

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号： 12601

研究種目： 若手研究（B）

研究期間： 2010 ～ 2011

課題番号： 22700875

研究課題名（和文） 内皮活性化転写因子 Egr-1、Egr-3 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of transcription factors Egr-1 and Egr-3 in VEGF activated endothelial cells

研究代表者 末弘 淳一（SUEHIRO JUNICHI）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号： 80572601

研究成果の概要（和文）：

血管内皮増殖因子により誘導される転写因子 Egr-1、Egr-3 は内皮活性化において中心的役割を果たす。Egr-1、Egr-3 遺伝子について siRNA を用いたマイクロアレイ・ChIP-seq 解析による標的遺伝子の網羅的探索を行ったところ、新規 Egr 標的遺伝子として Rho GTPase である RND1 を見出だした。RND1 遺伝子周辺の Egr 結合領域は転写開始点上流 25kb に存在し、レポータ解析からエンハンサーとして働いていることが示された。また、RND1 は転写因子 NFATc の制御下であり Egr/NFATc シグナルが内皮活性化において重要であることが示された。RND1 抑制下で内皮細胞の機能解析を行ったところ増殖、遊走、管腔形成、内皮バリア機能が損なわれた。個体レベルでの解析では Egr-3 抑制下では B16 メラノーマ固形腫瘍進展に障害が見られる一方、Egr-1 ノックアウトマウスにおいて野生型マウスと差異が認められず、in vivo における機能の差異が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Transcription factors, Egr-1 and Egr-3, play important roles in VEGF-activated endothelial cells. Here, I performed DNA microarray and ChIP-seq analysis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to find new targets. As a result, I found an Egr new target, Rho GTPase 1(RND1). Egr binding sites around RND1 gene located at 25kb upstream of TSS and functioned to enhance transcription. From ChIP-seq and reporter analysis, Egr and NFATc cooperatively contributed to VEGF-mediated RND1 expression. RND1 siRNA inhibited VEGF-mediated cell growth, migration, tube formation, and endothelial barrier function. In B16 melanoma solid tumor model, there were no differences between Egr-1 knockout and wildtype mice, while suppression of Egr-3 inhibited angiogenesis and tumor growth. Taken together, Egr/NFAT-mediated RND1 expression contributed to endothelial activation and there were functional differences between Egr-1 and Egr-3 in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：VEGF、Egr、ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

血管内膜を構成する内皮細胞は、その機能を絶えず変化させることにより環境に適応し、血管恒常性に寄与している。しかしながら、病的環境では異常活性化を引き起こすことで炎症を惹起し、動脈硬化、腫瘍血管新生、敗血症といった疾患を誘発する。これらの機能変化には遺伝子発現の変化を伴う。我々は炎症性刺激である VEGF、TNF- α 、Thrombin を臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に作用させ、早期に誘導されてくる遺伝子として Egr-1、Egr-3 を同定した。これら遺伝子の腫瘍血管新生における分子メカニズムは不明な点が多く、ファミリー間の機能を系統的に解析した例はない。

2. 研究の目的

本研究では内皮活性化における Egr-1、Egr-3 による転写活性化機構、及びそれらの差異を明らかとするため、マイクロアレイ、ChIP-seq 法による標的遺伝子の網羅的解析を行う。また、個体レベルでの機能解析を目的とし Egr-3 コンディショナルノックアウトマウス作製する。

3. 研究の方法

標的遺伝子の同定：

血管内皮細胞用培地 EGM-2 にて HUVEC を 6 ウェルプレート上に培養し、Lipofectamine 2000 を用いて 120pmol をトランスフェクションした。その後、血清除去のため 0.5% FBS を含む EBM-2 で一晚培養し、VEGF 刺激 1 時間で Trizol (invitrogen) にて RNA を回収した。その後、U133plus 2.0 マイクロアレイ (Affymetrix) にて解析を行った。

Egr-1、Egr-3 結合領域の網羅的探索：

Egr-1、Egr-3 強制発現アデノウイルスを感染率 MOI 1 で臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に感染させた。感染後 48 時間において 1% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、0.2M グリシンで 5 分間インキュベートし PBS で洗浄後サンプルを回収した。同様に、VEGF 刺激 1 時間の HUVEC でもサンプルを回収した。本研究室で作成した Egr-1、Egr-3 抗体 10ug をそれぞれ protein G sepharose ビーズ 50uL と 0.05mg/mL BSA を含む PBS において 4°C で 18 時間インキュベートした。サンプルを超音波破碎機 BRADSON SONIFER 250 (BRADSON) で 200-300bp となるよう破碎し、抗体ビーズ複合体と 4°C で 24 時間インキュベートした。その後、サンプルをバッフ

ァにて洗浄し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理し、エタノール沈殿後、30uL の nuclease free 水にて DNA を回収した。定量 PCR にて標的遺伝子上プロモータでの Egr-1、Egr-3 の濃縮を確認し、次世代高速シーケンサー-GAI (Illumina) にてゲノムワイドに結合領域の解析を行った。

標的遺伝子プロモータを用いたレポーターアッセイ：

EGR の標的遺伝子として見出した RND-1 のプロモータ (翻訳開始点から上流 1.9kbp) をクローニングし、pGL3 ルシフェラーゼ発現ベクターに組み込んだ。また、遺伝子の転写開始点から 25kb 上流の EGR 結合領域も同様にクローニングし、RND-1 プロモータに加えてルシフェラーゼ発現ベクターに組み込んだ。HEK293 細胞を 12 ウェルプレートに培養し、0.3ug の各種 pGL3 ベクター、internal control 用の pRL-SV40 ベクターを Fugene6 によりトランスフェクションした。48 時間後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) にてルシフェラーゼ活性を定量した。

標的遺伝子ノックダウン時の内皮細胞の機能解析：

Egr の標的遺伝子である RND-1 に対して 2 種の siRNA を HUVEC にトランスフェクションし、ノックダウンを行った。その後、細胞カウントによる増殖、wound healing assay による遊走、collagen tube formation assay による管腔形成、boyden chamber による内皮バリア機能の検討を行った。

Egr-3 コンディショナルノックアウトターゲットベクターの作製：

マウス Egr-3 の遺伝子上のジンクフィンガー領域 (Exon2) を除く形となるよう loxP 配列が 3' 領域、intron 領域に配置されるよう各種制限酵素を用いてコンストラクトを作製した。

ES ターゲティングとキメラマウスの作製：

Mitomycin C 処理した mouse embryonic fibroblast 上に ES 細胞を 1×10^3 unit の LIF 存在下で培養し、 1×10^7 個の細胞にターゲットベクターを 20ug エレクトロポレーションにて導入した。G418、FIAU 存在下でセレクションし、各コロニーについて PCR、サザンブロット法により相同組換えを確認した。

4. 研究成果

標的遺伝子の同定、機能解析：

Egr-1、**Egr-3** の新規標的遺伝子を見出すためそれぞれを標的とした siRNA を HUVEC にトランスフェクションし、マイクロアレイ解析を行った。その結果、VEGF 刺激後 1、4 時間において炎症性因子である **CXCL1**、**CCL20**、**E-selectin**、転写因子である **Ets-1**、**N-myc**、**PRDM1** が **Egr-1**、**Egr-3** siRNA によって抑制された。また、細胞接着に関わる **RND1** が顕著に抑制された (図 1)。次に、標的遺伝子の変化を時系列解析したところ、刺激後 1 時間の VEGF 誘導 260 遺伝子のうち、30% 以上抑制された遺伝子数は **Egr-1** siRNA により 49 遺伝子、**Egr-3** siRNA で 24 遺伝子であった。そのうち、14 遺伝子が共通標的であった。同様に刺激後 4 時間では、258 の誘導遺伝子のうち、**Egr-1** 抑制により 57 遺伝子、**Egr-3** 抑制により 95 遺伝子、共通のものとして 29 遺伝子が見出された (図 2)。タンパクレベルでの経時的発現パターンとして **Egr-1** は 1 時間、**Egr-3** は 2 時間をピークとした一過性発現を示すが (Suehiro J, Blood, 2010)、以上の標的遺伝子数はそれらの発現パターンに相関していた。

次に、**Egr-1**、**Egr-3** の結合遺伝子を見出すため ChIP-seq 解析を行った。**Egr-1**、**Egr-3** 結合遺伝子はゲノムワイドに見た場合に差異が認められず、多くが共通の制御下にあるものと類推された。

ChIP-seq 及びマイクロアレイ解析より、新規 **Egr** 標的遺伝子として **RND1** を見出した。**RND1** 遺伝子の転写開始点から 25kb の位置に **Egr** が結合するオープンクロマチン領域が存在し、遠隔的作用により転写を制御していることが推察された (図 3)。そこで **Egr** 結合領域、**RND1** プロモータをクローニングしレポータ解析を行ったところ、**Egr-3** 強制発現下で活性の上昇が見られた (図 3)。また、転写因子 **NFATc** のプロモータへの結合、活性の上昇も見られ、**Egr-3**、**NFATc** が協調して転写制御を行っていることが示された。内皮機能に対する **RND1** の寄与を検討するため、siRNA によりノックダウンし機能解析を行った。2 種類の異なる配列を標的とした siRNA を用いたところ、それぞれにおいて増殖・遊走・管腔形成が著しく損なわれた (図 4)。**RND1** の機能として、GTP 共役型として存在し p190 RhoGAP を介して RhoA の不活性化させると報告されているが、pull down assay により活性化型 RhoA を定量したところ、**RND1** ノックダウン時に GTP 型 RhoA が増加することが示された。**RhoA** を介した内皮細胞のバリア機能に影響することが推察されたことから、boyden chamber を用いた血管透過性の検討を行ったところ、**RND1** の非存在下で内皮バリア機能が著し

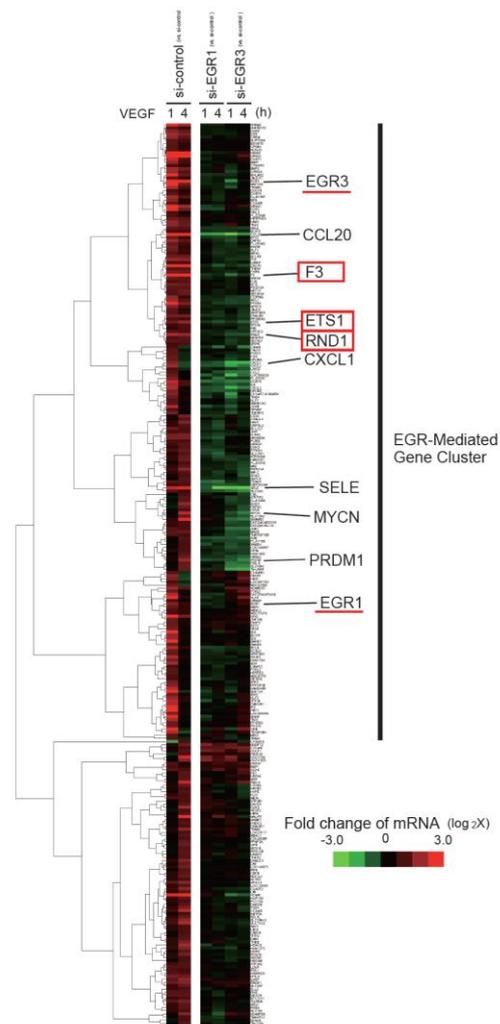


図 1 **Egr-1**、**Egr-3** siRNA を用いたマイクロアレイ解析

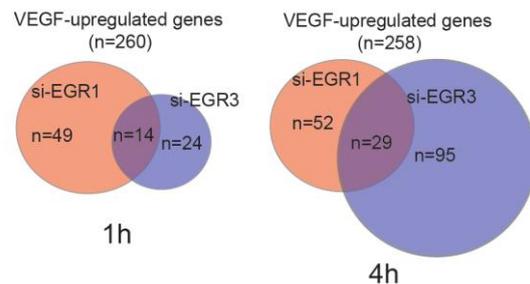


図 2 **Egr-1**、**Egr-3** 標的遺伝子 (30% 以上抑制) の経時的変化

く損なわれた (図 4)。以上より、**Egr-3** は **NFATc** と協調して **RND1** の発現制御に関わり、血管恒常性にかかわる機能を調節していることが明らかとなった。

個体レベルの解析：

マウス *Egr-3* の zinc finger 領域を有する exon2 を loxP 配列で挟み込んだコンディショナルターゲットベクターを作製し、ES 細胞へのターゲティングを行った。200 余り ES クローンを単離し、PCR 及びサザンブロットによるスクリーニングを行った。現在、キメラマウスの作製が進んでおり、ノックアウトマウスが樹立次第機能解析を進めていく。*Egr-1* ノックアウトマウスについて B16 メラノーマによる固形腫瘍モデルにて腫瘍進展の解析を行ったところ、野生型マウスに比してノックアウトマウスでは腫瘍進展に差が見られなかった (preliminary data)。以前、我々は *Egr-3* 阻害による血管新生抑制で腫瘍抑制効果があることを示したが、本研究から *in vivo* において *Egr-1*、*Egr-3* 間における機能の差異が明らかとなった。

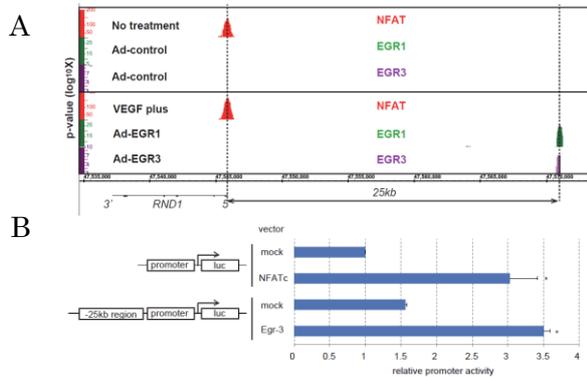


図 3 RND1 遺伝子周辺の *Egr-1*、*Egr-3*、NFATc の結合領域 (A) とレポーター解析 (B)

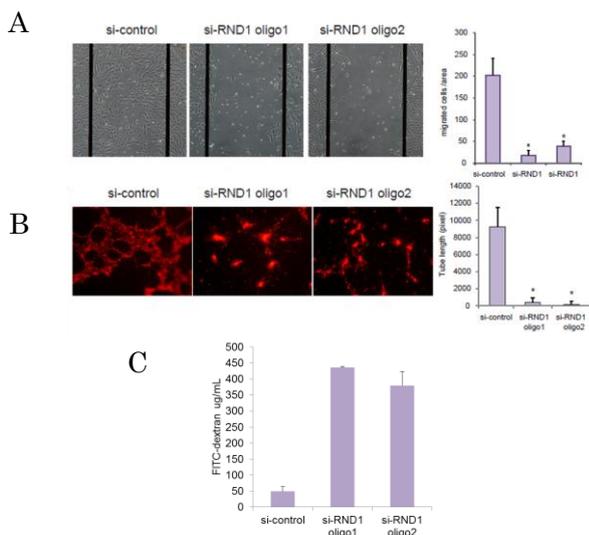


図 4 RND1 抑制時の遊走 (A)、管腔形成 (B)、内皮バリア機能 (C) の検討

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Itoh T, Suehiro J, Yuki K, Harada K, Morikawa M, Iwata C, Minami T, Morishita Y, Kodama T, Miyazono K, Watabe T. Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1.

J Cell Sci. 2011 Aug 15; 124(Pt 16): 2753-62.

2) Kanki Y, Kohro T, Jiang S, Tsutsumi S, Mimura I, Suehiro J, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Iwanari H, Naito M, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Minami T. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression.

EMBO J. 2011 Jun 10;30(13):2582-95. doi: 10.1038/emboj.2011.173.

3) Tozawa H, Kanki Y, Suehiro J, Tsutsumi S, Kohro T, Wada Y, Aburatani H, Aird WC, Kodama T, Minami T. Genome-wide approaches reveal functional interleukin-4-inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule 1 promoter.

Mol Cell Biol. 2011 Jun;31 (11): 2196-209.

[学会発表] (計 7 件)

1) 末弘淳一、南敬. 血管内皮細胞増殖因子による内皮活性化での転写因子 *Egr-3* の役割. 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議場

2) 末弘淳一、浜窪隆雄、児玉龍彦、William C Aird, 南敬. Vascular endothelial growth factor activation of endothelial cells is mediated by early growth response-3 第 18 回日本血管生物医学会学術総会 2010 年 12 月 1 日 梅田スカイビル

3) Jun-ichi Suehiro, Tatsuhiko Kodama, and Takashi Minami. Genome-wide analysis of NFATc binding sites in endothelial cells. 9th Japan-Korea joint Symposium on Vascular Biology 2011 年 8 月 26 日 TheWestin Chosun Hotel

4) 末弘淳一、南敬. 血管内皮増殖因子による活性化内皮細胞における転写因子 NFATc 結合部位の網羅的解析 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 名古屋国際会議場

5) **Jun-ichi Suehiro**, Yasuharu Kanki, Tatsuhiko Kodama, and Takashi Minami.

Genome-wide analysis revealed NFATc-regulated genes in VEGF-activated endothelial cells. 第 19 回日本血管生物医学学会学術集会 2011 年 12 月 9 日 東京ステーションコンファレンス

6) **Jun-ichi Suehiro**, Yasuharu Kanki, Tatsuhiko Kodama, and Takashi Minami.

Genome-wide analysis revealed NFATc-regulated genes in VEGF-activated endothelial cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 パシフィコ横浜

7) **Jun-ichi Suehiro**, Yasuharu Kanki, Tatsuhiko Kodama, and Takashi Minami.

Genome-wide analysis revealed NFATc-regulated genes in VEGF-activated endothelial cells. Keystone symposium Angiogenesis: Advances in Basic Science and Therapeutic Applications (A3) 2012 年 1 月 19 日 Snowbird resort

〔図書〕(計 1 件)

血管生物医学事典 (日本血管生物医学学会 編 末弘 淳一 他) 朝倉書店 500 頁 (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vb.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末弘 淳一 (SUEHIRO JUNICHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任
研究員

研究者番号：80572601

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

