

新規内皮特異的遺伝子の先天性心血管奇形における意義

奈良県立医科大学 先端医学研究機構
生命システム医科学分野 循環器システム医科学研究室
中川 修

1. はじめに

心血管系の発生と形態形成は胎児発育に必須のステップであり、また成人においても、虚血性心疾患や癌における血管新生は疾患抑制にも増悪にも働く重要な現象である。私たちは以前より、血管内皮細胞の分化制御に必須の役割を有するNotch情報伝達系の下流転写調節因子Hrt1・Hrt2・Hrt3 (Hey/Hesr/Herp/CHFとも呼ばれる) を同定し、ノックアウト (KO) マウスにおける心血管発生の異常を報告してきた。一方、Transforming Growth Factor β (TGF β) スーパーファミリーに属する液性因子であるBone morphogenetic protein 9 (BMP9) とBMP10も、ALK1受容体 (Acvr11とも呼ばれる) を中心とする受容体複合体への結合と細胞内情報伝達系の活性化により血管内皮分化と血管形態形成を制御する。ALK1欠損マウスは動脈分化・形態形成異常により胎生致死となり、ALK1受容体とco-receptorであるEndoglinの遺伝子変異はヒト遺伝性出血性末梢血管拡張症の原因となる。このように、BMP9/BMP10-ALK1受容体系によって活性化される細胞内シグナル伝達機構の生物学的・臨床的意義は非常に大きいですが、どのような機能分子がBMP9/BMP10-ALK1受容体の下流で心血管発生や成熟機能調節に働くかについては不明の点が多く残されている。

私たちは今回、ヒト内皮細胞におけるBMP9/BMP10-ALK1受容体シグナルの下流遺伝子発現解析において、これまでほとんど研究が行われていなかった膜タンパクと想定される分子、TMEM100のmRNA発現がALK1受容体の活性化により著しい発現亢進を受けることを明らかにした。さらに、TMEM100 KOマウス胎仔が内皮細胞特異的なNotch情報伝達系の抑制と血管分化・形態形成異常を示して死亡することを明らかにした。TMEM100の分子機能は未同定のままであるが、TMEM100は血管発生・形態形成を制御するBMP9/BMP10-ALK1系やNotch系などの情報伝達系を結ぶ新しい機能分子として働くことが予想される。

2. 方法

内皮細胞培養はTakara社から購入したhuman umbilical artery endothelial cell (HUAEC) を用いて行った。TGF β スーパーファミリーのリガンドはR&D社より、その他の分子生物学試薬・組織学試薬はLife Technologies社、Qiagen社などから購入し、分子マーカーに対する抗体はCell Signaling社、Sigma社などのものを使用した。ALK1 KOマウスはJackson研究所より導入した。Tmem100 KOマウスの作製法については、他の実験手技・試薬などの詳細とともに発表論文に記載した。

3. 実験結果

BMP9/BMP10による内皮細胞ALK1受容体の活性化により発現制御を受ける遺伝子群を同定するために、ヒト培養内皮細胞 (HUAEC) のBMP9刺激の有無によるmRNA発現様式の変化をMicroarray解析により検討した。BMP9刺激により様々な遺伝子のmRNA発現が有意に亢進もしくは低下していることが明らかになったが、著明なmRNA発現亢進を示す遺伝子群にTMEM100 (TransMEMbrane No. 100) が含まれていた。TMEM100は、推定アミノ酸配列の検討により、膜貫通領域を有するタンパクをコードすると推測される遺伝子の網羅的リストにおいて命名されていたが、その遺伝子発現調節機構は全く不明であった。

そこで、さらに詳細なTMEM100 mRNAの発現プロファイルをreal-time PCR、in situ hybridizationなどを用いて検討した。BMP9刺激によるTMEM100 mRNA発現亢進は刺激後3時間後より有意となり、24時間において100-150倍に達した。その効果はBMP9最終濃度1 ng/mL投与によっても明らかであり、20 ng/mLまで容量依存的に増加した。これらの濃度は、近年報告されたBMP9のヒト血中濃度と同等であった (David et al., 2008)。TGF β スーパーファミリーに属する他の因子の効果について比較検討を行ったが、TMEM100 mRNA発現に対する効果はBMP9と同じサブファミリーに属するBMP10に限られ、BMP2、BMP4、TGF β はTMEM100 mRNA発現に対して有意な影響を示さなかった。BMP9/BMP10刺激によるTMEM100 mRNAの発現亢進は、ALK1に対するsiRNAの前処理により著しく阻害され、転写阻害剤Actinomycin Dの前投与により完全に消失した。これらの結果より、培養内皮細胞において、BMP9およびBMP10がALK1受容体コンプレックスへの結合によりTMEM100の転写亢進を引き起こし、TMEM100 mRNAの著しい増加が生じることが示唆された。一方、マウス胎仔におけるTmem100の発現を検討したところ、Tmem100 mRNAは発生期の動脈内皮細胞に発現していることが示された。さらに、ALK1 KOマウス胎仔 (胎生9.5日) におけるTmem100 mRNA発現レベルが有意に低下していることが明らかになり、生体におけるTMEM100遺伝子発現に対するBMP9/BMP10-ALK1系の重要性が示唆された。

興味深いことに、Tmem100 KOマウスは動脈型内皮分化と血管形態形成異常というALK1欠損と同一の異常を示して胎生期に死亡し、TMEM100がBMP9/BMP10-ALK1系の下流分子として中心的な働きを有する可能性が示唆された。Tmem100 KO遺伝子座のヘテロ接合体マウスは正常に発育したが、ホモ接合体マウスはすべて胎生11.5日までに死亡した。Yolk sacおよび胎仔の組織学的解析により、動脈形態と血管網構築の異常が生じており、結果として循環不全によりTmem100 KOマウス胎仔が死亡すると考えられた。KOマウス胎仔の血管形態異常が動脈系に特異的に認められたことより、動脈系の分子マーカーの発現解析を行ったところ、血管内皮細胞の動脈型分化に伴って生ずる遺伝子発現の変化が生じていないことが明らかになった。例えば、動脈・静脈非特異的に発現する内皮マーカーであるPecam1の発現は保たれていたが、Efnb2・Gja5などの動脈内皮に発現の強い内皮マーカーの発現は有意に低下していた。

発生期の血管内皮細胞において、Notch情報伝達系の活性化が動脈型への分化に必須の役割を有することが知られている。そこでNotchシグナル活性化の指標であるNotch-ICD (Notch受容体細胞内ドメイン) の発現を検討したところ、Tmem100 KOマウス胎仔の動脈内皮細胞においてNotch-ICDの発現が有意に低下しており、血管系におけるNotchターゲット遺伝子として知られ

るHrt1・Hrt2・Hrt3の発現も著しく低下していた。これらの結果により、Tmem100遺伝子の欠損による動脈内皮細胞の分化阻害にNotch情報伝達系の異常が関与することが示唆された。

4. 考察

本研究では、Tmem100 KOマウスの表現型の組織学的解析と生化学・分子生物学的手法によるTMEM100発現調節機構の解析を組み合わせ、TMEM100の心血管系における生理的・病態生理的意義を検討することを試みた。先述のように、私たちはこれまでNotch情報伝達系の心血管発生における意義、特に、その下流転写調節因子Hrtファミリーの重要性について研究を進めて来ており、今回のBMP9/BMP10-ALK1系シグナル下流分子としてのTMEM100の機能がNotch-Hrtシグナル系とつながることは非常に興味深い。今後、ALK1シグナル系とNotchシグナル系のクロストークを中心に、発生期の血管内皮細胞分化・形態形成の制御機構の検討を進めて行きたい。また、内皮細胞の機能は心臓形態形成、特に流出路や房室管における内皮間葉細胞分化と引き続く弁・中隔形成に必須の役割を有することが知られている。実際、Tmem100 KOマウスには心臓形態形成異常も認められ、その分子メカニズムの解明にも取り組んでいるところである。

5. 発表論文

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 signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 109(30):12064-9, 2012.

6. 謝辞

最後になりましたが、今回、アステラス病態代謝研究会より研究助成をいただきましたことに心から御礼申し上げます。