

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15407

研究課題名(和文)新規手法による心血管発生・形態形成関連因子の機能解析

研究課題名(英文) Novel approaches to analyze the regulatory mechanisms of cardiovascular genes in development and morphogenesis

研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA, Osamu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：40283593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：心血管系の発生と形作りのメカニズム解析は、先天性心血管奇形・遺伝性血管病などのヒト疾患の病因解明に必須の研究テーマである。本研究において、私たちが報告した新しい血管特異的遺伝子の発現を規定する機構や分子としての機能・働きを明らかにするための研究、特にCRISPR/Cas9遺伝子編集や遠位転写エンハンサー解析を用いた取り組みを行った。この遺伝子の欠損によってマウスの血管形成の重篤な異常が生ずることが判明しており、当該遺伝子の発現と機能を制御するシグナル伝達系はヒト疾患の病態機序に深く関与する。今後、当該遺伝子のヒト疾患における意義を検討することも重要な研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein 9 (BMP9)/BMP10-ALK1 receptor signaling is essential for endothelial differentiation and vascular morphogenesis. Mutations in ALK1/ACVRL1 are implicated in human vascular diseases, and the Alk1/Acvrl1 deletion causes impaired vascular formation and embryonic lethality in mice. We previously identified Tmem100 to be an endothelium-enriched gene activated by the ALK1 signaling. Tmem100 null mice showed embryonic lethality due to the defects of vascular morphogenesis. In this study, we introduced novel experimental approaches using CRISPR/Cas9 gene editing and bacterial artificial chromosome-based distant enhancer reporters. In transgenic mouse analysis, we narrowed down the Tmem100 enhancer region for embryonic vascular expression, which showed characteristic activity in a subset of arterial endothelial cells. Further studies are ongoing in our laboratory to clarify the significance of Tmem100 in vascular development and disease.

研究分野：血管生物学 発生学 周産期・新生児医学

キーワード：心血管発生 シグナル伝達 遺伝子発現調節

## 1. 研究開始当初の背景

心血管系の発生・形態形成は胎児(胎仔)の発育に必須であり、ペプチド性増殖因子とキナーゼ型膜受容体、生理活性脂質 S1P と G タンパク質共役型受容体、D11/Jag 膜リガンドと Notch 受容体など、多様なリガンド・受容体による伝達メカニズムを有するシグナルが心臓・血管形成を制御している。シグナル伝達の異常は先天性心血管奇形の原因となるばかりでなく、虚血や癌血管新生など、生後の循環器系疾患の病態にも深く関与する(総説: Potente et al., *Cell* 2011)。

私たちはこれまで心血管系の発生・形態形成を制御するシグナル伝達機構とヒト疾患における意義の研究を行ってきた。例えば、心筋・骨格筋の発生・機能制御に働くリン酸化酵素・転写コファクター (Gottlieb et al., *Nat Genet* 2002, Murakami et al., *PNAS* 2005, Nakagawa et al., *Genes Dev* 2005 など)、Notch 系および bone morphogenetic protein 9 (BMP9)/BMP10-ALK1 受容体系の下流で働く HEY 転写調節因子 (Nakagawa et al., *PNAS* 2000, Xin et al., *PNAS* 2007, Morioka et al., *genesis* 2015, Fujita et al., *Mech Dev* 2016 など) を同定して、その意義を明らかにしてきた。

血管発生は、前駆細胞による血管内皮網の形成 (Vasculogenesis)、動脈・毛細血管・静脈を有する成熟血管構築へのリモデリング (Angiogenesis) のステップに大別されるが、BMP9/BMP10-ALK1 シグナル伝達系は Angiogenesis における内皮細胞分化に必須であり、ALK1 欠損によってマウス胎仔は致死となる。また、ALK1 および共役因子の遺伝子変異はヒト遺伝性血管疾患 Osler 病 (Hereditary hemorrhagic telangiectasia: HHT) の原因となり、肺動脈性肺高血圧症の病因にも深く関与する(総説: Beets et al., *Trends Genet* 2013)。血管内皮細胞に特異的に発現する ALK1 受容体はコファクターと複合体を形成し、リガンドである BMP9・BMP10 の結合による自己リン酸化を生ずると SMAD 転写調節因子のリン酸化・活性化により下流遺伝子群の発現制御を生じさせる。また、SMAD 非依存的に MAP キナーゼファミリーの活性化を生ずる副次的経路も知られている(総説: Garcia de Vinuesa et al., *Cytokine Growth Factor Rev* 2016)。

このように、BMP9/BMP10-ALK1 シグナルの生物学的・臨床的意義は大きいですが、その下流でどのような分子が働くかについては不明の点が多い。

## 2. 研究の目的

私たちは近年、BMP9/BMP10-ALK1 シグナル系の下流遺伝子のスクリーニングを行い、内皮特異的に発現する新しい BMP9/BMP10-ALK1 シグナル下流遺伝子 Tmem100 を同定した

(Somekawa et al., *PNAS* 2012)。Tmem100 は膜貫通領域を有する遺伝子のリストにおいて Transmembrane Protein No. 100 と命名されていたが、その生理的意義は解析されていなかった。

興味深いことに、Tmem100 ノックアウトマウスは ALK1 ノックアウトマウスに酷似した血管異常を示して胎生期に死亡し、Tmem100 が ALK1 シグナル系の新しい下流因子として心血管発生に必須であることが示された。また、Tmem100 ノックアウトマウスが胎生期動脈の Notch シグナル抑制・動脈型内皮分化阻害を示すことより、Tmem100 は新しい内皮分化制御因子として働くと考えられた。さらに、Tmem100 ノックアウトマウスは心内膜床形成過程における内皮間葉細胞転換に著しい障害を示し、Tmem100 が心臓形態形成にも重要な役割を有することが示された (Mizuta et al., *Dev Dyn* 2014)。しかしながら、新しいカテゴリーの膜タンパクである Tmem100 が分子としてどのような直接機能を有するのか、BMP9/BMP10-ALK1 シグナル下流で Tmem100 の内皮細胞発現がどのように制御されるか、については不明のままである。

ヒト血管病の直接の原因となる BMP9/BMP10-ALK1 系の分子メカニズムを明らかにすることは、臨床医学への発展・応用も大いに期待される重要な研究である。そこで今回、先進的実験法を組み合わせ、新しい胎生期心血管遺伝子である Tmem100 の分子機能と発現調節機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 遺伝子編集は既報 (Harrison et al., *Genes Dev* 2014) に従ってマウス受精卵に対するエレクトロポレーションを用いて行った。組換えマウスの系統確立・遺伝子配列確認・Western blot 解析は一般的な方法により行った。

培養ヒト臍帯動脈内皮細胞 (human umbilical artery endothelial cell, HUAEC) における BMP9/BMP10-ALK1 シグナル活性化は既報 (Somekawa et al., *PNAS* 2012) に準じて BMP9 添加によって行い、RNA サンプルを Agilent 社製 Microarray chip を用いた網羅的発現解析に用いた。個別遺伝子の mRNA 発現の検証は realtime RT-PCR 解析および Western blot 解析によって行った。

Tmem100 遺伝子領域を含む Bacterial artificial chromosome (BAC) クローンをを用いて大腸菌内相同組換えによる LacZ レポーター作成 (Watanabe et al., *PNAS* 2012) を行い、トランスジェニックマウス胎仔における転写活性解析を行った。さらに胎生期血管内皮特異的転写活性を示した Tmem100-BAC クローンをを用いて、同じく大腸菌内相同組換え・トランスジェニックマウス技術によって EGFP レポーターマウスを作成し、FACS ソーティングに供した。マウス胎仔の遺伝型決定・

サンプリング・組織学解析は一般的な方法を用いて行った。

#### 4. 研究成果

これまでの研究において、私たちはTmem100が主に小胞体に局在する膜タンパクとして内皮細胞のカルシウムシグナル調節に関与する可能性を示唆したが、直接の分子機能メカニズムは不明のままであった。Tmem100は約120アミノ酸からなる小型タンパクであり、他の膜分子と複合体を形成して働くことが示唆されたが、構造が類似したファミリー分子が存在せず、機能を推測することができない。そこで今回、Tmem100の分子機能解明の足がかりとして、Tmem100と複合体を形成して働く分子の同定を試みることを計画した。まず、*in vivo*発現パターン、つまり胎生期内皮における生理的レベルの発現を反映したスクリーニングを行うため、CRISPR/Cas9法を用いて、Tmem100遺伝子をエピトープタグ標識Tmem100型に改変した組換えマウスを作成した。今回一本鎖オリゴDNAを用いたTmem100遺伝子へのエピトープタグ配列の挿入に成功し、複数種類のエピトープタグ標識Tmem100発現マウス系統を確立したが、胎仔組織を用いたエピトープタグ抗体によるWestern blot解析・免疫組織学解析においてエピトープタグ標識Tmem100の発現を確認することができなかった。私たちは以前Tmem100分子の完全欠失が胎生致死性を引き起こすことを示しており、エピトープタグ標識Tmem100遺伝子座のホモ接合体マウスは出生し成長可能であったことより、これらの組換え遺伝子座における適正レベルのTmem100分子発現は保たれていると考えられる。今回用いたエピトープタグが、マウス胎仔組織において抗原性を失う翻訳後修飾を受ける可能性が考えられ、新しい種類のエピトープタグを用いた解析を試みる計画である。あるいは、今回計画した解析に供するにはTmem100遺伝子編集によるエピトープタグ標識分子発現のレベルより高い発現量が必要な可能性も考えられ、VE-cadherinやTie2などの血管内皮特異的エンハンサー・プロモーターを用いたトランスジェニックマウス系統の作成も必要である可能性がある。

一方、内皮細胞のTmem100発現はBMP9あるいはBMP10によるALK1受容体刺激に反応して著しく亢進するが、Tmem100 mRNA発現亢進はタンパク合成阻害剤によって完全に抑制され、ALK1シグナルにより新規に産生される未知のタンパク分子がTmem100発現亢進を仲介していることが示唆された。また、染色体DNA高次構造を制御するエピゲノム因子CTCF・Rad21のsiRNA処理によってTmem100の発現亢進が顕著に抑制されることより、遠位に存在するエンハンサーの立体的配置による転写制御の重要性が示唆された。この特徴は、タンパク合成を介さないSMAD転写因子のリン

酸化・活性化により転写制御を受ける既知のALK1ターゲット遺伝子 (ID1、HEY1など) の制御様式と全く異なり、BMP9/BMP10-ALK1下流遺伝子の新しい発現調節メカニズムとして注目された。そこで今回私たちは培養内皮細胞を用いて、BMP9刺激により早期の発現亢進を示す遺伝子群を網羅的解析により同定した。これらの遺伝子群より転写調節因子、転写調節因子の機能を正負に制御するシグナル分子を選択してTmem100発現制御因子の候補とした。BMP9刺激後2時間および6時間において有意なmRNA発現亢進を示す遺伝子は19種類存在し、それらのうちWestern blot解析によって確認を行うことが可能であった遺伝子については、タンパクレベルでも発現亢進を示していることが示された。候補19遺伝子は転写調節因子、リン酸化酵素などをコードしており、これらがBMP9/BMP10-ALK1シグナル活性化によるTmem100発現活性化現象のメディエーターとして働く可能性が示唆された。

先述のように、Tmem100の遺伝子発現制御には遠位エンハンサーの働きが重要であることが示唆されており、今回私たちはさらにTmem100発現に対する遠位染色体DNA領域の重要性を検討した。まずTmem100遺伝子の5'側・3'側それぞれ約200kb領域を含むBACクローンをを用いて、大腸菌内相同組換えによってTmem100遺伝子座にLacZカセットをノックインしたレポーターを作成した。このBACレポーターのトランスジェニックマウスを作成して胎仔F0解析を行ったところ、Tmem100遺伝子のマウス胎仔血管内皮特異的発現を再現するエンハンサー活性を確認することができた。その後のBACレポーター改変とトランスジェニックマウス解析によってエンハンサー領域の絞り込みを進め、現在約40kbの領域に胎生期血管内皮遺伝子発現活性が存在することを明らかにしている。今後さらなるエンハンサー領域の絞り込みを行ってcisエレメント解析を行い、さらにエンハンサー活性を制御するトランス因子の同定を試みる計画である。

私たちはこれまでに、Tmem100の血管内皮発現様式が典型的な血管内皮遺伝子と異なっており、中大動脈に強く発現するのに対し、小血管には発現が乏しいことを報告している (Somekawa et al., *PNAS* 2012)。今回作成したTmem100-BACレポーターはこの特徴をよく再現しており、今後このエンハンサーは中大動脈特異的なマーカー発現を実現する研究ツールとしての有用性も期待される。実際私たちはTmem100-BACを用いたEGFPレポーターマウスを作成しており、胎仔を用いた内皮細胞FACSソーティングに成功している。Tmem100遺伝子発現によって規定される内皮細胞のサブ分画がどのような特徴を有するか検討を進める計画である。

今回行った研究をさらに発展させることにより、Tmem100の発現制御機構、分子機能

を解明し、私たちが同定した新しい胎生期血管内皮特異的遺伝子の生理・病態生理的意義を明らかにしてゆきたい。

#### 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 3 件)

- ① Fujita M, Sakabe M, Ioka T, Watanabe Y, Kinugasa-Katayama Y, Tsuchihashi T, Utset MF, Yamagishi H, Nakagawa O. Pharyngeal arch artery defects and lethal malformations of the aortic arch and its branches in mice deficient for the Hrt1/Hey1 transcription factor. *Mech Dev* 139: 65-73, 2016. 査読有
- ② 渡邊裕介、久光隆、片山由美、荒木睦、石井修平、藤田匡秀、坂部正英、中川修 心血管形態形成におけるHrt/Hey転写調節因子の意義 循環器病研究の進歩 2015年36巻1号 pp74-82.
- ③ Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos. *Dev Dyn* 244: 31-42, 2015. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 石井修平、渡邊裕介、上本泰生、井原大、久光隆、深山俊治、中川修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 「Hrt1/Hey1 遺伝子の血管内皮発現制御機構における Notch および ALK1 シグナリングによる協調的転写調節メカニズム」 2016年12月17日 東京都
- ② 片山由美、渡邊裕介、富松彩佳、佐藤玄基、岩田裕子、荒井勇二、斎藤能彦、中川修 日本血管生物医学学会学術集会/日韓血管生物合同シンポジウム 「胎生期血管内皮遺伝子 TMEM100 の心血管形態形成における発現制御機構の解析」 2016年12月9日 長崎市
- ③ 渡邊裕介、石井修平、深山俊治、上本泰生、井原大、久光隆、荒井勇二、中川修 日本血管生物医学学会学術集会/日韓血管生物合同シンポジウム 「Synergistic regulatory mechanisms of endothelial Hrt1/Hey1 gene transcription by Notch

and ALK1 signaling pathways」 2016年12月9日 長崎市

- ④ 片山由美、岩田裕子、富松彩佳、渡邊裕介、斎藤能彦、中川修 日本分子生物学会年会 「胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における発現制御機構と分子機能の解析」 2016年12月1日 横浜市
- ⑤ 石井修平、渡邊裕介、上本泰生、井原大、久光隆、深山俊治、中川修 日本分子生物学会年会 「Hrt1/Hey1 遺伝子の血管内皮発現制御機構における Notch および ALK1 シグナリングによる協調的転写調節メカニズム」 2016年11月30日 横浜市
- ⑥ 中川修 日本血管生物医学学会春季特別シンポジウム 「Significance of downstream target genes of Notch and ALK1 signaling pathways during cardiovascular development and disease」 2016年6月3日 吹田市
- ⑦ 荒木睦、渡邊裕介、坂部正英、久光隆、中尾周、藤田匡秀、片山由美、井岡朋子、中川修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 「血管内皮細胞における BMP9/BMP10-ALK1 シグナル下流遺伝子群の解析」 2015年12月12日 神戸市
- ⑧ 片山由美、渡邊裕介、水田賢、坂部正英、井岡朋子、荒木睦、石井修平、染川智、斎藤能彦、中川修 日本血管生物医学学会学術集会 「胎生期内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における意義」 2015年12月11日 神戸市
- ⑨ 中川修 日本小児循環器学会学術集会シンポジウム先天性心疾患の発生と幹細胞医学 「心臓血管形態形成に関するシグナル伝達系の分子機構」 2015年7月16日 東京都

[図書] (計 2 件)

- ① Mizuta K, Sakabe M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. TMEM100, a novel intracellular transmembrane protein essential for cardiovascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2016. 査読無
- ② Sakabe M, Morioka T, Kimura H, Nakagawa O. Roles of endothelial Hrt genes for vascular development. In:

Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2016. 査読無

〔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：

〔その他〕

ホームページ等

① 所属施設公式ホームページ

[http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular\\_physiology/index.html](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/index.html)

② Facebook

<https://www.facebook.com/ncvc.molecular.physiology>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA Osamu)  
国立循環器病研究センター・研究所・  
部長  
研究者番号：40283593

(2)研究分担者

渡邊 裕介 (WATANABE Yusuke)  
国立循環器病研究センター・研究所・  
室長  
研究者番号：20562333

岩田 裕子 (IWATA Yuko)  
国立循環器病研究センター・研究所・  
室長

研究者番号：80171908

久光 隆 (HISAMITSU Takashi)  
国立循環器病研究センター・研究所・  
室長  
研究者番号：50327946

西谷 友重 (NISHITANI Tomoe)  
国立循環器病研究センター・研究所・  
室長  
研究者番号：50393244

坂部 正英 (SAKABE Masahide)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00525983  
(平成27年4月1日～平成27年9月7日)

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし