

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670492

研究課題名(和文)新しい手法による新規内皮特異的遺伝子の心血管発生における意義の解析

研究課題名(英文)Significance of a new endothelial gene TMEM100 in vascular development and disease

研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA, Osamu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：40283593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心血管系の発生と形作りのメカニズム解析は、生物学の中心課題であるだけでなく、先天性心血管奇形・遺伝性血管病などの様々なヒト疾患の病因解明に必須の研究テーマである。今回の研究において、私たちが近年報告した新しい血管特異的遺伝子の発現部位・発現量を規定する機構や分子としての働きを明らかにするための研究を行った。この遺伝子の欠損によってマウスの血管形成の重篤な異常が生ずることが判明しており、この遺伝子の発現制御に働くシグナル伝達系はヒト疾患の病態に深く関与する。今後、この遺伝子のヒト疾患における意義を検討することも重要な研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Mice that lack the ALK1/Acvr11 receptor die before birth due to severe abnormalities of vascular formation, and the defects of ALK1-mediated signaling are implicated in the etiologies of human diseases including hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arterial hypertension. We recently identified TMEM100, a gene encoding a previously uncharacterized transmembrane protein, to be an endothelium-enriched gene activated by the ALK1 signaling. Tmem100 null mice showed embryonic lethality due to the defects of vascular morphogenesis virtually identical to the abnormalities observed with the Acvr11/Alk1 deficiency. In this study, we examined mechanisms of embryonic vascular expression and molecular functions of TMEM100 using various experimental techniques such as RNA measurement and transgenic mouse analysis. Further studies are ongoing in our laboratory to clarify the significance of TMEM100 in vascular development and disease.

研究分野：発生生物学 循環器内科学 小児循環器学

キーワード：心血管発生 形態形成 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

心血管系の発生・分化・形態形成の制御機構の解析は、生物学の中心課題であるだけでなく、先天性心血管奇形・遺伝性血管病を含む、様々なヒト疾患の病因解明に必須の研究テーマである。さらに、癌・虚血性心疾患・脳血管障害などを含め、様々な成人疾患の病態にも深く関与する。

私たちはこれまで心血管シグナル伝達の研究を行っており、例えば、Notch情報伝達系の下流転写因子Hrtの意義を明らかにした (Nakagawa et al., Genes Dev 2005, Xin et al., PNAS 2007 など)。一方、Bone Morphogenetic Protein 9(BMP9)/BMP10はALK1受容体の活性化により血管内皮分化と心血管形態形成を制御する。ALK1欠損(KO)マウスは重篤な血管異常により胎生致死となり、ALK1受容体とコファクターEndoglinの遺伝子変異はヒト遺伝性出血性末梢血管拡張症(HHT)の原因となる (ten Dijke et al., Trends Cell Biol 2010)。このように、BMP9/BMP10-ALK1シグナルの生物学的・臨床的意義は大きい、その下流でどのような分子が働くかについては不明の点が多い。

最近私たちはBMP9/BMP10-ALK1シグナルによって著しい発現亢進を受ける内皮特異的遺伝子TMEM100を同定した (Somekawa et al., PNAS 2012)。TMEM100は膜貫通領域を有する遺伝子のリストにおいてTransmembrane Protein No.100と命名されていたが、その生理的意義は解析されていなかった。興味深いことに、TMEM100 KOマウスはALK1 KOマウスに酷似した血管異常を示して胎生期に死亡し、TMEM100がALK1シグナル系の新しい下流因子として心血管発生に必須であることが示された。TMEM100 KOマウスは胎生期動脈のNotchシグナル抑制・分化阻害を示し、TMEM100は新しい内皮分化制御因子として働くと考えられた。しかしながら、TMEM100の発現調節・分子機能・治療ターゲットとしての有用性については全く不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト心血管病に深く関与するBMP9/BMP10-ALK1シグナル伝達系による発生・形態形成制御機構を、私たち自身が近年報告した新規下流分子TMEM100に焦点を当てて解析するものである。これまで注目されていなかったTMEM100の発現調節・分子機能・生体における意義について、先進的な実験手技を組み合わせることで明らかにしようとする試みである。

3. 研究の方法

ヒト培養内皮細胞 (human umbilical artery endothelial cell) およびマウス内皮細胞株

(MS-1、bEnd3、C199など)におけるBMP9/BMP10-ALK1シグナル活性化に伴うTMEM100発現亢進のメカニズムをRT-PCR解析、Western Blot解析などを用いて解析した。また、TMEM100遺伝子領域を含むBacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンの大腸菌内相同組換えによるレポーター作成を行い、トランスジェニックマウス胎仔における転写活性解析を行った。さらに、TMEM100分子との共沈分子Mass Spec解析などによりTMEM100の複合体パートナー同定を試みた。

4. 研究成果

私たちは、ヒト培養血管内皮細胞におけるTMEM100のmRNA発現がBMP9/BMP10刺激によるALK1受容体シグナルの活性化により著明な亢進を示すことを明らかにしたが、既知のALK1シグナル下流遺伝子 (Id1、Id2など) の発現亢進が刺激後数時間後までにピークに達するのと対照的に、TMEM100の発現亢進は刺激後24時間まで徐々に増加する様式を取った。

そのTMEM100 mRNA発現亢進にはSMAD転写因子の活性化が必須であるが、上記の既知ALK1シグナル下流遺伝子がSMAD転写因子のリン酸化による活性化と転写調節領域への結合によって生ずるのに対し、TMEM100遺伝子の転写調節領域にはSMAD転写因子の結合が認められないと考えられた。転写阻害剤Actinomycin Dを用いた実験によってTMEM100 mRNA発現亢進は転写活性化によることが示唆されたが、一方、翻訳阻害剤Cycloheximideを用いた実験によってTMEM100 mRNA発現亢進には新たな蛋白質因子の生合成が必須であることも判明し、SMAD転写因子の活性化によって転写・蛋白質合成活性化を示す何らかの因子がTMEM100 mRNA発現の直接の制御因子になっていることも示唆された。さらに、TMEM100 mRNA発現亢進には染色体高次構造の変化を伴うエピゲノム遺伝子発現制御機構に働く複数の分子の重要性が示された。現在、血管内皮細胞におけるBMP9/BMP10-ALK1シグナル活性化によるTMEM100発現亢進機構の解析を継続している。

また、トランスジェニックマウスを用いてマウス胎仔における血管内皮特異的TMEM100発現に関する研究を進めた。先述のように、TMEM100の発現制御には染色体高次構造の変化が関与することが示唆されたため、特に今回、遠位に存在するエンハンサーのTMEM100発現に対する影響を検討した。約200kbのTMEM100遺伝子領域を含有するBACクローンを用いて大腸菌内相同組換えによってLacZレポーターを作成してトランスジェニックマウス解析を行ったところ、TMEM100の血管内皮特異的発現を再現しうる染色体DNA断片の同定に成功した。今後、このDNA断片の詳細なエンハンサー活性解析を行い、TMEM100の胎生期血管内皮特異的発現のメカニズム

を明らかにしてゆく計画である。

一方、TMEM100の分子機能を明らかにするため、TMEMと協調して働く複合体パートナー分子の解析を行った。培養細胞を用いた検討においてTMEM100と細胞内分子輸送に関連するタンパクとの複合体形成を示唆する結果を得たが、その生理学的意義については、今後の検討が必要である。また、近年TMEM100はTRPチャネルとの相互作用により細胞内カルシウムイオン制御系に影響を与えることが示されたが、実際にTMEM100ノックアウトマウスの内皮細胞においてカルシウムシグナル反応性の転写調節因子活性化の抑制が認められた。この転写調節因子活性の抑制が、胎生期の心血管系、特に内皮細胞の機能に影響を与え、ノックアウトマウスの心血管形態形成異常の一因になることが示唆された。

TMEM100発現トランスジェニックマウス系統樹立について、マウスの正常発育にはTMEM100の発現部位・発現レベルの精密なコントロールが必要と考えられ、今回作成したTMEM100過剰発現マウスの系統を樹立することは困難であった。今後、異なるストラテジーによるTMEM100発現トランスジェニックマウス系統の作成が必要と考えられた。

私たちが新しい胎生期血管内皮特異的遺伝子として報告したTMEM100について、その発現制御機構、分子機能、生理・病態生理的意義の研究は端緒についたばかりであり、今後も様々な分子生物学・発生生物学・細胞生物学的手法を組み合わせ、その詳細を明らかにしてゆきたいと考えている。

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 6 件)

Mizuta K, Sakabe M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. TMEM100, a novel intracellular transmembrane protein essential for cardiovascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2016 (in press). 査読無

Sakabe M, Morioka T, Kimura H, Nakagawa O. Roles of endothelial Hrt genes for vascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2016 (in press). 査読無

Fujita M, Sakabe M, Ioka T, Watanabe Y, Kinugasa-Katayama Y, Tsuchihashi T,

Utset MF, Yamagishi H, Nakagawa O. Pharyngeal arch artery defects and lethal malformations of the aortic arch and its branches in mice deficient for the Hrt1/Hey1 transcription factor. *Mech Dev* 139: 65-73, 2016. 査読有

渡邊裕介、久光隆、片山由美、荒木睦、石井修平、藤田匡秀、坂部正英、中川修 心血管形態形成におけるHrt/Hey転写調節因子の意義 循環器病研究の進歩 2015年36巻1号 pp74-82.

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* 244: 31-42, 2015. 査読有

Morioka T, Sakabe M, Ioka T, Iguchi T, Mizuta K, Hattamaru M, Sakai C, Itoh M, Sato GE, Hashimoto A, Fujita M, Okumura K, Araki M, Xin M, Pedersen RA, Utset MF, Kimura H, Nakagawa O. An important role of endothelial Hairy-related transcription factors in mouse vascular development. *Genesis* 52: 897-906, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

荒木睦、渡邊裕介、坂部正英、久光隆、中尾周、藤田匡秀、片山由美、井岡朋子、中川修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会「血管内皮細胞におけるBMP9/BMP10-ALK1シグナル下流遺伝子群の解析」2015年12月12日 神戸市

片山由美、渡邊裕介、水田賢、坂部正英、井岡朋子、荒木睦、石井修平、染川智、齋藤能彦、中川修 日本血管生物医学学会学術集会「胎生期内皮遺伝子 Tmem100の心血管形態形成における意義」2015年12月11日 神戸市

中川修 日本小児循環器学会学術集会シンポジウム先天性心疾患の発生と幹細胞医学「心臓血管形態形成に関するシグナル伝達系の分子機構」2015年7月16日 東京都

Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. The Conference on

Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014. 「Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos.」 2014年9月10日 京都市

Nakagawa O, Sakabe M. 18th International Vascular Biology Meeting シンポジウム 「Significance of endothelial Hairy-related transcription factors in embryonic vascular development.」 2014年4月14日 京都市

Sakabe M, Mizuta K, Sakai C, Ioka T, Morioka T, Hattamaru M, Hashimoto A, Fujita M, Kuraoka D, Okumura K, Hayashi H, Nakagawa O. 日本分子生物学会年会 「Roles of Hrt family of Notch downstream transcription factors during endocardial cushion development.」 2013年12月3日 神戸市

坂部正英、森岡崇、井岡朋子、水田賢、酒井千浩、八反丸美和、林寿来、橋本彩、木下友希、藤田匡秀、奥村和生、倉岡大希、Utset MF、Olson EN、木村弘、中川修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 「Notch および BMP-ALK1 系の下流転写調節因子 Hrt ファミリーの内皮分化・血管形成における意義」 2013年11月23日 吹田市

Sakabe M, Morioka T, Iguchi T, Ioka T, Mizuta K, Hattamaru M, Sato GE, Ito M, Hayashi H, Utset MF, Olson EN, Kimura H, Nakagawa O. 日本血管生物医学学会学術集会 YIA competition 「Roles of the Hrt family of Notch downstream transcription factors in endothelium during cardiovascular morphogenesis」 2013年9月28日 吹田市

坂部正英、森岡崇、井岡朋子、稲田賢、佐藤玄基、伊藤宗洋、八反丸美和、橋本彩、酒井千浩、林寿来、Utset MF、Olson EN、木村弘、中川修 日本先天異常学会学術集会 「Hrt 転写調節因子の内皮分化と血管形成における意義」 2013年7月23日 吹田市

坂部正英、稲田賢、橋本彩、藤田朋子、井岡朋子、佐藤玄基、森岡崇、伊藤宗洋、八反丸美和、酒井千浩、林寿来、染川智、齋藤能彦、中川修 日本先天異常学会学術集会 「心内膜床形成における新規膜タンパク Tmem100 の意義」 2013年7月

23日 吹田市

Sakabe M, Morioka T, Iguchi T, Ioka T, Mizuta M, Hattamaru M, Sato GE, Ito M, Hayashi H, Utset MF, Olson EN, Kimura H, Nakagawa O. The 7th TAKAO International Symposium 「Roles of the Hrt family of Notch downstream transcription factors in endothelium during vascular development」 2013年7月14日 東京都

Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Iwata N, Ioka T, Morioka T, Hattamaru M, Fujita M, Kinoshita Y, Sakai C, Hayashi H, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. The 7th TAKAO International Symposium 「Tmem100, a novel intracellular transmembrane protein, regulates endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion development.」 2013年7月14日 東京都

〔図書〕(計 1 件)

中川修 「心臓の発生・先天性心疾患と分泌性シグナル因子」最新内分泌代謝学(中尾一和編 970頁)第5章 心臓と腎臓の内分泌代謝 p271-273 2013年 診断と治療社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページなど

所属公式ホームページ

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/index.html

Facebook

https://www.facebook.com/ncvc.molecular_physiology

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA Osamu)
国立循環器病研究センター・研究所・
部長
研究者番号：40283593

(2)研究分担者

坂部 正英 (SAKABE Masahide)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00525983

林 寿来 (HAYASHI Hisaki)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：30533715

(3)連携研究者

該当無し