

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24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790750

研究課題名（和文） 肺高血圧症に関連するBMPによる転写制御のChIP-seq解析

研究課題名（英文） ChIP-seq analysis of transcriptional regulation by BMP in relation to pulmonary hypertension

研究代表者

鯉沼 代造 (KOINUMA DAIZO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80375071

研究成果の概要（和文）： 特発性肺高血圧症との関係が深い骨形成因子（BMP）シグナルについて、肺動脈平滑筋細胞および血管内皮細胞を用いて、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降—シーケンシング法(ChIP-seq)による下流の転写因子 Smad1/Smad5 の網羅的結合部位同定を行った。その結果肺動脈平滑筋細胞特異的な新規標的遺伝子を同定し、siRNA や阻害剤を用いた検討によりその病態との関与を示唆する役割を見出した。

研究成果の概要（英文）： Bone morphogenetic protein (BMP) signaling is closely related to idiopathic pulmonary hypertension. Using pulmonary arterial smooth muscle cells (PASCs) and endothelial cells, we determined Smad1/Smad5 binding sites by chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq). We identified PASCs-specific novel target gene. We examined and found its role in patho-physiology of pulmonary hypertension by siRNA and its inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子病理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：シグナル伝達、ゲノム、内科、病理学、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

特発性肺高血圧症（原発性肺高血圧症）， idiopathic pulmonary arterial hypertension (PAH) は家族性或いは孤発性に認められ若年発症で予後不良の疾病である。病理組織学的に肺動脈中膜の細胞性増殖、進行例では内膜の laminar fibrosis を伴い細胞増殖病変 plexiform lesion が認められ

る。臨床的検討やマウスモデルでの検討により、種々の発症機序が提唱されている。中でも Transforming growth factor- β (TGF- β) ファミリーの一つ、Bone morphogenetic protein (BMP) シグナル伝達に係わる遺伝子の異常との関連が脚光を浴びている。

(1) BMP シグナルの伝達機構・その異常と PAH

BMP ファミリーのシグナル伝達は、細胞膜表面に存在する I 型 (ALK-1, 2, 3, 6) および II 型 BMP 受容体 (BMPR2) にリガンドが結合することで始まる。リガンド・受容体複合体形成により II 型受容体のキナーゼ活性により I 型受容体がリン酸化を受けて活性化される。細胞内で BMP シグナルを伝達する主たるシグナル分子は Smad ファミリーに属する Smad1, Smad5, Smad8 (Smad1/5/8) である。Smad1/5/8 は活性化された I 型受容体のセリン・スレオニンキナーゼにより、その C 末端の SSXS モチーフがリン酸化を受けて構造変化を起こし、common-partner Smad と呼ばれる Smad4 とのヘテロオリゴマーを形成して核に移行する。核内でこの Smad 複合体は直接、或いは間接的に標的とする遺伝子のプロモーター、或いはエンハンサー領域に結合し、転写増強、抑制に係わっている。

これまでの報告で種々の BMP シグナルの伝達分子で PAH との関連が示唆されている。Idiopathic PAH の臨床例での検討では BMPR2 の変異による各種細胞内ドメインの欠失が認められる。ALK-1 や細胞外 TGF- β 結合蛋白 Endoglin の変異、そして SMAD8 の異常もまた PAH 症例で報告がある。遺伝子改変マウスの研究によっても、II 型受容体 Bmpr2、I 型受容体の一つ Activin receptor-like kinase-1 (ALK-1)、そして Smad8 の欠失による PAH 発症が示されている。これらの遺伝子異常は肺血管平滑筋細胞の増殖をきたすが、詳細なメカニズムはいまだ明らかにされていない。また血管平滑筋細胞ではなく、血管内皮細胞特異的に ALK-1 遺伝子を欠失させることによっても PAH を発症することが知られる。さらに臨床遺伝学的にも、またマウスモデルでも PAH の発症頻度は必ずしも高くないことも報告されている。このように治療法開発にとって欠かせない発症の分子メカニズム解明は未だ道半ばであると考えられる。

(2) ChIP-seq による発症メカニズム解明の可能性

研究代表者は肺線維症や多くの癌に係わる TGF- β ファミリーシグナルの制御機構に注目して 2001 年から引き続いて解析を続けてきた。そして近年のクロマチン免疫沈降法 (ChIP) と高密度ゲノムタイピングアレイや次世代高速シーケンサーを組み合わせた ChIP-Chip や ChIP-seq を利用して、TGF- β のシグナル伝達分子 Smad2, Smad3, そして Smad4 の結合部位を初めて網羅的にゲノム上にマッピングし報告した (Koinuma et al, Mol Cell Biol, 2009; Koinuma et al, Cancer Sci, 2009)。従来シグナル伝達の制御因子同定は特定の遺伝子発現制御にのみ基づいて行われてきたが、この手法により、シグナル伝達

経路全体、或いはそのサブセットにとって真に重要な制御分子を同定することができた。続いて Smad1/5 抗体を用いた予備的検討により、血管内皮細胞での Smad1/5 結合部位のマッピングも可能であることを確認した。

今日の PAH をとりまく状況と研究の進展を踏まえ、確立したこの手法を用いたアプローチにより、臨床に貢献しうる PAH 発症のメカニズムに迫ることができると考えられた。

2. 研究の目的

当研究では Bone morphogenetic protein (BMP) シグナル伝達異常による特発性肺高血圧症発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのため肺血管平滑筋細胞及び内皮細胞における BMP のシグナル伝達分子 Smad1/5 のゲノム上での結合部位を次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq によって網羅的に決定し、血管平滑筋細胞、内皮細胞などでの組織特異的遺伝子発現制御機構の解析、さらに BMP シグナル制御因子の同定を行うことを通して BMP シグナルによる肺血管平滑筋細胞や血管内皮細胞の増殖制御のメカニズムや、新たな PAH 関連標的遺伝子を同定することを目指した。

3. 研究の方法

本課題では肺血管平滑筋細胞及び血管内皮細胞からの Smad1/5 ChIP-seq データ取得と発現マイクロアレイデータ取得を行った。

細胞はいずれも市販の初代培養細胞を入手して用いた。予備的な検討によりこれらの細胞の基本的な性状と BMP 刺激による Smad1/5 活性化 (リン酸化)、主たる標的遺伝子発現変化、細胞増殖への影響等については確認済みであった。

肺血管平滑筋細胞に対しては、報告の多い BMP4 を用いた。血管内皮細胞に対しては後述のとおり BMP6 及び BMP9 の刺激を行って比較検討した。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) に用いる抗体はこれまでの研究により Smad1/5 特異的で且つ、ポジティブコントロールとしての ID1 プロモーター領域を効率的に免疫沈降できる抗体を決定済みであった。ChIP の実験系は申請者のこれまでの研究を通して ChIP-seq 解析に最適な低バックグラウンド、高濃縮のサンプル調製条件を確立しており、さらに予備的な検討で次世代シーケンサーでの Smad1/5 データ取得も可能なことを確認済みであった。

発現マイクロアレイデータは両細胞を BMP で刺激し 2 時間、及び 24 時間の total RNA を回収して未刺激サンプルとの比較を行った。2 時間、24 時間という時間はそれぞれ、

BMP シグナル応答時間として短期誘導される遺伝子、遅発性に誘導される遺伝子を効率的に把握するのに適した時間である。

こうして得られた ChIP-seq, 発現マイクロアレイデータから、Smad1/5 の結合部位と近傍の遺伝子、及びその発現変化、転写開始点からの距離、結合部位の DNA 配列の共通モチーフについて解析を行った。さらに血管平滑筋細胞と血管内皮細胞での遺伝子発現誘導の違い、また Smad1/5 結合部位の違いについて同様の解析を行った。これらの比較解析を通して、BMP の新規標的遺伝子とその役割、または Smad1/5 結合部位に存在する制御分子の同定を試みた。

これらの結果を踏まえ、肺血管平滑筋細胞または血管内皮細胞特異的な BMP シグナルの新規下流因子、Smad 分子のコファクターの機能解析をおこなった。そしてこれらの PAH の病態への関与の可能性を探索した。特に BMP シグナルによる肺血管平滑筋細胞、血管内皮細胞の増殖制御に係わる分子の同定と機能解析を行った。

4. 研究成果

肺動脈血管平滑筋細胞や血管内皮細胞における BMP シグナル下流のシグナル伝達分子 Smad1, Smad5 の結合部位を、次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq 法によって当初の予定通りに同定した。その結果、想定していた肺動脈平滑筋細胞と血管内皮細胞での Smad1/5 結合部位の違いを見出し、さらに血管内皮細胞については、BMP のアイソフォームの違い、シグナル強度の違いにより Smad1/5 結合部位が異なることが明らかになった。結合部位のモチーフ解析から、Smad1/5 が結合する配列を de novo 予測により決定し、実際にそれをゲルシフトアッセイやルシフェラーゼレポーターアッセイなどで確認した。血管内皮細胞での BMP シグナルとその標的として同定した notch シグナル伝達因子との関係について解析し、結果は雑誌論文⑥として報告した。これは雑誌論文⑦で研究代表者らが見出した、組織・細胞特異的な Smad2/3 ファミリーの結合部位の違いを Smad1/5 でも確認するものであった。これらの結果は論文総説①に発表した。

さらにこれらの肺動脈血管平滑筋細胞及び血管内皮細胞を用いた Smad1/5 の ChIP-seq データをもとに、発現マイクロアレイとの比較によって病態に関与している可能性のある新規の標的遺伝子の検索を行い、ある遺伝子を見出した。その役割につき siRNA を用いた検討を行った結果、BMP 刺激による肺動脈平滑筋細胞の分化マーカー発現がこの遺伝子のノックダウンにより抑制されることを見出した。siRNA のトランスフェクションに

よる非特異的な作用も否定できないため、この遺伝子の特異的阻害剤の投与を行ったところ、BMP 刺激による分化マーカー発現が抑制され、siRNA による検討と合致する結果であった。またこの遺伝子の産生する細胞外分泌因子を ELISA で定量評価すると BMP 刺激により増加することが確認された。以上のことからこの遺伝子が BMP シグナルによって直接誘導され、肺動脈平滑筋細胞の分化を促進する因子を分泌し、cell autonomous に BMP の作用に対して feed-forward に働いていることが示唆された。

本研究による BMP シグナル下流での PASC 特異的な標的遺伝子と、示唆されたその平滑筋細胞分化に与える影響から、BMP シグナル異常に起因する PAH の治療戦略構築上有用な発見が得られたと考えられた。

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 7 件)

① Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, and Heldin, C-H. Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene*, 査読有、2012、doi: 10.1038/onc.2012.191.

② Miyazono K, Ehata S, Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups J Med Sci*. 査読有、2012、117 (2): 143-152.

③ Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, and Miyazono K. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J Biochem*. 査読有、2012、151 (2), 205-216.

④ Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K, and Saitoh M. TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene*, 査読有、2012、doi: 10.1038/onc.2011.493.

⑤ Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M, Imamura T, Miyazono K, and Miyazawa K. RB1CC1 protein positively

regulates transforming growth factor-beta signaling through the modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. J Biol Chem. 査読有、286 (37)、2011、32502-32512.

⑥ Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K. ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. Nucleic Acids Res. 査読有、39 (20)、2011、8712-8727.

⑦ Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4 alpha in HepG2 cells. J Biol Chem. 査読有、286 (34)、2011、29848-29860.

[学会発表] (計4件)

① Horiguchi K, Koinuma D, Semba K, Miyazawa K, Miyazono K, Saitoh M. Change in alternative splicing of FGFR during TGF- β -induced EMT. The 1st International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling”, 2012年1月23～24日, 東京大学小柴ホール (東京都)

② Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Inhibitory mechanism of Thyroid transcription factor-1 on TGF- β signaling in lung cancer cells. The 1st International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling”, 2012年1月23～24日, 東京大学小柴ホール (東京都)

③ Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Aburatani H, Miyazono K. Mechanism of Smad Signaling Modification by TTF1 in lung Cancer Cells. UCSF, 36th Annual Tetrad Research Conference, 2011年9月8～10日, (Lake Tahoe, U.S.A.)

④ Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K. ChIP-seq reveals cell-type specific binding patterns of BMP-specific

Smads and a novel binding motif. FASEB Summer Research Conferences on the TGF- β Superfamily 2011年8月21～26日, (Lucca, Italy)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉沼 代造 (KOINUMA DAIZO)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80375071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし