

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710227

研究課題名(和文) 血管内皮細胞分化におけるエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) Genetic and Epigenetic Landscape of Endothelial Cells Differentiation Reveal the Transcriptional Factors Network.

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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管内皮細胞に焦点をあて、その分化機構を転写因子とエピゲノム修飾因子の視点から解析し、新たな分化制御因子を発見するのが目的である。マウスES細胞からの血管内皮細胞分化系を用いて、経時的なtranscriptome解析及びヒストン修飾解析を行った。その結果、特徴的なヒストン修飾パターンから、Gata2、Fli1、Sox7、Sox18を見出した。これら4つの転写因子をそれぞれノックダウンするとGata2のみでも内皮細胞分化は約50%阻害され、4つの転写因子を全てノックダウンすると顕著に阻害される結果となった。本研究により、血管内皮細胞分化の新たな転写因子ネットワークを提唱した。

研究成果の概要(英文)：In this report, our aim is to establish the more efficient and practical endothelial cell differentiation system from embryonic stem (ES) or induced pluripotent stem (iPS) cells. On this purpose, we analyzed the endothelial cell differentiation system from mouse ES cells by using two comprehensive analyses ChIP-seqs and micorarrays.

From these experiments we found out H3K4me3 have changed on early stage during differentiation. Moreover, we discovered some bivalent genes (H3K4me3 and H3K27me3 double positive) such as Etv2, Gata2, Sox18, Sox7 and Fli1 which are upregulated at early time points and supposed to be candidates for master regulators of endothelial cells differentiation. Knockdown of these factors caused drastic reduction of endothelial cell differentiation efficiency.

Taken together, these findings have suggested that determination of cell fate is based on not only master transcription factors but also epigenetic histone modifications.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：エピゲノム制御 血管内皮細胞 細胞分化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化や悪性固形腫瘍、糖尿病性網膜症等血管機能の障害に基づく疾患は、今日の高齢化社会において増加の一途をたどっており、そのメカニズムの解明や新たな治療法の開発がもつ社会的意義は大きい。上記疾患はいずれも血管内皮細胞における炎症と異常な血管新生に依拠するが、これら二つの病態において von Willebrand Factor (vWF)、Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)、Intracellular Adhesion Molecule 2 (ICAM-2)、Kinase Insert Domain-Containing Receptor (KDR; 別名 Flk) 等共通の分子の関与が知られている。転写因子 GATA2 は、これら重要なタンパク質いずれにおいてもその発現制御に関わっていることが報告されており、GATA2 による遺伝子発現制御メカニズムを解明することは、血管疾患を理解する上で重要である。しかも、血管内皮細胞において GATA2 を si-RNA によりノックダウンすると、血管内皮細胞はその形態を維持出来ず、tube 形成等の機能喪失が見られる (Kanki Y et al. EMBO J 2011 など) ことから、内皮細胞の生理学・病理学両側面において GATA2 は重要であることが推測されている。しかし、従来内在性 GATA2 を認識でき、かつ GATA2 とタンパク質構造の似ている GATA3 とを区別できる感度、特異度共に優れた抗体がなかったために分子レベルでの詳細な検討が叶わなかった。

(2) 近年申請者は感度、特異度共に優れた GATA2 マウスモノクローナル抗体を樹立した。この新規樹立抗体を使って毛細血管内皮細胞のモデルである HMVEC (ヒト皮膚微小血管内皮細胞) を用いて全ゲノム上で GATA2 が結合する部位を明らかにするために Chromatin Immunoprecipitation with deep sequencing (ChIP-seq) 解析を行った。その結果、結合領域の半分以上は非遺伝子領域であった。次に、この結果を K562 細胞 (GATA2 を発現している血球系細胞) における発現アレイ及び ChIP-seq 解析と比較することで「HMVEC と K562 細胞では GATA2 結合領域はほとんど一致せず、また GATA2 は HMVEC においては内皮特異的遺伝子に、K562 細胞においては血球特異的遺伝子に結合し、その分布は細胞特異的エピゲノム修飾に規定されている」という興味深いデータが得られた。この結果は、GATA2 は細胞ごとにその細胞特異的遺伝子発現制御を担っていることを示唆させるデータである。

(3) 一方で、血管内皮細胞はその生理的な分化過程も未知の部分が多く、ES 細胞からの分化過程においてどのような転写因子ネットワークが働くのか、あるいは血管内皮細胞特異的なエピゲノムはどのように獲得されるのかについては、ほとんど研究されていない。この機構を解明することは、血管生物学分野、

再生医療分野にとどまらず、細胞が分化していく過程で転写因子とエピゲノム修飾因子がどのようにクロストークしながら作用するのかという、現代の分子発生物学の課題を明らかにする一助となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は ES 細胞から血管内皮細胞が分化する際に必要な転写因子、エピゲノム因子を決定し、多細胞生物の基本である細胞特異性が genome, epigenome のレベルでどのように獲得、維持されるのかを明らかにすることを目的としている。申請者はこれまで、血管内皮細胞の性質維持に重要な遺伝子の発現が、転写因子 GATA2 の結合及び細胞特異的なクロマチン立体機構によって維持されていること (Kanki Y et al. EMBO J 2011)、慢性炎症刺激である IL (Interleukin)-4 刺激下において転写因子 STAT6 (Signal Transducers and Activator of Transcription) の結合とエピジェネティックな修飾変化が、単球接着因子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) 発現誘導を促していること (Kanki Y et al. MCB 2011) を報告してきた。そこで本研究ではこれまでに習得したオミックス技術を生かし、現在申請者が挑んでいる血管内皮細胞の分化制御に挑む。ES 細胞からの分化系は、これまで神経、心筋、脾細胞等様々な細胞系列でその発現解析から制御転写因子が報告されている。本申請では血管内皮細胞分化系を用いて、細胞特異的なエピジェネティックな変化と、細胞特異性を決める転写因子との関係性を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞を Leukemia Inhibitory Factor (LIF) 非存在下で分化誘導させ、96 時間後に Flk 陽性中胚葉細胞群を MACS でソートし、Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) を作用させると、高い分化効率をもって血管内皮細胞が誘導できる (Yamashita JK et al 2000 Nature)。一方で、この細胞に VEGF を作用させないで分化誘導培地で培養すると、ほぼ 100% 平滑筋細胞になる。

(2) 上記 2 つの分化誘導系 (血管内皮細胞、平滑筋細胞) を用いて、経時的な transcriptome 解析をマイクロアレイを用いて行った。

更にヒストン修飾解析として、active な転写を示す H3K4me3 抗体、repressive な状態を示す H3K27me3 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行い、全ゲノムで経時的なヒストン修飾の変化を解析した。

(3) 上記で見出した血管内皮細胞の master regulator 候補因子に対して、si-RNA を導入

し、実際に血管内皮細胞分化がどの程度阻害されるのかの検証を行った。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞分化時における経時的な transcriptome 解析

上記手法で分化誘導させた血管内皮細胞、平滑筋細胞を用いて、VEGF 添加後 6、12、24、48 時間後の total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。VEGF を作用させない群と比較して、作用群でのみ特異的に上昇する遺伝子を各タイムポイントで抽出した。

その結果、6 時間後には Etv2 や Tal1、12 時間後に Gata2 や Sox7、Sox18、Fli1 が抽出された。また、血管内皮細胞に分化したと考えられる 48 時間後には、Pecam1 や VE-Cadherin といった細胞特異的な表面マーカーが発現していた (表)。

Early phase	I	Etv2, T, Hoxc6, Tal1
	II	Gata2, Lmo2, Sox7, Fli1, Sox18
Late phase	III	Esam, Gja4, Icam2, Tbx5, Cd34, Plxnd1
	IV	Nos3, Mef2c, Erg, Notch4, Robo4, Emcn, Foxc2, Sox17, Dll4, Eng, Cldn5, Tie1, Arhgap18, Cdh5, Arhgef15, Hey1, Kdr, Pdgfb, Apoe

6 時間で抽出された Etv2 は、そのノックアウトマウスの解析から、血管内皮細胞の分化に関与することが既に個体レベルで報告されている遺伝子である。従って、この結果は妥当なものと考えられる。こうした経時的な遺伝子発現パターン解析から得られた遺伝子を Gene Ontology で解析すると、分化誘導初期では核内転写因子が有意に濃縮されており、分化終期では細胞表面の血管新生に関与する遺伝子が有意に濃縮されていた。

この結果から、未分化な細胞が特定の細胞に commit する過程では、まずその細胞にとって重要な転写因子が誘導され、次にその転写因子の下流として、細胞の機能や形態に関わる表面蛋白質が発現してくることが示された。

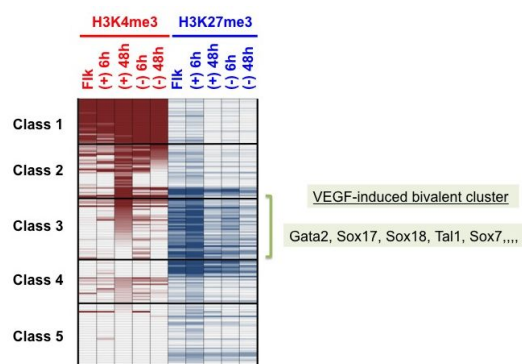
(2) マスター転写因子を絞り込むための経時的なヒストン修飾解析

上記マイクロアレイでは、VEGF に反応して発現が上昇する遺伝子 (VEGF を作用させない群と比較して 2 倍以上) として 200 個を抽出した。他の細胞の分化系論文 (心臓や肝臓など) では、一種類の細胞に分化する際には 2-4 個の転写因子で導入される場合が多い。そこで、血管内皮細胞分化に必要な転写因子の組み合わせを上記 200 個から更に絞り込むために、経時的なヒストン修飾解析を行った。

ここで用いたヒストン修飾抗体は H3K4me3 及び H3K27me3 である。一般的に H3K4me3 修飾は active な遺伝子の promoter に濃縮する傾向があり、H3K27me3 は抑制されている遺伝子の gene body に濃縮する傾向にある。更に、

H3K4me3 修飾と H3K27me3 修飾が両方とも入っている遺伝子は、bivalent gene と呼ばれ、細胞分化に重要であることが報告されている。このような知見から、血管内皮細胞分化時の bivalent gene の形成パターンを調べ、マイクロアレイの結果と照合した。

この結果、分化のマスター候補となる転写因子にはある一定の傾向があることが判明した。1: Flik でソートした時点 (VEGF 作用させる前) では H3K27me3 修飾によって遺伝子発現が抑制されていること。2: VEGF 作用後 6 時間の段階では H3K27me3 修飾はそれほど減らず、H3K4me3 修飾は入っていないまたは少ししか入っていない状態であること。3: VEGF 作用後 48 時間の段階では、H3K4me3 修飾が強く入って bivalent 状態を形成すること。上記 3 点を満たす代表的なクラスターを下図に示す。



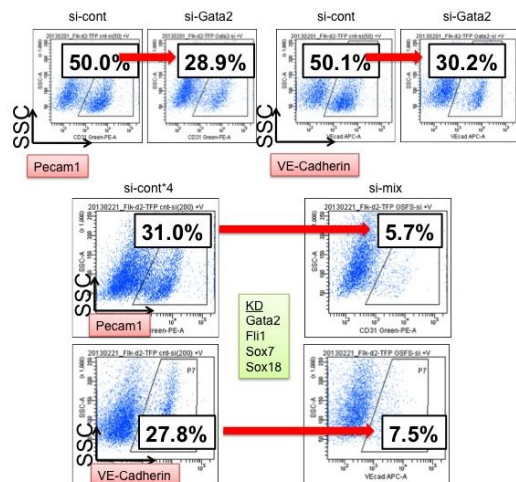
(3) 抽出したマスター転写因子候補のノックダウンによる分化誘導効率の検証

(1), (2) により 12 時間後に発現誘導される遺伝子の中から、マスター転写因子の候補として Gata2, Fli1, Sox7, Sox18 の 4 遺伝子を抽出した。これら転写因子の内皮分化に与える影響を調べるために、si-RNA を用いたノックダウン実験を行った。これまで ES 細胞は lipofection 法では si-RNA の導入効率が悪く、ノックダウン効率が悪いという欠点があったが、我々は導入法を工夫し、分化誘導後 72 時間、96 時間、Flik ソート直後の 3 回にわたって si-RNA を導入することで、各遺伝子の発現を mRNA レベルで 70% 以上落とすことができた。

この状態で VEGF 作用後 48 時間において FACS 解析を行い、血管内皮細胞表面マーカーの発現で分化効率を評価した。3 回の独立した実験において、上記 4 つの転写因子のうち、Gata2 は有意に Pecam1、VE-Cadherin の発現を抑制し、4 つ全てノックダウンすると、60% 以上の効率で内皮分化を阻害することが出来た (次ページ図)。

(4) 考察

本研究において、我々は transcriptome 解析とヒストン修飾解析をゲノムワイドに行い、そのデータを統合することで、分化系における新たなマスター転写因子候補を絞り



込む極めて有用な方法を確認した。

血管内皮細胞は ES 細胞からの分化系や、発生期における転写因子 ETV2 の重要性等が報告されているが、分化過程でどのような変化が起こっているのか、その分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、Gata2 を中心とした転写因子ネットワークの重要性を抽出した。

転写因子 Gata2 は進化の過程で幅広く保存されている Zinc finger ファミリーの転写因子である。これまでにそのノックアウトマウスの解析から、hemangioblast の維持に重要であること、血球系(特に hematopoietic stem cells や megakaryocytes) の発生、維持に寄与していることなどが報告されてきた。hemangioblast は血球系細胞、血管系細胞の元になる細胞である。本研究ではそのノックダウン実験より血管内皮細胞分化にも重要であることを示しており、血球、血管でその co-factor を変えることで運命決定を支持している可能性が示唆された。

一昨年、ヒト羊膜細胞から血管内皮細胞を直接分化誘導させる手法が報告された。この中では、ETV2、Fli1、Erg の 3 つの転写因子を経時的に発現させ、TGFβ のシグナルを阻害させることで更に効率よく誘導させることが可能となっている。本研究で抽出した経時的 transcriptome 解析からも ETV2、Fli1、Erg という 3 つの Ets ファミリー転写因子の発現は確認されている。Ets ファミリーが血管内皮細胞にとって重要であることは我々のグループを含めていくつも報告があるが、本研究では新たに Gata ファミリーの重要性を提唱している。

我々は最近、成熟したヒト皮膚微小血管内皮細胞を用いて、転写因子 Gata2 の ChIP-seq 解析を行い、Gata2 は Ets ファミリーや AP1 と相互作用しながら、内皮細胞特異性維持に寄与していることを報告した (Kanki Y et al 2011 EMBO J)。本研究の結果と合わせると、内皮細胞の形成及びその性質維持には Gata2 と Ets、Sox ファミリーの相互作用が重要である可能性が高い。

今後は、これら転写因子群が実際に相互作用しているどうか、血球と血管の分化の分か

れ目で Gata2 がそのパートナー因子を変えることで運命決定が行われるのかを検証することで、より詳細な機構が明らかになると期待される。

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 6 件)

1: Mimura I, Kanki Y, Kodama T, Nangaku M. 「Revolution of nephrology research by deep sequencing: ChIP-seq and RNA-seq.」 *Kidney Int.* 2014 Jan;85(1):31-8. 査読有、doi:10.1038/ki.2013.321.

2: Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M. 「GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation.」 *Genes Cells.* 2013 Nov;18(11):921-33. 査読有、doi: 10.1111/gtc.12086.

3: 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, Shibuya M. 「Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor-associated macrophages.」 *Cancer Res.* 2013 May 15;73(10):3019-28. 査読有、doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3231.

4: Papantonis A, Kohro T, Baboo S, Larkin JD, Deng B, Short P, Tsutsumi S, Taylor S, Kanki Y, Kobayashi M, Li G, Poh HM, Ruan X, Aburatani H, Ruan Y, Kodama T, Wada Y, Cook PR. 「TNF signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed.」 *EMBO J.* 2012 Nov 28;31(23):4404-14. 査読有、doi: 10.1038/emboj.2012.288.

5: Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro J, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y.

「Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A.」 *Mol Cell Biol.* 2012 Aug;32(15):3018-32. 査読有、doi: 10.1128/MCB.06643-11.

6: Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H, Nagano O.

「Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell.」

Nat Commun. 2012 Jun 6;3:883.査読有、doi: 10.1038/ncomms1892.

〔学会発表〕(計9件)

1: 神吉 康晴

「A novel epigenetic mechanism revealed tumor associated angiogenesis.」

第72回日本癌学会学術総会

パシフィコ横浜、神奈川県

2013年10月3日-2013年10月5日

2: 神吉 康晴

「Transcription factor GATA2 is indispensable for the differentiation and maintenance of vascular endothelial cells.」

第86回日本生化学会大会

パシフィコ横浜、神奈川県

2013年9月11日-2013年9月13日

3: Yasuharu Kanki

「Transcription factor GATA2 is indispensable for the differentiation and maintenance of vascular endothelial cells.」

The 11th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology

Hyatt Regency Jeju Hotel, Korea

2013年8月21日-2013年8月24日

4: 神吉 康晴

「Comprehensive analyses revealed the epigenetic switch during the endothelial cell differentiation.」

第12回日本再生医療学会

パシフィコ横浜、神奈川県

2013年3月21日-2013年3月23日

5: 神吉 康晴

「Two transcription factors mediated opposite chromatin conformation correlates with endothelial cell specificity」

第35回日本分子生物学会年会

福岡国際会議場、福岡県

2012年12月11日-2012年12月14日

6: Yasuharu Kanki

「Molecular mechanism about sustained VCAM-1 induction by the transcriptome and

epigenomic analyses」

第20回日本血管生物医学学会学術集会 (The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology)

徳島あわぎんホール、徳島県

2012年12月5日-2012年12月7日

7: Yasuharu Kanki

「The initiation step about the changes of transcription factor bindings and histone modifications is involved in sustained gene inductions」

Keystone Symposia 2013 Aging and Diseases of Aging

Sheraton Miyako Hotel Tokyo、東京都

2012年10月22日-27日

8: Yasuharu Kanki

「Regulation of the Endothelial-Mesenchymal Transition (EndMT)」

第71回日本癌学会学術総会

札幌市教育文化会館、北海道

2012年9月19日-21日

9: Yasuharu Kanki

「Epigenetic Switch on the Differentiation of Mouse Vascular Endothelial Cells」

International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting

2012年06月13日-2012年06月16日

Pacifico Yokohama、神奈川県

〔図書〕(計1件)

1: 神吉康晴

メディカルレビュー社、血管医学、2013年、9ページ

〔産業財産権〕

取得状況(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・神吉 康晴・未弘 淳一

権利者: 東京大学 TL0/JST

種類: PCT

番号: JP2014/051830

取得年月日: 2014年1月28日

国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ等

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