

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15988

研究課題名(和文) 転写因子Arid5bの血管新生における役割

研究課題名(英文) The role of transcriptional factor Arid5b in angiogenesis

研究代表者

渡邊 綾 (WATANABE, Aya)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10647887

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)：マクロファージ特異的Arid5bノックアウトマウスの皮下に移植したLL/2腫瘍は野生型に比べ腫瘍径が大きく、腫瘍内新生血管は血管径が小さく蛇行が軽度であり、より成熟した血管の様相を呈していた。腫瘍より分離した腫瘍関連マクロファージの免疫細胞における割合は野生型と比較し有意差は認めなかったが、網羅的遺伝子発現検索を行った結果、血管新生に関する遺伝子群で野生型に比較し有意な低下を認めた。ChIPシーケンスではArid5b蛋白のcFosプロモーター領域への結合を認め、cFosのプロモーター領域にあるAP-1配列およびArid5bの直接結合をルシフェラーゼレポーターアッセイにより確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における死因の第一位は悪性新生物(平成30年、27.4%)、第二位は心疾患(同15.3%)であり、第四位の脳血管疾患(同7.9%)と合わせると血管疾患と悪性腫瘍とで半数以上を占める。虚血性疾患や悪性腫瘍の病態において血管新生・血管網の発達、腫瘍免疫は重要な因子であり、これらを治療のターゲットとした抗Vegf薬、抗PD-L1・PD-1抗体などが広く知られている。本研究によりマクロファージにおけるArid5bが血管新生を制御する遺伝子の調整に関与していることが明らかになり、Arid5bが新しい治療ストラテジーのターゲットとなり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：LL/2 tumors implanted into macrophage-specific Arid5 knockout mice (mutant mice) showed larger than that of wild type. In addition, immunohistochemical staining revealed that neovascularization in tumors transplanted to mutant mice had smaller vessel diameter, less tortuous and more mature than wild type. The population of immune cells in tumors was investigated by flow cytometry, and there was no significant difference between mutant mice and wild type. On the other hand, as a result of RNA sequencing, the expression of genes responsible for angiogenesis was reduced in tumor associated macrophages of mutant mice. To identify the target gene of Arid5b, ChIP sequencing was performed. Consequently, significant enrichment was found in the promoter region of cFos, and we confirmed the direct binding of Arid5b to the AP-1 sequence by the luciferase reporter assay. Finally, We have identified cFos, which is also involved in Vegfa expression, as one of the target gene of Arid5b.

研究分野：循環器内科

キーワード：Arid5b 腫瘍関連マクロファージ マクロファージ特異的Arid5bノックアウト 血管新生 網羅的遺伝子発現検索

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Arid5b の遺伝子多型は、冠動脈疾患や関節リウマチ、白血病の発症に関与する

Arid5b は、DNA 結合モチーフ ARID(AT Rich DNA Interactive Domain)を持つ転写因子で、全身臓器、特に腎、肺、脳、心臓などで強く発現している。Arid5b ホモ接合体ノックアウトマウス(Arid5b^{-/-})は出生直後に高率に死亡するが、生存した場合は骨格異常・腎機能障害・免疫系の異常といった表現型を示す[1]。生存した Arid5b^{-/-}マウスの腎糸球体において aSMA 陽性細胞の遊走が抑制されている所見や、同マウスの MEF 細胞において Pdgf による細胞遊走の増加を生じないことが報告されている[2]。Arid5b は血管平滑筋細胞の形質転換に関与する転写因子として同定されていることから[3]、Arid5b が血管新生や血管の成熟に関与する可能性を考えた。また、Genome-wide association study(GWAS)により、Arid5b は小児急性リンパ性白血病の発症に関与することが報告されている[4]。さらに、Arid5b の遺伝子多型が冠動脈疾患[5]・糖尿病[6]・関節リウマチ・SLE・甲状腺疾患の発症に関与する[7]ことなども示されている。これらは、Arid5b が免疫機能・炎症反応・悪性腫瘍の進展に関与している可能性を示唆している。

2) マクロファージにおける Arid5b はマトリゲルへの血管新生に重要である。(未発表データ)

Arid5b が血管新生や血管の成熟に関与している可能性について検証するために、Arid5b^{-/-}マウスにマトリゲルを皮下注射したところ、野生型に比べてマトリゲルへの血管新生が抑制された。マトリゲルに浸潤している細胞を免疫組織化学染色し定量評価した結果、Arid5b^{-/-}マウスから採取したマトリゲルで新生血管の血管内皮細胞や血管平滑筋細胞数の有意な低下を認めたが、それらの細胞をリクルートするマクロファージの数には有意差を認めなかった。次に血管内皮細胞において Arid5b をノックダウンし、Boyden chamber を用いた細胞遊走実験を行った結果、遊走能の低下は認めなかった。一方、Arid5b^{-/-}マウスの骨髄由来マクロファージ(BMDMs)の培養上清中では、野生型 BMDMs の培養上清に比べて、内皮細胞の遊走能は有意に低下した。また、Arid5b^{-/-}マウスの骨髄を野生型マウスに移植して骨髄キメラマウスを作成し、背部皮下にマトリゲルを注射した結果、有意な血管新生の低下を認めた。以上の結果から、血管内皮細胞ではなくマクロファージにおける Arid5b が血管新生に重要である可能性が示唆された。

3) Arid5b は血管新生因子の発現に重要である。

Arid5b^{-/-}マウス由来の BMDMs で、血管新生に関する遺伝子の発現を調べると、Vegfa の発現が有意に低下していた。従って、マクロファージにおける Arid5b は血管新生因子の遺伝子発現を調節する可能性が示唆されたが、その機構は未知である。また、他に血管新生を制御する未知のシグナルや、転写制御機構があることも想定される。以上より、骨髄細胞、特にマクロファージにおける Arid5b が血管新生因子の発現コントロール、免疫機能や炎症反応を介して血管新生に関与しているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

虚血性疾患や悪性腫瘍の病態において血管新生・血管網の発達が重要な因子となっており、これらに関与するものとして Vegf が広く知られている。既に臨床の場において Vegf を標的とした治療薬が使用され一定の成績も得られているが、低・無反応症例も一定数おり長期予後の改善は得られていないのが現状である。Arid5b^{-/-}マウスの BMDMs で Vegf の発現が低下しているという予備的知見から、マクロファージ特異的 Arid5b ノックアウト(Arid5b^{fllox/fllox};LysM Cre^{+/+})マウスにおけるマトリゲルや腫瘍の移植実験ではマクロファージ特異的 Vegf ノックアウトマウスと似た表現型を示すことが予想される。また分離した Arid5b 欠損免疫細胞における遺伝子発現を調べることで Arid5b が血管新生を制御するメカニズムを解明することで、これまで報告されていない治療標的因子や、治療法選択に新たな可能性を提唱することにつながる事が期待される。本研究の目的は、Arid5b をターゲットとして、血管新生に重要なシグナルや転写機構を明らかにし、新しい治療戦略の可能性を提供することである。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ特異的 Arid5b ノックアウト(Arid5b^{fllox/fllox};LysM Cre^{+/+})マウスの作成

バクテリオファージ P1 由来の Cre/loxP 組換えシステムは、広く使用されている遺伝子改変技術である。loxP サイトに隣接する標的エクソンは Cre リコンビナーゼによって認識され欠失しフレームシフトする。マウス Lysozyme M は骨髄単球系細胞でのみ発現されるため、単球系細胞でのみ Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統を得ることができる。Arid5b の exon7 の両側に loxP サイトをノックインした Arid5b flox マウスを Lysozyme M プロモーター駆動型 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配することにより、Arid5b^{fllox/fllox};LysM Cre^{+/+}マウスを作成した。腫瘍から採取した腫瘍関連マクロファージ(TAMs)の欠失効率は 91.4%であった。

(2) LL/2 腫瘍細胞の移植実験

LL/2 腫瘍細胞は ATCC より入手し、DMEM 培養液中で 37°C、5%CO₂ のインキュベータ内で培養した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 1.0x10⁷ cells/ml に調整し、Arid5b^{fl^{ox}/fl^{ox}}:LysM Cre^{+/+}マウスおよび野生型の同腹仔マウス(両群共に 12 匹)の臀部と後肢の間の領域に 100 ul を皮下注射した。腫瘍の長径(a)と短径(b)を隔日で測定し、腫瘍サイズは以前の報告を参考に $ab^2/2$ と定義した[8]。

(3) 腫瘍の免疫組織化学染色

採取した腫瘍は PBS で洗浄し、100%メタノールで 48 時間以上固定をしたのちパラフィン包埋を行い切片を作成した。2%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、1%希釈のマウス CD31 抗体で反応させ、洗浄後 0.5%希釈のビオチン付き 2 次抗体を反応させた。アビジン-ビオチン標識アルカリフォスファターゼで反応させた後、ベクターレッドを用いて発色させた。

(4) 腫瘍内免疫細胞のフローサイトメーターによる解析

Arid5b^{fl^{ox}/fl^{ox}}:LysM Cre^{+/+}マウスおよび野生型の同腹仔マウス(両群共に 5 匹)に LL/2 腫瘍細胞を皮下注射し 8 日目に腫瘍を摘出した。腫瘍はハサミで物理的に細断したのちコラゲナーゼを用いて溶解し溶血処理を行った。細胞凝集塊や組織片を遠心分離およびフィルターで除去し、PBS で 1.0x10⁷ cells/ml に調整し、細胞表面マーカーで染色した。フローサイトメーターは BD FACS AriaTMII を用いた。CD11b および F4/80 共発現はマクロファージと単球を識別するために広く使用されているマーカーであり、顆粒球系細胞を Ly6G で除外し、Ly6c 高発現の炎症性単球を除外した。即ち、CD11b 陽性/F4/80 陽性/Ly6G 陰性/Ly6C 低発現の細胞を TAMs とし、CD11b 陽性/F4/80 陽性/Ly6G 陰性/Ly6C 高発現の細胞を炎症性単球とした。

(5) TAMs からの mRNA 抽出および次世代シーケンサー用の cDNA ライブラリ作成

セルソーターで上記細胞表面マーカーにより TAMs を分離し、NEBNext[®] Poly(A)磁気分離モジュールを使用し次世代シーケンサー用の cDNA ライブラリを作成した。cDNA ライブラリ作成に用いたトータル RNA は RNA integrity number(RIN)スコアが 7 より大きいことを確認し、精製した cDNA ライブラリは Agilent High Sensitivity DNA Kit でサイズが 300bp にピークがあることを確認した。次世代シーケンサーは Illumina 社 Genome Analyzer HiSeq2500 を使用した。

(6) 腫瘍関連マクロファージの PCR

PCR に用いたプライマーはすべて primer3 を用いて作成し、配列は以下の通りである。

Itgav left:ggtgtggatcgagctgtctt/right:caaggccagcattacagt, Spp1 left:cccgtgaaagtgactgatt/right:ttctcagaggacacagcattc, Nrp left:tctgagataatcctggagttgaa/right:ccaatgtgaggccaactt, Ptk2 left:cggtctctgggctacaatgt/right:aactcagaaggcagcagtga, Tnfrsf21 left:catgctgcataatcctgaacc/right:tcagcctggggaatctctt, Jag1 left:tggccgaggtcctacactt/right:gcctttcaattatgctatcagg, Thbd left:atgctgtggagcatgagt/right:ctggcatcgaggaaggtc, Timp1 left:gcaaagagctttctcaaagacc/right:aggatagataaacagggaacacat, Fgfr1 left:ccaccgaattggaggctac/right:gaaggcaccacagaatccat, Lpl left:tttgtgaaatgccatgacaag/right:cagatgctttctctctgtttgt, Stx5a (標準化用) left:gttccagctgcctgcgaagt/right:ccatgagggtaaattcactgc. Qiagen 社 SYBR Green PCR Kit を用い、3 ステッププロトコル(変性 94°C:15 秒、アニーリング 52°C:20 秒、伸長 72°C:30 秒、45 サイクル)で、Roche 社の LightCycler[®]480 System II 384well を用いて行った。

(7) 腹腔マクロファージの作成およびクロマチン免疫沈降法

Arid5b 野生型マウスの腹腔内にチオグリコレート 2 ml を注射し、3.5 日目に安楽死させ、PBS で腹腔内を洗浄し洗浄液を回収した。遠心分離による洗浄後、細胞数をカウントし、6 cm dish に 0.8x10⁷ 個の細胞を蒔いた。2 時間後培養液を替え浮遊細胞を除去し翌朝接着細胞を回収した。固定はホルムアルデヒド(最終濃度 1%)により行い、核溶解後、DNA-蛋白複合体を超音波破砕機(Covaris)で 300-500bp のサイズに断片化した。Arid5b 抗体(タカラバイオに受託し作成)5 ug を 4°Cで一晩反応させ、プロテイン A セファロースビーズを用いて親和性精製を行った。サンプルは Qubit[®] dsDNA HS Assay で濃度を測定し、Genomic DNA sample prep kit を用いてシーケンス用の DNA ライブラリを作成した。

(8) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポータープラスミドである pLuc-MCS プラスミドの Multiple cloning site に AP-1 結合配列(TGACTAA)を 7 回連続で挿入した AP-1-Luc プラスミドは Agilent Technologies より入手した。クローニングした Arid5b 全長を pcDNA3.1(-)ベクタープラスミドに挿入し、シーケンスにより配列を確認した。HEK293FT 細胞を 6 ウェルプレートに 1.6 x 10⁴/cm² の濃度で蒔き、トランスフェクション試薬は Lipofectamine 2000 を用いて、AP-1-Luc プラスミドおよび pcDNA-Arid5b プラスミドを各 0.8 ug/well でプロトコルに従いトランスフェクションした。48 時間後細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性は Promega 社の Luciferase assay system を用い、Perkin Elmer 社の 2300EnSpireTM で測定した。

4. 研究成果

(1) Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスへの LL/2 腫瘍皮下移植実験

Arid5b^{-/-}マウスは高率に生後早期に死亡し、生存したマウスも野生型と比較し体格が非常に小さいため、Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスを用いてマトリゲルおよび LL/2 腫瘍細胞の移植実験を行った。Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスに移植したマトリゲルでは、Arid5b^{-/-}マウスに移植したマトリゲルと同様、野生型と比較し血管新生が低下していた。また、Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスに LL/2 腫瘍細胞を皮下移植した結果、野生型に比べ腫瘍径が大きくなった(図 1a)。免疫組織化学染色により腫瘍血管を染色した結果、Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスに移植した腫瘍内の新生血管は、野生型に比較して血管径が小さく蛇行が軽度であり、より成熟した血管の様相を呈していた(図 1b)。以上から、マクロファージにおける Arid5b が腫瘍新生血管の成熟に関与し、血管の成熟化により腫瘍径が大きくなることが推測された。

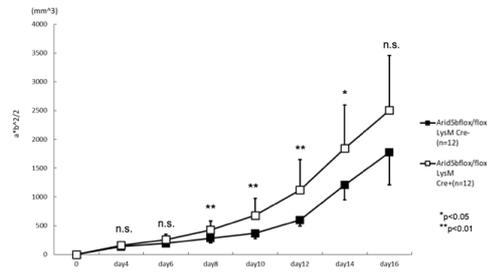


図1a マクロファージ特異的Arid5bノックアウトマウス臀部皮下に移植したLL/2腫瘍細胞の成長曲線 (黒:野生型 (12匹)、白:マクロファージ特異的Arid5bノックアウトマウス (12匹))

(2) 次世代シーケンサーによる腫瘍免疫細胞の網羅的遺伝子発現検索

上記実験(1)で採取した腫瘍免疫細胞をフローサイトメーターを用いて分離した結果、免疫細胞のうち TAMs および炎症性単球の占める割合は野生型と Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスとで共に有意差は認めなかった。分離した TAMs より mRNA を抽出したのち、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現検索を行った。結果については、GSEA(Gene set enrichment analysis)を用いて解析を行った[9]。GSEA とは、網羅的に調べた遺伝子の有意な発現差を遺伝子の機能ごとのグループに分けるもので、複数の遺伝子の発現上昇ないし低下が協調して起こることでその機能をもたらすという考え方に基づくものである。その結果、血管新生に関する遺伝子群で有意な差を認めた。その中に含まれる複数の遺伝子について PCR を行い実際に有意な発現差を確認した(図 2)。

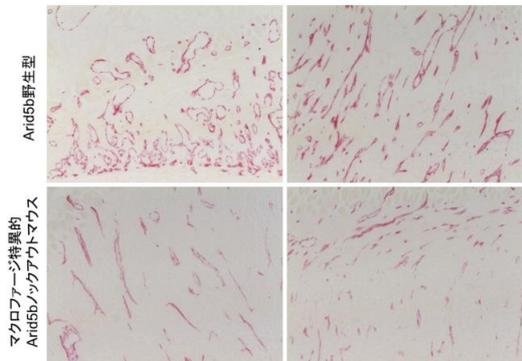


図1b マクロファージ特異的Arid5bノックアウトマウスに移植した腫瘍の免疫組織化学染色 (パラフィン標本、100倍、赤色:CD31陽性腫瘍内新生血管)

(3) クロマチン免疫沈降法(ChIP)による ARID5B 蛋白の標的遺伝子の同定

Arid5b 蛋白の標的遺伝子を同定する目的で ChIP アッセイを行った。TAMs を用いて実験を行う予定であったが、Arid5b^{flx/flx}:LysM Cre^{+/-}マウスは一度に出産する個体数が少ない傾向があり、実験個体を得るために十分な個体の繁殖が困難であったため、同マウスの腹腔マクロファージを作成し、この細胞を用いて ChIP を行った。また、得られた DNA については次世代シーケンサーを用いて網羅的に調べた。この結果、cFos のプロモーター領域に有意な濃縮を認め、Arid5b の標的遺伝子の候補とした。

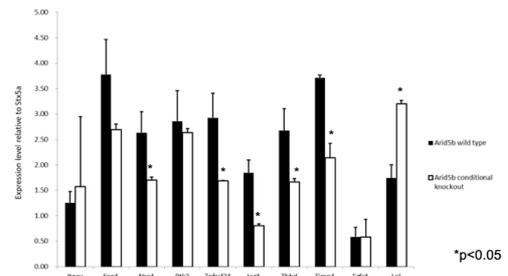


図2b マクロファージ特異的Arid5bノックアウトマウスより採取した腫瘍関連マクロファージ (TAM) における血管新生に関与する遺伝子群の発現 (黒:野生型、白:マクロファージ特異的Arid5bノックアウトMAM)

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイによるマクロファージにおける Arid5b の遺伝子制御システムの解析

Arid5b が cFos の遺伝子の発現を調整している可能性が示唆された。Arid5b の cFos 遺伝子への結合領域には AP-1 配列があり、直接結合を確認すべく AP-1 配列を挿入したルシフェラーゼレポータープラスミドを HEK293FT 細胞に導入するとともに Arid5b を過剰発現し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、Arid5b の過剰発現を行った細胞でルシフェラーゼ活性が上昇する傾向を認め、Arid5b が cFos 遺伝子の発現を介して血管新生に関する遺伝子の調節を行っていることが示唆された(図 3)。

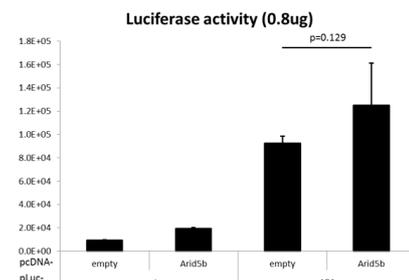


図3 ルシフェラーゼレポーターアッセイ (HEK293FT細胞、pLuc-AP1(0.8ug)、pcDNA-Arid5b(0.8ug))

血管新生に関する遺伝子の中で **Vegfa** は **cFos** によって発現調節を受けること、またマクロファージ特異的 **Vegfa** ノックアウトマウスにおいて **LL/2** 腫瘍細胞を移植すると腫瘍血管の **normalization** により腫瘍増大傾向があることが報告されている[10]が、今回作成した **Arid5b^{fllox/fllox}:LysM Cre^{+/+}**マウスにおいても同様の腫瘍増大傾向を認めており、動物実験の結果を支える根拠となった。

(5) 結果のまとめ

マクロファージ特異的 **Arid5b** ノックアウトマウスの皮下に移植した **LL/2** 腫瘍は野生型に比べ腫瘍径が大きく、腫瘍内新生血管は血管径が小さく蛇行が軽度であり、より成熟した血管の様相を呈していた。これはマクロファージ特異的 **Vegf** ノックアウトマウスに移植した腫瘍と同じ表現型であり、腫瘍血管の成熟化により腫瘍が増大した可能性がある。また、腫瘍より分離した腫瘍関連マクロファージの免疫細胞全体における割合は野生型と比較し有意差は認めなかったが、次世代シーケンサによる網羅的遺伝子発現検索を行った結果、血管新生に関する遺伝子群で野生型に比較し有意な低下を認めた。**ChIP** シーケンスでは **Arid5b** 蛋白の **cFos** プロモータ領域への結合を認め、**cFos** のプロモーター領域にある **AP-1** 配列および **Arid5b** の直接結合をルシフェラーゼレポーターアッセイにより確認した。

本邦における死因の第一位は悪性新生物(平成 30 年、27.4%)、第二位は心疾患(同 15.3%)であり、第四位の脳血管疾患(同 7.9%)と合わせると血管疾患と悪性腫瘍とで半数以上を占める。虚血性疾患や悪性腫瘍の病態において血管新生・血管網の発達、腫瘍免疫は重要な因子であり、これらを治療のターゲットとした抗 **Vegf** 薬、抗 **PD-L1**・**PD-1** 抗体などが広く知られている。本研究によりマクロファージにおける **Arid5b** が血管新生を制御する遺伝子の調整に関与していることが明らかになり、**Arid5b** が新しい治療ストラテジーのターゲットとなり得ることが示された。

<引用文献>

1. Whitson, R. H. *et al.* Neonatal mortality and leanness in mice lacking the ARID transcription factor Mrf-2. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 997-1004, (2003).
2. Soriano, P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* **8**, 1888-1896 (1994).
3. Watanabe, M. *et al.* Regulation of smooth muscle cell differentiation by AT-rich interaction domain transcription factors Mrf2alpha and Mrf2beta. *Circ Res* **91**, 382-389 (2002).
4. Papaemmanuil, E. *et al.* Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **41**, 1006-1010, (2009).
5. Wang, G. *et al.* Genetic variations of Mrf-2/ARID5B confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population. *Int Heart J* **49**, 313-327, (2008).
6. Wang, G. *et al.* Associations of variations in the MRF2/ARID5B gene with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population. *Journal of human genetics* **57**, 727-733, (2012).
7. Okada, Y. *et al.* Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* **44**, 511-516, (2012).
8. Yagi, N. *et al.* A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res* **69**, 6531-6538, (2009).
9. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550, (2005).
10. Stockmann, C. *et al.* Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* **456**, 814-818, (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----