

課題番号	LS038
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

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

1. 当該年度の研究目的

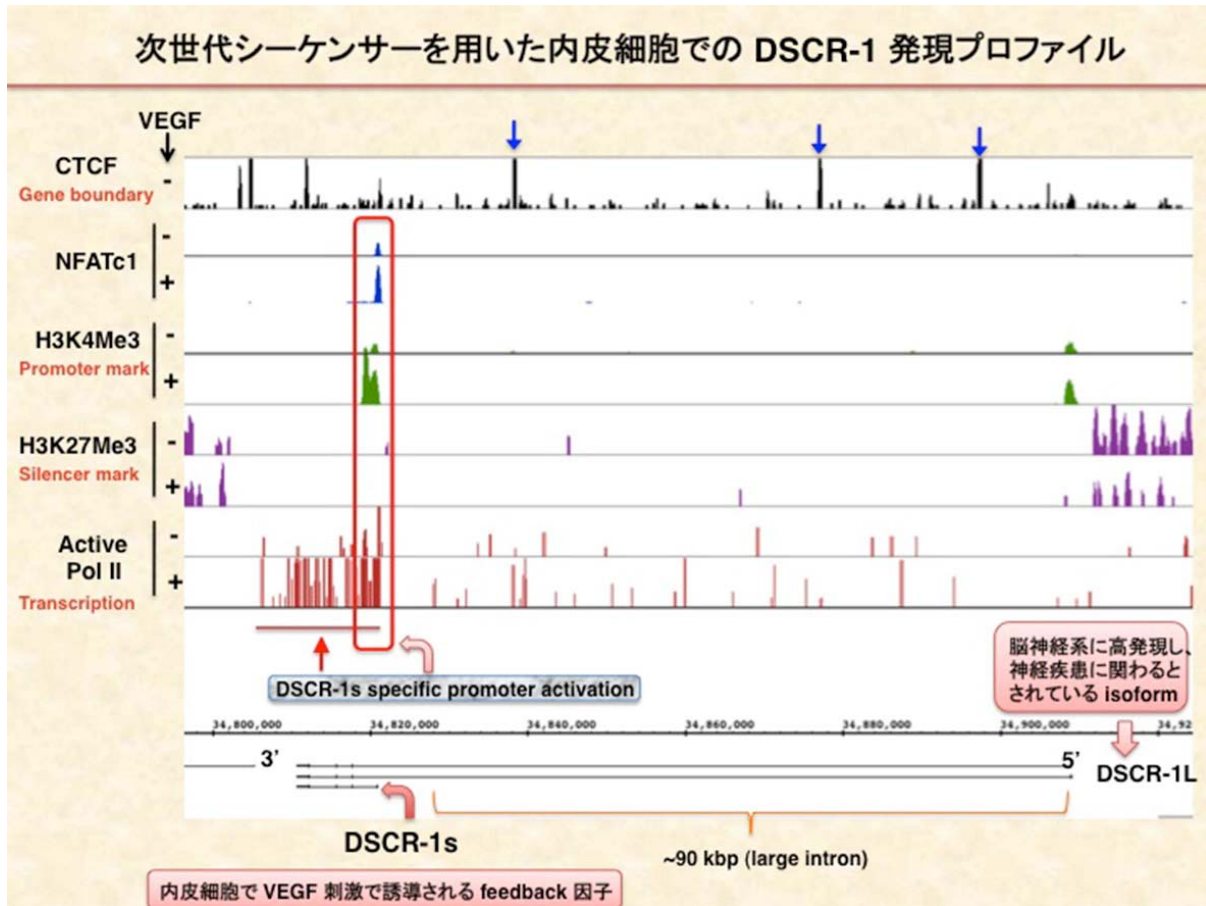
前年度までに、血管内皮細胞の炎症活性化に寄与する転写因子 STAT6 の役割解明 (*Mol.Cell.Biol.* 31, 2011) と、血管内皮細胞の維持と血管新生に寄与する転写因子 GATA2 のゲノムワイドな結合様式 (*EMBO J.* 30, 2011、日経産業新聞 6月21日版) を報告した。さらに GATA2 内皮分化への貢献度と分化のエピゲノム変動を時系列的に追跡するため、ES 細胞を用いたヒストンプロファイルと網羅的発現アレイのデータ取得を安定的に進める手順と方針が決まった。さらに前年度には血管内皮細胞の増殖・活性化を制御するサイトカイン VEGF からの主たるシグナル伝達の一つである Calcineurin-NFAT 経路に着目し、NFATc1 の抗体樹立とこれを用いた VEGF 刺激内皮細胞での ChIP-seq データの取得に成功している。そこで 24 年度では、NFAT 標的遺伝子に着目し、第一標的である NFAT フィードバック inhibitor ダウン症候群関連因子 (DSCR-1s) 遺伝子や Egr-3 遺伝子のヒストンプロファイルや各々の遺伝子改変モデルマウスからの内皮機能解析を進める。さらに、新たな NFAT 直接標的として見出された誘導性 Rho modulator (Round1, RND1) の内皮細胞における役割を *in vitro*, *in vivo* にて解析し、論文化を目指す。また、VEGF による内皮細胞早期活性化がエピゲノムレベルで制御されていることと、non-coding RNA や miRNA との関連を解析するため、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq も開始する。

2. 研究の実施状況

1. VEGF 活性化エピゲノムスイッチの同定と機能解析: VEGF-calcineurin-NFAT 経路の標的遺伝子である Egr-3 のゲノム解析をもとに、内皮早期活性化を制御する重要転写因子全てにおいて bivalent マーク (転写活性化と抑制の両方の目印) が入っていること、かつ VEGF 刺激によって転写活性化 (H3K4me3) 修飾が抑制マークである H3K27me3 修飾を超えて増えていくことを見出しており、その活性化機序と転写機能を確認した。特に内皮選択的に活性化マークを入れる主たる酵素を見出し、これを制御することで、内皮恒常性を維持しながら内皮異常活性化に基づく疾患を選択的に解除できる道筋が立てられた(特許取得)。
2. 新規 NFAT 標的遺伝子の機能解析: 作製した NFATc1 の抗体にて VEGF 刺激下でのゲノムワイドな NFATc1 の結合プロファイルとヒストンコードを組み合わせた。特に新たな NFATc1 の直接標的として CXCR7 と RND1 を見出したが、これらの内皮における役割は同定されていないことから、アデノウイルス強制発現系を構築し、VEGF 依存性血管新生への寄与や細胞形態変化を観察した。
3. ダウン症モデルマウスからのがん転移機能解析: ダウン症関連因子 (DSCR-1) 欠損マウスによる、がんの転移アッセイを行ったところ、がんの肺転移がより早期に成立すること、それに対し DSCR-1 発現量を内皮で増やすことによって、肺がん転移や移植部のがん増殖は顕著に抑制出来る結果を得た。このがん転移微小環境を考慮する際、特に転移標的となる肺では VEGF 量の

増大と VEGF receptor (VEGFR) 2 の活性化が転移前の血管内皮細胞で生じていること、このがん微小環境が DSCR-1 の有無によって大きく変化することを見出した。

4. 内皮分化のエピゲノム変化機構説明: マウス ES 細胞を用いた内皮分化系において、VEGF 添加、VEGFR2 抗体ビーズでの細胞濃縮を行い、分化前と分化後でのゲノム全体でのヒストン結合プロファイルと実際の発現アレイデータを取得した。Bivalent マークの入っている転写因子が内皮細胞分化の中間地点にあり、内皮に規定されると高発現する転写因子の特定に成功した。



3. 研究発表等

雑誌論文 計 6 件	(掲載済み一査読有り) 計 4 件 1. Higuchi, K., Nakaoka, Y., Shioyama, W., Arita, Y., Hashimoto, T., Yasui, T., Ikeoka, K., Kuroda, T., <u>Minami, T.</u> , Nishida, K., Fujio, Y., Yamauchi-Takahara, K., Shirai, M., Mochizuki, N., and Komuro, I.: Endothelial Gab1 Deletion Accelerates Angiotensin II-Dependent Vascular Inflammation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. <i>Circ J.</i> 76 : 2031-40, 2012 2. Yae, T., Tsuchihashi, K., Ishimoto, T., Motohara, T., Yoshikawa, M., Yoshida, G.J., Wada, T., Masuko, T., Mogushi, K., Tanaka, H., Osawa, T., Kanki, Y., <u>Minami, T.</u> , Aburatani, H., Ohmura, M., Kubo, A., Suematsu, M., Takahashi, K., Saya, H., and Nagano, O.: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. <i>Nat. Commun.</i> , 3 : 883, 2012 3. Endo, M., Nakano, M., Kadomatsu, T., Fukuhara, S., Kuroda, H., Mikami, S., Hato, T., Aoi, J., Tabata, M., Horiguchi, H., Kawamoto, Y., Miyata, K., Odagiri, H., Miyashita, K., Araki, K., Harada, M., Horio, H., Hishima, T., Nomori, H., Ito, T., Yamamoto, Y., <u>Minami, T.</u> , Okada, S., Takahashi, T., Iwase, H., Mochizuki, N., and Oike, Y.: A critical role for tumor cell-derived Angiopoietin-like protein 2 in metastasis. <i>Cancer Res.</i> 72 :1784-1794, 2012
---------------	---

様式19 別紙1

	<p>4. Sobrado, M., Ramirez, B.G., Neria, F., Lizasoain, I., Arbonés, M.L., <u>Minami, T.</u>, Redondo, J.M., Moro, M.A., and Cano, E.: Regulator of Calcineurin 1 (Rcan1) has a protective role in brain ischemia/reperfusion injury. <i>Journal of Neuroinflammation</i> 9: 48, 2012 (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 2 件</p> <p>1. Osawa, T., Tsuchida, R., Muramatsu, M., Shimamura, T., Wang, F., Suehiro, J., Kanki, Y., Wada, Y., Yuasa, Y., Aburatani, H., Miyano, S., <u>Minami, T.</u>, Kodama, T., and Shibuya, M.: Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages. <i>Cancer Res. In press</i> Mar. 12 [Epub ahead of print], 2013</p> <p>2. Yamazaki, T., Suehiro, J-I., Miyazaki, H., <u>Minami, T.</u>, Kodama, T., Miyazono, K., and Watabe, T.: The COUP-TFII variant lacking a DNA-binding domain inhibits the activation of the Cyp7a1 promoter through physical interaction with COUP-TFII. <i>Biochem J. In press</i> Mar 5. [Epub ahead of print], 2013</p>
<p>会議発表 計 4 件</p>	<p>専門家向け 計 3 件</p> <p>1. Activation of the VEGF-calcineurin signaling axis in lung endothelium is critical for establishment of lung metastasis. The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (2012) Tokushima Arts Foundation, 80 名程</p> <p>2. Keynote lecture 血管内皮活性化制御からの抗血管疾患アプローチ、第 3 回 Molecular Cardiovascular Conference II 2012 年 120 名程</p> <p>3. NEXT program 若手研究者 cutting edge 『血管内皮活性化・エピゲノム調節機構解明による抗がん作用への応用』、文部科学省新学術領域研究・がん支援活動公開シンポジウム、学術総合センター・一橋講堂、2013 年 200 名程</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>1. ダウン症因子 DSCR-1 の抗血管疾患活性と網羅解析アプローチ、次世代シグナル伝達医学 G-COE 研究会 2012 年 40 名程</p>
<p>図 書 計 1 件</p>	<p>1. 血管新生研究の最先端 (ISBN978-4-7532-2599-6) 第 10 章 血管新生に関わる転写調節因子、 第 14 章 血管新生の新しい研究法、システムバイオロジー 医薬ジャーナル社 2013 年</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 1 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 1 件 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 出願番号：特願 2013-013530 株式会社：東京大学 TLO 発明者：南 敬、末弘淳一、神吉康晴 出願日：2013 年 1 月 28 日</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.vb.rcast.u-tokyo.ac.jp/ http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>東京大学においてポスター展示を行った。一般高校生向けの内容とし、またがんと遺伝子疾患についての質問についても現状を平易に説明した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前年 度迄の累計)
直接経費	108,000,000	36,000,000	36,000,000	36,000,000	0
間接経費	32,400,000	10,800,000	10,800,000	10,800,000	0
合計	140,400,000	46,800,000	46,800,000	46,800,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	1,219,860	36,000,000	0	37,219,860	21,550,997	15,668,863	0
間接経費	0	10,800,000	0	10,800,000	5,400,000	5,400,000	0
合計	1,219,860	46,800,000	0	48,019,860	26,950,997	21,068,863	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	8,868,839	倒立顕微鏡、実験試薬、マウス固形飼料等
旅費	1,670,806	研究成果発表旅費(国際血管生物医学会)など
謝金・人件費等	10,536,808	常勤教員・職員人件費等
その他	474,544	学会参加費、配送費等
直接経費計	21,550,997	
間接経費計	5,400,000	
合計	26,950,997	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
倒立顕微鏡エクリ プスTi-S	ニコン社製 TIS30-FLPH-LU	1	1,702,155	1,702,155	2012/7/19	東京大学
				0		
				0		
				0		