

論文題目 A zinc finger transcription factor  $\delta$ EF1/ZEB1 controls vascular smooth muscle cell differentiation

和訳 ジンクフィンガー転写因子 $\delta$ EF1/ZEB1 による血管平滑筋細胞の分化調節

指導教官 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 西村 剛

血管平滑筋細胞は血管の発生・分化および動脈硬化を始めとする血管疾患の形成において重要な役割を果たす。成熟した血管における平滑筋細胞は収縮に特化した機能を示すが、血管病態や血管形成の過程では大きく異なった機能・形質を示す。この相違は分化度の違いと捉えることができ、平滑筋細胞分化の分子機構を明らかとすることは血管分化・病態の解明に重要である。ところが、血管平滑筋細胞の分化状態を調節する分子機構には、未だ不明な点が多く残されている。今回私は血管平滑筋細胞で機能する新しいジンクフィンガー(zinc finger)をもつ転写因子として $\delta$ EF1/ZEB1 を同定した。さらにその血管平滑筋細胞機能調節における役割を血管分化及び病態について *in vitro*・*in vivo* の両面から解明した。

私は心血管系で機能する可能性のあるジンクフィンガー型転写因子をデータベースで検索し、 $\delta$ EF1 を見出した。 $\delta$ EF1 はジンクフィンガーをアミノ基末端側に 4 つ、カルボキシル基末端側に 3 つ持ち、その間にホメオドメイン (homeo domain) を持つ 170kDa の転写因子で、マウス胎児では胎生 8.5 日に頭側ヒダ、中胚葉に発現し、9.5 日には頭部神経堤細胞・四肢原基に発現する。従来の研究では転写抑制作用を持つと報告されている。一部の血管平滑筋細胞は神経堤細胞から発生することから、 $\delta$ EF1 が血管平滑筋細胞で機能する可能性が推測されるが、詳しい研究および報告は行われていない。

まず、その分布を調べるため、ラット成体から得た RNA でノーザンブロットを行った。 $\delta$ EF1 は、心臓、大動脈及び頸動脈、脳、骨格筋、肺に発現するが、小腸、胃、膀胱には発現していなかった。すなわち、血管平滑筋細胞を多く含む臓器に発現するが、それ以外の、内臓平滑筋細胞で構成された臓器には、あまり発現していないと考えられた。

次にラット頸動脈の免疫染色により血管構造内での分布を調べた。健常頸動脈では、 $\delta$ EF1

は、中膜平滑筋層に分布した。バルーン傷害後2週間の新生内膜が形成された頸動脈では、 $\delta$ EF1 は、中膜平滑筋層に分布しているが、新生内膜にはほとんど検出されなかった。この時期の新生内膜は平滑筋細胞で構成されているが未分化な平滑筋細胞が多く存在することが報告されている。

血管平滑筋細胞は、分化に伴って収縮蛋白の発現を変え、未分化で、非平滑筋ミオシン重鎖 B/SMemb を発現している状態から、平滑筋 $\alpha$ -アクチン、SM22 $\alpha$ 、平滑筋ミオシン重鎖を発現する状態へと変わっていく。このような分化の指標となる遺伝子を用いて $\delta$ EF1 と平滑筋分化との関係を検討した。

レチノイン酸刺激により平滑筋細胞へ分化する胎児性癌細胞 P19 の一列、A404 細胞でその発現を調べたところ、その分化の過程において $\delta$ EF1 の発現が増加した。この $\delta$ EF1 の発現増加は平滑筋細胞の分化の指標である平滑筋 $\alpha$ -アクチン、平滑筋ミオシン重鎖の発現に先駆けて見られた。

$\delta$ EF1 の転写調節作用を、培養平滑筋細胞におけるプロモーターアッセイで調べたところ、 $\delta$ EF1 は平滑筋 $\alpha$ -アクチン、平滑筋ミオシン重鎖、SM22 $\alpha$ のプロモーターを活性化するが、未分化平滑筋細胞の指標である SMemb のプロモーターには影響を与えなかった。更に内因性の遺伝子に対する転写調節作用について、 $\delta$ EF1 発現アデノウイルスベクターを培養平滑筋細胞に感染させ調べたところ、内因性の平滑筋ミオシン重鎖・平滑筋 $\alpha$ -アクチンの発現増加が見られた。

この $\delta$ EF1 の、平滑筋分化に対する作用を *in vivo* でも検証するため、 $\delta$ EF1 ノックアウトマウスの大動脈から RNA を抽出し、 $\delta$ EF1 および平滑筋分化指標遺伝子の発現を調べた。ホモ接合体の $\delta$ EF1 ノックアウトマウスは心血管系に大きな異常を認めないが、生後間もなく死亡するため、胎生 18.5 日の胎児から大動脈を採取した。胎児の大動脈では、平滑筋ミオシン重鎖、平滑筋 $\alpha$ -アクチン、SM22 $\alpha$ いずれもノックアウトマウスにおいて野生型マウスより発現が減少していた。対して未分化平滑筋細胞の指標である SMemb はノックアウトマウスで発現が増加しており、 $\delta$ EF1 の発現減少は生体においても平滑筋細胞を未分化な状態にすると考えられた。野生型マウスの胎児・成体で $\delta$ EF1 の発現を比較すると $\delta$ EF1 は成体において胎児より多く発現しており、その発現が発達の比較的后期に見られるという特徴が示唆された。

以上の所見から、 $\delta$ EF1 が平滑筋細胞の分化に強く関与することが考えられ、次いで私は、平滑筋細胞の分化指標遺伝子の転写活性化メカニズムに注目し研究を進めた。

まず、平滑筋ミオシン重鎖プロモーターで $\delta$ EF1 作用部位を調べた。平滑筋ミオシン重鎖の転写調節領域を順次切断し、 $\delta$ EF1 との反応性を調べても、明確な反応性の違いは生じず、転写開始点近傍のみでも $\delta$ EF1 への反応性を保持していた。この転写開始点近傍の領域には、 $\delta$ EF1 が強い親和性を示すと報告されている CACCTG 配列の E box と CACCT という配列があ

り、この部分に変異を導入すると $\delta$ EF1 の転写促進作用が減弱した。ゲルシフトアッセイ (EMSA)で $\delta$ EF1 は、この E box ならびに CACCT 配列に特異的な結合を示した。

つづいて平滑筋 $\alpha$ -アクチンのプロモーター上で $\delta$ EF1 の作用部位を探した。プロモーターと第一イントロンを含む転写調節領域を順次切断し $\delta$ EF1 への反応性を調べたところ、転写開始点より 271 塩基上流から 155 塩基上流までに $\delta$ EF1 が強く作用する部位があると考えられた。この領域に $\delta$ EF1 の結合が報告されている配列はなかったが THR (TGF- $\beta$ 1 hypersensitivity region)と呼ばれる部位に変異を導入すると $\delta$ EF1 による転写促進作用が大きく損なわれた。ゲルシフトアッセイで、 $\delta$ EF1 はこの部位に結合した。

平滑筋 $\alpha$ -アクチンプロモーターは転写開始点より 155 塩基上流からの短い領域でも $\delta$ EF1 により活性化される。この領域は転写因子 serum response factor (SRF)の結合配列として知られる CArG エlementを有しており、SRF は平滑筋細胞における遺伝子発現の多くに関与することが報告されている。この CArG エlementに変異を導入すると $\delta$ EF1 への反応性が失われることから、 $\delta$ EF1 の作用が CArG エlementを介するものであると考えられ、更に SRF と $\delta$ EF1 の相互作用が推測された。そこで SRF と $\delta$ EF1 が相互作用するとの仮説について更に検討した。

平滑筋 $\alpha$ -アクチンプロモーターと SRF,  $\delta$ EF1 の発現ベクターで相互作用を調べたところ、SRF と $\delta$ EF1 は協調して平滑筋 $\alpha$ -アクチンプロモーターを活性化した。ゲルシフトアッセイでは、 $\delta$ EF1 単体は CArG エlementに結合しないが SRF と $\delta$ EF1 の共存下では複合体を形成し、CArG エlementに結合した。更に免疫沈降により SRF と $\delta$ EF1 の蛋白同士の結合が示され、 $\delta$ EF1 と SRF との結合部位を調べたところ、 $\delta$ EF1 のカルボキシル基側のジンクフィンガードメインが結合に関与するとの所見が得られた。

$\delta$ EF1 の平滑筋 $\alpha$ -アクチンプロモーター上の結合部位と考えた THR は TGF- $\beta$ 1 に対する反応性を司る部位と報告されている。TGF- $\beta$ は多分可能を持つ神経堤細胞に平滑筋 $\alpha$ -アクチンを発現させ、平滑筋細胞への分化を誘導するとの報告があり、血管の発達および血管疾患形成において平滑筋の分化・増殖に強く関与することが示されている。平滑筋細胞において $\delta$ EF1 が TGF- $\beta$ の作用に関与するか研究を進めた。

TGF- $\beta$ の信号を細胞内で伝達する主要要素である Smad 蛋白の一つ Smad3 と $\delta$ EF1 の相互作用を平滑筋 $\alpha$ -アクチンプロモーターで調べたところ、Smad3 は $\delta$ EF1 と協調して平滑筋 $\alpha$ -アクチンプロモーターを活性化し、この作用は活性化型 TGF- $\beta$  type1 receptor (ALK5)の存在により更に増幅された。逆に、抑制作用を示す Smad の一つ Smad7 は $\delta$ EF1 の転写促進作用を阻害した。SRF も TGF- $\beta$ の作用に関与することが言われており、SRF, Smad3,  $\delta$ EF1 三者の相互作用を平滑筋 $\alpha$ -アクチンのプロモーターで調べたところ、SRF と Smad3, SRF と $\delta$ EF1, Smad3 と $\delta$ EF1 相互間の協調作用に加え、更なる転写活性化作用が三者共存と活性化型 ALK5 の存在により認められた。

TGF- $\beta$ の平滑筋細胞における作用への $\delta$ EF1 の関与を直接的に見るため、RNA 干渉 (siRNA)によって、培養平滑筋細胞中の $\delta$ EF1 の発現を抑制した状態で、TGF- $\beta$ 刺激を行った。 $\delta$ EF1 の発現を small interference RNA (siRNA) で抑制した細胞では、非特異的配列の siRNA を導入した細胞に比べて TGF- $\beta$ による平滑筋 $\alpha$ -アクチン発現の誘導が損なわれていた。

次に、 $\delta$ EF1 の血管平滑筋細胞分化誘導作用を、血管疾患形成の病態においても検討するため、ラットの頸動脈をバルーンで傷害した後、血管内腔に $\delta$ EF1 アデノウイルスベクターを注入し $\delta$ EF1 を強制発現させた。この $\delta$ EF1 を強制発現させた頸動脈では、バルーン傷害後、コントロールとなる強制発現遺伝子を持たないアデノウイルスを注入した頸動脈に比べて有意に新生内膜の形成が抑制されていた。この頸動脈から抽出した RNA を調べたところ、 $\delta$ EF1 を強制発現させた頸動脈では、平滑筋ミオシン重鎖の、より分化した平滑筋細胞に発現する isoform である SM2 の発現が誘導されていた。

逆に $\delta$ EF1 のノックアウトマウスで大腿動脈ガイドワイヤー傷害モデルを作ったところ、 $\delta$ EF1 のヘテロノックアウトマウスでは新生内膜の形成が野生型マウスと比べ有意に多かった。

以上、本研究により私は転写因子 $\delta$ EF1 が、平滑筋細胞において、転写因子 SRF 及び Smad と相互作用し、平滑筋分化を制御すること、 $\delta$ EF1 が血管発生・血管疾患形成において重要な役割を果たすサイトカインである TGF- $\beta$ の信号を伝達する役割を担っていることを解明した。このように、 $\delta$ EF1 は外的環境に応じた平滑筋分化、機能の制御に重要であり、血管病態モデルによって示されたように血管疾患においても重要な機能を担うことが明らかとなった。