

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03432

研究課題名(和文) 早期誘導遺伝子の継時的なヒストンコード変化を可能にする因子の探索及びその機能解析

研究課題名(英文) Exploration of epigenetic factors that enable successional histone code changes in early-induced genes.

研究代表者

神吉 康晴 (KANKI, YASUHARU)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：00534869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまでの申請者の研究を発展させ、生理的な血管新生を阻害せず、悪性固形腫瘍増大や進展に関与する病的血管新生を阻害する薬剤の候補分子を同定することを目的として開始したものである。ヒト血管内皮細胞に血管内皮増殖因子を刺激した際のマルチオミクス解析から、KDM2Bというエピゲノム修飾関連分子を標的候補として見出した。強制発現系やノックダウンを用いた研究で、KDM2Bは病的な血管新生を負に制御していることが明らかとなった。この研究成果は、血管新生を負に制御する初めてのエピゲノム因子として国際誌に報告し、将来の創薬候補として期待される結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでの申請者の研究を発展させ、生理的な血管新生を阻害せず、悪性固形腫瘍増大や進展に関与する病的血管新生を阻害する薬剤の候補分子を同定することを目的として開始したものである。ヒト血管内皮細胞に血管内皮増殖因子を刺激した際のマルチオミクス解析から、KDM2Bというエピゲノム修飾関連分子を標的候補として見出した。強制発現系やノックダウンを用いた研究で、KDM2Bは病的な血管新生を負に制御していることが明らかとなった。この研究成果は、血管新生を負に制御する初めてのエピゲノム因子として国際誌に報告し、将来の創薬候補として期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：This study was initiated to build upon the applicant's previous research, aiming to identify candidate molecules for drugs that inhibit pathological angiogenesis involved in the growth and progression of malignant solid tumors, without disrupting physiological angiogenesis. Through multi-omics analysis of human endothelial cells stimulated with vascular endothelial growth factor, KDM2B was identified as a potential target related to epigenome modification. Studies using over-expression and knockdown experimental systems revealed that KDM2B negatively regulates pathological angiogenesis. This research outcome, reported in an international journal, highlights KDM2B as the first epigenomic factor to negatively regulate angiogenesis, marking it as a promising candidate for future drug development.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 エピジェネティクス VEGF KDM2B

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)先進国における主要な死因である悪性腫瘍、脳血管疾患、心血管疾患などは、いずれも血管がその病態に深く関与しており、血管の生理学や病理学を分子レベルで理解することは、基礎医学や臨床医学のみならず、医療経済の観点からも重要である。特に「血管新生」は発生初期において極めて重要であり、また成人以降も創傷治癒の過程において必要不可欠である。しかしながら、この血管新生は常に適切な量で制御される必要があり、異常な亢進が起こると、悪性固形腫瘍の増大や糖尿病性網膜症などの深刻な病態を引き起こす。そのため、臨床現場では悪性腫瘍や糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症の治療に血管新生阻害薬が使用されているが、現行の血管新生阻害薬は生理的な血管新生も阻害するため、臨床的には問題がある。そこで、本研究では、生理的な血管新生に影響を与えずに、病的な過剰血管新生のみに影響を与える分子を同定し、その阻害薬候補を抽出することを目的として開始した。

(2)申請者は10年ほど前から、ヒト血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVECs) に増殖因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor; VEGF) を加えた際に起こるエピゲノム変化に着目しており、病的血管新生に重要な即時誘導型転写因子の遺伝子座において、特殊なエピゲノム修飾が存在していることを見出した。この急激なエピゲノム変化に寄与する因子としてPTIPを同定し、創薬候補として国際特許を取得している。更に、抑制系ヒストン修飾 H3K27me3, H2AK119Ub に着目した。次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降実験を組み合わせた ChIP-seq 解析を行うと、VEGF 刺激前後で H3K27me3 は変化しないにも関わらず、H2AK119Ub は刺激後15分において有意な減少が見られた。この結果から、血管新生遺伝子を通常状態で抑制しているのは H2AK119Ub に関わる polycomb 複合体であることが示唆された。polycomb 複合体には大きく6種類あるが、我々は網羅的な siRNA を用いたスクリーニングにより、血管新生には PCGF3 複合体 (PRC1.3 複合体) が大きく寄与していることを見出した。そこで、PCGF3 の血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスを作成した。その血管新生を解析したところ、ノックアウトマウスは発生期血管には影響を与えず、生後の VEGF による血管新生のみが抑制され、がん増殖の遅延や病的炎症も抑制できることを明らかにした。以上の結果をまとめ、Cell Reports 誌に報告し、表紙に採択された (図、Kanki Y et al, *Cell Rep* 2022, 表紙)。

(3)上記研究の中で、申請者は VEGF による血管新生に polycomb 複合体の1種である PRC1.3 が関与していることを明らかにしている。更に、VEGF 刺激後一過性に血管新生に重要な転写因子の遺伝子座で H2AK119Ub が減少することを見出した。そこで、次に、H2AK119Ub 修飾に影響を与える因子としてヒストン脱メチル化酵素 KDM2B に着目した。KDM2B は、これまでの研究で胎生期の血管新生に影響を与えることは示唆されているが、成人の血管新生における役割は不明である。そこで、本研究では、KDM2B の血管新生における役割解析を行った。

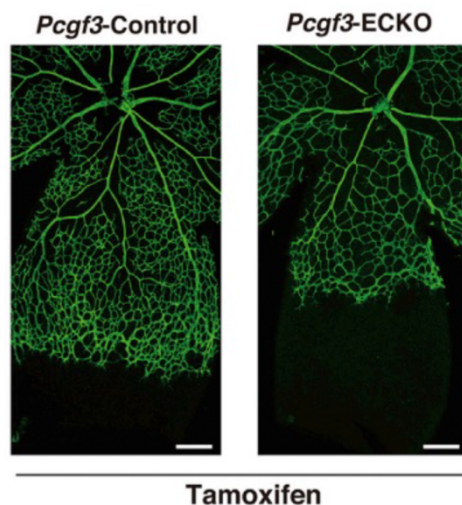
2. 研究の目的

本研究は、ヒストン修飾酵素 KDM2B に着目し、その血管新生における役割解析、及び、創薬の標的となりうるかどうかを検証するものである。上記で記載したように、病的な血管新生を制御するエピゲノム因子の一つとして、申請者らはすでに PTIP を同定しており、その効果に関しては国際特許を取得している。本研究では、もう一つの修飾である抑制系ヒストン修飾、具体的には H3K27me3, H2AK119Ub に着目し、それらの血管新生に対する意義を解明する。近年、H2AK119Ub 修飾に関与する Polycomb Complex1 (PRC1) には抑制系だけではなく、活性型の複合体の存在も示唆されており、その血管新生に対する作用を我々は明らかにした (Kanki Y et al 2022 *Cell Rep*)。本研究では、主に次世代シーケンサーを用いた手法で KDM2B の意義を解明し、その機能解析、ドメイン解析を行うことで、血管新生に対する影響を評価する。

3. 研究の方法

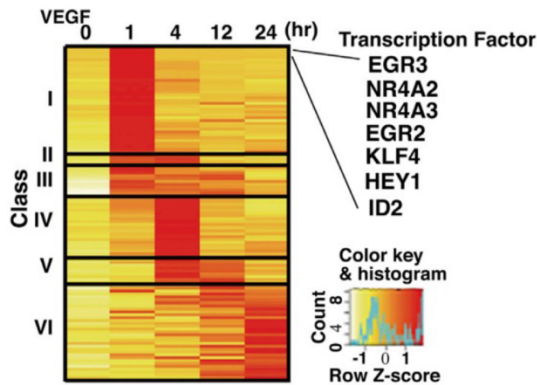
(1) KDM2B のノックダウン、過剰発現系を作成し、VEGF 刺激後の血管新生を評価する

Pcgf3 KOマウス解析

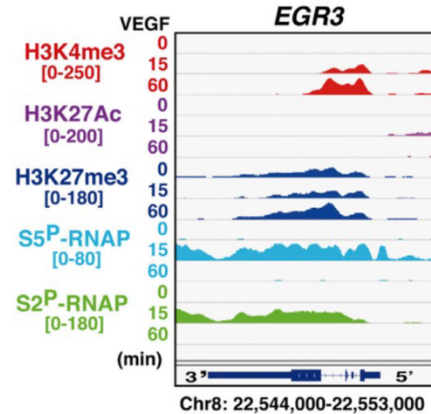


- (2) KDM2B のタンパクのどのドメインが重要かを決定するために、各ドメインを取り除いた過剰発現系を構築し、VEGF 刺激後の血管新生を評価する
- (3) VEGF 刺激と H2AK119Ub 修飾の関係を明らかにするために、ChIP-seq を行い、全ゲノム解析を行う
- 以上 3 点を行うことで、血管新生と KDM2B, H2AK119Ub との関連を明らかにする

Transcriptome解析



Epigenome解析



4. 研究成果

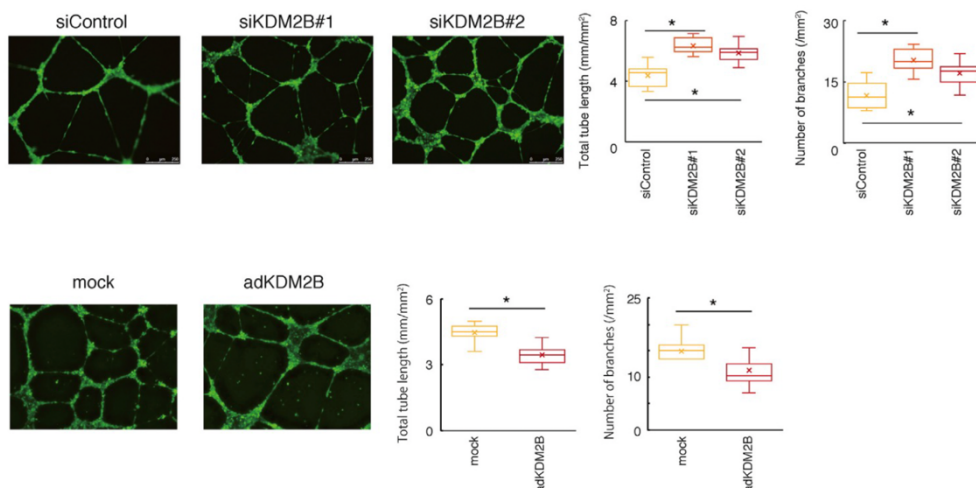
- (1) HUVEC に siControl または siKDM2B をトランスフェクションし、血清飢餓状態にしてから VEGF を 24 時間処理し、その tube 形成能を評価した。その結果、KDM2B の siRNA ノックダウン (オリゴ#1 およびオリゴ#2 の両方) は、siControl と比較して、総チューブ長および分岐数を有意に増加させた。これは KDM2B が VEGF 刺激下の血管新生を抑制していることを示唆する結果である。

一方で、KDM2B の過剰発現系を構築した。KDM2B 全長 cDNA を過剰発現させるアデノウイルスを作成し (adKDM2B)、HUVEC に感染させ、上記と同様の tube formation assay を行った。KDM2B ノックダウンとは対照的に、KDM2B の過剰発現は VEGF 介在性のチューブ形成を有意に抑制し、総チューブ長および分岐数を減少させた。これは siRNA の結果と一致するものである。

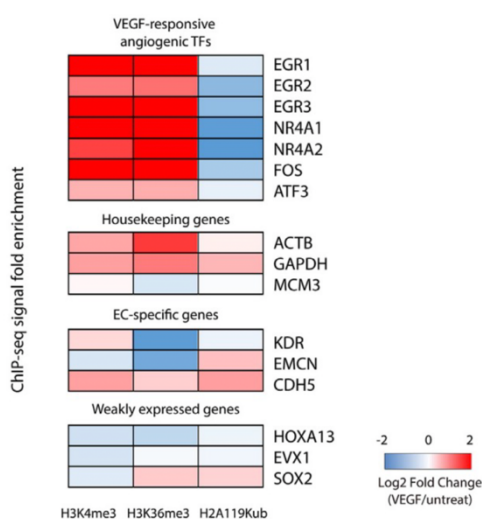
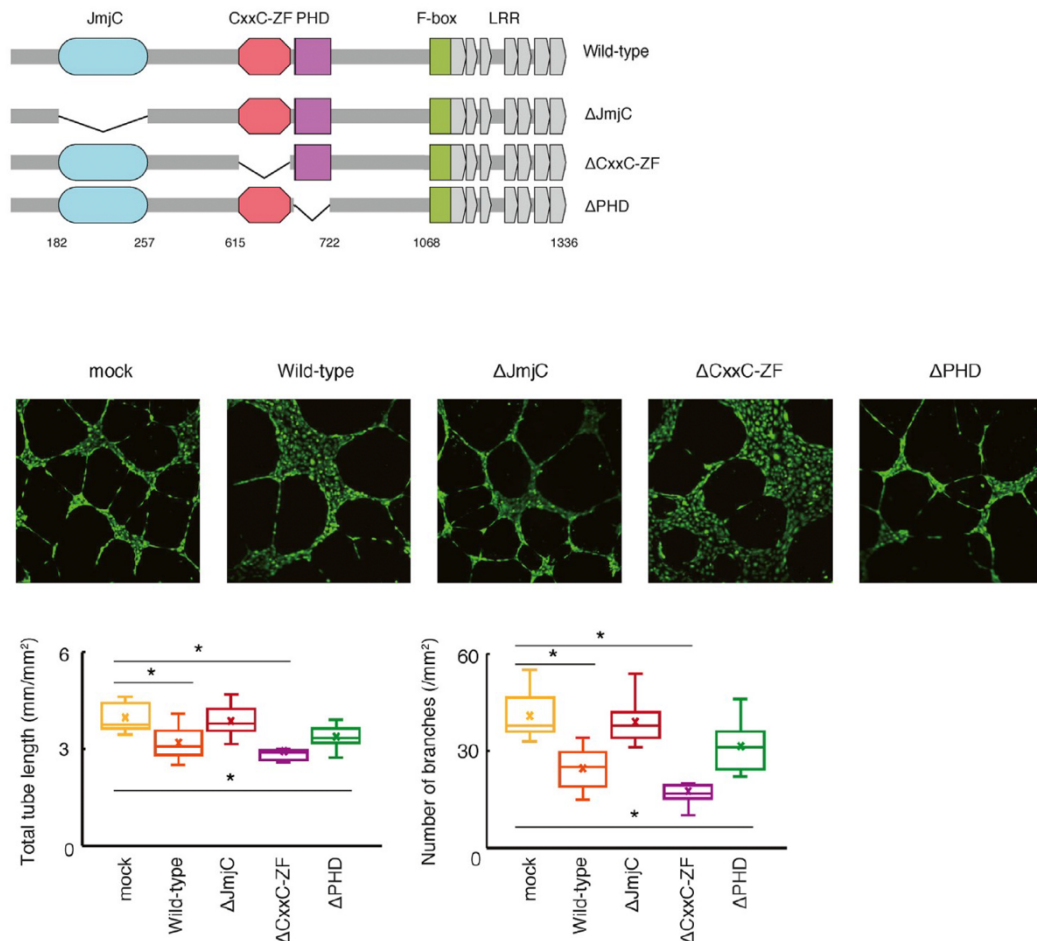
また、同時に行った migration assay でも、siKDM2B は血管内皮細胞の migration を促進させ、adKDM2B は抑制する結果となった。

以上のことより、KDM2B は VEGF による血管新生に関与していることが明らかとなり、また、他のこれまで我々が報告してきたエピゲノム因子と異なり、血管新生を負に制御している結果であった (図)。

Tube formation Assay



(2) KDM2B は、H3K4me3 および H3K36me2/3 に対する脱メチル化活性を示す JmjC ドメイン、非メチル化 CpG を認識する CxxC-ZF ドメイン、H3K4me3 に結合することができる PHD、F-box ドメイン、およびユビキチンリガーゼ RING1B の取り込みに重要なロイシンリッチリピートを含む (図)。VEGF 誘導性血管新生において KDM2B のどのドメインが重要であるかを決定するため、図に示すように、JmjC (Δ JmjC)、CxxC-ZF (Δ CxxC-ZF)、または PHD (Δ PHD) を欠損した adKDM2B を構築し、その機能を調べた。Tube formation assay では、wild type KDM2B、KDM2B Δ CxxC-ZF、および KDM2B Δ PHD の過剰発現が VEGF 誘導血管新生を有意に抑制し、総チューブ長および分岐数が減少した。対照的に、KDM2B Δ JmjC を過剰発現した内皮細胞では VEGF 誘導チューブ形成に対する抑制効果は顕著に見られなかった。これは、VEGF シグナル伝達中の血管新生において KDM2B の JmjC 依存の脱メチル化活性が重要である可能性を示唆している (図)。



(3) 次に、KDM2B が媒介するヒストン修飾と VEGF 応答性血管新生転写因子の転写制御との関連を評価するために、VEGF で刺激した HUVEC において、各種ヒストン修飾抗体で ChIP-seq を行った。EGR2、EGR3、NR4A1、NR4A2 などの VEGF 応答性血管新生転写因子の代表的なゲノム領域では、HUVEC に 1 時間 VEGF を刺激すると、プロモーターおよび遺伝子本体でそれぞれ H3K4me3 および H3K36me3 のシグナルが増加したが、H2AK119ub レベルは減少した。対照的に、HUVEC で弱くまたは発現していない転写因子である HOXA13 および EVX1 のゲノム領域における H3K4me3、H3K36me3、および H2AK119ub レベルには VEGF 刺激は影響を与えず、ハウスキーピング遺伝子座 ACTB および GAPDH の信号にもほとんど影響を与えなかった。ChIP-Seq シグナルのヒートマップは、VEGF 応答性血管新生転写因子で H3K4me3/H3K36me3 の占有が増加し、

H2AK119ub の占有が減少したことが示され、ハウスキーピング遺伝子、内皮細胞特異的遺伝子、およびほとんど発現していない遺伝子座でのこれらのヒストンマークの変化はわずかであった。これらの結果は、KDM2B が媒介するヒストンマークの調節が、VEGF 応答性血管新生転写因子の転写制御に関与している可能性を示唆している。

研究成果のまとめ

本研究により、これまでの我々の報告に加えて、VEGF 刺激下での血管新生における新たなヒストン修飾因子の役割が明らかとなった。KDM2B は VEGF 刺激下で特に H2AK119Ub 修飾を変化させることで、血管新生を負に制御していることを示した。これは、KDM2B そのものが新たな創薬分子の候補であることを示しており、血管新生分野において重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Sasaki Yuji, Higashijima Yoshiki, Suehiro Jun-Ichi, Sugasawa Takehito, Oguri-Nakamura Eri, Fukuhara Shigetomo, Nagai Nao, Hirakawa Yosuke, Wada Youichiro, Nangaku Masaomi, Kanki Yasuharu	4. 巻 605
2. 論文標題 Lysine demethylase 2B regulates angiogenesis via Jumonji C dependent suppression of angiogenic transcription factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 16 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamai Shinsuke, Fujita Shin-ichiro, Komine Ritsuko, Kanki Yasuharu, Aoki Kai, Watanabe Koichi, Takekoshi Kazuhiro, Sugasawa Takehito	4. 巻 608
2. 論文標題 Acute cold stress induces transient MuRF1 upregulation in the skeletal muscle of zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Komine Ritsuko, Manevich Lev, Tamai Shinsuke, Takekoshi Kazuhiro, Kanki Yasuharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Gene Expression Profile Provides Novel Insights of Fasting-Refeeding Response in Zebrafish Skeletal Muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2239 ~ 2239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14112239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Kanki Yasuharu, Komine Ritsuko, Watanabe Koichi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of RNA Markers in Red Blood Cells for Doping Control in Autologous Blood Transfusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1255 ~ 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13071255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Taisuke, Mimura Imari, Nagaoka Koji, Naito Akihiro, Sugasawa Takehito, Kuroda Ryohei, Yamada Daisuke, Kanki Yasuharu, Kume Haruki, Ushiku Tetsuo, Kakimi Kazuhiro, Tanaka Tetsuhiro, Nangaku Masaomi	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of M2-like macrophages of the injured-kidney cortex on kidney cancer progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-022-01255-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Kiyokazu, Nagae Genta, Seki Motoaki, Kudo Yotaro, Kamio Asuka, Hayashi Akimasa, Okabe Atsushi, Ota Satoshi, Tsutsumi Shuichi, Fujita Takanori, Yamamoto Shogo, Nakaki Ryo, Kanki Yasuharu, Osawa Tsuyoshi, Midorikawa Yutaka, Tateishi Keisuke, Ichinose Masao, Aburatani Hiroyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 TET1 upregulation drives cancer cell growth through aberrant enhancer hydroxymethylation of HMG2 in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2855 ~ 2869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashijima Yoshiki, Kanki Yasuharu	4. 巻 1
2. 論文標題 Potential roles of super enhancers in inflammatory gene transcription	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Nakano Takuro, Fujita Shin-ichiro, Matsumoto Yuki, Ishihara Genki, Aoki Kai, Yanazawa Koki, Ono Seiko, Tamai Shinsuke, Manevich Lev, Ueda Haruna, Ishibashi Noriyo, Tamai Kenshirou, Kanki Yasuharu, Yoshida Yasuko, Watanabe Koichi, Takemasa Tohru, Kawakami Yasushi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Proof of Gene Doping in a Mouse Model with a Human Erythropoietin Gene Transferred Using an Adenoviral Vector	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12081249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Takashi, Taguchi Akashi, Higashijima Yoshiki, Kanki Yasuharu, Nakaki Ryo, Urade Yoshihiro, Wada Youichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of cardiac PERK signaling promotes peripartum cardiac dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18687 ~ 18687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98344-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanki Yasuharu, Muramatsu Masashi, Miyamura Yuri, Kikuchi Kenta, Higashijima Yoshiki, Nakaki Ryo, Suehiro Jun-ichi, Sasaki Yuji, Kubota Yoshiaki, Koseki Haruhiko, Morioka Hiroshi, Kodama Tatsuhiko, Nakao Mitsuyoshi, Kurotaki Daisuke, Aburatani Hiroyuki, Minami Takashi	4. 巻 38
2. 論文標題 Bivalent-histone-marked immediate-early gene regulation is vital for VEGF-responsive angiogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110332 ~ 110332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Yuji, Higashijima Yoshiki, Suehiro Jun-ichi, Sugasawa Takehito, Oguri-Nakamura Eri, Fukuhara Shigetomo, Nagai Nao, Hirakawa Yosuke, Wada Youichiro, Nangaku Masaomi, Kanki Yasuharu	4. 巻 605
2. 論文標題 Lysine demethylase 2B regulates angiogenesis via Jumonji C dependent suppression of angiogenic transcription factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 16 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashijima Yoshiki, Matsui Yusuke, Shimamura Teppei, Tanaka Toshihiro, Taguchi Akashi, Miura Mai, Ruan Xiaolan, Li Guoliang, Inoue Tsuyoshi, Nangaku Masaomi, Kimura Hiroshi, Furukawa Tetsushi, Aburatani Hiroyuki, Wada Youichiro, Ruan Yijun, Glass Christopher K, Kanki Yasuharu	4. 巻 39
2. 論文標題 Coordinated demethylation of H3K9 and H3K27 is required for rapid inflammatory responses of endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019103949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu Takashi, Taguchi Akashi, Higashijima Yoshiki, Takubo Naoko, Kanki Yasuharu, Urade Yoshihiro, Wada Youichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 PERK-Mediated Suppression of microRNAs by Sildenafil Improves Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101410 ~ 101410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashijima Yoshiki, Nagai Nao, Yamamoto Masamichi, Kitazawa Taro, Kawamura Yumiko K., Taguchi Akashi, Nakada Natsuko, Nangaku Masaomi, Furukawa Tetsushi, Aburatani Hiroyuki, Kurihara Hiroki, Wada Youichiro, Kanki Yasuharu	4. 巻 3
2. 論文標題 Lysine demethylase 7a regulates murine anterior-posterior development by modulating the transcription of Hox gene cluster	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01456-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Takashi, Higashijima Yoshiki, Kanki Yasuharu, Nakaki Ryo, Kawamura Takeshi, Urade Yoshihiro, Wada Youichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 PERK inhibition attenuates vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension caused by BMPR2 mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabb3616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.abb3616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神吉康晴
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるGATA2の転写制御機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神吉康晴
2. 発表標題 Accurate transcription of bivalent histone-marked genes is vital for vascular development
3. 学会等名 第6回血管生物医学会若手研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関