

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23790840

研究課題名(和文) iPS細胞の血管平滑筋細胞分化・脱分化における転写機構解析と動脈硬化治療への応用

研究課題名(英文) Transcriptional analysis of SMC differentiation and de-differentiation using iPS cells and the medical application of arterial sclerosis

研究代表者

早川 朋子 (HAYAKAWA, Tomoko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30420821

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)：動脈硬化の原因の一つは、血管平滑筋細胞(SMC)の脱分化であるため、SMCの分化・脱分化機構の解明を行った。iPS細胞にレンチノイン酸を添加したSMC分化誘導系と、動脈硬化をミミックするマウス頸動脈結紮モデルにより、SMC分化・脱分化の際に多くのヒストン修飾酵素(HMEs)の発現変動が起こること、特にHME-Aは変動が大きいことが分かった。レンチノイン酸受容体とHME-A抗体を用いてChIP sequencを行ったところ、血管炎症の原因として知られているFcgr2a遺伝子のプロモーターに強いピークが観察された。以上よりFcgr2a遺伝子はSMC細胞の分化脱分化に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Smooth muscle cells (SMCs) play a pivotal role in development of vascular disease, in which they markedly change their phenotypes. We established a novel in vitro SMC differentiation system using iPS cells. Using this system we assessed if histone modifying enzymes (HMEs) might be involved in SMC differentiation and phenotypic modulation. We found a number of HMEs were differentially regulated during SMC differentiation. We also found that expression of many HMEs was altered in phenotypically modulated SMCs in the mouse carotid ligation model. Based on these results we identified 10 HMEs that might be involved in the control of SMC phenotype and systematically knocked down them in SMCs. Among the HMEs tested HME-A was upregulated by phenotypic modulation and its knockdown markedly augmented the SMC differentiation marker genes, suggesting that HME-A is crucially involved in phenotypic modulation of SMCs.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管平滑筋細胞 ヒストン修飾 細胞分化

## 1 研究開始当初の背景

SMC の分化・脱分化は、発生過程や病態において可逆的であることが知られている。正常血管 SMC は血管収縮に特化した性質を持ち、収縮型 SMC と呼ばれる。それに対し、動脈硬化病態 SMC は、脱分化を起こして細胞外基質等を盛んに産生する合成型 SMC へと形質転換する。この脱分化 SMC は胎児期 SMC に性質が近く、動脈硬化と SMC 分化・脱分化は密接にかかわっている (Manabe, I., Nagai, R.: Curr. Atheroscler. Rep, 2003, Fig.8 参考)。例えば、SMC 分化に関する重要な転写因子である EF1 は動脈硬化病態を顕著に改善する (Nishimura, G. et al.: Dev Cell, 2006)。

RA は SMC 分化促進作用をもち、さらに動脈硬化病態における SMC の細胞増殖抑制や細胞死促進効果などから、治療薬としての可能性が示唆されている (Miano JM, et al.: 2001, Arterioscler Thromb Vasc Biol)。しかし、RA は複数の受容体を介して多種の遺伝子発現を制御する事から、生体への影響が大きく呼吸困難等の重篤な副作用があり全身投与には危険が伴う。そこで、RA の SMC 分化における下流因子の解析により、動脈硬化治療に貢献できると考えられるが、不明な点が多くターゲット因子は未定である。未分化細胞からの高頻度な分化培養系が存在せず、現在のところ解析が不可能であり、初期分化メカニズムはほとんどわかっていない。

そこで、応募者は将来の臨床応用への期待も考慮し iPS 細胞を用いた RA 添加による SMC 分化培養系を確立した。現在知られている SMC 分化マーカーの発現の変化を調べた結果、未分化細胞、SMC 前駆細胞、胎児期 SMC、成熟 SMC と、時系列にそった分化マーカーの発現誘導が順次おこった。また細胞免疫染色の結果、ほとんどの細胞が

SM-MHC を発現しており、非常に高頻度な培養系であることがわかった。これより、本培養系は、RA の SMC 分化促進作用の解析に非常に有用であると考えた。

また、最初の RA 刺激が SMC 分化誘導に必須であるため、RA の 2 種類の受容体である RAR, RXR のどちらが働いているのかを調べた。本培養系では、両方に作用する RA を用いているが、RAR 特異的に作用する RA 類似体 Am80 と比較したところ、同程度の分化が観察された。これより、RA は主に RAR を介して働く事がわかった。

ついで、転写因子である RAR によって発現が誘導される遺伝子を、定量的 RT-PCR を行って解析した。RA 添加 6 から 12 時間後に X の発現が誘導されていた。そこで、X が RA によって直接誘導されるのか調べるために、X の転写開始点上流 3kbp 中に RAR 結合配列が存在するかをコンピュータ解析によって調べた。さらに、ChIP assay 法を用いて、RA 存在下において RAR が予想部位に結合する事を確認した。

X は DNA 結合タンパク複合体を構成する因子であり、幅広い遺伝子発現調節に働くため、X が SMC 分化を特異的に誘導しているとは考えにくい。そこで X の下流に SMC 分化特異的に働く因子が存在するのではないかと考えた。この X 下流因子を Y と仮定し、X を含む複合体がゲノムに結合し、Y の発現が誘導されるのではないかと仮定した。Y は、転写因子または miRNA と推測している。

近年、ティッシュエンジニアリングの手法を用いて作製される再生血管の開発が行われている (Koike, N. et al.: Nature, 2004)。しかし正常 SMC の性質を培養中に維持するのが困難であり、安全な培養 SMC の供給が期待されている。本培養系の分化 SMC は、分化後に形質転換を起こさず安定であり、再生血管開発に貢献できるものと期待している。

## 2 研究の目的

動脈硬化症の原因の一つは、血管平滑筋細胞(Smooth muscle cell; SMC)脱分化に伴う SMC の遊走と増殖であることが知られている。またレチノイン酸(Retinoic acid, RA)は SMC 分化促進・SMC 増殖抑制・細胞死促進作用があることから、SMC に対する RA の作用を解析することで動脈硬化治療のターゲット因子発見を期待できる。しかし、SMC 分化・脱分化機構は不明な点が多く、特に初期分化の誘導はほとんど解明されていない。研究代表者は、iPS 細胞を用いて SMC 分化培養系を確立し、RA が SMC 分化のトリガーとして作用することを見出した。そこで、RA の下流因子の同定によって SMC 分化・脱分化機構を解明し、動脈硬化治療への応用への可能性を探ることとした。

未分化細胞から SMC 分化培養系を新規に確立した事で、RA による SMC 初期分化機構解明の糸口を作った。今まで RA の SMC に対する作用は知られていたが、ターゲット因子は知られていなかった。しかし、X, Y を同定する事により、RA のターゲットとなる下流因子、さらに動脈硬化抑制作用が解析できると考えている。

動脈硬化病変の改善は、脱分化 SMC の増殖抑制や細胞死誘導、あるいは脱分化 SMC の再分化が有効である。Y 遺伝子改変マウスによる Y の抑制、アデノウィルスによる Y の強制発現などによって、in vitro, in vivo の両方向から Y の治療因子としての可能性を調べる。Y は、脱分化 SMC の増殖抑制・細胞死促進効果さらに、EF1 よりも強い動脈硬化改善効果が期待される。また、SMC 脱分化培養系を確立する事で、マクロファージとの共培養が可能になり、動脈硬化増悪のトリガーである炎症による SMC 脱分化が惹起される機構を解明できると期待できる。

## 3 研究の方法

- (1) 細胞培養 (マウス iPS 細胞、ラット血管平滑筋細胞)
- (2) ChIP sequence
- (3) siRNA による遺伝子のノックダウン
- (4) マウス頸動脈結紮モデル
- (5) レポーターアッセイ
- (6) ウェスタンブロット
- (7) QRT-PCR

## 4 研究成果

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日間培養したところ、高頻度で SMC に分化した。RA を 12 時間、1 日または 5 日間添加すると、LacZ 陽性の SMC が観察され、SM-MHC の発現が免疫染色により確認された。しかし最初の 24 時間に RA 添加せず、その後 4 日間 RA を添加すると、LacZ 陽性細胞は全く見られず SMC 分化が起らなかった。よって最初の 24 時間に、RA による SMC 分化の運命を決定づける機構があると予想した。

SMC 分化マーカー発現を調べた結果、初期マーカーは RA 存在下で 3 日目以降に上昇するのに対し、後期マーカーは 6 日後から急激に上昇した。Nestin は 2 日目以降で上昇するが、Brachyury は 1 日後から急速に低下した。SMC は、中胚葉または外胚葉を介して分化する事が知られている。今回確立した SMC 分化培養系は、iPS 細胞から外胚葉、前期 SMC、後期 SMC へと順番に分化していることから、この系により時系列に沿った解析ができると考えられた。

次にマウス頸動脈結紮モデルの作製を行い、2 週間観察した。alphaSMA、SM-MHC の発現は 1 日後から急激に低下し、その後は大きな変化はみられなかった。よって結紮後 1

日以内に、SMC 脱分化を促進する機構があると考えられた。以上より、SMC 分化誘導モデルと血管結紮モデルの双方で1日以内に正負の発現変動が見られる遺伝子を探索した。その結果、10種類のヒストン修飾酵素が発現変動していることがわかった。

マウス iPS 細胞に対しレチノイン酸を作用させると血管平滑筋細胞へ分化することから、レチノイン酸受容体が血管平滑筋細胞の分化・脱分化に重要であると考えた。そこでレチノイン酸受容体抗体を用いて ChIP sequence を行い、プロモーター領域に強いピークが観察される遺伝子を探索したところ、Fcgr2a 遺伝子が見つかった。Fcgr2a 遺伝子は免疫応答細胞表面に存在する免疫グロブリン Fc 受容体遺伝子ファミリーの一つであり、マクロファージ等の食作用性細胞上に存在する細胞表面受容体で、貪食や免疫複合体の排除に關与する。また Fcgr2a は血管炎症症候群として知られている川崎病の原因遺伝子であり、潰瘍性大腸炎の発症に關係するとの報告がなされている。動脈硬化巣で脱分化した平滑筋細胞はマクロファージ様細胞へ形質転換することが知られている。

ChIP sequence によって RAR 結合が判明した Fcgr2a 遺伝子のプロモーター領域をクローニングした。次いで Fcgr2a プロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ヒストン修飾酵素 A によって Fcgr2a プロモーター下流遺伝子発現が誘導されることが分かった。以上より、Fcgr2a 遺伝子は SMC 分化・脱分化に重要な働きがある可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

第78回日本循環器学会  
早川朋子、藤生克仁、眞鍋一郎、永井良三

NSD1 controls smooth muscle phenotypic modulation. 2014.03.21-23, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

第77回日本循環器学会  
早川朋子、藤生克仁、眞鍋一郎、永井良三  
The histone modifying enzyme NSD1 controls smooth muscle phenotypic modulation. 2013.03.15-17, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

第76回日本循環器学会  
早川朋子、藤生克仁、眞鍋一郎、永井良三  
Histone modification enzymes are crucially involved in smooth muscle phenotypic modulation. 2012.03.16-18, 福岡国際会議場(福岡県福岡市博多区)

第75回日本循環器学会  
早川朋子、藤生克仁、眞鍋一郎、永井良三  
Histone modification enzymes are crucially involved in smooth muscle phenotypic modulation. 2011. 08.03-04  
福岡国際会議場(福岡県福岡市博多区)

〔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 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：