

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19043

研究課題名（和文）脳動脈瘤破裂と関連する炎症性遺伝子群のエピジェネティックな転写制御メカニズム解明

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of inflammatory genes associated with the rupture of intracranial aneurysms

研究代表者

中岡 博史（Nakaoka, Hirofumi）

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教

研究者番号：70611193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究において、我々は破裂脳動脈瘤と未破裂脳動脈瘤で顕著な差異が認められる遺伝子群から、マクロファージを介した炎症反応亢進が脳動脈瘤破裂と関連する分子特性であることを明らかにした。破裂脳動脈瘤と関連する炎症反応性遺伝子には、多数の転写因子が含まれていた。これら転写因子の結合認識部位近傍に存在する遺伝子の発現データを検討し、下流遺伝子群の動態を明らかにした上で、遺伝子群の発現レベルの相関関係や転写因子-標的遺伝子の関連性に基づき、階層的転写制御ネットワークを構築した。脳動脈瘤破裂と関連する炎症性転写因子が寄与する生物学的パスウェイをネットワークレベルで解明するための重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In our previous study, we demonstrated that macrophage-mediated inflammation is a key biological pathway for the rupture of intracranial aneurysms. We focused on the inflammatory transcription pathway factors associated with the rupture of intracranial aneurysms. We explored the expression profiles of genes with binding motifs of these transcription factors, and constructed a hierarchical transcriptional regulatory networks associated with the rupture of intracranial aneurysms. We performed epigenetic analysis of these genes.

研究分野：統計遺伝学

キーワード：脳動脈瘤 くも膜下出血 マクロファージ 炎症反応 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の破裂は生命の危険を伴う重篤な疾患であるくも膜下出血を起こすため、破裂前診断が予防のために重要となる。我々は国際共同研究による脳動脈瘤ゲノムワイド関連解析(GWAS)により、脳動脈瘤発症に關与する複数の遺伝子座を同定してきた(Yasuno et al. 2010 Nat Genet; Akiyama et al. 2010 J Hum Genet)。さらに、脳動脈瘤は、破裂・未破裂、多発性、病変部位や瘤のサイズなどの表現型(subphenotype)が患者の転帰に差異をもたらす疾患であることから、GWASで同定したSNPsが特定のsubphenotypeと強く關連する可能性について検討した。その結果、9p21領域のSNPの効果は、脳動脈瘤の発症部位によって異なり、破裂リスクの高い後交通動脈および後方循環の瘤の形成に強く關連することを明らかにした(Nakaoka et al. 2010 Stroke)。これらは、脳動脈瘤の発症メカニズムという複雑な生命現象の解明に向けた基盤的知見になりうる。しかし、同定したSNPsは脳動脈瘤リスクを1.3倍程度高める効果しかなく、これだけで病態に迫ることはできないと考えられる。

一年あたりの脳動脈瘤破裂リスクは約1%と推定されており、生涯にわたり未破裂のままである可能性も高い。先制医療として適切な治療介入を決定する上で、脳動脈瘤の将来の破裂リスクと關連する分子表現型同定が最重要課題である。脳動脈瘤病変組織を用いた網羅的遺伝子発現解析が行われてきたが、脳動脈瘤組織の状態は患者ごとに一様ではなく、破裂を特徴づける遺伝子を多数同定するには至らなかった。そこで、申請者らは、網羅的遺伝子発現プロファイルに対して、次元縮約法に基づく統計解析を適用し、破裂・未破裂脳動脈瘤検体を均一なサブセットに分類することで、破裂脳動脈瘤検体が発症時年齢によって若年と高齢患者で異なる遺伝子発現パターンを示すことを世界に先駆けて報告した(Nakaoka et al. 2014 Stroke)。さらに、若年破裂脳動脈瘤は、破裂しやすい脳動脈瘤の分子的特性を有していると考え、若年破裂と未破裂脳動脈瘤の遺伝子発現量を比較し、有意な差異が認められる1,047遺伝子を同定した。同定した遺伝子群は、マクロファージを介した炎症反応亢進が脳動脈瘤破裂と關連する分子特性であることを示唆するものであった(Nakaoka et al. 2014 Stroke)。

上述の研究で同定した遺伝子群は、血中バイオマーカーや治療標的分子探索に有益な情報をもたらすと考えられる。破裂脳動脈瘤で顕著な発現減少が認められた、抗炎症に關わる転写因子であるKLFファミリー(KLF2, KLF12, KLF15)に注目している。スタチン投与がKLFの発現上昇を介して血管の炎症や動脈障害を抑制する(Bu et al. 2010 J Clin Invest)、また、脳動脈瘤動物モデルでスタチン投与が瘤増大抑制効果を示す(Aoki et

al. 2008 Stroke)という知見から、脳動脈瘤破裂に關連する分子表現型であるKLFファミリー発現低下を、スタチン投与によって補うことで、脳動脈瘤増大抑制が期待でき、ひいては破裂予防効果につながると考えられる。科学的発見から臨床応用の可能性を検討する上で、これら炎症反応關連遺伝子が破裂脳動脈瘤組織において発現異常を呈する分子メカニズム解明が求められる。

### 2. 研究の目的

先行研究で同定した脳動脈瘤破裂と關連する炎症反応性遺伝子には、KLFファミリーだけではなく、多数の転写因子が含まれていた。本申請課題では、これら転写因子が結合する認識部位近傍の遺伝子発現データを検討することで、下流遺伝子群の動態を明らかにし、脳動脈瘤破裂と關係する炎症性転写因子が寄与する生物学的パスウェイをネットワークレベルで解明する。

また、脳動脈瘤血管内皮細胞のDNAメチル化状態の変化によって炎症反応關連遺伝子が発現異常をきたし、血管の恒常性が破綻することが、脳動脈瘤破裂に繋がっている可能性について検証するため、メチローム解析によって、破裂および未破裂脳動脈瘤組織についてDNAメチル化レベルが異なる領域を同定し、破裂脳動脈瘤を特徴づける炎症反応關連遺伝子の転写制御メカニズムを解明する。

脳動脈瘤組織収集の困難が、脳動脈瘤破裂の分子機構解明への研究の大きな障害となっている。そこで、110歳以上の超百寿者から樹立したiPS細胞を血管内皮細胞へと分化させ、これを正常な血管内皮細胞モデルとして利用することが可能になれば、検体収集の困難を克服できるのではないかと考えた。超百寿者は大きな疾病に罹患せず、動脈硬化、糖尿病、がんが少ないといった事実から、強いストレス耐性を持っていると推測され、頑健な遺伝子発現ネットワークの最適なモデルとなりうる。そこで、超百寿者iPS細胞から分化させた血管内皮細胞が正常な血管内皮細胞モデルとして有用であるかを評価するため、血管内皮細胞への低酸素ストレスに対する頑健性を、百寿者由来内皮細胞と一般健康人由来内皮細胞で比較することによって検証した。次世代シーケンサーを用いたRNA-sequencingに基づく網羅的遺伝子発現解析を行った。

### 3. 研究の方法

先行研究で同定した脳動脈瘤破裂と關連する炎症反応性遺伝子には、KLFファミリーだけではなく、多数の転写因子が含まれていた。そこで、先行研究において破裂・未破裂脳動脈瘤で発現量に顕著な差異が認められた遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域に対して、これら転写因子の結合モチーフが存在するかどうかをバイオインフォマティクス・ツールによって評価する。この

解析によって、脳動脈瘤破裂と関係する炎症性転写因子が寄与する生物学的パスウェイをネットワークレベルで同定する。

#### 4. 研究成果

先行研究で同定した脳動脈瘤破裂と関連する炎症反応性遺伝子には、多数の転写因子が含まれていたことから、これら転写因子の結合認識部位近傍に存在する遺伝子の発現データを検討し、下流遺伝子群の動態を明らかにした。破裂脳動脈瘤で顕著な発現減少が認められた、抗炎症に関わる転写因子である KLF ファミリー (KLF2, KLF12, KLF15) 結合認識部位を遺伝子近傍のプロモーター領域やエンハンサー領域に有し、破裂脳動脈瘤で顕著に発現量が変動している遺伝子群を同定することに成功した。これら遺伝子群の発現レベルの相関関係や転写因子 標的遺伝子の関連性に基づき、階層的転写制御ネットワークを構築した。脳動脈瘤破裂と関係する炎症性転写因子が寄与する生物学的パスウェイをネットワークレベルで解明するための知見が得られた。

さらに詳細な分子メカニズムを探索するため、上述の遺伝子近傍領域におけるエピゲノム解析を検討した。さらに、動脈に浸潤する免疫細胞におけるエピジェネティックな転写制御について検討した。

超百寿者 iPS 細胞から分化させた血管内皮細胞が正常な血管内皮細胞モデルとして脳動脈瘤研究に有用であるかを評価するため、血管内皮細胞への低酸素ストレスに対する頑健性を、百寿者由来内皮細胞と一般健常人由来内皮細胞を比較した。内皮細胞への低酸素ストレス負荷によって変化する転写制御ネットワークを捉えるために、TFmiR を用いた解析を行った (Hamed et al. 2015 *Nucleic Acids Res*)。百寿者由来内皮細胞と一般健常人由来内皮細胞で低酸素ストレスに対する発現応答に差異の認められた 289 遺伝子のうち、“hypoxia” に関わるオントロジーを有する遺伝子について、TFmiR を適用した。その結果、これら遺伝子と相互作用することが推測される 17 microRNA を含む転写制御ネットワークが得られた。ネットワークには加齢に伴う疾患との関連が示唆される microRNA が有意に集積していた。

内皮細胞における低酸素状態によって誘導される、一酸化窒素産生から心筋肥大に至る経路に関わる重要な遺伝子が、本研究で構築した遺伝子発現ネットワークモデルに含まれていた。低酸素ストレス負荷によって、これらの遺伝子が一般人健常者と超百寿者で異なる発現動態を示すことが明らかになった。RGS4 発現パターンに基づいて同定された Akt/mTOR 経路およびカルシニューリン/NFAT 経路において、低酸素処理前後での遺伝子発現変化は超百寿者に比べて一般健常人で大きかった。このことは、ストレス負荷によって誘導される転写調節異常に対して、

超百寿者が何らかの維持機構 (resilience) を有しているという仮説を支持するものである (Friend SH & Schadt EE. 2014 *Science*)。iPS 細胞由来の内皮細胞は、CD31 や VE カドヘリンといったマーカー分子発現や血管内皮細胞管形成能評価から、血管関連研究モデルとしての有用性が示されているが、本研究ではストレス耐性の観点から超百寿者由来 iPS 細胞から分化させた内皮細胞が優れたモデルになりうることを示すことができた。また、本研究の成果は、一般健常者と超百寿者という生物学的に決定的な差異があるとは考えにくい細胞間であっても、ストレス負荷によって差異を顕在化させることが可能であることを示唆しており、iPS 細胞がヒト疾患や複雑形質における分子メカニズムを理解する上で優良な実験モデル系として利用可能性があることを示唆するものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

査読有

1. Ahmadloo S\*, Nakaoka H\*, Hayano T, Hosomichi K, You H, Utsuno E, Sangai T, Nishimura M, Matsushita K, Hata A, Nomura F, Inoue I. Rapid and cost-effective high-throughput sequencing for identification of germline mutations of BRCA1 and BRCA2. *J Hum Genet.* 2017; 62(5): 561-567. doi: 10.1038/jhg.2017.5.

\*Co-first author

2. van 't Hof FN, Ruigrok YM, Lee CH, Ripke S, Anderson G, de Andrade M, Baas AF, Blankensteijn JD, Böttlinger EP, Bown MJ, Broderick J, Bijlenga P, Carrell DS, Crawford DC, Crosslin DR, Ebeling C, Eriksson JG, Fornage M, Foroud T, von Und Zu Fraunberg M, Friedrich CM, Gaál EI, Gottesman O, Guo DC, Harrison SC, Hernesniemi J, Hofman A, Inoue I, Jääskeläinen JE, Jones GT, Kiemenev LA, Kivisaari R, Ko N, Koskinen S, Kubo M, Kullo IJ, Kuivaniemi H, Kurki MI, Laakso A, Lai D, Leal SM, Lehto H, LeMaire SA, Low SK, Malinowski J, McCarty CA, Milewicz DM, Mosley TH, Nakamura Y, Nakaoka H, Niemelä M, Pacheco J, Peissig PL, Pera J, Rasmussen-Torvik L, Ritchie MD, Rivadeneira F, van Rij AM, Santos-Cortez RL, Saratzis A, Slowik A, Takahashi A, Tromp G, Uitterlinden AG, Verma SS, Vermeulen SH, Wang GT; Aneurysm Consortium; Vascular Research Consortium of New Zealand, Han B, Rinkel GJ, de Bakker PI. Shared genetic risk factors of intracranial, abdominal, and thoracic aneurysms. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(7):

e002603.

<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002603>

3. Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo A, Omer WH, Yoshihara K, Yamamoto A, Kurose K, Enomoto T, Akira S, Hosomichi K, Inoue I. Allelic imbalance in ANRIL regulation at 9p21 endometriosis risk locus. *PLoS Genet.* 2016; 12(4): e1005893. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005893>.

4. Rabbani B, Nakaoka H, Akhondzadeh S, Tekin M, Mahdieh N. Next Generation Sequencing: Implications in personalized medicine and pharmacogenomics. *Mol Biosyst.* 2016; 12(6): 1818-1830. 10.doi: 10.1039/c6mb00115g.

5. Nakaoka H, Inoue I. Distribution of HLA haplotypes across Japanese Archipelago: similarity, difference and admixture. *J Hum Genet.* 2015; 60(11): 683-690. doi: 10.1038/jhg.2015.90.

[学会発表](計3件)

1. Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo S, Omer W, Hata C, Kimura T, Hosomichi K, Inoue I. Allelic imbalance in regulation of ANRIL through chromatin interaction at 9p21 endometriosis risk locus. The American Society of Human Genetics 66th Annual Meeting. October 21, 2016. Vancouver, Canada.

2. Casingal CR, Nakaoka H, Arai Y, Hirose N, Inoue I. RNA sequencing reveals stress responses of iPSC-derived endothelial cells isolated from peripheral blood mononuclear cells of supercentenarians. The 13th International Congress of Human Genetics. April 7, 2016. Kyoto, Japan.

3. Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo S, Omer W, Hosomichi K, Inoue I. Allelic imbalance in regulation of ANRIL through chromatin interaction at 9p21 endometriosis risk locus. The 13th International Congress of Human Genetics. April 5, 2016. Kyoto, Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中岡 博史 (NAKAOKA, Hirofumi)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教

研究者番号：70611193