

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08272

研究課題名(和文) 遺伝性出血性末梢血管拡張症の統合的な病態解明

研究課題名(英文) Integrated analysis of pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia

研究代表者

岩朝 徹 (Iwasa, Toru)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医師

研究者番号：80712843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝性出血性末梢血管拡張症はALK1(ACVRL1)蛋白による細胞内シグナル伝達に障害が起きることが主因である。ACVRL1のミスセンス変異は数多く報告されているが、in silico解析での病原性推定が多く、米国遺伝学会の推奨する基礎実験での蛋白機能障害の証明がされていないものは多い。今回近年同定されたACVRL1ミスセンス変異について、ACVRL1のシグナルに機能異常が生じるかを検討した。結果、多くのバリエーションは機能の低下が確認でき、一部はin silicoの推定より正確に病原性を評価した。一部のバリエーションでは機能低下が確認できず、両者の組み合わせが正確な病原性判定に必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACVRL1遺伝子変異の病原性を正確に推定・判定することは、遺伝性出血性末梢血管拡張症の診断には極めて重要であり、これをin silicoでの予測のみではなく実験を組み合わせることでより正確に判別することが可能となる。特にACVRL1の細胞外ドメインのミスセンス変異は細胞実験の方が機能低下を明瞭に示した。

また一部のバリエーションは臨床的には病原性があると考えられても、今回実施したBMP9による刺激でのSmad依存転写活性の低下が確認できず、エクソン内の変異であってもスプライス変異になっている、Smad転写活性以外の経路の問題などこれまで明らかでは無かった機序の存在が推定された。

研究成果の概要(英文)： Hereditary hemorrhagic telangiectasia is primarily caused by impaired intracellular signaling mediated by the ALK1 (ACVRL1) protein, and although many missense variants in ACVRL1 have been reported, most of them have been presumed pathogenic by in silico classifiers. However, many of them have not been proven the dysfunction in laboratory experiments which is recommended by the American College of Medical Genetics. In this study, we examined the recently identified ACVRL1 missense variants to determine whether they cause functional defects in ACVRL1 signaling. The results showed that many of the variants were found to be loss-of-function, and some of them were more accurately assessed for pathogenicity than in silico predictions. Some variants showed no functional deficit, suggesting that a combination of both methods is necessary to more accurate prediction of pathogenicity.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝性出血性末梢血管拡張症 ACVRL1 ALK1 BMP9 Smad

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性出血性末梢血管拡張症(hereditary hemorrhagic telangiectasia, 以下 HHT)は全身の臓器の動静脈吻合異常を生じる、常染色体顕性遺伝する稀少疾患である。[1]その原因として血管における ALK1 シグナルに関与する蛋白である ACVRL1(activin A receptor like type 1)、ENG(endoglin)、SMAD4(Smad family member 4)、GDF2(bone morphogenetic protein 9)が同定されている。[2]

ACVRL1 の遺伝子バリエーションは多数報告されているが、バリエーション ACVRL1 の蛋白機能を実験研究で評価したものは少ない。これらのバリエーションは公的なデータベース(米国 NIH の ClinVar など)では病原性あり(pathogenic)と判定されているものも少なくないが、病原性不明の VUS(variant of unknown significance)とされているものも多く、HHT 患者に遺伝子バリエーションを同定しても病原性が結論づけられない場合も多い。遺伝子バリエーションの病原性評価については米国遺伝学会(American College of Medical Genetics and Genomics : ACMG)のガイドラインでは遺伝子疾患全般に、遺伝子バリエーションの評価においては実験研究でのバリエーション蛋白の機能障害の評価があれば強いエビデンスとして病原性を評価することとしてその評価基準が公表されており [3]、ClinVar もこの基準に沿って評価がされている。

### 2. 研究の目的

今回我々は近年同定され公的な ACVRL1 バリエーションデータベース(ClinVar、ユタ大学の ARUP laboratory)での病原性評価が VUS、あるいは掲載されていない ACVRL1 バリエーション 25 種に対し、細胞実験での ACVRL1 機能評価を実施し病原性評価に寄与することを第一の目的とした。また ACVRL1 蛋白の三次元構造を ColabFold プログラム [4]を用いて、ミスセンス変異による ACVRL1 蛋白と結合する他の蛋白との立体的な関係について評価を試みた。*In silico* の病原性推定プログラムによる評価と比較を行い、ACVRL1 のバリエーション評価における実験研究とのそれぞれの利点欠点を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 研究対象バリエーションと病原性予測

過去に当施設での遺伝子解析で判明し、近年本邦で論文報告された 21 種、当施設で検出したが未報告の新規バリエーション 1 種(D235Y)と、ACVRL1 の構造上重要な位置に存在すると報告されている 3 種(T197I・K229R・T265P)の合計 25 種の ACVRL1 バリエーションを対象とした。

各バリエーションの病原性の予測には Web ベースで使用可能な SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, PANTHER の 4 つを選択した。これらの全てのバリエーションは既報論文での記載や過去の当施設での遺伝子解析時の症状所見から HHT の診断基準であるキュラソー基準で definite と判定される患者から検出されたものである。

#### 3-2. 使用細胞株とプラスミドの挿入、免疫細胞染色、ルシフェラーゼアッセイ

マウス線維芽細胞株(NIH-3T3)細胞を使用し、WT-ACVRL1 及びバリエーション ACVRL1、endoglin プラスミドを導入した。上記プラスミドを導入した NIH-3T3 細胞をヒト ALK1 に対する一次抗体で標識し、緑色蛍光を発する二次抗体で染色した。ACVRL1 シグナルの転写活性を評価する為、ALK1 シグナル下流で転写が行われる転写因子として、既報を参考 [5]に BRE(BMP response element)を使用した。WT 及びバリエーション ACVRL1 を導入した NIH-3T3 細胞を BMP9 で刺激し、リン酸化 SMAD1/5/9、SMAD1 に対する抗体でウエスタンブロットを行った。

#### 3-7. 三次元構造予測

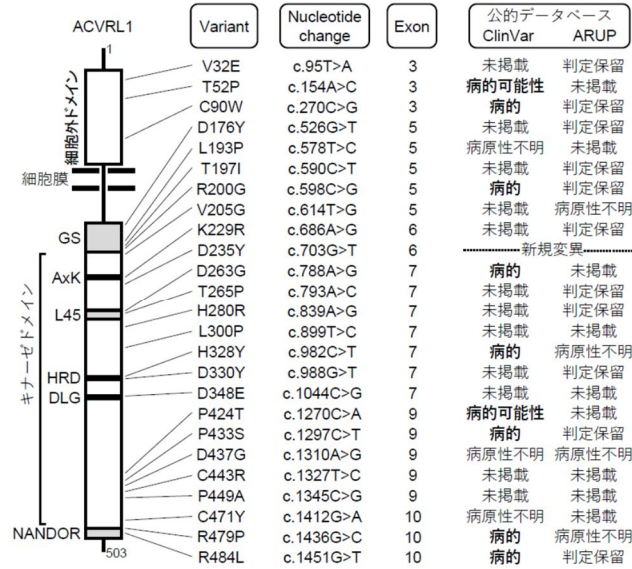
ACVRL1・BMP2・SMAD1 の三量体・二量体構造を ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)を用いて予測した [4]。ACVRL1、BMP2 は細胞内部分を、SMAD1 は MH2 ドメインを使用した。

### 4. 研究成果

4.1. 選択した 25 種のバリエーションは、図 1 に指し示す。ClinVar で病的(Pathogenic)あるいは病的可能性が高い(likely pathogenic)と掲載されているバリエーションは 9 種で、他は掲載されていないか病原性不明である。ユタ大学の ARUP には今回解析した全てのバリエーションは掲載がないか、病原性が不明あるいは判定保留となっており、病原性が分からないものが大多数を占める。

これらの全てのバリエーションは東北メディカルバンクの正常人日本人のパネル 38KJPN にアレレル頻度の登録はなく、世界最大の正常人データベースである gnomAD にも同様にアレレル頻度が掲載されていないため、一般人にはないものと考えられる。

図 1・解析したバリエントと、公的データベース(ClinVar・ARUP)での病原性掲載状況



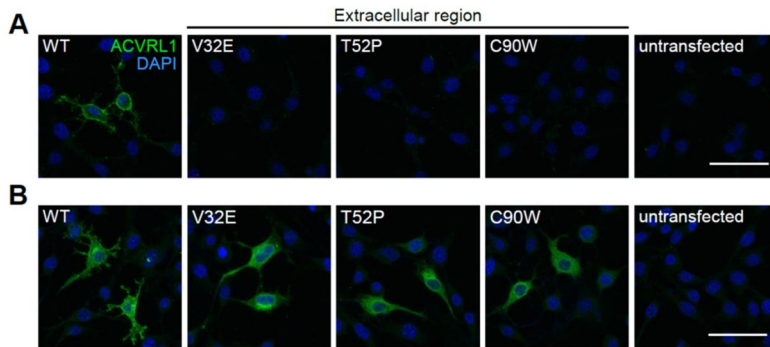
4.2. 病原性予測プログラムによる ACVRL1 バリエントの評価

今回我々はアミノ酸の進化的保存性や蛋白の構造・生化学的な特性のみからバリエントの病原性を予測する4つのプログラムを使用した。25種のバリエントのうち、細胞外ドメインに属するV32E及びT52PをSIFTとPROVEANは病原性なし(ToleratedあるいはNeutral)と判定していた。V32EはPolyPhen-2も病原性なし(Benign)と判定し、SIFTはT265Pも病原性なしと判定し、プログラムにより細胞外ドメインを中心に差異が生じた。

4.3 細胞内でのバリエント ACVRL1 の局在性

野生型 ACVRL1 は細胞膜に局在する様子が確認出来たが、細胞外ドメインに属する3種のバリエント(V32E・T52P・C90W)は染色されなかった。Triton-Xを用いて細胞膜を破壊して染色したところ、細胞質内には ACVRL1 蛋白の存在が確認できた。本実験系では細胞膜まで輸送されないことが示唆された。結果は示さないが、細胞質内のバリエントはすべて細胞膜へ絵の局在が同じ実験で確認できており、この3つのバリエントの特徴と考えられる。

図 2:細胞外ドメインの3つのバリエント (V32E・T52P・C90W) の ACVRL1 局在



カラム A は通常の ACVRL1(緑色の蛍光)での染色。野生型(WT)以外は確認できない  
 カラム B は Triton-X での細胞膜破壊後の染色。バリエント ACVRL1 も細胞質内には存在することが確認できる。

4.4 ルシフェラーゼアッセイによる SMAD 依存転写活性の評価

ACVRL1 は TGF- $\beta$  ファミリーに属する蛋白であり、BMP9/10 をリガンドとしてセリン/スレオニンキナーゼとして働き、SMAD1/5/9 をリン酸化し SMAD4 との複合体を形成、SMAD の複合体が核内に移行することで下流にある転写因子を活性化する。(図 3)

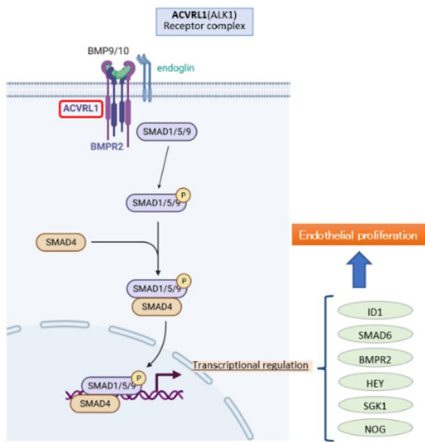


図 3 : ACVRL1 による SMAD 依存転写

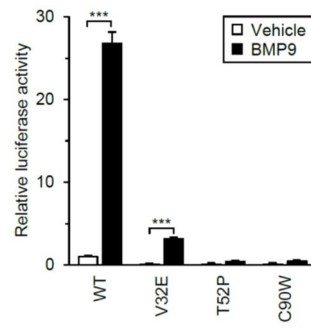


図 4 : 細胞外ドメインのバリエーションでのルシフェラーゼ活性

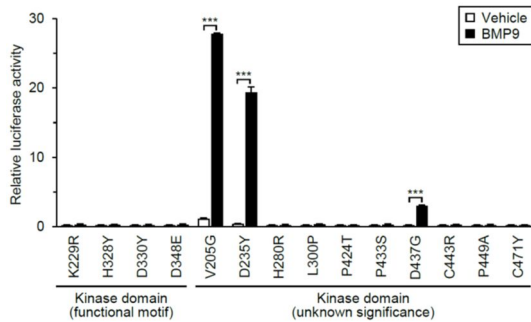
4.5 細胞内キナーゼドメインのバリエーションにおける SMAD 依存転写活性

今回使用した 22 種の細胞内キナーゼドメインのバリエーションは、ACVRL1 免疫細胞染色では細胞膜に局在が確認できている。これらについても BMP9 刺激時の BRE をレポーターとしたルシフェラーゼアッセイを実施した。セリン/スレオニンキナーゼで保存性の高い AxK、HRD、DLG モチーフに属する 4 種 (K229R・H328Y・D330Y・D348E) 及び、重要性がはっきりしない 10 種のバリエーションについて、図 5 のようにセリン/スレオニンキナーゼで保存性の高いモチーフに属する部位の変異は BMP9 刺激時のルシフェラーゼ活性上昇が見られなかった。一方、重要性がはっきりしていないバリエーションも多くはルシフェラーゼ活性の上昇が見られなかったが、V205G・D235Y では野生型に近い活性上昇が認められた。

4.6 ALK ファミリーで保存性の高いドメインの変異

ALK ファミリーレセプターで共通のモチーフとして、L45 loop、NANDOR ドメイン、GS ドメインが知られている。図 6 に示すように、L45 loop 及び NANDOR ドメインの変異では BMP9 刺激時の SMAD 依存転写活性が抑制されていた。しかし、GS ドメインの 2 種の変異 (D176Y・R200G) には活性が低下していなかった。

A



B

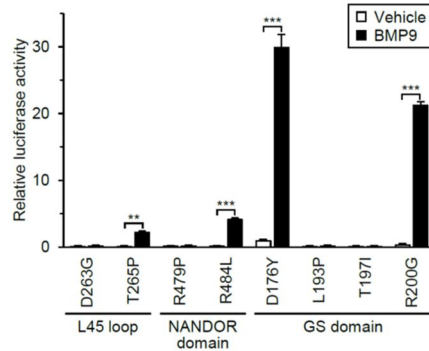


図 5A 細胞内ドメインの 14 種の変異のルシフェラーゼ活性

5B ALK ファミリーで保存性の高い部位の変異でのルシフェラーゼ活性

4.7 立体構造からの ACVRL1-BMPR2、ACVRL1-SMAD 二量体について

ACVRL1-BMPR2 に関しても同様の立体構造を作成したところ、ALK2 で既報のように ACVRL1 の NANDOR ドメイン部分の R484 が BMPR2 の D482、D485 と近接することが判明した。(図 7-C)R484 は今回の研究で R484L を解析し、SMAD 依存転写活性が上昇しなくなることを確認している。この R484 は ACVRL1-BMPR2 の結合に重要な残基と立体構造からも強く示唆される。



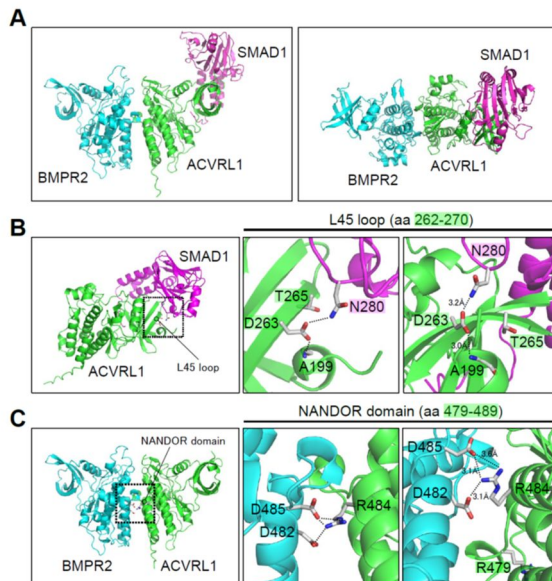


図 7A, B, C ColabFold により作成した ACVRL1-SMAD1-BMPR2 の多量体の三次元予測構造

#### 4.7 ACVRL1 のバリエントにおける病原性予測と細胞実験による評価について

今回の研究では、in silico の病原性評価プログラムは細胞外ドメインのバリエントの病原性を低く見積もっていると考えられた。これは進化的保存性に重きを置いたプログラムであるため、種間の保存性が高くない細胞外ドメインを病原性が低いと判定しやすいものと推測される。しかるに細胞実験では細胞外ドメインのバリエントの ACVRL1 蛋白の局在や機能の低下は明らかであり、実験研究の方がより鋭敏に評価できると思われた。

また細胞内ドメイン 22 種のバリエントについても本実験系では 18 種については変異が生じる事で ACVRL1 蛋白の機能低下・喪失が起きることが確認できており、ClinVar や ARUP と言った公的データベースで病原性がよく分からない、となっていて、これらは病原性が高いと判断することが可能となった。一方で 4 つのバリエント (D176Y・D235Y・R200G・V205G) については本実験系では機能低下を証明することが出来なかった。これらは definite HHT の複数の患者から検出されていることから病的バリエントである蓋然性が高いと思われる。

今回の研究を通じて、HHT 患者から検出された変異の病原性をより確固たるものとして出来たと共に、細胞外ドメインの変異については病原性予測プログラムよりもより鋭敏に病原性を推定することが可能であった。またこれまで明らかではなかった ACVRL1-BMPR2 の立体構造と NANDOR ドメインの機能についても ColabFold を用いた三次元構造予測で推定することが可能となり、HHT の発症機序や ACVRL1 の構造に関して新たな知見を追加することができたと考えている。一方で今回の実験研究では機能低下が再現出来なかったバリエントに関しても解析を進めることで、HHT の発症機序に SMAD 依存転写活性の低下以外の機序が関与していることが解明される可能性があると考え、本疾患の病態解明に寄与するものと考えている。

1. Shovlin, C.L., et al., *Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome)*. Am J Med Genet, 2000. **91**(1): p. 66-7.
2. Bernabeu, C., et al., *Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*. J Clin Med, 2020. **9**(11).
3. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
4. Mirdita, M., et al., *ColabFold: making protein folding accessible to all*. Nat Methods, 2022. **19**(6): p. 679-682.
5. Ricard, N., et al., *Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1604-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩朝 徹
2. 発表標題 ACVRL1変異と受容体分子機能の関連解析
3. 学会等名 第24回日本小児心血管分子医学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩朝 徹
2. 発表標題 ACVRL1変異と受容体分子機能の関連解析
3. 学会等名 HHT JAPAN 2021
4. 発表年 2021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
研究分担者	渡邊 裕介  (Watanabe Yusuke)  (20562333)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長   (84404)	
研究分担者	中川 修  (Nakjagawa Osamu)  (40283593)	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   (84404)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	浦崎 明宏 (Urasaki Akihiro) (40550083)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長  (84404)	
研究分担者	黒崎 健一 (Kurosaki Ken-ichi) (40561460)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・特任部長  (84404)	
研究分担者	石川 泰輔 (Ishikawa Taisuke) (60708692)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長  (84404)	
研究分担者	白石 公 (Shiraishi Isao) (80295659)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・部長  (84404)	

	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
研究協力者	垣花 優希 (Kakihana Yuki)	国立循環器病研究センター・研究所・リサーチフェロー  (84404)	
研究協力者	長田 菜実 (Nagata Nami)	国立循環器病研究センター・研究所  (84404)	
研究協力者	原田 恭弘 (Harada Yukihiro)	国立循環器病研究センター・研究所  (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	森崎 裕子  (Morisaki Hiroko)	榊原記念病院・病院	

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