

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293187

研究課題名(和文) 肺高血圧 右心不全発症における新規TMEM100遺伝子の病態生理的意義の解明

研究課題名(英文) A Nobel Protein TMEM100 and Pulmonary Hypertension and Right-sided Heart Failure.

研究代表者

齋藤 能彦 (SAITO, YOSHIHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30250260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症はそれに続発する右心不全は予後不良な病態であり、その成因は不明である。我々は、モノクローリンによる肺高血圧に続発する右心肥大組織の網羅的解析により、機能不明の20kDの小胞体蛋白質であるTMEM100に注目した。TMEM100は肺高血圧の原因遺伝子であるBMPR2やALK1の下流で発現制御されていた。TMEM100の遺伝子欠損マウスは胎生致死であったため、TMEM100ヘテロ欠損マウス、誘導性TMEM100欠損マウスを用いて、肺高血圧誘導実験を実施したが、残念ながらTMEM100の肺動脈性肺高血圧症への関与を支持する結果は本研究期間中には得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism for pulmonary arterial hypertension (PAH) and its complication, right-sided heart failure is unknown. Using cDNA array analyses in the right ventricular tissues in the rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension, we have focused TMEM100, which is 20kD protein located in endo-cytoplasmic reticulum. Interestingly, TMEM100 expression is upregulated in cultured human umbilical arterial endothelial cells by BMP9/10, specific ligands for ALK1/BMPR2 receptors, recognized as causative genes for PAH by the linkage analysis in familial PAH. Thus, it is expected that TMEM100 is involved in the pathogenesis of PAH and its complication, right-sided heart failure. Because of mice lacking the tmem100 gene is embryonic lethal, we generated inducible knockout mice of the tmem100 gene. Unfortunately, in spite of several experimental pulmonary arterial hypertension models, we have not found the evidence that TMEM100 is involved in the pathogenesis of PAH.

研究分野：循環器内科

キーワード：TMEM100 肺高血圧 右心不全 BMP9/10 IP3受容体 GPR78

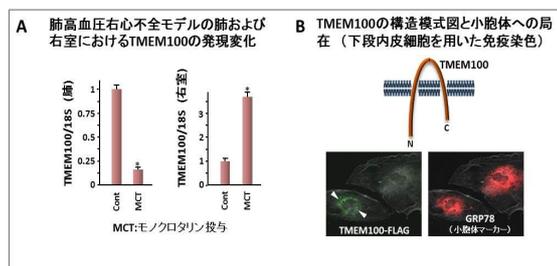
1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症は原因不明の予後不良な疾病である。家族性肺高血圧症例の連鎖解析から TGF β スーパーファミリーの受容体 ALK1 や B MPR2 をコードする遺伝子の変異が肺動脈性高血圧症の発症の原因と報告された。それらの研究を契機に肺高血圧の発症・進展に ALK1/BMPR2 受容体複合体を介したシグナル異常（機能低下）が関与することが多く報告された。しかし、それら下流で機能する分子は不明な点が多い。また、肺高血圧は右心不全を合併すると特に予後が悪い。その右心不全の進展に関与する右室特異的なメカニズムに関しても不明なままである。そのため、肺高血圧やそれに伴う右心不全の発症・進展の機序を解明する研究は重要性を増してきている。我々の研究室では以前より以下の 2 つの研究から肺高血圧 右不全発症に関与する遺伝子の網羅的解析を実施していた。

(1) in vivo 肺高血圧-右心不全モデル動物の肺および右室で変動する新規遺伝子を探索

肺高血圧から右心不全に特異的に関与している遺伝子の網羅的解析のため、モノクローリン肺高血圧・右心不全モデルと大動脈縮窄による左心不全モデルの右室と左室を cDNA マイクロアレイで解析した。その中で右心不全の右室で特異的に発現が誘導された遺伝子として TMEM100 遺伝子に着目した。また、興味深いことに TMEM100 はこの肺高血圧モデルの肺で著名に発現が低下していた（図 1A）。肺における TMEM100 の発現低下は肺動脈圧の上昇と逆相関することも発見した。TMEM100 は約 20 Kd の比較的小さいタンパク質で、小胞体に存在し、膜貫通ドメインをその N 端と C 端近傍に持つことから図 1B のように存在していると想像された。

【図 1】



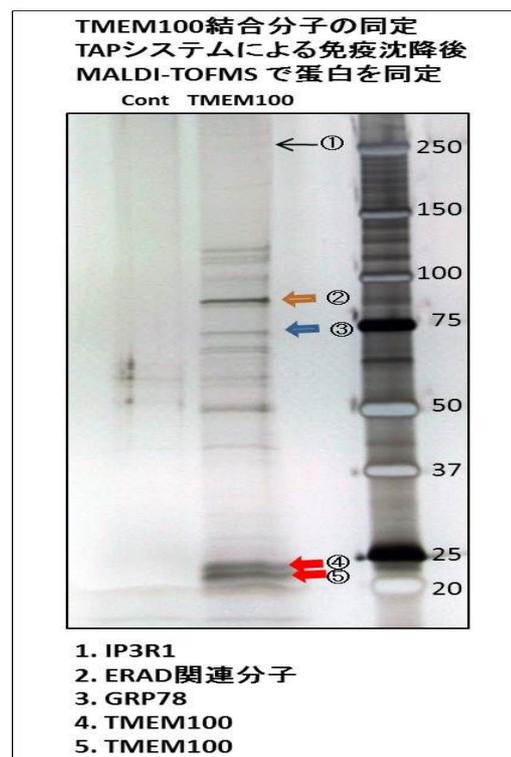
(2) in vitro 肺高血圧に關与する ALK1/BMPR2 受容体の下流で制御される新規遺伝子の探索

肺高血圧の原因遺伝子である ALK1/BMPR2 遺伝子の下流シグナルを網羅的に検索するために、リガンドである TGF β ファミリーに属するリガンド Bone morphogenetic protein 9 (BMP9)と BMP10 を内皮細胞に添加してそこで遺伝子発現が亢進する遺伝子をマイクロアレイで網羅的に解析すると、その中で最も発現が亢進したのが、奇しくも TMEM100 遺伝子であった。

以上の結果より TMEM100 が肺高血圧発症とそれに続発する右心不全発症に関わる鍵分子の候補であるとの着想に至った。

TMEM100 遺伝子欠損マウスは、血管新

【図 2】



生および動脈分化障害を来して胎生致死であった。そのため、TMEM100の生後の機能は全く不明であった。

TMEM100が小胞体に存在することにより、血管内皮細胞を用いてTMEM100を強制発現させIP-Mass-Spectrometryを用いてTMEM100と会合するタンパク質の同定を試みた結果、細胞内Ca²⁺放出に関係するIP3受容体やシャペロンタンパク質であるGRP78と結合することを認めた。

2. 研究の目的

1) TMEM100の肺高血圧症発症への意義を解明する。

2) TMEM100タンパク質の小胞体タンパク質としての機能を解明する。

3. 研究の方法

1) ラットモノクローリン肺高血圧モデルにおけるTMEM100の発現パターンの解析
ラットにモノクローリン誘導肺高血圧症を作製し、肺におけるTMEM100の発現の経時的変化等を明らかにする。

2) 誘導型TMEM100cKOマウスの開発

成体において内皮特異的および心筋特異的に遺伝子欠損が誘導できるconditional KOマウスを作製しその表現型を解析する。肺高血圧は遺伝的な素因だけではその病態が惹起されないことが多い。そこで低酸素刺激や内皮障害のためモノクローリン活性体投与など環境因子を組み合わせた実験条件での解析も行う。

TMEM100 flox マウスと VE cadherin-ER-Cre Tg マウスおよび aMHC-ER-Cre Tg マウスを交配させ、生後にTamoxifenで血管内皮特異的および心筋特異的 TMEM100 遺伝子欠損誘導した TMEM100 cKO マウスを作製する。これらのマウスが単独でコントロールに比較して有意な肺動脈肥厚や右室肥大を認めていない場合には、肺高血圧の発症に重要とされる環境因子として低酸素やモノクローリン活性体で刺激を行い各 cKO マウスの肺高

血圧や右心不全の程度がコントロールに比較しどのように変化するか、特に病理組織学的検査で肺小動脈(血管径10-50umレベル)の平滑筋の増殖肥厚、右室肥大の程度、血行動態評価(右室収縮期圧など)を評価する。これらの実験から内皮細胞におけるTMEM100が肺高血圧における肺血管のリモデリングに、心筋細胞のTMEM100が右室肥大に関与するかを検討する

3) ヒト肺動脈高血圧症におけるTMEM100の発現解析

肺動脈性高血圧患者のゲノムDNA)からBMP2とALK1の遺伝子変異を認めない症例(40症例程度)に対してTMEM100のヘテロ変異の有無を調べる。患者の末梢血リンパ球分画からゲノムDNAが抽出されたストックがあり、ここからTMEM100のタンパク合成に関わる翻訳領域に該当するエクソンおよびその周辺領域の情報をPCR法で増幅したのち、直接シーケンス法でTMEM100変異の有無を確認する。また、京都大学胸部外科伊達洋至教授との共同研究によりヒト肺高血圧症により肺移植されたレシピエント肺におけるTMEM100の発現を解析する。

4) 小胞体タンパク質としてのTMEM100の意義の解明に関する解析

TMEM100をHela細胞に強制発現させてIP3受容体(IP3R)との会合、GPR78との会合を直接共免疫沈降で確認する。また、ATP刺激による小胞体からのCa²⁺の放出にTMEM100が関与しているかを確認するために、TMEM100を過剰発現させてCa²⁺の放出を測定する。

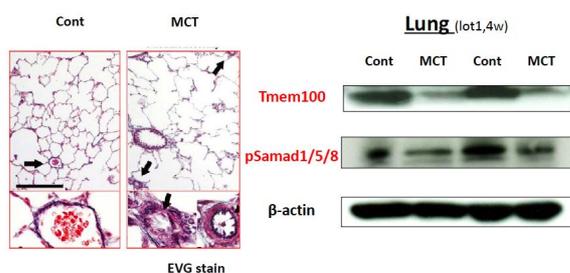
4. 研究成果

1) ラットモノクローリンモデルにおけるTMEM100の発現の解析

ラットにモノクローリン60mg/kgを投与すると、約4週間で肺高血圧が完成するが、

4週で肺動脈の肥大が観察され、肺高血圧も観察された。その時に、TMEM100のタンパク量は図のように著しく低下しており、同時にリン酸化Smad1/5/8の低下も観察された(図3)。

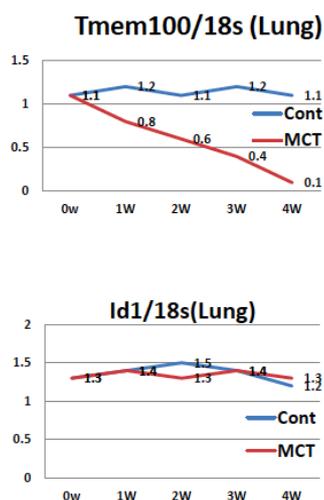
【図3】



継時的変化は、図4に示すように、モノクロタリン投与直後から継時的に低下することが観察され、肺高血圧症の進展と並行していることが認められた。

【図4】

Monocrotaline (MCT) PH Model (Rat)

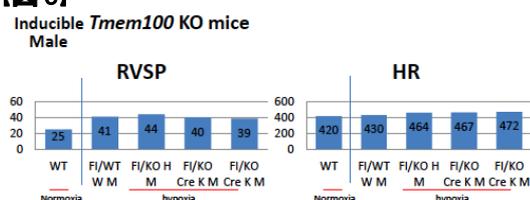


2)誘導型 TMEM100cKO マウスの結果
TMEM100 flox マウスと VE cadherin-ER-Cre Tg マウスを交配させ、生後に Tamoxifen で血管内皮特異的 TMEM100 遺伝子欠損を誘導したが、これらの cKO マウスでは、自然には肺高血圧症や右心肥大を観察しなかった。そこで、低酸素刺激により、TMEM100

cKO マウスで肺高血圧の易誘導性が観察されるかを検討した。TMEM100 の肺での発現はタモキシフェンで誘導すると誘導前と比べて10%以下に減少していた。

しかし、残念ながら図5、図6に示すように右室圧は上昇するものの、コントロールマウスと同程度であり、特に易肺高血圧発症性は観察されなかった。同時に測定した肺重量、心臓右室重量も cKO とコントロールで有意な差は認められなかった。

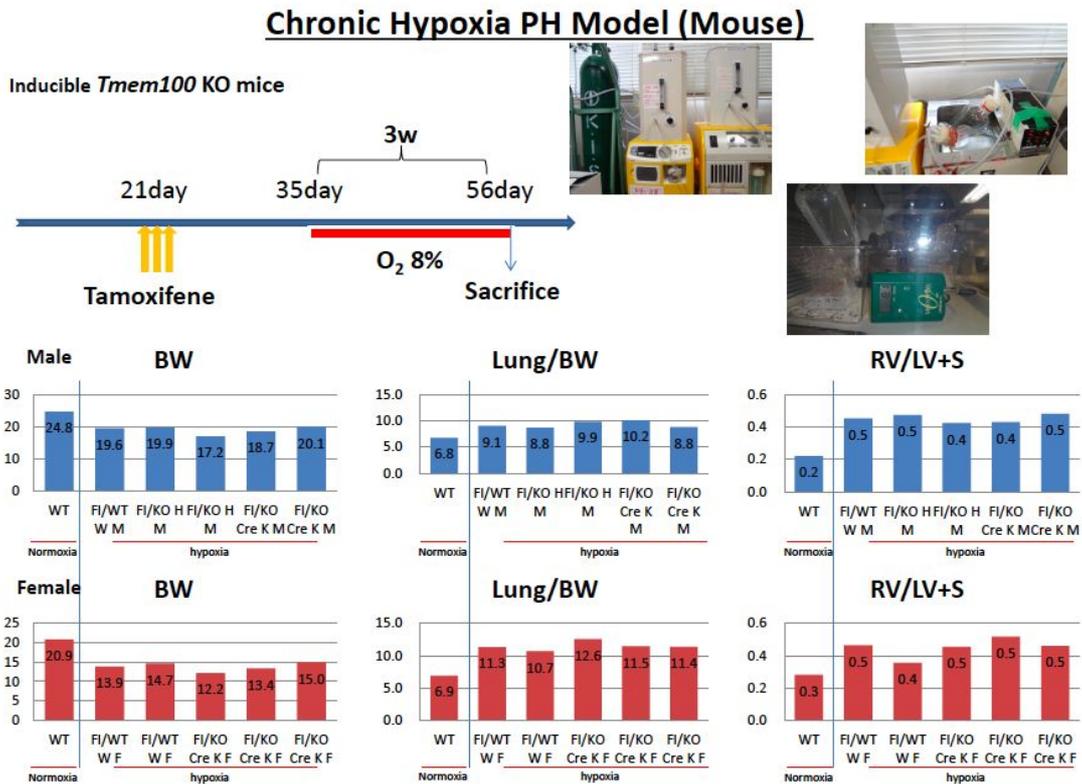
【図5】



低酸素の刺激も8%の他、11%の軽い刺激も実施したが、同じ結果であった。低酸素以外の肺高血圧の刺激として、マウスでは、ラットに使用するモノクロタリンがチトクローム p-450 によって脱水素化されてモノクロタリン ピロール (MCTp) となり肺動脈内細胞傷害を惹起し肺高血圧症を惹起するが、マウスにはこの酵素が存在しないために、通常のモノクロタリンの投与では肺高血圧症は生じない。

低酸素以外の肺高血圧の刺激として、マウスでは、ラットに使用するモノクロタリンがチトクローム p-450 によって脱水素化されてモノクロタリン ピロール (MCTp) となり肺動脈内細胞傷害を惹起し肺高血圧症を惹起するが、マウスにはこの酵素が存在しないために、通常のモノクロタリンの投与では肺高血圧症は生じない。そこで、大量のモノクロタリン(600mg/kg)あるいは活性体のMCTpを投与して肺高血圧を誘導しようとしたが、これらの刺激では、マウスでは肺高血圧が発症せずに、この系でのsKOの実験には至らなかった。野生型では十分に肺高血圧症が発症しなかったが、TMEM100 KOのヘテロマウスでは、肺高血圧が発症する可能性も考え、TMEM100

【図 6】



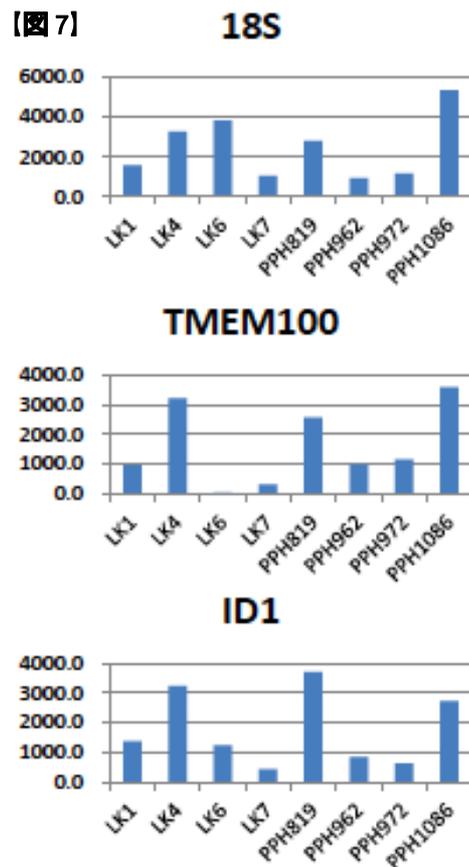
KO ヘテロマウスに大量モノクロタリン、MCTp で刺激したが、右室の重量や右室でのBNP 発現量は、野生型と同様であった。

3) ヒト肺動脈性肺高血圧症組織におけるTMEM100 の発現の検討

肺動脈性肺高血圧症のために肺移植術を実施されたレシピエントの肺組織のTMEM100 を4例、対照として肺がんにて摘出された肺組織の正常部分でのTMEM100 の発現を検討した。予備検討では、TMEM100mRNA が低下している可能性が示唆されていたが、4例で検討すると図7に示すように、肺動脈性肺高血圧症でも、対照肺組織でもばらつきがかなり見られ、肺動脈性肺高血圧症で有意に発現が低下しているとの確固とした結果は得られなかった。

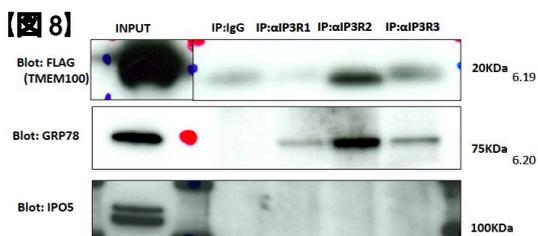
4) TMEM100 の小胞体タンパク質としての意義の解明

【図 7】



TMEM100 の機能を解析する目的で、細胞内で会合するタンパク質のタグを 2 種類結合させた TMEM100 を 293 細胞に強制発現させて免疫沈降と LC-Mass で解析し (図 2) 細胞内 Ca^{2+} 放出に關与する IP3 受容体やシャペロンタンパク質である GPR78 と同定された (図 2) 。

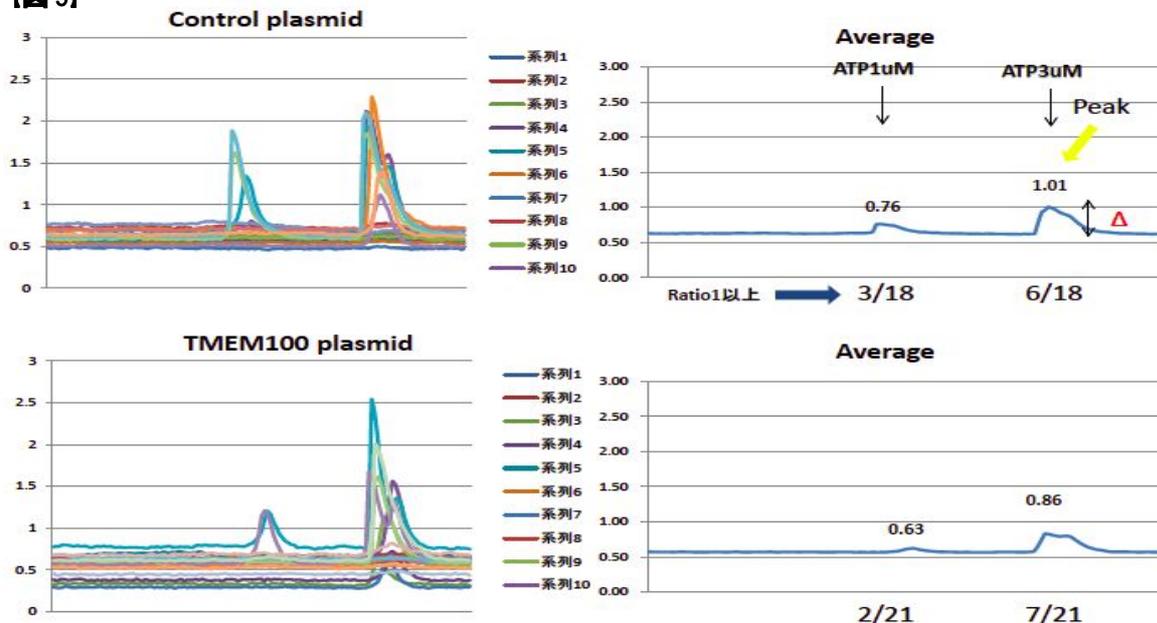
これらの会合をより確認するために直接 TMEM100 と GPR78 あるいは IP3 受容体の結合を共免疫沈降で検討した結果図 8 のように TMEM100 と IP3R2、GPR78 が会合することが証明された。



次に ATP 刺激下での小胞体からの Ca^{2+} の放出を検討した結果、TMEM100 を過剰発現させても、 Ca^{2+} の放出は変化しなかった (図 9) 。

以上の全体の結果から、TMEM100 が肺高血圧の発症に原因的に働いている証拠は得られてなかった。

【図 9】



引用文献

1) Somekawa S, Imagawa K, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato GE, Inada K, Iwamoto T, Mori T, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y. Tmem100, an ALK1 receptor signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis. PNAS 2012;109:12064.

5. 主な発表論文等

1) Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos. Dev Dyn 2015; 244: 31.

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 能彦 (SAITO, Yoshihiko)

奈良県立医科大学・医学部第 1 内科・教授
研究者番号：30250260

(2)研究分担者

尾上 健児 (ONOUE, Kenji)

奈良県立医科大学・医学部第 1 内科・助教
研究者番号：90510173