

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390059

研究課題名（和文） BMP 受容体変異を伴う細胞増殖性疾患の分子基盤の解明

研究課題名（英文）

Molecular basis of proliferative diseases associated with BMP receptor mutations

研究代表者

別府 秀幸（BEPPU HIDEYUKI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：20550479

研究成果の概要（和文）：骨形成因子(BMP)は細胞膜に存在する BMP 受容体（BMPR2 など）に結合し細胞内へシグナルを伝達する。BMP 受容体の遺伝子変異は肺高血圧症、先天性心疾患、若年性ポリポーシス症候群など細胞増殖性疾患を引き起こすことが知られている。本研究では BMPR2 遺伝子変異マウスおよびマウス由来線維芽細胞を用いて細胞増殖異常に関わる分子機構の解析を行なった。その結果、BMPR2 欠損線維芽細胞が上皮細胞の増殖を促進することが明らかとなった。また BMP シグナルの異常は TNF と NK-kB シグナルを増幅させることから炎症刺激に対する反応性の亢進が病態の形成に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：BMP signaling is transduced by BMP receptors (e.g., BMPR2), which are located at cell membrane. Mutations of BMP receptor genes are known to cause pulmonary hypertension, congenital heart defects, and juvenile polyposis syndrome. We investigated molecular mechanism, by which BMP receptor mutations develop cell-proliferative diseases, using BMPR2-deficient mice and fibroblast cells isolated from the mice. We found that BMPR2-deficient fibroblast cells promoted proliferation of epithelial cells. Also, suppression of BMP signaling augmented TNF-induced NK-kB activation. These results suggest that increased inflammatory response may play an important role in the pathogenesis of the diseases caused by the BMP receptor mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	9,700,000	2,910,000	12,610,000

研究分野：分子病態学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：大腸ポリープ、上皮間質相互作用、BMP、受容体、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨形成因子(BMP)は多彩な作用をもち、心血管病変、腎疾患、大腸がん、前立腺がん、骨格異常など様々な疾患の発生に密接に関与している。BMP の受容体のひとつである 2

型 BMP 受容体(BMPR2)の遺伝子変異が原発性肺高血圧症患者において報告された。さらに BMP の 1 型受容体である ALK3 やシグナル伝達分子である Smad4 の変異は若年性ポリポーシス症候群患者で報告されている。

(2) 組織特異的遺伝子改変マウスを用いた実験より間質細胞の遺伝子変異が上皮細胞の増殖に影響を与えていることが示唆された。我々が遺伝子改変マウスを用いて行なった大腸間質細胞特異的な BMPR2 遺伝子の欠損は若年性ポリポーシス症候群に類似した病変を引き起こした。一方で、腸上皮細胞特異的に ALK3 または Smad4 を欠損させても上皮細胞の腫瘍化は見られないという論文が発表された。これらの結果より、間質細胞の BMP シグナル異常が上皮細胞の腫瘍化に関わっていると仮説を立て、このことを上皮細胞と間質細胞の共培養系を用いて解析を行なうこととした。

(3) BMPR2 の特徴的な構造として C 末端にテイルドメインが存在する。このテイルドメインがなくても BMPR2 のキナーゼ活性には影響しない。しかしながら、原発性肺高血圧症患者の一部にこのテイルドメインに変異が見つかった。このことから、これまで明らかにされていないテイルドメインの機能が示唆された。

2. 研究の目的

骨形成因子 (BMP) の 2 型受容体 (BMPR2) 遺伝子は肺動脈血管構成細胞の異常増殖を特徴とする原発性肺高血圧症の原因遺伝子である。また我々が作成した BMPR2 遺伝子改変マウスを用いた研究から大腸腫瘍や心臓弁肥厚などの細胞増殖性疾患の発生において BMPR2 遺伝子が重要な役割を担うことが明らかとなった。細胞増殖性疾患のモデルマウスをこれまで樹立してきたが、詳細な分子メカニズムの理解は未だ不十分である。本研究計画においては、それらの疾患の詳細な病態解析とともに、BMPR2 遺伝子変異がどのような分子の発現や機能を修飾することにより疾患の発症にいたるのかを分子レベルで解明することを目的とする。

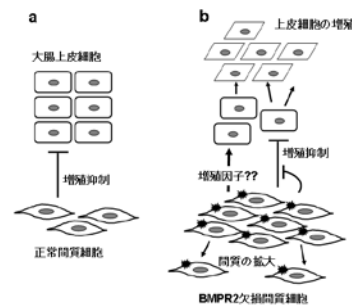
3. 研究の方法

本研究計画においては、我々が作成した BMPR2 コンディショナル変異マウスに生じる大腸ポリープの病態解析を中心に、そのポリープ形成に関与する液性因子の同定を行う。野生型マウス由来の大腸粘膜および変異マウス由来のポリープ組織から、それぞれ RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにてスクリーニングし、定量的 RT-PCR 法にて検討を行う。同定された因子の BMP 刺激に対する応答性を含め、シグナル伝達経路や発現調節の解析も行う。さらに、BMPR2 の特徴的な構造であり、原発性肺高血圧症の患者で変異が報告されているエクソン 12 がコードする C 末テイル

ドメインの機能解析を行う。すでにエクソン 12 を欠損したマウスは作成されており、その表現型の解析と、そのドメインを欠損した BMPR2 を介した BMP シグナルの生化学的な特性を明らかにする。

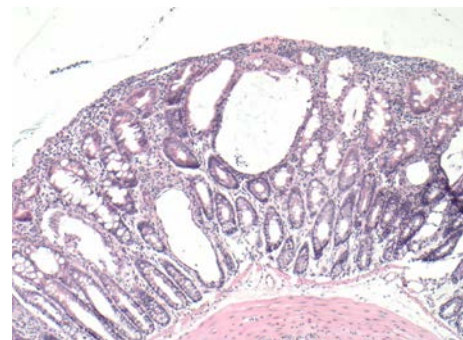
4. 研究成果

BMPR2 遺伝子欠損マウスに発生する大腸ポリープの解析結果より間質細胞における BMPR2 遺伝子の機能が上皮細胞の腫瘍化において重要な役割を担うことが明らかとなった。すなわち、BMPR2 遺伝子欠損間質細胞からの何らかのシグナルが上皮細胞の増殖を促進させることが示唆された (図 1)。



(図 1)

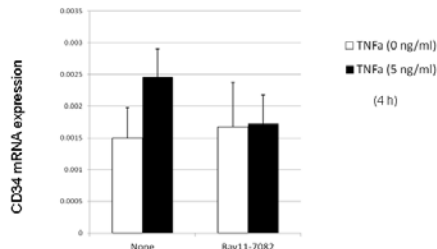
これらの遺伝子改変マウスの大腸ポリープはヒトにおける若年性ポリポーシス症候群と病理学的に類似している (図 2)。



(図 2)

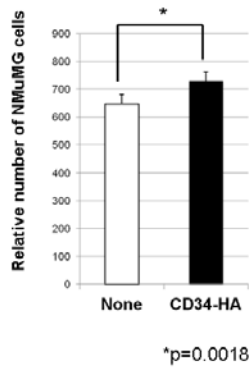
そこで BMPR2 遺伝子欠損線維芽細胞から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイにて遺伝子発現の変化を正常細胞と比較を行った。遺伝子発現が増加していたものに endoglin, lipocalin2, CD34, prostaglandin E synthetase などが認められた。特に CD34 はヒトの消化管間質腫瘍 (GIST) での腫瘍マーカーであり、CD34 が若年性ポリポーシス症候群の発症機構にも何らかの影響を及ぼすことが示唆された。また BMP シグナルの欠損あるいは減弱は NF- κ B シグナルの亢進を引き起

こすことも見出した。さらに、この NF- κ B シグナルによって CD34 は発現誘導されることが本研究によって明らかとなった (図 3)。



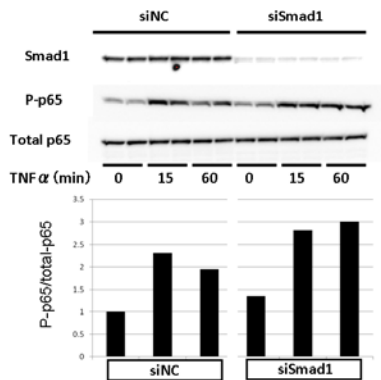
(図 3)

線維芽細胞に CD34 遺伝子を過剰発現させ、正常マウス乳腺上皮細胞 (NMuMG) との共培養を行なうと NMuMG 細胞の増殖が促進される結果も得た (図 4)。



(図 4)

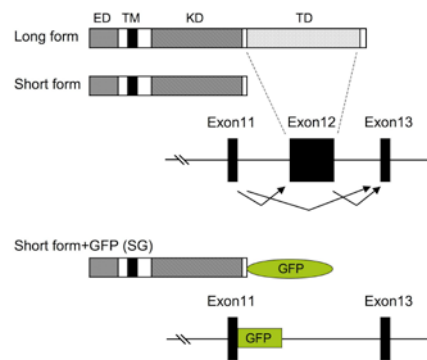
また Smad1 の発現を siRNA 法で抑制すると NF- κ B (p65) のリン酸化が亢進することも確認した (図 5)。



(図 5)

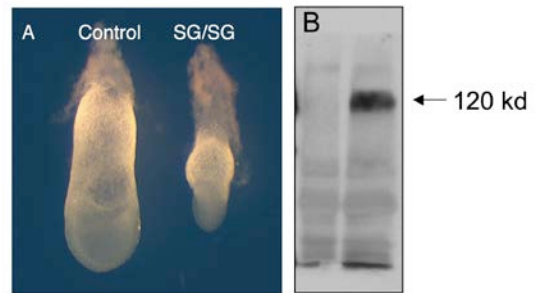
したがって、Smad を介した経路が NF- κ B の活性化調節に関与している可能性が考えられた。これらの結果より間質細胞での BMP シグナル異常が NF- κ B シグナルを活性化し、CD34 発現を誘導し、さらに上皮細胞の腫瘍化に関わっていることが示唆された。

次に BMP2 の特徴的な構造であるテイルドメイン (TD) の機能を解析するためにジーンターゲット法を用いて、このドメインをコードするエクソン 12 を欠損させたマウスを作製した (図 6)。



(図 6)

エクソン 12 を欠損させ、GFP カセットを挿入することにより BMP2 の short form に GFP が融合したタンパクを産生する (SG allele)。この SG allele をもつ変異マウス (ホモ) は胎生初期に致死となった (図 7)。この結果よりテイルドメインは哺乳類の初期発生に必要であることが示された。



(図 7)

この BMP2 short form は long form と比較して BMP7 のシグナルに対する応答性が亢進していることが明らかとなった。テイルドメインが欠損することで ALK2 との複合体形成が促進された。これらの結果より過剰な BMP シグナルが初期胚の発生を阻害した可能性が示唆された。

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 8 件)

①Saitoh M, Shirakihara T, Fukasawa A, Horiguchi K, Sakamoto K, Sugiya H, Beppu H, Fujita Y, Morita I, Miyazono K, Miyazawa K. Basolateral BMP Signaling in Polarized Epithelial Cells. PLoS One. 2013. May 13;8(5):e62659. (査読有)
doi:10.1371/journal.pone.0062659

②Bagarova J, Vonner AJ, Armstrong KA, Bürgermann J, Lai CS, Deng DY, Beppu H, Alfano I, Filippakopoulos P, Morrell NW, Bullock AN, Knaus P, Mishina Y, Yu PB. Constitutively Active ALK2 Receptor Mutants Require Type II Receptor Cooperation. Mol Cell Biol. 2013 Jun;33(12):2413-24. (査読有)
doi: 10.1128/MCB.01595-12.

③Beppu H. Smad7-modified alleles by various gene-targeting strategies. J Biochem. 2013 May;153(5):399-401. (査読有) doi: 10.1093/jb/mvt020.

④Han R, Beppu H, Lee YK, Georgopoulos K, Larue L, Li E, Weiner L, Brissette JL. A pair of transmembrane receptors essential for the retention and pigmentation of hair. Genesis. 2012 Nov;50(11):783-800. (査読有) doi: 10.1002/dvg.22039.

⑤Gamer LW, Tsuji K, Cox K, Capelo LP, Lowery J, Beppu H, Rosen V. BMPR-II is dispensable for formation of the limb skeleton. Genesis. 2011 Sep;49(9):719-24. (査読有) doi: 10.1002/dvg.20761.

[学会発表] (計 9 件)

①Beppu H. Augmented NF- κ B signaling in BMPR2 deficient cells as the model for juvenile polyposis syndrome. TGF- β meeting. 2012年08月29日~2012年08月31日. Leiden Medical Center (The Netherlands).

②別府秀幸. BMPR2 欠損線維芽細胞における亢進したTNF刺激反応性とNF- κ B活性化. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年09月19日~2012年09月21日. 札幌.

③別府秀幸. BMPR2 変異マウスにおける肺血管異常とその細胞内シグナル伝達異常. PHサミット2012 (招待講演). 2012年07月28日~2012年07月29日. 岡山.

④Beppu H. BMPR2-deficient fibroblast cells promote proliferation of epithelial cells in a cell culture system. FASEB Summer Research Conferences. 2011年8月21-26日. Barga (Italy).

⑤Beppu H. BMPR2-deficient fibroblast cells exhibit augmented NF- κ B signaling in response to TNF- α . The 1st International Symposium by JSPS Core-to-Core Program (招待講演). 2012年1月24日. Tokyo (Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別府 秀幸 (BEPPU HIDEYUKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
准教授
研究者番号: 20550479