

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14914

研究課題名(和文)血管内皮細胞の成熟におけるエピジェネティック制御の研究

研究課題名(英文)Epigenetic regulation during maturation of endothelial cell

研究代表者

田中 亨(TANAKA, TORU)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

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)：血管内皮細胞は動脈・静脈内皮細胞へと成熟し、遺伝子発現を変化させる。遺伝子欠損マウスを用いた解析によりこの遺伝子発現の違いが血管形成において重要であるが報告されている。しかしながら、動脈・静脈内皮細胞における特異的な遺伝子発現制御メカニズムは未だ明らかになっていない。本研究ではエピジェネティック修飾に着目し、動脈・静脈内皮細胞の特異性を生み出す分子メカニズムの解析を行なった。その結果、特定のヒストン修飾因子阻害剤が内皮細胞の動脈化を抑制し、静脈特異的遺伝子の発現を増加させたことから、標的とされるヒストン修飾因子が内皮細胞の動脈化に関与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

動脈・静脈内皮細胞がそれぞれの特異性を持つことは正常な血管形成に不可欠である。内皮細胞の成熟においてエピゲノムがどのように規定され遺伝子発現を制御するかを理解することは血管形成の分子機構を知る重要な手がかりとなり、効率的な血管内皮細胞への分化誘導法の開発、再生医療への応用に繋がる。また、死因の上位を占める疾患(癌、心疾患、脳血管障害)には血管形成が関連しており、将来的にエピジェネティック修飾因子を標的とした治療薬が血管関連疾患の新規治療法への応用に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Endothelial cells (ECs) mature into arterial and venous ECs, and then change gene expression. The differences in gene expression are important in vasculogenesis. However, the mechanisms of arterial/venous EC specific gene expression are poorly understood. In this study, I focused on epigenetic modification and investigated the molecular mechanism that produces the specificity of arterial and venous ECs. I found that the inhibitors of a particular histone modifier suppressed the arterial maturation of ECs and increased the expression of vein-specific genes. These data suggest that the histone modifier function is involved in the arterial maturation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 転写制御 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

エピジェネティクス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ている。これらの修飾は未分化細胞から様々な細胞へと分化する過程で劇的に改変され、分化後の細胞の特徴づけに極めて重要である。エピジェネティック修飾異常は癌、精神疾患や生活習慣病などの発症に関わることが明らかとなってきている。これまでに、神経細胞、脂肪細胞や血球細胞など多種の細胞でエピジェネティック修飾が細胞特異性を生み出しているが報告されている (Fujiki et al., Nat Commun. 2013)。

血管内皮細胞(内皮細胞)は多能性幹細胞から中胚葉系細胞を経て内皮細胞に分化し、さらに動脈・静脈内皮細胞へと成熟する。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)。申請者も内皮細胞特異的な遺伝子発現が生み出される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 を対象に転写制御解析を行ってきた。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 DNA 脱メチル化されること、この脱メチル化は転写因子 ETV2 が脱メチル化酵素 TET1/2 をプロモーターにリクルートすることで誘導され、内皮細胞特異的な Robo4 発現が生み出されることを見いだした (Tanaka et al., Sci Rep 2018)。内皮細胞特異的な遺伝子発現はプロモーター領域の DNA メチル化によって生み出されているため、この DNA 脱メチル化機構は内皮細胞の特徴を生み出す重要な機構といえる。しかし、内皮細胞は VEGF シグナルや ALK1 シグナルを介してさらに動脈・静脈内皮細胞へと成熟し、遺伝子発現パターンを変化させる。例えば、動脈内皮細胞では Cxcr4 や Efnb2、静脈内皮細胞では Coup-TFII や Apj の発現が高いことが知られている。これら因子のノックアウトマウスは血管構造の破綻や動脈と静脈の並走異常が認められており、動脈・静脈内皮細胞特異的な遺伝子発現は血管形成に重要であることが示されている。しかしながら、動脈・静脈内皮細胞特異的な遺伝子発現がどのように生み出されているかは不明である。

2. 研究の目的

動脈・静脈内皮細胞特異的な遺伝子発現は血管形成において重要であることから、本研究ではエピジェネティック修飾に着目した動脈・静脈内皮細胞の特異性を生み出す分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞分化系におけるエピジェネティック修飾因子の機能解析

血管内皮細胞の成熟過程でエピジェネティック修飾因子が内皮細胞の成熟に与える影響をマウス ES 細胞の血管内皮細胞分化誘導法を用いて解析する。ES 細胞から分化した FIK1 陽性細胞(中胚葉系細胞)を VEGF・cAMP 含有培地で培養すると動脈内皮細胞に、VEGF 含有培地で静脈内皮細胞に分化する。この FIK1 陽性細胞の分化誘導時にエピジェネティック修飾因子阻害剤を添加し、分化誘導後に得られた CD31 陽性細胞(血管内皮細胞)の動脈マーカーである Cxcr4^{high} 細胞の割合と遺伝子発現により評価する。

(2) 血管内皮細胞におけるヒストン修飾因子による遺伝子発現制御解析

ヒト培養内皮細胞 HUVEC を用いて静脈特異的な遺伝子の発現制御機構を解析する。ES 細胞の分化誘導系と同様にエピジェネティック修飾因子を処理した時の遺伝子発現を解析する。次に、標的とされるヒストン修飾因子群の siRNA を用いてノックダウン実験により静脈特異的な遺伝子発現を制御するヒストン修飾因子を同定する。

(3) ヒストン修飾因子を制御する上流シグナルの解析

動脈で活性化しているシグナル伝達系が静脈特異的な遺伝子の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、遺伝子発現を解析する。

4. 研究成果

(1) ES 細胞分化系におけるエピジェネティック修飾因子の機能解析

ヒストンアセチル化およびメチル化が血管内皮細胞の動脈化に寄与するかを調べるため、種々のヒストン修飾因子阻害剤を FIK1 陽性中胚葉系細胞から CD31 陽性内皮細胞への分化誘導時に処理し、CD31 陽性細胞における Cxcr4^{high} 細胞の割合を FACS により評価した。その結果、一部の阻害剤が特異的に Cxcr4^{high} 細胞を減少させた。さらに、CD31 陽性細胞の遺伝子発現を解析したところ、複数の動脈マーカー遺伝子の発現を様に減少させ、静脈マーカー遺伝子発現を増加させた。これらの結果から、これらの阻害剤の標的因子群が内皮細胞の動脈化に寄与することが示唆された。

(2) 血管内皮細胞におけるヒストン修飾因子による遺伝子発現制御解析

標的とされるヒストン修飾因子群が静脈特異的な遺伝子の発現を抑制することで内皮細胞の動脈化に寄与するという仮説を考え、特定の静脈特異的な遺伝子の発現制御機構の解析を行なった。その結果、エピジェネティック修飾因子阻害剤を HUVEC に処理したところ、ES 細胞分化系と同様に静脈特異的な遺伝子発現が増加した。さらに、ヒストン修飾因子群の siRNA を用いてノックダウン実験を行なったところ、その発現抑制によって静脈特異的な遺伝子の発現が顕著に増加した。以上のことから、血管内皮細胞において特定のヒストン修飾因子が静脈特異的な遺伝子の発現を

抑制することが示された。

(3) ヒストン修飾因子を制御する上流シグナルの解析

静脈特異的遺伝子は動脈で発現が低いことから、動脈で活性化しているシグナル伝達系を介してヒストン修飾因子が静脈特異的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、特定の動脈系シグナル伝達活性化によって下流遺伝子の発現が増加し、静脈特異的遺伝子の発現が減少した。このことから、動脈系シグナル伝達によって静脈特異的遺伝子の発現は抑制させることが示唆された。しかしながら、発現を変化させたシグナル伝達系の下流でヒストン修飾因子の制御機構については明らかに出来なかったため、今後のさらなる検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Norika LIU, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Teruhisa KAWAMURA, Yoshihiko SAITO, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Transcriptional regulation and physiological significance of ALK1 target genes in endothelial cells
3. 学会等名 日本血管生物医学会 第16回Korea-Japan Joint Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田恭弘、田中亨、渡邊裕介、荒井勇二、磯本祥恵、中野厚史、川村晃久、中川修
2. 発表標題 血管形成期における新規ALK1ターゲット遺伝子SGK1の血管内皮細胞特異的発現機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦崎明宏、渡邊裕介、原田恭弘、田中亨、劉孟佳、中川修
2. 発表標題 BMP-ALK1シグナル伝達系の新規下流遺伝子群の発現制御と機能解析
3. 学会等名 第6回日本HHT研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru TANAKA, Norika LIU, Shoko TAMURA, Daiki SEYA, Yusuke WATANABE, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Significance of Hey transcription factors in endothelial cell differentiation and embryonic vascular development
3. 学会等名 NAVBO Vascular Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田恭弘、田中亨、足立淳、若林真樹、石濱泰、渡邊裕介、川村晃久、中川修
2. 発表標題 胎生期血管形成におけるリン酸化酵素遺伝子SGK1の上皮特異的発現機構と下流シグナル伝達様式の解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦崎明宏、田中亨、原田恭弘、劉孟佳、川村晃久、渡邊裕介、中川修
2. 発表標題 胚発生における心血管シグナル伝達系と環境因子の相互関係
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2019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