

論文の内容の要旨

論文題目 血管新生におけるヒストン脱メチル化酵素 KDM2B の機能解析

氏名 佐々木裕司

血管新生は血管が組織や臓器に酸素や栄養を運び、異物を除去し生理的な恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている。通常は周囲の環境に合わせて血管作動性物質の放出や凝固・線溶系、血管透過性増殖の調節を行うことで血管恒常性が保たれているが、低酸素や炎症によって VEGF が過剰に産生され異常活性化状態となり血管新生が過剰に亢進することで腫瘍の増殖や増殖性糖尿病性網膜症や加齢黄斑変性といった病的な血管新生が起こる。これまで数多くの抗 VEGF 薬が臨床で使用され、多くの固形癌や増殖性糖尿病性網膜症に対して効果を有する一方で、正常な血管や内皮細胞で生理的に機能している VEGF シグナルをも阻害するため出血や血栓症といった有害事象を認めている。そのため、生理的な血管新生を阻害せずに病的な血管新生のみを特異的に阻害する新規薬の開発が求められている。エピジェネティクスは遺伝子の転写制御に関わっており、このエピジェネティクスの異常によって、がんや糖尿病・動脈硬化・生活習慣病など多くの病気の原因となることが報告されている。今回、私はエピジェネティクスが病的な血管新生に関与しているという仮説を立てて研究を行った。

最初に、血管内皮細胞における VEGF 刺激下で活性化する転写調節機構を網羅的に解析するために、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対して VEGF(50ng/mL) で 1 時間、4 時間刺激した後に mRNA を抽出し、RNA-seq で解析を行った。その結果、TPM

(Transcripts per kilobase million) が VEGF 刺激によってコントロールと比較して 5 倍以上に増加した 85 個の遺伝子を同定した。VEGF 刺激 1 時間後に TPM が最大となった 57 個の遺伝子を早期誘導遺伝子群、また VEGF 刺激 4 時間後に発現量が最大となった 28 個の遺伝子を中期誘導遺伝子群と分類したところ、EGR (Early growth response protein) ファミリー、NR4A (Nuclear receptor subfamily 4, group A) ファミリーといった腫瘍血管新生に重要な転写因子群は早期誘導遺伝子群に分類された。

次に VEGF 刺激下における HUVEC のヒストン修飾の変化を網羅的に調べる為に活性型ヒストン修飾である H3K4me3、H3K27ac、H3K36me3 および、抑制性ヒストン修飾である H3K9me3、H3K27me3、H2A119Ub の ChIP-seq を行った。その結果、活性型ヒストン修飾では EGR2、EGR3、NR4A2、NR4A3、FOS、JUNB といった血管新生に関連する遺伝子座において H3K4me3 および H3K36me3 において VEGF 刺激 60 分でシグナル強度の上昇を認めたが、H3K27ac はあまり変化を認めなかった。抑制性ヒストン修飾においては、H2A119Ub では血管新生関連遺伝子座において VEGF 刺激 15 分で抑制が解除され VEGF 刺激 60 分後にはシグナルが元に戻っていた一方で H3K9me3、H3K27me3 では VEGF 刺激によってシグナル強度の変化はほとんどみられなかった。ヒストン脱メチル

化酵素 KDM2B (LysineDemethylase2B) は H3K4me3、H3K36me3 の脱メチル化酵素であり、また、KDM2B を含むヒストン修飾複合体 PRC1.1 は H2A119 のユビキチン化に関与していることが知られている。以上の結果から、VEGF による血管内皮の遺伝子変化に介在する因子として KDM2B に着目した。

KDM2B が血管新生に与えている影響を調べるために、KDM2B を 2 種類の siRNA (siKDM2B#1、siKDM2B#2) を用いてノックダウンさせ、HUVEC における VEGF 刺激時の mRNA の定量化を行った。定量 PCR によるノックダウン効率は siKDM2B#1 では 98.4%、siKDM2B#2 では 97.7%であった。VEGF 刺激はそれぞれ 1 時間、及び 4 時間行ったところ、血管新生関連遺伝子の mRNA 発現量は VEGF 刺激 1 時間後に 100 倍~1000 倍以上に上昇し、4 時間後には元のレベルに戻った。また、これらの遺伝子における VEGF 刺激 1 時間後の発現量の上昇は KDM2B のノックダウンにより EGR2 で 1.37 倍、EGR3 で 1.82 倍、NR4A2 で 2.80 倍、NR4A3 で 2.02 倍に増加し、有意に上昇を認めた。この結果から KDM2B が血管新生関連遺伝子に影響を与えている可能性が示された。

VEGF 刺激によって早期誘導される遺伝子に与えている KDM2B の影響を網羅的に調べるために、HUVEC に対し KDM2B の 2 種類の siRNA をトランスフェクションしノックダウンさせ、VEGF 刺激をそれぞれ 1 時間行い、RNA-seq を行った。VEGF 刺激で早期誘導される 57 個の遺伝子について VEGF1 時間刺激時の foldchange (FC) を調べたところ、コントロールに対して、2 種類の siRNA に共通して KDM2B ノックダウンによって FC が上昇した遺伝子は 41 遺伝子であり、また、腫瘍血管新生に重要な遺伝子群は 2 種類の siRNA に共通して FC は上昇していた。このことから KDM2B が腫瘍血管新生遺伝子に抑制的に作用していることが示唆された

in vitro において VEGF 刺激下での KDM2B の血管新生の表現型に与える影響を調べる為に、チューブフォーメーション、スクラッチアッセイ、増殖アッセイを行った。チューブフォーメーションでは HUVEC に対して 2 種類の siRNA をトランスフェクションし KDM2B をノックダウンさせたのちに VEGF を投与し、24 時間後のチューブ形成を観察したところ、チューブの長さの総計は siKDM2B#1 で 36.5%、siKDM2B#2 で 27.3%増加し、分岐数は siKDM2B#1 で 50.5%、siKDM2B#2 で 20.9%増加し、いずれも有意に増加した。スクラッチアッセイでは 1 視野当たりの細胞の占める面積を用いて細胞の移動を評価したところ細胞面積は siKDM2B#1 で 23.9%、siKDM2B#2 で 35.0%増加し、いずれも有意に増大していた。増殖アッセイでは VEGF 刺激後 48 時間の細胞数をカウントしたところコントロール群において VEGF 刺激により細胞数は 2.48 倍に増加しており、また、KDM2B ノックダウンによって VEGF 刺激なしの細胞数は 2.19 倍、VEGF 刺激ありの細胞数は 1.51 倍に増加し、いずれも有意に増加を認めた。以上の結果から、KDM2B のノックダウンは VEGF 刺激下の HUVEC の血管新生を有意に亢進させることが判明した。

次に、KDM2B の過剰発現系を構築するためにクローニングを行った。KDM2B の全長は 4kb と長く 1 回の PCR では全長を増幅することができなかったため、上流と下流の 2 つ

に分けて PCR で増幅した。上流を KDM2Ba、下流を KDM2Bb とし、それぞれ TOPO-Blunt に組み込んだ。次に Flag タグを付加するために KDM2Ba と KDM2Bb をそれぞれ PCR で In-Fusion プライマーを付加して増幅し、3XFLAG のプラスミドと共に In-Fusion を行い KDM2B の全長を組み込んだ 3XFLAG 付きのプラスミドベクターを作成した。次にアデノウイルス発現ベクターを作製するためのエントリーベクターである pENTR4 に 3XFLAG 付きの KDM2B を In-Fusion を用いて挿入し、その後 LR クロナーゼ反応を用いた組み換えによってアデノウイルス発現ベクターである pAd/CMV/DEST に乗せ換えた。このベクターを HUVEC にトランスダクションしてウェスタンブロットで評価したところ MOI100 で過剰発現していることを確認した。

adeno-KDM2B によって KDM2B を過剰発現した HUVEC における、VEGF 刺激時の影響を調べるために、mRNA の定量化を行った。定量 PCR による KDM2B の発現量は KDM2B の過剰発現によって 10 倍程度上昇していた。血管新生関連遺伝子の mRNA 発現量が最大となる VEGF 刺激 1 時間後において、EGR2 で 66.6% の EGR3 で 82.8% の減少、NR4A2 で 57.8% の減少と著明な発現量の減少を認めた。この結果は KDM2B をノックダウンした時の結果と逆であり、KDM2B が血管新生遺伝子に抑制的に作用していることが強く示唆された。

KDM2B の過剰発現が VEGF 刺激によって誘導される遺伝子に与える影響を網羅的に調べるため RNA-seq を行ったところ、VEGF 刺激によって TPM がコントロールと比較して 5 倍以上に増加した遺伝子は 105 遺伝子であり、うち 72 遺伝子が VEGF 刺激 1 時間後に TPM が最大となる早期誘導遺伝子であった。これらの遺伝子のコントロールに対する VEGF1 時間後の FC を調べたところ、90.2% にあたる 65 遺伝子が KDM2B の過剰発現によって FC が減少しており、KDM2B が VEGF 刺激で早期誘導される遺伝子に強く関与していることが確認できた。次に KDM2B ノックダウンによって FC が上昇した早期誘導遺伝子 41 個と KDM2B 過剰発現によって FC が低下した早期誘導遺伝子 65 個を比較したところ、31 遺伝子が共通しており、EGR1~3、NR4A2、NR4A3 といった腫瘍血管新生に重要な役割を果たしている早期誘導遺伝子群を含んでいた。また、これら 31 遺伝子を対象に Gene Ontology 解析を行ったところ、炎症や血管に関わる遺伝子を有意に多く含んでいた。

KDM2B を過剰発現させた際の血管新生の表現型への影響を観察するために、チューブフォーメーション、スクラッチアッセイ、増殖アッセイを行った。チューブフォーメーションアッセイでは HUVEC に対して KDM2B のアデノベクターを感染させて過剰発現させたのちに VEGF を投与し 24 時間後のチューブ形成を観察したところ、チューブの長さの総計は 23.2%、分岐数は 24.3% 減少し、いずれも有意に減少した。スクラッチアッセイにおいても同様に、アデノベクターを用いて KDM2B を過剰発現させたのちに VEGF を投与し、24 時間後の細胞の移動を評価したところ KDM2B の過剰発現によって 1 視野当たりの細胞の面積は 9.8% の減少を認めたが、有意差は認めなかった。増殖アッセイにお

いては、VEGF 刺激 48 時間後に細胞数をカウントしたところ、KDM2B 過剰発現によりコントロール群で 16.5%、VEGF 刺激群において 37.1%の有意な細胞数の減少を認めました。これらの結果より KDM2B の過剰発現が内皮細胞における血管新生に抑制的に作用していることが判明した。

以上より、KDM2B の血管内皮細胞における血管新生に対しての影響を調べ、KDM2B が抑制的に作用していることを示した。VEGF 刺激によって KDM2B が関与している複数のヒストン修飾変化が起き、また KDM2B が腫瘍血管新生関連遺伝子の調節を通して *in vitro* の表現型においても実際に血管新生に抑制的に作用していることを示した。本研究は VEGF 刺激時における KDM2B の血管新生との関連を示した初めての報告であり、KDM2B ががん治療などの新たな治療標的となる可能性が示唆された。