

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	血管内皮エピゲノム転写調節機構解明に基づくダウン症・抗がん治療へのアプローチ
研究機関・部局・職名	東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授
氏名	南 敬

【研究目的】

現代の高齢化社会において、脳、心筋梗塞の素因となる動脈硬化、血栓症や病的血管、リンパ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。これらの疾病の根本原因となる血管疾患、特にその悪性化の機序を解明するには炎症性因子の存在、血管リンパ管微小環境を綿密に調べていくことが必須である。特に血管系の基礎を構築する内皮細胞は一層からなるが微小環境制御を受けて変動する非常に動的な細胞である。このことを踏まえ、これらの血管疾患誘発刺激に応答する内皮細胞での遺伝子発現変化、エピゲノム変化を網羅的に追跡し、かつその制御機構を詳細に解析していくことが重要となってきた。そこで研究代表者らはまず VEGF や thrombin で共通して最大に強く誘導されたダウン症候群関連因子 Down Syndrome Critical Region (DSCR)-1 short form (DSCR-1s) に着目し、この DSCR-1s が転写因子 NFAT/GATA によって誘導され、calcineurin/NFAT の更なる活性化を阻害する内因性 feedback 機能を持っていることから、DSCR-1s の血管機能における更なる *in vivo* 解析 (VEGF や thrombin による炎症、遊走、血管新生や xenografts での腫瘍進展) を推進することを計画した。また研究代表者らが見出した VEGF/thrombin signal において 2 番目に強く誘導される NFAT mediator である転写因子 Egr-3 や、Egr-3 の標的因子活性化に重要で、NFAT 複合体に含まれる転写因子 GATA の網羅的機能探索も先端的な内皮機能解明に重要となることが予想された。

一方、ダウン症は 21 番染色体がトリソミーになることが原因の最も高頻度 (700 分の 1 の確立) に生じる遺伝病であることは認知されていたが、分子レベルでの解明が最近まで全く進んでいなかった。しかし 2006 年末にスタンフォード大、Crabtree らが、21 番染色体に位置する DSCR-1, DYRK1a の過発現によって生じる NFAT の完全不活化がダウン症の主因となることをモデルマウスと数理モデルでもって明らかにして以来、DSCR-1 と神経疾患についてクローズアップされてきている。実際、神経系や白血病細胞に発現する DSCR-1 long form (DSCR-1L) は酸化ストレスに対する神経の保護作用を有する一方、高発現した場合での神経毒性・アルツハイマー病誘起など相反する作用が報告されている。他方、研究代表者らは血管からのアプローチに特化し、ダウン症患者が固形がんにかかりにくいこと、及び動脈硬化を起こさない疫学データをヒントにして DSCR-1s による優れた利点を報告してきた (Minami, Aird, Sandra, et al. *Nature* 2009, *J. Clin. Invest.* 2009)。これらのこ

とを踏まえ、本研究では DSCR-1s, DSCR-1L 両アイソフォームの発現・機能比較、NFAT, Egr-3 転写ネットワーク解明を内皮細胞で行い、かつ内皮活性化エピゲノム変動の包括的探索から血管微小環境への寄与をゲノム解析技術を駆使して系統的に解析し、副作用の少ない抗血管疾患・抗がんに対する治療戦略を構築することを目標とした。

本研究において実施する細目については、基礎的機能面での解明においては転写因子 GATA, Egr, NFAT の標的因子探索並びに、転写因子 ChIP-seq とヒストン修飾マップを融合した網羅的内皮エピゲノム解析を進めること、DSCR-1 両アイソフォームの特異的抗体樹立から各 DSCR-1 の細胞内挙動（複合体形成、安定性、NFAT の活性調節）や体全体（血管、脳神経、がん）での発現時期、特異性を明らかにすること、さらに DSCR-1 の抗腫瘍活性、抗炎症活性の実体を分子レベルで解明するため、DSCR-1 欠損マウスを用い、腫瘍環境下、肺やリンパ管へのがん転移時における微小環境変化や APO-E 欠損マウスとの掛け合わせによる動脈硬化性疾患の実態を追跡することを基本とした。一方、抗疾患応用研究としては DSCR-1s の内皮安定発現ベクター開発及び DSCR-1 内皮特異的発現トランスジェニックマウス樹立から DSCR-1s の抗炎症、がん転移抑制作用を実証すること、内皮特異的 Egr-3 欠損マウスと Egr-3 特異的抑制法の樹立から、抗腫瘍活性を実証すること、ES を含めた未分化細胞から内皮分化への手法を確立すること、上記3点を優先し、また転写エピゲノム解析から明らかになった下流標的因子のうち、特に膜タンパクが重要である場合には抗体がん治療への応用性を目指し、高機能性抗体樹立から改変、小動物 *in vivo* 投与までの手順を連続的に進めていくことを計画した。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は VEGF や thrombin により発現が制御される遺伝子 (DSCR-1, Egr-3) が血管形成の際にどのような機能を有するかを解明し、その発現調節機構をエピジェノミック機構を含めて明らかにすることを目的として研究が遂行された。これまでに内皮細胞における GATA2, STAT6, Egr3, NFATc1 の ChIP-seq やヒストンプロファイルを取得し、内皮活性化におけるゲノムワイドな解析と制御メカニズムの全貌把握に向けて研究を行った。また、ダウン症モデルマウスと肺がん転移研究から VEGF-VEGFR niche の形成や臨床検体における NFAT niche の存在を確認した。一方で、Egr-3 のノックアウトマウスの樹立は組み替え *egr-3 null ES* 細胞ではキメラ化に至らないなどの困難な点があり、計画を中断した。このように遂行困難な計画については、優先

順位をつけて対応し、他の方法により目的を達成しようとする姿勢が見受けられた点は評価できよう。DSCR-1 抗体については short form に特異的なウサギポリクローナル抗体を得た。

研究代表者が研究期間中に特任准教授から特任教授へ昇任、責任著者として、EMBO J、MCB、Cell Report など国際的な一流誌に論文が発表された。ダウン症の症状と血管異常との関連が明らかになれば社会的な波及効果も期待される。特許出願もなされており、全体的に研究が順調に進行していることがうかがえる。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題は VEGF や thrombin により発現が制御される遺伝子 (DSCR-1, Egr-3) に関する研究を行い、Egr3 周辺遺伝子の解明に関しては、GATA2、STAT6、NFATc1 の連動的発現制御、機能制御について明確にしてきており、順調に研究が進行した。

VEGF 活性化のエピゲノムスイッチの同定と機能の解析、新規 NFAT 標的遺伝子の同定と機能解析、ダウン症モデルマウスからのがん転移機能の解析、内皮分化のエピゲノム解析など当初計画した研究の多くが順調に進行し、論文発表済みもしくは準備中と思われる。一方で DSCR1 モノクローナル抗体の作製、Egr-3 ノックアウトマウスなど一部停滞している研究もあるが、優先度をつけて研究を進めた。DSCR-1 のモノクローナル抗体が作成できなかった理由として、DSCR-1s のエピトープとなりうる部分が他の分子と結合しているためにマスクされてしまう可能性を示唆している。一方で、short form に特異的なウサギポリクローナル抗体を得るなどの工夫が見られる。モノクローナル抗体の作成がうまく行かなかったこと、Egr-3 ノックアウトマウスなど一部停滞したことなど、困難なこともあったが、全般的には重要な研究課題について NEXT プロジェクトに相応しい成果が得られたと思われる。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が (ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が (創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

生物学的には面白い研究を行っている。血管新生の早期活性化制御に関わる転写因子の多くが、VEGF の刺激によりエピゲノムとして、活性化と抑制化の両方のマークが入っている状態があることを発見しており、血管新生の on, off を制御する新規治療法の開発につながる可能性があり、特許出願している点は先進性・優位性がある成果と言える。

内皮活性化に特徴的なエピゲノムスイッチを発見し、VEGF 活性化、血管新生に必須の転写因子に限ってアクセルマークとブレーキマークの共存状態になっているこ

とや ES 細胞の分化系について、内皮分化を規定するのに重要な転写因子のカスケードを同定し、GATA2 に加えて ETV2 の重要性を明らかにするなど、先進性の高い成果と言える。

DSCR-1 ノックアウトマウスを用いたがん転移の解析では、前転移ニッチ領域の血管内皮細胞において、VEGFR2 の活性化が DSCR-1 の有無により変化しうることを示した。血管ニッチ形成における DSCR-1 の機能の一端が観察できており、興味深い成果が得られている。がんの肺転移には Ang-2 の上昇、Ang-1 や Tie-2 の減少が DSCR-1 の有無に相関することを示すなど、興味深い結果を得た。DSCR-1 の欠損が生活習慣病予防にも効果があることが示唆されており、興味深い。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

血管形成はがんをはじめ多くの疾患に関係している。VEGF 刺激による血管内皮細胞のゲノムワイドなヒストンコードと転写因子結合量の変化を統合したデータベースは、今後の血管内皮研究の進展に寄与すると思われる。

ダウン症の症状と血管異常との関連、それが神経症状との相関性という点で解明されれば、ダウン症の画期的な治療薬の開発につながる。また血管形成が関与する血管病の多くの疾病に対する治療薬の開発につながる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

これまでに当初の研究計画の多くは、予定どおり遂行されてきている。遂行困難な計画が出てきた際には、優先順位をつけて対応し、可能な場合は他の方法により目的を達成しようとする姿勢が見受けられる。ダウン症そのものの研究は本補助事業期間中では全うできないと予想されると指摘されていたが、疾患 iPS 細胞よりも正常 ES 細胞の研究を優先してそれに対応するなどの工夫が見られた。

研究成果は責任著者の論文として、Mol Cell Biol, EMBO J, Cell Report などの国際的な一流誌に公表されている。また共同研究としての共著論文が国内外の研究者となされている。特許出願も一件なされている。国際会議でも多く発表されている。

一般市民向けの講演、新聞報道、ホームページなどを介して国民に対し研究成果を発信しており評価できる。