

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26710013

研究課題名(和文) ヒストン修飾新規リーダータンパク質による転写機構解析

研究課題名(英文) Epigenetic mechanism about immediate early transcribed genes in vascular endothelial cells

研究代表者

神吉 康晴 (KANKI, YASUHARU)

東京大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：00534869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管内皮細胞における遺伝子転写制御機構に焦点をあて、特に血管内皮増殖因子(VEGF)刺激下での早期誘導遺伝子に着目して研究を行った。固形腫瘍内では細胞増殖の早さゆえ、血管からの酸素や栄養の不足が起こり、腫瘍細胞自身がVEGFを分泌することで新生血管を呼び寄せる。研究期間内に、VEGF刺激下での特徴的なヒストン修飾パターンを見出し、特にH3K4me3修飾に関与するタンパク質を阻害することで腫瘍が小さくなることをマウスモデルでも確認できた。本研究によって、ヒストン修飾阻害剤という新たな視点からの抗がん剤開発の基礎となる知見を提唱できた。

研究成果の概要(英文)：In solid tumor, cancer cells secrete vascular endothelial cell growth factor (VEGF) by themselves in order to get oxygen and nutrition. In this report, our aim is to elucidate a novel epigenetic mechanism about immediate early transcribed genes in vascular endothelial cells under VEGF stimulation.

At first, we performed ChIP-sequence by using various histone modification antibodies including H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac, and H2AK119Ub. We clarified that H3K4me3 modification was induced within 15min on EGR3 locus. In addition, the inhibition of H3K4me3 modification by PTIP knockdown caused the reduction of VEGF-induced genes transcription in vitro and in vivo.

Taken together, these findings have suggested that inhibition of PTIP might be useful material for the development of anti-angiogenic drugs in the future.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 エピゲノム VEGF ChIP-seq ヒストン修飾 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティクスは分化、発がん、生活習慣病といった生命現象に深く関わることが知られており、国際プロジェクトの成果が発表されるなど、分野を超えた学問に成長しつつある。Encode Project では、細胞ごとに異なるヒストン修飾プロファイルを持つことが示され、データベース化された (Encode 2012 *Nature*)。しかし、これまでのエピゲノム研究は、特定の癌細胞での変異や、細胞ごとに異なるエピゲノム修飾の同定、及び受精卵や細胞分化時における解析が中心である。ヒトは一生を生きる上で様々な病態に曝されるが、必ずしも細胞の劇的な変化は伴っていない。申請者が目指すのは、同じ細胞でも置かれた環境や受け取るシグナルによって、発現する遺伝子の種類や量を微妙に調節する仕組みを解き明かすことである。

(2) これまでに、申請者らはマイクロアレイと次世代シーケンサーを用いた網羅的解析から、血管内皮細胞の恒常性維持、サイトカインや低酸素刺激による活性化シグナルについて研究を重ねてきた (Song H et al 2009 *JBC*, Kanki Y et al 2011 *EMBO J*, Kanki Y et al 2011 *MCB*, Mimura I et al 2012 *MCB*, Papantonis A et al 2012 *EMBO J* など)。血管内皮細胞にとって必須の栄養因子は血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor、以下 VEGF) であるが、これは生理的な血管新生のみならず、悪性固形腫瘍や糖尿病性網膜症などの病的血管新生でも重要な役割を果たしている。現在、抗 VEGF 抗体が臨床応用されているが、VEGF シグナルそのものを阻害しているために、血栓症や出血などの副作用が問題となっている。そこで、血管内皮細胞が VEGF 環境下におかれることで駆動するエピジェネティクス機構解明から、新規エピゲノム創薬を目指す目的で、本研究を開始した。具体的にはヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; 以下 HUVECs) に VEGF を 50 ng/ml で作用させ、その経時的な遺伝子発現変化の解析を行った。

(3) まず、VEGF を作用させた際の 1、4、12、24、48 時間後のマイクロアレイ解析を行った。この結果、腫瘍血管新生に重要だと我々の研究室で提唱した EGR3 (Suehiro JI et al 2010 *Blood*) や NR4A2 など早期誘導転写因子群が刺激後 1 時間で上昇し、その後、発現は落ちていくことが分かった。これら遺伝子はノックダウンにより血管新生を顕著に抑制することから、高濃度 VEGF 刺激下の master transcription factor (以下 MTF) と考えられる。つまり、これら MTF の発現誘導のみを特異的に抑制するエピゲノム機構を解明することで、生理的血管新生には影響を与えずに、病的血管新生を抑制できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が見出した新たなヒストン修飾変化に対する生物学的意義を解明し、その修飾が形成される分子機構、更に新規ヒストンリーダータンパクの同定を行うことを目的としている。申請者はこれまでに、血管内皮細胞を用いて次世代シーケンサーを用いた網羅解析から、血管内皮細胞活性化に寄与する転写因子、エピゲノム修飾を報告してきた (Kanki Y et al 2011 *MCB*, *EMBO J* など)。そこで、本申請では、内皮細胞にとって最も重要な活性化シグナルである VEGF に着目し、その下流の分子カスケード解析から、より副作用の少ない新たなエピゲノム創薬の標的を探索することを目的としている。

研究の背景で記載したように、HUVECs に VEGF を作用させると、刺激後わずかな時間で VEGF 下流下の MTF と考えられる転写因子が一過性に転写され、その後、発現が落ちていくということが分かった。本研究はこのメカニズムをエピゲノム、特にヒストン修飾に焦点を当てて解析し、生理的血管新生を阻害せずに、固形腫瘍内血管新生を阻害する薬剤の候補となるタンパク質をスクリーニングすることが目標である。

3. 研究の方法

(1) HUVECs に VEGF 刺激を行い、刺激後 0 分、15 分、60 分でのヒストン修飾解析を ChIP-seq を用いて行った。刺激前後の細胞を 1% ホルマリンで固定し、その後超音波にて DNA を断片化する。H3K4me3, H3K27me3, H2AK119Ub, H3K27ac, RNA polymerase II 抗体で免疫沈降を行い、沈降物から DNA を回収した。その DNA を illumina 社の次世代シーケンサーを用いて解析し、それぞれのヒストン修飾のゲノムワイドな変化を分単位で解析した。

また、複数の修飾が同時に存在することを確認するために最初の免疫沈降産物を別の抗体を用いて更に免疫沈降を行い、同時に 2 つの修飾が同じ染色体上で起こっていることを確認する ChIP-re-chip も行った。

(2) si-RNA を用いたノックダウン実験。H3K4me3 修飾、H3K27me3 修飾、H2AK119Ub 修飾を行う酵素に対して si-RNA を用いたノックダウン実験を行い、MTF の転写誘導や血管新生がどのように変化したかを解析した。

(3) マウスモデルを用いた *in vivo* での固形腫瘍アッセイ。8 週齢の健常なマウスに B16 メラノーマ細胞を皮下注射し、腫瘍の進展を解析した。その際に特定のエピゲノム修飾因子のマイクロ RNA を発現するアデノウイルスを感染させ、全身性にノックダウンした際に腫瘍の進展や血管新生、増大にどのような影響を与えるかを解析した。

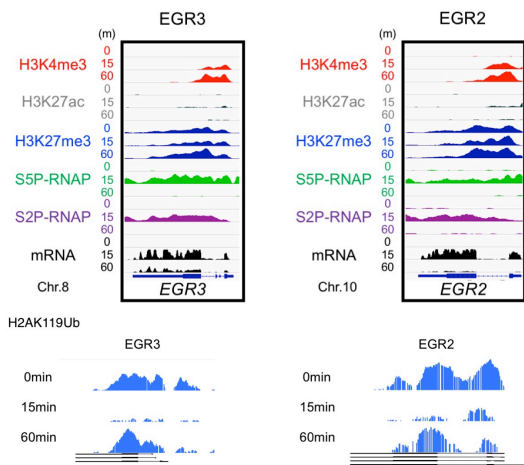
4. 研究成果

(1) VEGF 刺激後の遺伝子発現に及ぼすエピゲノム修飾変化を捉えるために、ChIP-seq にてヒストン修飾を解析した。活性化マークとして H3K4me3 及び H3K27ac、抑制系マークとして H3K27me3 及び H2AK119ub を刺激後 0、15、60 分後で解析した。その結果、以下の興味深い現象を見出した。

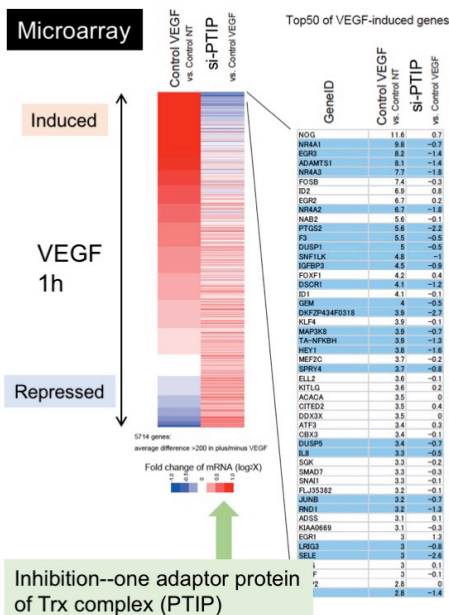
1: 終末分化した細胞が、増殖因子で刺激された際に特定の MTF のみ一過性の bivalent 修飾 (H3K4me3 と H3K27me3 が共局在する状態) を形成すること

2: 抑制系修飾である H3K27me3 が入っていても、一過性に H2AK119ub が減少することで転写が行われる領域が存在すること

3: H2AK119ub 修飾を担う Polycomb complex1 (PRC1) の variant の一つが刺激後 15 分のタイミングのみで recruit されていること

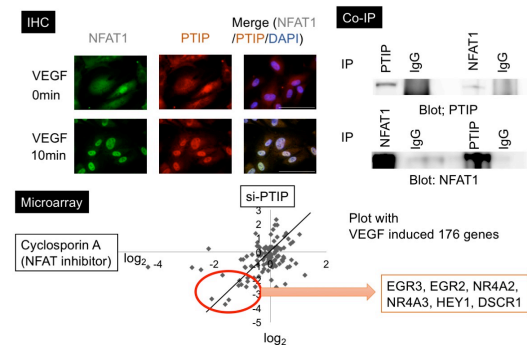


(2) 次に、刺激後 15 分で H3K4me3 修飾が入ることに着目し、その修飾酵素を同定するために H3K4me3 修飾を入れる酵素群、trithorax の構成タンパク質に対して siRNA 実験を行った。その結果、図に示すように PTIP をノック

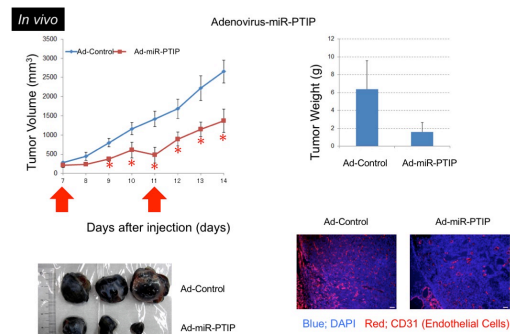


クダウンした際に VEGF 刺激によって誘導される遺伝子はその誘導がキャンセルされることを見出した。

(3) 申請者らはこれまでに、VEGF 刺激下のマスター転写因子 EGR3, EGR2 などの誘導に転写因子 NFAT の核内移行が重要であることを示しており (Suehiro JJ, Kanki Y et al 2014 *JBC*)、今回新たに見出した PTIP と NFAT の関係性を調べた。その結果、PTIP も同様に VEGF 刺激で核内移行し、NFAT と複合体を形成していることが免疫沈降で確認された。また、PTIP をノックダウンした際のマイクロアレイと NFAT の阻害剤を投与した際のマイクロアレイとは相関性が高いことから、PTIP による EGR3, EGR2 の転写誘導には NFAT による適切な遺伝子座への trithorax のリクルートが重要であると考えられた。

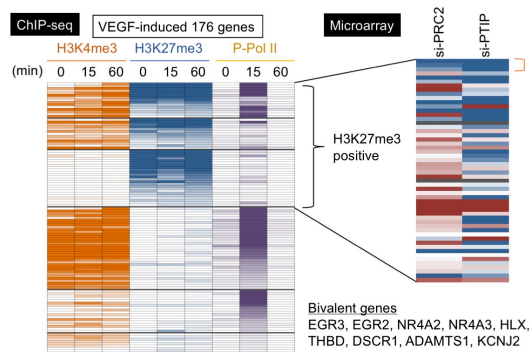


(4) PTIP をノックダウンした際にマウスで固形腫瘍内血管新生がどのように変化するかを解析した。PTIP のマイクロ RNA を発現するアデノウイルスを用いて解析を行ったところ、PTIP をノックダウンすると腫瘍内血管新生は抑制され、それに伴って腫瘍自体も小さくなることが分かった。



(5) 抑制系修飾である H3K27me3 が入ったまま EGR3 や EGR2 は転写されていることから、この修飾の意義を解析するために、H3K27me3 修飾を行うポリコム複合体 2 (PRC2) のノックダウン実験を行った。PRC2 をノックダウンすると、VEGF によって誘導される遺伝子の誘導は大半が上昇するが、EGR3 や EGR2 などの bivalent 修飾を形成する転写因子の一部は発現が減少する結果となった。つまり、これらの遺伝子は活性化修飾因子である

trithorax を阻害しても、抑制系修飾因子である PRC2 を阻害しても、その発現誘導は抑制されることから、刺激後に形成される bivalent 修飾が重要であることが分かった。



(6) 考察

以上の現象は、分化した細胞が再び増殖する際に起こる、従来にはない特殊なエピゲノム修飾の変化を捉えたものであり、分化系や癌細胞と異なって分単位で変化する。ES 細胞分化での bivalent 修飾は血管生物学分野では申請者は世界に先駆けて報告している (Kanki Y et al 2017 *NAR*)。しかし HUVECs で見出した現象は終末分化した細胞において転写が一過性に起こる MTF でのみ見られるものであり、転写の開始と終結を解析する上でも重要な知見である。ここで見出した現象を実際の臨床に応用させるにはまだ遠いが、以下の項目を明らかにすることで、血管内皮細胞を超えた普遍的な事象が明らかになることが期待される。

1: MTF 領域のみに起こる遺伝子座特異的な複合体を時系列で同定すること

2: trithorax、PRC1 などが集積する EGR3 の第 1 イントロン領域を用いてタンパク質複合体の立体構造解析を行い、locus 特異的に集積する理由や、活性化 polycomb、抑制性 polycomb の本質的な違いを原子レベルで捉える。

上記を通して、正常な細胞が病的な状態に移行する際に起こるエピゲノム複合体の本質を捉え、より副作用の少ない将来の創薬の手がかりをつかむことが期待される。

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 5 件)

(1) Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T. 「Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation.」 *Nucleic Acids Res.* 2017 May

5:45(8):4344-4358.、査読有り、doi: 10.1093/nar/gkx159.

(2) Katsura M, Cyou-Nakamine H, Zen Q, Zen Y, Nansai H, Amagasa S, Kanki Y, Inoue T, Kaneki K, Taguchi A, Kobayashi M, Kaji T, Kodama T, Miyagawa K, Wada Y, Akimitsu N, Sone H. 「Effects of Chronic Low-Dose Radiation on Human Neural Progenitor Cells.」 *Sci Rep.* 2016 Jan 22;6:20027.、査読有り、doi: 10.1038/srep20027.

(3) Suehiro J, Kanki Y, Makiyama C, Schadler K, Miura M, Manabe Y, Aburatani H, Kodama T, Minami T. 「Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium.」 *J Biol Chem.* 2014 Oct 17;289(42):29044-59.、査読有り、doi: 10.1074/jbc.M114.555235.

(4) Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y. 「Direct evidence for pitavastatin induced chromatin structure change in the KLF4 gene in endothelial cells.」 *PLoS One.* 2014 May 5;9(5):e96005.、査読有り、doi: 10.1371/journal.pone.0096005.

(5) Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y. 「Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements.」 *Genome Biol.* 2014 Apr 10;15(4):R63.、査読有り、doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r63.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 神吉康晴

「血管内皮細胞の運命を制御するエピジェネティクス」
第 2 回血管生物若手研究会

東北大学、仙台市、日本
2016年3月4日-5日

(2) Yasuharu Kanki, Jun-ichi Suehiro, Ryo Nakaki, Tsuyoshi Osawa, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Takashi Minami

「The Integration of Dynamic Epigenetic Data in Vascular Endothelial Cells」
第38回日本生物学会年会、第88回日本生化学会年会、合同大会
神戸ポートアイランド、神戸市、日本
2015年12月1日-4日

(3) Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada

「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity.」
15th International Congress of Radiation research
京都国際会議場、京都市、日本
2015年5月25日-29日

(4) Yasuharu Kanki, Jun-ichi Suehiro, Ryo Nakaki, Tsuyoshi Osawa, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Takashi Minami

「A novel epigenetic mechanism revealed tumor associated angiogenesis」
春期特別日本血管生物医学学会シンポジウム
大阪大学微生物研究所、大阪市、日本
2015年5月13日

(5) 神吉康晴

「エピゲノム制御機構からみた VEGF シグナル」
第1回血管生物若手研究会
東京大学、東京、日本
2015年2月6日-7日

(6) Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Ryo Nakaki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada

「Chromatin interaction between mRNA and miRNA mediated by NR2F2 is important for vein identification.」
The 4D Nucleome 2014
安芸グランドホテル、広島、日本
2014年12月17日-20日

(7) Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada

「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity.」

第37回日本分子生物学会大会
パシフィコ横浜、横浜市、日本
2014年11月25日-27日

(8) Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada

「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity.」
第87回日本生化学会大会
京都国際会館、京都市、日本
2014年10月15日-18日

(9) Yasuharu Kanki

「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes to the Cell Specificity」
11th EMBL Conference
EMBL, Heidelberg, Germany
2014年8月23日-26日

(10) Kanki, Yasuharu, Matsunaga, Taichi, Ryo, Nakaki, Yamamizu, Kohei, Shimamura, Teppei, Miyano, Satoru, Aburatani, Hiroyuki, Kodama, Tatsuhiko, Wada, Youichiro, Yamashita, Jun, Minami, Takashi, 「Genetic and Epigenetic Landscape of Endothelial Cells Differentiation Reveal the Transcriptional Factors Network」
The 12th International Society for Stem Cell Research Meeting
Convention Center, Vancouver, Canada
2014年6月18日-21日

(11) Yasuharu Kanki, Taichi Matsunaga, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada, Tatsuhiko Kodama, Jun Yamashita, Takashi Minami, 「Transcription Factor GATA2 is indispensable for the Differentiation and Maintenance of Vascular Endothelial Cells」
The 18th International Vascular Biology Meeting
Miyako Messe Kyoto, Kyoto, Japan
2014年4月14日-17日

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神吉康晴 (KANKI, Yasuharu)
東京大学・アイソトープ総合センター・助教
研究者番号: 00534869