

## ヘテロクロマチン及び染色体構造による血管老化機構の解明

神吉康晴

東京大学アイソトープ総合センター

### 【研究の背景】

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た<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。これらすべての病態にはいずれも血管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に極めて重要であると考えられる。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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) に応じたゲノムワイドな miRNA 誘導機構を報告しており<sup>3)</sup>、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では TNF- $\alpha$  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。VCAM-1 は他の因子と比較して非常に早期から動脈硬化巣に局限して発現することから動脈硬化進展における key factor と考えられている<sup>4)</sup>。我々は、従来ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において、TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  と IL-4 が共存した場合には TNF- $\alpha$  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<sup>5)</sup>。この研究の中で TNF- $\alpha$  および IL-4 による VCAM-1 誘導にはそれぞれ NF $\kappa$ 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。

### 【目 的】

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。

### 【方 法】

- (1) 同定した miRNA (miR-3679-5p) の機能解析
- (2) AGO2 抗体を用いた RIP array による miRNA の標的遺伝子の同定
- (3) 同定した標的遺伝子の機能解析
- (4) クロマチン免疫沈降によるヒストン修飾変化の解析
- (5) Intravital microscopy による阻害剤の検証

## 【結 果】

我々はこれまでの研究で、動脈硬化時の血管内皮細胞で有意に発現の減少している miR-3679-5p を抽出している。血管内皮で接着因子特に VCAM-1 が誘導されることが動脈硬化に重要であることから、miR-3679-5p の接着因子に対する影響を調べた。その結果、miR-3679-5p を強制発現させた HUVEC では TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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 2077 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 を行った。miRNA は AGO と呼ばれるタンパク質に取り込まれた後に RISC 複合体を形成して標的遺伝子の分解あるいは翻訳抑制を行う。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。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 を脱メチル化する酵素) と UTX (H3K27me3 を脱メチル化する酵素) を miR-3679-5p の標的遺伝子として同定した。

そこで、miR-3679-5p の標的を KDM7A 及び UTX と考え、KDM7A、UTX を siRNA にてノックダウンしたところ、TNF- $\alpha$  によって誘導される遺伝子の大部分が有意に抑制された。更に、単球接着アッセイにおいて、KDM7A、UTX のノックダウンは TNF- $\alpha$  による単球接着を有意に抑制した。このことから、KDM7A、UTX は HUVEC において炎症性応答遺伝子を制御するエピゲノム因子と考えられる。

次に、炎症性遺伝子 (VCAM1 など) のヒストン修飾状態を解析するために、ヘテロクロマチンマーカーである H3K9me3、H3K9me2、H3K27me3 などの ChIP-seq を行ったところ、H3K9me2 や H3K27me3 などが TNF- $\alpha$  刺激後わずか 1 時間以内に減少することを見出した。

最後に、KDM7A、UTX の阻害剤をマウスに投与後、TNF- $\alpha$  で刺激すると、阻害剤を投与しない群に比較して単球接着が有意に抑制された。

以上の結果より、動脈硬化の初期巣において、ヘテロクロマチン修飾の速やかな除去が重要であり、ヒストン脱メチル化酵素である KDM7A、UTX が重要であることが示された。

## 【考 察】

本研究において、炎症性サイトカインを受容した際の TNF-NF $\kappa$ B pathway に、KDM7A、UTX という 2 つのヒストン脱メチル化酵素が重要な役割を持つことが示された。TNF 刺激を受容した血管内皮細胞では、これら 2 つの酵素は発現が変化するわけではなく、対象となる遺伝子座へリクルートされることを示している。しかし、なぜ特定の遺伝子座へリクルートされるのか、あるいは酵素活性が変化するのか、という疑問は残る。近年では、ヒストン修飾酵素は、その酵素活性のみならず、他のドメインも重要であることが示されており、本研究においても大きな課題である。これらを明らかにするためには、酵素ドメインを特異的にノックアウトした細胞やマウスの作成が必要となるであろう。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究における臨床的意義は 2 点ある。1 点目は、見出した miR-3679-5p という miRNA であり、これは動脈硬化の進行した患者血清では、健常人と比べて減少している可能性が示唆されている。つまり、将来的には動脈硬化の初期マーカーとなり得る可能性を秘めている。もう 1 点は KDM7A、UTX の阻害剤である。既にマウスでは単球接着を阻害するデータは取得できているが、全身投与した場合は副作用が出やすい。この理由は、KDM7A、UTX 共にユビキタスに発現しているからである。従って、ヒトへの臨床応用を考えた際には、DDS (ドラッグデリバリーシステム) をうまく活用し、血管内皮細胞のみに阻

害剤を届けるシステムの開発などを行う必要がある。

【参考・引用文献】

- 1) Romanoski CE, Glass CK, Stunnenberg HG, Wilson L, Almouzni G. Epigenomics: Roadmap for regulation. *Nature*. 2015 Feb 19;518(7539):314-6.
- 2) Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):1410-22.
- 3) Papantonis A, Kohro T, Baboo S, Larkin JD, Deng B, Short P, Tsutsumi S, Taylor S, Kanki Y, Kobayashi M, Li G, Poh HM, Ruan X, Aburatani H, Ruan Y, Kodama T, Wada Y, Cook PR. TNF  $\alpha$  signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. *EMBO J*. 2012 Nov 28;31(23):4404-14
- 4) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
- 5) Tozawa H, Kanki Y, Suehiro J, Tsutsumi S, Kohro T, Wada Y, Aburatani H, Aird WC, Kodama T, Minami T. Genome-wide approaches reveal functional interleukin-4-inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *Mol Cell Biol*. 2011 Jun;31(11):2196-209.