

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670619

研究課題名(和文) 内皮細胞へ分化するくも膜における転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of transcriptional regulation from arachnoid cells to endothelial cells

研究代表者

和田 洋一郎 (WADA, youichiro)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：10322033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血などの脳血管障害においてくも膜細胞が果たす役割は十分解明されていない。我々は既にくも膜が多様な細胞に分化して治癒過程に貢献していることを見いだしたので、この転写制御メカニズムを解明するために、ヒトくも膜細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析とエピゲノム解析を行った。その結果、転写制御に関わるヒストン修飾が特徴的に変化することを見いだした。現在は、その意義を明らかにする為、引きつづき細胞数を増やして同様の解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：It is not fully elucidated the role of arachnoid cells in the course of subarachnoid hemorrhage. It was found that arachnoid cells could contribute to the recovery from cerebrovascular diseases. To elucidate the transcriptional regulation mechanism of arachnoid cells, we performed comprehensive transcriptional analysis followed by epigenetic analysis. We found some of histone modifications were dynamically changed, suggesting the importance of chromatin dynamics of arachnoid cells. Based on the outcome of this project, further study is now ongoing to confirm and validate the significance of these findings.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：脳血管障害 トランスクリプトーム エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血は動脈瘤の破裂によって、くも膜下腔に血液が貯留し脳実質を圧迫するだけでなく、その約7割において発症後1～2週間に亘って脳動脈の攣縮が生じ、この間二次的な虚血が生じるなど最終的に30%から60%の致死率となる重要な疾患である。しかしながら動脈攣縮の機序については不明の点が多い。そこで、協力研究者の和田裕美は脳神経外科臨床経験の後、申請者の所属施設において攣縮の機序を解明するために網羅的遺伝子発現解析を行い、比較対照として調整したくも膜が豊富な遺伝子発現プロファイルを有することを見だし報告した。

脳血管は他の部位と比較して、外膜が殆ど存在せず栄養血管も存在しない。代わりに平滑筋層外側にくも膜細胞が位置して血管を取り囲み、クモの巣のように支える。また、くも膜は単に外膜として存在するだけでなく隔壁を構成し、脳動脈および神経に沿った走行によって、正中より対称的に脳槽という部屋を形成する。この脳槽は、脳外科領域において脳動脈と神経の位置を知るガイドポストとして非常に重要な役目を果たしている。

2. 研究の目的

くも膜は脳血管周囲の構造を維持するだけでなく、後述のように血管への分化能を維持している(協力研究者により投稿中)。本研究では協力研究者の所属機関において術中標本組織から初代培養したくも膜細胞を用い、内皮細胞への分化誘導時のトランスクリプトームやエピゲノム情報を取得し、内皮化に決定的なクロマチン構造変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト由来くも膜細胞が内皮化する際のクロマチン構造変化を解明するため、

(1) 動脈瘤クリッピング手術等の開頭手術の際採取されたくも膜を初代培養する。

(2) 幹細胞培地を用いてくも膜細胞を維持増幅する。

(3) 内皮細胞誘導培地を用いて、内皮細胞への分化を誘導する。

(4) 分化各時点において細胞を固定し、エピゲノム修飾及びクロマチン相互作用解析を実施する。上記の手法によって、くも膜細胞の性格を明らかにすると同時に、内皮細胞への分化過程におけるエピゲノム修飾とクロマチン構造を明らかにし、申請者らが見出したくも膜の分化誘導現象において内皮化を決定づける機序を解明すること

を目指した。

ヒト由来くも膜細胞の遺伝子発現解析と分化誘導における知見を踏まえて、詳細なエピゲノム解析、クロマチン相互作用解析を実施するため、以下の手順で研究を進めた。

1. くも膜細胞の採取

ヒトくも膜組織は協力研究者の所属機関において、くも膜下出血又は未破裂動脈瘤の処置等開頭手術の際提供者の同意のもと、不要となつたくも膜組織から得る。同機関に付置する培養施設においてコラーゲンコート培養皿を用い、ES細胞専用培地の中で Explant 法によって初代培養を行った。

2. くも膜細胞の培養

ヒトくも膜組織は協力研究者の所属機関である社会医療法人祥和会脳神経センター大田記念病院において、くも膜下出血又は未破裂動脈瘤の処置等開頭手術の際提供者の同意のもと、不要となつたくも膜組織より初代培養、増幅した。同機関に付置する培養施設においてコラーゲンコート培養皿を用い FBS と LIF を含んだ ES 細胞専用培地において Explant 法によって培養を開始した。

3. 内皮細胞への誘導

充分量のくも膜細胞を調整した後、内皮細胞増殖培地 EGM2MV など、VEGF を含む培地における培養を開始し、day 0 から day 7 の間一定の間隔で1%パラホルムアルデヒドで固定した。また、クロマチン相互作用解析の為には更に1%EGSを併用した二重固定を行い、細胞塊を凍結保存した。同時に、経時的に核酸も調製した。

4. ゲノム・エピゲノム解析

4-A: トランスクリプトーム解析

調製した RNA を用いて、マイクロアレイ及び RNA-seq を行い、遺伝子の転写状況を網羅的に解析した。

4-B: ヒストン修飾解析

代表研究者の施設において、凍結細胞塊を Lysis buffer に懸濁後、sonication を行い DNA の断片化と DNA の精製を行う。引きつづき定法に従って、シーケンス用リンカー付与したライブラリーを作成した後、高速シーケンサーにより塩基配列情報を取得し、ヒストン修飾マップを作成する同様に促進的な H3K4me3 と H3K27ac の分布を全ゲノム的に解析することによって、ヒトくも膜における転写制御の状況を解析した。

4. 研究成果

マイクロアレイによって、正常くも膜細胞の網羅的遺伝子発現パターンを比較した

ところ、ヒト幹細胞、ヒト血管内皮細胞異なるクラスターに分類された。また、RNA-seq によってもくも膜の遺伝子発現様式は血管内皮細胞ともヒト幹細胞とも異なっていた。エピゲノム修飾のうち、H3K4me3 については、くも膜にいて 22,863 箇所の有意なシグナル蓄積領域を認めたが、このうち 16,683 箇所(73%)がヒト大動脈内皮細胞と、16,204 箇所(71%)がヒト幹細胞と共通であった。一方 H3K27ac は 36,022 箇所のピークを認めたがこのうち大動脈内皮細胞と共通のものは 19,596 箇所(54%)、ES 細胞と共通のものは 10,400 箇所(29%)であった。上記の結果は、2 例のくも膜でほぼ同様の傾向をしめした。

これは、くも膜は ES 細胞とも内皮細胞とも異なる遺伝子発現パターンを有しているものの、プロモーターシグナルである H3K4me3 の結果が示すようにある程度共通に発現する遺伝子の存在を示している。しかし、エンハンサーマークである H3K27ac の共有率が低下することは、同じ遺伝子発現を実現するために、異なる転写制御領域を動員している可能性があり、現在投稿中である。

引きつづき同様の検体を蓄積することによって、多能性幹細胞からの分化誘導、高度に分化した細胞からのリプログラミングに加え、組織中で維持されている前駆細胞を活用した第三の再生医療の可能性を示す。本研究は臨床応用に向けた第一歩として、遺伝子発現制御の背後にあるエピゲノム情報変化、クロマチン相互作用情報を取得し、分化方向を決定する転写調節機構解明の手がかりとしたい。

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 2 件)

1. Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T, *Wada Y. (2014) Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin

Structure Change in the KLF4 Gene in Endothelial Cells. *PLoS One*;9(5):e96005.

doi:10.1371/journal.pone.0096005. eCollection 2014. (査読あり)

2. Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro JI, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, *Wada Y. (2014) Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biol.* 15(4):R63. [Epub ahead of print] (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

1 . 和田洋一郎、内皮細胞において観察される転写の波が示唆する転写複合体によるクロマチン構造変化、日本遺伝学会、2013 年 03 月 27 日、慶応大学日吉キャンパス(神奈川県)

〔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

和田 洋一郎 (WADA, Youichiro)
東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：10322033