

令和 3 年 6 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 令和1年度

受付番号 201960531

氏 名 藤井 雅行

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) Cincinnati Children's Hospital Medical center (米国)

2. 研究課題名 (和文)

血管形成におけるクロマチンリモデリング制御機構の解明3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: Cincinnati Children's Hospital Medical center部局名: Experimental Hematology and Cancer Biology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果

本研究では血管内皮細胞の遺伝子発現調節機構をクロマチン構造の変化に着目して明らかにする事を目的とする。所期の目的である Chd8 の血管形成における機能、遺伝子発現調節機構の解明を、*in vivo* の血管形成解析、及び RNA-seq、Chip-seq、ATAC-seq の解析により達成することができた。この過程で Chd8 によって、p53 標的遺伝子や Zfp580 等の遺伝子が調節されていることが明らかとなり、さらにこれらの遺伝子が血管形成において重要な機能を持つことも示された。現在は、これらの結果を報告する論文を執筆中である。以下にその実験結果を記載する。

クロマチンリモデリングファクター (Chd8) の血管形成における機能解析

概要

血管形成において血管内皮細胞は主要な役割を担っており、VEGF をはじめとする様々な成長因子や細胞外基質により細胞分裂、遊走、細胞間接着が緻密に制御されている。さらに、血管内皮細胞は、組織また発生段階により異なる遺伝子発現パターンを持つことが明らかとなり、また、その制御にヒストン修飾などによってクロマチンの構造が変化するエピジェネティックな機構が関与していることが明らかにされつつある。本研究では、クロマチンの構造を変化させる機能を持つ Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 8 (Chd8) に着目し、血管形成における機能を解明する。

1) Pdgfb-Ert2Cre;flox-Chd8-flox マウスを用いた網膜血管発生の解析

網膜血管形成はマウスの生後直後に開始され、血管網の形成を三次元的に観察することできる非常に有用なモデルである。本研究では血管内皮細胞特異的に Chd8 をノックアウトするため、Pdgfb-Ert2Cre;flox-Chd8-flox マウスを作製し、生後 1-3 日間タモキシフェンを投与し、生後 5-15 日で網膜血管の形成を観察した。その結果、Chd8 ノックアウトマウスは網膜血管の長さ、密度、血管分岐数が減少し、低形成を示した (図 1)。また、網膜内皮細胞の細胞分裂が Chd8 ノックアウトでは有意に減少していることが観察された (図 2)。マウス脳血管の観察でも、Chd8 ノックアウトでは血管数が減少していた。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞及びヒト網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* の実験では、shChd8 レンチウイルスを導入し CHD8 をノックダウンした細胞では、細胞分裂の減少と、細胞遊走能の低下が観察された。これらのことから、Chd8 は内皮細胞

による血管形成において重要な因子であることが考えられ、また血管内皮細胞の細胞分裂や遊走に関与していることが示唆された。

図 1. 内皮細胞特異的 Chd8 ノックアウトマウスにおける網膜血管の低形成

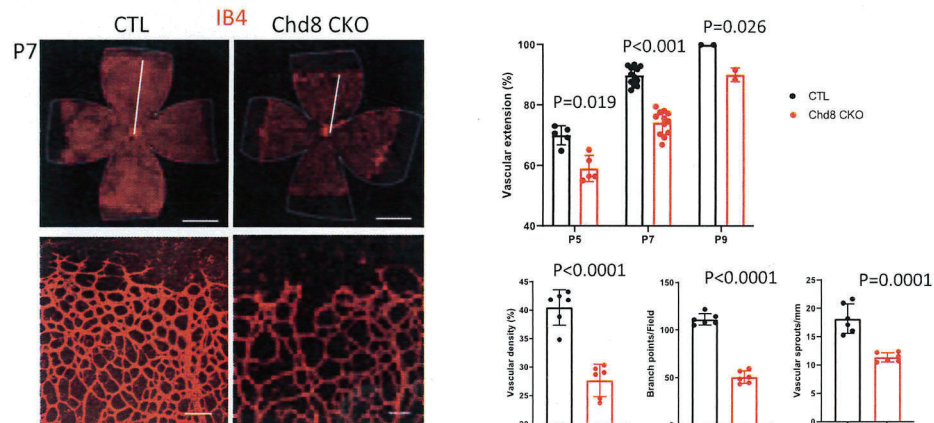


図 2. 網膜内皮細胞の EdU 染色

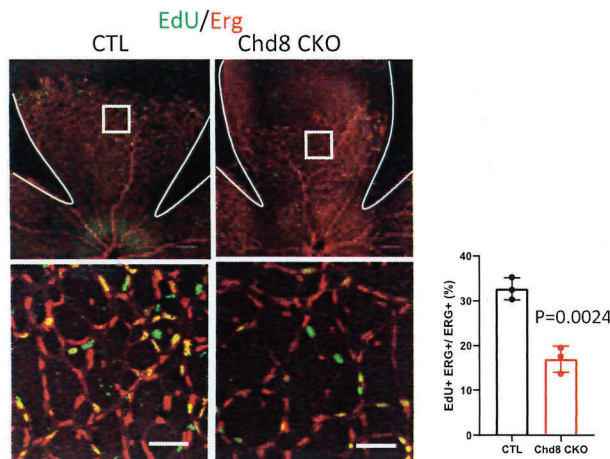
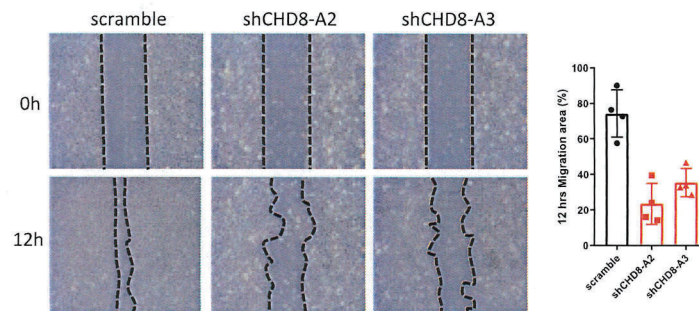


図 3. ヒト臍帯静脈内皮細胞による遊走実験



2) Chd8 のクロマチンリモデリング機構、遺伝子発現制御機構の解析

Chd8 は ATP-dependent に helicase 活性を持ち、クロモソームをスライドさせることでクロマチン構造を変化させることがわかっている。内皮細胞においても Chd8 がクロマチン構造を変化させることで複数の遺伝子発現の転写制御部位の accessibility を変化させ、その発現を制御していることが考えられた。そこで、Chd8 の標的遺伝子の同定と Chromatin accessibility の変化を解析するために、コントロールマウスとノックアウトマウスから内皮細胞を抽出し、RNA-seq、ChIP-seq および ATAC-seq を行った。RNA-seq の KEGG 解析では、Chd8 ノックアウト内皮細胞では p21 等の p53 標的遺伝子、Ribosome、Cell cycle に関わる遺伝子発現が大きく変化していた (図 4)。特に、Cdkn1a (p21) などの DNA damage や cell cycle arrest に関与する複数の遺伝子が Chd8 ノックアウトでは大きく上昇していた。さらに、これらの遺伝子が Chd8 の直接の標的遺伝子であるかを確かめるため、血管内皮細胞を用いて ChIP-seq を行ったところ、RNA-seq により有意に発現が変化していた遺伝子 657 個のうち、132 個で Chd8 の直接の結合がみられ、Cdkn1a、Gtsel、Trp53INP1、Zmat3 では遺伝子発現制御部位に Chd8 が結合していることが明らかになった。

(図5)。これらの遺伝子は p53 の標的遺伝子であり、また、細胞分裂を抑制する機能を有している。Chd8 をノックアウトした細胞ではこれらの遺伝子発現が上昇していたことから、Chd8 はこれらの遺伝子を直接抑制するはたらきがあると考えられる。Chd8 は p53 と相互作用を有することはすでに報告されている。本モデルにおいては、Chd8 が p53 の標的遺伝子である Cdkn1a、Gtse1、Trp53INP1、Zmat3 の遺伝子発現を抑制し細胞分裂を促進させることが明らかになった (図6)。

図4. 内皮細胞の RNA-seq 解析

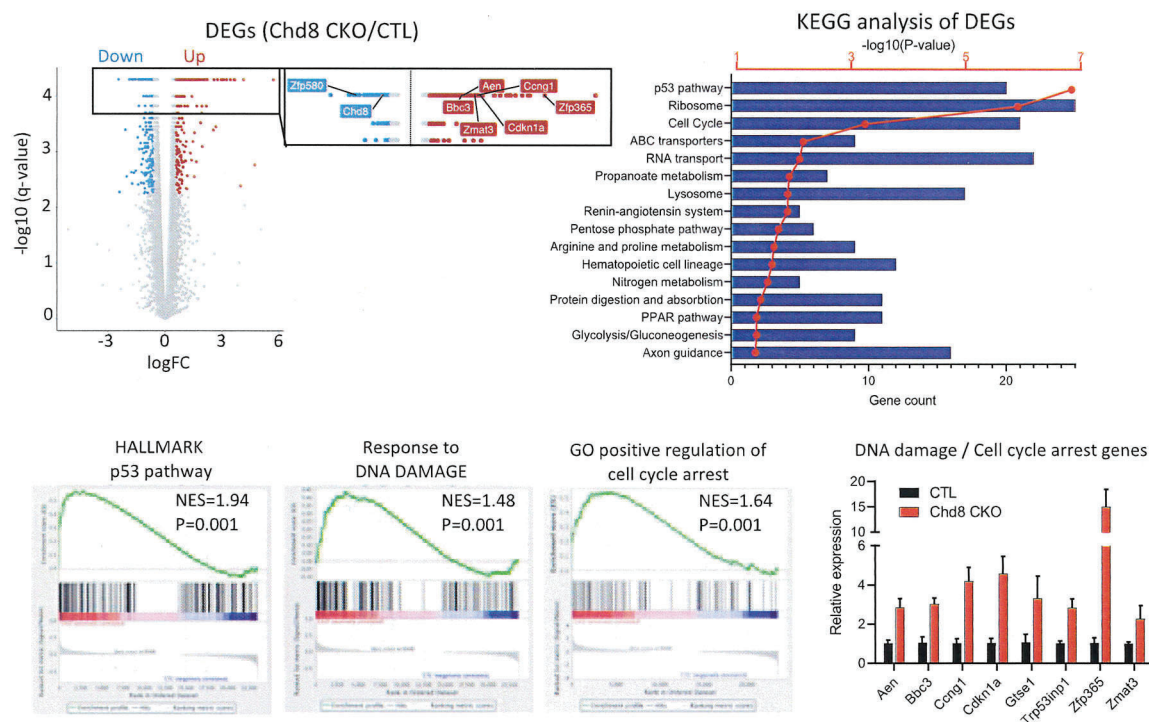


図5. 内皮細胞の ChIP-seq 解析

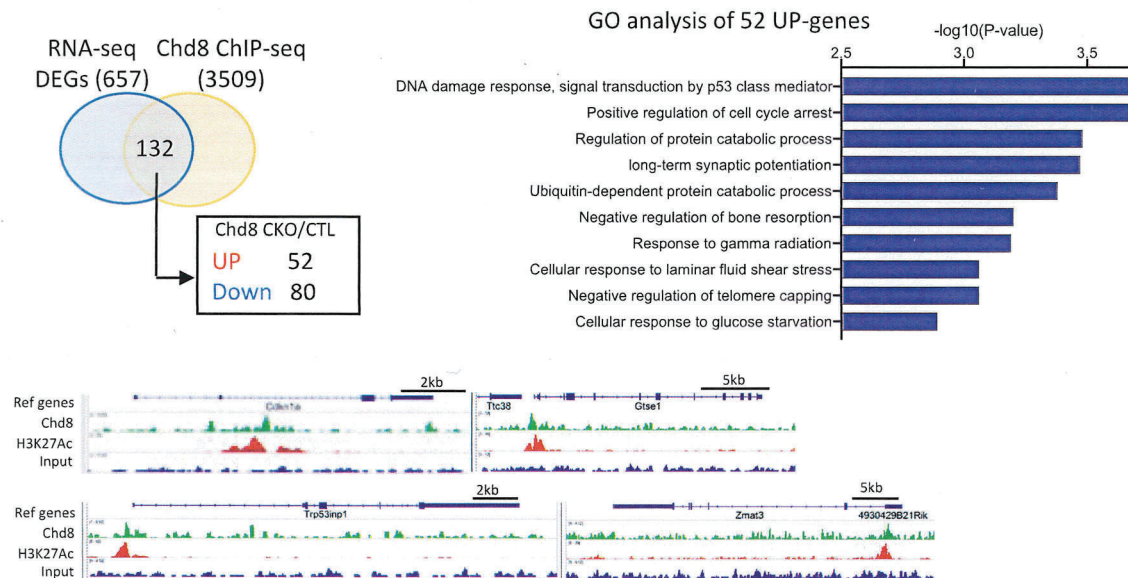
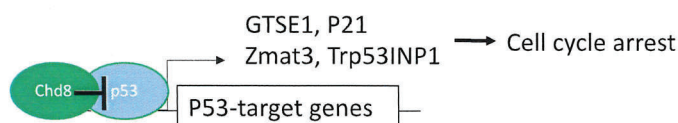


図6. Chd8 の p53 標的遺伝子抑制機能



3) Chd8/p53 ダブルノックアウトマウスの網膜血管解析

Chd8 ノックアウトでは p53 の標的遺伝子の発現が上昇し細胞分裂が抑制されることから、Chd8/p53 のダブルノックアウトマウスでは、p53 を抑制することで標的遺伝子の発現上昇が抑えられ、血管内皮細胞が正常に分裂することができる可能性が考えられた。これを確かめるために、p53^{fllox} マウスと掛け合わせ、血管内皮特異的に Chd8 と p53 をノックアウトできるマウスを

作製した。網膜血管を観察したところ、血管の密度や分岐数は Chd8 単独ノックアウトマウスに比べダブルノックアウトマウスでは有意に増加していた。一方で、血管の形成長は差が認められなかった。血管の密度や分岐数は、血管内皮細胞の細胞分裂により依存しているが、血管長は細胞遊走能により依存していると考えた。これらのことから、p53 を抑制することで、細胞分裂に関与する表現系である密度や分岐数を増加することができるが、細胞遊走に関しては不十分である可能性が示唆された。

4) *in vitro* Zfp580 過剰発現の解析

細胞遊走に関わる因子を探索するために、RNA-seq の解析を再検討したところ、Chd8 ノックアウトでは血管形成因子として知られる Fgfbpl、Nr2e1、Wnt7a、Zfp580 の発現が減少していることが明らかになった。特に Zfp580 は血管形成において内皮細胞の遊走に関わることが知られている。ChIP-seq では Chd8 が Zfp580 に直接結合し、また Chd8 をノックアウトすると、Zfp580 の転写開始点の Chromatin Accessibility が顕著に低下していることが明らかになった (図 7)。これらのことから、Chd8 は Zfp580 の転写開始転点に直接結合しクロマチン構造をオープンさせることで遺伝子発現を促進していることが考えられる。

さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、Chd8 ノックダウン細胞に Zfp580 を過剰発現させたところ、細胞遊走能の上昇がみられた。これらのことから、Chd8 は Zfp580 の発現を増加させ、内皮細胞の遊走を促進していることが明らかになった。

図 7. Zfp580 遺伝子領域の ATAC-seq および Chd8 の ChIP-seq 解析

