

血管内皮活性化の分子機構システム解析

熊本大学生命資源研究・支援センター / 大学院生命科学研究部

表現型解析分野

南 敬

1. 目的: 現代の高齢化社会において動脈硬化、血栓症や病的血管新生に起因するがん増殖、転移での死亡率は年々増加する傾向にある。これら日本人の三大疾病には必ず血管が密接に関与しておりその根本原因ともなり得る一方、これら血管疾患は臓器特異的に血管恒常性の破綻した部位に局限して生じる特徴を有する。この発症機序を解き明かすには、まず血管構築の基礎となる血管内皮細胞に焦点をおき、その恒常性維持機構・病的活性化原理を解明するのが急務である。体全身に行き渡る内皮細胞のゲノム情報は同一であるにもかかわらず、血管形成期において動静脈が運命付けられる先天的事象や各臓器の微小環境要因に応じて臓器血管特異的な遺伝子が発現する後天的制御を考慮すると、エピゲノムによる転写制御が内皮多様性獲得の鍵を担っていることが予想される。しかも内皮細胞は微小環境変化 (アクセセル刺激) に迅速に応答し、フィードバックシステムを備えた時系列転写反応を行う動的な特徴も有しており、その活性化ダイナミズムを解明するためには増殖・凝固・炎症性因子を用いた包括的発現アレイや、次世代シーケンサーを用いたヒストンプロファイリングが有効で、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た系で、内皮を規定する転写因子の発現カスケードや内皮活性化制御に関わる固有なエピゲノム修飾の発見、VEGF シグナルの内因性フィードバックシステムの本体であるダウン症関連因子 (DSCR)-1 の機能解明を行ってきた。これらの機能解析をシステムアプローチに適した培養内皮細胞を用いてさらに探究することに加えて、今後は見出した事象が実際生体内のどの臓器血管に、かつどの病態にあてはまるか考慮して進めていくことが大事である。そこで 1.アクセセル刺激を受けた内皮細胞が恒常性を維持するために行う動的エピゲノム変化を NFAT シグナルを中心にゲノムワイドに解析すること、2.アクセセル刺激が異所的にあるいは制御範囲を超えて生じた場合、内皮恒常性が破綻し血管疾患へと繋がっていくが、その作動原理を担う疾患関連因子の同定や、その発現制御を解明すること、3.DSCR-1 (プレーキ)欠損マウスやダウン症モデルマウスを用いてその治療効果を確認すること、この3つの系を推進し内皮基礎研究から実情に即した臓器血管特異性を考慮した創薬シーズを見出す体制を図ることをねらいとする。

2. 方法: 内皮エピゲノム変化をまずゲノムワイドに解析するために初代正常内皮培養細胞として安定的なヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) や野生型及び病態モデルマウスから単離・培養した肺内皮細胞 (MLEC) を選択した。これらの細胞を内皮専用培地にてサブコンフルエントの状態まで増殖培養し、その後血清や増殖因子を除いた最少培地で馴化させた後、主に VEGF (50ng/ml) 刺激を経時的に行い表現型解析を行った。クロマチン免疫沈降 (ChIP) やその後の次世代シーケンスは既報に従い行った。ダウン症モデル (DSCR-1^{-/-} や DSCR-1 内皮特異的トランスジェニック (Tg) マウスや動脈硬化モデル (ApoE^{-/-}) マウスは既存計画によって樹立または維持されており、その掛け合わせや genotype も行った。動物実験に関する操作、戦略は東京大学及び熊本大学における規定に則り実施した。

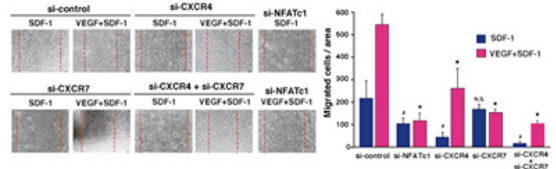
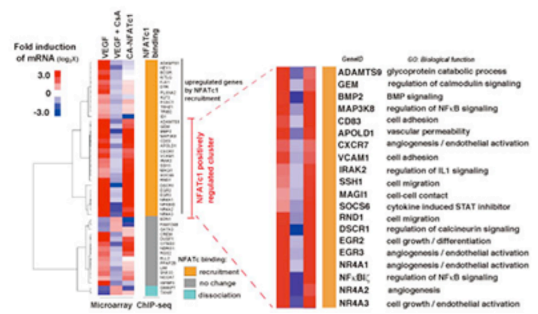
3. 結果:

1). VEGF-NFAT シグナルにおける内皮機能システム解析

HUVEC に VEGF 刺激を加えた際の早期エピゲノム変化をグローバルに探索するため、VEGF 刺激1時間、更に calcineurin-NFAT 系路の阻害剤 Cyclosporin A (CsA) を前処理したグループとconstitutive active (constitutive nuclear localized)-NFATc1 のアデノウイルスを VEGF 非存在下処理したものでマイクロアレイを行った。VEGF で誘導される 416 遺伝子のうち、193 遺伝子は constitutive-NFATc1 にて誘導されるものと合致していた。一方 VEGF にて発現抑制される早期遺伝子数は 12 と少なく、constitutive-NFATc1 との合致はわずか 3 遺伝子であった (この中には内皮特異的発現を担う新規遺伝子 FAM が含まれ、転写因子 GATA2/3 や ERG によって制御されていた)。次に、VEGF 刺激に伴うエピゲノム変化を追跡するため、刺激 0, 1 時間におけるエンハンサーヒストンマーク (H4Ac) やプロモーターマーク (H3K4me3) の動態や NFATc1 自体のゲノムワイド結合様式について各抗体を用いて ChIP-seq を試みた。その結果、NFATc1 の結合部位は遺伝子骨格の転写開始点近傍 (<1kbp) や 5'非翻訳領域に半数以上が濃縮しており、coding 領域や遺伝子間に位置づけられる結合は他の転写因子に比べ少ない傾向になった。また、NFAT にて濃縮されたクロマチン配列を探索すると、非常に有意な (E-value <30乗) 転写因子結合配列として上位3つは NFAT、C/EBP、CREB1 であった。また VEGF 刺激前後において結合プロファイルは NFATc1 濃縮部位とプロモーターマーク H3K4me3 は類似傾向に有り、エンハンサーマーク H4Ac のプロファイルは VEGF 刺激後の NFATc1 と同同性を示すことから、NFATc1 は主にプロモーター近傍領域の既にクロマチンが開いた状態での NFATc1 認識領域に受動的に結合でき、転写活性化因子として機能することがゲノムワイドスケールにて明らかとなった。さらにマイクロアレイでの heat map と NFATc1 の ChIP-seq を組み合わせたと、VEGF 刺激にて誘導され、CsA 処理にて誘導が阻害されるもの、かつ constitutive active NFATc1 処理のみで誘導される遺伝子群の殆ど

の発現制御領域において NFATc1 の ChIP 濃縮が認められ、特に VEGF 誘導が顕著な19遺伝子を特定した (右図)。この中には、これまで我々が内皮恒常性や血管新生に必須として報告したダウン症関連因子 (Dscr-1) や転写因子 Egr3、増殖因子 Vcam-1、サイトカイン Bmp2 が含まれた。

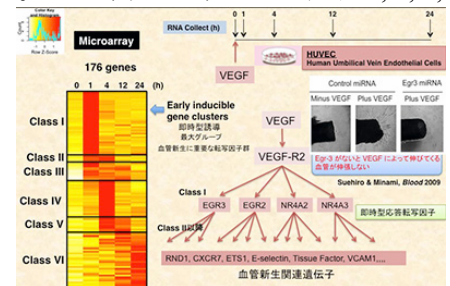
このクラスターの中で NFAT や VEGF 誘導との相関が知られていない Cxcr7 や Rnd1 遺伝子に着目して血管新生活性との関与を解析した。CXCR7 は長年 orphan レセプターであったが CXCL12 (SDF-1) リガンドのレセプターとして活性が認められ、既知の CXCR4 レセプターとの協調作用や競合作用、腫瘍血管特異的な発現などが報告されている。筆者はこの Cxcr4 プロモーターの -439bp に位置する NFAT 結合シスエレメントの働きで VEGF 応答性や NFAT による発現誘導が担われていること、さらに実際に内皮膜表面に VEGF 刺激下発現されることが、CXCR7 特異的抗体を用いたフローサイトメリーより明らかとした。次に CXCR4 と CXCR7 の血管新生における関係について解析した。リガンドである SDF-1 は内皮周囲の壁細胞や繊維芽細胞で発現が高く、VEGF 同様内皮細胞の遊走活性を示すので、NFAT, CXCR4, CXCR7 に対する siRNA を処理した条件下比較した。CXCR4, CXCR7 ノックダウン条件下における SDF-1 遊走阻害は各々70%程度認められ、両方のレセプターをノックダウンすることで SDF-1 に対する内皮遊走が喪失する結果となった。更に invasion assay の系では VEGF と SDF-1 が相乗的に内皮遊走活性を向上させるが、CXCR7 をノックダウンしたときのみ相乗的な遊走活性が無くなり、SDF-1 単独投与での遊走レベルと似た活性を示すこと、CXCR4 ノックダウン時のほうが、CXCR7 ノックダウン時よりも有意な SDF-1 依存的遊走活性の低下が認められることから、定常時内皮細胞では CXCR4 が発現し、SDF-1 依存的な遊走・増殖活性を示すが、VEGF 誘導時では CXCR7 の内皮発現も上昇し、SDF-1/VEGF における協調的な内皮遊走増殖活性を引き起こすこと、内皮細胞の系では CXCR4, CXCR7 独自にレセプターとしての機能を有することが強く示唆された (右図)。また、マウス Cxcr7 に対する siRNA も作製し、aortic ring アッセイを行い、VEGF 依存的な管腔形成や血管新生反応に CXCR7 が positive に関与していることも明らかとなった。



一方、RND1 は RhoA に対する拮抗的な作用を持ち、細胞遊走や透過性を制御していることが知られている分子である。Rnd1 のプロモーター領域 (転写開始点から1kbp以内) に 2 つの、2.5 kbp 以上上流のエンハンサー領域に 8 つの NFAT 結合シスエレメントが存在し、いずれも VEGF 依存的な NFATc1 結合活性上昇効果を ChIP-seq からでも示すが、特にエンハンサー領域のシスエレメントが機能的な VEGF 応答転写促進に関与していることが明らかとなった。HUVEC に Rnd1 のノックダウンを行うことで、RhoA の hyper-activation が生じ、透過性が 200 倍以上亢進すること、その効果は VEGF 存在下 NFAT をノックダウンした時に匹敵すること、VEGF 依存的な細胞遊走能も si-RND1 処理下大きく上昇することが明らかとなった。更にマウス Rnd1 に対する siRNA も構築し、aortic ring アッセイを行ったところ、VEGF によってもたらされる管腔形成の伸びが Rnd1 ノックダウンによって更に亢進すること、その一方で管腔基底 (aortic ring 付近の管腔根元部) での血管構造が疎になっていて、異常な血管新生が促進していることが推察された。RhoA hyper-activation によって血管伸張は促進されるが、透過性維持や血管安定化に関与する Rnd1 の発現が伴わないことによって非機能的な血管新生が促進されたものと思われる。

2). VEGF 刺激でのヒストンプロファイル作製

内皮細胞に VEGF 刺激を加えた際のトランスクリプトームは筆者を含め行われ報告されているが、ヒストンプロファイルの変化と並列比較し、遺伝子発現制御を考慮した系は未開拓である。そこで、改めて、VEGF 刺激 0, 1, 4, 12, 24 時間のタイムコースでもって 2 回の独立したアレイを実施し、誘導される 276 遺伝子を抽出し、誘導パターンから右図に示されるクラスターやカスケードを作製した。最大グループは早期誘導型であり、上述した NFAT 活性化に基づくものが顕著であるが、早期誘導型転写因子の働きでもって血管新生に関連づけられる遺伝子が発現する転写ピラミッドやカスケードが成り立っていることが判明した。この早期誘導型転写因子は血管新生に必須な EGR3, EGR2, NR4A2, NR4A3 などが含まれており、この遺伝子発現パターンをヒストンの動態変化と比較した。そこで、0, 15, 60 分のタイムコースで active promoter マークである



H3K4me3、Active enhancer region を示す H3K27Ac、プレーキマークである H3K27me3、開始型及び伸張型ポリメラーゼ II を意味する Ser5 及び Ser2 リン酸化ポリメラーゼ II の抗体を用いた ChIP-seq を行った。その結果、恒常的な発現を示す VEGFR2, vWF、持続的誘導を示す PAR2, CCL2 などの多くの遺伝子と異なり、一過性発現を示しかつ血管新生に必須な転写因子群に限定した特殊な H3K4me3, H3K27me3 positive-bivalent ヒストン修飾が成り立っていることが認められた。この VEGF 刺激に応じて H3K4me3 修飾を入れる酵素群は MLL のうち、MLL3/4 であり、そのアダプタータンパクを見出したことが大きな進展である。このアダプタータンパクを siRNA あるいは miRNA でノックダウンすると、定常状態での内皮恒常性には全く影響を与えないが、血管新生急性期誘導転写因子の発現を全てキャンセルし、VEGF 依存的な管腔形成能やがん進展を効果的に抑制出来た。また、このアダプタータンパクは DNA や RNA 配列を認識できるドメインを持っていない

いが、VEGF 刺激前からその N 末ドメインが NFAT と結合しており、VEGF 刺激に応じて NFAT と共に核内移行することが認められた。即ち、MLL を目的遺伝子にガイドする機構として MLL アダプターが特定の刺激応答性転写因子と複合体を形成し、配列認識能を持つことが想定された。一方、ES/iPS 細胞の分化誘導時と異なり、この内皮 VEGF 誘導での bivalent 修飾ではブレーキヒストンである H3K27me3 が EGR3 などの急性期因子誘導時において全く減少しない。そこで、H3K27me3 修飾においてポリコーム複合体が関与しているか包括的に解明を進めた。まず、ポリコーム複合体のうち、PRC2 複合体が本当に制御に関与しているのか確かめるために、Ezh2 の siRNA を用いて VEGF 刺激誘導での変化を解析した。その結果、bivalent 制御を受けない大半の遺伝子では想定通り、発現は変化しないか、上昇する結果となるが、bivalent 修飾をもつ急性期転写因子群では逆に発現が抑制されるデータとなった。また最近 PRC2 複合体からヒストン H2A の K119 のユビキチン化を行う PRC1 複合体を経てクロマチンが凝集する conventional な抑制機構に加えて、PRC1 バリエント複合体が PRC2 複合体の H3K27me3 修飾の認識に先んじてクロマチンにアクセスすること、さらに PRC1 バリエント複合体のうち、神経分化の系では PRC 1.5 (PCGF5 をもつ PRC1 複合体)が p300 を標的クロマチンに動員させて転写促進に寄与することが報告されている。そこで筆者らの内皮誘導系において PRC1 バリエントの存在を確認したところ、神経細胞とは異なる PRC1 バリエントがこの急性期応答型転写因子群の誘導に関わっており、そのバリエント特異的ノックダウンの系で標的遺伝子の VEGF 応答性が消失することが確認出来た。即ち内皮細胞での VEGF 誘導において、PRC1 バリエントが目的遺伝子にアクセスし、一過的に発現を促進させ、その後 PRC2, PRC1 結合でもって発現を閉じることが示唆された。

3). ダウン症モデルにおける病態解析

DSCR-1 ノックアウトマウス及び、ダウン症モデルマウスとして DSCR-1 内皮特異的な doxycycline 応答性 Tg マウスを樹立した。DSCR-1 の conventional な BAC Tg マウスは胎生致死となることが報告されているが、DSCR-1 内皮特異的 Tg においても最も発現量が多いと想定される VE-cadherin-tTA トランスジーンと TRE-DSCR-1-IRES-lacZ トランスジーンが共にホモになるパターンは産まれず致死であることが想定された。また、LacZ の発現量でもって DSCR-1 の発現を考慮した場合、LacZ の発現量が多いほど、胎仔が規定サイズよりも小さく、また血管分岐パターンの異常が顕著に認められた。更に MLEC を採取して培養を行うと passage を重ねるにつれて lacZ の発現が減少する結果が得られた。ホモマウスが胎生致死であることを考慮すると、DSCR-1 発現カセットをもたない内皮細胞が増殖過程において優先的に選択されて血管構築がなされることが想定された。

4). がん微小環境下における内皮間葉系形質転換 (EndMT)

内皮細胞分化において重要な転写因子 ERG, FLI1 を共にノックダウンすることで EndMT を引き起こす事象を再現し、かつ EndMT 時における内皮発現プロファイルや ERG, FLI1 抗体での ChIP-seq をゲノムワイドに取得した。その結果、ERG, FLI1 共に内皮特異的マーカー遺伝子の発現を促進させる領域に結合出来、H3K4me3 修飾と重なる受動的な転写因子パターンであることが判明した。

4. 考察

結果 1)-4) のうち、本研究計画に合致した、特に基本的な内皮活性化の *in vitro* HUVEC での分子生物学的解析に集中して記載したが、VEGF 刺激では早期に多くの遺伝子が誘導されること、その多数が NFAT 活性に基づくものであることが示唆された。更に NFAT 核内移行に伴って、NFAT 結合性の MLL3/4 アダプター因子がガイド因子として働き、血管活性化に関わる即時型転写因子群の発現誘導に関わっていること、即時型転写因子群はこれまで報告されていない特殊な bivalent 修飾を発現制御領域で引き起こし、PRC1 variant-PRC2-PRC1 の順でポリコーム複合体がスイッチしていく中で PRC1 variant が一過的に転写促進に転じることから極めて特殊な一過性転写発現が形成されていることが推察できた。これら *in vitro* データを基に *in vivo* マウス解析での応用を進めていく計画であるが、特に NFAT フィードバック阻害作用を持つ DSCR-1 Tg は VEGF からの早期転写シグナルが阻害されるため、分岐異常や胎仔増殖遅延が生じることが認められた。本仕組みや EndMT の仕組みを解明し、抗がんへの新規手法に繋げることを構築していくことが肝心と思われる。

5. 参考文献

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.

Suehiro, J., Hamakubo, T., Kodama, T., Aird, W.C., and Minami, T.: Vascular endothelial growth factor activation of endothelial cells is mediated by early growth response-3. *Blood* 2010 **115**: 2520-32.

Baek, K.H., Zaslavsky, A., Lynch, R.C., Britt, C., Okada, Y., Siarey, R.J., Lensch, M.W., Park, I.H., Yoon, S.S., Minami, T., Korenberg, J.R., Folkman, J., Daley, G.Q., Aird, W.C., Galdzicki, Z., and Ryeom, S.: Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 2009 **459**: 1126-30.

Gao Z, Lee P, Stafford JM, von Schimmelmänn M, Schaefer A, and Reinberg D: An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature.* 2014 **516**:349-54.

Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL, Ito S, Cooper S, Kondo K, Koseki Y, Ishikura T, Long HK, Sheahan TW, Brockdorff N, Kessler BM, Koseki H, and Klose RJ: Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell* 2014 **157**:1445-59.