

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09683

研究課題名(和文) 胸部大動脈瘤破裂をきたす遺伝性疾患治療を目指した血管平滑筋細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) The role of the heterotrimeric G protein, Galpha12/13 in differentiation and proliferation of smooth muscle cells.

研究代表者

鈴木 信周 (Suzuki, Nobuchika)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：90247007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性大動脈瘤形成の病理には、血管平滑筋細胞(SMC)分化・増殖の異常が考えられている。本研究結果から、SMC分化の過程で、三量体G蛋白G12ファミリーであるG₁₂とG₁₃が、それぞれ全く違ったシグナル伝達経路を活性化してSMC分化に寄与する事が明らかになった。更に、G₁₂のリン酸化が、分化シグナルの活性化維持に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Losing a balance between differentiation and proliferation of smooth muscle cells causes the hereditary aortic aneurysms. Our study indicates that a heterotrimeric G protein, Galpha12 activates the pathway divergent from Galpha13. Phosphorylation of Galpha12 by TGFbeta stimulation may sustain the activation of the pathway.

研究分野：生化学

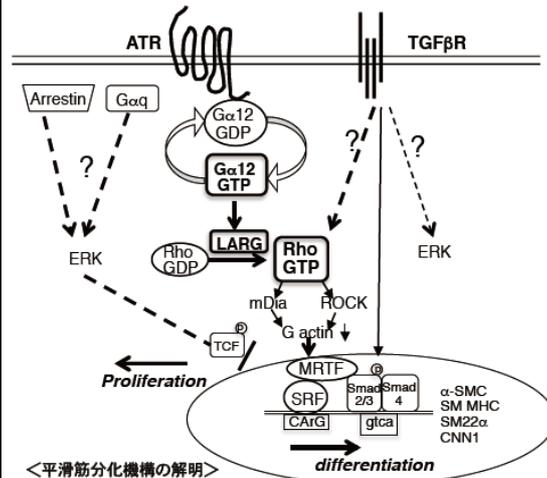
キーワード：平滑筋分化 三量体G蛋白 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

胸部大動脈瘤破裂の殆どは遺伝性疾患に起こり、小児期突然死の大きな要因ではあるが有効な治療法が無かった。しかし、ここ数年で精力的に責任遺伝子が同定され、“ TGFβシグナルの異常” [マルファン症候群 - fibrillin-1、Loeys-Dietz syndrome (LDS) - TGFβ受容体 TGFβR1、R2 または Smad3] と、“収縮型平滑筋に必要なユニットの欠如” [家族性 ACTA2 (α-smooth muscle actin)、MYH11 (smooth muscle myosin)] が示唆された (Dietz et al. 1991; Guo et al. 2007; Loeys et al. 2005; Zhu et al. 2006; van de Laar et al. 2011)。それを基に作製されたモデルマウスでは、大動脈起始部中膜構造異常 - 平滑筋細胞 (SMC) の異常、その結果としての弾性線維非組織化 - が認められた。共通する病態として、< 1 > “ TGFβシグナルの過剰”、< 2 > “ 発生学的 SMC 分化異常” の二つが浮かび上がった (Lindsay and Dietz, 2011; Ailawadi et al. 2009; Mack 2011; Loeys, 2014)。更なるブレイクスルーは、ヒト、モデルマウスに対する angiotensin receptor blocker (ARB) の大動脈瘤拡大抑制効果の報告であった (Brooke, 2008; Loeys, 2014)。既存の薬剤が生後投与で有効性を示した事は、患者と医師に大きな希望をもたらした。現在 USA では、Phase3 まで進んだ。transforming growth factor β (TGFβ) 抗体の生後投与もモデルマウスで有効と報告された。私達は本課題において、“過剰の TGFβが、クロストークする Ang II シグナル伝達系にも異常を起こし、平滑筋細胞分化障害を惹起させる” という仮説を立てる。

SMC は他の分化細胞と異なり、高度な可塑性を持って外的環境に適応する。収縮型 (分化型) と、増殖能・移動能・細胞外基質合成能を有する合成型 (脱分極、未分化) を可逆的に移行する。さらに二つの特性を併せ持つ事もある。この可塑性の欠損が血管病変を

引き起こすと考えられる。SMC 分化は、転写レベルでは詳細に解明されている (図)。Serum response factor (SRF) は Myocardin-related transcription factor (MRTF) が結合すると、CArG box に結合し、



分化に方向へ転写が開始する。ERK によりリン酸化された ternary complex factor (TCF) が結合すると増殖に進む。MRTF が核内に移行して SRF と結合するには、低分子量 G 蛋白質 Rho を介した活性化が必要である。TGFβ は TGFβR1、2 を介して Smad2/3 をリン酸化し核移行させる Canonical pathway 以外に、詳細は不明だが ERK、Rho も活性化する。TGFβ から Smad 複合体を介した SMC 分化は、CArG/SRF 依存性であり、Rho の活性化が必要である。Ang II は三量体 G 蛋白質、Gα12、Gα13、Gαq どれとも同時に共役する G 蛋白共役型受容体 (GPCR)、Angiotensin 受容体 (ATR) を介して Rho を活性化する。つまり、TGFβ、Ang II 細胞外シグナルは Rho に合流する。一方で、Rho は SMC の増殖にも不可欠である。増殖と分化は排他的なものではない。Rho の多能性が、活性化経路の解析を難しくさせている。私達は未だ不明な Rho 活性化機構の解明を目指す。分化増殖の過程で“いつ”、“どの経路が”、Rho を活性化させるのかを理解する。

Rho 活性化の強力なドライバーは G12/13 ~ RH-RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor) [RH ドメインを有する Rho 活性化因子、Leukemia-associated RhoGEF (LARG)、

PDZ-RhoGEF、p115RhoGEF の三種]からのシグナルである。私達はこの Rho 活性化経路の研究を続けてきた (Suzuki, 2009a b & 2003)。Offermanns らは血管平滑筋特異的な Gq/G11 ノックアウトマウス、G12/13 ノックアウトマウスの血管修復モデルで比較から、Gq は SMC 増殖に、G12/13 は SMC 分化に寄与することを報告した (Althoff, 2012)。

そこで私達は、G12/13 ~ RH-RhoGEF~RhoA シグナルに注目した。TGFβにより SMC に分化するマウス中胚葉由来多能性細胞 10T1/2 の系を使って、独自に開発した Gα12 抗体を用いてショットガンプロテオミクスを行い、形成されるタンパク複合体を継時的に解析した。その結果、SMC へ分化すると、Gα12 と LARG の蛋白発現が上昇し、LARG 活性化のシグナルが作動する事がわかってきた。この結果を基に研究を進める。

2 . 研究の目的

本研究の目的は平滑筋分化・増殖に重要な細胞内シグナルの活性化機構、分子を同定して、小児胸部大動脈瘤治療薬開発の基盤を確立する事である。胸部大動脈瘤破裂の殆どは遺伝性疾患の大動脈基底部に起こり、小児期突然死の大きな要因であるが、有効な治療法は無かった。ここ数年で遺伝性疾患の責任遺伝子が同定され、モデルマウスの解析も進み、疾患に共通して TGFβシグナル活性と血管平滑筋細胞分化の異常が見出された。更に、ARB が大動脈瘤拡大を抑制するというブレイクスルーもあった。私達は本課題で、“ 過剰の TGFβが、クロストークする angiotensin II (Ang II) シグナル伝達系にも異常を起こし、平滑筋細胞分化障害を惹起させる ” という仮説を立てた。低分子量 G 蛋白質 Rho 活性化に注目して疾患シグナルを解明する。

[1] 平滑筋分化、増殖で活性化される Rho 活性化シグナル経路・分子を同定する。

分化、増殖に特異的で重要な Rho 活性化シグナル経路、分子をそれぞれ同定する。

<1-1>ATR と共役する Gα12、Gα13、Gαq シグナル活性の評価

TGFβによる 10T1/2 細胞の平滑筋細胞分化の系で、Gα12、Gα13、Gαq 抗体を用いてショットガンプロテオミクスを行い、活性化によって形成された複合体を経時的に追跡し、比較検討して、重要なシグナルを同定する。更に、LARG、p115RhoGEF、PDZ-RhoGEF 抗体でも解析を行う。

<1-2> TGFβによる canonical な経路(Smad)、non-canonical な経路 (Rho、ERK) 活性の評価

<1-3> 分化に伴う RH-RhoGEF リン酸化修飾の同定

RH-RhoGEF の活性化にはリン酸化も関与することを、私達も報告している (Guilluy, 2010; Suzuki, 2003)。

<1-4> TGFβ過剰投与、ARB 投与による上記シグナルの変化を理解する。

大動脈瘤疾患群の病因と考えられる過剰量の TGFβを投与してシグナルの変化を見る事は、疾患の理解に非常に有用と考えられる。更に、ARB 投与下でどのシグナルが変化するのかを解析する。

[2] 標的分子の活性を調節して平滑筋分化・増殖シグナルを分解する。

1. で決定した分化・増殖の標的因子を TGFβ刺激無しに強制発現、または TGFβや Ang II 刺激下でノックダウンまたはノックアウトする事で、分化・増殖が調節可能になるかを検討する。

[3] TGFβ刺激による Gα12 活性化機序を解明する。

予備実験において上記が確認されたが Gα12 の活性化の機序は、オートクラインによる GPCR の活性化によるのか、または他のレベルでの活性化なのか全く不明である。

3 . 研究の方法

TGFβと Ang II シグナルのクロストークによる SMC 分化調節機構を解明する。活性化され

た蛋白複合体を捕獲するための、Gα12、Gα13、Gαq、LARG、p115RhoGEF、PDZ-RhoGEF に対する高感度・高特異性モノクロナル抗体は作成済みである (Iwanari et al., 2011, Patel et al., 2014, Rusu et al., 2014, Chow et al., 2013)。ショットガンプロテオミクスによりシグナル特異的蛋白複合体を捕獲し質量分析で網羅的に解析して、平滑筋分化に重要な、細胞外刺激から Rho 活性化に至るシグナルを解明し、創薬のターゲットを同定する。平滑筋分化マーカー (α-SMC、SM-MHC、SM22α、CNN1) の発現、増殖マーカー (c-fos、E1k1) の発現、Rho 活性化 (Rhotekin プルダウンアッセイ、MRTA 核内移行)、Smad 活性化 (リン酸化、核移行)・ERK 活性化 (リン酸化) を生化学的、細胞生物学的解析法で評価する。以上の手法は、時間もかかるため、ハイスループットな Rho 活性化の評価には SRF ルシフェーラスアッセイを、平滑筋分化の評価に α-SMC、SM22α のプロモーター・ルシフェーラスアッセイを行う (Medlin et al., 2010, Suzuki et al., 2003)。機能解析のための Gα12、Gα13、Gαq、RH-RhoGEF 蛋白は私達が既に確立している Sf9-baculovirus 系で大量精製する。

1. 平滑筋分化、増殖で活性化される Rho 活性化シグナル経路・分子を同定する。

分化、増殖、に特異的な重要で Rho 活性化シグナル経路、分子をそれぞれ同定する。

1-1. ATR と共役する Gα12、Gα13、Gαq シグナル活性の評価

既に確立されている、10T1/2 細胞を TGFβ 1 ng/ml で SMC に分化させる系をモデルとする (Xie et al., 2011)。活性化されたシグナル複合体を経時的に追跡するため、Gα12、Gα13、Gαq 抗体を用いてショットガンプロテオミクスを行い、比較検討して、重要なシグナルを抽出する。更に、LARG、p115RhoGEF、PDZ-RhoGEF 抗体でも解析を行う。本法は、本実験遂行の根幹となるが、前述のように予

備実験で成功しているため、確実に実験は進められる。

1-2. TGFβによる canonical pathway (Smad)、non-canonical pathway (Rho、ERK) 活性化の評価を行う。

1-2. TGFβによる canonical な経路 (Smad)、non-canonical な経路 (Rho、ERK) 活性化の評価

1-3. RH-RhoGEF のリン酸化修飾の同定

RH-RhoGEF の活性化にはリン酸化も関与することを、私達や他のグループも報告している (Guilluy, 2010; Suzuki, 2003)。分化に伴ったリン酸化の部位を同定する。同定された部位の変異体 (A に置換した非リン酸化型、または D に置換したリン酸化型) 作製し細胞内に強制発現し影響を見る。更に Gα12/13 ~ p115RhoGEF 変異体 ~ RhoA を蛋白で再構成し [3H]-GDP の RhoA からの解離を指標に GEF 活性を測定する (Suzuki et al., 2003, Suzuki et al., 2009, Tanabe et al., 2004)。

1-4. TGFβ過剰投与、ARB 投与による上記シグナルの変化を理解する

LDS はヘテロ接合体であり、野生型 TGFβ R は、インタクトなシグナル活性を保持している事が解っている。そこで、大動脈瘤疾患群の病因と考えられる過剰量の TGFβを投与して 1-1、1-2 と同様の実験を行い比較検討する。更に、ARB 投与下でどのシグナルが変化するのかを解析する。

インテグリンシグナルからの入力も、10T1/2 細胞の系では考慮していない。しかし、メカニカルストレスが SMC の分化に重要な役目を果たすことはよく知られている。そこで、ファイブロネクチンコーティングによりインテグリンシグナルを刺激したり、抗体を用いて遮断したりすることも考える。

1-5. 以上の結果を総括して、シグナルのクロストークのチャートを作成し、標的分子を同定する。

2. TGFβ刺激による Gα12 活性化機序を解明

する。

前述のように予備実験において 10T1/2 細胞を TGFβ 1 ng/ml で SMC に分化させると、Gα12 が活性化された。無血清培地での単培養であることを考えると、Gα12 がオートクラインにより GPCR を介して活性化されたのか、リガンドなしで GPCR がトランスアクチベーションされたのか、または Gα のレベルでの活性化なのか全く不明である。分化時 SMC のアンギオテンシン変換酵素活性の上昇は報告されている。そこで培養液中のアンギオテンシノーゲン を ELISA 法で測定する。また、Gα のリン酸化等の蛋白修飾が同定されれば、上記と同様変異体を作製して細胞実験、再構成実験を行う。上記実験結果を総合的に解析し、機序を解明する。

4. 研究成果

遺伝性大動脈瘤形成の病理には、血管平滑筋細胞 (SMC) 分化・増殖の異常が考えられている。低分子量 G 蛋白 Rho は SMC 分化・増殖の調節において重要な役割を果たすと考えられているが詳細は不明である。本研究結果では、SMC 分化の際に、Rho 活性化の強力なドライバーである三量体 G 蛋白、G12~

Leukemia-associated RhoGEF (LARG) シグナル伝達機構が作動している事が明らかになった。SMC 分化の過程では、どちらも三量体 G 蛋白 G12 ファミリーに属して、生理機能の違いが不明であった、G12 と G13 が、それぞれ全く違ったシグナル伝達経路を活性化する事も明らかにした。更に、G12 のリン酸化が、分化促進シグナルの伝達に影響を及ぼすことが示唆された。同定したリン酸化によって、G12~LARG シグナル活性化が遷延される可能性を見出した。

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 2件)

1. Helms MC, Grabocka E, Martz MK, Fischer CC, Suzuki N, Wedegaertner PB. (2016) Mitotic-dependent phosphorylation of leukemia-associated RhoGEF (LARG) by Cdk1. Cell Signal. Jan;28(1):43-52. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.10.004.

2. Watanabe S, Ogasawara T, Tamura Y, Saito T, Ikeda T, Suzuki N, Shimosawa T, Shibata S, Chung UI, Nangaku M, Uchida S. Targeting gene expression to specific cells of kidney tubules in vivo, using adenoviral promoter fragments. (2017) PLoS One. Mar 2;12(3):e0168638. doi:10.1371/journal.pone.0168638.

[学会発表](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木信周 (Suzuki, Nobuchika)
日本医科大学・大学院医学研究科・
研究生
研究者番号: 90247007

(2) 研究分担者

川村猛 (Kawamura, Takeshi)
東京大学・アイソトープ総合センター・
准教授
研究者番号: 70306835
研究者番号: