

Title	転写・エピジェネティック因子による血管特異的受容体Robo4の発現制御機構の解明
Author(s)	田中, 亨
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61702
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (田中 亨)	
論文題名	転写・エピジェネティック因子による血管特異的受容体Robo4の発現制御機構の解明
論文内容の要旨	
<p>著者らの研究室では、血管内皮細胞特異的に発現するRobo4の発現制御機構の解析を行っている。これまでに、Robo4 遺伝子上流の3 kbの配列がプロモーター配列であること、またプロモーター内に3か所の種間で保存された領域が存在することを発見した。転写開始点付近の領域にはSP1、GABPが、最上流領域にはAP-1が結合し、Robo4発現を促進することを明らかにした。また、転写開始点領域がRobo4の内皮細胞特異的な発現を制御すること、またそれ以外の領域がプロモーター活性化に寄与することを明らかにしてきた。今回、著者は転写開始点領域を介してRobo4の内皮細胞特異的な発現が生み出される機構、および、上流領域を介してRobo4の発現が制御される機構について、さらに詳細な解析を行った。</p> <p>まず、転写開始点領域により内皮細胞特異的なRobo4発現が生み出される機構の解析について述べる。これまでに著者らは、Robo4プロモーターの転写開始点付近のDNA配列が内皮細胞で非メチル化、非内皮細胞では高メチル化状態であり、このメチル化状態の違いがRobo4の内皮細胞特異的な発現を生み出すことを明らかにしている。そこで、このRobo4プロモーターの非メチル化状態がいつ、どのように形成されるかについて解析を行った。まず、ヒトiPS細胞から内皮細胞への分化過程におけるプロモーターのメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法により解析した。その結果、iPS細胞ではプロモーター全域が高度にメチル化されていたが、内皮前駆細胞以降の細胞では転写開始点付近は、ほぼ非メチル化状態であった。この結果から、Robo4プロモーターはiPS細胞が内皮細胞へと分化する過程で脱メチル化されることが明らかになった。</p> <p>次に、このプロモーターの脱メチル化誘導因子の同定を目指し、脱メチル化される分化段階で発現する転写因子に着目し、Robo4発現に影響を与える因子を探索した。その結果、ETSファミリーに属するETV2がRobo4発現を促進することが明らかになった。さらに、レポータージーンアッセイを用いた解析から、ETV2が転写開始点付近の4つのETSモチーフを介してプロモーターを活性化すること、また、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法を用いた解析から、ETV2はこれら4つのETSモチーフに直接結合することが明らかになった。</p> <p>ETV2がプロモーターの脱メチル化に寄与する機構として、ETV2がDNA脱メチル化酵素TET1-3と相互作用し、プロモーターの脱メチル化を誘導する可能性を考えられた。リアルタイムPCRによる解析から、iPS細胞の分化過程において、プロモーターが脱メチル化される未成熟内皮細胞の段階では、TET1、TET2が発現していることが示された。また、免疫沈降実験による解析から、ETV2はTET1、TET2の双方と相互作用することが明らかになった。また、高メチル化 Robo4プロモーターを持つヒト皮膚線維芽細胞にETV2とTETを強制発現する実験から、ETV2とTET1、TET2が協調的にRobo4プロモーターを脱メチル化することが明らかとなった。さらに、本強制発現細胞を用いたリアルタイムPCRによる解析から、ETV2とTETの強制発現による脱メチル化は協調的にRobo4発現を促進することが明らかになった。</p> <p>以上すべての結果から、内皮細胞への分化過程において転写開始点付近のETSモチーフに結合するETV2が、TET1、TET2との相互作用を介してRobo4プロモーターを脱メチル化し、Robo4発現を誘導することが明らかになった。</p> <p>次に、プロモーター上流領域の、炎症刺激によるRobo4発現制御への関与について解析した結果を述べる。近年、Robo4が炎症下の血管機能を制御することが報告され、かつ著者らのデータベース解析によりRobo4プロモーター上流に複数のNF-κBモチーフが発見されたことから、炎症刺激がNF-κBモチーフを介してRobo4発現を制御する可能性が考えられた。炎症メディエーターTNFαがRobo4発現に影響を与えるかを解析するために、マウスにTNFαを静脈投与し、肺、腎臓、心臓、肝臓のRobo4発現量をリアルタイムPCRにより解析した。その結果、TNFαを投与したマウスの各臓器においてRobo4発現が増加した。また、2種のヒト初代培養内皮細胞（さい帯静脈、冠状動脈由来）にTNFαを処理しRobo4発現量を解析したところ、TNFαは内皮細胞のRobo4発現を促進した。また、NF-κB阻害剤（PDTC）の処理は、このRobo4の発現誘導を抑制した。これらの結果から、TNFαによるRobo4発現誘導にNF-κBが寄与することが示唆された。</p> <p>また、ルシフェラーゼアッセイによる解析から、TNFαは、Robo4プロモーター中の5か所のNF-κBモチーフ（-2905、</p>	

-2753、-2556、-2220、-1820) のうち、-2753と-2220のモチーフを介してプロモーターを活性化することが明らかになった。さらに、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法による解析から、TNF α は-2753、-2220モチーフへのNF- κ B p65、p50の結合を誘導することが明らかとなった。

以上全ての結果から、TNF α は-2753、-2220モチーフへのNF- κ B p65-p50の結合を誘導し、プロモーター活性化を介してRobo4発現を促進することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (田 中 亨)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 土井 健史 副 査 教授 水口 裕之 副 査 教授 藤尾 慈
論文審査の結果の要旨	
<p>田中君は、Robo4遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現制御機構、およびRobo4遺伝子の発現量の調節機構について解析を行い、ETV2-TET複合体によるプロモーターの脱メチル化誘導、炎症刺激によるNF-κBを介するプロモーター活性化の機構を明らかにした。</p> <p>まずはじめに、Robo4プロモーターが内皮細胞へ分化する過程で領域特異的、かつ段階的に脱メチル化されることを示した。また、Robo4の内皮細胞特異的な発現を生み出す転写開始点領域は、ETV2-TET1/TET2複合体がプロモーターに結合し、脱メチル化することで、Robo4発現が誘導されることを明らかにし、内皮細胞特異的な遺伝子発現の新モデルの提唱に成功した。</p> <p>次に、TNFα刺激によりNF-κB p65-p50がプロモーター上流のNF-κBモチーフに結合し、Robo4発現を誘導することを明らかにした。近年、Robo4は炎症性疾患の新規治療標的として注目されつつあるが、本研究は炎症時にRobo4発現が誘導され、血管透過性亢進に対する負の制御などの役割を担っている可能性を示している。今後、炎症治療戦略を立てる上で重要な知見となると考えられる。</p> <p>以上の成果は、再生医療への貢献や、転写因子とエピジェネティック因子による組織特異的な遺伝子発現制御の理解に貢献することが大いに期待されることから、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。</p>	