

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15991

研究課題名(和文) 動脈硬化発症に寄与する新規エクソソームmicroRNAの探索

研究課題名(英文) Identification of novel miRNAs contributing the onset of atherosclerosis

研究代表者

東島 佳毅(Higashijima, Yoshiki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：40780713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心血管疾患は先進国における主要な死因の1つであり、その原因の大部分を占める動脈硬化の新規診断法・治療法の確立は医学領域における喫緊の課題である。本研究では、マイクロアレイや超高速シーケンサーを用いてヒト血管内細胞を炎症性刺激した際の遺伝子変化を詳細に解析した。その結果、動脈硬化に寄与する新規miRNAとしてmiR-3679-5pを同定した。エクソソームは血液や尿などの体液中に分泌される小胞で、その診断マーカーや薬剤担体としての可能性が注目されている。現在、miR-3679-5pの創薬標的および診断マーカーとしての可能性について、ヒト患者血清エクソソームに着目して研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管疾患は本邦の死因の第二位の心疾患と第四位の脳血管疾患を合わせた総称であり、その数は第一位の悪性新生物に匹敵する。近年問題となっている国民医療費においても心血管疾患を含む循環器疾患が一位であり、医療経済的に重要な分野である。本研究では、心血管病の主な原因である動脈硬化発症に寄与する新規miRNAとしてmiR-3679-5pを同定した。今後、今回の発見などに基づいて、動脈硬化の病態の理解が進み、その診断法・治療法などが向上して行くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease is one of the leading causes of death in developed countries. Atherosclerosis is responsible for cardiovascular disease and it is expected to develop novel diagnostic markers or therapeutic targets for atherosclerosis. In this study, we examined transcriptional changes of human endothelial cells during inflammatory responses by using microarray and next generation sequences. As a result, we identified a novel miRNA, miR-3679-5p that contributes to the onset of atherosclerosis (i.e. induction of cell adhesion molecules). Exosome is a small vesicle that is secreted into body fluid including blood and urine, and its potential uses as diagnostic marker or drug vehicle are also expected. Now, we are analyzing exosomal miR-3679-5p from human patients serum to examine whether exosomal miR-3679-5p could be useful for diagnostic marker as well as therapeutic target.

研究分野：分子血管学

キーワード：動脈硬化 miRNA 接着因子 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は先進国における主要な死因の1つであり(米国1位、本邦2位)、その診断および治療法の確立が期待されている。心血管疾患の原因として高血圧や高脂血症に起因する血管内皮細胞の慢性炎症および動脈硬化が重要である。これまで心血管疾患の治療は、降圧剤や脂質異常症治療薬による血圧および脂質値低下に焦点を当てて行われてきた。一方で、最近の大規模臨床研究において、血管炎症の抑制が血圧および高脂血症の改善とは独立したメカニズムで心血管疾患を抑制することが報告され(文献①)、血管炎症をターゲットとした新しい予防および治療法の確立が期待されている。

近年、DNAメチル化、ヒストン修飾、非翻訳RNA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、その発症や進展に重要であることが分かってきた(文献②)。申請者らのグループは血管内皮細胞を用いた研究によって炎症性刺激で誘導される動脈硬化発症に重要な接着因子vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の転写制御にヒストン修飾が重要であることを明らかにしてきた(文献③)。また、申請者らのグループは血管内皮細胞が炎症性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-alpha (TNF- α)に応じたゲノムワイドなmicroRNA (miRNA)誘導機構も報告しており(文献④)、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。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの研究を更に発展させてmiRNAによるVCAM-1遺伝子座のヒストン修飾制御機構を明らかにし、動脈硬化発症メカニズムの一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にTumor Necrosis Factor (TNF)- α を作用させ、時系列に、遺伝子発現をRNA-seqにより、ヒストン修飾状態をChIP-seq(クロマチン免疫沈降および次世代シーケンサー)により、miRNA発現をmiRNA-マイクロアレイにより、それぞれ解析を行った。種々のバイオインフォマティクスを駆使して治療ターゲット候補の選別を行い、選別後には、薬理学的および分子生物学的手法を用いて、in vivoおよびin vitroの実験により、治療薬シーズの妥当性を検討した。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化に寄与する新規miRNA, miR-3679-5pの同定

HUVECにTNF- α を作用させ、時系列に遺伝子発現をRNA-seqにより解析したところ、VCAM-1やE-selectinなどの動脈硬化に関わる接着因子は刺激後1時間程度で速やかに誘導され、およそ8時間でピークに達し、24時間では発現がほぼ定常状態に戻ることが示された。そこで、VCAM-1の発現誘導に関わるmiRNAはTNF- α 刺激早期で変化し、TNF- α 刺激後期では変化しないと仮説を立て実験を行った。HUVECをTNF- α 刺激4時間(早期)およびTNF刺激24時間(後期)した後RNAを回収してマイクロアレイ解析にて発現を調べたところ興味深いことに多くのmiRNAの発現がTNF刺激4時間でのみ減少し、TNF刺激24時間では変化しないことが分かった。これらTNF刺激4時間でのみ減少するmiRNAの中で発現変動が大きい上位5つのmiRNAについて調べたところmiR-3679-5pはTNF- α によるVCAM-1発現誘導および単球接着を有意に抑制した。以上より、miR-3679-5pはTNF- α によるVCAM-1誘導を負に調節するmiRNAである可能性が示唆された。

(2) miR-3679-5p 標的遺伝子の同定

次に miR-3679-5p の標的遺伝子探索を行った。これまで、miRNA のターゲット予測には target scan や TarBase といった in silico 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されてきた。そこで申請者は RNA 免疫沈降およびマイクロアレイ (RIP-Chip) と target scan を組み合わせて解析を行い、miRNA の標的遺伝子の同定を試みた。miR-3679-5p を過剰発現させた後に、miRNA-翻訳抑制複合体 (RISC complex) の主要タンパクである Argonaute2 に対する抗体を用いて RIP-Chip することで、miR-3679-5p 標的遺伝子を濃縮したマイクロアレイ解析が可能となった。得られた結果と target scan の照合により、転写制御に関わる複数の候補標的遺伝子が抽出された。最終的にレポーターアッセイなどの生化学実験を行い、lysine demethylase 7A (KDM7A) および 6A (UTX) が miR-3679-5p の標的遺伝子であることが分かった。

(3) 血管内皮細胞における KDM7A および UTX の機能解析

in vitro の系において siRNA を用いて KDM7A および UTX をノックダウンすると、VCAM-1 および E-selectin の発現誘導が抑制されることが明らかとなった。また試験管内単球接着アッセイにおいて、KDM7A および UTX のノックダウンは HUVEC への単球接着を抑制した。さらに実際にマウス血管炎症モデルにおいて Daminozide (KDM7A 阻害剤) および GSK-J4 (UTX 阻害剤) を共投与すると、血管への白血球接着が抑制されることも明らかとなった。興味深いことに KDM7A および UTX が VCAM-1 や E-selectin などの接着因子だけでなく、血管内皮細胞において炎症時に誘導されるケモカインやサイトカインなど数多くの炎症性遺伝子の制御に関与する可能性がゲノムワイドな解析によって明らかとなった。さらにヒストン修飾状態を ChIP-seq により網羅的に解析したところ、VCAM-1 および E-selectin を含む動脈硬化に重要な多数の炎症性遺伝子座において、抑制系ヒストン修飾である H3K9me2 (KDM7A が脱メチル化するヒストン修飾) および H3K27me3 (UTX が脱メチル化するヒストン修飾) が TNF- α 刺激後速やかに脱メチル化されることが明らかとなった。更に KDM7A および UTX がゲノム上で結合する領域についても ChIP-seq により検討を行い、KDM7A および UTX が炎症性遺伝子座周囲に TNF- α 刺激に応じてリクルートされること、さらに KDM7A および UTX が結合する領域の特徴として、炎症および細胞死のマスター転写因子である NF- κ B (p65) 配列が有意に濃縮していることも明らかとなった。

以上より、平成 29 年度から令和元年度にかけての 3 年間の本研究において、miR-3679-5p が KDM7A および UTX を制御することで血管内皮細胞における接着因子および炎症性遺伝子の発現をコントロールする可能性が明らかとなった。この成果は国際一般誌 “*The EMBO Journal* (欧州分子生物学機関紙)” に掲載された。現在、動脈硬化患者血清エクソソーム miRNA に着目して本研究を発展させているところである。

<引用文献>

- ① Ridker, P. M. et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 377, 1119-1131, doi:10.1056/NEJMoa1707914 (2017).
- ② Romanoski, C. E., Glass, C. K., Stunnenberg, H. G., Wilson, L. & Almouzni, G.

Epigenomics: Roadmap for regulation. *Nature* 518, 314-316, doi:10.1038/518314a (2015).

③ Tozawa, H. et al. Genome-wide approaches reveal functional interleukin-4-inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *Mol Cell Biol* 31, 2196-2209, doi:10.1128/MCB.01430-10 (2011).

④ Papantonis, A. et al. TNFalpha signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. *EMBO J* 31, 4404-4414, doi:10.1038/emboj.2012.288 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Higashijima Y, Matsui Y, Shimamura T, Nakaki R, Nagai N, Tsutsumi S, Abe Y, Link VM, Osaka M, Yoshida M, Watanabe R, Tanaka T, Taguchi A, Miura M, Xiaolan Ruan, Gouliang Li, Inoue T, Nangaku M, Kimura H, Furukawa T, Aburatani H, Wada Y, Yijun Ruan, Glass CK, Kanki Y	4. 巻 39
2. 論文標題 Coordinated demethylation of H3K9 and H3K27 is required for rapid inflammatory responses of endothelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019103949	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 該当する
1. 著者名 Higashijima Y, Kanki Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular mechanistic insights: The emerging role of SOXF transcription factors in tumorigenesis and development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcancer.2019.09.008	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 Higashijima Y, Nagai N, Kitazawa T, Kawamura Y, Taguchi A, Nakada N, Nangaku M, Furukawa T, Aburatani H, Kurihara H, Wada Y, Kanki Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Lysine demethylase 7a regulates the anterior-posterior development in mouse by modulating the transcription of Hox gene cluster.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1101/707125	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Higashijima Y, Matsui Y, Shimamura T, Tsutsumi S, Nakaki R, Abe Y, Link VM, Osaka M, Yoshida M, Watanabe R, Tanaka T, Taguchi A, Miura M, Inoue T, Nangaku M, Kimura H, Furukawa T, Aburatani H, Wada Y, Glass CK, Kanki Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Coordinated demethylation of H3K9 and H3K27 is required for rapid inflammatory responses of endothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1101/456491	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka S, Sugiura Y, Saito H, Sugahara M, Higashijima Y, Yamaguchi J, Inagi R, Suematsu M, Nangaku M, Tanaka T.	4. 巻 94(5)
2. 論文標題 Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition normalizes glucose metabolism and suppresses oxidative stress in the kidneys of diabetic mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 912-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.04.025.	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 Saito H, Tanaka T, Tanaka S, Higashijima Y, Yamaguchi J, Sugahara M, Ito M, Uchida L, Hasegawa S, Wakashima T, Fukui K, Nangaku M	4. 巻 6(10)
2. 論文標題 Persistent expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and M2 macrophage markers and chronic fibrosis after acute kidney injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13707.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashijima Yoshiki, Hirano Seiichi, Nangaku Masaomi, Nureki Osamu	4. 巻 92
2. 論文標題 Applications of the CRISPR-Cas9 system in kidney research	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 324 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2017.01.037	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 Tanaka Shinji, Tanaka Tetsuhiro, Kawakami Takahisa, Takano Hideki, Sugahara Mai, Saito Hisako, Higashijima Yoshiki, Yamaguchi Junna, Inagi Reiko, Nangaku Masaomi	4. 巻 92
2. 論文標題 Vascular adhesion protein-1 enhances neutrophil infiltration by generation of hydrogen peroxide in renal ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 154 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2017.01.014	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Higashijima Y, Nagai N, Kitazawa T, Kawamura Y, Nangaku M, Kurihara H, Wada Y, Furukawa T, Kanki Y
2. 発表標題 Lysine demethylase 7a regulates anterior-posterior development via modulating Hox gene cluster transcription in mice
3. 学会等名 Cell Symposia: Transcriptional Regulation in Evolution, Development, and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東島佳毅
2. 発表標題 炎症性遺伝子転写制御におけるヒストン脱メチル化の機能解析
3. 学会等名 第27回血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東島佳毅、永井直、北沢太郎、河村悠美子、南学正臣、栗原裕基、和田洋一郎、古川哲史、神吉康晴
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素Kdm7aはマウスにおいて前後軸形成を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東島佳毅、永井直、北沢太郎、河村悠美子、南学正臣、栗原裕基、和田洋一郎、古川哲史、神吉康晴
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素Kdm7aはHox遺伝子群の転写制御を介して前後軸形成を制御する
3. 学会等名 第92回生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東島佳毅
2. 発表標題 クロマチン相互作用による血管炎症関連遺伝子の転写制御機構の解明
3. 学会等名 第1回ダウン症基礎研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashijima Y, Tsutsumi S, Link VM, Abe Y, Nangaku M, Wada Y, Glass CK, Furukawa T, Kanki Y.
2. 発表標題 Lysine demethylase 7A and 6A dynamically modulate chromatin looping to control inflammatory gene transcription in human endothelial cells.
3. 学会等名 EMBL Conference: Transcription and Chromatin. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Transcriptional control of atherosclerosis-related genes through repressive histone marks and chromosomal interactions
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higashijima Y, Inoue T, Nangaku M, Kodama T, Kanki Y, Wada Y
2. 発表標題 MicroRNA-3679-5p modulates the induction of adhesion molecules by targeting histone demethylases, KDM7A and UTX.
3. 学会等名 第43回内藤コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東島 佳毅、神吉 康晴、井上 剛、南学 正臣、古川 哲史、和田 洋一郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Higashijima Y, Inoue T, Nangaku M, Wada Y, Furukawa T, Kanki Y
2. 発表標題 Lysine Demethylase 6A And 7A Regulated By MicroRNA-3679-5p Mediates TNF- α -induced Inflammatory Signaling In Vascular Endothelium.
3. 学会等名 American Heart Association 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究協力者	神吉 康晴 (KANKI Yasuharu)		