

血管内皮細胞における Hey1 遺伝子エンハンサー制御機構と機能

[1] 組織

代表者：渡邊 裕介
(国立循環器病研究センター、研究所)
対応者：久保 純
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：中川 修
(国立循環器病研究センター、研究所)

研究費：物品費 136,860 円
旅費 63,140 円

[2] 研究経過

研究代表者らは、血管内皮細胞での Hey1 発現が鎖骨下動脈・大動脈弓といった胸部大血管発生の形成に不可欠であることを見出している。また、現在までの久保助教との共同研究により Hey1 遺伝子上流域に血管内皮エンハンサー領域を同定し、その Notch シグナリング応答性を明らかにしてきた(未発表データ)。本年度は、同定した Hey1 血管内皮エンハンサー機能の解明を目的とした。

研究代表者、協力者および受け入れ先教員である久保助教のこれまでの解析により、マウス胚における Hey1 血管内皮エンハンサーが遺伝子上流域に存在することを突き止めている。本年度は、Hey1 血管内皮エンハンサーの機能を明らかにするため、Hey1 血管内皮エンハンサーの欠失マウスを作製した。また、Hey1 血管内皮エンハンサーの活性をマウス胚で観察するため、Hey1 血管内皮エンハンサー-EGFP Tg マウス系統を作製した。さらに、剪断応力に対する Hey1 血管内皮エンハンサーの転写活性化能をルシフェラーゼレポーターにより解析した。これら実験状況、計画について、昨年5月に研究代表者が加齢医学研究所を訪問して詳細な情報交換と打ち合わせを行った。

[3] 成果

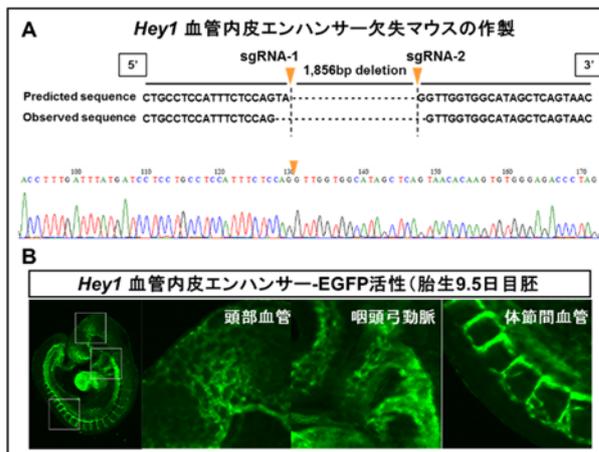
(3-1) 研究成果

本年度は以下に示す研究成果を得た。

1、Hey1 血管内皮エンハンサー欠失マウスの作製。
Hey1 遺伝子上流域に存在する血管内皮エンハンサーを欠失させたマウスをCRISPR/Cas9 ゲノム編集法により作製することを試みた。その結果、F0 マウス世代に

て Hey1 血管内皮エンハンサー欠失マウスを 20/33 個体で得ることができた(図A)。

2、Hey1 血管内皮エンハンサー-EGFP Tg マウスの作製。
Hey1 遺伝子上流域に存在する血管内皮エンハンサーに EGFP レポーターを繋げたコンストラクトのトランスジェニック(Tg)マウス系統を作製した。その結果、Tg マウス胚において頭部血管、咽頭弓動脈、体節間血管などにおいて EGFP の蛍光を観察し、Hey1 血管内皮エンハンサーが中大動脈の血管内皮において転写活性を示していることを明らかにした(図B)。



3. Hey1 血管内皮エンハンサーの剪断応力応答性解析。
Hey1 遺伝子上流域に存在する血管内皮エンハンサーにルシフェラーゼレポーターを繋げたコンストラクトを作製し、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にエレクトロポレーション法により導入した。HUVEC に対して1時間、2Paの剪断応力を負荷した後、細胞からRNAを単離し、Hey1 遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子発現をqPCRにより解析した。その結果、Hey1 遺伝子は剪断応力負荷により発現上昇していたが、ルシフェラーゼ遺伝子は発現変化していなかった。この結果により、Hey1 遺伝子の剪断応力応答を担う転写調節領域は、血管内皮エンハンサーとは別の領域に存在することが明らかとなった。

(3-2) 波及効果と発展性など

血管内皮での Hey1 発現は胸部大血管形成において必須であるため、本申請研究によって得られる結果は、大血管系の形態形成機構の理解、さらにはヒト先天性心疾患(22q.11.2症候群など)で頻発する大動脈弓離断症などの病態解明へと繋がることが期待される。

[4] 成果資料

学会等発表

一般講演 (口頭発表)

1. Yusuke WATANABE, Toshiharu FUKAYAMA, Shuhei ISHII, Taiki Uemoto, Masahide FUJITA, Yoshie ISOMOTO, Yuji ARAI, Atsushi KUBO, Hiroyuki YAMAGISHI, Osamu NAKAGAWA.

Significance of Hey1 transcription factor in pharyngeal arch artery formation and regulatory mechanisms of its expression during embryonic development.

Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2018、2018年5月17日、奈良市

2. Yusuke WATANABE, Shuhei ISHII, Taiki UEMOTO, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA

Significance of the Hey family of transcription factors during cardiovascular development

International Vascular Biology Meeting 2018 2018年6月5日 Helsinki, Finland

3. Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Yukihiro HARADA, Norika Liu, Toru TANAKA, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA.

Transcriptional regulation and physiological significance of BMP-ALK1 signal target genes in embryonic vascular endothelial cell.

12th International BMP Conference 2018 2018年10月24日 東京都

4. 西谷-中村友重、渡邊裕介、瀬谷大貴、田中亨、中川修

Hey 転写調節因子ファミリーの胎生期血管形成における細胞特異的意義の解析

第26回日本血管生物医学会学術集会 2018年12月8日 東京都

一般講演 (ポスター発表)

5. 中川修、原田恭弘、田中亨、久光隆、片山由美、川村晃久、渡邊裕介

BMP-ALK1 シグナル伝達系の新しい下流遺伝子としての Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) の意義

第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2018年4月28日、宮崎市

6. Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Takashi HISAMITSU, Ayaka TOMIMATSU, Koichi NISHIYAMA, Teruhisa KAWAMURA, Yoshihiko SAITO.

Transcriptional regulation and physiological significance of novel downstream target genes of BMP-ALK1 signaling in embryonic vascular endothelial cells.

Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2018、2018年5月17日、奈良市

7. Dai IHARA, Yusuke WATANABE, Daiki SEYA, Yukihiro HARADA, Osamu NAKAGAWA, Teruhisa KAWAMURA.

The mechanism of Hey2 expression in cardiac development.

23rd Annual Scientific Meeting of International Society of Cardiovascular Pharmacology、2018年5月26日、京都市

8. Yukihiro Harada, Yusuke Watanabe, Toru Tanaka, Dai Ihara, Osamu Nakagawa, Teruhisa Kawamura SGK1 as a novel transcriptional target of BMP-ALK1 signaling in vascular endothelial cells.

23rd Annual Scientific Meeting of International Society of Cardiovascular Pharmacology、2018年5月26日、京都市

9. Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Koichi NISHIYAMA, Teruhisa KAWAMURA, Yusuke WATANABE, Osamu NAKAGAWA.

Transcriptional regulation and physiological significance of novel BMP-ALK1 signal target genes in vascular endothelial cells.

International Vascular Biology Meeting 2018 2018年6月5日 Helsinki, Finland

10. Yusuke WATANABE, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA.

Significance of Hey transcriptional factors in endothelial cells during cardiovascular development.

日本血管生物医学会 第16回 Korea-Japan Joint Symposium 2018年9月14日 吹田市

11. Yusuke WATANABE, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA.

Significance of Hey transcriptional factors in endothelial cells during cardiovascular development.

日本循環器学会 第2回 Basic Cardiovascular Research Conference 2018年9月22日 奈良市