

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16004

研究課題名（和文）血管内皮細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御の研究

研究課題名（英文）Epigenetic gene regulation in endothelial cell

研究代表者

田中 亨（Tanaka, Toru）

神戸薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：50806065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤は高血圧や心不全など循環器病疾患の治療薬になると注目されている。血管内皮細胞はVEGF・Notch・Apelinシグナルなど多様なシグナル系を介して遺伝子発現を変化させるが、エピジェネティック修飾がどのように変化し、遺伝子発現を制御するかは不明である。HDAC阻害剤によって発現誘導されるApelin受容体（APLNR）の遺伝子発現制御機構の解析を行なった。その結果、HDAC1/2がNotchシグナルの活性化によって発現誘導される転写抑制因子Hey1/Hey2と相互作用することでAPLNR遺伝子発現を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APLNRはApelinやElabelaなどのリガンドの結合によって活性化され、胎生期においては血管形成や心臓形態形成に寄与することが知られている。また、成獣においては血管修復、血圧や心収縮性の調節を担っており、高血圧症や心不全のモデルマウスにリガンド投与することで改善が見られることから、APLNRが新たな治療標的として注目されている。本研究はAPLNRに着目し、HDACによるエピジェネティック修飾制御機構を解析することで、APLNR発現と疾患との関連性を明らかにする新たな知見をもたらす、HDAC阻害剤が血管関連疾患の新規治療薬となる可能性を示すことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Histone deacetylase (HDAC) inhibitors are attracting attention as potential treatments for cardiovascular diseases such as hypertension and heart failure. Vascular endothelial cells alter gene expression through various signaling pathways such as VEGF, Notch, and Apelin signaling, but it is unclear how epigenetic modifications alter and regulate gene expression. We analyzed the molecular mechanisms of Apelin receptor (APLNR) gene expression induced by HDAC inhibitors. The results suggest that HDAC1/2 suppresses APLNR gene expression by interacting with the transcriptional repressor Hey1/Hey2 which is induced by the activation of Notch signaling.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 血管内皮細胞 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック制御とは塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御する機構であり、主に DNA メチル化とヒストン修飾が知られる。これらの修飾は未分化細胞の分化過程で劇的に改変され、分化後の細胞特異性を生み出している (Fujiki et al., Nat Commun. 2013)。血管内皮細胞においてもエピジェネティック修飾、特に DNA メチル化が内皮細胞特異的な遺伝子の発現を制御し、内皮細胞の特徴を生み出していることが報告されている (Shirodkar et al., Blood 2013, Okada et al., ATVB.2014)。これまでに申請者も内皮細胞特異的な遺伝子発現機構を明らかにすべく、内皮細胞特異的に発現し血管透過性を制御する膜タンパク質 Robo4 を対象に DNA メチル化による転写制御解析を行なった (Tanaka et al., Sci Rep 2018)。その結果、iPS 細胞から内皮細胞へと分化する過程で Robo4 プロモーターの転写開始点付近が転写因子 ETV2 と脱メチル化酵素 TET1/2 によって脱メチル化され、内皮細胞でのみ転写因子 SP1 や GABP の結合を可能とすることで内皮細胞特異的な Robo4 発現が生み出されることを示した。さらに申請者はヒストン修飾による転写制御解析を開始した。ES 細胞内皮細胞分化系を用いて種々のヒストン修飾因子阻害剤の効果を検証したところ、血管新生や血圧調節に関わる Apelin の受容体 Aplnr の mRNA 発現が Class I HDAC 阻害剤 PCI-24781 によって増加し、Class II HDAC 阻害剤 TMP195 およびヒストンメチル化酵素阻害剤 DZNep では変化しないことを見いだした。Class I HDAC 阻害剤の効果は他の薬剤 (Chidamide, Mocetinostat, MS275) でも確認された。ES 細胞分化系において阻害剤は内皮細胞分化および分化後の遺伝子発現の両方に影響しうることから、既に分化しているヒト培養内皮細胞 HUVEC を用いて同様の実験を行ない、HUVEC においても Class I HDAC 阻害剤 (PCI-24781 等) が APLNR 発現を増加させることを確認した。使用した 4 種の Class I HDAC 阻害剤は共通して HDAC1/HDAC2/HDAC3 を阻害することから、HDAC1-3 が APLNR 遺伝子発現を制御することが考えられる。APLNR は G タンパク質共役型受容体であり、Apelin や Elabela などのリガンドの結合によって活性化される。APLNR シグナル伝達系は胎生期においては血管形成や心臓形態形成に寄与することが知られている (Ho et al., Science 2017)。また、成獣においては血管修復、血圧や心収縮性の調節を担っており、高血圧症や心不全のモデルマウスにリガンド投与することで改善が見られることから、APLNR が新たな治療標的として注目されている (Sato et al., J Clin Invest 2013)。しかしながら、APLNR の発現制御メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では血管内皮細胞における APLNR 遺伝子の発現制御機構、特にヒストン修飾の意義の解析を試みる。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまで行ってきたエピジェネティック研究を発展させ、ヒストン修飾を制御する HDAC に着目し、内皮細胞において血管新生・血圧調節に働く APLNR 遺伝子の発現制御の分子機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) APLNR 発現に関わる HDAC の同定

ヒト培養内皮細胞 HUVEC を用いて APLNR 遺伝子の発現制御機構を解析する。HDAC1-3 の siRNA を用いてノックダウン実験により APLNR 遺伝子発現を制御するヒストン脱アセチル化酵素を解析した。

#### (2) ヒストン脱アセチル化酵素を制御する上流シグナルの解析

APLNR は静脈特異的に発現することが報告されている。そのため、動脈で活性化しているシグナル伝達系が APLNR 遺伝子の発現を抑制している可能性を考えた。そこで、動脈で活性化しているシグナル伝達系が APLNR 遺伝子発現に影響を与えるかを解析するため、HUVEC にシグナル伝達系のリガンドを処理し、遺伝子発現を解析した。また、Notch シグナル下流で機能する転写因子 Rbpj を欠損させた ES 細胞を樹立し、得られた細胞を CD31+内皮細胞へと分化誘導した。その後、Aplnr 遺伝子発現の発現を解析した。

#### (3) Notch シグナルが HDAC を介して APLNR の遺伝子発現を制御する機序の解析

Notch シグナル伝達で発現誘導される Hey1/Hey2 は HDAC と相互作用し、遺伝子発現を負に制御することが報告されている。そこで、HUVEC に Hey1/Hey2 の siRNA を処理することでノックダウン実験を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) APLNR 遺伝子発現に関わる HDAC の同定

これまでの解析から、APLNR 遺伝子発現は HDAC1-3 によって制御されていると考えられる。そこで HUVEC において siRNA による HDAC1-3 のノックダウン実験を行なったところ、HDAC1/2 の発現抑制に伴って APLNR 遺伝子発現が顕著に増加した。一方、APLNR のリガンドである APLN や内皮細胞機能に必須である VEGF・Notch シグナル関連因子 (VEGFR2, DLL4, Notch1) などの発現に大きな変化は見られなかった。このことから、ヒトの血管内皮細胞において HDAC1/2 が APLNR 発現を特異的に抑制することが示唆された。

## (2) ヒストン修飾因子を制御する上流シグナルの解析

APLNR の発現は静脈で発現が高く、動脈で低いことから、動脈で活性化しているシグナル伝達系を介して HDAC1/2 が APLNR 遺伝子の発現を抑制していることが考えられる。そこで、HUVEC に動脈で代表的な Notch シグナルおよび ALK1 シグナル伝達系のリガンドを処理し、遺伝子発現を解析した。その結果、Notch シグナル伝達の活性化によって既知の下流遺伝子である Hey1/Hey2 遺伝子発現は増加し、APLNR 遺伝子発現は減少した。また、Notch シグナル阻害剤である DAPT の処理により Notch シグナル活性化による APLNR 遺伝子発現抑制が消失した。さらに、Notch シグナル伝達に働く Rbpj 転写因子欠損 ES 細胞を用いて分化誘導により得られた CD31<sup>+</sup>内皮細胞の遺伝子発現を解析したところ、Rbpj 欠損によって ApInr 遺伝子発現が増加していた。このことから、Notch シグナル伝達系によって APLNR 遺伝子の発現が抑制させることが示唆された。

## (3) HDAC を制御する上流シグナルの解析

上記の解析から APLNR 遺伝子発現には Notch シグナル伝達を介した RBPJ による遺伝子発現誘導が関与すると考えられる。Notch シグナル伝達は転写抑制因子である Hey1/Hey2 の発現を誘導し、これらの転写因子は HDAC と相互作用することが報告されている。そこで、Hey1/Hey2 が ApInr 発現を制御するかを siRNA によるノックダウン実験により解析したところ、Hey1/Hey2 の発現抑制により APLNR 遺伝子発現が顕著に増加した。このことから、APLNR 遺伝子発現は Hey1/Hey2 によって発現が抑制させることが示唆された。以上の結果から、APLNR 遺伝子発現は Notch シグナル伝達の活性化を介して誘導させた Hey1/Hey2 と HDAC 複合体によって抑制される可能性が示唆された。しかしながら、Hey1/Hey2 が APLNR 遺伝子発現をどのゲノム領域に結合して発現制御するか、またその領域のヒストン修飾を変化させるか明らかにすることができなかったため、今後さらに検討を進めていく必要がある。

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 Tanaka Toru, Sasaki Naoto, Rikitake Yoshiyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Advances on the Role and Therapeutic Potential of Regulatory T Cells in Atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5907 ~ 5907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10245907	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 Harada Yukihiko, Tanaka Toru, Arai Yuji, Isomoto Yoshie, Nakano Atsushi, Nakao Shu, Urasaki Akihiro, Watanabe Yusuke, Kawamura Teruhisa, Nakagawa Osamu	4. 巻 26
2. 論文標題 ETS dependent enhancers for endothelial specific expression of serum/glucocorticoid regulated kinase 1 during mouse embryo development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 611 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12874	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中亨、佐々木直人、西村紗良、井戸花乃、山口悠馬、武岡侑希、中村百花、浜田悠花、Amin Hilman Zulkifli、堀部紗世、平田健一、力武良行
2. 発表標題 特定波長の紫外線B波による動脈硬化抑制効果とその機序の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Tanaka, Naoto Sasaki, Hilman Zulkifli Amin, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 Identification of specific wavelengths of ultraviolet B for preventing atherosclerosis and their mechanisms of action
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中亨、佐々木直人、Hilman Zulkifli Amin、力武良行
2. 発表標題 動脈硬化抑制に有効な紫外線B波の波長の特定とその機序の解明
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Tanaka, Naoto Sasaki, Hilman Zulkifli Amin, Yoshiyuki Rikitake
2. 発表標題 Development of a novel anti-inflammatory phototherapy against atherosclerosis
3. 学会等名 第19回国際動脈硬化学会議（国際学会）
4. 発表年 2021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