

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390219

研究課題名 (和文) 心血管疾患におけるエピジェネティクス制御の解析とそれを標的とした新しい治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of New Treatment Strategies of Cardiovascular Pathologies by Using Epigenetic Regulation

研究代表者

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：90359620

研究成果の概要 (和文)：心血管疾患等の生活習慣病では、遺伝的要素以上に環境要因が病態発症に寄与する。すなわち、ゲノム遺伝子の配列への変化がないまま遺伝子の機能あるいは細胞形質への変化がみられるエピジェネティクス制御が病態の発症と深く関与すると考えられるが、心血管領域ではエピジェネティクス制御の分子解析はまだ十分に進んでいない。我々は、クロマチン構造変換が真核生物における転写活性化の機構論の解明の糸口になると考え、いち早く注目し、DNA 結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用及びその機能的な意義を明らかにしてきた。本研究では、心血管系のエピジェネティクス制御の観点から、心血管疾患におけるクロマチン転写制御、さらに DNA 修復の制御機構を明らかにし、創薬の糸口にしたい。心血管疾患のエピゲノム制御を明らかにするために、本疾患の鍵因子である KLF5 に着目し、その相互作用因子を取得した (ANP32B 等)。これら相互作用因子だけでなく、DNA 修復のキーファクターである ATM, H2AX にも着目し、分子細胞生物学的、遺伝子工学的手法 (ノックアウトマウス作成)、病理モデル (血管老化モデル) を用いて機能解析を行った。その結果、(i) ヒストンシャペロン群による転写制御に着目し、その構造解析として、新規ヒストンシャペロン (ヒストンに直接相互作用し、ヌクレオソーム形成を行う) ANP32B を同定し、これが KLF5 下流遺伝子のプロモーター領域においてヒストン量調節を行うことが明らかになった (Munemasa et al. 2008)。さらに、ANP32B の結晶構造も解析した (Tochio et al. 2010)。(ii) ATM による新規血管老化制御機構について解析し、ATM が Akt/p53/p21 経路を通じて、酸化ストレスにより誘導された内皮機能障害と早期老化において、重要な役割を担うことが明らかになった (Zhan et al. 2010)。本研究を通じてヒトの病態におけるエピジェネティクス制御の分子機構が明らかになった。重要なことは、それらの機構が新しい治療法の開発につながる可能性があり、今後の研究に発展させたい。

研究成果の概要 (英文)：The pathogenesis of lifestyle diseases such as cardiovascular disease is more closely related to environmental factors than genetic factors. In other words, the changes in gene function and cellular phenotype lacking any changes in genomic sequence, known as epigenetic regulation, is considered to be responsible for the pathogenesis. Epigenetic regulation in the cardiovascular system, however, has not been sufficiently understood. We expected that the changes in chromatin structure would lead us towards a greater understanding of the mechanism of regulation of transcription in eukaryotes and discovered the interactions between DNA binding proteins and chromatin structural changes and their functional significance. We hypothesized that by focusing on cardiovascular epigenetic regulation, this study will explain how transcription in chromatin and DNA repair is regulated in cardiovascular disease and will contribute to drug discovery. In order to address epigenetic regulation in cardiovascular disease, we studied KLF5, a key factor of this disease, and discovered molecules, such as ANP32B, which interact with KLF5. In addition to these interactive factors, we analyzed the function of ATM and H2AX, the key factors for DNA repair that we considered were important, by employing molecular biological and genetic engineering techniques (e.g. the generation of knockout mice) and disease animal models (e.g. vascular senescence models). As a result, (i) by examining the regulation of the histone chaperone family, we found a novel histone chaperone ANP32B, and its structural analysis revealed that ANP32B regulates the amount

of histone in the promoter region of KLF5 downstream genes (Munemasa et al. 2008). We also solved the crystal structure of (Tochio et al. 2010). (ii) The analysis of the new regulative mechanism of vascular senescence by ATM showed that ATM plays an important role in oxidative stress-induced endothelial dysfunction and premature senescence through the Akt/p53/p21 pathway. Our research revealed the molecular mechanisms of epigenetic regulation in human pathology. Importantly, it is possible that these mechanisms may lead to new treatments, and new studies based on our results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：①循環器・高血圧、②ストレス、③蛋白質、④トランスレショナル・リサーチ、⑤プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

心血管疾患等の生活習慣病では、遺伝的要素以上に環境要因が病態発症に寄与する。よって、ゲノム遺伝子の配列への変化がないまま遺伝子の機能あるいは細胞形質への変化がみられるエピジェネティクス制御が病態の発症と深く関与すると考えられるが、心血管領域ではエピジェネティクス制御の分子解析はまだ十分に進んでいない。

ヒトゲノムの解読が終了した現在、遺伝子機能ないし細胞形質の制御機構に研究の焦点が移り、エピジェネティクス研究は注目を集めている。とくに、ヌクレオソームやクロマチンといった真核生物に特有なDNAの高次構造の調節に関わる諸反応（転写、複製、修復等）の制御の解明がもっとも注目されている。エピジェネティクスは生物の発生（X染色体の不活性化）や分化、発癌など生命現象と広く関わるが、種々の細胞刺激・ストレスにより後天的にもたらされる制御のため、生活習慣病を始めとする病態の発症機序の鍵となると考えられている。

このように生命現象において極めて重要な役割を果たすエピジェネティクス制御であるが、DNA-蛋白質間、蛋白-蛋白間、さらに蛋白質の翻訳後修飾が複雑に関わっている。それらの時空間的な制御を理解するためには、DNA高次構造の制御を中心とした蛋白質の包括的な解析が必要であり、解析法の困難さから十分に解明されてこなかった面がある。

心血管領域においてはエピジェネティクス制御の重要性を示唆する知見が得られつつある。重要なことは、新しい治療法の開発につながるヒトでの病態制御解析が全く進んでいないことである。

心血管領域をはじめ、病態におけるエピジェネティクス制御を対象とした解析は我々が知る限り、現時点では国内では全く行われておらず、我々が第一人者である。我々は、クロマチン構造変換が真核生物における転写活性化の機構論の解明の糸口になると考え、いち早く注目し、DNA結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用及びその機能的な意義を明らかにしてきた。DNA結合型転写因子と相互作用することにより、クロマチン構造変換酵素は特定のプロモーターへ誘導されるという真核遺伝子転写の選択性、特異性を説明する新しいメカニズムを提唱してきた(Suzuki et al., J Chrom B Analyt Tech Biomed Life Sci 2007 & Trends Cardiovasc Med 2005 & ATVB 2005 & Gene Ther Mol Biol 2003)。さらに、修復、複製反応もあり多岐にわたる制御が存在する。重要なことは、クロマチン制御因子と転写因子さらにそれらの翻訳後修飾による相互作用並びに制御ネットワークを世界に先駆けて明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクス制御を解明するうえで、クロマチンレベルでの制御を解き明かす

ことは重要である。遺伝子の発現調節の異常は疾患の病態と深く関わっており、転写段階において質的・量的に最もダイナミックな制御を受ける。真核生物における転写調節を理解するためには、従来のアプローチのように、単に DNA 配列と結合蛋白質を解析しただけでは全貌を把握できない。その理由は、真核生物のみに存在するクロマチンという DNA と蛋白質がパッケージされた構造体が、転写に対して負に作用するためである。我々は、それにいち早く注目し、DNA 結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用及びその機能的な意義を明らかにしてきた。因子間相互作用並びに翻訳後修飾が制御の中心にあるクロマチンのエピジェネティクス制御では、インターアクションマップを解析するうえでは、プロテオミクス解析法がもっとも適した解析法と考えられる。

本研究ではプロテオミクス解析を通して病態におけるエピジェネティクス制御の理解につながり、新しい治療法の開発に繋げることを目的とする。エピジェネティクス制御、とくにクロマチンレベルでの制御がピンポイント(分子反応特異的に)で可能になると考えている。

### 3. 研究の方法

心血管系のエピジェネティクス制御の観点から、心血管疾患におけるクロマチン転写制御、さらに DNA 修復の制御機構を明らかにし、創薬の糸口にしたいと考えている。

心血管疾患のエピゲノム制御を明らかにするために、本疾患の鍵因子である KLF5 に着目し、その相互作用因子を取得した (ANP32B 等)。これら相互作用因子だけでなく、DNA 修復のキーファクターである ATM, H2AX にも着目し、分子細胞生物学的、遺伝子工学的な手法 (ノックアウトマウス作成)、病理モデル (血管老化モデル) を用いて機能解析を行う。具体的な分子細胞生物学的な手法としては、GST-pull down によるヒストン結合活性、in vitro histone chaperone activity、siRNA を用いたノックダウンによる転写への影響の検討、クロマチン免疫沈降によるクロマチン化学修飾の変化の検討、ウエスタンブロットにより蛋白質リン酸化の変動、リン酸化阻害剤による細胞シグナル経路の切断、アンジオテンシン II 刺激による細胞刺激などである。

また、ANP32B については、NMR により立体

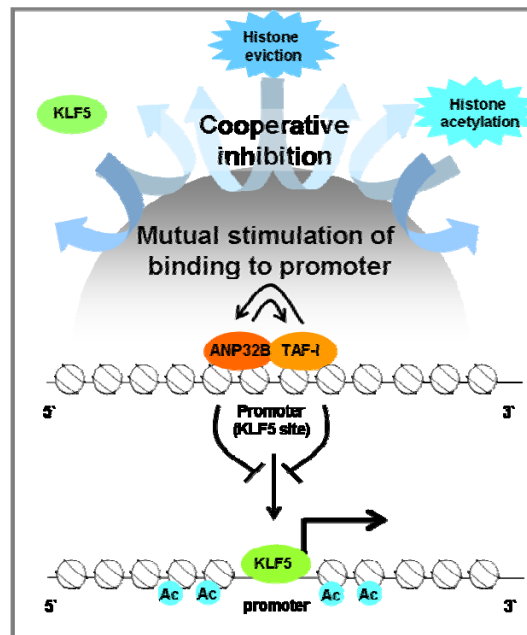
構造解析を行う。点変異導入した変異体を NMR perturbation を行うことによりヒストン結合活性を担うアミノ酸を同定する。

### 4. 研究成果

(i) ヒストンシャペロン群による転写制御、その構造解析

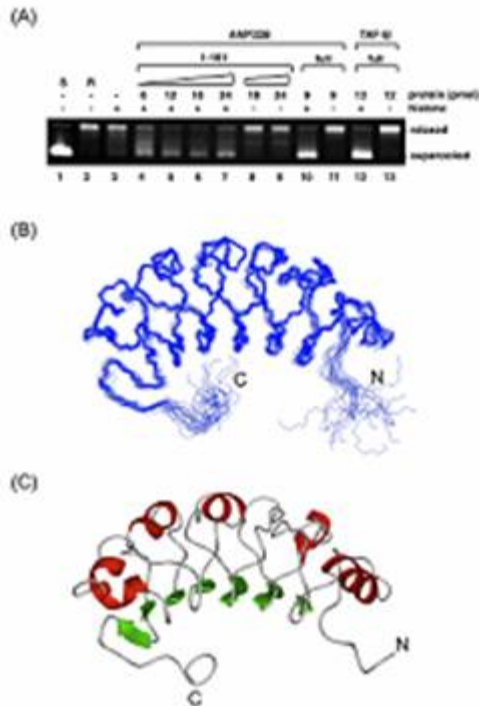
血管平滑筋細胞の増殖は動脈効果の重要なステップであり、生活習慣などの外的要因により制御される。我々は転写因子 KLF5 がこの段階の鍵因子であることを明らかにしていたが、ここにおけるクロマチン制御は不明であった。血管平滑筋細胞増殖におけるクロマチン制御を明らかにするため、KLF5 相互作用因子を取得した結果、複数の機能不明因子を取得した。これらについて機能解析をした結果、新規ヒストンシャペロン (ヒストンに直接相互作用し、ヌクレオソーム形成を行う) ANP32B を同定し、これが KLF5 下流遺伝子のプロモーター領域においてヒストン量調節を行うことが明らかになった (Munemasa et al. 2008)。

#### Functional interaction: ANP32B-core histone-TAF-I



さらに、ANP32B と他のヒストンシャペロン TAF-I の機能的関連性を検討したところ、転写抑制において、これらのヒストンシャペロンが協調的に働くことを明らかにした (in preparation)。

興味深いことに、これらのヒストンシャペロンは、機能欠損の表現型が同じであったが、二次元構造上では全く保存されておらず、全く異なる三次元構造を用いてヒストンシャペロン活性、KLF5 との結合という複数の機能



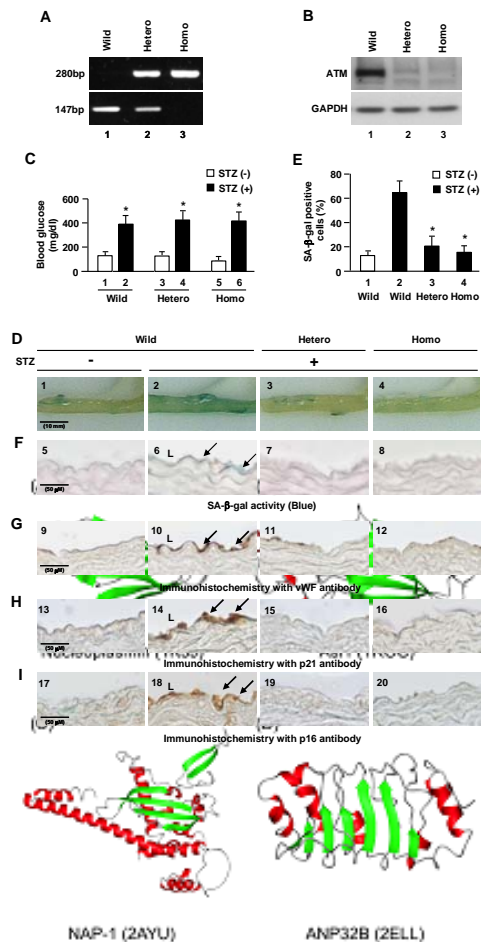
を發揮していることが考えられた。この可能性について明らかにするために、ANP32B のヒストンシャペロンドメインの三次元構造を明らかにした結果、(1) ロイシンに富む LRR ドメインは単体で存在する、(2) ヒストン認識に関与するくぼみ面が 6 本の beta sheet で形成されるが、一般的にヒストンシャペロン活性を担う alpha helix が外側に露出されヒストン認識に参加していない、ということが明らかになった (Tochio et al. 2010)。一方、TAF-I は (1) 2 量体形成によりヘッドフォン様構造を持つ、(2) ヒストンシャ

ペロン活性ドメインは alpha helix により形成される、ことが我々の過去の研究により明らかであった (Muto et al. 2007)。これらのことから、全く異なる三次元構造を持つヒストンシャペロン群により、クロマチン転写が制御されることで、内膜肥厚が負に制御されていることが明らかになった。

### (ii) ATM による血管老化制御

酸化ストレスは血管内皮細胞の機能障害およびその老化を制御する。DNA 損傷修復と ATM を含む中心的シグナル経路が、酸化ストレスの中心的役割を果たすことが示されてきた。しかし、血管病態形成における ATM シグナル経路の役割は、ほぼ不明であった。今回、我々は ATM が酸化ストレスにより誘導された血管内皮細胞の機能障害およびその老化を制御することを明らかにした。

Akt/p53/p21 経路を介した経路による ATM の活性化・リン酸化を通じて、酸化ストレスが老化を誘導する。これらの反応は、ATM を欠損した細胞にて抑制が観察され、特異的阻害剤による阻害により抑制されることが明らかになった。更に、これらの反応の細胞における生物学的優位性は、ATM ノックアウトマウスモデル (野生型マウスに比較して、大



動脈における血管内皮細胞の機能障害の誘導と老化が抑制される)を用いた実験によっても、確認された。

このように、ATMはAkt/p53/p21経路を通じて、酸化ストレスにより誘導された内皮機能障害と早期老化において、重要な役割を担うことが明らかになった (Zhan et al. 2010)。

今後は、ATMと同じDNA損傷修復系で重要な役割を有するH2AXマウスでの解析を通じた共通性および多様性の解析、ならびに、コンディショナルノックアウトマウスを用いた心血管系特異的なATMの機能解析を行う予定である。

#### 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14件)

- ① Suzuki T, Trimarchi S, Sawaki D, Grassi V, Costa E, Rampoldi V, Nagai R, Eagle KA. Circulating TGFbeta levels in acute aortic dissection. *J Am Coll Cardiol*, 査読有, in press.
- ② Trimarchi S, Sangiorgi G, Sang X, Rampoldi V, Suzuki T, Eagle KA, Elefteriades JA. In search of blood tests for thoracic aortic diseases. *Ann Thorac Surg* 査読有, 2010; 90(5): 1735-1742.
- ③ Suzuki T, Distante A, Eagle KA. Biomarker-assisted diagnosis of acute aortic dissection; how far we have come and what to expect. *Curr Opin Cardiol* 査読有, 2010; 25(6): 541-545.
- ④ Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, and Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem* 査読有, 2010 285:29662-29670.
- ⑤ Suzuki T, Distante A, Zizza A, Trimarchi S, Villani M, Antonio J, Salerno Uriarte JA, de Luca Tupputi Schinosa L, Renzulli A, Sabino F, Nowak R, Birkhahn R, Hollander J, Counselman F, Vijayendran R, Bossone E, Eagle K. Response to letter regarding article, "Diagnosis of acute aortic dissection by D-dimer; the IRAD-Bio experience". *Circulation* 査読有, 2010; 121: e24.
- ⑥ Tochio N, Umehara T, Munemasa Y, Suzuki T, Sato S, Tsuda K, Koshiha S, Kigawa T, Nagai R, and Yokoyama S. Solution Structure of Histone Chaperone ANP32B: Interaction with Core Histones H3-H4 through Its Acidic Concave Domain. *J Mol Biol*. 査読有, 2010, 401: 97-114.
- ⑦ 鈴木亨, 澤城大悟, 永井良三, 診断の進歩; バイオマーカー、日本内科学会雑誌、査読無、Vol.99、No.2、2010、269-274
- ⑧ Suzuki T, Distante A, Zizza A, Trimarchi S, Villani M, Salerno Uriarte JA, de Luca Tupputi Schinosa L, Renzulli A, Sabino F, Nowak R, Birkhahn R, Hollander JE, Counselman F, Vijayendran R, Bossone E, Eagle K; for the IRAD-Bio Investigators. Diagnosis of acute aortic dissection by D-Dimer. The International Registry of Acute Aortic Dissection substudy on biomarkers (IRAD-Bio) experience. *Circulation* 査読有, 2009; 119(20): 2702-2707.
- ⑨ Suzuki T. Cardiovascular diagnostic biomarkers -The past, present and future-. *Circ J* 査読有, 2009; 73(5): 806-809.
- ⑩ Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Munemasa Y, Matsumura T, Ishida J, Nagai R. Krüppel-like factor 5 shows proliferation-specific roles in vascular remodeling, direct stimulation of cell growth, and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 査読有, 2009; 284(14): 9549-9557.
- ⑪ 鈴木亨, プロテオミクス手法を用いた心血管系酸化ストレスの病態解明、代謝異常治療研究基金研究業績集、査読無、36巻、2009、97-103
- ⑫ 鈴木亨, 澤城大悟、解説; IRAD、その成績と意義、循環器科、査読無、Vol.66、No.5、2009、561-566
- ⑬ Suzuki T, Distante A, Zizza A, Trimarchi S, Villani M, Salerno Uriarte JA, de Luca Tupputi Schinosa L, Renzulli A, Sabino F, Nowak R, Birkhahn R, Hollander JE, Counselman F, Bossone E, Eagle K; International Registry of Acute Aortic Dissection Substudy on Biomarkers (IRAD-Bio) Investigators. Preliminary experience with the smooth muscle troponin-like protein, calponin, as a novel biomarker for diagnosing acute aortic dissection. *Eur Heart J* 査読有, 2008; 29(11): 1439-1445.
- ⑭ Suzuki T, Nagai R. Molecular markers for cardiovascular disease: cardiovascular biomarkers to proteomic discovery. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 査読有, 2008; 5(6): 295.

[学会発表] (計10件)

- ① 鈴木亨: Epigenetic regulation of disease biology - focus on the role of ATM and the DNA-damage response in the cardiovascular. 第33回日本分子生物学学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸). 2010/12/7-10. (シンポジウム: Interface between nuclear dynamics and diseases)
- ② Suzuki T: Epigenetic regulation of chromatin transcription - KLFs as a model system. 2010 FASEB Summer Research Conferences (Steamboat Springs, CO, USA). 2010/8/8-13.
- ③ Suzuki T: Proteomic analysis of the vasculature. 16th International Vascular Biology Meeting (Los Angeles, CA, USA). 2010/6/20-24.
- ④ 鈴木亨: 細胞核の機能制御異常による心血管病態の解析. 日本放射線影響学会第52回大会(広島). 2009/11/11-13. (ワークショップ: 細胞核からみた放射線病態学)
- ⑤ Suzuki T: The potential for development of a circulating marker for acute aortic dissection: opportunities and challenges. Aortic Diseases Summit (Baltimore, ML, USA). 2009/9/22-23.
- ⑥ Suzuki T: Genetics of fibrillinopathies. Advances in Understanding Aortic Diseases (Hamburg, Germany). 2009/9/11-12.
- ⑦ Suzuki T: Biomarkers as a new diagnostic option? Advances in Understanding Aortic Diseases (Hamburg, Germany). 2009/9/11-12.
- ⑧ 鈴木亨: Current approaches to aortic dissection; from biomarkers to the international registry of acute aortic dissection (IRAD). 第73回日本循環器学会学術集会(大阪). 2009/3/20-22.
- ⑨ Suzuki T, Aizawa K, Munemasa Y, Matsumura T, Sawaki D, Kada N, Nagai R: Epigenetic control of gene transcription at the chromatin level with a focus on Krüppel-like factors. 15th International Vascular Biology Meeting (Sydney, Australia). 2008/6/1-5.
- ⑩ Suzuki T. Epigenetic control of gene transcription at the chromatin level with a focus on Krüppel-like factors. 15th International Vascular Biology Meeting (Sydney, Australia.) 2008/6/1-5.

[図書] (計2件)

- ① 鈴木亨, 他、医歯薬出版、新しい酸化LDLの測定法. 清野精彦監修「別冊・医学のあゆみ、心血管マルチバイオマーカー・スト

ラテジー」、2009、pp91-94

- ② 鈴木亨, 他、中外医学社、DNA損傷と修復. 山口徹、高本眞一、中澤誠、小室一成監修「Annual Review 2008 循環器」、2008、pp23-27

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 血液試料を用いて心筋虚血状態を評価する方法

発明者: 鈴木亨、藤本宏隆

権利者: 国立大学法人東京大学、株式会社島津製作所

種類: 特許

番号: PCT/JP2008/65444

出願年月日: 2008年8月28日

国内外の別: 国外

○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

東京大学大学院医学系研究科ユビキタス予防医学講座

<http://plaza.umin.ac.jp/upm/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 90359620

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし