

平成30年6月28日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09161

研究課題名(和文) Nsd1の転写機構解明と次世代型動脈硬化治療薬の開発

研究課題名(英文) The analysis of Nsd1 cause phenotypic change of vascular smooth muscle cells

研究代表者

早川 朋子 (Hayakawa, Tomoko)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30420821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管平滑筋細胞の形質転換は、血管病における最も重要な疑問であるにもかかわらず、何によって平滑筋細胞の形質転換のスイッチが入るのかはほとんど不明である。SRFは血管平滑筋細胞特異的遺伝子の転写をコントロールする主要な転写因子であり、また多くの因子がSRFを正または負に制御することが知られている。我々はヒストン修飾酵素であるNsd1が合成型と収縮型の血管平滑筋細胞のphenotyping switchを制御することを発見した。さらにCRISPR-Cas9の系を用いてNsd1欠損マウスを新規に作製し、頸動脈結紮モデルを作製したところ、Nsd1欠損マウスは内膜肥厚が大きく減少したことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of smooth muscle cells (SMCs) phenotypic change is one of the most important question in vascular diseases, yet, little is known regarding what plays the role of SMCs switch. SRF acts as the key transcription factor controlling SMCs specific genes, and many factors regulate SRF positively or negatively. Here we show that histone methyltransferase, Nsd1 is upregulated in synthetic SMCs compare with contractile SMCs, and knocking down Nsd1 using small interfering RNA occur SMC phenotypic change from synthetic state to contractile state in cultured high passage rat SMCs. Homozygous Nsd1 mutant mice exhibited little neointimaformation after vascular injury. Our present study suggested that Nsd1 act as SMC phenotyping switch, then inhibition of Nsd1 expression or activity could be available in vascular injury.

研究分野：血管生物学

キーワード：平滑筋細胞 動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満・糖尿病などの生活習慣病や喫煙によって引き起こされる慢性炎症によって恒常性維持が破綻し、動脈硬化が誘発されて血管閉塞が起こる。これまで「動脈硬化病巣では、正常血管 SMC (収縮型) が脱分化による形質転換を起こして動脈硬化病態 SMC (合成型) になり、血管収縮能の消失と細胞外基質合成の上昇により、SMC に細胞増殖能と遊走性が付加され内膜肥厚が起こる」との報告がなされてきた (Manabe, Nagai et al.: Curr. Atheroscler. Rep, review 2003)。SMC は生体より調整して培養すると、最終分化マーカーである Smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC) を含む、筋収縮に必須な遺伝子群の発現が強く抑制されて脱分化する。そのため適切な SMC 分化培養系はこれまで存在せず、この事実が SMC 分化・脱分化機構の解明の障害となっていた。

(2) 高血圧、生活習慣病や加齢などにより発症する動脈硬化やステント留置後の再狭窄の主要因として、血管平滑筋細胞 (smooth muscle cells; SMCs) が収縮型から合成型に形質転換することが知られている。SRF や Myocd など形質転換を決定づける因子は報告されているが、合成型から収縮型に移行する逆形質転換メカニズムは不明であった。

(3) 正常な収縮能をもつ収縮型 SMCs と病態血管で見られる合成型 SMCs の形質転換は広く知られており、これは転写因子 SRF とコファクター Myocd による収縮関連遺伝子の発現 ON/OFF により決定される。SRF はユビキタスに発現し、結合するコファクターにより誘導される遺伝子群が変化する。特に平滑筋、心筋、骨格筋及び神経では、Myocd ファミリーがコファクターとして働くことにより細胞骨格・収縮関連遺伝子群の発現調節が起こることが知られている (Gualdrini, F. et al.:

Mol Cell, 2016)。

## 2. 研究の目的

動脈硬化症の大きな原因は、血管平滑筋細胞 (Smooth muscle cell: SMC) 脱分化とそれに伴う増殖と遊走であることが知られている。閉塞血管に対して薬剤徐放性ステント移植が広く行われているが、10%もの高率で SMC 増殖による再狭窄が起こることから、SMC 脱分化を強力に抑制する新薬の開発が喫緊の課題である。このような背景のもと、申請者らは「動脈硬化様の合成型 SMC に対してヒストン修飾酵素 Nsd1 を抑制することにより、正常血管に近い収縮型 SMC へ移行できる」との発見をした。これは、Nsd1 阻害剤が有効な動脈硬化治療薬になる可能性を示唆している。しかし Nsd1 の働きや転写機構がほぼ不明であることから、本研究では Nsd1 による SMC 分化・脱分化機構を明らかにし、Nsd1 を標的とした次世代型動脈硬化治療薬の開発に取り組む。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス iPS 細胞を用いた血管平滑筋細胞分化誘導

iPS 細胞による SMC 分化培養系を確立するために、SMC 最終分化マーカーである SM-MHC 遺伝子へ、核移行シグナルを付加した LacZ カセットを導入したノックインマウスを用いて、マウス繊維芽細胞から iPS 細胞を作製した。iPS 細胞をレチノイン酸 (RA) 存在下で 7 日間培養し、高頻度な分化誘導を行った。血管平滑筋細胞の分化は、LacZ 染色で確認した。また最終分化マーカーである SM-MHC 発現上昇を確認した。マウス iPS 細胞培養は以下の論文と同様の方法で行った (Cell, 2006 Aug 25; 126(4):663-76, Takahashi, Yamanaka)。血管平滑筋細胞分化培地は、基礎培地として -MEM を使用し 10% FBS、atRA (1 $\mu$ M) を添加した培地を用いた。細胞培養皿のコート剤として 0.1%ゼラチンを用いた。

## (2) 頸動脈結紮モデルの作製

C57BL/6 マウスの7週齢の雄の右頸部を切開し、右頸動脈を露出し結紮を行なった後、切開部を縫合する。結紮後、1, 2, 4, 7, 14, 28日後に組織を取り出し、RNA調製、組織染色、免疫染色を行った。

## (3) ラット血管平滑筋細胞培養

基本培地として DMEM/F12 を使用し、10% FBS を加えた培地を用いた。細胞培養皿のコート剤は使用していない。

## (4) siRNA による遺伝子ノックダウン

ラット血管平滑筋細胞に対し、Nsd1 siRNA を導入し、Nsd1 遺伝子発現抑制を行った。siRNA は Dharmacon 社より購入し、siRNA 導入は Dharmacon 社のプロトコールに従った。

## (5) 免疫染色

使用した抗体は以下の通りである。Acta2 抗体 (Monoclonal Anti-Actin, a-Smooth Muscle-Cy3, antibody produced in mouse, clone1A4, 品番: C-6198-sML, sigma)、SM-MHC (MX-SM1, Anti-Smooth Muscle Myosin Heavy Chain Isoform, Rat monoclonal antibody メーカー: 協和メディックス, 品番: BM20)。

## (6) Time lapse 撮影

Transfection の24時間後から72時間後までを Time lapse 撮影を行った。撮影機種は、KEYENCE オールインワン蛍光顕微鏡: BZ-X700/BZ-X710 を使用した。

## (7) Nsd1 遺伝子欠損マウス作製

CRISPR-Cas9 システムを利用して Nsd1 ノックアウトマウスを新規に作製した。作製はトランスジェニック社に委託した。野生型、ヘテロ型、ホモ型のマウスを得た。

## 4. 研究成果

合成型と収縮型 SMC におけるヒストン修飾酵素の発現変動を解析するために、マウス頸動脈結紮モデル、マウス iPS 細胞による SMC 分化誘導モデル、合成型 SMC の性質をもつ high passage rat SMC 培養系を用いた。マウス頸動脈結紮モデルは、結紮後3週間で内膜肥厚が観察されその後自然回復するモデルであり、結紮前は収縮型、結紮3週間後は合成型、自然回復後は収縮型 SMC へと変化する。SMC マーカー遺伝子は結紮後1-2日で発現低下が観察された。主要なヒストン修飾酵素 50 以上を解析した結果、結紮後1-2日で発現上昇を示す9遺伝子 (Nsd1, Hat1, Suv39h2, Ezh2, Nsd2, Setdb2, Dot11, Jhdm1b, Utx) が見つかった。これらのヒストン修飾酵素は SMC マーカー遺伝子の発現抑制に働く可能性が推測された。

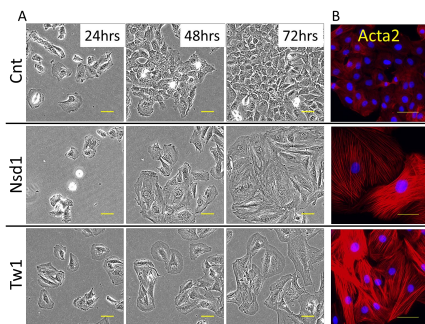
ついでマウス iPS 細胞による SMC 分化誘導培養系の確立を行った。SMC マーカー遺伝子発現変動を解析したところ、SMC の分化初期に誘導される Acta2 は培養2日後より、また分化終期に誘導される SM1/SM2 は6日後より発現上昇が観察された。以上より、分化開始2-4日後は合成型 SMC、分化開始6-7日後は収縮型 SMC の性質を有すると考えられた。主要なヒストン修飾酵素 50 以上を解析した結果、と同様に SMC マーカー遺伝子発現と逆の発現傾向が見られるヒストン修飾酵素が5遺伝子 (Nsd1, Hat1, Suv39h2, Ezh2, Suv420h2) 見つかった。興味深いことに、で見つかった遺伝子のうち4遺伝子 (Nsd1, Hat1, Suv39h2, Ezh2) が同じであった。

次に合成型 SMC の性質を有する SMC 培養系確立を行った。SMC 培養は、継代により収縮型 SMC の性質が消失するため、低い継代数、すなわち low passage SMC を用いるのが通常である。今回、収縮型と合成型 SMC の比較を

行うため、継代数 20 以上の high passage SMC を検討した。Low 又は high passage SMC において SMC マーカー発現、細胞増殖、細胞形態変化、遊走性を比較した結果、high passage SMC は low passage に比べて収縮型の特徴が消滅し、合成型 SMC の特徴が顕著であることが判明した。さらに、 、 によって見つかったヒストン修飾酵素 10 遺伝子の発現比較を行った結果、4 遺伝子 (Nsd1, Setdb2, Suv420h2, Utx) が SMC マーカー遺伝子の発現と逆の傾向が見られた。 、 、 を集約した結果、SMC マーカー遺伝子の発現と逆の傾向が見られ、合成型 SMC で発現上昇が観察されたヒストン修飾酵素は Nsd1 のみであった。

CRISPR-Cas9 システムを利用して Nsd1 ノックアウトマウスを新規に作製し、頸動脈結紮モデルの解析を行った結果、ホモ欠損マウスは、野生型またはヘテロ欠損マウスと比較し内膜肥厚が顕著に低下する事が分かった

以上より Nsd1 は収縮型から合成型 SMC への形質転換に重要な働きを持つことが判明した。



上図 Nsd1 ノックダウンによる細胞形態変化を Time lapse 撮影、Acta2 抗体による免疫染色で観察した。

## 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 1 件)

Tescalcin is a potential target of class

I histone deacetylase inhibitors in neurons.

Takamatsu, Katagiri, Tomoyuki, Shimizu-Okabe, Nakamura, Nakamura-Higa, Hayakawa, Wakabayashi, Kondo, Takayama, Matsushita.

Biochem Biophys Res Commun

2017

10.1016/j.bbrc.2016.12.036. Epub 2016 Dec 7.

査読：有り

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川朋子 (HAYAKAWA, Tomoko)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30420821

### (2) 研究分担者

松下正之 (MATSUSHITA, Masayuki)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30273965

(3)連携研究者

真鍋一郎 (MANABE, Ichiro)

千葉大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 70359628

(4)研究協力者

( )