



Title	血管内皮細胞特異的分子Robo4の発現制御機構の解明と細胞転換技術への応用
Author(s)	井澤, 洸栄
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76502
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (井澤 洸栄)	
論文題名	血管内皮細胞特異的分子Robo4の発現制御機構の解明と細胞転換技術への応用
論文内容の要旨	
本論文において私は、Robo4プロモーター上流のエピジェネティクス修飾の制御因子とRobo4発現への影響を明らかにした。また、Robo4発現を制御する転写因子とエピジェネティクス修飾因子を活用した線維化疾患治療法の基盤技術の開発を行った。 Roundabout4 (Robo4) は血管内皮細胞特異的に発現し、炎症性疾患の治療標的分子として注目されている。我々の研究室では、Robo4の発現制御機構に興味を持ち研究を行ってきた。これまでにRobo4遺伝子上流3 kbの配列がプロモーター配列に、転写因子SP1、GABP、AP-1やNF-κBが結合し、Robo4遺伝子発現を制御することを明らかにした。また、エピジェネティクス修飾の解析からプロモーター上流領域は高度にDNAメチル化され、クロマチンが凝集していることを見出した。本研究ではプロモーター領域のエピジェネティクス修飾に着目し、その形成因子とメカニズムの解析、また得られた知見を応用し、線維化疾患治療の基盤技術としての細胞転換技術の開発を行った。 上流領域の特徴的なエピジェネティック修飾を制御する因子としてPolycomb repressive complex 2 (PRC2) に着目し、これのプロモーター上流領域のエピジェネティック修飾やRobo4発現への寄与について検討した。まず血管内皮細胞において、Robo4プロモーターにPRC2が結合するかを検討した。その結果、PRC2のコアサブユニットであるSUZ12がプロモーター上流領域に存在する-2521 PRC2モチーフに結合することが明らかになった。PRC2モチーフが上流領域のDNAメチル化維持に寄与するかを検討するため、野生型もしくは-2521 PRC2モチーフに変異を導入したプロモーターを導入したマウスES細胞を用いて、上流領域のDNAメチル化を解析した。その結果、変異プロモーターではDNAメチル化が抑制されていたことから、-2521 PRC2モチーフは、プロモーター上流のDNAメチル化維持に寄与することが示された。 次にPRC2がRobo4プロモーター活性とRobo4発現に与える影響を解析した。野生型もしくは-2521 PRC2モチーフ変異プロモーターを持つレポータープラスミドの血管内皮細胞におけるプロモーター活性を評価した。その結果、PRC2モチーフへの変異はRobo4プロモーター活性を有意に上昇させたことから、PRC2が-2521 PRC2モチーフを介してプロモーター活性を抑制することが示された。血管内皮細胞をPRC2のコアサブユニットであるEZH2の阻害剤 (GSK126) で処理したところ、Robo4発現が増加した。これらの結果からPRC2は-2521 PRC2モチーフに結合し、Robo4発現を抑制することが示された。 最後にPRC2がTNFαによるRobo4発現誘導に必要なことについて検討を行った。その結果、GSK126はTNFαによるRobo4発現誘導に変化を与えなかった。この結果からPRC2はTNFαによるRobo4の発現上昇に必須ではないことが明らかとなった。以上全ての結果から、PRC2がRobo4のプロモーター上流領域の高メチル化状態維持とRobo4発現の抑制に寄与することが示された。 Robo4のような細胞特異的な遺伝子の発現は主に分化の過程で決定され、その発現が維持されることで細胞の特徴や機能など細胞の多様な性質が維持されている。しかし生体内では分化後においても細胞の性質が変化する現象が知られている。血管内皮細胞が線維芽細胞に変化する現象である内皮間葉系転換 (EndMT) は、線維化疾患の病態を増悪させることが知られているが、これを効果的に抑制する治療法はない。そこで著者は線維芽細胞を内皮細胞へとダイレクトリプログラミングする技術を開発し、EndMTを逆行させることで線維化病態の治療に応用することを考えた。これまでに線維芽細胞に転写因子ETV2を単独で発現させると内皮細胞に転換されることが報告されているが、転換効率が低い問題があった。著者らはこれまでにETV2に加えDNA脱メチル化酵素TET2を発現させることによって、線維芽細胞に	

内皮細胞特異的遺伝子であるRobo4を効率的に発現させられることを見出したことから、ETV2とTET2を共発現させることで細胞転換効率を高められると考えた。そこでプロモーターのDNA脱メチル化を介して、内皮細胞特異的遺伝子発現を高効率に誘導し、線維芽細胞を内皮細胞へと転換する技術の研究を行った。

まずETV2とTET2の共発現でRobo4以外の内皮細胞特異的遺伝子発現も誘導できるのか検討を行った。その結果、ETV2とTET2を線維芽細胞に共発現させることでETV2単独時より効率的にVE-cadherinの発現を誘導できた。このことから、ETV2とTET2の共発現により線維芽細胞に内皮細胞特異的遺伝子の発現を誘導できることが示された。

次にETV2とTET2の相互作用様式の解析を行った。線維芽細胞にTET2とETV2の部分欠損体を共発現させ、Robo4プロモーターのメチル化パターンとRobo4発現について解析を行った。その結果、ETV2は89-239番目のアミノ酸領域でTET2と相互作用し脱メチル化を誘導すること、1-89番目のアミノ酸領域（転写活性化領域）を介して遺伝子発現を誘導することが示された。

最後に、将来の疾患治療への応用を考慮し、ETV2とTET2の2因子を融合し一分子化できるかについて検討した。まず、TET2の脱メチル化触媒領域（TET2CD）とETV2の融合体を線維芽細胞に導入したところ、2因子導入時より弱いDNA脱メチル化が誘導された。一方で、Robo4の発現は誘導されなかった。次に、ETV2のDNA結合ドメインとTET2CDとの融合体を構築し同様の解析を行ったところ、2因子導入時と同等の脱メチル化能を持つことが示されたが、遺伝子発現誘導能は持たなかった。最後に、TET2CDの部分欠損体と野生型ETV2を融合した融合体を構築し、同様に機能評価を行ったところ、DNA脱メチル化能と遺伝子発現誘導能の双方を有することが示された。これらの結果から、DNA脱メチル化と遺伝子発現誘導の両機能を保持したETV2とTET2融合体の開発に成功した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (井 澤 洸 榮)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	土井 健史
	副 査	教授	辻川 和丈
	副 査	教授	藤尾 悠

論文審査の結果の要旨

井澤君は、血管内皮細胞に特異的に発現し、炎症性疾患の新たな治療標的になると期待されるRoundabout4(Robo4) の発現制御機構について、特にエピジェネティクスに関する研究を行った。まず、Polycomb repressive complex 2(PRC2)が Robo4のプロモーター領域におけるエピジェネティック修飾と発現を制御していることを明らかにした。PRC2 がRobo4プロモーター上流領域に存在する領域特異的なエピジェネティック修飾を制御していること、また、PRC2を構成するタンパク質であるEZH2の活性がRobo4の発現を制御している事を明らかにし、この機構は炎症時に起こるRobo4発現誘導機構とは独立した新たな機構であることを示した。

次に、Robo4の発現を制御するDNA脱メチル化誘導機構を応用し、線維化病態の治療を目指した基礎技術の開発に成功した。Robo4の発現誘導に重要な2種のタンパク質によって引き起こされるDNA脱メチル化を単独で行える人工タンパク質の開発に成功した。これによりI因子の導入のみによって線維芽細胞においてDNA脱メチル化誘導とRobo4発現誘導が可能となり、線維化した細胞を内皮細胞に転換するという新たな線維化病態治療法の開発に向けた基礎技術となることを示した。

以上、本研究からRobo4発現を制御する新たなエピジェネティック修飾制御機構が明らかとなり、加えて、既知の制御機構を応用し、治療が困難とされてきた線維症病態を改善する新たな治療戦略の開発に貢献する成果が示されたことにより、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。