

## ETV2 による血管内皮細胞へのリプログラム分子機序の解明

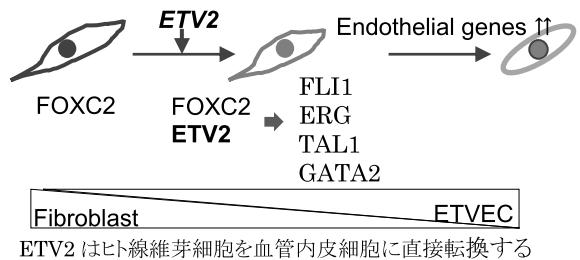
森田林平

慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学

## 【研究の背景】

血管内皮細胞は胎生期に血液細胞と共に前駆細胞である Hemogenic endothelium という特殊な内皮細胞から発生することが知られている。私達は内皮細胞および血液細胞の発生に重要な 18 種類の転写因子をレンチウイルスベクターにより成人皮膚線維芽細胞に導入し、血管内皮細胞の直接誘導に必須の転写因子を探査した。その結果唯一つの転写因子 ETV2 により成人皮膚線維芽細胞は機能的な血管内皮細胞 ETVEC に直接転換することを見出した(Morita *et al.* 2015. PNAS)。導入された ETV2 は内因性 FOXC2 と協調作用することで FLI1 や ERG 等の内皮細胞の分化に重要な転写因子の発現を誘導し、その結果多くの内皮細胞遺伝子の発現を誘導する(図)。

一方、成体内の生理的な血管内皮細胞は ETV2 を発現していない。そこで私達はテトラサイクリン誘導(Tet-on)システムを用いて ETVEC 中の ETV2 の発現を消失させたところ、一部は血管内皮細胞の性状を保ち続けることを見出した。



## 【目的】

ヒト線維芽細胞に対する ETV2 のエピジェネティクスな作用を網羅的に解析し、ヒト線維芽細胞から血管内皮細胞へのリプログラムの分子機序の解明を目指す。

## 【方 法】

ETV2 発現消失後、血管内皮細胞の状態を保持する細胞群(Sustained ETVEC)と脱落した細胞群(Non-EC)の遺伝子発現とプロモーターのメチル化を網羅的に比較・解析し、ETV2 により安定発現誘導する内皮細胞遺伝子の同定を試みた。

- ① 細胞の準備:Tet-on システムによりヒト線維芽細胞に ETV2 の発現を誘導し内皮細胞培養条件下で培養した。15 日後に CD31+ 細胞をソートし、更に 10 日間培養した。その後ドキシサイクリンを除いた培養液で 2 週間培養し、ETV2 が消失した細胞から Sustained ETVEC(CD31+CD144+細胞)と Non-EC(CD31-CD144-細胞)を各々ソートした。
- ② プロモーターのメチル化の網羅的解析:上記 2 細胞群およびヒト線維芽細胞(陰性コントロール)と HUVEC(陽性コントロール)からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理をした後に Infinium® HumanMethylation450 BeadsChip を用いて網羅的に DNA のメチル化状態を解析した。更にこれまでの遺伝子発現解析の結果と合わせ、ETV2 により発現が誘導されかつ安定化する遺伝子の特定を試みた。データ解析では共同研究者の小田真由美博士(慶應義塾大学医学部)の協力を得た。

## 【結 果】

NIA Array Analysis Tool を用いてデータの解析を行った。PCA 解析で angiogenesis、blood vessel morphogenesis

に関する遺伝子群(*ACVRL1*, *ROBO4*, *ANGPT2* 等)また *MYCT1* のメチル化が HUVEC に近いものとしてリストアップされた。また Gene ontology 解析により、Non-EC と比較して Sustained ETVEC で高メチル化が認められた遺伝子群としては negative regulation of BMP signaling pathway (GO:0030514)、G-protein coupled receptor activity (GO:0004930) がクローズアップされた。つまりこれらの遺伝子群の発現が抑制されていることが、内皮細胞の維持に関わると考えられる。その一方で、血管内皮細胞の分化に必須の転写因子 *ERG* や *FLI1* さらに *PECAM1*(CD31) といった内皮細胞マーカーのプロモーター部位のメチル化は Non-EC と Sustained ETVEC あまり変化が認められなかった。

### 【考 察】

今回の DNA メチル化解析により ETV2 はヒト線維芽細胞中の遺伝子のメチル化状態を HUVEC に近いものにすることが明らかとなった。しかし Sustained ETVEC では *PECAM* 等の遺伝子のプロモーター部位の高メチル化が残存していることより、完全なリプログラミングには更なる分子イベントが必要であることが明らかとなった。これまでに私達は *in vitro* 培養で作成された ETVEC には eNOS の発現は認められないが、免疫不全マウスに移植し血管を作製させると eNOS の発現が誘導されることを見出している(Morita *et al.* 2015. PNAS)。つまり Sustained ETVEC を本来あるべき「場」に移植することによりリプログラミングが亢進し、更に安定な血管内皮細胞に分化が進むと考えられる。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた血管新生療法は、閉塞性動脈硬化症やバージャー病による血流障害に対して有効であることが証明されている。一方、EPC は末梢血中での存在比率が非常に低く、基礎疾患の重症度によっては採取自体が困難となる場合もある。本研究成果はこの様な EPC 採取困難な症例に対する新たな治療細胞ソースの提供につながると共に、iPS 細胞由来の肝細胞や腸上皮細胞と組み合わせ、シングルドナーの皮膚細胞から立体的臓器の作製につながることが期待される。

### 【参考・引用文献】

Morita R\*, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A\*. ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112:160-165. 2015. (\*Corresponding author)