

論文の内容の要旨

論文題目 Genome-wide analysis of Smad1/5 binding sites in endothelial cells

和訳 血管内皮細胞における Smad1/5 結合領域の網羅的解析

指導教員 宮園 浩平 教授

東京大学医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

森川 真大

骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP) は TGF- β ファミリーの一員であり, 発生・分化などで多彩な機能を有し様々な疾患の病態に関与していることが報告されている. TGF- β ファミリーのシグナル構成因子が関与するヒト遺伝病として遺伝性出血性毛細血管拡張症 (Osler-Weber-Rendu 病, HHT) があり, 血管内皮細胞 (EC) 特異的 I 型受容体 ALK-1, 共受容体 Endoglin そして細胞内シグナル伝達分子 Smad4 の変異が病因であることが知られている. ALK-1 は BMP 系の特異型 Smad (BR-Smad: Smad1/5/8) を介して細胞内にシグナルを伝達する. 近年 BMP-9 と BMP-10 が ALK-1 の生理的なりガンドとして同定されたこととあわせ, HHT は BMP 関連疾

患だと認識されるようになった。

これまでの遺伝子改変動物の解析から、ALK-1 を介したシグナルは血管の動脈化と血管平滑筋 (vSMC) 被覆による成熟化を促進することが知られていた。血清中には BMP-9 がシグナル伝達に十分な量 (1-12 ng/ml) 存在しており、BMP-9/ALK-1 シグナルが EC の静止期維持に関係していると考えられている。一方、BMP-2, 4, 6, 7 といった他の BMP リガンドは、EC を活性化し細胞増殖・運動能を亢進する。このように同じ BR-Smad を介してシグナル伝達するにも関わらず、リガンドの種類で細胞応答が異なる場合や、同じリガンドでもコンテキストに応じて異なった応答を認める場合があり、EC における BMP シグナルには未解明な点が多い。また、HHT の病態に関する ALK-1 シグナルの直接の標的遺伝子は明らかになっていない。

本研究では、クロマチン免疫沈降-シーケンシング法 (ChIP-seq 法) を用い、EC における BR-Smad 結合領域に関する網羅的解析を行った。この際、以下にあげる 3 点に注目して解析を行った。(1) 分化した細胞であるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) で、BR-Smad 結合領域や標的遺伝子転写調節の特徴を網羅的に解析する、(2) BR-Smad が直接結合する結合モチーフを同定する、(3) HHT の病態に関する標的遺伝子を同定する。また、BMP-9 とそれ以外の BMP リガンドとの異同を明らかにすることも目標とした。解析に用いた細胞は HUVECs で、1 ng/ml の BMP-9 もしくは 50 ng/ml の BMP-6 で刺激した。BMP リガンドの用量は、Smad1/5/8 のリン酸化レベル、BMP シグナルの既知の標的遺伝子である *IDI* mRNA の誘導、ChIP-qPCR によ

る Smad1/5 結合が同程度になるよう決定した。用いた抗体は ChIP 可能なもので、Smad1 と Smad5 を特異的に認識するが Smad8 には結合しなかった。ただし HUVECs では Smad8 の発現が低かったため、Smad1 と Smad5 の結合部位の解析を行うことで十分だと考えた。

上記の条件で ChIP-seq を施行し、Smad1/5 の結合領域のデータを得た。BMP-9 刺激時にはゲノム上の 3,750 ヶ所に結合するのに対し、BMP-6 刺激時には 880 ヶ所だった。Smad1/5 の 30%程度はイントロンに結合しており、これまで標的遺伝子で解析されたプロモータ領域よりも頻度が高かった。また、結合領域の配列は種間で保存されていた。遺伝子発現マイクロアレイとあわせて解析することで、Smad1/5 の結合が転写活性亢進と関係していることが示唆された。公開済みのヒストン修飾マーカーのデータを利用し、Smad1/5 結合領域の 85.3%が H3K4me1, H3K27ac で特徴付けられるエンハンサー領域と一致することを示した。以上より、Smad1/5 は種間で保存されたエンハンサー領域に結合し、標的遺伝子の転写を亢進する傾向があった。

次に、BR-Smad の結合モチーフを解析した。de novo モチーフ予測ソフトを用い、Smad1/5 結合領域の配列に特徴的に存在するモチーフを 5 種類同定した。この 5 種類のモチーフの妥当性を、(1) Smad1/5 結合領域に濃縮して存在する、(2) 多数の Smad1/5 結合領域に存在する、(3) Smad1/5 が存在すると考えられるピーク頂点の近傍に存在する、という 3 点を検討した結果、C(T/C)G(G/C)(A/C)GCC 配列が妥当だと結論した。このモチーフは、既に報告されている GC-rich 配列、GC-rich モチーフに

極めて類似しており，GC-SBE (Smad binding element) と名付けた。

Smad1/5 結合領域内のピーク頂点近傍に存在する GC-SBE の配列の頻度を確認すると，既に多くの検討が報告されている GCCG, GGCGCC という配列の他に GGAGCC という配列が多く含まれていた。そこで，GGAGCC 配列に関して更なる検討を行う方針とした。Luciferase assay により，この GGAGCC 配列を含む Smad1/5 結合領域がエンハンサーとして機能することを明らかにした。GGAGCC の “A” に注目したところ，血管内皮細胞である HMEC-1 細胞では GGAGCC, GGCGCC そして GGTGCC が同等に応答し，GGGCGCC のみが BMP-9 に対する応答を認めなかった。興味深いことに，肝癌由来細胞である HepG2 細胞では，GGCGCC のみが BMP-6 に対して強く応答し，GGAGCC, GGTGCC の BMP 応答性は減弱していた。

Drosophila では，転写抑制因子 Brinker が BR-Smad 結合配列を認識して拮抗的に作用することが知られており，GGAGCC 配列を認識する転写因子が拮抗的に機能する可能性を考えた。過去に，転写因子 OAZ/ZNF423 が TGGAGC 配列に結合し BMP シグナルに影響を与えることが報告されていたため，OAZ/ZNF423 を発現しないとされる C2C12 筋芽細胞，ヒト肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) でも同様の Luciferase assay を施行した。この場合でも GGCGCC に比較して GGAGCC では BMP 応答性が低下しており，OAZ/ZNF423 の関与は否定的であった。しかし，未知の転写因子が関与している可能性は否定できなかった。

更に，Smad1 の DNA 結合部位である Smad1-MH1 の精製蛋白を用いてゲルシ

フトアッセイ (EMSA) を行い, Smad1 が直接 GGAGCC 配列を認識していることを示した. また, GGCGCC>GGAGCC \geq GGTGCC>GGGGCC の順に結合能が弱くなることも示した. ヘモジデローシス患者では, hepcidin プロモータに存在する GGCGCC 配列が GGTGCC に変異することで, BR-Smad の結合能が低下しヘモジデローシスが増悪することが報告されている. これらの結果から, GC-SBE の中でも Smad1/5 への結合能に差があり, 結合能の低いものでは, 他の転写因子の有無などで規定される細胞のコンテキストに依存して影響されやすくなることが示唆された.

近年, HHT の治療法として thalidomide の有効性が報告されている. 作用機序は解明途中だが, HHT で認められる脆弱な血管で thalidomide が EC 由来の PDGF-B の発現を亢進し vSMC 被覆を改善することが重要だと報告されている. このことから, 内皮-壁細胞 (EC-MC) 相互関係の破綻が病態の一部を担っていると考えられている. また, HHT 患者では動静脈奇形 (AVM) が頻発するが, Notch シグナルの破綻でも同様に AVM を認め, Notch シグナルとの関係が指摘されてきた.

今回同定した標的候補遺伝子の中から EC-MC 相互関係に関わる遺伝子を検索し, Notch リガンドの一つである Jagged1 に着目した. BMP-9 が Jagged1 を誘導することを, mRNA レベル, 蛋白レベルで確認した. 更に, BMP-9 により内皮で誘導された Jagged1 が機能を有し, 隣接する細胞の Notch シグナルを活性化することも確認した. 今回, 我々の手では生体内における ALK-1 と Jagged1 との関係を証明することはできなかったが, タモキシフェン誘導性 EC 特異的 Alk1 欠損マウスの網膜動

脈の EC で、*Jagged1* の発現が低下することが示されている。*Jagged1* の血管内皮特異的欠損マウスでは動脈周囲の vSMC 被覆が低下することとあわせ、BMP-9/ALK-1—BR-Smad—*Jagged1*—Notch3 経路により vSMC の分化・被覆化ならびに血管成熟化が促進されることが示唆された。また、この経路に介入することが、HHT の血管病変の新たな治療法となりうると考えられた。

本研究では、BMP-9 と BMP-6 との異同を示すことはできなかった。BMP-9 と BMP-6 が同等の効果を持つように用量を設定したが、結果として BMP-6 の用量が不足している可能性が考えられた。更に BMP-6 量を増加した実験を行うことが機序解明の助けとなると考えられる。一方で、BMP-6 が EC にとって最適のリガンドではない可能性がある。*Drosophila* では標的遺伝子によって応答の閾値が異なることが知られており、哺乳類でも同様の機序が存在する可能性が考えられる。BR-Smad に対する結合能が高く BMP 刺激への感度が高い遺伝子群は低強度のシグナルでも誘導され、これらの遺伝子に内皮細胞の活性化・増殖亢進に関係する ID 蛋白が含まれる。これらの点から、閾値に応じた標的遺伝子誘導が BMP 間の生理的な作用の違いと多彩な細胞応答の基盤になっている可能性が示唆された。