

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09675

研究課題名(和文) 生理的・病的条件下でのHIF-2 による栄養膜細胞のFlt1遺伝子発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of Flt1 gene expression in trophoblast cells by HIF-2 alpha under physiological and pathological conditions

研究代表者

笹川 忠 (SASAGAWA, Tadashi)

上武大学・医学生理学研究所・研究員

研究者番号：30424675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、通常酸素濃度下および低酸素濃度下の栄養膜細胞におけるHIF-2 を介したFlt1遺伝子の発現機構を調べた。その結果、HIF-2 の二量体化パートナーであるHIF-1 が、両方の培養条件で関与していることが明らかとなった。さらに、HIF-2 が結合するFlt1遺伝子上の低酸素応答性エレメントの候補の位置が、それぞれの培養条件で異なる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群(PE)の病態進行には、胎盤の栄養膜細胞より過剰分泌される抗血管新生因子sFlt1が中心的役割を果たしている。本研究により、栄養膜細胞が低酸素ストレスを受けるとHIF-2 とHIF-1 が協力してsFlt1分泌を増強させることが明らかとなった。現時点においてPEの治療薬は確立されておらず、本成果はHIF-2 とHIF-1 の複合体形成阻害がPEの新たな治療戦略となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, the expression mechanisms of the Flt1 gene mediated by HIF-2 in trophoblast cells under normoxic and hypoxic conditions were investigated. The results revealed the involvement of HIF-1, the dimerization partner of HIF-2, in both culture conditions. Furthermore, it was also suggested that the locations of candidate hypoxia response elements on the Flt1 gene to which HIF-2 binds may differ between the respective culture conditions.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Flt1 HIF-2 HIF-1 妊娠高血圧症候群 栄養膜細胞 転写制御

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群(Preeclampsia:PE)は、妊婦の約5%が罹患する産科疾患である。病的所見としては、高血圧が主体であり、付随的な症状として腎障害に起因する蛋白尿や浮腫が見られる。重症例では母体死亡、胎児発育不全、胎児・新生児死亡をもたらすことも少なくない。特に高齢出産が進む日本では、PEの発症は増加傾向にある。しかしながら、未だにその発症機序は不明な点が多く、予防法ならびに有効な治療法は確立されていない。PEの病態進行には、胎盤構成細胞の一つである栄養膜細胞が分泌する抗血管新生因子 sFlt1(可溶性 fms 様チロキシンキナーゼ)が中心的役割を果たすことが明らかとなってきた。その機序としては、母体血の sFlt1 濃度が高くなることで、血液中の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)がトラップされ VEGF の供給不足となり、血管内皮の膨化や血管内腔の狭小化といった血管内皮障害が起こり、結果として母体末梢組織や胎盤における血流障害、低酸素、栄養不足および炎症等が生じるものと考えられている。しかしながら、栄養膜細胞における sFlt1 過剰産生に関わる分子メカニズムについては、ほとんど理解されていなかった。しかし近年、我々はこの産生亢進の要因の一つと考えられる胎盤血流の低下に起因する虚血状態(低酸素ストレス)に着目し、ヒト初代培養栄養膜細胞およびヒト絨毛由来細胞株において、低酸素環境下で誘導される Flt1 遺伝子発現上昇には、HIF(hypoxia-inducible factor: 低酸素誘導因子)ファミリーの中でも HIF-1 $\alpha$ ではなく HIF-2 $\alpha$ が関与していることを明らかにした(Sasagawa T. et al. Sci Rep, 8: 17375. 2018)。その過程において、通常酸素濃度下の培養条件においても HIF-2 $\alpha$  の発現を抑えると Flt1 遺伝子発現が抑制されることを新たに見出した。以上のことから、栄養膜細胞では HIF-2 $\alpha$  が病的な低酸素濃度状態のみならず生理的な通常酸素濃度状態においても Flt1 遺伝子の転写制御にも関わっている可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

HIF-2 $\alpha$ は、同じ HIF ファミリーの一員である HIF-1 $\beta$ と複合体を形成して、標的遺伝子上に存在する低酸素応答性エレメント(hypoxia response element: HRE)への結合を介して転写を制御することが知られている。そこで本研究では、低酸素ストレスによる病的な Flt1 遺伝子発現上昇ならびに通常酸素濃度下での生理的な Flt1 遺伝子発現における HIF-1 $\beta$  の関与の有無を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- ① 病的条件下(低酸素濃度培養系)での Flt1 遺伝子発現上昇における HIF-1 $\beta$  の関与  
栄養膜細胞のモデル細胞には、三種類のヒト絨毛由来細胞株(BeWo, JEG-3, JAR)を用いた。ヒト初代培養栄養膜細胞に関しては、インフォームドコンセントを得た正常妊婦の出産後胎盤組織より単離・凍結保存された栄養膜細胞を使用した。これらの細胞は前培養を行った後、低酸素条件下(2%O<sub>2</sub>濃度)に24時間暴露することにより低酸素ストレスを与えた。低酸素条件下での HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の複合体形成の有無は共免疫沈降法により調べた。HIF-1 $\beta$  の関与の有無については、HIF-1 $\beta$  に対する特異的 siRNA を用いて調べた。さらに、この現象に HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  のヘテロダイマー化が重要なのかについては、複合体形成を阻害する低分子化合物(HIF-2 $\alpha$  阻害剤)を用いて調べた。各遺伝子の発現は定量的 PCR 法で測定し、各タンパク質の発現はウエスタンブロット法で調べた。
- ② 生理的条件下(通常酸素濃度培養系)での Flt1 遺伝子発現における HIF-1 $\beta$  の関与  
通常酸素濃度下で培養した BeWo 細胞および JEG-3 細胞に対して、HIF-1 $\beta$  の siRNA 導入または HIF-2 $\alpha$  阻害剤処理を行い Flt1 遺伝子発現への影響を調べた。
- ③ Flt1 遺伝子上流に位置する HRE の低酸素誘導性 Flt1 遺伝子発現上昇への関与  
プロモーター解析を行うにあたり、これまでに報告のあった Flt1 遺伝子の転写開始点より約 1kbp 上流に位置する HRE (-966/-962)を含む 5' 非翻訳領域 (-1629/+8) の DNA 断片をプロモーターレスのルシフェラーゼベクターに組み込んで pFlt1-Luc ベクターを構築した。次に BeWo 細胞に対して、pFlt1-Luc ベクターと内部標準用ルシフェラーゼレポーターベクターをコトランスフェクションし、低酸素刺激の有無による Flt1 遺伝子発現を定量的 PCR 法で、プロモーター活性をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。
- ④ クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)解析に供するための細胞ソースの探索  
Flt1 遺伝子の HRE を同定するため、ChIP-seq が実施できるだけの細胞数を確保できる細胞ソースを低酸素刺激による sFlt1 の分泌増強を指標に探索を行なった。
- ⑤ 栄養膜細胞における Flt1 遺伝子の機能的 HRE 同定の試み  
探索により選定されたヒト細胞株 X から分化させた栄養膜細胞を低酸素刺激の有無で培養し、常法に従い断片化クロマチンを調整後、HIF-2 $\alpha$  抗体を用いて ChIP 反応を行なった。得られた ChIP DNA は次世代シーケンス解析に供した。

#### 4. 研究成果

##### ① 病的条件下(低酸素濃度培養系)での F1t1 遺伝子発現上昇における HIF-1 $\beta$ の関与

低酸素条件下で培養した三種類のヒト絨毛由来細胞株(BeWo, JAR, JEG-3)の核抽出液を用いて免疫沈降を行なった結果、すべての細胞株で HIF-2 $\alpha$  抗体により HIF-1 $\beta$  の共沈降が認められ、反対に HIF-1 $\beta$  抗体でも HIF-2 $\alpha$  の共沈降が見られた。したがって、低酸素条件下での核内では HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  は相互作用していることが確認できた。次に、BeWo 細胞および JEG-3 細胞について、HIF-1 $\beta$  に対する特異的 siRNA を導入して低酸素下に曝露すると、HIF-1 $\beta$  のタンパク質発現が低下した場合のみに、低酸素刺激により誘導される F1t1 遺伝子発現上昇の抑制が認められた。さらに、HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の複合体形成を阻害する低分子化合物(HIF-2 $\alpha$  阻害剤)で処理した場合にも同様に F1t1 遺伝子発現上昇が抑制される結果が得られた。ヒト初代培養栄養膜細胞についても、HIF-1 $\beta$  に対する siRNA を導入すると低酸素誘導性 F1t1 遺伝子発現上昇が抑えられ、さらに sF1t1 の二種類のアイソフォーム(sF1t1-e15a および sF1t1-i13)の培養上清中への分泌増加も抑制されることが示された(図1)。以上の結果より、ヒト絨毛由来細胞株およびヒト初代培養栄養膜細胞における低酸素刺激による F1t1 遺伝子発現上昇には HIF-2 $\alpha$  に加えて HIF-1 $\beta$  も関与しており、その発現上昇には HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の複合体形成が重要であることも明らかとなった。

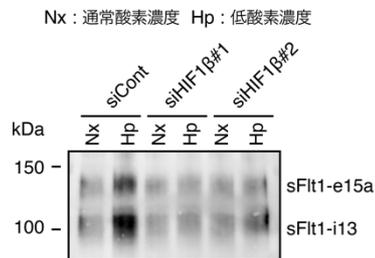


図1. ヒト初代培養栄養膜細胞における低酸素誘導性 sF1t1 分泌増加への HIF-1 $\beta$  の関与

##### ② 生理的条件下(通常酸素濃度培養系)での F1t1 遺伝子発現における HIF-1 $\beta$ の関与

通常酸素濃度下で培養した BeWo 細胞および JEG-3 細胞について、HIF-1 $\beta$  に対する siRNA を導入すると F1t1 遺伝子発現の抑制が認められた。さらに、BeWo 細胞では HIF-2 $\alpha$  阻害剤の添加でも F1t1 遺伝子発現の減少も見られた。したがって、ヒト絨毛由来細胞株における通常酸素濃度下での F1t1 遺伝子発現にも HIF-2 $\alpha$  /HIF-1 $\beta$  のヘテロダイマーが機能していることが示された。

##### ③ F1t1 遺伝子上流に位置する HRE の低酸素誘導性 F1t1 遺伝子発現上昇への関与

pF1t1-Luc ベクターと内部標準用ベクターを導入した BeWo 細胞でも、低酸素刺激により F1t1 遺伝子発現上昇は観察されたが、F1t1 プロモーター活性の上昇は認められなかった。したがって、HRE(-966/-962)は低酸素誘導性 F1t1 遺伝子発現上昇に関与しておらず、機能的 HRE は別のところに存在する可能性が示唆された。

##### ④ クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)解析に供するための細胞ソースの探索

ChIP-seq 解析には多くの細胞数が必要となるため、ヒト初代培養栄養膜細胞に代わる細胞ソースの探索を行なった。その結果、ヒト細胞株 X より分化させた栄養膜細胞が、ヒト初代培養栄養膜細胞と同様に低酸素刺激により HIF-2 $\alpha$  /HIF-1 $\beta$  を介して F1t1 遺伝子発現を上昇させるとともに sF1t1 分泌も増加させる特性を示した(図2)。さらに、この細胞でも通常酸素濃度下での F1t1 遺伝子発現に HIF-2 $\alpha$  /HIF-1 $\beta$  が関与していることも明らかとなった(図3)。ヒト細胞株 X は増殖能が高いため、数多く入手することが可能であり、栄養膜細胞への分化効率も高いため、ChIP-seq に適するという理由により選定した。

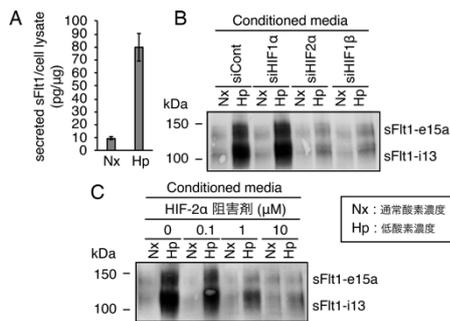


図2. ヒト細胞株 X 由来栄養膜細胞における低酸素誘導性 sF1t1 分泌増加への HIF-2 $\alpha$  /HIF-1 $\beta$  の関与 (A) ELISA (B,C) ウエスタンブロット

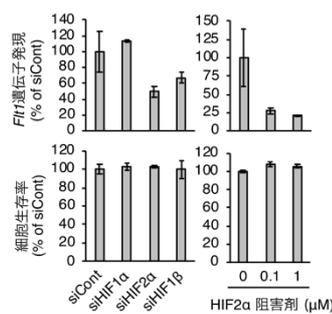


図3. ヒト細胞株 X 由来栄養膜細胞における通常酸素濃度下での F1t1 遺伝子発現への HIF-2 $\alpha$  /HIF-1 $\beta$  の関与 (左: siRNA, 右: HIF2- $\alpha$  阻害剤)

##### ⑤ 栄養膜細胞における F1t1 遺伝子の機能的 HRE 同定の試み

ヒト細胞株 X より分化させた栄養膜細胞を用いて ChIP-seq 解析を行なった結果、それぞれの培養系で数ヶ所の HRE 候補を絞り込むことができた。しかし、どの部位が機能的 HRE であるのかについては今後の検討課題であるが、通常酸素濃度培養と低酸素濃度培養では重複する HRE 候補が存在しなかったため、それぞれの培養条件で異なる HRE を介して F1t1 遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

本研究の成果により、PE の治療薬が確立されていない現状において、HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の複合体形成を阻害することが PE の新たな治療戦略として有望である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasagawa Tadashi、Nagamatsu Takeshi、Yanagisawa Manami、Fujii Tomoyuki、Shibuya Masabumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 is essential for upregulation of the hypoxia-induced FLT1 gene in placental trophoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molehr/gaab065	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 Sasagawa Tadashi、Nagamatsu Takeshi、Shibuya Masabumi	4. 巻 424
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated mutations in both a cAMP response element and an ETS-binding site suppress FLT1 gene expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113500 ~ 113500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2023.113500	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0件

〔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
---------	---------