

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15438

研究課題名(和文) 動脈硬化進行と共に変化するsmall RNAワールドのネットワーク統合解析

研究課題名(英文) The Analysis of miRNA-mRNA network related to atherosclerosis.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、培養ヒト血管内皮細胞を用いて、動脈硬化の初期イベントである単球接着に関連するmicroRNA(miRNA)を網羅的に同定した。その中から、特にmiR-3679-5pに着目して解析したところ、miR-3679-5pは単球接着を抑制することを見出した。更に、このmiRの標的遺伝子として2つのヒストン修飾酵素KDM7A、KDM6Aを同定し、その機能解析を細胞レベル、マウス個体レベルで行った。その結果、この2つの酵素は相乗的に機能し、血管の慢性炎症を惹起することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、世界で初めて、「動脈硬化」という血管の慢性炎症を惹起するスタートとなるイベントに関連する2つの酵素を発見した。これら酵素はヒストンの脱メチル化酵素であることから、DNAの塩基配列変化を伴わない遺伝子発現制御機構である「エピゲノム」が、動脈硬化にも寄与していることを示した重要な成果である。また、血管の老化は臓器の機能低下、しいては個体の機能低下に繋がることから、これら酵素の阻害剤は新たな抗動脈硬化薬としての可能性を秘めている。今後は、この酵素の働きを詳細に調べることで、血管特異的な機構を明らかにすることが重要だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, at first, we comprehensively identified microRNAs related to monocyte adhesion to vascular endothelial cells, which is the initial event of atherosclerosis. Within these identified miRNAs, we focused on miR-3679-5p and revealed that this miRNA repressed monocyte adhesion in vitro. In addition, we determined two histone modifying enzymes, KDM7A and KDM6A, as target mRNAs of miR-3679-5p. KDM7A and KDM6A synergistically works as initiator of vascular chronic inflammation in vitro and in vivo (mice model). Taken together, our findings uncovered a novel epigenetic facilitating signal pathway on atherosclerosis and anticipate to be therapeutic utility for vascular inflammatory diseases.

研究分野：血管生物学

キーワード：動脈硬化 microRNA ヒストン修飾酵素 エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画の終結宣言以降、DNAメチル化、ヒストン修飾、非翻訳RNA、染色体構造などDNA塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の機能および発現を調節する機構「エピゲノム」の異常が様々な疾患において重要であることが明らかとなっている。高齢化社会が進んだ現在、日本をはじめとする先進国の主要な死因はがん、心疾患、脳血管疾患である。がんの進行には低酸素から免れるための血管新生が重要であり、心疾患および脳血管疾患においては高脂血症、慢性炎症に起因する動脈硬化が重要である。これらすべての病態にはいずれも血管が深く関与しており、血管の生理および病理の基本原則を分子レベルで解明することが様々な病気の理解に極めて重要であると考えられる。所属研究室ではこれまでに、血管内皮細胞を用いて、その細胞特異性に転写因子GATA2が寄与していること、及び、GATA2のゲノム上への結合はその細胞特異的なヒストン修飾に規定されていることを見出し、報告してきた(Kanki Y et al 2011 *EMBO J*)。さらに、血管内皮細胞が刺激に応じて動的な状態にスイッチする際のエピゲノム解析として、tumor necrosis factor- α (TNF- α) に応じたゲノムワイドなmiRNA誘導機構を報告しており、血管内皮細胞の動的変化にヒストン修飾およびmiRNAが重要であるという知見を得ている。

動脈硬化は、高血圧や高血糖により傷ついた血管内皮へ単球が接着することを引き金として始まる。その最初のステップとして血管内皮ではTNF- α やIL-4などの炎症刺激に応じてvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) やintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、E-selectinなど接着因子の発現が上昇する。VCAM-1は他の因子と比較して非常に早期から動脈硬化巣に限局して発現することから、動脈硬化進展におけるkey factorと考えられている。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、TNF- α は4時間をピークとして一過性にVCAM-1を誘導するのに対して、IL-4は24時間をピークとして持続的にVCAM-1を誘導することを報告した。さらに実際の生体内で想定されるTNF- α とIL-4が共存した場合にはTNF- α の一過性タイプのVCAM-1誘導が持続性タイプに転じ、さらに相乗的にVCAM-1を誘導するという興味深い知見を見出した(Kanki Y et al 2011 *MCB*)。この研究の中で、TNF- α およびIL-4によるVCAM-1誘導にはそれぞれNF κ B (p65) およびSTAT6が関与することを明らかにしたが、VCAM-1が持続的かつ強く誘導される機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、申請者のこれまでの動脈硬化研究、次世代シーケンサーを用いた血管内皮細胞解析研究の技術を生かし、「ヒト臨床血清検体中のmiRNA、mRNA」と「動脈硬化の発症、進展」に新たな相関性を見出し、他の慢性疾患にも応用の効く「Sequential miRNA-mRNA Network」俯瞰図を作成することが目的である。申請者はこれまでに、動脈硬化に寄与する新規非翻訳領域(2011 *MCB*)、更に動脈硬化に寄与するmiRNAと染色体構造の相関(2012 *EMBO J*, 共著)などを報告してきた。そこで本研究では、これまでの研究を大幅に発展させるために、動脈硬化状態に応じて変化するmiRNA、mRNAの網羅的な解析を行う。こうして得られたデータを統合的に解析し、miRNA-mRNA相互作用を病態とリンクさせた、従来にない時系列俯瞰図を作成する。本研究が達成されれば、慢性疾患の病態変化に新たな知見をもたらすことが可能となり、臨床マーカー探索や進行予防薬開発といった応用が期待される。

3. 研究の方法

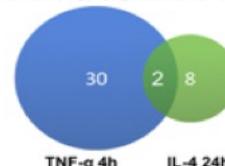
- (1) 血管内皮細胞を用いて動脈硬化に寄与するmiRNAをスクリーニングする
- (2) 見出したmiRNAが単球接着に寄与するかどうか検討する
- (3) 見出したmiRNAの標的遺伝子を同定する
- (4) 標的遺伝子の単球接着に対する影響を評価する

4. 研究成果

(1) 動脈硬化進展に寄与する新規miRNAの同定

申請者はHUVECを用いてマイクロアレイを行い、TNF- α 刺激に応じて変動するmiRNAから、接着因子VCAM-1の転写を制御する可能性のある因子を2個同定した(図1)。

図1
HUVECにおけるmiRNAアレイの結果



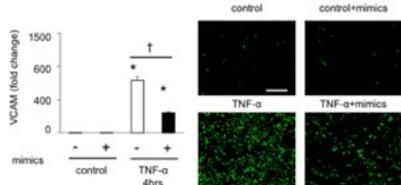
(2) 見出したmiRNAが単球接着に寄与するかどうか検討する

これら2つのmiRNAの合成mimicsを用いて、HUVECにTNF- α 刺激を行った際のVCAM-1誘導および単球接着に関して評価したところ、miR-3679-5pの合成mimicsはTNF- α によるVCAM-1の発現誘導および単球接着を有意に抑制した(図2)。

(3) 見出したmiRNAの標的遺伝子を同定する

これまで、miRNAのターゲット予測にはtarget scanやTarBaseといった配列からのデータベースに頼る手法がとられてきた。しかしながら、miRNAと標的mRNAの結合にはミスマッチが含まれる、認識配列が7塩基と非常に短く標的となり得るmRNAが数多く存在する、など様々な理由からコンピューター予測のみで標的遺伝子を同定することは困難と考えられる。そこで申

図2 miRNA mimicsはVCAM-1誘導、単球接着を抑制する



った。興味深いことに、これら核局在と関連する遺伝子の中にヒストン修飾酵素酵素が複数含まれており、レポーターアッセイの結果、抑制系ヒストン修飾 H3K9me2 および H3K27me3 をそれぞれ脱メチル化する酵素 lysine demethylase 7A (KDM7A) および 6A (UTX) が miR-3679-5p の直接の標的遺伝子であることが明らかとなった。

(4) 標的遺伝子の単球接着に対する影響を評価する

次に RNA-seq を用いて、KDM7A および UTX のノックダウンの遺伝子発現に対する影響を網羅的に解析したところ、興味深いことに、VCAM1 および SELE のみならず、TNF- α -NF- κ B 経路に依存する炎症関連遺伝子の多くが KDM7A および UTX によって発現制御されている可能性が示唆された (図 3)。ChIP-seq を用いて KDM7A および UTX の結合領域をゲノムワイドに調べたところ、この結果に一致して、KDM7A および UTX が数多くの炎症関連遺伝子のエンハンサー領域に結合すること、それらエンハンサー領域の特徴として NF- κ B (p65) 結合配列が有意に濃縮していることが明らかとなった。一方で、KDM7A および UTX をノックダウンすると NF- κ B のエンハンサー領域への結合が有意に抑制されることが明らかとなった。これは KDM7A および UTX が NF- κ B のゲノムへの結合よりも上流である可能性を示唆する重要なデータである。

図3 KDM7A, UTXはTNF-NFκB経路を制御している

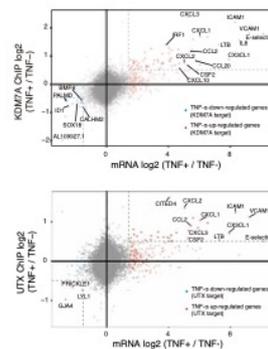
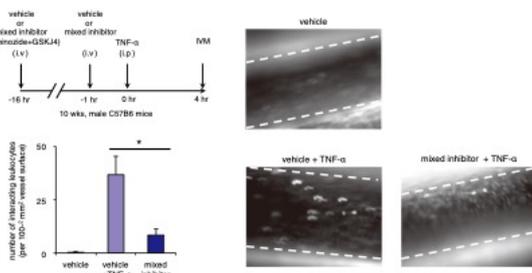


図4 in vivoでKDM7A, UTXを阻害すると単球接着は阻害される



最後に、血管内皮細胞への単球接着が KDM7A および UTX のノックダウンによって抑制されること、また、in vivo (マウス) において血管内皮細胞への白血球接着が Daminozide (KDM7A 阻害剤) および GSK-J4 (UTX 阻害剤) 投与によって阻害されることが判明した (図 4)。以上より、miR-3679-5p が KDM7A および UTX を制御することで接着因子を含む NF- κ B 依存性炎症関連遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1: Nagai N, Ohguchi H, Nakaki R, Matsumura Y, Kanki Y, Sakai J, Aburatani H, Minami T. Downregulation of ERG and FLI1 expression in endothelial cells triggers endothelial-to-mesenchymal transition. PLoS Genet. 2018 Nov 30;14(11):e1007826. doi: 10.1371/journal.pgen.1007826. eCollection 2018 Nov. PubMed PMID: 30500808; PubMed Central PMCID: PMC6291168.

2: Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Genome-wide analysis revealed that DZNep reduces tubulointerstitial fibrosis via down-regulation of pro-fibrotic genes. Sci Rep. 2018 Feb 28;8(1):3779. doi: 10.1038/s41598-018-22180-5. PubMed PMID: 29491489; PubMed Central PMCID: PMC5830881.

3: Takeda M, Kanki Y, Masumoto H, Funakoshi S, Hatani T, Fukushima H, Izumi-Taguchi A, Matsui Y, Shimamura T, Yoshida Y, Yamashita JK. Identification of Cardiomyocyte-Fated Progenitors from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Marked with CD82. Cell Rep. 2018 Jan 9;22(2):546-556. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.057. PubMed PMID: 29320747.

4: Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Kushida N, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Novel lnc RNA regulated by HIF-1 inhibits apoptotic cell death in the renal

tubular epithelial cells under hypoxia. *Physiol Rep.* 2017 Apr;5(8). pii: e13203. doi: 10.14814/phy2.13203. PubMed PMID: 28420760; PubMed Central PMCID: PMC5408278.

5: Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T. Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2017 May 5;45(8):4344-4358. doi: 10.1093/nar/gkx159. PubMed PMID: 28334937; PubMed Central PMCID: PMC5416769.

〔学会発表〕 (計 17 件)

1. Yasuharu Kanki, Yoshiki Higashijima, Yusuke Matsui, Teppei Shimamura, Shuichi Tsutsumi, Yohei Abe, Verena M. Link, Hiroyuki Aburatani, Christopher K. Glass
Coordinated demethylation of H3K9 and H3K27 is required for rapid inflammatory responses of endothelial cells Keystone Symposia Epigenetics and Human Disease, Banff, BA, Canada, March 2019
2. 神吉康晴 Coordinated demethylation of H3K9 and H3K27 is required for rapid inflammatory responses of endothelial cells 第 5 回日本血管生物若手研究会、金沢、2019 年 3 月
3. 神吉康晴 炎症性サイトカインによる染色体構造変化の俯瞰的解析 第 41 回日本分子生物学会ワークショップ、横浜、2018 年 11 月 (口頭発表・招待講演)
4. 東島佳毅、松井佑介、島村徹平、大坂瑞子、吉田雅幸、南学正臣、和田洋一郎、古川哲史、神吉康晴 miRNA-ヒストン修飾による動脈硬化関連遺伝子の転写制御機構解析 第 41 回日本分子生物学会ワークショップ、横浜、2018 年 11 月 (口頭発表・招待講演)
5. 東島佳毅、堤修一、松井佑介、島村徹平、井上剛、南学正臣、和田洋一郎、古川哲史、神吉康晴 Transcriptional control of atherosclerosis-related genes through repressive histone marks and chromosomal interactions 第 91 回日本生化学会大会、京都、2018 年 9 月 (ポスター発表)
6. Yasuharu Kanki, Jun-ichi Suehiro, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Takashi Minami A novel epigenetic mechanism revealed tumor associated angiogenesis 第 77 回日本癌学会学術集会総会、大阪、2018 年 9 月
7. Yasuharu Kanki microRNA-histone modification network in TNF- α -stimulated inflammatory endothelium The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (K-J meeting)、大阪、2018 年 9 月
8. Yasuharu Kanki A novel tri-valent histone modification is necessary for the balance of angiogenesis--- accelerator and brake--- EMBL Conference: Transcription and Chromatin. Heidelberg, Germany. August 2018. (ポスター発表)
9. Higashijima Y, Tsutsumi S, Link VM, Abe Y, Nangaku M, Wada Y, Glass CK, Furukawa T, Kanki Y. Lysine demethylase 7A and 6A dynamically modulate chromatin looping to control inflammatory gene transcription in human endothelial cells. EMBL Conference: Transcription and Chromatin. Heidelberg, Germany. August 2018. (ポスター発表)
10. 神吉康晴 クライオ電子顕微鏡による単粒子解析 BioExpo2018、東京、2018 年 6 月
11. 神吉康晴 クライオ電子顕微鏡による単粒子解析 第 14 回日本臨床プロテオゲノミクス学会、東京、2018 年 5 月
12. 神吉康晴 ヒストン修飾酵素による動脈硬化関連遺伝子発現制御機構解析 第 4 回日本血管生物若手研究会、熊本、2018 年 3 月 (口頭発表)
13. Yasuharu Kanki, Sagar Chittori, Doreen Matthies, Prashant Rao, Alan A. Merk, Sriram Subramaniam Single particle analysis by cryo-electron microscopy ConBio2017 (招待講演)
14. 東島佳毅、神吉康晴、井上剛、南学正臣、古川哲史、和田洋一郎 血管内皮細胞における炎症刺激に応じた miRNA-ヒストン修飾ネットワーク機構 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 (口頭発表)
15. Higashijima Y, Inoue T, Nangaku M, Wada Y, Furukawa T, Kanki Y. Lysine demethylase 6A and 7A regulated by microRNA 3679-5p mediates TNF- α -induced inflammatory signaling in vascular endothelium. American Heart Association. Anaheim. U.S.A. November 2017. (ポスター発表)
16. 東島佳毅、井上剛、南学正臣、児玉龍彦、神吉康晴、和田洋一郎 MicroRNA-3679-5p modulates the induction of adhesion molecules by targeting histone demethylases, KDM7A and UTX. 第 43 回内藤コンファレンス、札幌、2017 年 6 月 (ポスター発表)
17. 東島佳毅、井上剛、南学正臣、児玉龍彦、神吉康晴、和田洋一郎 MicroRNA-3679-5p inhibits the induction of adhesion molecules by suppressing histone demethylases, KDM7A and UTX 第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 (口頭発表)

〔図書〕 (計 1 件)

- 1: 神吉康晴 「クライオ電子顕微鏡による単粒子解析」 実験医学 2017 年 8 月号 (羊土社)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

研究代表者：神吉 康晴

ローマ字氏名：KANKI, Yasuharu

所属機関名：東京大学

部局名：アイソトープ総合センター

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 00534869

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：東島 佳毅

ローマ字氏名：HIGASHIJIMA, Yoshiki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。