

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16107

研究課題名（和文）新規長鎖ノンコーディングRNAを介した動脈硬化発症機序の解明

研究課題名（英文）Investigate the role of a novel long non-coding RNA in the pathogenesis of atherosclerosis

研究代表者

呉 家賢（WU, CHIA-HSIEN）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：10908528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新たに発見した長鎖ノンコーディングRNA(LncX)の発現抑制による内皮健常性の維持効果を、生体外および生体内での動脈硬化保護効果やメカニズムについて解明した。その結果、LncXヘテロ欠損マウスにおいて、高脂肪食の負荷下で大動脈全体に形成される脂肪プラークの面積が、コントロールマウスと比べて減少することが確認された。さらに、網羅的遺伝子解析(RNA-seq)を用いて分析した結果、細胞周期に関わる遺伝子群の発現量が減少し、細胞間接着などに関わる遺伝子の発現量が上昇することが明らかになった。これらの成果から、LncXによる内皮健常性維持を介した新たな動脈硬化抑制メカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性心疾患をはじめとする動脈硬化性疾患は、世界的に長年にわたり死亡原因の1位となっており、動脈硬化の克服は喫緊の課題である。スタチンを始めとする脂質を標的にした治療法は動脈硬化の軽減に非常に有効であるが、動脈硬化性疾患の克服には未だ不十分であり、さらなる治療法の開発が望まれている。本研究成果は内皮細胞健常性に焦点をあて、動脈硬化の成因と治療法に新たな見解を与えることができたと思う。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether and how a novel long non-coding RNA (LncX) is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. We generated LncX knockout mice using the CRISPR-Cas9 system and found that the knockout of LncX attenuated atherosclerotic plaque size. Furthermore, RNA-seq analysis revealed that the knockdown of LncX maintained endothelial cell quiescence in the S-phase by regulating DNA synthesis-related genes. Since cell quiescence is an important characteristic of functional endothelial cells, LncX may be a novel therapeutic target for atherosclerosis targeting endothelial dysfunction.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 血管内皮健常性 長鎖ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は長年に渡って世界における死因の第一位となっており、死者総数全体の 3 割を超えている。この状況は、先進国だけでなく発展途上国でも同様であり、心血管疾患はグローバルな健康問題として認識されている。特に、高齢化が進行している日本においては、心血管疾患である心疾患や脳血管疾患による死因は、がんに次いで第 2 位および第 3 位となっている。これらの疾患は、高齢化に伴うリスクの増加や生活習慣の変化などが原因となり、ますます重要な健康課題となっている。

心血管疾患の発症原因として、動脈硬化の存在が非常に重要であることは古くから知られている。動脈硬化の形成の機序の一つとして、血管内皮細胞の機能異常が報告されている。具体的には、血管内皮細胞の機能低下が炎症反応を引き起こし、それがさらなる動脈硬化の進行を促進する。近年の研究では、血管内皮細胞の機能異常が動脈硬化の初期段階から進行段階まで関与していることが明らかにされている。

我々は予備実験にて、LncX という長鎖非コード RNA をノックダウンすることで、血管内皮細胞の一酸化窒素産生因子の発現が上昇することを確認した。また、炎症刺激下において免疫細胞の接着が減少し、細胞死亡の抑制が観察された。これらの結果は、LncX のノックダウンが血管内皮細胞の健全性維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

さらに、これらの実験結果に基づいて、LncX が動脈硬化の新たな治療標的となり得る可能性が示された。この発見は、将来的に動脈硬化に対する新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。従って、我々は LncX の機能とその作用メカニズムのさらなる解明を行うことを決定した。この研究が進展することで、心血管疾患の予防および治療における新たな突破口が開かれることを期待している。

2. 研究の目的

本研究は LncX が新たな動脈硬化の治療標的となる可能性を探索すべく、以下の二点について明らかにすることを目的とする。第一に、動脈硬化モデルを用いて、*in vivo* における LncX 欠損による動脈硬化進展抑制を評価する。この評価は、LncX の欠損が実際に動脈硬化の進行をどの程度抑制できるかを生体内で確認するための重要なステップである。具体的には、遺伝子改変マウスを用いて、LncX の欠損が動脈硬化病変の形成に与える影響を観察する。これにより、LncX の欠損がどのようにして動脈硬化の進行を遅らせるのか、そのメカニズムを解明する。

第二に、遺伝子網羅的解析を用いて、LncX を介した血管内皮機能に関する分子メカニズムを明らかにする。遺伝子網羅的解析は、LncX が血管内皮細胞に及ぼす影響を分子的なレベルで詳細に解析するための方法である。これにより、LncX がどのような遺伝子の発現を調節し、その結果として血管内皮細胞の機能をどのように変化させるのかを明らかにすることができる。具体的には、RNA シーケンシングやクロマチン免疫沈降法を用いて、LncX が直接的または間接的に関与する遺伝子ネットワークを特定し、その機能的意義を評価する。

これらの研究により、LncX が動脈硬化の進行を抑制する新たな治療標的として有望であることが示されれば、将来的には動脈硬化の予防や治療に向けた新しいアプローチの開発に繋がる可能性がある。また、LncX を介した血管内皮機能の分子メカニズムの解明は、動脈硬化の基礎的な理解を深めるだけでなく、他の心血管疾患の治療にも応用できる知見を提供することが期待される。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* における LncX 欠損による動脈硬化進展抑制を評価する。

LncX 欠損マウスは市販では取得できないため、長崎大学先端ゲノム研究センターの協力によって、CRISPR-Cas9 を用いた全身性 LncX 欠損マウスを作製する。さらに、ApoE ノックアウトマウスと交配させることで、ダブルノックアウトマウスを作製する。ApoE ノックアウトマウスは動脈硬化モデルとして広く利用されており、このモデルに LncX 欠損を加えることで、動脈硬

化の進展に対する LncX の影響をより明確に評価できる。

次に、ApoE ノックアウトおよびダブルノックアウトマウスに高脂肪食を与えることで、動脈硬化を誘発させる。高脂肪食は、動脈硬化のリスクを高めることが知られており、この方法によって実験的に動脈硬化を再現することができる。動脈硬化が発症した後、大動脈全体を Oil Red O 染色（脂肪染色）を行うことで、動脈硬化の程度を評価する。

さらに、プラークにおける炎症の評価をマクロファージの免疫染色を用いて行う。マクロファージ侵入は動脈硬化の主要な発症原因の一つであり、炎症反応の指標として重要である。免疫染色により、プラーク内のマクロファージの分布や量を可視化し、LncX 欠損が炎症反応に与える影響を定量的に評価することができる。

(2)LncX を介した血管内皮機能に関する分子メカニズムを明らかにする。

siRNA を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）にて LncX をノックダウンする。次に、RNA 網羅的解析(RNA-seq)を行うことで、転写レベルで LncX ノックダウンによる遺伝子発現変化を明らかにし、LncX の潜在標的遺伝子およびメカニズムを解明する。さらに、RNA-seq によって同定された LncX の下流遺伝子について、それらを個別にノックダウンあるいは過剰発現させる実験を行う。これにより、各遺伝子が血管内皮細胞の機能にどのような影響を及ぼすのかを詳細に調査することが可能である。具体的には、これらの遺伝子の発現操作が、内皮細胞の増殖、移動、分化、さらには炎症反応や血管新生にどのように影響するかを評価する。

4．研究成果

(1)in vivo における LncX 欠損による動脈硬化進展抑制を評価する。

まず、CRISPR-Cas9 技術を用いて全身性 LncX 欠損マウスの作製が成功した。次に、動脈硬化のモデル動物 ApoE ノックアウトマウスと交配させ、LncX /ApoE のダブルノックアウトマウス（LncX^{-/-}ApoE^{-/-}）を作製した。この交配は順調に進み、ダブルノックアウトマウスの系統を確立することができた。

次のステップとして、ApoE ノックアウトマウスおよびダブルノックアウトマウスに対して、高脂肪食を 16 週間にわたり与えた。16 週間後、実験動物から大動脈を摘出し、Oil Red O 染色を用いて動脈硬化プラークの面積を評価した。この結果、LncX 欠損による大動脈脂肪プラークの面積が顕著に減少していることが明らかとなっており、LncX の欠損が動脈硬化の進行を抑制する効果を持つことを示唆している。

(2)LncX を介した血管内皮機能に関する分子メカニズムを明らかにする。

LncX を介した血管内皮機能に関する分子メカニズムを明らかにするために、HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）を用いて実験を行った。まず、LncX のノックダウンを実施した(N=3)。その後、RNA-seq 技術を用いて遺伝子発現量のデータを取得し、DEseq2[1]を用いて詳細な解析を行った。その結果、コントロール群に比べて、LncX ノックダウンを行った細胞では、427 個の遺伝子が有意に上昇し、634 個の遺伝子が有意に減少することが明らかになった（ $p < 0.05$ ）。

これらの上昇および低下した遺伝子群について、さらにオントロジー解析を実施した。上昇した遺伝子群は主にエンドサイトーシスや細胞間接着に関与する遺伝子であることが判明した。エンドサイトーシスは細胞が外部から物質を取り込む過程であり、細胞間接着は血管内皮細胞が血管バリアとして機能するために不可欠なプロセスである。一方、低下した遺伝子群は細胞周期に関連する遺伝子であることが明らかとなった。細胞周期は細胞が分裂・増殖するプロセスであり、これが適切に制御されることは血管の健康維持にとって重要である。

血管内皮細胞の間での細胞間接着は、血管バリア機能を維持するために極めて重要であり、このバリア機能が損傷すると、動脈硬化の発症リスクが増加することがよく知られている[2]。さらに、健全な血管内皮細胞は通常、休眠状態（静止期）を維持しているが[3]、動脈硬化が進行する部位では細胞周期の再開が観察されている[4]。これらの知見は、細胞周期の制御が動脈硬化の進展に深く関与していることを示唆している。

これらの結果から、LncX の欠損が血管内皮細胞のバリア機能の維持および細胞の休眠状態の維持に寄与していることが示唆された。具体的には、LncX の欠損によって、エンドサイトーシスや細胞間接着が促進され、細胞周期関連遺伝子の発現が抑制されることがわかった。これにより、血管内皮細胞は動脈硬化の進行を抑制する方向に働く可能性が示唆される。これらの知見は、LncX が動脈硬化の予防および治療において重要なターゲットとなり得ることを示しており、将

来的な治療戦略の開発に向けた新たな道筋を提供するものである。

<文献>

- [1] Genome Biol. 15(12):550, 2014
- [2] Circulation Research. 118:620–636, 2016.
- [3] Nat Rev Cardiol. 18(8):565-580, 2021.
- [4] Circulation. 117(14):1856-63, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wu Chia-Hsien, Inoue Tsuyoshi, Nakamura Yasuna, Uni Rie, Hasegawa Sho, Maekawa Hiroshi, Sugahara Mai, Wada Youichiro, Tanaka Tetsuhiro, Nangaku Masaomi, Inagi Reiko	4. 巻 590
2. 論文標題 Activation of 7 nicotinic acetylcholine receptors attenuates monocyte-endothelial adhesion through FUT7 inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 89 ~ 96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Jia-Huang, Wu Chia-Hsien, Jheng Jia-Rong, Chao Chia-Ter, Huang Jenq-Wen, Hung Kuan-Yu, Liu Shing-Hwa, Chiang Chih-Kang	4. 巻 29
2. 論文標題 The down-regulation of XBP1, an unfolded protein response effector, promotes acute kidney injury to chronic kidney disease transition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Science	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12929-022-00828-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umene Ryusuke, Nakamura Yasuna, Wu Chia-Hsien, Muta Kumiko, Nishino Tomoya, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 665
2. 論文標題 Induction of tetraspanin 13 contributes to the synergistic anti-inflammatory effects of parasympathetic and sympathetic stimulation in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 187 ~ 194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.04.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 呉家賢, 井上剛
2. 発表標題 Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway attenuates monocyte-endothelial adhesion through FUT7 inhibition
3. 学会等名 第73回 西日本生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------