

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591108

研究課題名(和文)肺高血圧症血管平滑筋におけるNotch-TGFbeta-PIAS1経路の解明

研究課題名(英文)The role of Notch1-TGFbeta-PIAS1 on pulmonary hypertension

研究代表者

小和瀬 桂子(Kowase, Keiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50594264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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の分化誘導の調節異常の観点から、Notch-TGFbeta-PIAS1経路を解明することを目的とした。肺動脈平滑筋細胞を用いたreal-time PCR法にて、TGFbetaやNotchが平滑筋分化マーカーを誘導する機序にPIAS1やSUMO化が関与していることを示した。また、osteoprotegerineの発現にもNotchやPIAS1が関与していることを示した。肺高血圧モデルマウスにおいて、TGFbetaR11、Notch1の発現は肺動脈中膜に多く発現していた。一方、OPGやSUMO1の発現は気道上皮細胞に強く認められた。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that the protein inhibitor of activated STAT (PIAS)1 promotes TGFbeta-induced activation of SMC gene expression at least in part by promoting sumoylation. Here, we tested the hypothesis that Notch1-TGFbeta-PIAS1 axis promote pulmonary artery hypertension (PAH). An siRNA specific for PIAS1 and ubc9, an E2-ligase for sumoylation, inhibited TGFbeta- and Notch1-induced expression of SMC specific genes in cultured pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) as determined by real-time RT-PCR. Expression of osteoprotegerine (OPG) was also inhibited by siRNA specific for PIAS1 and ubc9. Moreover, overexpression of PIAS family increased OPG promoter activity. Immunohistochemistry of model mice for hypoxia-induced pulmonary hypertension revealed colocalized expression of TGFbetaR11, Notch1 and SMC marker in pulmonary artery, whereas SUMO1 and OPG were expressed in tracheal epithelial cell. These results could indicate that Notch1-TGFbeta-PIAS1 axis participate in PAH.

研究分野：循環器

キーワード：肺高血圧

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Deng及びLaneらにより、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TGFβ/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(SMα-actin)、平滑筋ミオシン重鎖(SM-MHC)、SM22α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、TGFβ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つつある[3]。私達は最近、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]。今までに、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TGFβシグナル系を制御すること、PPARγ、NFκB、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、申請者らは、TGFβ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、私達のグループは、最近までに、細胞の分化を決定するために働くNotchシグナルが平滑筋分化マーカーの発現を誘導することを示し、肺胞上皮細胞においてはTGFβによる筋線維芽細胞への分化の上流にNotchが位置していることも示した。

2. 研究の目的

前述の背景を基盤として、私たちは、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、Notch-TGFβ-PIAS1経路を明らかにすることを目的とした。肺血管における、この経路の役割を解明することで、肺高血圧発症や進展のメカニズムの新たな局面を理解することが可能と考えられる。

3. 研究の方法

(1)まず、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞(PASMC)を用い、TGFβやNotchシグナルによる平滑筋分化マーカーの誘導にPIAS1やSUMO化が関与しているか否かについて、siRNAを用いて種々のタンパク発現をknock downし、real-time PCR法で検討した。また、PAH発症に関与すると考えられるPDGF-BB、FGF2、IL1βについても同様に検討した。次に、種々の転写因子が結合すると考えられる部位に変異を持つSMα-actinのプロモーター/レポーターコンストラクトを用い、ルシフェラーゼアッセイ法にてNotchシグナルやTGFβシグナルの反応部位を検討した。

(2)近年、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]。そのため、OPG発現がNotch-TGFβ-PIAS1経路と関与するか否かを、OPGプロモーター/レポーターコンストラクトを作成し、293細胞に導入することによりルシフェラーゼアッセイを行った。また、PIAS1やSUMO化のsiRNAを用いて、OPG発現をreal-time PCR法で検討した。

(3)肺高血圧症の病態モデルマウスを作製し、平滑筋マーカーやTGFβRII、Notch1、OPG、PIAS1、SUMO等の発現を検討した。具体的には、低酸素に加え、VEGF-R抗体を用い、よりヒト肺高血圧の病態に近いマウスモデルを作製し、上記検討を行った。

4. 研究成果

(1)まず、PASMCにおいて、TGFβ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。PASMCをTGFβ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SMα-actin、SM22αが誘導された。しかし、OPGの発現量には変化がなかった。さらに、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、平滑筋分化マーカーであるSMα-actin、SM22α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、TGFβ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、TGFβ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、TGFβ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。そのため、肺動脈平滑筋細胞の形質変換の機序は大動脈平滑筋細胞と異なる可能性があると考えられた。

また、肺動脈平滑筋細胞にNotchシグナルの細胞内ドメインであるN1-ICDを発現するアデノウイルスベクターを感染させると、平滑筋分化マーカーが誘導された。PIAS1のsiRNAを用いたところ、この誘導が抑制されることより、Notchシグナルによる平滑筋分化マーカーの誘導にもPIAS1が関与していると考えられた。興味深いことに、SUMO化E3リガーゼであるubc9をknockdownすることによってもこの誘導が抑制されることより、TGFβによる平滑筋分化マーカー誘導とは異なり、Notchシグナルによる平滑筋分化マーカーの誘導にはSUMO化が関与している可能性が示唆された。

また、PASMCにおいて、PDGFやFGF2、IL1β刺激により、平滑筋分化マーカー発現は著明に抑制された。現在、これらの抑制系にSUMO化が関与しているか検討中である。

次に、種々の転写因子が結合すると考えられる部位に変異を持つSMα-actinのプロモーター/レポーターコンストラクトを用い、ルシフェラーゼアッセイ法にてNotchシグナルやTGFβシグナルの反応部位を検討した。しかし、PASMCについては、トランスフェクション効率が悪く、これらについて有意な差を認めなかった。今後、SMα-actinのプロモーター/レポーターコンストラクトをアデノウイルスベクターに挿入し、導入効率を上げて、上記の検討を行う予定である。次いで、その結合サイトに結合する転写因子をChIP assay法にて同定し、sumoylation assay法にてその結合因子がSUMO化されるか否かを検討する必要がある。さらに、degradation assay法にタンパクの転写後修飾が起こるか否かについて検討する予定である。

(2)近年、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ている。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。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、私たちは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-kappaやPIAS family (PIAS1, PIASxalpha, PIASxbeta)、SRFにより著明に活性化された(図)。さらに、PASMC

において、siRNAを用いてPIAS1発現をknockdownし、real-time PCR法にてOPGのmRNAの発現量を測定した結果、コントロールであるGFPに対するsiRNAをトランスフェクションした細胞と比べ、PIAS1に対するsiRNAをトランスフェクションした細胞群において、OPG発現が有意差を持って抑制されていた(図)。以上の結果より、PASMCにおけるOPG発現には、Notchシグナルや、少なくともPIAS1が関与していると考えられた。私たちは過去に、血管平滑筋において、TGFβがSRFを誘導し、PIAS1とSRFが相乗的に平滑筋マーカーを誘導することを示しているため、OPG発現にもこれらの因子が関与している可能性が示唆された。

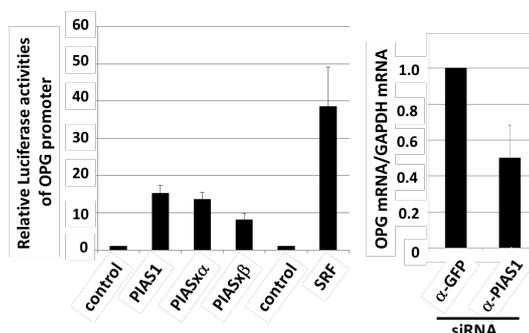


図1. PIASファミリーやSRFはOPGプロモータを活性化させ、PIAS1のsiRNAはOPG発現を抑制する。

(3) 私達は、現在までに、人の動脈硬化巣において、TGFβ、PIAS1がSMα-actinと共に発現が減弱していることを示した。興味深いことに、同部位では、BMP2の発現は増加していた。そのため、肺高血圧血管モデルマウスを作製し、その際のTGFβRII、Notch1、PIAS1、SUMO等の発現変化を免疫組織染色で検討した。

また、今までにOPGはPASMCの遊走や増殖を促進することが他の研究室から示されている。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、おそらく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[7]。そのため、私たちは、肺高血圧症の病態モデルマウスを作製し、上記に加え、OPGの発現も検討した。

具体的には、低酸素に加え、VEGF-R抗体を用い、よりヒト肺高血圧の病態に近いマウスモデルを作製した。このモデルマウスを用い、平滑筋分化マーカーとTGFβRII、Notch1、OPG、SUMO1の発現を検討した。(PIAS1の抗体作製を試みたが、PIAS1に特異的な適切な抗体の作製には至らなかったため、現在再検討中である。)その結果、TGFβRII、Notch1の発現は、平滑筋分化マーカーである、SMα-actinの発現部位と一致し、肺動脈中膜に多く発現していた。一方、OPGの発現は、平滑筋分化マーカーであるSMα-actinの発現部位と一致せず、気道上皮細胞に強く認められた。

興味深いことに、SUMO1 発現も平滑筋分化マーカーの発現部位と異なり、OPG と同一の気道上皮細胞に強く認められた。以上の結果より、OPG と SUMO1 は気道上皮に共に発現することが示された。今後、FACS を用いて、細胞の局在をさらに検討する予定である。

以上の結果より、肺動脈平滑筋内では Notch シグナルや TGFβ が PIAS1 を介して平滑筋分化マーカーを誘導することが示唆された。一方、OPG や SUMO1 は気道上皮に発現することより、気道上皮で発現した OPG が肺動脈平滑筋細胞に作用し、その遊走や増殖を促進する方向に働いていると考えられる。

さらに、呼吸器疾患 (COPD、間質性肺炎、CPFE、閉塞性睡眠時無呼吸症候群) 症例の血清 OPG を測定し、肺高血圧症における OPG のバイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とし、観察研究を行った。現在 60 名の OPG 測定をし、呼吸機能検査、心エコー検査、CT 検査を行ったが、現時点では肺高血圧や疾患ごとの血清 OPG に有意な差は認められていない。今後、症例数を増やして、さらに検討する予定である。

< 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] Condliff R, et al. Pulmonary Circulation 2(1):21-27, 2014
- [7] Lawrie A, et al. Am J of Pathology 172(1): 256-246, 2008

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)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Iso T, Utsugi T, Tomono S, Arai M, Kurabayashi M. Fibroblast Growth Factor23 Inhibits Osteogenic Differentiation Of Vascular Smooth Muscle Cells: A Protective Role Against Vasucular Calcification? Annual Meeting of American Heart Association Scientific Sessions (LA , USA) 2012.11.3-7
- (2) Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Iso T, Utsugi T, Tomono S, Arai M, Kurabayashi M. Fibroblast growth factor 23

plays a protective role against vascular calcification ESC Congress 2013 (Amsterdam, Netherland) 2013.8.31-9.4

- (3) Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Iso T, Utsugi T, Tomono S, Arai M, Kurabayashi M. A protective role of Fibroblast growth factor 23 against vascular calcification. American Heart Association Scientific Session(Dallas, USA) 2013.11.16-2
- (4) Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Iso T, Utsugi T, Tomono S, Arai M, Kurabayashi M. Evidence for a protective role of Fibroblast Growth Factor 23 against vascular calcification. 78th Annual Scientific meeting of Japanese Circulation Society Featured Research Session (Tokyo) (2014.3.21-23)

〔その他〕

ホームページ等

<http://gunma-u-med2.jp/>

医療グループ/医療グループ-循環器内科/
基礎研究・小和瀬グループ/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小和瀬 桂子 (KOWASE, Keiko)
群馬大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 5 0 5 9 4 2 6 4

(2)研究分担者

倉林 正彦 (KURABAYASHI, Masahiko)
群馬大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 0 0 2 1 5 0 4 7

中原 健裕 (NAKAHARA, Takehiro)
群馬大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 0 0 5 9 9 5 4 0