

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <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 の機能解析

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

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、TNF-α と IL-4 が協働して作用すると持続的でかつ強い誘導になることを我々は報告した (Kanki Y et al 2011 MCB)。次に、申請者らは、血管内皮細胞において炎症性刺激下で 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 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

研究成果

まず、HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) に TNF-α 刺激を行い、有意に発現の変動した miRNA として、miR-3679-5p を同定した。この miR を強制発現させた HUVEC において TNF-α 刺激を行うと、VCAM-1 の誘導が顕著に抑制されるだけでなく、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。

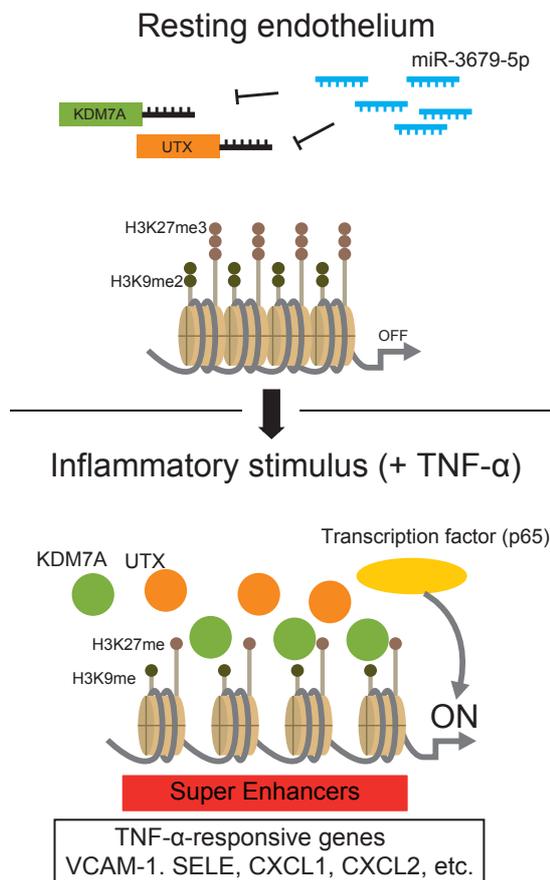
次に、そのメカニズム解明のため、miRNA の標的を in silico での配列予測だけではなく、AGO2 抗体を用いた RIP (RNA Immunoprecipitation)-array により絞り込み、KDM7A と UTX という2つのヒストン脱メチル化酵素を同定した。

更に、HUVEC においてヒストン修飾抗体を用いた ChIP アッセイにより、TNF-α 刺激に応答する遺伝子のほとんどは、刺激に応じて KDM7A、UTX がその遺伝子座にリクルートされること、及び、その結果として抑制系ヒストン修飾 H3K9me2、H3K27me3 が脱メチル化されることを見出した。

最後に、in vivo で KDM7A、UTX の阻害剤をマウスに投与し、単球接着を観察したところ、阻害剤投与によって接着が有意に低下することも見出した。

結論

以上の成果により、動脈硬化を惹起する新規 miRNA として miR-3679-5p を、新規ヒストン修飾酵素として KDM7A、UTX を同定した。また、これらによって、「ゲノムワイドに起こる抑制系ヒストン修飾の脱メチル化が動脈硬化に関与する」という新たな分子メカニズムを提唱することが出来た。



Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

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 の機能解析

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

(研究目的)

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重要であることが分かってきており、ENCODE project に代表される国際プロジェクトの成果もデータベースとして活用されている。高齢化社会が進んだ現在、日本人の主要な死因はがん、心疾患、脳血管疾患である。がんの進行には低酸素から免れるための血管新生が重要であり、心疾患および脳血管疾患においては高脂血症、慢性炎症に起因する動脈硬化が重要である。これらすべての病態にはいずれも血管内皮細胞が深く関与しており、血管の生理および病態の基本原則を分子レベルで解明することが様々な病気の理解の基本ステップとなると考えられる。所属研究室ではこれまでに、血管内皮細胞を用いて、血管分化とエピゲノム修飾の関連を報告した(Kanki Y et al 2017 *Nuc Acids Res*)。また血管内皮細胞特異性に転写因子 GATA2 が寄与していること、及び、GATA2 のゲノム上への結合はその細胞特異的なヒストン修飾に規定されていることを見出した(Kanki Y et al 2011 *EMBO J*)。さらに、血管内皮細胞が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- α (TNF- α) に応じたゲノムワイドな miRNA 誘導機構を報告しており (Papantonis A, Kanki Y et al 2012 *EMBO J*)、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。

動脈硬化は、高血圧や高血糖により傷ついた血管内皮へ単球が接着することを引き金として始まる。その最初のステップとして、血管内皮細胞では、TNF- α や IL-4 などの炎症刺激に応じて vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) や intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、E-selectin など接着因子の発現が上昇する。我々は、従来ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において、TNF- α は 4 時間をピークとして一過性に VCAM-1 を誘導するのに対して、IL-4 は 24 時間をピークとして持続的に VCAM-1 を誘導することを報告した。さらに実際の生体内で想定される TNF- α と IL-4 が共存した場合には TNF- α の一過性タイプの VCAM-1 誘導が持続性タイプに転じ、さらに相乗的に VCAM-1 を誘導するという興味深い知見を見出した(Kanki Y et al 2011 *MCB*)。この研究の中で TNF- α および IL-4 による VCAM-1 誘導にはそれぞれ NF κ B (p65) および STAT6 が関与することを明らかにしたが、VCAM-1 が持続的かつ強く誘導される機構は不明であった。

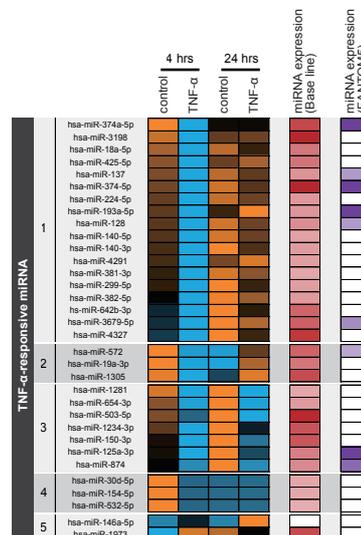
そこで本研究では、VCAM-1 の持続的かつ強い誘導を可能にしている機構として miRNA によるエピゲノム変化が関与している仮説を立て、VCAM-1 の転写制御を従来にないレベルで解き明かし、更に新しい創薬およびバイオマーカーの可能性を探索することを目的とした。

(研究方法)

(1) TNF- α 刺激に応答して変動する miRNA の同定
HUVEC に TNF- α 刺激を行い、4 時間後および 24 時間後に miRNA を回収し、マイクロアレイ解析を行い、発現変動する miRNA の同定を試みた。

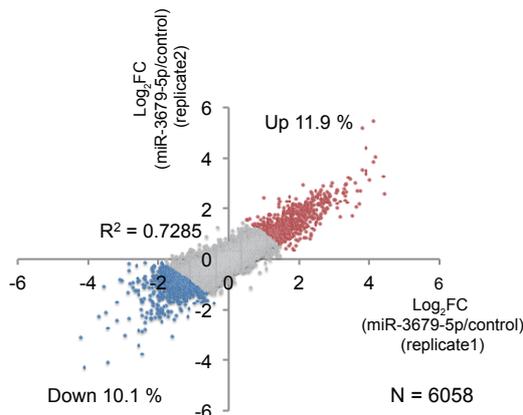
(2) 同定した miRNA の機能解析
同定した miRNA の合成 mimics を HUVEC に強制発現して、その VCAM-1 誘導に対する影響を確認した。さらにヒト単球細胞 U937 と HUVEC の混合培養の系を用いて、同定した miRNA の単球接着への影響も確認した。

(図 1) TNF刺激による miRNA変動



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

(図2) AGO2抗体を用いたRIP-array



(3) AGO2 抗体を用いた RIP array による miRNA の標的遺伝子の同定

候補 miRNA の合成 mimics を HUVEC に過剰発現させて、抗 AGO2 抗体で RNA immunoprecipitation (RIP) assay を行った。PCR および WB によりサンプルの濃縮を確認した RIP サンプルから RNA を抽出、マイクロアレイにかけて標的 mRNA を探索した。得られた候補 mRNA と標的予測サイト target scan を照合して標的 mRNA の決定を行った。抽出された mRNA が実際に候補 miRNA の標的となるかどうかについては 3' UTR-レポータークローンを用いたルシフェラーゼアッセイによって確認を行った。

(4) 同定した標的遺伝子の機能解析

標的 mRNA に対する siRNA を用いて、候補 miRNA の機能評価と同様に標的 mRNA の VCAM-1 発現および

単球接着に対する影響について評価を行った。

(5) クロマチン免疫沈降

HUVEC に TNF- α 刺激を行い、ヒストン修飾酵素 (KDM7A、UTX) および、ヒストン修飾抗体 (H3K9me2、H3K27me3) を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP-seq) を行った。

(結果)

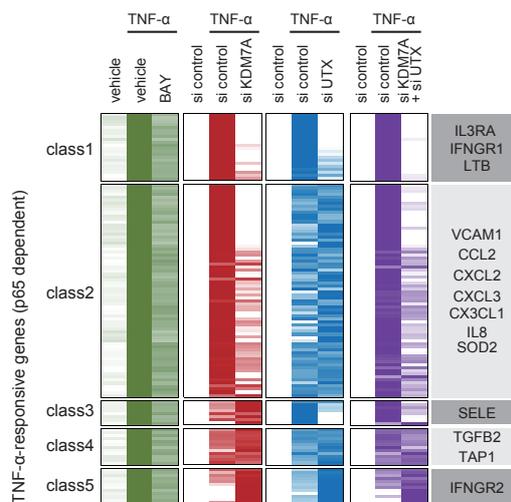
まず HUVEC に TNF- α 刺激を行い、miRNA アレイ解析を行った。TNF- α 刺激 4 時間後に発現が減少し、24 時間後に元に戻る miRNA として 18 個の miRNA を抽出し、この中で、公共データベース FANTOM5 においてヒト血管内皮での発現が報告されている miR-3679-5p に着目した (図 1)。この miR-3679-5p を強制発現させた HUVEC では TNF- α による VCAM-1 の発現誘導が有意に抑制された。また単球接着アッセイにおいて、miR-3679-5p は TNF- α による単球接着を有意に抑制した。以上の結果より、本研究で新たに見出した miR-3679-5p は、炎症性刺激下において、接着因子 VCAM-1 の発現を低下させることで、単球接着を抑制することが示された。

次にそのメカニズム解明のために、miR-3679-5p の標的となる mRNA の同定を試みた。in silico データベース、target scan を用いて miR-3679-5p の標的遺伝子を探索したところ 2,077 個の標的遺伝子が予測された。データベースによる予測は単純に配列に依存するため、予測された遺伝子が実際の生体内で miRNA の標的となるかは分からない。実際に血管内皮細胞内において、炎症性刺激下での標的を見出す手法として AGO2 抗体を用いた RIP assay に着目した。本研究では、HUVEC に miR-3679-5p の mimics を強制発現させたサンプルを用いて、抗 AGO 抗体により免疫沈降を行い、濃縮した RNA サンプルをマイクロアレイ解析した (図 2)。最終的に、Target scan で予測された 2077 個の遺伝子の中で、RIP assay において miR-3679-5p の過剰発現によって有意な発現変化が認められたヒストン修飾酵素 KDM7A (H3K9me2 の脱メチル化酵素) 及び UTX (H3K27me3 の脱メチル化酵素) を同定した。さらに reporter assay において、miR-3679-5p の過剰発現による KDM7A、UTX のルシフェラーゼ活性の有意な低下を確認した。

そこで、miR-3679-5p の標的を KDM7A、UTX と考え、KDM7A、UTX をノックダウンした HUVEC に TNF- α 刺激を行い、RNA-seq 解析を行った。その結果、TNF- α 刺激で発現が上昇する遺伝子のほとんどが、この 2 つのヒストン修飾酵素によって介在されていることを見出した (図 3)。

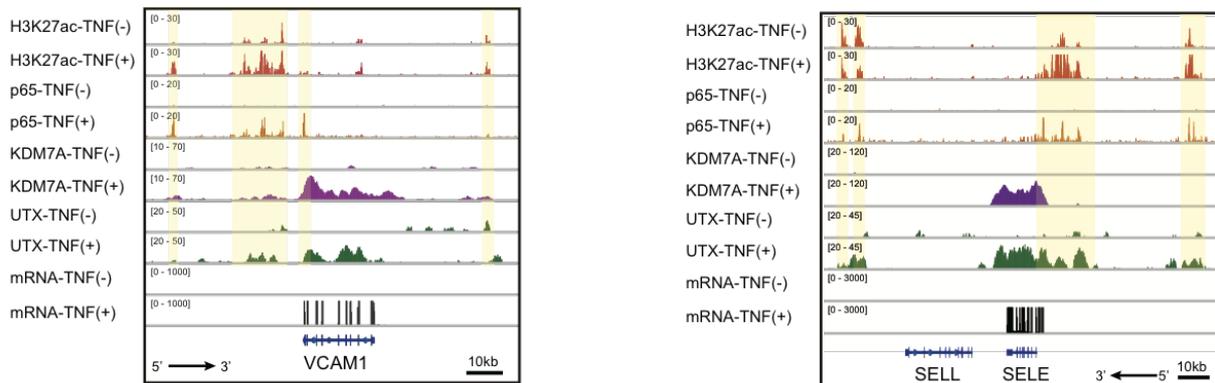
次に、これら 2 つのヒストン修飾酵素が TNF- α 刺激によってゲノム上のどこにリクルートされるかを調べるために ChIP-seq を行った。その結果、VCAM1 や E-selectin といった接着因子の遺伝子座では、KDM7A、UTX が TNF- α 刺激に応じてリクルートされることが分かった (図 4)。また、GSEA 解析を行うと、

(図3) RNA-seq



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

(図4) KDM7A、UTXのChIP-seq



TNF- α 刺激で発現が大幅に変動する遺伝子座には KDM7A や UTX が刺激応答性にリクルートされることを見出した。

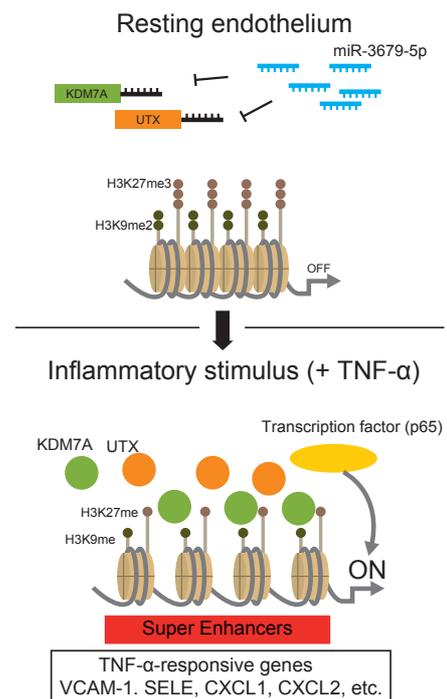
ここで、KDM7A、UTX はそれぞれ H3K9me2、H3K27me3 の脱メチル化酵素であることから、刺激に応じて H3K9me2 や H3K27me3 の修飾レベルがどのように変化するかを ChIP-seq にて解析した。その結果、TNF- α 刺激に応じてこれら抑制系ヒストン修飾は外れることが分かった。

(考察)

以上の結果より、図 5 のようなモデル図が考えられる。

通常状態の血管内皮細胞では、接着因子の遺伝子座には抑制系ヒストン修飾が入っており、転写は行われていない。一旦炎症性刺激が加わると、miR-3679-5p の発現が減少し、その結果、KDM7A、UTX のタンパクレベルが上昇する。これらタンパク質は TNF- α 刺激応答性遺伝子座にリクルートされて抑制系ヒストン修飾を解除することで、これら遺伝子の転写が ON になる。TNF- α などの炎症性サイトカイン刺激を受けていない血管内皮細胞では VCAM-1 の発現はほとんど見られず、この機構は現在でも解明されていない。VCAM-1 のプロモーター領域は GATA 配列や Ets 配列などが多く含まれており、血管内皮細胞で恒常的に発現しているプロモーターとしての性質を持っているにも関わらず、サイトカイン等の刺激無しには発現しない。この理由として積極的な抑制機構が存在しているという可能性が考えられる。積極的な抑制機構としては DNA メチル化が有名であるが、血管内皮細胞において VCAM-1 遺伝子座には DNA メチル化は濃縮されていない(データ未発表)。本研究において、世界で初めて、ヒストン修飾酵素によって、血管内皮細胞には非炎症状態を維持している積極的な機構が存在することが示唆された。炎症性刺激によって miR-3679-5p の発現が減少するメカニズムは現段階では不明だが、動脈硬化発症の機序のひとつとして micro RNA-ヒストン修飾制御の破綻による接着因子の発現亢進が関与している可能性が考えられた。

(図5) 内皮細胞活性化の新規モデル図



(今後の課題)

上記実験は *in vitro* の結果であるが、これらを *in vivo* で検証することが重要である。まず 1 点目として、今回見出した、動脈硬化を制御する miR-3679-5p が実際の動脈硬化患者血清でマーカーとして使用できるかどうか検証する必要がある。次に、KDM7A、UTX の *in vivo* での働きを調べるためには、血管内皮細胞特異的なコンディショナル KO マウスを作成し、動脈硬化がどのように進展するかを解析する。これらを行うことで、動脈硬化のような慢性炎症疾患のスタートとなるイベントに miRNA、ヒストン修飾酵素が関与していることを示すことが可能となる。

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <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"> ・ 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。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 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 <論文 PDF 添付あり>	
1	Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T. Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. <i>Nucleic Acids Res.</i> 2017 May 5;45(8):4344-4358.
2	Mimura I, Hirakawa Y, <u>Kanki Y</u> , Kushida N, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Novel lnc RNA regulated by HIF-1 inhibits apoptotic cell death in the renal tubular epithelial cells under hypoxia. <i>Physiol Rep.</i> 2017 Apr;5(8).
3	Katsura M, Cyou-Nakamine H, Zen Q, Zen Y, Nansai H, Amagasa S, <u>Kanki Y</u> , Inoue T, Kaneki K, Taguchi A, Kobayashi M, Kaji T, Kodama T, Miyagawa K, Wada Y, Akimitsu N, Sone H. Effects of Chronic Low-Dose Radiation on Human Neural Progenitor Cells. <i>Sci Rep.</i> 2016 Jan 22;6:20027.
② <論文 PDF 添付なし>	
1	Masafumi Takeda, <u>Yasuharu Kanki</u> , Hidetoshi Masumoto, Shunsuke Funakoshi, Takeshi Hatani, Hiroyuki Fukushima, Akashi Izumi-Taguchi, Yusuke Matsui, Teppei Shimamura, Yoshinori Yoshida, Jun. K. Yamashita. Identification of cardiomyocyte-fated progenitors from human induced pluripotent stem cells marked with CD82. <i>Cell Reports in press</i>

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。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 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	2017 年 11 月	2017 American Heart Association (AHA) Scientific Session Yoshiki Higashijima, Tsuyoshi Inoue, Masaomi Nangaku, Youichiro Wada, Tetsushi Furukawa, Yasuharu Kanki Lysine demethylase 6A and 7A regulated by microRNA 3679-5p mediates TNF- α -induced inflammatory signaling in vascular endothelium
2	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」
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2017 年 12 月	ConBio 2017 ワークショップ 神吉 康晴、Sagar Chittori、Doreen Matthies、Prashant Rao、Alan Merk、Sriram Subramaniam 「クライオ電子顕微鏡による単粒子解析」
2	2018 年 1 月	Yoshiki Higashijima, Yusuke Matsui, Ryo Nakaki, Yohei Abe, Tsuyoshi Inoue, Akashi Taguchi, Mai Hasegawa, Mai Miura, Masaomi Nangaku, Tatsuhiko Kodama, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada, Teppei Shimamura, Tetsushi Furukawa, Christopher K Glass, Yasuharu Kanki 「Lysine demethylase 6A and 7A mediates TNF- α -induced inflammatory signaling in vascular endothelium」 投稿予定