

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08508

研究課題名(和文) 肺高血圧血管病変におけるユビキチン様修飾による平滑筋分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of smooth muscle differentiation induced by ubiquitin-like modification in pulmonary hypertension

研究代表者

小和瀬 桂子 (Kawai-Kowase, Keiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50594264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肺動脈高血圧症の発症と進展における血管平滑筋細胞分化誘導の調節異常の観点から、PIAS1やSUMO化の機構を明らかにすることを目的とした。肺高血圧モデルマウスにおいて、SUMO化E3リガーゼ活性を持つPIAS1やE2酵素であるubc9の肺高血圧肺動脈部位での発現を明らかにした。さらに、PASMICにおいて、TGFbetaによる平滑筋分化マーカー誘導や血管石灰化因子であるOPGの発現誘導にPIAS1とubc9などのSUMO化シグナル、Notchシグナル等が関与する事、さらに、FGF23におけるOPG発現誘導やRunx2、Msx2の発現抑制にはSUMO化が関与する可能性がある事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺動脈高血圧症(IPAH)などの肺動脈高血圧症(PAH)は、稀ではあるが、重篤な疾患である。その病態として、肺血管内皮細胞の機能障害により、血管拡張因子と血管収縮因子のバランスが破綻していることが知られている。このため、肺血管の持続的な攣縮や血管平滑筋細胞の増殖、肺動脈内での微少血栓形成が惹起され、肺高血圧の進展につながっていると考えられる。今回、私達は、肺高血圧において、血管平滑筋の形質変換という観点から、PIAS1/SUMO化の役割を明らかにすることを目的とした。また同時に、OPGや炎症性サイトカインに対する役割も検討した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of PIAS1 and SUMOylation from the viewpoint of dysregulation of vascular smooth muscle cell differentiation induction in the onset and progression of pulmonary arterial hypertension. In a pulmonary hypertension model mouse, we clarified the expression of PIAS1 with SUMOylation E3 ligase activity and the E2 enzyme ubc9 in the pulmonary artery of pulmonary hypertension. We demonstrated the possibility that PIAS1 is involved in the induction of smooth muscle differentiation markers by TGFbeta in PASMIC. We also demonstrated that SUMOylation signals such as PIAS1 and ubc9, as well as Notch signaling, are involved in the induction of expression of OPG, a vascular calcification factor, and that SUMOylation may be involved in the induction of OPG expression and the suppression of Runx2 and Msx2 expression by FGF23.

研究分野：循環器

キーワード：肺高血圧 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

特発性肺動脈高血圧症 (IPAH) などの肺動脈高血圧症 (PAH) は、稀ではあるが、重篤な疾患である。その病態として、肺血管内皮細胞の機能障害により、血管拡張因子と血管収縮因子のバランスが破綻していることが知られている。このため、肺血管の持続的な攣縮や血管平滑筋細胞の増殖、肺動脈内での微小血栓形成が惹起され、肺高血圧の進展につながっていると考えられる。2000年に BMP2 型受容体 (BMPR2) をコードする BMPR2 遺伝子が、家族性肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子の一つとして初めて同定された。現在では BMPR2 遺伝子変異による肺高血圧発症の機序として、肺血管における TGF β /BMP2 シグナル伝達系の不均衡という説が一般的である(1)。

血管平滑筋細胞は、周囲の環境に応じてその形質を変化させ、血管の形成、血圧維持、動脈硬化などの病態形成に働く。肺高血圧肺動脈においては、中膜の肥厚、血管平滑筋の増殖が認められるため、肺高血圧症における血管平滑筋細胞の分化調節を明らかにすることは、その病態解明・治療に貢献しうると考えられる。収縮型(分化型)平滑筋細胞では、平滑筋 α -アクチン(SM α -actin)、平滑筋ミオシン重鎖(SM-MHC)、SM22 α 等の分化マーカーの発現が認められる。これまでに、私達のグループを含む多くの研究者が、TGF β シグナル系や、serum response factor (SRF)/myocardinの発現、活性が血管平滑筋の分化・脱分化に重要な役割を担っていることを示した(2)。また、SRFに結合する Krüppel like factor 4 (KLF4)等の転写因子が相互に複雑に作用し、積極的に平滑筋分化マーカーの発現を抑制し、平滑筋の形質変換を誘導することも明らかにされている(3)。私達は、血管平滑筋細胞において class I bHLH 蛋白に結合する因子としてユビキチン様修飾 (SUMO) 化 E3 リガーゼ活性を持つ protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1)を同定し、PIAS1が SRF-CArG シスエレメントを介した平滑筋分化マーカーの発現に重要な役割を担っていることを解明した(4)。また、PIASファミリーは STAT、Smadファミリーを SUMO 化することによって IFN や TGF β シグナル系を制御すること、PPAR γ 、NF κ B、GATAファミリーなどの転写因子活性を制御することが報告されている。さらに、私達は、TGF β による血管平滑筋細胞の分化シグナルに、PIAS1による KLF4 蛋白の SUMO 化が関与していることを示した(5)。

また、破骨細胞分化を調節する因子として同定された osteoprotegerin (OPG) が、血管病変形成に関与することが示され、PAHにおいては、OPGが肺動脈リモデリングを促進させることなどが報告されている(6)。申請者は、血管平滑筋細胞において、FGF23が OPG 発現を誘導することにより、血管石灰化を抑制することを示した(7)。これらの知見を基盤として、本研究は、肺高血圧において、血管平滑筋の形質変換という観点から、PIAS1/SUMO 化の役割を明らかにすることを目的とする。また同時に、OPG や炎症性サイトカインに対する役割も検討する

2. 研究の目的

本研究は、肺動脈高血圧症 (PAH) の発症と進展における血管平滑筋細胞分化誘導の調節異常の観点から、ユビキチン様修飾 (SUMO) E3 リガーゼ活性を持つ protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) の機能解明や、SUMO 化が肺動脈平滑筋にもたらす影響について解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

1) 低酸素暴露に加え、VEGF 受容体阻害剤を腹腔内投与し、肺高血圧症の病態モデルマウスを作製した。その際の肺組織において、PIAS1、ubc9、TGF β /BMP 2 シグナル、Notch シグナル、OPG 等の因子が、脱分化型、あるいは分化型平滑筋細胞にどのように発現するかを、SM α -actin やサイトケラチンも含め、免疫染色で検討した。

2) 培養ヒト肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) を用いて、TGF β が平滑筋分化マーカーを誘導する機序に、PIAS1 や SUMO 化が関与するか否かを、これらの siRNA を用いて real-time PCR 法で検討した。

3) OPG 発現に対する PIAS1 の作用を検討するために、新規の PIAS1 と ubc9 のアデノウイルスベクターを作製した。PASMC に、アデノウイルスベクターにて PIAS1 や ubc9 を強制発現させ、real-time PCR にて OPG 発現を検討した。また、ヒト OPG プロモーター/レポーターコンストラクトを作成し強制発現させると同時に、Notch シグナルである RBP-J κ や PIAS family (PIAS1, PIAS α , PIAS β)、SRF 等を強制発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。

4) PASCにおいて石灰化の機序を検討するために、PASCにおいて、アデノウイルスを用いて FGF23 を強制発現させ、real-time PCR 法にて OPG を含む石灰化調節因子の発現を検討した。さらに、先述の PIAS1 や ubc9 の siRNA を用いて、それらの発現調節を real-time PCR 法や Western blot 法で検討した。

4. 研究成果

1) 肺高血圧モデルマウスにおいて、SUMO 化 E3 リガーゼ活性を持つ PIAS1 や E2 酵素である ubc9 の肺高血圧肺動脈部位での発現を明らかにする。

肺高血圧モデルマウスにて、PIAS1、ubc9、TGF β /BMP 2 シグナル、Notch シグナル、OPG、等の因子が、脱分化型、あるいは分化型平滑筋細胞にどのように発現するかを、SM α -actin も含め、免疫染色で検討した。その結果、TGF β RI や BMP2、Notch1 は SM α -actin の発現している平滑筋細胞で染色された。一方、OPG の発現は、平滑筋分化マーカーである SM α -actin の発現部位と一致せず、サイトケラチン染色で陽性を示す気道上皮細胞に強く認められた。同様に、PIAS1 や ubc9 もサイトケラチン染色陽性の気道上皮細胞で染色された。

以上の結果より、肺高血圧モデルマウスにおいては、TGF β シグナル、BMP2 シグナル、Notch シグナルは分化型平滑筋に発現する一方で、OPG や PIAS1、ubc9 は気道上皮細胞に多く発現している事が示された。

2) PASCにおいて、TGF β による平滑筋分化マーカー誘導に PIAS1 と SUMO 化が関与する可能性がある。

まず、PASCにおいて、TGF β が平滑筋分化マーカーを誘導する機序に、PIAS1 や SUMO 化が関与するか否かを、real-time PCR 法を用いて検討した。PASC を TGF β で刺激したところ、およそ 24 時間をピークにして平滑筋分化マーカーである SM α -actin、SM22 α が誘導された。そして、PIAS1 と SUMO 化 E3 リガーゼである ubc9 の siRNA を用いたところ、PIAS1 を knock down した系で、この誘導は抑制された。この事より、大動脈平滑筋細胞と同様、肺動脈平滑筋細胞においても、TGF β は平滑筋分化マーカーを誘導し、その誘導には PIAS1 が関与していることが示唆された。しかし、興味深いことに、ubc9 を knockdown した系では、TGF β による平滑筋分化マーカーの誘導は抑制されなかった。これらの事より、肺動脈平滑筋細胞においては、TGF β による平滑筋分化マーカーの誘導には PIAS1 が関与しているが、SUMO 化の関与は認められない可能性が示唆された。

3) PASCにおいて、PIAS1 と ubc9 は OPG を誘導する。

肺高血圧において、OPG が肺動脈リモデリングを促進させる事が報告されている(6)。さらに、肺高血圧との関連が強く示唆されている BMP2 が OPG 分泌を抑制することや、炎症性サイトカインで OPG が誘導される点より、OPG が何らかの機序で肺高血圧の病態に関与していることが示されている。また、肺高血圧患者やラット肺高血圧モデル肺動脈病変で、肺動脈の石灰化が増加しているという報告も認められ、Runx2 を介した肺動脈の増殖と石灰化の機序が示されている。また、骨細胞において、OPG は Notch シグナルで誘導されることが報告されている。

そのため、OPG 発現に対する PIAS1 の作用を検討するために、新規の PIAS1 と ubc9 のアデノウイルスベクターを作製した。PASCにおいて、PIAS1 アデノウイルスベクターにて PIAS1 を強制発現させると、real-time PCR 法にて OPG の発現が増加した。同様に、ubc9 を強制発現させると、OPG の発現が増加した。このことより、OPG 発現自体に、SUMO 化が関与していることが示唆された。また、OPG 発現がどのような機序で調節されているかを検討するために、ヒト OPG プロモーター/レポーターコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、OPG プロモーターは、Notch シグナルである RBP-J κ や PIAS family (PIAS1, PIAS α , PIAS β)、SRF により著明に活性化された。さらに、PIAS1 と SRF を共発現させると、OPG プロモーター活性は有意に上昇した。以上の結果より、PASCにおける OPG 発現には、PIAS1 や Notch シグナル、SRF が関与している可能性が考えられた。

4) PASCにおいて、FGF23 における OPG 発現誘導には SUMO 化が関与する可能性がある。

私たちは、現在までに、血管平滑筋において、FGF23 が OPG の発現を増加させ、Runx2 や Mx2、BMP4 の発現を低下させ、血管の石灰化を抑制する事を示した(7)。今回、肺動脈平滑筋細胞の増殖および石灰化抑制という観点から、PASC における石灰化の機序を検討した。

PASMCにおいて、アデノウイルスを用いて FGF23 を強制発現させると、real-time PCR 法にて OPG の発現が増加した。さらに、Msx2 や Runx2, BMP4 の発現は低下していた。この FGF23 による OPG の発現は、siRNA を用いて PIAS1 や ubc9 を knockdown させることにより抑制された。このため、FGF23 による OPG 発現には、SUMO 化が関与している可能性が示唆された。また、Runx2 や Msx2 自体の発現抑制は PIAS1 や ubc9 で抑制された。上記の結果は Western blot による蛋白レベルでも同様であった。

以上のことから、PIAS1 や SUMO 化が肺動脈石灰化調節因子の発現にも関与している可能性が示唆された。

(引用文献)

- (1) Newman JH, et al, Ann Intern Med 345:319-324,2001.
- (2) Kawai-Kowase K,et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(8):1384-1390, 2004.
- (3) Kawai-Kowase K,et al. Am J Physiol Cell Physiol 292:C59-C69, 2007.
- (4) Kawai-Kowase K,et al. Mol Cell Biol.25(18):8009-8023, 2005.
- (5) Kawai-Kowase K,et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29(1):99-106, 2009.
- (6) Lawrie A, et al. Am J Pathology. 172, 256-264, 2008.
- (7) Nakahara T, et al. Atherosclerosis. 20;253:102-110. 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------