

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02813

研究課題名（和文）心臓線維芽細胞由来血管新生抑制因子Lypd-1の発現機能解析による心疾患病態解明

研究課題名（英文）The analysis of LYPD1 expression regulatory system for understanding the mechanisms of heart diseases

研究代表者

松浦 勝久（Katsuhisa, Matsuura）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70433993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに我々は、心臓由来線維芽細胞が血管形成を抑制する働きがあり、その責任因子として新規の血管新生抑制因子であるLYPD1を同定した。本研究では、心臓由来線維芽細胞においてなぜLYPD1の発現が高いのか、また心疾患におけるLYPD1発現の意義について検討した。網羅的遺伝子発現データを用いたパイオインフォマティクス解析を駆使した結果、LYPD1の発現調節を介して血管新生を抑制する転写因子の同定に成功した。また心臓において高発現するLYPD1が、心筋梗塞後に一過性に低下することを見出し、心筋梗塞モデル動物に対するLYPD1中和抗体投与によって、左室駆出率の低下が抑制される傾向が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維芽細胞は、様々な組織・臓器に存在し、周囲の細胞の機能調節を通して組織・臓器機能に影響することが知られている。血管新生とは、組織の構造変化や細胞外マトリクスタンパクの分解を伴う現象である。心臓は、拍動によって効率的に血液を拍出し、かつ高い内圧に耐える組織的頑強さも要求される臓器であるため、転写因子レベルで血管新生を高度に負に制御する機構が存在することは、心臓の恒常性を理解する上で大変重要な知見と考えられ、心臓の様々な生理現象と当該転写因子およびLYPD1発現との関連の検証が今後必要と考える。また一過性のLYPD1抑制は、虚血性心疾患に対する新たな血管新生治療に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have identified that heart-derived fibroblasts, unlike other tissue-derived fibroblasts, have a function of suppressing angiogenesis, and that a novel angiogenesis-suppressing factor, LYPD1, is responsible for this. In this study, we investigated why LYPD1 expression is high in heart-derived fibroblasts and the significance of LYPD1 expression in heart disease. As a result of making full use of bioinformatics analysis using comprehensive gene expression data, we succeeded in identifying a transcription factor that suppresses angiogenesis through regulation of LYPD1 expression. We also found that LYPD1, which is highly expressed in the heart, transiently decreases after myocardial infarction, and it was confirmed that administration of LYPD1 neutralizing antibody to myocardial infarction model animals tends to suppress the decrease in left ventricular ejection fraction.

研究分野：循環器内科学 再生医学

キーワード：血管新生抑制因子 LYPD1 線維芽細胞

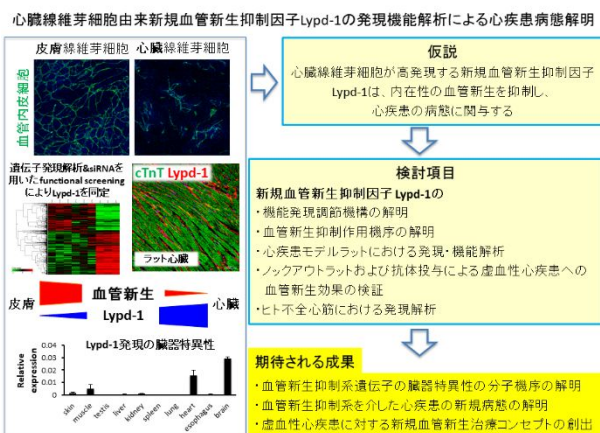
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

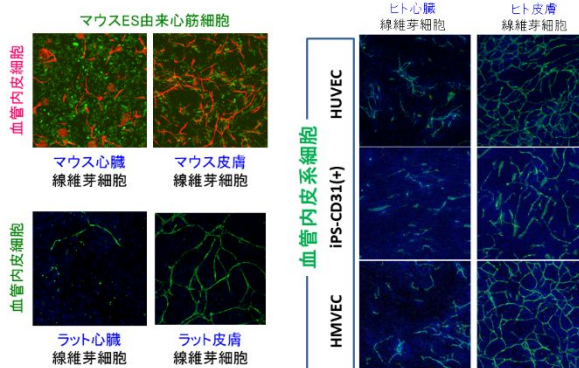
血管新生は、生体の恒常性維持に不可欠であり、促進系機序と抑制系機序のバランスにより厳格に制御されていると考えられるが、心疾患を含む多くの疾患においては血管新生促進系遺伝子・タンパクの増加・減少により組織内の微小血管数や病態が説明されることが多い。急性心筋梗塞モデル動物では、発症後に心筋組織で発現上昇する VEGF などの血管新生促進因子が十分でないために梗塞サイズの増大を来し、細胞や遺伝子を用いたそれらの補充により虚血が改善し梗塞サイズの減少に繋がることが広く知られている (Circulation 112, 1813, 2005, J Clin Invest. 119, 2204, 2009)。また圧負荷心肥大においても、p53 の発現増加による HIF-1 の低下に伴う VEGF の低下が慢性的な心筋虚血を来し、心不全発症に関与することも知られている (Nature. 446, 448-8, 2007)。一方、血管新生抑制系機序の心疾患への関与は十分明らかでない。本研究は、心臓と脳に特異的に高発現する新規血管新生抑制因子 Lypd-1 と心疾患病態との関連を明らかにすることを目的とする。心疾患と脳血管疾患は、日本の死因の第 2 位と 3 位を占める重大な疾患であり、その臓器において血管新生抑制因子である Lypd-1 が特異的に高発現することは逆説的である。しかし、心臓・脳は成体でのターンオーバーが極めて少ない post mitotic な臓器として知られ、また血管新生に際しては MMP などを経た細胞外マトリックスや組織構造の再構築を伴うことから、高い内圧に耐える組織の強度と効率的な収縮を生み出す心筋細胞の配向・組織構造を要する心臓においては、血管新生を負に制御することには合理性があると考えられる。したがって本研究によって得られる成果は、心臓の恒常性および心疾患の病態を血管新生抑制系から新たに捉えることに繋がるものであり、標的分子の新規性のみならず、その医学的価値は極めて高いものとする。

### 2. 研究の目的

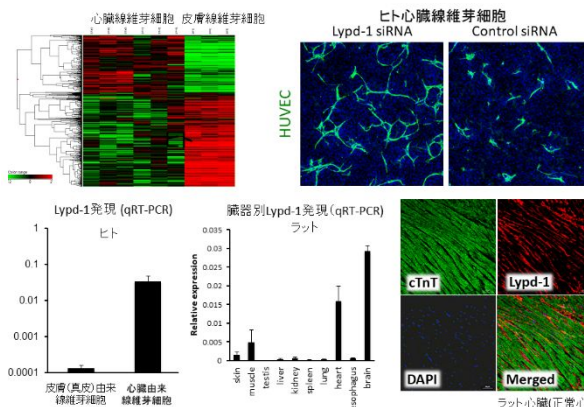
生体の心臓には、実質細胞である心筋細胞とともに線維芽細胞が最も多く存在し、血管を含め様々な細胞より構成され、健常時および心疾患における心機能は、内在する細胞間の相互作用の結果である。我々は、独自の細胞シート工学を用いて組織工学的な心筋組織を構築する過程で、ヒトを含む複数種の心臓由来線維芽細胞が血管内皮細胞のネットワーク形成を著しく抑制する現象を見出し、その原因遺伝子として Lypd-1 を同定した (特許出願済)。Lypd-1 は細胞膜に存在する GPI アンカータンパクであるが機能は未知であり、心臓線維芽細胞および心臓における報告もこれまでにない。これまでの我々の検討により、Lypd-1 は生体の組織・臓器では心臓と脳に特異的に高発現し、心臓では間質に局在することを確認している。虚血性心疾患や心肥大を伴う心疾患は、一般的に動脈硬化性変化が経年的に蓄積する中年期以降までは発症頻度が低く、また心臓原発腫瘍の発症頻度が極めて低いことから、「心臓は血管新生に関して休眠臓器に近い」と考えられ、その要因として高発現する Lypd-1 の関与が想定される。したがって、Lypd-1 の発現制御機構の解明は、心臓の血管新生能の制御に繋がるものであり、心疾患の病態と Lypd-1 の



### 心臓線維芽細胞は種によらず共培養時に血管内皮細胞ネットワーク形成を抑制する



### 心臓線維芽細胞の血管新生抑制因子の同定



関係性を明らかにするのみならず、Lypd-1 の抑制による新たな血管新生治療の創出にも繋がる点で、極めて新規性が高いと考える。

### 3. 研究の方法

#### 研究項目 1) Lypd-1 の機能発現調節機構の解明

##### 1. Lypd-1 の機能部位の同定

平成 30 年度は、Lypd-1 の血管形成抑制作用の機能部位を同定するために、野生型および変異型リコンビナント Lypd-1 を調製し、血管内皮細胞のマトリゲルアッセイおよび Lypd-1 の発現が低い皮膚線維芽細胞と血管内皮細胞の共培養系を用いて、Lypd-1 の機能部位を同定する。平成 31 年度は、Lypd-1 の発現が低い皮膚線維芽細胞に野生型および変異型 Lypd-1 を発現させたのち、血管内皮細胞と共培養して血管形成抑制機能を評価・比較することによって、同定した Lypd-1 の機能部位について検証する。

##### 2. Lypd-1 のプロモーター部位の同定と上流転写因子解析

平成 30 年度前半に、Lypd-1 の基本的な遺伝子発現調節部位を明らかにするためにプロモーター領域を同定する。Lypd-1 の上流領域をプロモーター領域と仮定し、結合する可能性のある転写調節因子および結合箇所をデータベースより抽出する。転写因子の結合予測をもとにプロモーター領域の欠失体を作成し、レポーターアッセイを行う。平成 30 年度後半からは、同定したプロモーター領域に結合する心臓線維芽細胞の核抽出液中の因子の単離を行い、質量分析による候補転写調節因子の同定を行う。平成 31 年度は候補転写調節因子の組織・臓器特異性を定量的 RT-PCR で検証するとともに、心臓線維芽細胞への上流転写因子発現抑制による Lypd-1 発現抑制および元来 Lypd-1 の発現の低い皮膚線維芽細胞への上流転写因子強制発現による Lypd-1 発現上昇を確認する。

#### 研究項目 2) Lypd-1 による血管内皮ネットワーク形成抑制の作用機序の解明

##### 1. Lypd-1 の相互作用分子の同定

平成 30 年度よりプルダウンアッセイによって Lypd-1 と相互作用する血管内皮細胞膜上の因子の同定を試みる。タグ付き Lypd-1 タンパク質の発現プラスミドを構築し、COS 細胞などで発現させたりコンビナントタンパク質をベイトとして用いる。血管内皮細胞膜画分の抽出液とタグ付き Lypd-1 とを混合したあと、タグを用いて Lypd-1 を含む複合体をプルダウンする。平成 31 年度前半までに回収したタンパク質について網羅的質量分析を行い、Lypd-1 と相互作用する血管内皮細胞膜上の分子を探索する。平成 32 年度はプルダウンアッセイ、ファーウェスタンプロット等により得られた候補分子と Lypd-1 とのタンパク質間相互作用を検証し、Lypd-1 相互作用分子を同定する。

##### 2. Lypd-1 に関連する血管内皮細胞シグナル伝達系の同定

平成 30 年度にリコンビナント Lypd-1 添加の有無の血管内皮細胞 2 群について網羅的遺伝子発現解析を行い、特に細胞増殖、遊走、細胞死に関わる遺伝子に着目して発現変動遺伝子を選び出して血管形成抑制に関わるシグナル伝達分子の候補とする。平成 31 年度からは候補分子の遺伝子発現やリン酸化等の細胞内シグナル伝達の変動を定量 RT-PCR、western blot により解析し血管形成抑制に関わるシグナル伝達分子を同定する。

#### 研究項目 3) 心疾患ラットモデルにおける Lypd-1 の発現・機能解析

##### 1. 心疾患ラットにおける Lypd-1 発現解析

平成 30 年度に、急性心筋梗塞モデルラットにおける Lypd-1 の経時的変化を定量的 RT-PCR および western blot にて評価する。平成 31 年度は、研究項目 2)-2 で明らかとなる Lypd-1 を介して変動する血管内皮細胞における遺伝子・蛋白発現を、急性心筋梗塞モデルラットにおいて評価する。

##### 2. Lypd-1 ノックアウトラットにおける機能解析

既に我々は CRISPR/CAS9 を用いて Lypd-1 ノックアウトラットの作成を完了しており、このラットを用いて Lypd-1 の血管形成抑制効果を評価し、生体における機能を検証する。平成 30 年度前半に、Lypd-1 ノックアウトおよび野生型ラットより心臓線維芽細胞を単離し血管内皮細胞との共培養を行い、心臓線維芽細胞における Lypd-1 依存性の血管形成抑制効果を *in vitro* で検証する。平成 30 年度後半より Lypd-1 ノックアウトおよび野生型ラットを用いて心筋梗塞モデルを作製し、心臓超音波やカテーテル検査により心機能を評価するとともに、梗塞サイズ、線維化、血管数を定量的に評価して *in vivo* における Lypd-1 の血管形成抑制効果およびその抑制による心保護効果を検証する。

### 4. 研究成果

#### 研究項目 1) Lypd-1 の機能発現調節機構の解明

##### 1. Lypd-1 の機能部位の同定

Lypd-1 の血管形成抑制作用の機能部位を同定するために、野生型および変異型リコンビナント Lypd-1 を調製し、血管内皮細胞のマトリゲルアッセイを用いて、Lypd-1 の機能部位を検証し、Lypd-1 の血管新生抑制活性を低下させる複数の変異体を同定できた。また既知である Lypd6 の構造をもとに、Lypd-1 タンパクの立体構造予測を行い、ジスルフィド結合部位への 1 アミノ酸置換により Lypd-1 の血管新生抑制活性が低下することも明らかとなった。

##### 2. Lypd-1 のプロモーター部位の同定と上流転写因子解析

心房線維芽細胞特異的遺伝子群のプロモーター領域抽出、ChIP-Atlas による ChIP-seq データと

の比較・抽出、HOMERによる結合モチーフ解析、さらに心臓線維芽細胞のマイクロアレイ解析データを踏まえ、心臓線維芽細胞特異的な遺伝子発現制御に関わる転写因子候補遺伝子として5遺伝子を抽出した。定量的RT-PCRによる候補遺伝子発現評価の結果、3つの候補遺伝子を選定した。心臓線維芽細胞の遺伝子A発現をsiRNAで抑制したところ、Lypd-1の発現が有意に抑制された一方で、遺伝子Bおよび遺伝子Cの発現をsiRNAで抑制してもLypd-1の発現低下が認められなかった。次にLypd-1遺伝子の5'上流1300bp程度の配列を組み込んだNIucベクターを作製し、Lypd-1の発現の高い心臓線維芽細胞、Lypd-1の発現の低い皮膚線維芽細胞におけるプロモーター活性を評価したところ、心臓線維芽細胞において顕著にレポーター活性が高いことが確認された。また遺伝子AとNIucベクターを共遺伝子導入すると、有意にレポーター活性が上昇したことから、遺伝子AはLypd-1プロモーターを正に制御していることが示唆された。siRNAによって遺伝子A発現を抑制した心臓線維芽細胞とHUVECを共培養したところ、血管内皮細胞ネットワーク形成が回復した。さらにsiRNAによって遺伝子A発現を抑制した心臓線維芽細胞とHUVECを共培養環境下にリコンビナントLypd-1を添加することで、血管内皮細胞ネットワーク形成が抑制されたことから、遺伝子AはLypd-1の転写を正に制御しその機能を制御する可能性が示された。

研究項目2) Lypd-1による血管内皮ネットワーク形成抑制の作用機序の解明

1. Lypd-1の相互作用分子の同定

Lypd-1と相互作用する血管内皮細胞膜上の因子の同定にむけてプルダウンアッセイ系の構築を行い、ベイトとして用いるタグ付きLypd-1リコンビナントタンパク質を効率的に発現できるタンパク質発現系を構築した。しかしながら、解析に用いるに足る十分量のタンパクの回収が困難であり、相互作用分子同定には至らなかった。

2. Lypd-1に関連する血管内皮細胞シグナル伝達系の同定

リコンビナントLypd-1添加の有無の血管内皮細胞2群についてRNAseq発現解析を行い、Lypd-1による血管内皮細胞のシグナル伝達分子群を同定した。

研究項目3) 心疾患ラットモデルにおけるLypd-1の発現・機能解析

1. 心疾患ラットにおけるLypd-1発現解析

新生仔ラットおよび成体ラット心臓および真皮よりRNAを抽出しLypd-1の発現を定量的RT-PCRで検証したところ、新生仔および成体いずれにおいても、心臓において有意にLypd-1の発現が高いことが確認された。また新生仔ラットおよび成体ラット心臓および真皮より線維芽細胞を単離し、Lypd-1の発現を定量的RT-PCRで検証したところ、新生仔および成体いずれにおいても、心臓由来線維芽細胞で優位にLypd-1の発現が高いことが確認された。さらに新生仔ラットおよび成体ラット心臓由来線維芽細胞を心臓由来CD31陽性血管内皮細胞と共培養を行った結果、血管内皮細胞のネットワーク形成が顕著に抑制され、この効果はLypd-1の中和抗体添加下で抑制されたことから、心臓由来線維芽細胞は、出生後一貫して血管新生抑制作用があると考えられた。また胎生15日、胎生18日のラットより心臓を摘出し、Lypd-1の発現を定量的RT-PCRで検証したところ、Lypd-1の発現量は、新生仔、成体ラット心臓と差を認めなかったことから、Lypd-1を介した血管新生抑制作用が心臓発生から成長過程においても機能していることを示唆するものである。

野生型ラットの左冠動脈を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。梗塞後ラット心臓におけるLypd-1の経時的発現変化を定量的RT-PCRで評価したところ、梗塞1日目では健常心臓に比して有意なLypd-1の発現低下を認めたものの、その後は徐々に発現レベルは上昇し、梗塞8日目には、健常心臓と同等レベルまで回復した。したがって、心筋梗塞発症早期に一過性に血管新生抑制系因子であるLypd-1の発現は低下するが、その発現低下が維持されないため、十分な血管新生が生じず、梗塞サイズの増大に關与する可能性が示唆された。

そこで、心筋梗塞ラットに対しLypd-1に対する中和抗体を投与したところ、左室駆出率の低下が抑制される傾向が認められた。

2. Lypd-1ノックアウトラットにおける機能解析

Lypd-1ノックアウトラットの心臓は、形態学的に健常ラット心臓と著変なく、心臓超音波検査においても、壁の菲薄化や左室収縮能の低下など、顕著な心機能低下は認められなかった。次に、Lypd-1ノックアウトラット左前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。梗塞後4週間の時点で、野生型ラット心筋梗塞モデルに比して有意な左室拡張末期径の拡大抑制が認められた一方で、左室収縮能の低下の顕著な抑制効果は認められなかった。今後コンディショナルノックアウトラットを用いた急性のLypd-1発現抑制による心臓への影響を検証する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoru Sakamoto, Katsuhisa Matsuura, Shinako Masuda, Nobuhisa Hagiwara, Tatsuya Shimizu	4. 巻 15
2. 論文標題 Heart-derived fibroblasts express LYPD-1 and negatively regulate angiogenesis in rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 青木信奈子
2. 発表標題 inhibition of LYPD1 is critical for endothelial network formation in bioengineered tissue with human cardiac fibroblasts
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦勝久
2. 発表標題 補填型心筋再生医療を目指したiPS心筋組織の特性理解
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhisa Matsuura, Shinako Masuda, Tatsuya Shimizu
2. 発表標題 Human cardiac fibroblasts have angiogenic inhibitory phenotypes through their expressing LYPD1 in vitro
3. 学会等名 BCVS 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Katsuhisa Matsuura
2. 発表標題 Identification of the tissue specific phenotypes of heart-derived fibroblasts for tissue engineering and further understanding "Heart"
3. 学会等名 TERMIS World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Katsuhisa Matsuura
2. 発表標題 Identification of the tissue specific phenotypes of heart-derived fibroblasts for tissue engineering
3. 学会等名 The 4th Stem Cells and Cellular Therapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Satoru Sakamoto, Katsuhisa Matsuura, Shinako Masuda, Jun Homma, Nobuhisa Hagiwara, Tatsuya Shimizu
2. 発表標題 Functional Evaluation of LYPD1, Novel Angiogenesis Inhibitor Factor, in Rat Heart
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増田 信奈子  (Masuda Shinako)  (30342851)	東京女子医科大学・医学部・助教    (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------