

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19639

研究課題名(和文)肺動脈性肺高血圧症の新規原因遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文)Role of X Gene Variant in Childhood Pulmonary Arterial Hypertension

研究代表者

永井 礼子(Nagai, Ayako)

東京女子医科大学・医学部・研究生

研究者番号：10622160

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)：PAH患者が複数名存在し、既知の原因遺伝子変異が同定されなかった1家系においてエクソーム解析を実施したところ、X遺伝子変異を検出した。機能解析を行った結果、Xタンパクはp53と結合し、同定したX遺伝子変異は機能獲得型変異であることがあきらかになった。さらに、ヒト肺動脈平滑筋細胞においてX遺伝子変異はp53伝達経路の活性低下を惹起し、これによりヒト肺動脈平滑筋細胞が異常増殖すること、さらにヒト肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを抑制すること、この2つの機序からPAHの発症をもたらす可能性を示すことができた。本研究の結果はPAHの新たな治療法の創出に寄与しうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to find novel disease-causing variants in patients with pulmonary arterial hypertension, we performed direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification to analyze 18 families with multiple affected family members with PAH. In one of the 18 families with PAH, there were no disease-causing variants already-known. Whole-exome next-generation sequencing was performed in the family, and we identified a novel variant in X gene in the family. The variant, R554L-X, revealed gain-of-function and induced decreasing nucleus p53 and p21, lower phosphorylation of nucleus p53, decreasing apoptotic hPASCs, and increasing hPASCs proliferation and cell viability compared to wild-type X. This study can contribute to elucidate mechanism of PAH pathogenesis.

研究分野：小児循環器分野

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は肺小動脈の血管内皮細胞・平滑筋細胞が異常に増殖することによって血管内腔が狭窄して肺血管抵抗が上昇し、右心不全が惹き起こされる予後不良の疾患である。これまでに PAH の疾患原因遺伝子として TGF- β /BMP シグナル伝達経路内の型受容体である *BMPR2* 遺伝子、型受容体である *ALK1* 遺伝子、そして細胞内で BMP シグナルを伝達する分子である *SMAD1/4/8* 遺伝子、細胞膜の陥没構造を形成する *CAV1* 遺伝子、カリウムチャネルのひとつである *KCNK3* が同定されている。しかしこれらの遺伝子変異が認められるのは PAH 全体の約 30-40% にすぎず、半数以上では原因遺伝子がいまだ確認されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PAH の発症機序を解明することである。本研究ではエクソーム解析を用いて PAH の新規疾患遺伝子を同定し、その変異が PAH の発症にもたらす影響をあきらかにすることで、PAH の新たな治療法の創出への寄与を目指す。

3. 研究の方法

(1) エクソーム解析による新規疾患遺伝子候補の同定

PAH 患者が複数名存在する 18 家系において、遺伝学的検査 (直接シーケンシング法、および MLPA 法) を施行した。このうち、既知の原因遺伝子変異が同定されなかった 1 家系においてエクソーム解析を実施した。この結果、同定された新規疾患遺伝子候補、X 遺伝子について機能解析を行うこととした。

(2) X 遺伝子変異がもたらす、ヒト肺動脈平滑筋細胞の増殖能への影響

細胞数の計測

野生型 X 遺伝子発現ベクターを作製した後、mutagenesis を行い、我々が発見した X 遺伝子変異体の発現ベクターを作成する。野生型、変異型それぞれのベクターをヒト肺動脈平滑筋細胞に導入し、数日ごとに細胞数を測定して細胞増殖能を評価する。

cell viability の評価

野生型、変異型それぞれの X 遺伝子発現ベクターをヒト肺動脈平滑筋細胞に導入し、WST-1 reagent (Roche) を用いて、テトラゾリウム塩 (WST-1) が生細胞中ミトコンドリア脱水素酵素によってホルマゼン色素へ変換されることを利用して、数日ごとに定量的に細胞生存能を評価する。

(3) X 遺伝子変異がもたらす、ヒト肺動脈平滑筋細胞における p53 シグナル伝達経路への影響

real time PCR

ヒト肺動脈平滑筋細胞に野生型、変異型それぞれの X 遺伝子発現ベクターを導入する。一定時間培養した後に total RNA を抽出し、それを用いて cDNA 合成を行う。その後 real time PCR を行って、p53 およびその下流のターゲットのメッセンジャー RNA の発現量を比較する。

western blotting

ヒト肺動脈平滑筋細胞に野生型、変異型それぞれの X 遺伝子発現ベクターを導入する。一定時間培養した後に細胞を溶解して SDS-PAGE に供し、western blotting を行う。p53 およびそのターゲットタンパクの発現量を比較する。

(4) X 遺伝子のノックダウンがヒト肺動脈平滑筋細胞の増殖能および p53 シグナル伝達経路に与える影響

siRNA を用いてヒト肺動脈平滑筋細胞の X 遺伝子をノックダウンし、(2) (3) と同様の手法で研究を行う。

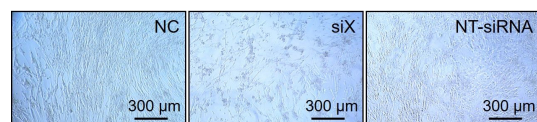
(5) X 遺伝子がもたらす、ヒト肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスへの影響

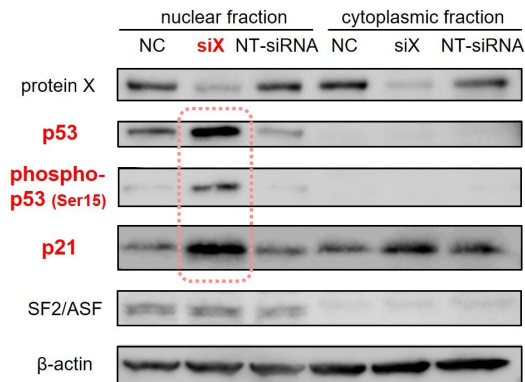
ヒト肺動脈平滑筋細胞に野生型、変異型それぞれの X 遺伝子発現ベクターを同時に導入し、一定時間培養する。その後、Guava EasyCyte flow cytometer (Life Science Research) を使用して、Annexin V assay および TUNEL assay を行い、アポトーシス細胞の比率を比較する。

4. 研究成果

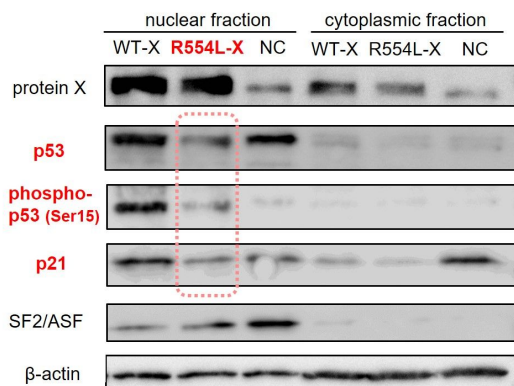
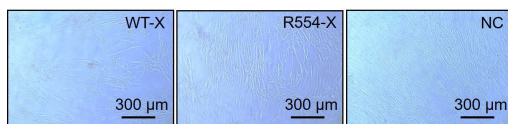
PAH 患者が複数名存在する 18 家系において、遺伝学的検査を施行したところ、12 家系において *BMPR2* 遺伝子変異、4 家系において *ALK1* 遺伝子変異を同定した。1 家系については追跡不能となり、対象から除外した。既知の原因遺伝子変異が同定されなかった、残る 1 家系においてエクソーム解析を実施したところ、X 遺伝子変異 (p.R554L) を検出した。

機能解析として、siRNA を利用してこの X 遺伝子をノックダウンしたところ、ヒト肺動脈平滑筋細胞の増殖能が低下すること、ヒト肺動脈平滑筋細胞の核内 p53 および p21 の発現量が増加し、p53 リン酸化が亢進することがあきらかになった。

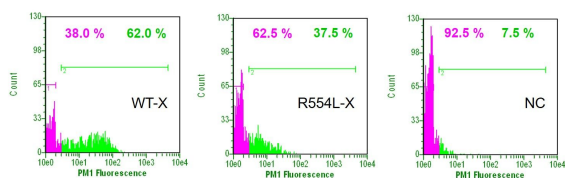




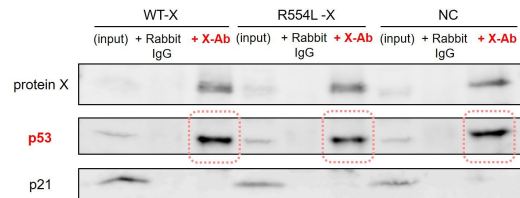
p.R554L-X 変異遺伝子コンストラクトをヒト肺動脈平滑筋細胞に導入した場合、野生型 X 遺伝子と比較して増殖能を亢進させ、核内 p53 および p21 の発現量を減少させ、p53 リン酸化を減弱させることがあきらかになり、機能獲得型変異であることが示された。



さらに、p.R554L-X 変異遺伝子はヒト肺動脈平滑筋細胞において、アポトーシス細胞を有意に減少させることがあきらかになった。



また、抗 X 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、X タンパクは野生型、p.R554L 変異型共に p53 と結合しうることが示された。



以上から、変異型 X 遺伝子は p53 伝達経路の活性低下を惹起し、これによりヒト肺動脈平滑筋細胞が異常増殖すること、さらにヒト肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを抑制すること、この 2 つの機序を通じて PAH の発症をもたらす可能性を示すことができた。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

(1) Ayako Chida-Nagai, Yoshiyuki Furutani, Kei Inai, Toru Furukawa, Tomotaka Nakayama, Yasuo Ono, Toshio Nakanishi. X gene variant identified in childhood pulmonary arterial hypertension induces activation of p53 signaling pathway and a decrease in pulmonary arterial smooth muscle cell apoptosis. 52nd Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, 2018

(2) Ayako Chida, Yoshiyuki Furutani, Kei Inai, Toru Furukawa, Tomotaka Nakayama, Yasuo Ono, Toshio Nakanishi. Role of X Gene Variant in Childhood Pulmonary Arterial Hypertension, American Heart Association 2017 Scientific Sessions, 2017

[図書](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：
出願年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 礼子 (NAGAI, Ayako)
東京女子医科大学・医学部・研究生
研究者番号：10622160

(2) 研究協力者

中西 敏雄 (NAKANISHI, Toshio)
古谷 喜幸 (FURUTANI, Yoshiyuki)