

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

所属	東京大学 アイソトープ総合センター
氏名	神吉康晴
研究テーマ	動脈硬化を惹起する miRNA の同定及び機能解析

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

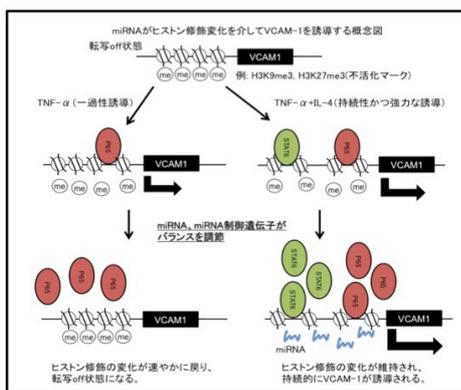
研究目的

接着因子 VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) は動脈硬化巣に限局的に強く発現し、単球接着を介した初期動脈硬化進展の key factor である。in vitro で血管内皮細胞に炎症性刺激 TNF- α を加えても一過性には誘導されるものの持続的で強い誘導にはならないが、我々は TNF- α と IL-4 が協働して作用すると持続的かつ強い誘導になることを報告した (Kanki Y et al 2011 MCB)。次に、申請者らは、血管内皮細胞における炎症性刺激下で miRNA が重要な機能を果たすことを報告した (Papantonis A, Kanki Y et al 2012 EMBO J)。そこで、本研究では、持続的な VCAM-1 誘導を可能にしている機構として miRNA によるエピゲノム変化を想定し、以下の研究を行った。

実験項目及び手法

- (1) ヒト培養血管内皮細胞に TNF- α 、IL-4 刺激を加えた際に変動する miRNA の同定
- (2) 見出した miRNA の in vitro での接着因子の発現制御及び単球接着に与える影響解析
- (3) AGO2 抗体を用いた RIP assay による miRNA の標的 mRNA の同定
- (4) ChIP アッセイを用いた接着因子遺伝子座のヒストン修飾の変動と miRNA の関係
- (5) ヒト臨床検体を用いた、動脈硬化初期マーカーの可能性検討

研究成果



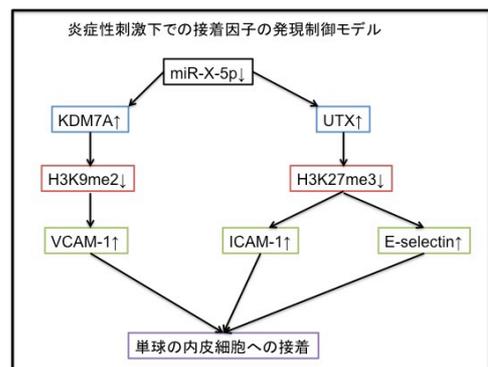
まず、HUVECs (ヒト臍帯静脈内皮細胞) に TNF- α 刺激、IL-4 刺激を行い、共通して有意に発現の変動した miRNA を、miRNA アレイを用いて同定した (以下、miR-X とする)。この miR-X を強制発現させた HUVECs において、TNF- α 刺激や IL-4 刺激を行うと、VCAM-1 の誘導が顕著に抑制されるだけではなく、他の接着因子である ICAM-1 や E-selectin も抑制され、その結果として内皮細胞への単球接着が抑制されることを見出した。

次に、そのメカニズム解明のため、miRNA の標的を in silico での配列予測だけではなく、AGO2 抗体を用いた RIP (RNA Immunoprecipitation)-array により絞り込み、KDM7A と UTX という2つのヒストン脱メチル化酵素を同定した。

更に、HUVECs においてヒストン修飾抗体を用いた ChIP アッセイにより、VCAM1 遺伝子座では KDM7A が H3K9me2 を脱メチル化していること、ICAM-1、E-selectin 遺伝子座では H3K27me3 を脱メチル化することでエピゲノム情報を書き換え、持続的な誘導を可能にしていることを見出した。

最後に臨床への応用として、動脈硬化のヒトの血清から exosome を抽出し、miR の変動解析を試みている。

以上、本研究助成では、助成期間内に、当初の目的であった miRNA による動脈硬化遺伝子の発現制御のみならず、miRNA-ヒストン修飾酵素による制御モデルという新たな転写制御モデルを提示することが出来た。



Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—
研究成果報告書(最終) <発表実績/予定一覧>

所	属	東京大学 アイソトープ総合センター
氏	名	神吉康晴

1. 論文発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
1		Mari Katsura, Hiromasa Cyou-Nakamine, Qin Zen, Yang Zeng, Hiroko Nansai, Shota Amagasa, Yasuharu Kanki, Tsuyoshi Inoue, Kiyomi Kaneki, Akasi Taguchi, Mika Kobayashi, Toshiyuki Kaji, Tatsuhiko Kodama, Kiyoshi Miyagawa, Youichiro Wada, Nobuyoshi Akimitsu, Hideko Sone. Effects of Chronic Low-Dose Radiation on Human Neural Progenitor Cells <i>Sci. Rep.</i> in press 2015 (査読あり)
2		Suehiro J, Kanki Y, Makihara C, Schadler K, Miura M, Manabe Y, Aburatani H, Kodama T, Minami T. Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. <i>J Biol Chem.</i> 2014 Oct 17;289(42):29044-59. (査読あり)
3		Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y. Direct evidence for pitavastatin induced chromatin structure change in the KLF4 gene in endothelial cells. <i>PLoS One.</i> 2014 May 5;9(5):e96005. (査読あり)
4		Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y. Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. <i>Genome Biol.</i> 2014 Apr 10;15(4):R63. (査読あり)
5		Mimura I, Kanki Y, Kodama T, Nangaku M. Revolution of nephrology research by deep sequencing: ChIP-seq and RNA-seq. <i>Kidney Int.</i> 2014 Jan;85(1):31-8. (査読あり)
6		Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M. GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. <i>Genes Cells.</i> 2013 Nov;18(11):921-33. (査読あり)
7		神吉康晴、「血管エピゲノム網羅解析の現状」血管医学 Vol.14 No.4, 9-17, 2013(査読なし)、メディカルレビュー社

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015年5月	15 th International Congress of Radiation Research Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Ryo Nakaki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada 「Chromatin interaction between mRNA and miRNA mediated by NR2F2 is important for vein identification.」
2	2015年5月	春期特別日本血管生物医学会シンポジウム Yasuharu Kanki, Jun-ichi Suehiro, Ryo Nakaki, Tsuyoshi Osawa, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Takashi Minami 「A novel epigenetic mechanism revealed tumor associated angiogenesis」
3	2015年3月	生命動態の分子メカニズムと数理 神吉康晴 「血管内皮増殖シグナルの多様性解析」
4	2014年12月	The 4D Nucleome 2014 Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Ryo Nakaki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada 「Chromatin interaction between mRNA and miRNA mediated by NR2F2 is important for vein identification.」
5	2014年11月	第37回日本分子生物学会年会 Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada 「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity.」
6	2014年10月	第87回日本生化学会大会 Yasuharu Kanki, Teppei Shimamura, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada 「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity.」
7	2014年8月	The 11th EMBL Conference Transcription and Chromatin Yasuharu Kanki 「Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity.」
8	2014年6月	International Society for Stem Cell Research the 12th annual meeting Kanki Yasuharu, Matsunaga Taichi, Ryo Nakaki, Yamamizu Kohei, Shimamura Teppei, Miyano Satoru, Aburatani Hiroyuki, Kodama Tatsuhiko, Wada Youichiro, Yamashita Jun, Minami Takashi 「GENETIC AND EPIGENETIC LANDSCAPE OF ENDOTHELIAL CELLS DIFFERENTIATION REVEAL THE TRANSCRIPTIONAL FACTORS NETWORK」

9	2014年4月	The 18th International Vascular Biology Meeting Yasuharu Kanki, Taichi Matsunaga, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada, Tatsuhiko Kodama, Jun Yamashita, Takashi Minami 「Transcription Factor GATA2 is indispensable for the Differentiation and Maintenance of Vascular Endothelial Cells」
10	2013年10月	第72回日本癌学会学術総会 Yasuharu Kanki, Jun-ichi Suehiro, Tsuyoshi Osawa, Imari Mimura, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Takashi Minami 「A novel epigenetic mechanism revealed tumor associated angiogenesis」
11	2013年9月	第86回日本生化学会大会 神吉康晴、興梶貴英、堤修一、三村維真理、松永太一、山水康平、片山志織、油谷浩幸、児玉龍彦、和田洋一郎、山下潤、南敬 「Transcription factor GATA2 is indispensable for the differentiation and maintenance of vascular endothelial cells」
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2015年12月	第38回日本分子生物学会年会 ワークショップ Yasuharu Kanki, Jun-ichi Suehiro, Ryo Nakaki, Tsuyoshi Osawa, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Takashi Minami 「A novel epigenetic mechanism revealed tumor associated angiogenesis」
2		
3		
4		