

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640069

研究課題名(和文) 内皮活性化エピゲノムスイッチの作動原理解明と創薬アプローチ

研究課題名(英文) Molecular mechanistic study for epigenome-switch on endothelial cell activation

研究代表者

南 敬(MINAMI, Takashi)

熊本大学・生命資源研究支援センター・教授

研究者番号：00345141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞は主に VEGF のようなサイトカインの刺激を受けて増殖することが、血管新生のきっかけとなる。そこで、この VEGF シグナルを包括的に探索したところ、転写因子 NFAT の核内移行に伴い、エピゲノムが変化する結果が得られた。特に SDF-1 のレセプターや RhoA のモジュレーターが NFAT によって制御され、血管新生機能に積極的に関わることを示された。またエピゲノムプロファイリングから転写のアクセルヒストンマークとブレーキマークが血管新生に必須な急性期応答転写因子群の制御領域に両方修飾されるが、本制御が VEGF 刺激下同一の内皮細胞で起こりうることを今回明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis based on the inner endothelial proper proliferation via growth factor or cytokines such as VEGF. We comprehensively surveyed VEGF signaling by using HUVEC, resulted the findings of dynamic epigenome alteration following the NFAT nuclear localization. ChIP-seq experiments by using the NFATc1 antibody resulted that SDF-1 receptor; CXCR7, and RhoA modulator, RND1 were newly picked up for the NFAT downstream angiogenesis regulator. Moreover, our epigenome profiling data indicated that bivalent histone marks which means double positive for transcriptional active; H3K4me3 and brake; H3K27me3, were enriched on the regulatory regions of acute angiogenic transcription factor family. Our ChIP-re chip experiment successfully indicated that such a bivalent histone modification was occurred in single cell level and not reflect the cell mixture condition from either only H3K4me3 positive cells and H3L27me3 positive cells.

研究分野：血管生物学

キーワード：エピゲノム制御 血管内皮細胞 VEGF ChIP-seq NFAT 転写制御 血管新生 ヒストンプロファイル

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解読の世界プロジェクト終了に伴い、これからはゲノムにコードされた因子をどのように発現するか、ヒストンを含めてどのようにゲノム全体をマーキングして機能あるいは細胞分化調節を行うかというエピゲノム解析が重要度を増している。一方でこれら基礎的研究をふまえて、高齢化社会を迎えた日本全体でのニーズとして見た場合、年々増加している脳卒中、心筋梗塞の素因となる動脈硬化、血栓症や病的血管新生に起因するがんでの死亡率減少が急がれている。特にがんにおいては再発、転移防止が今後の重要課題であり、これにはがん微小環境の詳細説明が不可欠である。この日本人の三大疾病(がん・脳梗塞・心疾患)の病態には必ず血管が密接に関与しておりその根本原因となり得ることから、まず血管構築の基礎となる内皮細胞に重点をおき、その恒常性維持原理や活性化メカニズムを解明するのが急務であると考えられる (Minami, *Genetics of angiogenesis*, chapter I, 2003)。そこで我々は血管内皮細胞が微小環境因子の刺激を受けて活性化される推移をエピゲノム制御を介した遺伝子のダイナミックな変化から捉え、これまでヒト正常血管内皮細胞や ES 細胞からの内皮分化系を用いて、網羅的発現アレイ (*Trends Cardiovasc. Med.* 2005) や次世代高速シーケンサーによる内皮制御転写因子の ChIP-seq、及びヒストンプロファイリングを行ってきた。その中で、VEGF シグナルでのヒストンダイナミズムを ChIP-seq から取得し、VEGF 依存的な血管新生に必須の転写因子のゲノム locus に限って転写のアクセルマーク (H3K4me3 修飾) とブレーキマーク (H3K27me3 修飾) の共存 (bivalent) 状態になっており、VEGF 刺激に応じてアクセルマークが増大し、一過性の転写反応が生じる新事実を見出している。しかもこのアクセルヒストンマークを入れるトリソラックス酵素複合体をゲノム上にもっていく内皮特有のアダプタータンパクを miRNA や siRNA にてノックダウンした場合、病的血管新生のみが遮断され、内皮恒常性を保つ因子群には一切影響を与えないことから、創薬シーズとしても期待されている。

2. 研究の目的

このことを踏まえ、本研究では VEGF を介した内皮活性化時において特定の転写因子群が、これまで ES/iPS 細胞分化スイッチ機構で認知されていた bivalent ヒストン修飾を受けていることを実証すること、トリソラックス酵素複合体のアダプタータンパクの効率良い抑制が *in vivo* レベルでも血管新生やがん増殖抑制に寄与していることを確認し、そのエピゲノム分子制御メカニズム

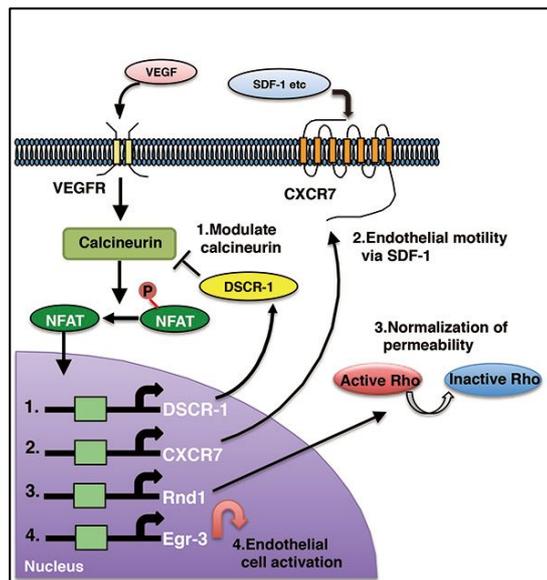
を解明すること、この二つに焦点をおいて推進することを考えた。これらの研究を介して抗血管疾患・がん治療という社会的ニーズに応えるエピゲノム創薬や DSCR-1 ブレーキシステムの効率良い応用法に繋げていくことを目的とする。

3. 研究の方法

血管内皮細胞が VEGF 刺激を受けて早期活性化する仕組みを解明するため、HUVEC を用いて時間分解能を上げた 0,15,60 分での発現アレイや mRNA-seq を追加する。NFATc1 及びヒストン抗体 (H4Ac, H3K4me3, H3K27me3)、実際の転写を表すリン酸化 RNA polymerase II の抗体を用いた ChIP-seq を VEGF 刺激 0, 1 時間で validate する。HUVEC はヒト個人差を平均化するため、複数ドナーをプールしたもの (LONZA 社から市販) を購入し、継代は 12 回まで行った。RNA 精製後、発現アレイは Affymetrix U133.2.0 を用い、測定条件は affymetrix の規定の手法に従い行った。また、ChIP-seq の手法に関しては、コンフルエント HUVEC をホルマリン固定し、既報論文 (Kanki, and Minami et.al. *EMBO J.* 2011 30, 2582-95) に示したとおりに行った。また NFATc1 抗体を用いた際の条件は *J.Biol.Chem.* (Suehiro and Minami, et.al. 2014 289, 29044-59) に記載した。

4. 研究成果

**VEGF 刺激前後におけるヒストンプロファイリングと NFATc1 ChIP-seq の統合：活性化プロモーターマークとして H3K4me3、活性化エンハンサーマークとして H4Ac、H3K27Ac、抑制マークとして H3K27Ac、実**

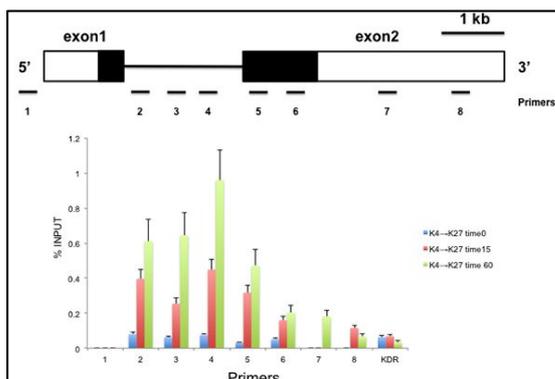


際の転写を表すリン酸化 RNA polymerase II 及びゲノム locus での mRNA 発現を示す mRNA-seq について完了した。さらに、このヒストンプロファイルに VEGF シグナル伝達の一つの key factor である NFATc1 に着

目した ChIP-seq データを統合し、このデータを公表した (Suehiro, et.al. *J.Biol.Chem.* 2014)。カルシニューリン-NFAT の feedback modulator である DSCR-1 や NFAT 下流の転写誘導因子 EGR3 のみならず、SDF-1 のリガンドである CXCR7 や Rho 活性化 modulator である RND1 が NFAT の直接のターゲットであり、血管遊走、血管新生に直接関与していることを明らかにした。

#### VEGF 活性化エピゲノムスイッチの同定:

VEGF 刺激前後の発現アレイと方法論で示した各ヒストン抗体を用いた ChIP-seq を統合したプロファイルを作製した。VEGF-calcineurin-NFAT 経路の標的遺伝子である急性期転写因子 Egr-3 や核内受容体 NR4A2/3 をもとに、内皮早期活性化を制御する転写因子特有の bivalent マークを同定した。転写因子 Egr-3 locus で見た場合、VEGF 刺激を受けて H3K4me3 アクセルマークが 15 分から上昇するが、H3K27me3 転写抑制マークは ES/ iPS 細胞の分化システムと違い全く減少していない。これは概念的に新規なものであるが、'bivalent' であることを確実に立証するために、H3K4me3 抗体で ChIP した産物に、H3K27me3 抗体で re-ChIP する手法を行い、Egr3 locus など今回着目した領域にのみ実際にこのエピゲノム bivalent スイッチが存在していることを明らかにした。また、通常強く転写活性化される遺伝子制御



領域には活性化 Pol II 結合が濃縮する前に H3K27Ac (エンハンサーマーク) がゲノムブラウザー上で認められることが報告されている (Stasevich and Kimura, et.al. *Nature* 2014)。しかし、この VEGF 活性化 Bivalent スイッチでは例外的に全く H3K27Ac の濃縮が認められない結果となった。もし、エピゲノム修飾が細胞間で混在している状況であって、アクセルとブレーキヒストンが共に存在する bivalent でなかった場合、細胞をバルクでみる ChIP-seq の系だと H3K27Ac の濃縮が転写時に連動するはずであり、このことから内皮 Bivalent スイッチの存在を意図している。この H3K4me3 修飾を入れるトリソラック

ス酵素のアダプタータンパクである PTIP が siRNA ノックダウンの実験から本 VEGF 応答早期転写活性化に必須であることが明らかになったが、この PTIP と転写因子 NFAT1 が物理的に結合していること、VEGF 刺激に応じて NFAT-PTIP 複合体が核内移行し、NFAT 認識配列を介して PTIP-トリソラックス酵素複合体が領域特異的に bivalent 状態を導く分子メカニズムが明らかになった (Minami, Kanki, Black, et.al. manuscript in preparation)。

#### 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)

1. Suehiro, J.I., Kanki, Y., Makihara, C., Schadler, K., Miura, M., Manabe, Y., Aburatani, H., Kodama, T., and 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 endothelium. *J.Biol.Chem.* 2014 **289**:29044-59.
2. Arita, Y., Nakaoka, Y., Matsunaga, T., Kidoya, H., Yamamizu, K., Arima, Y., Kataoka-Hashimoto, T., Ikeoka, K., Yasui, T., Masaki, T., Yamamoto, K., Higuchi, K., Park, J.S., Shirai, M., Nishiyama, K., Yamagishi, H., Otsu, K., Kurihara, H., Minami, T., Yamauchi-Takahara, K., Koh, G.Y., Mochizuki, N., Takakura, N., Sakata, Y., Yamashita, J.K., and Komuro, I.\* Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart *Nat. Commun.* 2014 **5**: 4552
3. Enomoto, S., Mitsui, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Daigo, K., Horiuchi, K., Minami, T., Kodama, T., Hamakubo, T.\*. Suppression of Slit2/ROBO1 mediated HUVEC migration by ROBO4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 **469**: 797-80.
4. Nagai, N., and Minami, T.\*. Emerging role of VEGFC in pathological angiogenesis. *eBiomedicine* 2015 **2**: 1588-90.

[学会発表](計 7 件)

- T. Minami, The Down syndrome critical region (DSCR) gene 1 is critical for the regulation of proper vessel formation and vascular inflammation, 2015.7.4-7.7., Hostital Piteie Salpetriere, Paris France, 1<sup>st</sup> international conference of trisomy 21 research society.
- T. Minami, NFAT-related Down syndrome and epigenome factors regulated VEGF-endothelium activation switch in tumor microenvironment. 2015.10.8-10.10.
- 名古屋国際会議場、日本がん学会指定シンポジウム

永井 直、南 敬、血管内皮細胞における ERG 及び FLI1 の発現低下が EndMT を誘導する 2015.12.10-12.12., 神戸国際会議場、日本血管生物医学会総会

T.Minami, The Down syndrome critical region (Dscr) gene-1 is critical for regulation of proper vessel formation and vascular-lipid homeostasis. 2015.9.4-9.5., ヒルトン福岡シーホーク、第 6 回 Molecular cardiovascular conference II

南 敬、VEGF 活性化内皮細胞における動的なエピゲノム転写機構解析 2015.12.1-12.4 神戸ポートピアホテル、BMB2015

T.Minami, Genome-wide analysis for endothelial cell activation, 2016.3.17., Folkman Auditorium Harvard, USA, Wide vascular biology seminar series in Harvard.

南 敬、ダウン症因子 DSCR-1 の血管機能～両刃の剣～2016.3.26-3.29., パシフィコ横浜、日本薬学会シンポジウム

〔図書〕(計 3 件)

1. 南 敬、止血・血栓症に関連する Omics 網羅的解析の動向 「新・血栓止血血管学」検査と診療、金芳堂 2015
2. 南 敬、NFAT-ANG-2 による内皮活性化とダウン症因子 DSCR-1 アクセル/ブレーキ内皮恒常性システムと抗がん制御、秀潤社、細胞工学 2015
3. 血管医学 (第 64 号) 招聘 Editor 南 敬、特集「網羅解析からの血管研究アプローチ」2014 年メディカルレビュー社

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 敬 (MINAMI, Takashi)  
熊本大学生命資源研究支援センター/大学院  
生命科学部 教授  
研究者番号：00345141

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
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