

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19044

研究課題名(和文) BMP-ALK1シグナル下流遺伝子Tmem100による心血管形成機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of endothelial-specific Tmem100 expression during cardiovascular development

研究代表者

片山 由美 (Kinugasa-Katayama, Yumi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：20570675

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)：先行研究によりTmem100が胎生期の心血管形態形成において必須であることを示していたが、その分子機能や発現制御機構は未だ不明のままであった。本研究では、Tmem100遺伝子上流および下流約200kbの染色体DNAを含むBACクローン2種類を用い、大腸菌内相同組換えにより作成したLacZレポーターのトランスジェニックマウス胎仔における発現パターンを解析した。その結果、胎生期血管内皮発現に必要な十分な新規エンハンサーを同定し、活性を制御する転写因子も複数絞られてきた。この領域はヒトにおいても高く保存されており、マウス、ヒトのTmem100エンハンサー領域を同定できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that the expression of transmembrane protein No. 100 (TMEM100) was markedly induced by the activation of ALK1 signaling in cultured human endothelial cells. Tmem100 was expressed in arterial endothelial cells during mouse embryo development, and Tmem100 null mice showed embryonic lethality due to impairment of endothelial differentiation and vascular morphogenesis. However, the regulatory mechanisms of TMEM100 expression in embryonic vasculature are largely unknown. We identified a well-conserved endothelial enhancer of mouse Tmem100/human TMEM100 through BAC-based reporter analysis in mouse embryos. The reporter expression pattern was restricted to intermediate to large arteries and distinct from broader expression of the Alk1 knock-in LacZ reporter in the smaller caliber-vessels. These results suggest that the TMEM100 expression in embryonic endothelial cells is likely to be controlled by a unique combination of BMP-ALK1 and other signaling pathways.

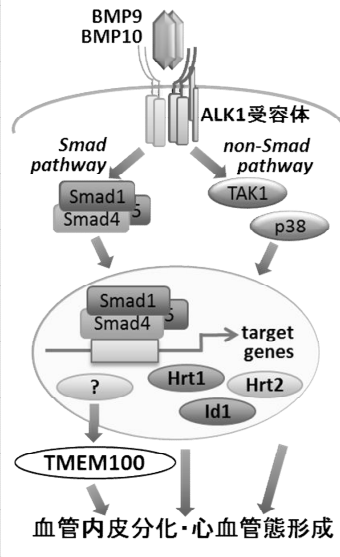
研究分野：発生生物学、生化学、腫瘍学

キーワード：Tmem100 血管形成 血管内皮 胎生期

1. 研究開始当初の背景

心血管系の形態形成異常は先天性心血管奇形の病因に直結するが、その分子機序には不明の点が多い。心血管奇形は新生児に高頻度に生じ、その原因の解明、治療ターゲットの同定が切望されている。

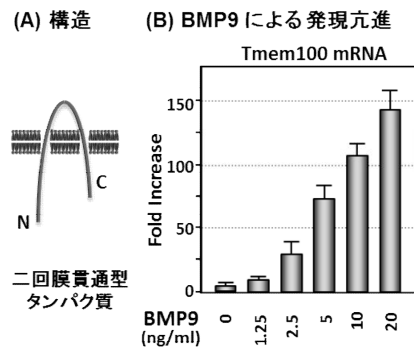
【図1】 BMP9/10-ALK1 シグナル



BMP9 および BMP10 による ALK1 受容体活性化を起点とする内皮細胞シグナル (BMP9/10-ALK1 シグナル、以下 ALK1 シグナルとする) は胎生期の血管形態形成に必須の役割を有している (ten Dijke et al., *Trends Cell Biol* 2010) 【図 1】。

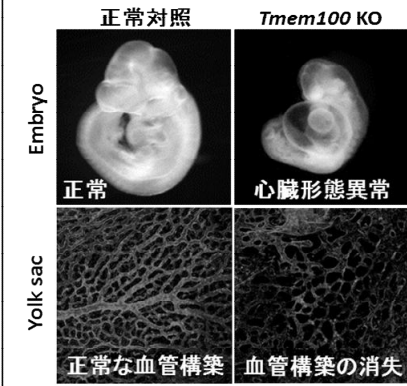
私の所属研究室では、ALK1 シグナルによってヒト培養内皮細胞における発現が顕著な亢進を示す膜タンパク質 Tmem100 を、内皮特異的な新規 ALK1 下流因子として同定していた 【図 2】。

【図2】 BMP9/10-ALK1 新規下流因子 Tmem100

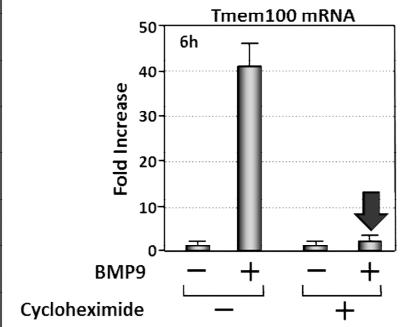


Tmem100 ノックアウト (KO) マウスは、胎生期の心血管形成異常により胎生致死となり、Tmem100 が心血管発生に必須の因子であることも明らかになっている (Somekawa et al, *PNAS* 2012) 【図 3】。

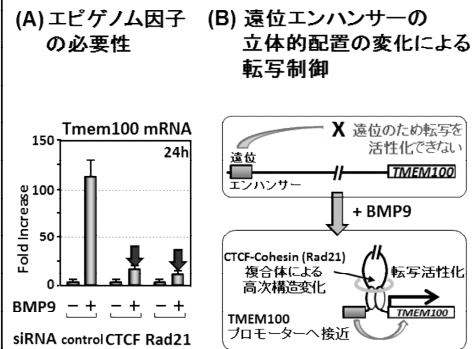
【図3】 Tmem100 KO マウスの血管形成異常と心臓形態異常



【図4】 Tmem100 発現に対するタンパク質合成の必要性



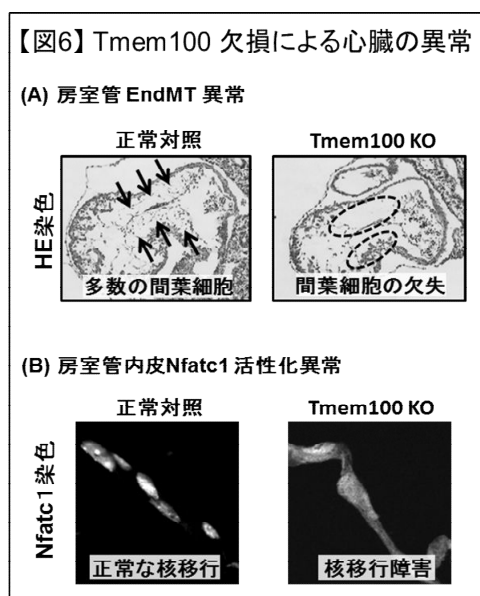
【図5】 Tmem100 発現に対するエピゲノム因子の必要性



一方、Tmem100 の ALK1 シグナルによる発現誘導はタンパク質合成阻害剤 Cycloheximide により完全に抑制され【図 4】、BMP9 刺激により産生される何らかのタンパク質が Tmem100 の発現を誘導していることが示唆されていた (未発表)。この特徴は、ALK1 シグナルにおいてタンパク質合成を介さず、転写因子 Smad のリン酸化により転写制御を受ける既知の下流因子群の発現制御と全く異なり、ALK1 シグナルによる新しい下流遺伝子発現調節メカニズムとして注目する

に値した。さらに、染色体高次構造を制御するエピゲノム因子 (CTCF、Rad21) の発現阻害により Tmem100 の発現上昇が抑制され、遠位エンハンサーの立体的配置が変化して近位プロモーターに会合することの重要性も示唆されていた【図 5】(未発表)。

また、Tmem100 KO マウス胚では、(1) 心臓形態形成期において房室管内皮細胞の間葉系細胞への形質転換 (EndMT: Endothelial-mesenchymal transition) が著しく障害されること【図 6(A)】、(2) 房室管内皮においてカルシウム(Ca)シグナル反応性の転写因子 Nfatc1 の核移行・活性化が消失すること【図 6(B)】を見出し、Tmem100 が EndMT と Ca シグナル制御に重要な機能を有する可能性を提唱していた(Mizuta et al., *Dev Dyn* 2015)。その後、他グループから、成体の後根神経節に Tmem100 が発現し、transient receptor potential (TRP) Ca チャネルと複合体を形成して活性を制御していることが報告された (Weng et al., *Neuron* 2015)。



2. 研究の目的

課題 1 : Tmem100 の発現制御解析を通して ALK1 シグナルによる新しい下流遺伝子発現制御機構の同定を目指す。

課題 2 : EndMT における Tmem100 の意義を検討するとともに、内皮 Ca シグナル制御における分子機能の解明を目指す。

本研究により、新しい心血管形態形成の必須因子 Tmem100 の ALK1 シグナルを中心とした発現調節様式、および、分子機能を検討し、心血管形態形成の新たな制御メカニズムの同定を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

課題 1 :

【図 5】に示した先行研究により、Tmem100 の発現制御メカニズムは既知の ALK1 シグナル下流遺伝子群とは全く異なり、新たなタンパク質の合成を介した遠位エンハンサーのエピゲノム調節によることが示唆された。そこで、Tmem100 遺伝子上流および下流約 200kb の染色体 DNA を含む BAC クローン 2 種類 (A、B) を用い、大腸菌内相同組換えによってノックイン LacZ レポーターを作製した。これらの BAC レポーターのトランスジェニック (Tg) マウスを作成して LacZ 発現を解析した。また、クローン B の数種類の欠失変異体を用い、内在性 Tmem100 発現パターンを再現する内皮特異的エンハンサーと考えられる領域を同定し、その領域のヒストン修飾、転写因子結合配列、種間の塩基配列相同性について *in silico* 解析を行った。

課題 2 :

後根神経節における報告のように、Tmem100 は TRP チャネルファミリーの機能制御を介して Ca シグナルに関与することが考えられるが、20 種類以上の分子からなる TRP ファミリーの房室管内皮における意義は全く不明のままである。申請者らはマウス胚からの内皮細胞分離方法を確認し、胎生期内皮における TRP ファミリー因子の網羅的発現解析を行った。

4. 研究成果

課題 1:

BAC クローン 2 種類(A, B)の LacZ レポーター Tg マウスを作成して LacZ 発現を解析した。ところ、Tmem100 遺伝子下流 216kb を含むクローン B において内在性 Tmem100 発現パターンを再現する胎生期血管特異的エンハンサーが存在すると考えられた。このクローン B の数種類の欠失変異体を用い、内在性 Tmem100 発現パターンを再現する内皮特異的エンハンサーと考えられる領域約 37kb を同定した。さらに数種類の欠失変異体を作製し、約 2kb の領域が血管内皮発現に必要な新規エンハンサーとして働くことを明らかにした。この領域はヒト遺伝子においても保存性が高く、マウスで同定した領域に相当するヒト遺伝子約 2 kb の領域を用いて LacZ レポーター解析を行った。その結果、内皮特異的な発現パターンを示した。以上より、マウス、ヒトの Tmem100 エンハンサー領域を同定できたと考えられる。

さらに、この約 2kb 領域についてヒストン修飾、転写因子結合配列、種間の塩基配列相同性について in silico 解析を行い、結合が予想される転写因子がエンハンサー活性へ与える影響についてルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、血管発生を制御していることが既知の転写因子数種類が Tmem100 エンハンサー活性を促進する結果を得た。

また Tmem100 の研究を行う上で抗体は必須であると考えられるが、Tmem100 に対する抗体はこれまでに数種類試みているが解析に有用な良い抗体を得ることができないのが現状である。そこで、BAC クローン B の EGFP レポーターTg (BAC-EGFP) マウスラインを作製した。これは、Tmem100 発現を EGFP レポーターにより再現することができ、抗体を用いず Tmem100 発現細胞を回収することができる非常に有用性の高いツールである。

課題 2:

胎生期内皮における TRP ファミリー因子の網羅的発現解析を行った結果、3 種類の TRP 因子が内皮特異的に発現していることを明らかにした。免疫沈降実験により Tmem100 とこれらの TRP 因子が複合体を形成するという結果も得ている。今後は、Tmem100 と TRP 因子による生理機能についての解析が課題である。

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 4 件)

Araki M, Hisamitsu T, Kinugasa-Katayama Y, Tanaka T, Harada Y, Nakao S, Hanada S, Ishii S, Fujita M, Kawamura T, Saito Y, Nishiyama K, Watanabe Y, Nakagawa O. Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 21:415-423. (2018)

Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, Schott AF, Kinugasa-Katayama Y, Lee Y, Won NH, Nakasone ES, Hearn SA, Küttner V, Qiu J, Almeida AS, Perurena N, Kessenbrock K, Goldberg MS, Egeblad M. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med*. 8. (2016)

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)

Kise K, Kinugasa-Katayama Y, Takakura N. Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 99:197-205. (2016)

[学会発表](計 4 件)

片山由美、富松彩佳、渡邊裕介、久光隆、瀬谷大貴、荒井勇二、磯本祥恵、斎藤能彦、中川修
胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形成

における発現制御機構
第 25 回日本血管生物医学会 (2017 年)

片山由美、富松彩佳、渡邊裕介、瀬谷大貴、
荒井勇二、磯本祥恵、斎藤能彦、中川修
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
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
(2017 年)

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
胎生期血管内皮遺伝子 TMEM100 の血管形態形
成における発現制御機構の解析
第 24 回日本血管生物医学会 (2016 年)

片山由美、岩田裕子、富松彩佳、渡邊裕介、
斎藤能彦、中川修
胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の血管形態形
成における発現制御機構と分子機能の解析
第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 由美 (KATAYAMA YUMI)

国立研究開発法人 国立循環器病研究セ
ンター・研究所・流動研究員

研究者番号：20570675

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

中川 修 (NAKAGAWA OSAMU)

渡邊 裕介 (WATANABE YUSUKE)