

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07278

研究課題名（和文）転写因子 Dach1 による組織特異的な血管内皮細胞分化調節メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of tissue-specific differentiation of vascular endothelial cells by Dach1 expression

研究代表者

早坂 晴子（Hayasaka, Haruko）

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：70379246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：全身で恒常的に Dach1 を発現する遺伝子改変マウスを用いて、リンパ節血管における Dach1 遺伝子の機能を解析した。リンパ節ストローマ細胞を解析したところ、Dach1 全身発現マウスにおいて高内皮細静脈血管内皮細胞割合の増加がみられた。一方、汎血管内皮細胞マーカー陽性血管内皮細胞の割合に変化は見られなかった。次世代シーケンス解析から、Dach1 全身発現マウスでは高内皮細静脈接着分子発現に関連する遺伝子発現に違いが見られたことから、Dach1 はリンパ節血管内皮細胞において接着分子発現を調節し、血管成熟分化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌組織およびリンパ節血管の解析から、転写因子 Dach1 が組織特有の血管内皮細胞分化を決定する転写因子であることが明らかになった。次世代シーケンス解析による血管内皮細胞の遺伝子発現パターンから、Dach1 の被制御因子候補が得られ、Dach1 によるリンパ節および腫瘍血管新生促進経路の一部が明らかになった。本研究の成果により、組織内微小環境下において血管多様性が生まれるメカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we analyzed the transgenic mice that ubiquitously express Dach1 gene. In lymph nodes, percentage of high-endothelial microvascular endothelial cells was increased in the Dach1 transgenic mice. In contrast, there was no change in the percentage of pan-endothelial marker-positive vascular endothelial cells. Next generation sequencing analysis showed that Dach1 transgenic mice showed differential expression of genes associated with high endothelial venules, suggesting that Dach1 regulates differentiation of lymph node vascular endothelial cells and vascular maturation.

研究分野：組織分化

キーワード：血管形成 リンパ節 遺伝子発現マウス

1. 研究開始当初の背景

抗原感作を受けたことのないナイーブリンパ球は、高内皮細静脈 (High endothelial venules: HEV) を介して二次リンパ節実質に移動し、血中と二次リンパ組織との間を循環することで免疫監視を行なう。HEV は二次リンパ組織特異的に形成される血管であり、厚い基底膜を持ち、背が高く肥厚した内皮細胞をもつなど、他の組織血管にはない形態的特徴をもつ。HEV は二次リンパ組織のうちリンパ節と小腸パイエル板には形成されるが、脾臓では形成されないことから、HEV 形成には組織特有の環境が影響すると考えられる。しかし HEV 形成における組織微小環境要因、HEV-内皮細胞 (HEC) がいつどのような前駆細胞から分化し、機能的な細胞として最終分化して維持されるのかについては不明である。これまでの研究代表者らの研究から、*Dachshund1* (*Dach1*) が、HEV 形成期の HEV マーカー陽性血管内皮細胞においてマーカー陰性血管内皮細胞の約 50 倍高発現し、成熟血管では発現消失することが見出された。哺乳類における DACH1 機能の詳細は不明であるが、DNA 結合領域を持つ他の転写因子の補助因子として機能する一方、直接プロモーターに結合し転写抑制能あるいは活性化能を持つことが報告されており、細胞種によって多様な活性を示す転写調節因子である。そこで研究代表者らは、*Dach1* が HEV 形成調節の有力候補遺伝子と考え、*Dach1* が組織特異的な血管内皮細胞分化の決定因子である可能性を検証することにした。

2. 研究の目的

免疫組織における特殊血管形成と癌組織の血管新生を調節する共通転写因子 *Dach1* の複数の制御経路をそれぞれ特定することで、組織内微小環境の違いによる血管内皮細胞分化経路の多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

生後 4 ならびに 6 週齢の野生型マウス (WT マウス) および *Dach1*-Tg マウス鼠径リンパ節から得た単細胞懸濁液のローサイトメトリー解析により PNA⁺ (成熟 HEC に発現)、MAdCAM-1 (未熟 HEC を含む未熟血管内皮細胞に発現)、CD34 (血管内皮細胞に発現) の発現解析をおこなった。mRNA-Seq 解析では、生後 3 週齢ならびに生後 8 週齢の WT マウスおよび *Dach1*-Tg マウス 4~8 匹から鼠径、腋下、上腕リンパ節を摘出し細胞懸濁液調製後、細胞分離した HEC から mRNA-Seq 用ライブラリーを作製した。Veerman K. ら (Cell Rep. 26: 3116-3131, 2019) のシングルセル RNA-Seq データの再解析により各 HEC クラスを特徴的な遺伝子発現パターンから再定義

した後、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により比較をおこなった。

生後 4~6 週齢の WT マウスおよび *Dach1*-Tg マウスに B16F10 メラノーマ細胞あるいは LLC 肺がん細胞を 1×10^6 細胞を皮下移植し、2 週間後に腫瘍を摘出した。各腫瘍重量を測定後、酵素的分解により腫瘍細胞懸濁液を調製した。次にフローサイトメトリーにより、調製した細胞の 7AAD 陰性 (生細胞)、CD45 陰性 (非血球系細胞)、CD34 陽性 (血管内皮細胞) 割合を解析した。また、*Dach1* 発現が腫瘍内血管内皮細胞の遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、生後 6~8 週齢のコントロールマウスおよび *Dach1*-Tg マウスに形成された LLC 腫瘍から腫瘍内 CD45 陰性、CD31 陽性 (血管内皮細胞) 細胞を分取し、抽出した total RNA を次世代シーケンサーにより解析した。

4. 研究成果

DACH1 恒常的発現が HEC における血管内皮細胞マーカー分子の発現に与える影響を解析した。その結果、生後 4 週齢 *Dach1*-Tg マウスにおいて MAdCAM-1 陽性血管内皮細胞割合が有意に増加し、生後 6 週齢 *Dach1*-Tg マウスにおいて PNA^d 陽性血管内皮細胞割合が有意に増加した。一方、生後 4 週齢および生後 6 週齢どちらにおいても CD34 陽性血管内皮細胞割合に有意な差はみられないことから、*Dach1* は HEV 関連接着分子発現を調節する可能性が示唆された。GSEA 解析の結果、*Dach1*-Tg の血管内皮細胞は通常の HEC から離れた遺伝子発現パターンへ変化し、その発現パターンは非 HEC あるいは未熟 HEC 様に近づく可能性が示唆された。

一方、WT および *Dach1*-Tg に形成された B16F10 腫瘍内血管内皮細胞割合および腫瘍重量を解析したところ、WT および *Dach1*-Tg 間で変化はみられなかったが、LLC 腫瘍内血管内皮細胞割合および腫瘍重量を解析したところ、WT と比較して *Dach1*-Tg で腫瘍内 CD34 陽性細胞割合と腫瘍重量に有意な増加がみられた。以上のことから、*Dach1* 恒常的発現は B16F10 腫瘍における血管形成および腫瘍形成に影響しないが、LLC 腫瘍における血管形成および腫瘍増殖を促進することが示唆された。腫瘍内血管の増加は、組織内に酸素や栄養素を供給し、腫瘍増殖に促進的に作用することが知られている。そのため、*Dach1* 発現による LLC 腫瘍内血管形成促進を介して、腫瘍増殖が亢進した可能性が考えられる。LLC 腫瘍血管内皮細胞について RNA-Seq 解析をおこない、WT と *Dach1*-Tg 間で比較したところ、FDR (偽発見率) = 0.1、遺伝子発現量の倍率変化 (Fold change) が 2 倍以上を満たす、有意に発現変動する遺伝子 DEG (Differentially expressed genes) が 862 個検出された。*Dach1* 遺伝子はコントロールと比較して、*Dach1*-Tg で約 16 倍発現していた。DEG として検出された 862 個の遺伝子のうち、*Dach1*-Tg で発現上昇する遺伝子は 765 個、減少する遺伝子は 97 個であった。

これらの DEG についてエンリッチメント解析をおこなったところ、*Dach1*-Tg では、血管形成に關与するパスウェイ (Angiogenesis、Blood vessel morphogenesis、Blood vessel development、Vasculature development) に含まれる遺伝子の発現がコントロールと比較して有意に増加していた。以上のことから、*Dach1* は血管形成關連遺伝子発現により腫瘍内血管形成を促進させ、その結果 LLC 腫瘍増殖が亢進する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kurowarabe K, Endo M, Kobayashi D, Hayasaka H	4. 巻 28
2. 論文標題 CXCL12-stimulated lymphocytes produce secondary stimulants that affect the surrounding cell chemotaxis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101128-101128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101128	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 -
1. 著者名 Kobayashi D, Sugiura Y, Umemoto E, Takeda A, Ueta H, Hayasaka H, Matsuzaki S, Katakai T, Suematsu M, Hamachi I, Yegutkin G G., Salmi M, Jalkanen S, Miyasaka M	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular ATP Limits Homeostatic T Cell Migration Within Lymph Nodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.786595	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 該当する
1. 著者名 Hayasaka H, Yoshida J, Kuroda Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, Kishimoto K, Nishimura H, Okada M, Shimomura Y, Kobayashi D, Shimazu Y, Taya Y, Akashi M, Miyasaka M	4. 巻 113
2. 論文標題 CXCL12 promotes CCR7 ligand mediated breast cancer cell invasion and migration toward lymphatic vessels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1338-1351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15293	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 -
1. 著者名 Shintani A, Fukai S, Nobusawa R, Taniguchi K, Hatatani T, Nagai H, Sakai T, Yoshimura T, Miyasaka M, Hayasaka H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Dach1 transcription factor regulates the expression of peripheral node addressin and lymphocyte trafficking in lymph nodes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Research in Immunology	6. 最初と最後の頁 175-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crimmu.2022.08.008	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryota Hayashi, Hinami Kawahata, Kakeru Fujiwara, Kaoru Kurowarabe, Yuki Yamada, Izumi Ohigashi, Haruko Hayasaka
2. 発表標題 An enhanced anti-melanoma immune response in the Ccl21a-deficient mice
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitoshi Nishimura, Kei Kishimoto, Kurowarabe Kaoru, Haruko Hayasaka
2. 発表標題 Establishment of the luciferase complementation assay to detect CCR7 homodimerization
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arisa Shintani, Hayato Nagai, Reika Nobusawa, Shoko Fukai, Haruko Hayasaka
2. 発表標題 The role of transcription factor Dach1 in high endothelial venule development in mouse lymph nodes
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Megumi Miyamoto, Kaoru Kurowarabe, Kakeru Fujiwara, Sachie Ota, Izumi Ohigashi, Haruko Hayasaka
2. 発表標題 The roles of endogenous and tumor-derived CCL21-Ser in melanoma growth
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷ありさ、永井隼人、信澤怜佳、片貝璃子、深井祥子、早坂晴子
2. 発表標題 リンパ節高内皮細静脈血管形成における転写因子 Dach1 遺伝子の関与
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 信澤怜佳、永井隼斗、畑谷友宥、新谷ありさ、深井祥子、早坂晴子
2. 発表標題 転写因子 Dach1 が腫瘍流入領域リンパ節血管形成に与える影響
3. 学会等名 がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑谷友宥、向井めぐみ、田辺薫佳、曾根麻由奈、早坂晴子
2. 発表標題 転写因子 Dach1 による腫瘍内血管形成の促進
3. 学会等名 がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早坂 晴子、松田 幸、宮坂 昌之
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞リンパ節転移におけるCCR7およびCXCR4リガンドケモカインの関与
3. 学会等名 第28回 日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒藤 馨、遠藤 正隆、早坂 晴子
2. 発表標題 リンパ球感の細胞遊走を制御する走化性因子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井隼斗、新谷ありさ、酒井智弘、深井祥子、早坂晴子
2. 発表標題 リンパ節血管形成における転写因子Dach1遺伝子の関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ研究業績 https://www.life.kindai.ac.jp/laboratory/hayasaka/achievement.html 近畿大学理工学部のトップランナーいま注目の最先端研究 https://www.kindai.ac.jp/science-engineering/research/forefront-research/hayasaka-haruko/

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

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
---------	---------