

論文の内容の要旨

論文題目 Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- β in human umbilical vein endothelial cells

和訳 血管内皮細胞における二つの TGF- β I 型受容体による TGF- β 標的遺伝子の解析

指導教官 後藤 淳郎助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月 1 日入学

医学博士課程

内科学専攻

No. 41-97387

氏名 太田 樹

背景 TGF- β は多彩な作用を持つサイトカインで、細胞の増殖、遊走、分化、アポトーシスに深く関与している。細胞外基質の蓄積や線維化の他、発生、免疫、腫瘍、骨リモデリング、創傷治癒にも広く関わっている。TGF- β はまた血管形成に重要な役割を果たしており、血管内皮細胞および平滑筋細胞や周細胞に作用して血管の成熟や安定化を調節すると考えられている。

TGF- β シグナルは、セリン-スレオニンキナーゼ型受容体である TGF- β II 型受容体および TGF- β I 型受容体によって細胞内に伝えられる。TGF- β I 型受容体によりシグナル伝達因子である Smad がリン酸化、活性化され、核内に移行して標的遺伝子の発現が調節される。血管内皮細胞では二つの TGF- β I 型受容体である ALK-1 および ALK-5 が発現しており、それぞれ Smad1/5/8, Smad2/3 を介してシグナルが伝達される。

TGF- β , TGF- β II 型受容体, ALK-1, ALK-5, Smad5 のノックアウトマウスでは、拡張した血管と周囲の平滑筋細胞の障害を特徴とする重大な血管形成の異常をきたす。TGF- β シグナルを修飾する膜結合蛋白の Endoglin のノックアウトマウスも同様に血管の異常を呈する。疾患とのかかわりでは、拡張した脆弱な血管からの出血と動静脈奇形を主徴とするヒト遺伝性出血性毛細血管拡張症 (HHT) の原因遺伝子として ALK-1 と Endoglin が同定されている。

このように TGF- β は血管形成に深く関与しているが、二つの異なる TGF- β I 型受容体である ALK-1 と ALK-5 の血管内皮細胞に対する作用や TGF- β 標的遺伝子の発現調節については不明な点が多い。そこで活性型 ALK-1 および ALK-5 のリコンビナントアデノウイルスを用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に発現導入し、血管内皮細胞の増殖、アポトーシス、分化に与える影響を検討するとともに、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて血管内皮細胞における TGF- β 標的遺伝子とその発現調節機構の解析を試みた。

材料と方法 初代培養 HUVEC を I 型コラーゲンコート培養皿で、胎児ウシ血清および各種増殖因子を添加した endothelial basal medium により培養した。 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) のリコンビナントアデノウイルスを HUVEC に感染させ、 β -ガラクトシダーゼアッセイによって発現量を検討し、最適な感染効率が得られる multiplicity of infection を決定した。HUVEC に活性型 ALK-1 および ALK-5、コントロールとして LacZ のリコンビナントアデノウイルスを感染させ、48 時間後に細胞数の測定、DNA 断片化によるアポトーシスの検出、マトリゲル上のネットワーク形成の観察を行った。また I 型コラーゲングル内にてアデノウイルス感染後 7 日間培養し、管腔形成を観察した。アデノウイルス感染後 8 時間、12 時間、24 時間、48 時間における ALK-1 および ALK-5 蛋白の発現、Smad のリン酸化をイムノプロットにより検討した。

同様に HUVEC にアデノウイルスを感染させ、48 時間後に RNA を抽出し、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Affymetrix 社 GeneChip™HuGeneFL) を用いて遺伝子発現を解析した。LacZ と比較して ALK-1 あるいは ALK-5 により Fold change が 2 倍以上増加または減少した遺伝子を抽出した。より有意な変化を同定するため、発現量の指標である GeneChip intensity を 100 以上とした。これら以外に血管形成および TGF- β に関連する遺伝子を抽出した。

上記と同様に RNA を抽出し、ノーザンプロットにより Smad1-Smad8, Id1-Id4, Endoglin, STAT1, IL1RL1, Eph-B4, Ephrin-B2, PAI-1 の発現を検討した。Smad6, Smad7, Id1, Id2, Endoglin, PAI-1 の発現については定量的リアルタイム PCR による検討を追加した。また HUVEC を TGF- β 3 5ng/ml で 1 時間、4 時間、24 時間処理後 RNA を抽出し、同様に定量的リアルタイム PCR にて検討した。

結果 ALK-5 を発現導入した HUVEC において細胞増殖の抑制とアポトーシスの誘導を認めた。これに対して ALK-1 では ALK-5 と比較して増殖抑制効果は

弱く、またアポトーシスの誘導を認めなかった。ネットワーク形成および管腔形成においては、ALK-5 によりいずれの場合にも抑制効果を認めたが、ALK-1 では明らかな形態的变化を認めなかった。

イムノブロットによる検討により、アデノウイルス感染 8 時間後から 48 時間後まで ALK-1 および ALK-5 蛋白の発現を認め、またそれぞれ ALK-1 による Smad1/5/8 および ALK-5 による Smad3 のリン酸化を認めた。アデノウイルス感染 48 時間後に ALK-1 蛋白の発現と Smad1/5/8 のリン酸化を最も強く認めたことから感染 48 時間後の RNA を分離し解析した。

オリゴヌクレオチドマイクロアレイの解析により、約 7000 個の遺伝子から ALK-1 により誘導された遺伝子 46 個、ALK-5 により誘導された遺伝子 52 個、ALK-1 により抑制された遺伝子 54 個、ALK-5 により抑制された遺伝子 49 個を同定した。ALK-1 により、Smad6, Smad7, Id1, Id2, STAT1 などの転写因子、HHT の原因遺伝子である Endoglin, IL1 受容体に構造的に類似する IL1RL1 などの遺伝子の発現誘導を認めた。また ALK-1 によりケモカイン受容体の CXCR4, 細胞相互作用に関連する Ephrin-A1, 細胞接着や細胞内シグナルに関与する Plakoglobin の発現抑制を認めた。これに対して ALK-5 では TGF- β シグナルや細胞外基質に関連する β IG-H3, LTBP1, 平滑筋細胞に関連する SM22 α , Caldesmon 1, ギャップジャンクション蛋白の Connexin 37, VEGF ファミリーに属する PlGF などの遺伝子の特異的な発現誘導を認めた。また血管内皮細胞の特異的タイトジャンクション蛋白である Claudin 5 や細胞-細胞外基質相互作用に関与する Integrin β_5 の発現抑制を認めた。静脈系内皮細胞に発現する Eph-B4 が HUVEC で強い発現を認め、ALK-1 により発現量の増加を認めた。動脈系に発現する Ephrin-B2 の発現は弱く、変化は認められなかったが、ALK-5 による Ephrin-B3 の発現増加が認められた。TGF- β および ALK-5 の標的遺伝子である PAI-1 は ALK-5 により有意な変化を認めなかった。

ノーザンブロットでは Smad6, Smad7, Id1, Id2, STAT1, Endoglin, IL1RL1 について ALK-1 による特異的な発現誘導を認め、マイクロアレイの結果と一致した。Eph-B4, Ephrin-B2, PAI-1 についてもマイクロアレイと同様の結果であった。

定量的リアルタイム PCR においては Smad6, Smad7, Id1, Id2, Endoglin について ALK-1 による特異的な誘導を認め、マイクロアレイおよびノーザンブロットの結果と一致した。PAI-1 については ALK-5 により有意な変化を認めなかった。Smad6, Smad7, Id1, Id2 については ALK-1 と同様に TGF- β によっても

発現誘導を認めた。Endoglin, PAI-1 については TGF- β による発現誘導は認められなかった。

考察 ALK-1 と ALK-5 は血管内皮細胞においてともに TGF- β シグナルを伝えるが、血管内皮細胞の増殖、アポトーシス、分化に対する作用はそれぞれ全く異なることが示された。ALK-5 による増殖抑制、アポトーシス誘導、ネットワーク形成と管腔形成の抑制は、血管内皮細胞の機能を抑制することによる血管の安定化や成熟、退縮によるリモデリングなどに関与している可能性が考えられる。ALK-1 では *in vitro* の条件で HUVEC に対する明らかな作用を同定できなかったが、*in vivo* においては重要な役割を果たしていると考えられ、TGF- β の作用発現には ALK-1 と ALK-5 の相互作用とバランスが重要であると思われる。

マイクロアレイを用いた解析では ALK-1 および ALK-5 により調節される血管内皮細胞の新しい TGF- β 標的遺伝子を多数同定することができた。ノーザンブロットおよび定量的リアルタイム PCR の検討によりマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの妥当性が示された。ALK-1 および ALK-5 の標的遺伝子は構造的機能的に多様でその発現調節は大きく異なることが明らかになった。

ALK-1 は Smad6, Smad7, Id1, Id2, STAT1 などの重要な転写因子の発現を多く誘導していたが、特に basic helix-loop-helix 転写因子を調節する Id は、発生、分化、血管形成に関与が深く、Id の特異的誘導が TGF- β による血管形成の調節に重要であると考えられる。ALK-5 による β IG-H3 や LTBP1 の誘導からは細胞外基質の機能調節に ALK-5 が強く関与していることが示唆され、また SM22 α など平滑筋細胞に関連する遺伝子の ALK-5 による特異的誘導は、TGF- β が血管内皮細胞と平滑筋細胞の分化や相互作用に重要であることを示唆する。ALK-5 による Claudin 5 の特異的抑制は ALK-5 のマトリゲルでのネットワーク形成抑制作用への関与を示唆する。細胞間相互作用や分化に重要な Ephrin-A1, Eph-B4, Ephrin-B3 に対する ALK-1 あるいは ALK-5 の関与は、血管形成における TGF- β の安定化作用に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

今回の報告により、血管内皮細胞において ALK-1 と ALK-5 により調節される細胞機能および TGF- β 標的遺伝子の発現機構が大きく異なることが明らかになったが、新しく同定された TGF- β 標的遺伝子についてさらなる検討を進めることにより、TGF- β の血管形成におけるメカニズムの解明と血管に関連する疾患の治療に貢献することが期待される。