

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19512

研究課題名(和文) くも膜下出血によって引き起こされるくも膜細胞から内皮細胞への分化機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of differentiation from arachnoid cells to endothelium

研究代表者

和田 洋一郎(WADA, YOUICHIRO)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：10322033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜をつかった初代培養を実施し、ゲノム・エピゲノム解析を実施した。初代培養細胞を用いた、くも膜細胞から内皮細胞への分化において、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析と、ChIP-Seqによるエピゲノム解析を行い、TGF-β経路におけるシグナル伝達系の関与を示すデータをえた。特に重要な転写因子を同定し、ChIP-Seqによってゲノム上の結合部位の変化を明らかにし、結合部位近傍の遺伝子群がくも膜から内皮細胞への分化誘導において変動する遺伝子と合致することが確認できた。現在インタラクティブ解析を継続しており、内皮細胞分化におけるクロマチン構造変化の解明を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜組織は、従来脳血管周囲に存在するが、その生理的病理学的機能に不明の点が多かった。本研究は、健康時くも膜細胞において重要な転写カスケードの解明すること、主要な脳血管障害であるくも膜下出血の血管攣縮期からの回復においてくも膜細胞が果たす役割を明らかにする事、そしてくも膜細胞の内皮細胞への分化における分子機序をあきらかにすること、の3つの成果を得た。くも膜下出血における血管攣縮は、予後を左右する重要な病態であり、これに対する新規治療法の開発が可能になる点で、社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：We performed primary cultivation of arachnoid cells from brain tissue prepared from patients with or without arachnoid hemorrhage or Moyamoya disease under consent of donors. Cells were used for transcriptome analysis by RNA-seq and epigenetic analysis by ChIP-seq. Involvement of TGF-beta cascade was suggested. Among cascade related proteins, we identified one transcription factor, and evaluate the involvement and identified binding sites by ChIP-seq during differentiation from arachnoid cells to endothelium. Comprehensive interactome analysis is now ongoing and chromatin dynamics of differentiation will be elucidated.

研究分野：血管生物学

キーワード：くも膜下出血 エピゲノム解析 血管内皮細胞 脳神経外科学 血管生物学 ゲノム科学 エピゲノム科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管は他の部位と比較して、外膜が殆ど存在せず栄養血管も存在しない。代わりに平滑筋層外側にくも膜細胞が位置して血管を取り囲み、クモの巣のように支える。また、くも膜は単に外膜として存在するだけでなく隔壁を構成し、脳動脈および神経に沿った走行によって、正中より対称的に脳槽という部屋を形成する。

くも膜に関する300年以上前から記載されているが、現在に至るまで、その遺伝子発現に関する詳細な報告は乏しい。研究分担者の和田は脳神経外科臨床経験の後、申請者の所属施設において脳血管障害における血管攣縮の機序を解明するため、まず健常脳血管の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、比較対照として調製したくも膜の豊富な遺伝子発現プロファイルを見出し、くも膜と脳血管の間のクロストークに關与する遺伝子群の発現を確認した(JAT, 2002)。

また、くも膜下出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)は動脈瘤の破裂によって、くも膜下腔に血液が貯留し脳実質を圧迫するだけでなく、その約7割において発症後1~2週間に亘って脳動脈の攣縮が生じ、この間二次的な虚血が生じるために最終的に30%から60%の致死率となる重篤な疾患である。しかしながら動脈攣縮の機序については不明の点が多い。

申請者らは、脳血管のトランスクリプトーム解析において、比較対照として解析した“くも膜”が一定の条件下で内皮細胞と極めてよく似たパターンを持つことを見出し、電顕による形態学的観察によってその類似性を裏付けた。一方、各種内皮細胞とくも膜のエピゲノム情報を取得して比較したところ、SAH症例から取得されたくも膜細胞が血管内皮細胞、特に頸動脈内皮細胞とよく似た遺伝子発現パターンを示した。そこで、初代培養くも膜を*in vitro*において内皮細胞分化誘導培地で培養したところ、内皮細胞マーカーを高発現し、脱分化の可能性が示唆された。さらに、研究分担者の和田は動脈血注入によるラットくも膜下出血モデルを樹立し、血管攣縮期におけるくも膜細胞の内皮化現象を確認した。

内皮細胞とくも膜細胞の間でエンハンサー部位を比較し、モチーフ解析することによって、SMAD3を含むくも膜細胞に特徴的な転写因子群を抽出した。トランスクリプトーム解析によってSMAD3が健常くも膜に高発現する一方でSAH由来のくも膜細胞においてSMAD3の発現は抑制されていたので、内皮細胞への分化においてSMAD3経路の關与が重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では従来成果に基づいてくも膜下出血におけるくも膜から内皮細胞への脱分化を症例数を増やすことによって検証すると共に、エピゲノム解析とクロマチン相互作用解析によって、次の3つの目的を達成することによって、くも膜細胞から内皮細胞への分化機序の解明に挑む。

(1) 臨床検体由来のくも膜細胞におけるSMAD3を中心とする転写因子カスケードの評価: 内皮細胞、血球細胞、神経細胞との比較によって標準くも膜細胞において特徴的な一群のエンハンサー部位が同定され、モチーフ解析によってSMAD3を含む転写因子が抽出されて、トランスクリプトーム解析でもくも膜でSMAD3の高発現が示されている。そこで、SAH由来のくも膜細胞からRNA-seqによるトランスクリプトーム情報とヒストン修飾情報を取得し、これら転写因子の働きを評価する。

(2) くも膜細胞から内皮細胞への分化における転写因子カスケードの評価:

初代培養細胞による内皮細胞誘導系を用いて、単一細胞レベルで、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行い、抽出した転写因子カスケードが確かに変動することを検証する。

(3) 重要な転写因子を介したクロマチン構造解析:

例えばSMAD3が重要であると推測された場合、ChIP-Seqによってゲノム上の結合部位を網羅的に同定する。次に、この部位にプライマーを設計してcapture Hi-Cを行い、内皮細胞への分化に伴うクロマチン構造変化を明らかにする。重要な相互作用部位においては、engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin (enChIP)によって、結合する蛋白複合体解析が可能であり、分化を司る転写複合体を同定することができる。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体由来のくも膜細胞におけるSMAD3を中心とする転写因子カスケードの評価:

研究分担者が所属する帝京大学脳神経外科において、健常くも膜組織は未破裂動脈瘤の処置等開頭手術の際に、病態くも膜組織はくも膜下出血手術において、提供者の同意のも

と、不要となっても膜組織より調製する。

初代培養に当たっては、同機関に付置する培養施設においてコラーゲンコート培養皿を用い、1%FBS と終濃度 1 µg/ml の LIF を含んだ ES 細胞専用培地において Explant 法によって初代培養を開始する。遊走し増殖したくも膜細胞は、定期的に継代し、15 cm plate まで増幅する。内皮細胞への分化誘導実験に当たっては、内皮細胞増殖培地 EGM2MV など、VEGF を含む培地における培養を実施する。

(2) くも膜細胞から内皮細胞への分化における転写因子カスケードの評価：

2A：組織あるいは単一細胞のトランスクリプトーム解析

病態または健康くも膜組織、或いはくも膜細胞から内皮細胞への分化実験の各時点において RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行う。

特に、内皮細胞分化現象において、培養開始時点での内皮細胞の混入の可能性を除外するため、単一細胞解析が必要である。実際、ラットくも膜下出血モデルでは、単一細胞遺伝子解析装置 (C1™ Single-Cell AutoPrep System、Fluidigm 社製) を用いたパイロット研究によって、分化誘導 3 週間後に内皮細胞マーカーを示す細胞の分画が増加することが見出されており、これをヒト細胞によって追試することにより、くも膜から内皮細胞への分化の過程におけるトランスクリプトーム解析を行う。

2B：ヒストン修飾解析

1%パラホルムアルデヒドを用いて固定した凍結細胞塊を Lysis buffer に懸濁後、sonication を行い DNA の断片化と DNA の精製を行う。引きつづき定法に従って、シーケンス用リンカー付与したライブラリーを作成した後、高速シーケンサーにより塩基配列情報を取得し、ヒストン修飾マップを作成する。促進的な H3K4me3 や H3K27ac の分布を全ゲノム的に解析することによって、内皮細胞化するくも膜のヒストン修飾パターン変化を明らかにする。

上記実験によって得られたデータから、まず健康くも膜と内皮細胞の網羅的エンハンサー部位を同定し、この領域の配列を用いたモチーフ解析によって転写因子候補を抽出する。病態くも膜あるいは分化系実験におけるトランスクリプトーム解析によって実際に内皮細胞への分化において寄与する重要な転写因子カスケードを明らかにする。

(3) 重要な転写因子を介したクロマチン構造解析：

SMAD3 など重要な転写因子が明らかになれば、これを介したクロマチン構造変化を明らかにするため、まず全ゲノム上での結合部位を同定し、次にこれを介したクロマチン相互作用解析を行い、最後に重要な相互作用部位に結合する複合体同定を進める。。

3A：ChIP-Seq による転写因子結合部位の同定

ヒストン修飾解析と同様に、転写因子に対する抗体を用いた ChIP-Seq によってこれを行う。

3B：capture Hi-C による相互作用解析

転写因子の結合可能部位においてはクロマチン相互作用が予測されるので、定量的な Chromatin Conformation Capture (3C) あるいはその応用手法である Hi-C を行って相互作用頻度の変化を定量的に測定する。効率的な解析のため、capture Hi-C を行う。通常の Chromatin Conformation Capture (3C) 産物に対して、エンハンサーやプロモーターなどを含み、観察したい相互作用部位において設計された修飾 RNA プローブをハイブリさせ、プローブと結合した 3C 産物だけを濃縮後シーケンスを行う。

3C：engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin (enChIP) による複合体単離

くも膜細胞から内皮細胞への分化においてクロマチン相互作用が増加する部位には、転写にともなってクロマチン構造を制御する複合体の存在が推測される。そこで enChIP 法を用いて転写複合体を精製・濃縮する。まず、相互作用が増加するターゲット遺伝子領域に結合するガイド RNA (gRNA) を設計、合成して細胞に導入する。次に、二本鎖に結合した gRNA を認識する不活性型 Cas9 蛋白質 (dCas9) と FLAG タグの複合体を導入し、ターゲット領域に特異的に集積させる。その後、分化誘導系において任意の時点でクロソリンクを行う。通常のクロマチン免疫沈降と同様に検体を回収、断片化したのち、FLAG タグ抗体による免沈を行い DNA と蛋白の複合体を濃縮する。脱クロソリンクした後、DNA はシーケンシングによって予定していた部分と相互作用していることを確認し、蛋白成分は質量分析計を用いたショットガンプロテオミクスによって同定を行う。

4. 研究成果

臨床検体由来のくも膜細胞における SMAD3 を中心とする転写因子カスケードの評価については、臨床機関における倫理委員会での承認を得て、脳外科手術において不要となった組織から収集された正常くも膜と、くも膜下出血手術例、及びモヤモヤ病において収集さ

れたくも膜をつかった初代培養を実施した。初年度中には各5例の細胞を回収と、ゲノムエピゲノム解析を実施した。二年度目は更に10例を得て、各群間での比較を行う為の準備が完了した。

くも膜細胞から内皮細胞への分化における転写因子カスケードの評価については、初年度において、RNA-seqによるトランスクリプトームデータとH3K27ac、H3K4me3に対する抗体を用いたChIP-Seqデータをもちいたモチーフ解析によって、TGFβ経路におけるシグナル伝達系の関与を示すデータを取得した。二年度目には、同定した転写因子については、ChIP-Seqを行い、結合部位近傍の遺伝子群がくも膜から内皮細胞への分化誘導において変動する遺伝子と合致することが確認できた。以上の内容については報告書作成時点で論文投稿中である。

また、上記のように、TGFβ経路に関する転写因子のChIP-Seqによってその関与と、ゲノム上の結合部位を示唆するデータを得たので、内皮細胞の分化に伴うクロマチン構造変化(目的の3番目)をcapture Hi-Cによって解析する予定であったが、近年NovaSeqによる解析が有用であることが明らかになり、現在方針を変更し、本方法による相互作用解析を進めている。重要な相互作用部位においてはenChIPを実施するためガイドRNAを設計し、分化を司る転写複合体の同定を近々に実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. Wada H., Ishii N., Sekihara Y., Takata Y., Saito Y., Kohro T., Nakaki R., Furukawa T., Wada Y., Contribution of arachnoid cells in arterial stenosis of Moyamoya Disease suggested by ex vivo functional assay, ESOC European Stroke Organization Conference, poster, 2019/5/22~24 (Milan /Italy)

2. Wada H., Ishii N., Sekihara Y., Ota S., Kohro T., Wada Y., The characterization of arachnoid cells in Moyamoya disease, 27th ESC (European Stroke Conference) Oral presentation 2018/4/11~13

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/research/people/staff-wada_youichiro.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：和田裕美

ローマ字氏名：WADA HIROMI

所属研究機関名：東京大学

部局名：アイソトープ総合センター

職名：特任研究員

研究者番号(8桁)：60645042

研究分担者氏名：中戸隆一郎

ローマ字氏名：NAKATO RYUICHIRO

所属研究機関名：東京大学

部局名：定量生命科学研究所

職名：講師

研究者番号（8桁）：60583044

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：N/A

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。