

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16153

研究課題名(和文) 動脈硬化形成におけるCCR4-NOTの役割及び制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of CCR4-NOT in the development of atherosclerosis

研究代表者

安 健博 (An, Jianbo)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40723771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化モデルマウスを背景に作製したCnot3ヘテロ欠損マウス(ApoEKO; Cnot3Het^z)では、動脈硬化の病態がより悪化したことから、Cnot3(CCR4-NOT複合体)の機能不全は動脈硬化進行に繋がることが明らかとなった。またそのメカニズムとして、ApoEKO; Cnot3Het^zでは炎症が亢進しており、マクロファージを中心とした解析から、Cnot3欠損マクロファージではInterferonシグナル応答が増強していることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫・炎症性疾患におけるCCR4-NOT複合体の役割が注目される中、最近では脳血管の難治疾患であるモヤモヤ病(Moyamoya disease)患者においてCNOT3遺伝子のde novo変異が報告され、CCR4-NOTの血管系疾患における重要性が強く示唆された。本研究課題では動脈硬化症を標的に、RNA制御に重要なCCR4-NOT複合体が如何なる機序を介して動脈硬化病態形成に影響するかを解明することにより、新しい血管系疾患の治療の概念創出に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：CCR4-NOT complex was involved in immune/inflammatory diseases. However, the physiological role of CCR4-NOT in the development of atherosclerosis has not been elucidated. In this study, by using established ApoE null Cnot3 heterodeficient mice (ApoEKO; Cnot3Het^z), it was demonstrated that dysfunction of Cnot3(CCR4-NOT) exacerbates the progression of atherosclerosis. Interestingly, aberrant inflammation was observed in ApoEKO; Cnot3Het^z. It was found that Cnot3 was highly expressed in atherosclerotic lesions, including macrophages. Macrophages play major roles in mediating inflammatory responses during atherosclerosis. The inflammatory response was significantly enhanced in Cnot3 deficient macrophages under Interferon-gamma stimulation, suggesting CCR4-NOT complex was a negative regulator of IFN signaling.

研究分野：分子免疫学

キーワード：動脈硬化症 CCR4-NOT マクロファージ Interferon

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性疾患である動脈硬化症は、血管の狭窄や閉塞をきたし、脳卒中や心筋梗塞の主な病因となることから、その克服が医学的・社会的に解決すべき喫緊の課題となっている。

CCR4-NOT(carbon catabolite repressor 4-negative on TATA)複合体は、10個のNOTファミリー分子からなる蛋白質複合体であり、その構成因子の中にRNA合成と分解に寄与するコア因子(CNOT1, CNOT2, CNOT3)とpoly(A)鎖の分解活性をもつデアデニレース因子(CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8)などを持つ。これらの構成因子と会合するRNA結合タンパクを介して、CCR4-NOTはpoly(A)の分解などRNA制御による遺伝子発現調節に寄与する。CCR4-NOT複合体の生理的役割に関しては、コア因子Cnot3の欠損マウスは心不全を来し、CCR4-NOTの標的の一つであるオートファジー分子Atg7が細胞死に寄与することが報告された(Kuba K, et al. *Cell* 2010; Yamaguchi T, et al. *Sci Signal* 2018)。また、組織特異的にCnot3を欠失したコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、Cnot3は肝臓や脂肪組織などの恒常性維持に重要であることが報告された(Development 2019; FEBS Lett 2017)。一方で、Cnot3はB細胞の分化、抗原提示にも関与し(Genes Dev 2016; Sci Rep 2017)、免疫・炎症性疾患におけるCCR4-NOTの役割が注目されつつあるが、その病態形成におけるCCR4-NOTのRNA制御やエピトランスクリプトーム調節は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的として、RNA制御による炎症性疾患治療の基盤構築を目指して、動脈硬化症を標的とし、遺伝子組換えマウスと次世代シーケンサーを用いた解析から、RNA制御において重要な役割を持つCCR4-NOT複合体が、どのような細胞において、どのように標的RNAに作用するかを明らかにする。

3. 研究の方法

Cnot3(CCR4-NOT複合体)の動脈硬化病態形成における役割を検証するため、

- (1) 動脈硬化モデル動物であるApoE欠損マウス(ApoEKO)の動脈硬化巣におけるCnot3の発現パターンを検討した。またApoEKOを背景にしたCnot3ヘテロ欠損マウス(Cnot3Het^z)を樹立し、大動脈におけるApoEKO;Cnot3Het^zの動脈硬化進行程度を検討した。
- (2) 動脈硬化進行において重要な役割を持つマクロファージに着目し、フローサイトメトリー法を用いてCnot3が欠損した骨髄由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)の細胞機能について解析した。
- (3) 動脈硬化発症メカニズムとして、Interferon(IFN)シグナルによるマクロファージの炎症応答に焦点をあて、Cnot3欠損BMDMsにおいてIFN関連遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法およびウェスタンブロット法を用いて評価し、炎症応答におけるCnot3の役割およびそのメカニズムについて検討した。

4. 研究成果

- (1) マウス動脈硬化巣組織免疫染色の結果から、Cnot3は動脈硬化に重要なマクロファージおよび平滑筋細胞に強く発現していた(図1)。そこで、ズダンIVを用いたen face stainingの解析から、ApoEKO;Cnot3Het^zの大動脈では脂質の蓄積がコントロールに比べより顕著であることが

明らかとなり(図2)、CCR4-NOT 複合体の機能不全は動脈硬化進行に繋がることが示唆された。

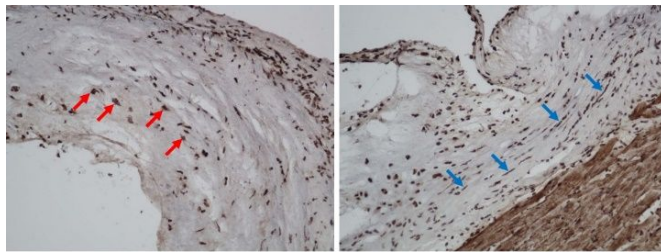


図1 マウス動脈硬化巣におけるCnot3の発現
(赤矢印はマクロファージ、青矢印は平滑筋細胞を示す)

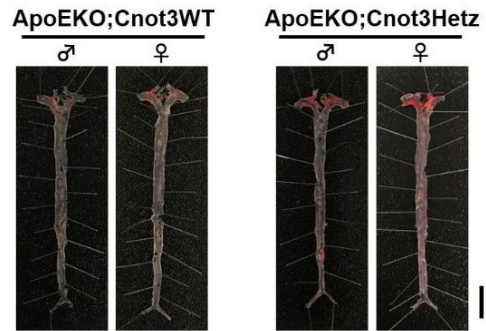


図2 Cnot3(CCR4-NOT)のヘテロ欠損マウスでは動脈硬化の病態が悪化する

(2)今までの報告から、CCR4-NOT 複合体は細胞分裂をはじめとする様々な細胞機能を制御することが知られているが、野生型に比べ Cnot3 を欠損した BMDMs は、形態異常に伴い PI 陽性細胞の割合が増加しており、細胞死が亢進していることが明らかとなった(図3)。

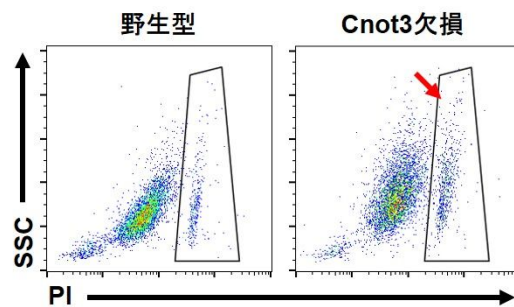


図3 Cnot3欠損マクロファージは細胞死が亢進する

(3) 次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq の解析から、ApoEKO;Cnot3Hetz における動脈硬化巣では、より多くのマクロファージや CD4 陽性 T 細胞の浸潤が示唆されたと同時に、IFNシグナルによって誘導される Cxcl9 や Cxcl10 などの遺伝子が高発現を示し、つまり IFN による炎症応答が亢進していることが考えられた。そこで、動脈硬化促進作用を持つ IFN γ によるマクロファージの活性化を解析したところ、Nos2 や Cxcl10 の遺伝子誘導が Cnot3 欠損 BMDMs において顕著に促進されていた(図4)。さらに、Cnot3 欠損マクロファージでは IFNシグナルに重要な転写因子 STAT1 の発現が上昇していた(図5)。

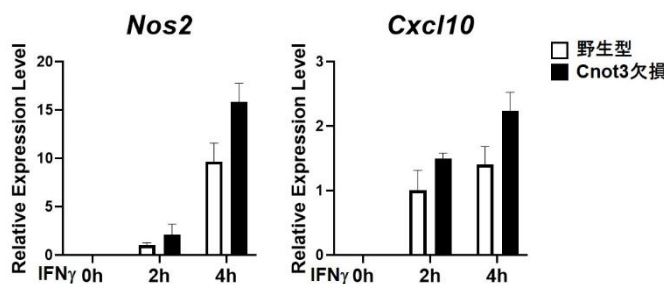


図4 Cnot3欠損マクロファージではIFN γ による炎症応答が促進される

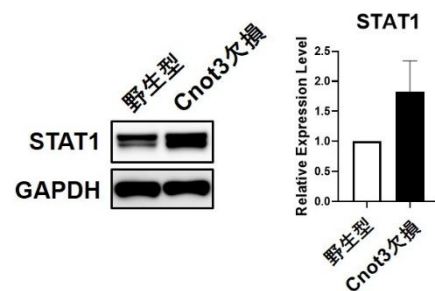


図5 Cnot3欠損マクロファージではSTAT1の発現が上昇する

以上の結果から、Cnot3(CCR4-NOT 複合体)は IFNシグナル経路の制御に関与し、動脈硬化症をはじめとする炎症性疾患の負のレギュレーターであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi T, Hoshizaki M, Minato T, Nirasawa S, Asaka MN, Niiyama M, Imai M, Uda A, Chan JF, Takahashi S, An J, Saku A, Nukiwa R, Utsumi D, Kiso M, Yasuhara A, Poon VK, Chan CC, Fujino Y, Motoyama S, Nagata S, Penninger JM, Kamada H, Yuen KY, Kamitani W, Maeda K, Kawaoka Y, Yasutomi Y, Imai Y, Kuba K	4. 巻 12
2. 論文標題 ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP protects from SARS-CoV-2-induced lung injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27097-8	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安健博，山口智和，星崎みどり，久場敬司
2. 発表標題 動脈硬化形成におけるCCR4-NOT の役割及び制御機構の解析
3. 学会等名 第87回日本生化学会東北支部例会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 安健博，山口智和，星崎みどり，久場敬司
2. 発表標題 マクロファージを介したCCR4-NOTの動脈硬化進行への影響
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021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
---------	---------