that the protein inhibitor of activated STAT (PIAS) 1 promotes TGFb-induced activation of SMC gene expression at least in part by promoting sumoylation. Here, we tested the hypothesis that PIAS1 and sumoylation promote pulmonary artery hypertension (PAH). An siRNA specific for PIAS1 and ubc9, an E2-ligase for sumoylation, inhibited TGFb- and Notch1-induced expression of SMC specific genes in cultured pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) as determined by real-time RT-PCR. Expression of osteoprotegerine (OPG) was also inhibited by siRNA specific for PIAS1 and ubc9. Moreover, overexpression of PIAS family and SRF increased OPG promoter activity. Immunohistochemistry of model mice for pulmonary hypertension revealed colocalized expression of TGFbRII, Notch1 and SMC markers in pulmonary artery, whereas SUMO1, OPG and ubc9 were expressed in tracheal epithelial cells. These results could indicate that sumoylation participated in PAH through OPG gene expression.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺高血圧症

### 1. 研究開始当初の背景

特発性肺動脈高血圧症(IPAH)などの肺動脈高血圧症(PAH)は、稀ではあるが、重篤な疾患である。その病態として、肺血管内皮細胞の機能障害により、血管拡張因子と血管収縮因子のバランスが破綻していることが知られている。このため、肺血管の持続的な攣縮や血管平滑筋細胞の増殖、肺動脈内での微小血栓形成が惹起され、肺高血圧の進展につながっていると考えられる。2000年にDeng及びLaneらにより、BMP2型受容体(BMPR2)をコードするBMPR2遺伝子が、家族性肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子の一つとして初めて同定された。現在ではBMPR2遺伝子変異による肺高血圧発症の機序として、肺血管におけるTGFβ/BMP2シグナル伝達系の不均衡という説が一般的である[1]。

血管平滑筋細胞は、周囲の環境に応じてその形質を変化させ、血管の形成、血圧維持、動脈硬化などの病態形成に働く。肺高血圧肺動脈においては、中膜の肥厚、血管平滑筋の増殖が認められるため、肺高血圧症における血管平滑筋細胞の分化調節を明らかにすることは、その病態解明・治療に貢献しうると考えられる。収縮型(分化型)平滑筋細胞では、平滑筋α-アクチン(SMα-actin)、平滑筋ミオシン重鎖(SM-MHC)、SM22α等の分化マーカーの発現が認められる。これまでに、私達のグループを含む多くの研究者が、TGFβシグナル系や、serum response factor (SRF)/myocardinの発現、活性が血管平滑筋の分化・脱分化に重要な役割を担っていることを示した[2]。また、SRFに結合するKrüppel like factor 4(KLF4)等の転写因子が相互に複雑に作用し、積極的に平滑筋分化マーカーの発現を抑制し、平滑筋の形質変換を誘導することも明らかにされつつある[3]。

私達は、血管平滑筋細胞においてclass I bHLH蛋白に結合する因子としてユビキチン様修飾(SUMO)化E3リガーゼ活性を持つprotein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1)を同定し、PIAS1がSRF-CarGシスエレメントを介した平滑筋分化マーカーの発現に重要な役割を担っていることを解明した[4]。また、PIASファミリーはSTAT、SmadファミリーをSUMO化することによってIFNやTGFβシグナル系を制御すること、PPARγ、NFκB、GATAファミリーなどの転写因子活性を制御することが報告されている。さらに、私達は、TGFβによる血管平滑筋細胞の分化シグナルに、PIAS1によるKLF4蛋白のSUMO化が関与していることを示した[5]。

さらに、破骨細胞分化を調節する因子として同定されたosteoprotegerin(OPG)が、血管病変形成に関与することが示されている。PAHにおいては、OPGが肺動脈リモデリングを促進させることなどが報告されている[6]。さらに、私達は、血管平滑筋細胞において、FGF23がOPG発現を誘導することにより、血管石灰化を抑制することを示している[7]。

### 2. 研究の目的

前述の背景を基盤として、私達は、肺高血圧において、血管平滑筋の形質変換という観点から、PIAS1/SUMO化の役割を明らかにすることを目的とした。特に、血管平滑筋の形質変換を誘導するTGFβやNotchシグナルによる平滑筋分化誘導機構へのPIAS1/SUMO化の役割を明らかにすることを目的とした。また、PAHにおいて、OPGが肺動脈リモデリングを促進させることなどが報告されていることより、OPGの発現機序とPIAS1/SUMO化の関連を明らかにすることも目的とした。肺血管におけるPIAS1/SUMO化の役割を解明することで、肺高血圧発症のメカニズムの新たな局面を理解することが可能であり、肺高血圧症の新規治療法の開発にも貢献しうると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1)培養ヒト肺動脈平滑筋細胞(PASMC)を用い、TGFβやNotchシグナルによる平滑筋分化マーカーの誘導にPIAS1やSUMO化が関与しているか否かについて、siRNAを用いて種々のタンパク発現をknock downし、real-time PCR法で検討した。また、PAH発症に関与すると考えられるPDGF-BB、FGF2、IL1βについても同様に検討した。次に、種々の転写因子が結合すると考えられる部位に変異を持つSMα-actinのプロモーター/レポーターコンストラクトを用い、ルシフェラーゼアッセイ法にてNotchシグナルやTGFβシグナルの反応部位を検討した。

(2)近年、破骨細胞分化を調節する因子として同定されたosteoprotegerin(OPG)が、血管病変形成に関与することが示され、PAHにおいては、OPGが肺動脈リモデリングを促進させることなどが報告されている[6]。そのため、OPG発現がNotch、TGFβ、PIAS1と関与するか否かを、OPGプロモーター/レポーターコンストラクトを作成し、293細胞に導入することによりルシフェラーゼアッセイを行った。また、PIAS1やSUMO化のsiRNAを用いて、OPG発現をreal-time PCR法で検討した。

(3)肺高血圧症の病態モデルマウスを作製し、平滑筋マーカーやTGFβRII、Notch1、OPG、PIAS1、SUMO1等の発現を検討した。具体的には、低酸素に加え、VEGF-受容体抗体を用い、よりヒト肺高血圧の病態に近いマウスモデルを作製し、上記検討を行った。また、PIAS1やubc9を発現するアデノウイルスベクターを作成した。

(4)前述のように、肺高血圧と血管石灰化の関与が示唆されていることより、PASMCにアデノウイルスベクターを用いて血管石灰化を調節すると考えられるFGF23を強制発

現し、血管石灰化マーカーである OPG, Runx2, Msx2, BMP4 の発現変化を real-time PCR 法で検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肺動脈平滑筋細胞において、TGFβ や Notch シグナルは PIAS1 を介して平滑筋分化マーカーを誘導する可能性がある。

まず、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞(PASMC)において、TGFβが平滑筋分化マーカーを誘導する機序に、PIAS1 や SUMO 化が関与するか否かを、real-time PCR 法を用いて検討した。PASMC を TGFβで刺激したところ、およそ 24 時間をピークにして平滑筋分化マーカーである SM α-actin, SM22αが誘導された。そして、PIAS1 と SUMO 化 E2 リガーゼである ubc9 の siRNA を用いたところ、PIAS1 を knock down した系で、この誘導は抑制された。この事より、大動脈平滑筋細胞と同様、肺動脈平滑筋細胞においても、TGFβは平滑筋分化マーカーを誘導し、その誘導には PIAS1 が関与していることが示唆された。しかし、興味深いことに、ubc9 を knockdown した系では、TGFβによる平滑筋分化マーカーの誘導は抑制されなかった。これらの事より、肺動脈平滑筋細胞においては、TGFβによる平滑筋分化マーカーの誘導には PIAS1 が関与しているが、SUMO 化の関与は認められない可能性が示唆された。そのため、肺動脈平滑筋細胞の形質変換の機序は大動脈平滑筋細胞と異なる可能性があると考えられた。

また、肺動脈平滑筋細胞に Notch シグナルの細胞内ドメインである N1-ICD を発現するアデノウイルスベクターを感染させると、平滑筋分化マーカーが誘導された。PIAS1 の siRNA を用いたところ、この誘導が抑制されることより、Notch シグナルによる平滑筋分化マーカーの誘導にも PIAS1 が関与していると考えられた。興味深いことに、SUMO 化 E3 リガーゼである ubc9 を knockdown することによってもこの誘導が抑制されることより、TGFβによる平滑筋分化マーカー誘導とは異なり、Notch シグナルによる平滑筋分化マーカーの誘導には SUMO 化が関与している可能性が示唆された。

また、PASMC において、PDGF や FGF2, IL1β刺激により、平滑筋分化マーカー発現は著明に抑制された。同様に PIAS1 や SUMO1 の siRNA を用いたが、PDGF や FGF2, IL1β刺激による平滑筋分化マーカー発現抑制に有意な変化は認められなかった。

次に、種々の転写因子が結合すると考えられる部位に変異を持つ SM α-actin のプロモーター/レポーターコンストラクトを用い、ルシフェラーゼアッセイ法にて Notch シグナルや TGFβシグナルの反応部位を検討した。しかし、PASMC については、トランスフェクション効率が悪く、これらについて有意な差を認めなかった。現在、SM α-actin のプロ

モーター/レポーターコンストラクトをアデノウイルスベクターに挿入し、導入効率を上げて、上記の検討を行っている。次いで、その結合サイトに結合する転写因子を ChIP assay 法にて同定し、sumoylation assay 法にてその結合因子が SUMO 化されるか否かを検討する予定である。

##### (2) 肺動脈平滑筋細胞において、osteoprotegerine の誘導に、Notch シグナルや PIAS1, SRF が関与する可能性がある。

近年、破骨細胞分化を調節する因子として同定された osteoprotegerine (OPG) が、血管病変形成に関与することが示されている。今までに OPG は培養肺動脈平滑筋細胞の遊走や増殖を促進することが他の研究室から示されている。さらに、肺高血圧との関連が強く示唆されている BMP2 が OPG 分泌を抑制することや、炎症性サイトカインで OPG が誘導される点より、OPG が何らかの機序で肺高血圧の病態に関与していることが示されている。また、骨細胞において、OPG は Notch シグナルで誘導されることが報告されている。そのため、私たちは OPG 発現がどのような機序で調節されているかを検討するために、ヒト OPG プロモーター/レポーターコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、OPG プロモーターは、Notch シグナルである RBP-J-κや PIAS family (PIAS1, PIASxα, PIASxβ)、SRF により著明に活性化された。さらに、PASMC において、siRNA を用いて PIAS1 発現を knock down し、real-time PCR 法にて mRNA の発現量を測定した結果、コントロールである GFP に対する siRNA をトランスフェクションした細胞と比べ、PIAS1 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞群において、OPG 発現が有意差を持って抑制されていた。以上の結果より、PASMC における OPG 発現には、PIAS1 や Notch シグナル、SRF が関与していると考えられた。

私たちは過去に、血管平滑筋において、PIAS1 と SRF が相乗的に平滑筋マーカーを誘導することを示しているため、OPG 発現にもこれらの因子が関与している可能性が示唆された。

##### (3) 肺高血圧病態モデルマウスにおける SUMO1、OPG 発現の検討

私たちは、低酸素に加え、VEGF-R 抗体を用い、よりヒト肺高血圧の病態に近いマウスモデルを作製した。このモデルマウスを用い、平滑筋分化マーカーと OPG、SUMO1 の発現を検討した。この実験に先立ち、PIAS1 の抗体作製を試みたが、適切な抗体の作製には至らなかった。そのため、ubc9 の発現を検討した。その結果、OPG の発現は、平滑筋分化マーカーである SM α-actin の発現部位と一致せず、気道上皮細胞に強く認められた。興味深いことに、SUMO1 や ubc9 の発現も平滑筋分

化マーカーの発現部位と異なり、OPG と同一の気道上皮細胞に強く認められた。以上の結果より、OPG と SUMO, ubc9 は気道上皮に発現することが、示された。

また、PIAS1, ubc9 のアデノウイルスベクターを作製した。今後、上記二つのアデノウイルスベクターを、前述した肺高血圧の病態モデルマウスに投与し、右室重量や右心圧を測定する。同時に平滑筋分化や炎症性サイトカイン、OPG の発現を検討する予定である。

#### (4) 肺動脈性肺高血圧と血管石灰化の検討

私達は、現在までに、血管平滑筋において、FGF23 が OPG の発現を増加させ、Runx2 や Msx2, BMP4 の発現を低下させ、血管の石灰化を抑制する事を示した [7]。また、今までに、他の研究室から、肺高血圧患者やラット PAH モデル肺動脈病変で、肺動脈の石灰化が増加しているという報告がある。肺高血圧の肺動脈において、Runx2 の発現が増加しており、Runx2 を介した肺動脈の増殖と石灰化の機序が示されている。

今回、肺動脈平滑筋細胞の増殖および石灰化抑制という観点から、PASMC における石灰化の機序を検討した。PASMC でも同様に、FGF23 が石灰化を抑制するか検討した。アデノウイルスで FGF23 を強制発現させると、肺動脈平滑筋細胞においても OPG の発現が増加していた (real-time PCR 法)。今後、Runx2 や Msx2, BMP4 の発現も検討する予定であるが、FGF23 は肺動脈の石灰化を抑制する事により、肺高血圧の進展を抑制する可能性がある。前述のように、PIAS1 が OPG の発現を誘導する可能性もあるため、今後、PIAS1 が肺血管石灰化にも関与しているか、前述の肺高血圧モデルマウスと PIAS1, ubc9 アデノウイルスベクターを用いて検討していく予定である。

#### <引用文献>

- [1] Newman JH, et al, Ann Intern Med 345:319-324,2001
- [2] Kawai-Kowase K,et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(8):1384-1390, 2004
- [3] Kawai-Kowase K,et al. Am J Physiol Cell Physiol 292:C59-C69, 2007
- [4] Kawai-Kowase K,et al. Mol Cell Biol.25(18):8009-8023, 2005.
- [5] Kawai-Kowase K,et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29(1):99-106, 2009
- [6] Condliff R, et al. Pulmonary Circulation 2(1):21-27, 2014
- [7] Nakahara T, et al. Atherosclerosis. 20;253:102-110. 2016

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Sunaga H, Utsugi T, Iso T, Arai M, Tomono S, Kurabayashi M. Fibroblast growth factor 23 inhibits osteoblastic gene expression and induces osteoprotegerin in vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis. 20;253:102-110. 2016 (査読有り)

[その他]

ホームページ等

<http://gunma-u-med2.jp/>

医療グループ/医療グループ-循環器内科/  
基礎研究・小和瀬グループ/

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

小和瀬 桂子 (KOWASE, Keiko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：5 0 5 9 4 2 6 4

(2)研究分担者

倉林 正彦 (KURABAYASHI, Masahiko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：0 0 2 1 5 0 4 7