

原発性肺高血圧症の病態形成における骨形成蛋白（BMP）I型受容体の関与とその意義：肺動脈血管平滑筋細胞を用いた検討

武田昌也^{a*}，大塚文男^a，中村一文^b，稲垣兼一^a，鈴木二郎^a，三浦大志^b
藤尾栄起^b，松原広己^b，伊達洋至^c，大江透^b，槇野博史^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a腎・免疫・内分泌代謝内科学，^b循環器内科学，^c腫瘍・胸部外科学

キーワード：原発性肺高血圧症（PPH），骨形成蛋白（BMP），肺動脈血管平滑筋細胞，TGF- β スーパーファミリー，BMP IB型受容体（ALK-6）

緒言

原発性肺高血圧症（primary pulmonary hypertension, PPH）は、肺血管内皮細胞と平滑筋細胞の過剰な増殖を生じ、肺細小血管壁の肥厚さらに肺血管腔の狭小化によって右心不全に至るきわめて予後不良な疾患である。年間発症率は人口100万人に対し1～2人とされ、男女比は1：2～3で、30歳前後では1：10と若年女性に好発する。また約6%に常染色体優性の遺伝性があるとされる。

これまでは全く原因不明であったが、Nichols WCらが家族性PPHの家系における染色体2q31-33部位（*PPH1* gene）での異常を報告した¹⁾のを皮切りに、PPHの分子生物学的病因の解明が進展することとなった。その後の検討により、この*PPH1*遺伝子は骨形成蛋白（bone morphogenetic protein, BMP）のII型受容体をコードする*BMPR2*遺伝子であることが明らかとなった^{2,3)}。さらにこの遺伝子異常は家族

性PPHにおいてのみならず、散発性PPHにおいても多く認められることが認識された⁴⁾。

BMPリガンドはTGF- β スーパーファミリーに属し、現在約20種類が知られている。BMPはセリン・スレオニンキナーゼ型の受容体（I型およびII型）に結合し、3者複合体を形成し、Smad蛋白をリン酸化して細胞内にシグナルを伝達する。すなわち、BMPリガンドが働くためにはI型およびII型両方のBMP受容体の存在が必須である。このPPHの病態におけるBMP受容体異常の存在が、PPHの病因解明につながることを期待されてきたが、PPH患者のおよそ半数には*BMPR2*遺伝子の異常が認められないことも考えると、PPHの病因をBMPII型受容体のみを求めるのは難しいと思われる。さらに、この*BMPR2*遺伝子の変異が、PPHにおける肺血管異常の病態形成にどのように関与しているかについても詳細は不明であった。

今回の研究では、PPHの病態におけるBMPシステムの関与を詳細に検討するため、PPH患者の肺組織から単離した肺動脈血管平滑筋細胞（PASMC）の初代培養・継代を行い、BMPシグナルに必須となるBMPI型受容体、とくにBMPIB型受容体である

平成18年2月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7235 FAX：086-222-5214

E-mail：mtakeda-endo@umin.ac.jp

◆プロフィール◆



武田 昌也

平成11年岡山大学第三内科（現 腎・免疫・内分泌代謝内科学）入局。岡山労災病院での研修、大学病院病棟医を経て平成14年10月から槇野博史教授、大塚文男先生のもとで、内分泌臓器とくに脳下垂体と骨形成蛋白（BMP）の関わりについて研究を始めました。また、循環器内科学との共同研究の機会に恵まれ、原発性肺高血圧症におけるBMPシステムの重要性を明らかにするという成果を上げることができました。ご指導頂いた先生方にはこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。私は現在、脳下垂体細胞の中で特に生殖内分泌に関与するゴナドトロピン分泌細胞の cell line を用いて、細胞内シグナル伝達・転写調節メカニズムを研究しています。今夏、アメリカ・カリフォルニア大学サンディエゴ校、Dr. Mark Lawson 研究室へ留学する予定です。

activin receptor-like kinase (ALK)-6 の役割に着目して細胞レベルでの検討を行った⁵⁾。

材料と方法

散発性 PPH 患者 (13歳女性) の肺組織から単離した PASM (これを以下 pphPASM と表記する) の初代培養を行った。これを passage 5~7 まで継代し、*in vitro* の検討に用いた。対照としては、28歳、30歳、73歳の3人の女性から、肺癌あるいは肺移植ドナーの手術の際得られた組織から単離した PASM を用いた。細胞の単離は共著者である中村らの方法⁶⁾に基づいて行われた。10%ウシ胎児血清・1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有した DMEM 培地内で、37°C、95% air / 5% CO₂ の条件下で培養を行った。培養した PASM から、isothiocyanate-acidphenol-chloroform 法を用いて total cellular RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて BMP・アクチビンの受容体、およびフォリスタチンの発現検出を行った。また、Id-1, plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, L19 の mRNA レベルを、Roche Diagnostic 社の LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green I システムを用いたりアルタイム定量 PCR で評価した。

ゲノム DNA は PPH 患者の末梢白血球から、genomic DNA isolation kit を用いて採取した。BMP2 遺伝子の各 exon について PCR で増幅を行い、PCR 産物のシーケンスを決定した。

細胞増殖能はチミジン取り込みアッセイにより評価した。48時間の細胞培養後、低血清培地に置換し、実験に応じた growth factor を添加した。24時間後 [methyl-³H] 標識チミジンを添加し、37°C で3時間培養、取り込まれた ³H をシンチレーションカウンタで測定した。

細胞内シグナルの評価を行うために reporter gene assay を行った。ルシフェラーゼレポータープラスミド (Xvent2-Luc, 3TP-Luc, Tlx2-Luc) それぞれを、pCMV- β -galactosidase (β -gal) プラスミドとともに transient transfection を行った。Luciferase 活性/ β -gal 活性の比を用いて BMP シグナルの評価を行った。

BMP 受容体の機能抑制のために、PASM において BMP 受容体の細胞外ドメインおよび膜貫通領域を発現するドミナントネガティブモデルの作製、および small interfering RNA (siRNA) を用いた BMP IB 型受容体 (ALK-6) 遺伝子のサイレンシング (Elbashir

らの方法^{7,8)}による) を行った。Id-1 mRNA 定量、細胞増殖能(チミジン取り込みアッセイ)の評価を行った。一方、対照細胞には正常 ALK-6 を過剰発現させ、非導入細胞との Id-1 遺伝子発現強度の比較を試みた。なお、本研究は学内倫理委員会の承認を受けている。

結 果

PPH 患者の摘出肺組織標本では、肺血管内皮細胞と平滑筋細胞の過剰増殖がみられ、肺細小血管壁の肥厚・肺血管管腔の狭小化を来していた。PASM の形態は紡錘状で、対照細胞と比較して非常に強い増殖を認めていた。チミジン取り込みアッセイで増殖能を比較したところ、pphPASM の DNA 合成能は対照細胞の約5倍~20倍に相当した (図1)。

BMP II 型受容体 (BMPRII) の mRNA について RT-PCR 法で検討したが、最初の7つの exon については pphPASM と対照 PASM で発現パターンに違いを認めなかった。また、全12 exon を PCR 法で増幅し、シーケンスを検討したが、BMPRII 遺伝子には変異を認めなかった。

アクチビン II 型受容体 (ActRII), BMP I 型受容体 (ALK-2, -3, -6), フォリスタチン (アクチビン・BMP に結合しその働きを阻害する蛋白) の mRNA の発現を検討したところ、pphPASM には、対照 PASM では認められない ALK-6 の発現増強を認めることが明らかになった。定量 PCR 法でも、pphPASM での ALK-6 mRNA の発現は対照細胞の10倍以上であった (図2)。

チミジン取り込みアッセイで pphPASM の細胞増殖能を評価した。PASM の細胞増殖を促進する growth factor として知られる PDGF-BB により、pphPASM の増殖能は濃度依存的に増加した。

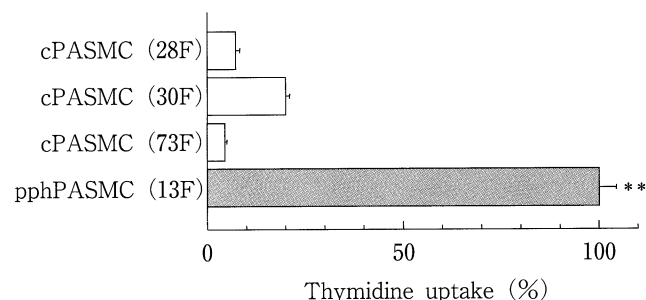


図1 pphPASM と対照 PASM の細胞増殖能の比較
[methyl-³H] 標識チミジン取り込みアッセイにより定量的評価を行った。**, p < 0.01 vs control PASM.

ACTH やアンジオテンシン II 刺激では細胞増殖に影響を与えなかった。一方, cyclic AMP のドナーである BtcAMP や forskolin は pphPASM C の増殖を著明に抑制した。アクチビンは細胞増殖を抑制し, TGF- β 1 は二峰性の変化を示した。BMP-2, -7 は, pphPASM C の増殖に促進的に働き, BMP-4, -6 は抑制的に働いた (図 3)。

pphPASM C の増殖を促進した BMP-2, -7 による反応とは異なり, 対照 PASM C では BMP-2, -7 は増殖に抑制的に働いた (図 3)。PDGF-BB は対照 PASM C の増殖を促進するのに対し, BMP-4, -6, アクチビンについては対照細胞では細胞増殖能に影響を与えなかった。

BMP の target gene である Id-1 遺伝子発現レベルの解析を行ったところ, Id-1 の発現は BMP-2 の存在下で強く, TGF- β 1 の影響は受けなかった。逆に, TGF- β 1 の target gene である PAI-1 の発現は TGF- β 1 の存在下で増強され, BMP-2 は添加しても不変であった。ルシフェラーゼアッセイを行い, BMP・アクチビンの細胞内シグナルである Smad シグナルの活性化の評価を行った。BMP によって活性化される Smad 1/5/8 経路に反応する Xvent2-Luc, Tlx2-Luc を用いたアッセイでは, BMP-2 添加時のみに有意に強いルシフェラーゼ活性を認めたが, アクチビン添加時には不変であった。アクチビンによって活性化される Smad 2/3 経路に強く, Smad 1/5/8 経路には弱く反応する 3 TP-Luc については, アクチビン・BMP-2 添加時ともにルシフェラーゼ活性の増強傾向を認めた。これらの結果から, PASM C においてリガンドに反応する BMP システムの存在が示唆された。

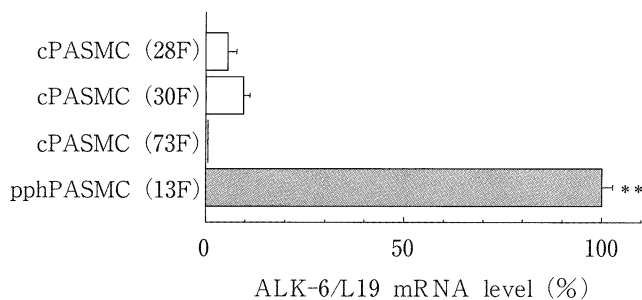


図 2 pphPASM C と対照 PASM C での ALK-6 mRNA 発現レベルの相違
リアルタイム PCR 法により定量的評価を行った。**, $p < 0.01$ vs control PASM C.

多くの平滑筋細胞の増殖には MAPK 経路が関与することが知られている。BMP/Smad シグナリングと MAPK 経路との間のクロストークも多種の細胞で認識されている。ERK の阻害剤である U0126 と, p38 経路の阻害剤である SB203580 を用いて MAPK 経路の抑制を試みたところ, 両剤とも pphPASM C の細胞増殖を濃度依存的に抑制した。また, PDGF-BB, BMP-2 それぞれの存在下に両阻害剤の添加を行ったところ, PDGF-BB, BMP-2 それぞれの細胞増殖促進効果を MAPK 経路阻害剤が打ち消すことが明らかになった。PDGF-BB, BMP-2 の pphPASM C 増殖促進作用は, 少なくとも一部は MAPK 経路の活性化を介していることが明らかとなった。BMP・アクチビンに結合しそれらの働きを阻害するフォリスタチンを pphPASM C に添加するも, 細胞増殖能は不変であった。内因性 BMP の非特異的なブロックは, 総合的には細胞増殖能に影響を及ぼさないものと考えられた。

次に, pphPASM C において, BMP 受容体のドミナントネガティブモデルを作製することにより, BMP 受容体の機能抑制を試みた。II 型受容体 (ActR II, BMPRII) DN, BMP I 型受容体のうち IA 型 (ALK-3) DN の導入では, PASM C 増殖能に有意な変化を認めなかったが, BMP IB 型受容体 (ALK-6) DN の導入により細胞増殖能は抑制された (図 4 A)。また Id-1 mRNA の発現を検討したところ, BMP-2 添加により増強した Id-1 発現は,

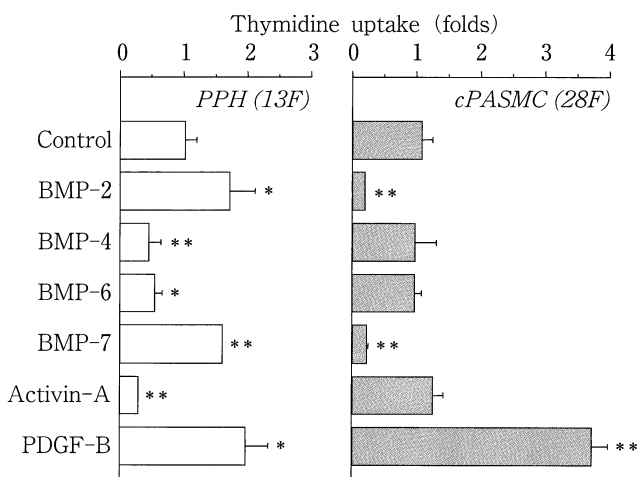


図 3 BMP・アクチビンが PASM C の細胞増殖能に与える影響
それぞれの growth factor (100ng/ml) で 24 時間刺激後の細胞増殖能をチミジン取り込みアッセイで評価した。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs control group.

ALK-6 DN 導入により有意に抑制された(図4 B).

同様に, small interfering RNA (siRNA) を用いて, ALK-6 mRNA の発現抑制を試みた. ALK-6 を特異的にノックダウンする siRNA を作製し, pphPASC に導入を試みた. チミジン取り込みアッセイでは, ALK-6 siRNA 導入により細胞増殖能は約40%まで抑制された(図5 A). また, Id-1 mRNA の発現を検討したところ, Id-1 の発現は ALK-6 siRNA 導入により抑制され, これは特に BMP-2 存在下で顕著であった(図5 B).

ALK-6 発現を欠く対照 PASC に, 野生型(正常) ALK-6 の導入を試みた. BMP の target gene である Id-1 の発現について検討したところ, 特に BMP-2 存在下で, ALK-6 導入により濃度依存的に, 有意に強い Id-1 発現を認めた. これらの結果から, PPH

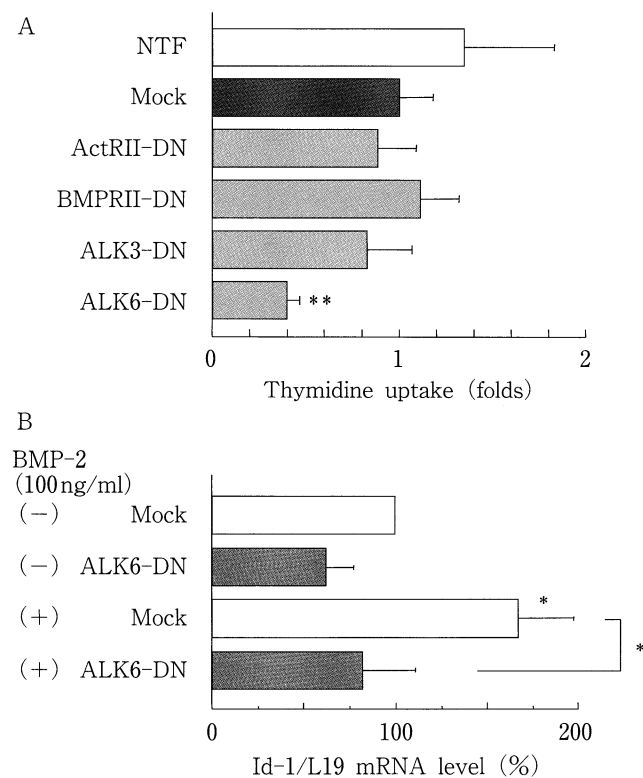


図4 ドミナントネガティブモデルを用いた BMP 受容体の機能抑制

A) BMP/アクチビンの I 型・II 型受容体のドミナントネガティブを pphPASC に導入し, 細胞増殖能の変化をチミジン取り込みアッセイで評価した. NTF, nontransfection control; Mock, ベクターのみ. B) ALK-6 ドミナントネガティブ導入時の Id-1 遺伝子 (BMP の target gene) 発現を BMP-2 存在下/非存在下それぞれで比較した. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

患者の PASC が対照細胞と比べて強い増殖能をもつ原因として, ALK-6 の存在は重要な因子である可能性が示唆された.

考 察

PPH の家族例・散发例で, *BMPR2* 遺伝子の変異が存在することが知られ¹⁻⁴⁾, PPH の病因解明につながることを期待されてきた. しかし, PPH 患者のおよそ半数には *BMPR2* 遺伝子の異常が認められないことも考えると, PPH の病因を BMP II 型受容体のみを求めるのは難しいと思われる.

今回我々は, BMP II 型受容体とともに BMP システムを構成し, それぞれが BMP シグナリングに必須である BMP リガンドおよび I 型受容体の, 肺動脈血管平滑筋細胞における役割を検討した. 今回検討した症例では, *BMPR2* 遺伝子に変異を認めず, また PASC には BMPRII のすべてのキードメインの発現を認めた. 対照 PASC との比較で特筆すべき点は, 対照細胞は ALK-6 の発現を欠いていたのに対し, pphPASC では明らかな発現を認めたことである.

PASC に対する BMP の作用としては, pphPASC においては BMP-2, -7 は増殖促進的に, BMP-4, -6 は抑制的に働くことが明らかになった. 対照 PASC では BMP-2, -7 は増殖抑制に働

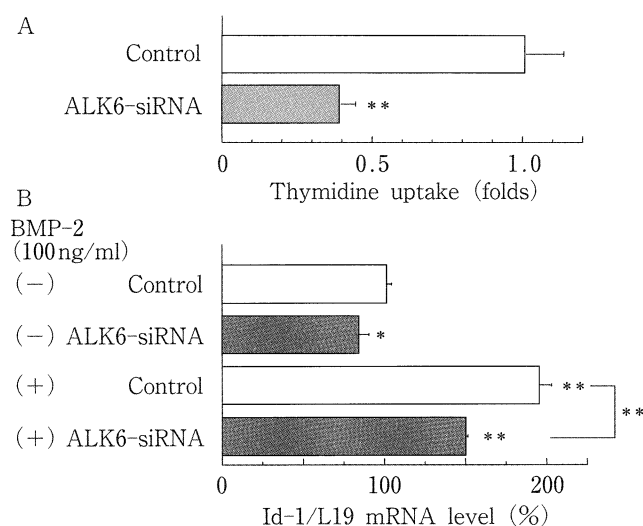


図5 siRNA 法を用いた ALK-6 の機能抑制

A) ALK-6 遺伝子機能をノックアウトする siRNA を作製し, pphPASC に導入, 細胞増殖能の変化をチミジン取り込みアッセイで評価した. B) ALK-6 siRNA 導入時の Id-1 遺伝子 (BMP の target gene) 発現を BMP-2 存在下/非存在下それぞれ比較した. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

いており, 相反する作用を示した。ドミナントネガティブ法や siRNA 法を用いた ALK-6 の機能抑制により pphPASM C の細胞増殖能や BMP シグナルが抑制されることも考慮に入れると, PPH 患者の PASM C における ALK-6 機能の重要性が明らかとなった。対照細胞への正常 ALK-6 の過剰発現では, BMP-2 のシグナルが増強されており, ALK-6 が pphPASM C と対照細胞の増殖能の差を決定づける重要因子である可能性が示唆された。

また pphPASM C にフォリスタチンの添加を行っても細胞増殖能には変化が起こらないことより, 内因性アクチビン・BMP を非特異的に阻害しても, pphPASM C の増殖能を変化させるには至らないものと考えられた。このことから PASM C ではさまざまな BMP・アクチビンのリガンドが細胞増殖に複雑に関与している可能性が考えられた。また本研究では, PDGF-BB および BMP-2 の細胞増殖が少なくとも一部は MAPK 経路を介していることが明らかになった。これまでの BMP-Smad 経路の重要性に加えて, MAPK とのシグナルクロストークが存在する可能性も示された。

BMP の I 型・II 型受容体およびリガンドの組み合わせは細胞によって異なるが, ALK-6/BMPRII の組み合わせは BMP-2, -7 をリガンドとすることが知られている。また, 実験的に培養細胞に受容体を過剰発現させた際, BMP のリガンドは II 型に比べ I 型受容体により強い親和性を示すことが知られている。ドミナントネガティブおよび siRNA を用いた ALK-6 の機能抑制により細胞増殖能の抑制および BMP シグナルの減弱がみられたことから, この pphPASM C における BMP・I 型受容体 (ALK-6)・II 型受容体のシステムが細胞増殖機構に深く関わっていることが示唆された。

結 論

原発性肺高血圧症 (PPH) 患者の肺組織から単離培養した肺動脈血管平滑筋細胞 (PASM C) を用いて, BMP IB 型受容体である activin receptor-like kinase (ALK)-6 の役割を中心に細胞レベルでの検討を行った。ALK-6 は PPH 患者の PASM C 増殖に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。既知の知見も含め, BMP I 型・II 型両方の受容体機能および BMP リガンドを含めた BMP システムが重要であると考え

られ, 今後の PPH 病因の解明に重要な手がかりであると考えられる。

文 献

- 1) Nichols WC, Koller DL, Slovis B, Foroud T, Terry VH, Arnold ND, Siemieniak DR, Wheeler L, Phillips JA 3rd, Newman JH, Conneally PM, Ginsburg D, Loyd JE : Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet* (1997) **15**, 277-280.
- 2) Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA : Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* (2000) **67**, 737-744.
- 3) Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, Thomson JR, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC : Heterozygous germline mutations in BMPRII, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* (2000) **26**, 81-84.
- 4) Thomson JR, Machado RD, Pauculo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, Ward K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Newman J, Wheeler L, Higenbottam T, Gibbs JS, Egan J, Crozier A, Peacock A, Allcock R, Corris P, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC : Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPRII, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet* (2000) **37**, 741-745.
- 5) Takeda M, Otsuka F, Nakamura K, Inagaki K, Suzuki J, Miura D, Fujio H, Matsubara H, Date H, Ohe T, Makino H : Characterization of the bone morphogenetic protein (BMP) system in human pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from a sporadic case of primary pulmonary hypertension : roles of BMP type IB receptor (activin receptor-like kinase-6) in the mitotic action. *Endocrinology* (2004) **145**, 4344-4354.
- 6) Kouchi H, Nakamura K, Fushimi K, Sakaguchi M, Miyazaki M, Ohe T, Namba M : Manumycin A, inhibitor of ras farnesyltransferase, inhibits proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) **264**, 915-920.
- 7) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* (2001) **411**, 494-498.
- 8) Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T : RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* (2001) **15**, 188-200.