

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591588

研究課題名(和文)小児期肺動脈性肺高血圧症の発症に関わる新しい伝達経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the new pathways about onset of the childhood pulmonary arterial hypertension

研究代表者

杉山 央 (Sugiyama, Hisashi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70303419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：既知の原因遺伝子変異を認めないIPAH患者において、Delta/Notchシグナル伝達経路に関係する遺伝子変異検索を行い、同シグナル伝達経路に關与するX遺伝子変異を検出した。X遺伝子発現ベクターを作製し、mutagenesisを行い、X遺伝子変異体の発現ベクターを作製した。野生株あるいは変異体発現ベクターが導入された安定発現株の免疫染色を行ったところ、変異体発現株ではX蛋白発現量が減少していること、48時間経過した後にX蛋白の残存量が大きく減少していることが明らかになった。変異体発現株では小胞体シャペロンが著しく減少していること、さらに一部のシャペロンが小胞体から核内へ移行することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We screened IPAH patients without a known genetic mutation for mutations in genes related to the Delta/Notch signaling pathway, and detected X gene mutations involved in the signal transduction pathway. For mutagenesis, we prepared the gene expression vector X of the X gene variants. When immunostaining was performed for expression detection in stable cell lines introduced with a wild or a mutant expression vector, the mutant expression strain showed decreased X protein expression levels, and large declines in the residual amount of X protein were observed after 48 hours. Expression of the endoplasmic reticulum chaperone was remarkably reduced in the mutant expression strains, and translocation of a portion of the chaperones from the endoplasmic reticulum to the nucleus was observed.

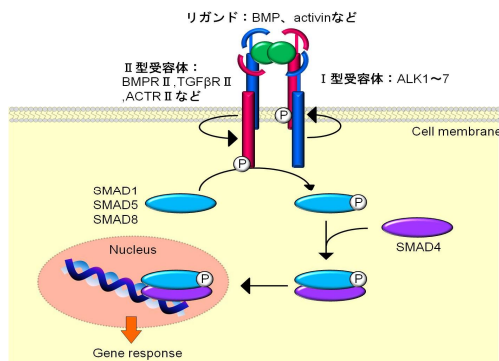
研究分野：循環器小児科学

キーワード：特発性肺動脈性肺高血圧症 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

小児の特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) は末梢肺動脈の細動脈壁の血管内皮細胞および平滑筋細胞が異常に増殖することにより血管内腔が狭窄して惹き起こされる予後不良の疾患である。これまでに IPAH の疾患原因遺伝子として TGF- β /BMP シグナル伝達経路内の II 型受容体である BMPRII 遺伝子、I 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のひとつである SMAD8 遺伝子が同定されている (図 1) 。

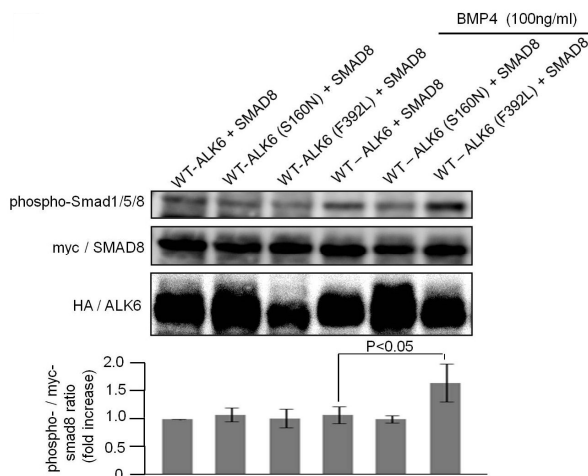
図 1. TGF- β /BMP シグナル



れるのは小児 IPAH 全体の約 30~40%にすぎない。我々は TGF- β /BMP シグナル伝達経路内に他にも IPAH を惹起しうる原因疾患遺伝子が存在する可能性を考え IPAH 患者についてこのシグナル伝達経路内の遺伝子変異を検索してきた。

その結果、小児 IPAH において ALK6 遺伝子変異 (S160N、F392L) を検出した。この変異がもたらす影響を解明するためタンパク機能解析を行った。Western blotting では ALK6-F392L は下流遺伝子である SMAD8 のリン酸化を増強していた (図 2)。

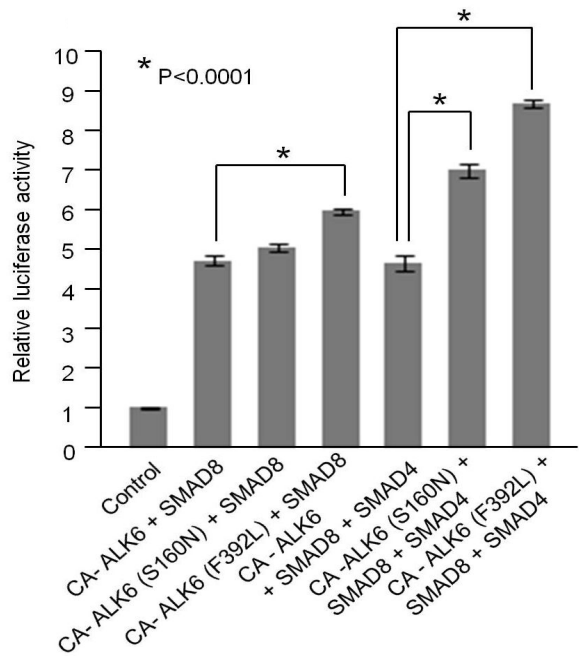
図 2. ALK6 機能解析: Western blotting



ルシフェラーゼアッセイでは constitutive active ALK6-S160N および constitutive active ALK6-F392L の両方とも SMAD8、SMAD4 が共存した場合の発光反応活性を亢

進させていた (図 3)。

図 3. ALK6 機能解析: ルシフェラーゼアッセイ



これまで同定された IPAH の原因遺伝子はいずれも SMAD1/5/8 のうちのひとつもしくは複数のリン酸化を低下・消失させていたが、我々の研究結果は ALK6 変異は SMAD8 のリン酸化を増強させることを明らかにした。また、BMPRII を欠損した肺動脈平滑筋細胞では BMP2 に対する SMAD1/5/8 のリン酸化は低下したが、BMP7 による SMAD1/5/8 のリン酸化は亢進したとの報告もある。

以上の結果からは、TGF- β /BMP シグナル伝達の低下のみでは IPAH の発症の説明は不可能であり、TGF- β /BMP シグナル伝達経路の亢進も IPAH の発症につながる可能性がある。TGF- β /BMP シグナル伝達経路に関連する IPAH 発症の機序をさらに研究する必要がある。

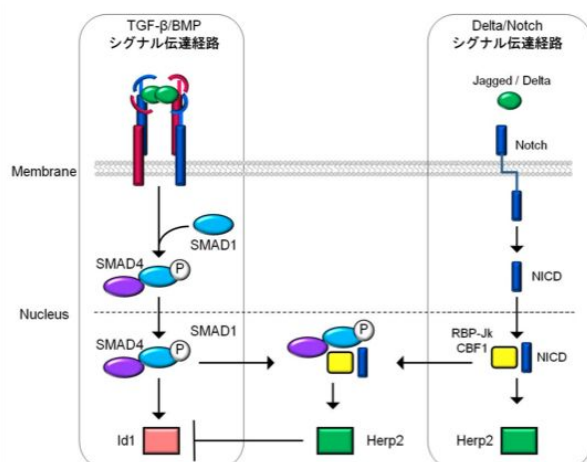
最近、IPAH の患者では肺動脈平滑筋細胞内の NOTCH3 タンパクが過剰発現していることが明らかにされ、その発現量と IPAH の重症度が相関していることが示された (Xiaodong Li et al. Nature Medicine, 2009)。この報告は、NOTCH3 が HES5 タンパク質を介して行うシグナル伝達が平滑筋細胞の増殖に関与することを示唆している。我々は、NOTCH3、HES5 を含む Delta/Notch シグナル伝達経路が TGF- β /BMP シグナル伝達経路とクロストークすることで IPAH を発症させるのではないかと考え、既知の原因遺伝子変異を認めない IPAH 患者について、Delta/Notch シグナル伝達経路に関する遺伝子変異検索を行った。その結果、複数の小児患者において Delta/Notch シグナル伝達経路に関する X 遺伝子の変異を検出した。NOTCH3、HES5 を含む Delta/Notch シグナル伝達経路が TGF-

/BMP シグナル伝達経路とクロストークすることで IPAH を発症させる可能性についてさらに研究する必要がある。

2. 研究の目的

TGF- β /BMP シグナル伝達経路と Delta/Notch シグナル伝達経路の関係としては相乗作用と拮抗作用の両方が考えられ(図4) それらの機序について研究する。これまでの予備研究で、内皮細胞が個別に存在する状況下では TGF- β /BMP シグナル伝達経路は単独で Smad1 のリン酸化とその核内移行をもたらし、核内での発現を促進させて内皮細胞の移動を活性化させる。しかし、複数の内皮細胞が接触している場合には、Jagged/Delta リガンドと Notch 受容体によって活性化された Notch 蛋白は核内で Herp2 の発現を促進して Id1 の発現を阻害して内皮細胞の移動を阻害する可能性がある(図4)。

図 4. TGF- β /BMP シグナル伝達経路と Delta/Notch シグナル伝達経路の相互作用



本研究では、内皮細胞と TGF- β /BMP シグナル伝達経路との関係や、NOTCH3、HES5 を含む Delta/Notch シグナル伝達経路が TGF- β /BMP シグナル伝達経路とクロストークする機序について明らかにする。本研究ではまず我々が検出した X 遺伝子の変異が X タンパクの合成・分解に与える影響、および Delta/Notch シグナル伝達経路内で X 遺伝子の下流遺伝子に与える影響を解析する。その後、X 遺伝子変異により Delta/Notch シグナル伝達経路と TGF- β /BMP シグナル伝達経路の相互作用がどのように変化するかを解明する。その上で、Delta/Notch シグナル伝達経路が IPAH の発症機序に関与している機序を検討する。

IPAH 患者における TGF- β /BMP シグナル伝達経路と他のシグナル伝達経路の関係に関する報告は日本国内外ともに皆無であり、本研究が世界ではじめての研究となる。TGF- β /BMP シグナル伝達経路以外に IPAH 発症を引き起こす要因を特定できれば、小児 IPAH の新しい治療法の開発や創薬の促進に

つながる。

3. 研究の方法

我々が小児 IPAH 患者において検出した X 遺伝子変異を用いて Delta/Notch シグナル伝達経路の関与を調べることができる。X 遺伝子変異が X タンパクの合成・分解に与える影響、および Delta/Notch シグナル伝達経路内で X 遺伝子の下流遺伝子に与える影響を解析する。その後、X 遺伝子変異により Delta/Notch シグナル伝達経路と TGF- β /BMP シグナル伝達経路の相互作用がどのように変化するかを解明する。その上で、Delta/Notch シグナル伝達経路が IPAH の発症機序に関与している機序に関して、X 遺伝子変異をもつマウスを作成し、肺動脈の組織や標本から、TGF- β /BMP シグナル伝達経路と Delta/Notch シグナル伝達経路の遺伝子および蛋白発現の増減を調べる。

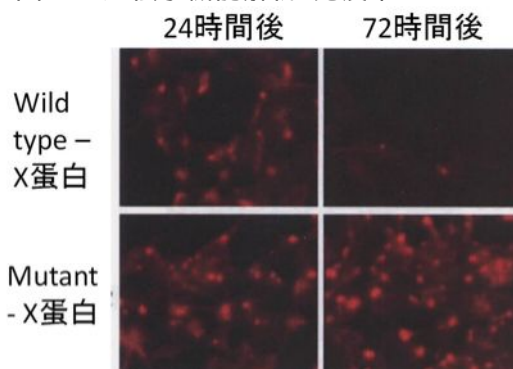
(1). X 遺伝子変異がもたらす、細胞内における X 蛋白の合成・分解への影響

X 遺伝子発現ベクターを作製した後に 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製する。その後以下の2種類の手法でタンパク機能解析を実施する。

免疫染色法

野生株および変異体 X 遺伝子発現ベクターを細胞に導入し、一定時間培養した後に抗 X 抗体と適切な 2 次抗体を反応させる。その後細胞を染色して光学顕微鏡で観察する。導入の 24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後にそれぞれ上記の観察を行い、野生株を導入した場合と変異体を導入した場合の X 蛋白の局在、発現量、残存量の相違を検討する(図5)。

図 5. X 遺伝子機能解析: 免疫染色



Pulse-chase analysis

野生株および変異体 X 遺伝子発現ベクターを細胞に導入し、一定時間培養した後に starvation を行う。その後 ^{35}S で一定時間標識し、その細胞溶解物を抗 X 抗体で免疫沈降し、免疫複合体を用いて SDS-PAGE を施行する。分離された蛋白を蛍光撮影法で確認する。導入の 24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後にそれぞれ上記の確認を行い、野生株を導入した場合と変異体を導入した場合の X 蛋白の分解速度、半減期を評価する。

(2).X 遺伝子変異がもたらす、シャペロン蛋白の発現への影響

Western blotting 法を活用して、X 遺伝子変異が各シャペロン蛋白量に与える影響を解析する。まずは野生株および変異体 X 遺伝子発現ベクターを細胞に導入し、一定時間培養した後に溶解する。溶解物を SDS-PAGE に供し、分離した蛋白をニトロセルロース膜へと転写する。この膜をブロッキングした後、ERp72、HSP70 等、各々の抗シャペロン抗体を反応させる。次に各 1 次抗体に適した 2 次抗体を反応させて、各シャペロンを蛍光イメージャーで検出して発現量を比較する。

(3).X 遺伝子変異がもたらす、TGF- β /BMP シグナル伝達経路と Delta/Notch シグナル伝達経路の相互作用への影響

ルシフェラーゼアッセイ

野生株または変異体 X 遺伝子発現ベクターを Herp2 レポーター遺伝子発現ベクターと同時に細胞へ導入し、一定時間培養する。一部は各種 BMP リガンドを追加して刺激し、さらに SMAD1 遺伝子発現ベクターとの同時導入を組み合わせる。その後細胞を溶解し、溶解物をルシフェラーゼアッセイに供してルシフェラーゼ活性を測定し、比較する。

Northern blotting

野生種または変異体 X 遺伝子発現ベクターを細胞へ導入する。一部は constitutive active ALK6 発現ベクターと同時に導入する。その後、Northern blotting を行って Herp2 mRNA の発現量を比較する。

Western blotting

野生種または変異体 X 遺伝子発現ベクターを細胞へ導入する。一部は constitutive active ALK6 発現ベクターと同時に導入する。一定時間培養した後に細胞溶解物を SDS-PAGE に供し、Western blotting を行う。蛋白が転写された膜と抗 Id1 抗体や抗 Herp2 抗体と反応させ、蛍光イメージャーで撮影して Id1 蛋白、Herp2 蛋白の発現量を比較する。

4. 研究成果

我々は Delta/Notch シグナル伝達経路が IPAH の発症に関与するのではないかと推測し、既知の原因遺伝子変異を認めない IPAH 患者において、Delta/Notch シグナル伝達経路に関係する遺伝子変異検索を行った。その結果、2 名の患者において、同シグナル伝達経路に関与する X 遺伝子の変異を検出した。

我々は X 遺伝子発現ベクターを作製した後に mutagenesis を行い、X 遺伝子変異体の発現ベクターを作製した。その後、培養細胞にこのベクターを導入し、テトラサイクリンを利用した Tet on システムにより、安定発現株を複数作製した。

野生株あるいは変異体発現ベクターが導入された安定発現株を一定期間培養して免

疫染色を行ったところ、変異体発現株では X 蛋白の発現量が減少していること、48 時間経過した後に X 蛋白の残存量が大きく減少していることがあきらかになった。さらにこれらの安定発現株内の各種小胞体シャペロンの発現量と局在についても検討したところ、変異体発現株では小胞体シャペロンが著しく減少していること、さらに一部のシャペロンが小胞体から核内へ移行することがわかった。

また、各安定細胞株の細胞増殖能および細胞生存性を検討したところ、変異体発現株は野生株よりも細胞増殖および細胞生存能力を亢進させる傾向にあることが明らかになった。さらに X タンパクに対するリガンドで刺激を行った場合に、野生株とは異なり、変異体発現株はいずれも X シグナル伝達経路を亢進しない可能性がルシフェラーゼアッセイの結果から示された。

さらに、野生株と変異株それぞれに対して、肺動脈平滑筋細胞の増殖に大きく関与することが既にあきらかになっている BMP4、もしくは X タンパクに対するリガンドを加えて BMP シグナル伝達経路に対する影響をルシフェラーゼアッセイで確認した。その結果、野生株と変異株の間で有意な相違はみられなかったが、BMP4 刺激もしくは X タンパクに対するリガンドによる刺激の存在下で、X は BMP シグナル伝達経路の活性を低下させることがあきらかになった。

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 1 件)

Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension.

Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Kawamura Y, Inai K, Ohtsuki S, Saji T, Nonoyama S, Nakanishi T. Mol Genet Genomic Med. 2014;2(3):229-239.doi:10.1002/mgg3.58.

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 央 (Sugiyama Hisashi)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：70303419

(2)研究分担者

古谷 喜幸 (Furutani Yoshiyuki)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：10424673

新谷 正樹 (Shintani Masaki)
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10578537

中西 敏雄 (Nakanishi Toshio)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：90120013

(3)連携研究者

千田 礼子 (Chida Ayako)
東京女子医科大学・医学部・研究生
研究者番号：10622160