

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06134・19K21249

研究課題名(和文) ALK1下流遺伝子TMEM100の新規転写制御機構と血管形態形成における意義

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of endothelial-specific expression and cellular functions of Tmem100 during vascular formation

研究代表者

劉 孟佳 (Liu, Norika (Mengchia))

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：50826922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血管形成に必須なALK1シグナルの新規下流遺伝子TMEM100の発現制御機構と機能メカニズムを解明することを目的としている。発現制御機構を探索するため、Tmem100の内皮エンハンサーおよびその活性を制御する転写因子群を同定した。さらに、Tmem100領域BACコンストラクトを利用してEGFP蛍光レポーターマウス系統の作成に成功した。一方、Tmem100の分子機能メカニズムを探索するため、誘導型内皮特異的欠損マウスを用いた新生仔網膜血管の表現型解析を行い、動脈内皮細胞における異常を発見した。また現在、Tmem100が機能する際に必要なパートナー因子を複数同定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMEM100欠損はOsler病や肺動脈性肺高血圧症をはじめとした難治性ヒト血管疾患に重要な役割を持つことが想定されている。よって、本研究にてTmem100の発現制御機構と機能メカニズムを解明することで、上記のような血管形成異常や遺伝性血管病の疾患機序に関与する新たな治療ターゲットとしての有用性を示す可能性を持つ。

また、EGFPレポーターマウス系統を作成したことは、マウス胎生中期の血管形成過程において中・大動脈内皮細胞をFACS精製するツールとして有用である。これまでに中・大動脈特異的な内皮細胞のレポーターマウスは存在せず、網羅的遺伝子発現・プロテオーム解析などに用いることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to unveil regulatory mechanisms of Tmem100 expression and cellular functions during vascular formation. The BAC transgenic mouse reporter analysis was performed to search for an endothelial enhancer of Tmem100. We found a group of endothelial transcription factors that activate the endothelial enhancer of Tmem100. Moreover, we have created an EGFP fluorescent reporter mouse line using the BAC constructs described above. On the other hand, to explore the molecular function of Tmem100, the retinal vasculature of neonatal mice with the endothelial-specific inducible gene deletion was analyzed. This phenotypic analysis revealed that Tmem100 had important morphogenic roles in arterial endothelial cells. We are currently addressing the partner proteins that are required for Tmem100 to function in vascular formation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 Tmem100 転写制御機構 血管リモデリング 新生仔網膜

1. 研究開始当初の背景

所属研究グループはALK1シグナル伝達系の新規下流ターゲットとしてTmem100 (Transmembrane protein No.100)を同定した(Somekawa et al, PNAS 2012)。Tmem100はこれまでにパラログが同定されていないが、興味深いことに、Tmem100欠損マウスはAlk1欠損マウスと酷似した表現型(血管リモデリング障害など)を示し、胎生10日前後で死に至る。ALK1受容体シグナル異常はOsler病(遺伝性出血性末梢血管拡張症)の原因、肺動脈性肺高血圧症(PAH)の素因として知られ、下流遺伝子であるTmem100もこれらの疾患を始めとしたヒト血管疾患に重要な役割を持つことが想定される。

TMEM100の発現制御機構と機能メカニズムには不明の点が多く残されている。ヒト血管内皮細胞HUVECにおけるTmem100発現はALK1受容体刺激によって顕著に亢進するが、マウス胎仔においてTmem100は中・大動脈内皮細胞に特異的に発現する一方で、Alk1発現はより広範囲な動脈型内皮細胞に認められる(Somekawa et al., PNAS 2012)。そこで本研究では、Tmem100の内皮エンハンサーを同定し、それを介した転写制御機構を解明する。一方、Tmem100欠損マウスは胎生致死であることから、その血管発生・形態形成過程の異常について細胞レベルの観察・解析が困難であった。そのため、本研究にて誘導型内皮特異的欠損マウス(iECKO)を用いた表現型解析からTmem100の血管形成における意義を解明する。

2. 研究の目的

TMEM100は、既知のALK1系下流遺伝子群とは異なる転写制御を受けていることがわかったため、本研究では内皮特異的発現制御機構を探索する(課題1)。また、Tmem100欠損マウスは重篤な血管形成異常を示し胎生致死となることから、経時的な細胞レベルの解析で、血管発生・形態形成過程における働きを調べる必要がある。そこで、本研究では、胎生致死性を回避した誘導型内皮特異的欠損マウスの網膜血管解析系を用いる(課題2)。こうして、血管発生・形態形成に必須でヒト血管疾患に深く関与することが示唆されるTMEM100について、その上流シグナル伝達機構と生理的・病態生理的意義の両方を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

課題1. Tmem100の血管内皮特異的発現制御機構の解明

マウスTmem100遺伝子領域を含むゲノムDNAのBAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンを用いたLacZレポーター解析を行い、中・大動脈特異的な活性を示す内皮エンハンサーを探索した。次に、CRISPR/Cas9システムを用いたTmem100内皮エンハンサー領域の欠損マウスを作成することでTmem100 mRNA転写が抑制されるかどうかを確認した。Tmem100内皮エンハンサーの活性を制御する転写因子を同定するため、Luciferaseレポーター解析で様々な内皮特異的転写因子によるエンハンサー活性を調べた。こうして明らかになった内皮転写因子のエンハンサーへの結合部位に変異を起こしたトランスジェニック(TG)マウスのLacZレポーター解析を行い、in vivoにおいてエンハンサー活性が消失することを確認した。

課題2. 血管形成におけるTmem100の意義

Tmem100欠損時の内皮細胞の表現型をより詳細に解析するため、Cdh5-CreERT2マウスを用いて内皮細胞特異的にTmem100を誘導欠損させた。マウス網膜の血管新生は出生直後に開始するため、Tmem100欠損時の表現型を個体レベルの発生異常の影響なく観察できる有用な実験系である。この表現型解析に加え、BAC-Tmem100-エピトープタグ融合TGマウスおよび内因性

Tmem100-LacZノックインマウスを用いて新生仔網膜におけるTmem100の発現パターンを解析した。さらに、Tmem100が血管形態形成を司るための共役因子を同定するため、前述のエピトープタグ融合型Tmem100発現マウスから抗タグ抗体によって免疫沈降されたタンパク質の質量分析を行った。

4. 研究成果

課題1. Tmem100の血管内皮特異的発現制御機構の解明

方法に記した約200kbのBAC-TGマウスのLacZレポーター解析から、2kbまで絞り込んだ内皮エンハンサー領域の発見に成功した。このエンハンサーは内在性Tmem100の発現パターンで見られる中・大動脈特異的な内皮細胞に活性を示した。本研究で同定した内皮エンハンサーはヒト相同配列にも共通していた。この2kb内皮エンハンサー領域をCRISPR/Cas9で欠損させたところ、内皮細胞におけるTmem100の転写が有意に減少し遺伝子自体をノックアウトさせたマウス同様に胎生期の血管発生異常が観察された。つまり、同定された2kbエンハンサーは胎生期のTmem100発現に必須であることを証明した。さらに、Luciferaseレポーター解析から明らかになった当エンハンサーの転写調節因子の結合サイトに変異を起こしたTGマウスを

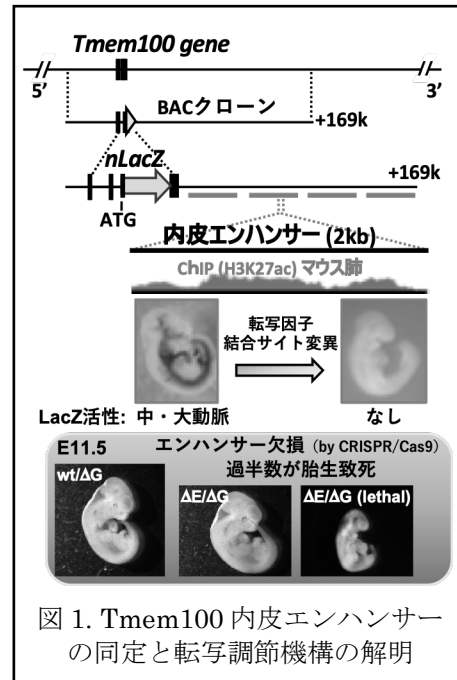


図 1. Tmem100 内皮エンハンサーの同定と転写調節機構の解明

作製したところ、胎仔におけるTmem100内皮エンハンサー活性が消失することを確認した。以上より、課題1の目標であったTmem100の新規転写制御機構の解明を実現した(図1)。また、本課題の遂行と並行して、Tmem100遺伝子領域を含んだ200kbをカバーするBACコンストラクトを利用したEGFP蛍光レポーターマウス系統の作成に成功した。このEGFPレポーターマウスは胎生中期の血管形成過程において中・大動脈内皮細胞をFACS精製するツールとして有用であり、網羅的血管内皮遺伝子発現・プロテオーム解析などに用いることが期待される。

課題2. 血管形成におけるTmem100の意義

血管形成におけるTmem100の機能メカニズムを探究するためCdh5-CreERT2マウスを用いたTmem100 iECKOマウスを作製した。このマウスの新生仔網膜では血管新生に遅延は見られたものの、上流シグナルとして知られるAlk1受容体やNotchシグナルの欠損で報告されているようなTip-stalk cell分化の異常に有意差は認められなかった。一方、網膜における主要な動脈を構成する内皮細胞で形態異常が確認された。BAC-Tmem100-エピトープタグ融合TGマウスおよび内因性Tmem100-LacZノックインマウスを用いた新生仔網膜におけるTmem100の発現パターン解析からは、主要動脈の内皮細胞特異的な発現を示した。Tmem100 iECKO網膜で表現型が見られた箇所と一致していたことから、その表現型はTmem100が無くなることの直接的な結果を示していると考えられた。Tmem100の役割をさらに検討するため、Tmem100と相互作用を持つ因子の同定を試みた。免疫沈降産物の質量分析から、内皮細胞分化や血管発生に重要な細胞形態制御因子が同定された。現在これらの因子とTmem100の相互作用を検証中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kinugasa Katayama Yumi, Watanabe Yusuke, Hisamitsu Takashi, Arima Yuichiro, Liu Norika M., Tomimatsu Ayaka, Harada Yukihiro, Arai Yuji, Urasaki Akihiro, Kawamura Teruhisa, Saito Yoshihiko, Nakagawa Osamu	4. 巻 59
2. 論文標題 Tmem100 BAC EGFP mice to selectively mark and purify embryonic endothelial cells of large caliber arteries in mid gestational vascular formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 (4):e23416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 劉 孟佳
2. 発表標題 胎生期血管内皮遺伝子Tmem100の転写制御機構と血管形成における意義
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norika (Mengchia) Liu
2. 発表標題 A Novel Transmembrane Protein Tmem100: Regulatory Mechanisms of Endothelial-Specific Expression and Cellular Functions During Vascular Formation
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 孟佳
2. 発表標題 A novel flow-responsive protein Tmem100 is important in pericyte recruitment during vascular formation
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------