

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700969

研究課題名(和文)腫瘍環境下の内皮細胞におけるNFATcによる転写活性化機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of transcriptional regulation by NFATc in tumor endothelial cells

研究代表者

末弘 淳一(SUEHIRO, JUNICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：80572601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍環境下の内皮細胞におけるNFATcを介した転写活性化機構を明らかにすることを目的とし、DNAマイクロアレイ、ChIP-seqによる標的遺伝子の網羅的探索、NFATc結合配列を組み込んだlacZ発現トランスジェニックマウスの作成、解析を行った。NFATcが転写を直接誘導する標的遺伝子として、ケモカイン受容体CXCR7、RhoGTPase RND1が同定され、VEGFを介した血管新生調節において重要な役割を果たすことが明らかになった。また、in vivoにおける種々の血管内皮細胞で、NFATを介したプロモータ活性は炎症刺激にて上昇することが認められた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanism of transcriptional activation by NFATc, I performed global analysis of target genes using microarray and ChIP-seq and examined beta-galactosidase activities in hprt locus-target in EGR3 promoter-lacZ transgenic mice. CXCR7 and RND1 were first identified as NFATc targets and contributed to VEGF-mediated angiogenesis. NFAT-mediated EGR3 promoter activities in vivo were upregulated by inflammatory stimuli in various types of endothelial cells.

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：血管内皮細胞 腫瘍血管新生 VEGF NFATc

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

血管内皮増殖因子 VEGF は多くのシグナル経路を誘導することが知られており、なかでも細胞内カルシウムイオンの上昇によるシグナル経路は内皮活性化の早期において中心的役割を果たす。カルシニューリン依存に活性化する転写因子 NFATc は免疫や心血管発生に必須の遺伝子として研究が進んでいたが、近年、NFATc 活性化のネガティブレギュレーターとして働く DSCR-1 や DYRK1A の解析から NFATc 活性化と腫瘍血管新生は密接な関係にあることが示された。その調節機構を知ることは腫瘍血管新生の分子メカニズムを理解するうえで大変重要である。

### 2. 研究の目的

腫瘍環境下の内皮細胞における NFATc を介した転写活性化機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

以下の 3 テーマについて解析を進めた。

- ・ DNA マイクロアレイ、ChIP-seq による標的遺伝子の網羅的探索、及び機能解析
- ・ NFATc 結合配列を組み込んだ *lacZ* 発現トランスジェニックマウスの作成、解析
- ・ 質量分析装置による NFATc 複合体同定

標的遺伝子の同定：

血管内皮細胞用培地 EGM-2(Lonza)にて HUVEC を培養し、VEGF 刺激を行う前日に 0.5% FBS を含む EBM-2 に交換し、血清除去を行った。VEGF 刺激を行う 30 分前に 1 $\mu$ M cyclosporineA(Calbiochem)を加え、その後 50ng/mL VEGF にて 1 時間処理を行った。TRIzol (Invitrogen)にて total RNA を回収し、U133 plus 2.0 DNA マイクロアレイ (Affymetrix)にて発現解析を行った。また、恒常活性化型 NFATc を組み込んだアデノウイルスを M.O.I = 1 にて HUVEC に感染させ、24 時間後のサンプルで同様に DNA マイクロアレイ解析を行った。

ChIP-seq 法による NFATc 結合領域の網羅的探索：

上述「標的遺伝子の同定」で示した同様の条件で VEGF 刺激を行い、1% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定、0.2M グリシンで 5 分間処理を行った。その後、氷冷 PBS にて洗浄後セルスクレーパーにて細胞を回収した。本研究室で作成した NFATc マウスモノクローナル抗体 10 $\mu$ g を protein G sepharose 50 $\mu$ L と混合し、0.05mg/mL BSA を含む PBS 中で 4、18 時間インキュベートした。サンプルを超音波破砕機 BRADSON SONIFER250 (BRADSON)で 1000bp となるように破砕し、抗体ビーズと 4、24 時間インキュベートした。その後、ビーズを各種

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にて処理し、エタノール沈殿によって DNA を回収した。その後、DNA 断片を再度 DNA shearing システム (Covaris)にて 200-300bp となるようソニケーションを行い、次世代高速シーケンサー-GAI(illumina)で解析を行った。

標的遺伝子プロモーターのクローニングとレポーターアッセイ：

HUVEC の genome DNA をテンプレートとし、ChIP-seq 解析から得られた NFATc 結合領域として、CXCR7 遺伝子上流-2193/+83、RND1 遺伝子上流-890/+83、-16066/-18577 領域を KOD polymerase(TOYOBO)にてクローニングした。それぞれを pGL3-Basic ベクターへ組み込み、0.3 $\mu$ g 各種 pGL3 ベクター、0.03 $\mu$ g 内部コントロール用 pRL-SV40 ベクターを FugeneHD(Promega)にてトランスフェクションし、Dual luciferase reporter assay kit (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

標的遺伝子ノックダウン時の内皮機能解析：標的遺伝子として同定された RND1、CXCR7 に対して 2 種の異なる配列を標的とした siRNA を設計し、lipofectamine RNAi max (Invitrogen)にて HUVEC ヘトランスフェクションし、ノックダウンを行った。CXCR7 ノックダウン時には、スクラッチによる遊走、コラーゲンサンドイッチによるチューブ形成を検討し、RND1 ノックダウン時には、RhoA 活性化、セルカルチャーインサートを用いた血管バリア機能の検討を行った。

*hprt*-locus target in *EGR3* promoter-*lacZ* 発現マウスの作製と解析：

NFAT 結合配列を含む *EGR3* プロモータ領域 (Suehiro J, et.al. *Blood*, 2010) の下流にレポーター遺伝子として *lacZ* を挿入し、Aird らが開発した *hprt*-locus ターゲットシステムを利用してトランスジェニックマウスを作製した。胎生、及び成体マウスの臓器を摘出し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより、NFAT を介したプロモータ活性を個体レベルで検討した。

NFATc 抗体を用いた免疫沈降によるタンパク質複合体同定：

本研究室で作成した NFATc 抗体を Dynabeads Protein G (Invitrogen)に DMP (Thermoscientific)を用いて架橋させ、HUVEC 細胞抽出液と混合し、免疫沈降を行った。ウェスタンブロットティング、Oriole 蛍光ゲルステイン(Biorad)により免疫沈降物を確認し、質量分析装置への解析へ進めた。

### 4. 研究成果

標的遺伝子の同定：

臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いて NFATc 抗体を用いた ChIP-seq を行い、VEGF 刺激後 1 時間で 4,119 箇所の結合領域を同定した。ChIP-seq から得られたデータをインフォマティクス解析したところ、1) GGAAA 配列に NFATc が結合すること、2) NFATc 結合領域周囲に C/EBP、CREB 結合配列が存在すること、3) NFATc は H3K4me3 ヒストンマークと共局在していることを新たに見出した (Figure 1)。NFATc 標的遺伝子の絞り込みでは ChIP-seq とマイクロアレイデータを組み合わせて 20 遺伝子を抽出し、そのなかで *CXCR7*、*RND1* に着目して発現・機能解析を行った。プロモータ解析では、*CXCR7* 遺伝子 5'-flanking 領域 (-439/+89) をクローニングしてレポーターアッセイを行い、この領域に存在する 3 か所の NFATc 結合配列が誘導に必須であることを見出した (Figure 2)。また、内皮機能解析において VEGF-NFATc シグナルにより誘導された *CXCR7* は、特異的リガンドである SDF-1 を介した細胞遊走、血管新生を増強することを明らかにした (Figure 3)。さらに、もう一つの標的遺伝子である RhoGTPase *RND1* について機能解析を行い、RhoA を介した内皮バリア機能制御に関わることを明らかにした (Figure 4, 5)。

*hprt*-locus target in *EGR3* promoter-*lacZ* 発現マウスの作製と解析：

*EGR3* プロモータ依存 *lacZ* 発現マウスの胎生期において、E10.5 以前には活性がほぼ見られず、E15 以降の血管においてシグナルが確認されるようになった (Figure 6)。成体においても同様に血管で強い活性が見られ、特に脳、心臓、皮膚において顕著であった。また、癌・浸潤部に見られる炎症状態を模擬する意味で、リポ多糖を全身性に投与し、活性を検討した。その結果、脳、心臓、胸壁、横隔膜で活性の上昇が観察された (Figure 7)。現在、B16F10 細胞による固形腫瘍における血管、肺など癌細胞転移先の血管で検討を進めているところである。

NFATc 抗体を用いた免疫沈降によるタンパク質複合体同定：

NFATc 抗体を用いたプロテオミクスでは内在性タンパク質の免疫沈降に成功したが、特異的な複合体同定には至らなかった。理由として、本研究では網羅的に複合体構成タンパク質を同定することを目的としていたことから、NFATc 抗体と磁性ビーズを共有結合し、免疫沈降産物全体を質量分析装置にかける手法を取っていたが、NFATc 抗体と磁性ビーズを結合させる作業によって、抗体の親和性が著しく減少し、当初期待した量の免疫沈降

物を得ることが難しくなったことが挙げられる。この代替案として FLAG 融合 NFATc を作製し、FLAG M2 抗体により免疫沈降を行っており現在も継続中である。また、yeast two hybrid システムによる相互作用するタンパク質の同定も進めており、NFATc 全長、N 末端 (トランス活性化領域) 側を 300 アミノ酸残基ごとクローニングしたコンストラクトを作製し、血管の多い臓器として肺由来 cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行っている。

Name	E-value	Motif
NFAT	1.3e-194	AGGAAA p-value: 4.8e-03
C/EBP	4.6e-055	AGCCAATCA p-value: 5.9e-09
CREB1	2.9e-034	GTGACGTCA p-value: 6.3e-07

Figure 1 ChIP-seq により同定された NFATc 結合領域周囲に存在するモチーフ

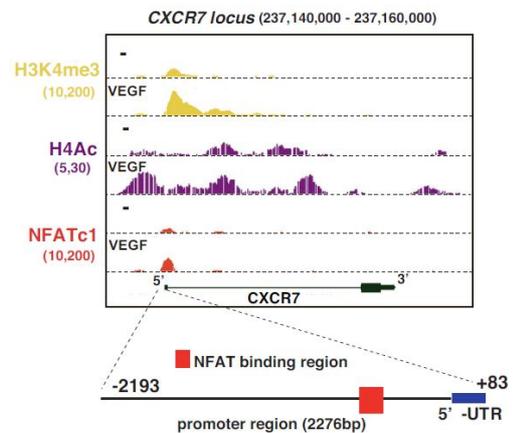


Figure 2 *CXCR7* 遺伝子周囲の NFATc 結合領域

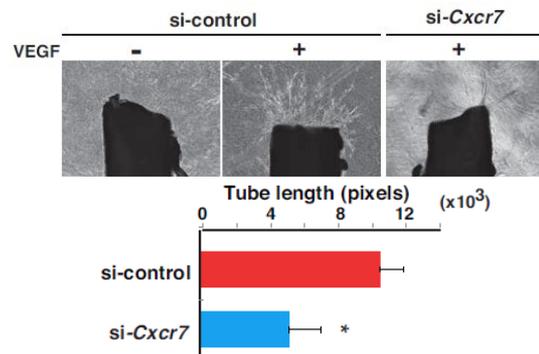


Figure 3 *CXCR7* ノックダウンにおける血管新生

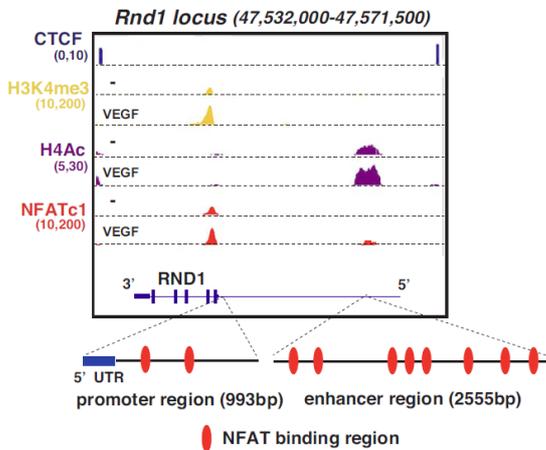


Figure 4 *RND1* 遺伝子周囲の NFATc 結合領域

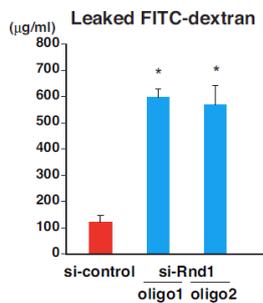


Figure 5 *RND1* ノックダウンにおける FITC 標識デキストランによる透過性評価

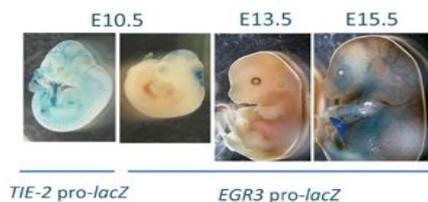


Figure 6 マウス胎生期における *EGR3* promoter-*lacZ* 活性

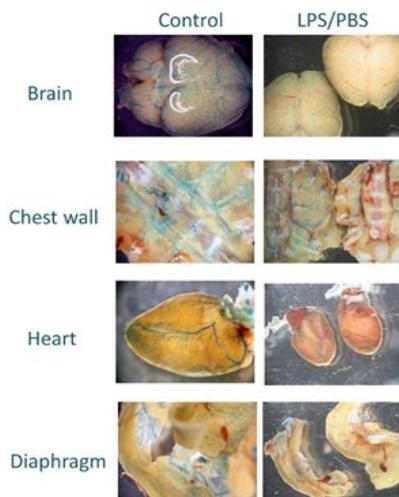


Figure 7 マウス成体の各種臓器における *EGR3* promoter-*lacZ* 活性

## 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 4件) 全て査読有

1) Minami T, Jiang S, Schadler K, Suehiro J, Osawa T, Oike Y, Miura M, Naito M, Kodama T, Ryeom S. The Calcineurin-NFAT-Angiopoietin-2 Signaling Axis in Lung Endothelium Is Critical for the Establishment of Lung Metastases. *Cell Rep.* 2013 Aug 29;4(4):709-23. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.021. Epub 2013 Aug 15.

2) Osawa T, Tsuchida R, Muramatsu M, Shimamura T, Wang F, Suehiro J, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, and Shibuya M. Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages. *Cancer Research.* 2013 May 15;73(10):3019-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3231.

3) Yamazaki T, Suehiro JI, Miyazaki H, Minami T, Kodama T, Miyazono K, Watabe T. The COUP-TFII variant lacking a DNA-binding domain inhibits the activation of the Cyp7a1 promoter through physical interaction with COUP-TFII. *Biochem J.* 2013 Jun 1;452(2):345-57. doi: 10.1042/BJ20121200.

4) Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro JI, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y. Dynamic change of the chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of HIF1 and KDM3A. *Mol Cell Biol.* 2012 Aug;32(15):3018-32. doi: 10.1128/MCB.06643-11.

[学会発表](計 7件)

1) 末弘 淳一、木村 徹、櫻井 裕之. 血管内皮細胞増殖因子を介した血管ネットワーク形成におけるアミノ酸トランスポーター LAT1 の役割. 第 129 回日本薬理学会関東部会、東京、2013 年 10 月 19 日.

2) 末弘 淳一、櫻井 裕之. LAT1 阻害は血管内皮細胞増殖を抑制する. 生理研研究会『上皮膜輸送の多層的コントロールによる生体の恒常性維持機構』、愛知、2013 年 8 月 26 日.

3) 末弘 淳一、櫻井 裕之. 血管内皮細胞にお

ける LAT1 選択的阻害薬 JPH203 の薬理学的検討. 第 128 回日本薬理学会関東部会、東京、2013 年 7 月 14 日.

4) 末弘 淳一、神吉 康晴、油谷 浩幸、浜窪 隆雄、児玉 龍彦、南 敬 . The calcineurin/NFATc signaling axis regulates VEGF-mediated angiogenesis and vascular integrity. 第 1 回生活習慣病の分子細胞病態学研究会. 東京, 2013 年 3 月 23 日.

5) Jun-ichi Suehiro, Takashi Minami : Temporal-spatial analysis of Egr-3 promoter activities in *hprt* locus target-in transgenic mice . 第 20 回血管生物医学会学術集会, 徳島, 2012 年 12 月 7 日 .

6) 末弘淳一, 南敬: calcineurin- NFATc シグナルが VEGF を介した血管新生と病的な内皮細胞の表現型に寄与する . 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 20 日 .

7) Jun-ichi Suehiro, Yasuharu Kanki, Takashi Minami : Genome-wide approaches reveal functional VEGF-NFATc-mediated RND1 induction is necessary for endothelial barrier potential . IVBM2012 , Wiesbaden , 2012 年 6 月 3 日 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 血管内皮細胞の活性化に起因する疾患の治療又は予防剤

発明者: 南敬、末弘淳一、神吉康晴

権利者: 国立大学法人東京大学(504137912)

種類: 特願

番号: 2013-13530

出願年月日: 2013 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

○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/>

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/pharmaco/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

末弘 淳一 (SUEHIRO JUNICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 80572601

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし