

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09674

研究課題名(和文) 網膜における血管内皮コロニー形成細胞の同定およびその微小環境の解明

研究課題名(英文) Endothelial colony forming cells in retinal vasculature

研究代表者

崎元 晋 (Sakimoto, Susumu)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：60633047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CREBファミリーに属する遺伝子Aの網膜血管リモデリング機構を解析した。野生型マウスの網膜血管発生期および虚血性網膜症モデルでフローサイトメトリーを用いて網膜血管内皮細胞を単離し、qPCRで遺伝子Aの発現を確認した。遺伝子Aノックダウン(KD)ヒト網膜血管内皮細胞を用いた血管新生アッセイでは、血管密度が有意に減少した。遺伝子Aノックアウト(KO)マウスを用いた解析では、血管伸長が減少し、OIRモデルでは無血管野が増大した。結果として、遺伝子Aは網膜血管構築に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮コロニー形成細胞(Endothelial colony-forming cells: ECFCs)は、細胞治療に用いるヒトないしは自家血管内皮細胞のソースとして知られているが、近年広義のECFCとして、生体内における血管内皮幹/前駆細胞の存在が注目されている。申請者は、最近報告されているCD201などのマーカーに着目し、網膜血管におけるECFCの同定とニッチ環境の解明を行っており、本研究成果はECFCを調節する遺伝子の役割を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the retinal vascular remodeling mechanism of gene A, which belongs to the CREB family. Retinal vascular endothelial cells were isolated using flow cytometry in wild-type mice during retinal vascular development and in an ischemic retinopathy model, and gene A expression was confirmed by qPCR. Angiogenesis assays using gene A knockdown (KD) human retinal vascular endothelial cells showed a significant decrease in vascular density. Analysis using gene A knockout (KO) mice showed decreased vascular elongation and an increase in the vascular-free field in the OIR model. Results suggest that gene A is involved in retinal vascular architecture.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：眼科学

キーワード：網膜血管 血管内皮細胞 血管内皮コロニー形成細胞 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、先進国における生産年齢の失明原因の第一位であり、非常に重要な疾患である。近年抗 VEGF 剤により画期的な治療効果がもたらされるようになったが、反復眼内注射が必要など改善を要する点があるため、新たな治療の開発が喫緊の課題である。特に血管そのものを再生し、虚血を改善する網膜症の根本的な治療の開発は非常に重要である。

血管内皮細胞は、成体においては多くが休止期にあり、まれにしか分裂しないものの、虚血に陥り低酸素状態となった組織では血管新生促進因子により、血管の修復および再生（血管新生）が誘導される。組織には障害された際に、自身を再生する組織常在型の幹細胞が存在することが知られているが、血管に幹細胞が存在するか不明であった。血管内皮コロニー形成細胞（Endothelial colony-forming cells: ECFCs）は、細胞治療に用いるヒトないしは自家血管内皮細胞のソースとして注目されているが、近年広義の ECFC として、生体内における血管内皮幹/前駆細胞の存在が注目されている。組織に存在する血管内皮幹細胞に関しては、組織に存在し増殖することによって血管の修復に寄与する血管内皮幹細胞として、ごく最近その細胞表面マーカー、CD201 (Procr) や CD157 (Bst1) とともにいくつかの報告がなされるようになっていく。現時点で、網膜に存在する血管内皮幹細胞はこれまで報告がなされておらず、網膜血管において実際にどのような幹細胞システムが存在するかは未知である。肝臓において、従来恒常的リモデリングがないと信じられていた成体の血管において、血管障害時に幹細胞から血管が修復されることが報告された。さらに血管障害を起こさない定常状態においても長期間観察によって毛細血管が幹細胞から新生した血管で置換される生理的リモデリングが示唆されている。このことから、網膜においてもこのような生理的血管リモデリングが生じており、糖尿病網膜症などの虚血性網膜症では、高血糖などの生体内ストレスの増強に伴い、幹細胞の機能不全や疲弊が生じ、生理的リモデリング機能が追いつかないため、形態的、機能的な組織障害が生じ疾患発症につながるのではないかと仮説を立てた。

活性化転写因子 3 (ATF3) は、ATF/サイクリック AMP 応答要素結合タンパク質ファミリーに属する転写因子であり、グルコースおよび脂肪細胞代謝、免疫恒常性、ならびに発癌において重要な役割を果たすことが知られている。ATF3 は癌細胞の増殖および転移に関与するが、最近の研究により、前立腺癌、結腸癌、肝臓癌の調節において、腫瘍促進遺伝子と腫瘍抑制遺伝子の両方の機能を有することが示唆されている。内皮細胞 (ECs) における ATF3 ファミリー遺伝子 ATF4 の欠失は、運動誘導性血管新生を抑制する。ATF3 の発現は、修復能力が低下した加齢大動脈では低く、ATF3 の発現減少はマウスモデルの大動脈損傷において EC の増殖を抑制し、再生を抑制する。EC 特異的な ATF3 欠失は、アポトーシスを促進し、内皮増殖を減少させ、肺胞再生の欠陥を引き起こす。しかし、ATF3 が血管新生に関与しているかどうかは十分に理解されていない。

2. 研究の目的

申請者は、最近報告されている CD201 などのマーカーに着目し、網膜血管における ECFC の同定とニッチ環境の解明を計画している。次年度に引き続いて、CREB ファミリーに属するストレス応答転写因子である遺伝子 ATF3 の網膜血管リモデリング機構に関わる解析を行った。本研究は、ATF3 が血管新生を調節し、血管損傷時の血管修復を促進するかどうかを明らかにすることを目的とした。ATF3 ノックダウン (ATF3KD) 細胞および内皮特異的な Atf3 条件付きノックアウトマウス (Atf3iECKO) を用いて、ATF3 が網膜血管新生および血管修復において重要な役割を果たす

かどうかを確認した。本研究は、生理的血管新生および病理的網膜モデルにおける血管修復の両方において、ATF3 発現の調節役割を明らかにしている。したがって、本研究は網膜血管疾患における血管修復療法の進展に寄与するアプローチを提供する可能性がある。

3 . 研究の方法

(1)ATF3 の in vivo における局在検討

網膜血管発達モデルの生後 5 日目 (P5) の網膜において、抗 ATF3 抗体および抗 IB4 (アイソレクチン B4) 抗体を用いた免疫染色を行い、マウス網膜における ATF3 の局在を確認した。

(2)in vitro 血管新生モデルにおける ATF3 の機能

ATF3 遺伝子活性化メカニズムを検討するために、VEGFA 刺激における培養内皮細胞の検討を行った。

(3)網膜血管内皮細胞に発現する ATF3 の生理的血管新生に対する影響

in vivo における EC に対する ATF3 の機能を調査するために、cdh5-BAC-CreERT2 マウスと Atf3 flox (Atf3^{fl/fl}) マウスを交配させた、Atf3^{iECK0} マウスを得た後、生後網膜血管新生モデルを利用し、網膜血管発達の過程である P5 において血管内皮細胞を IB4 にてフラットマウント染色した。

(4)虚血性網膜症モデルにおける ATF3 発現の検討

ATF3 が虚血性網膜症において果たす役割を調査するために、OIR (酸素誘導性網膜症) モデルを使用した。このモデルでは、マウスを P7 で 75%の酸素 (高酸素) 環境に置いて血管を脱落させ、虚血性網膜症を誘発し、P12 で通常の酸素条件 (常酸素) に戻すと、血管新生が発生し、P17 ~ 21 で最大に達する。その後、新生血管は退縮し、網膜血管は P25 までに回復する。OIR WT マウスの網膜 EC における ATF3 発現を、P17 での通常酸素 (対照) マウスの網膜 EC と比較した。

(5)in vivo における虚血性網膜症モデルにおける ATF3 の機能解析

OIR マウスの網膜に対する ATF3 欠損の影響を調査するために、OIR モデルと組み合わせた Atf3^{iECK0} マウスを作成し、P12、P17、および P21 で IB4 を用いた網膜全層標本を染色した。

(6)OIR マウス網膜血管内皮細胞のシングルセル RNAseq

OIR モデル WT マウスの EC を P17 で単離し、シングルセル RNAseq を行った。血管内皮クラスターの細胞を ATF3 陽性細胞と陰性細胞に分け、ジーンオントロジー (GO) 濃縮解析を行った。

4 . 研究成果

(1)ATF3 の in vivo における局在検討

ATF3 は血管に発現しており、これは内皮細胞 (EC) に対応した。P5 のマウスから網膜を採取し、蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いて CD45⁻/CD31⁺細胞 (EC) および CD45⁻/CD31⁻細胞 (非 EC) に分離し、それぞれのグループにおける ATF3 mRNA レベルを測定した。リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) の結果、ATF3 mRNA レベルは非 EC よりも EC で高いことが示された。これらの結果は、マウス網膜において ATF3 の発現が EC に局在していることを示唆していた。

(2) in vitro 血管新生モデルにおける ATF3 の機能

ATF3 遺伝子活性化メカニズムを探るために、VEGFA 刺激における培養内皮細胞の検討を行った。RT-qPCR の結果、20 ng/mL の VEGFA 投与がヒト臍帯静脈 EC (HUVEC) およびヒト網膜微小血管 EC (HRMEC) の両方において ATF3 発現を増加させることが確認された。HUVEC および HRMEC の免疫染色でも ATF3 免疫蛍光の増加が示された。これらの結果は、VEGFA が ATF3 発現を刺激することを示している。in vitro における ATF3 の機能を特性化するために、HRMEC に ATF3 siRNA (siATF3) をトランスフェクトして ATF3 をサイレンシングした。RT-qPCR の結果、siATF3 によるトランスフェクションは ATF3 mRNA 発現を約 20%~50%減少させ、HRMEC における ATF3 タンパク質の産生も減少させることが確認された。チューブ形成アッセイでは、ATF3 ノックダウンによりネガティブコントロール siRNA (siNC) と比較して血管密度が抑制された。これらの結果は、VEGFA 刺激によって ATF3 発現が誘導され、その減少が in vitro における血管新生を損なうことが示唆された。

(3) 網膜血管内皮細胞に発現する ATF3 の生理的血管新生に対する影響

in vivo における EC に対する ATF3 の機能を調査するために、cdh5-BAC-CreERT2 マウスと Atf3 flox (Atf3^{fl/fl}) マウスを交配させた。Atf3^{iECK0} マウスを得た後、生後網膜血管新生モデルを利用した。網膜血管発達の過程である P5 において、Atf3^{iECK0} マウスは野生型 (WT) マウスと比較して血管叢の放射状拡大が遅れ、血管前縁の血管分岐点および先端細胞の数が著しく減少していた。これらの網膜を先端細胞の普遍的マーカーである ESM1 で染色したところ、血管前縁における ERG と共染した細胞の割合が Atf3^{iECK0} マウスでは減少していた。増殖マーカー ki67 で染色した場合も、Atf3^{iECK0} マウスでは血管前縁における ERG と共染した細胞の割合が減少していた。これらの結果は、内皮 ATF3 の欠失がマウスの網膜発達中の血管新生を阻害することを示した。

(4) 虚血性網膜症モデルにおける ATF3 発現の検討

ATF3 が虚血性網膜症において果たす役割を調査するために、OIR (酸素誘導性網膜症) モデルを使用した。このモデルでは、マウスを P7 で 75%の酸素 (高酸素) 環境に置いて血管を脱落させ、虚血性網膜症を誘発し、P12 で通常の酸素条件 (常酸素) に戻すと、血管新生が発生し、P17~21 で最大に達する。その後、新生血管は退縮し、網膜血管は P25 までに回復する。OIR WT マウスの網膜 EC における ATF3 発現を、P17 での常酸素 (対照) マウスの網膜 EC と比較した結果、OIR マウスでは対照マウスよりも ATF3 mRNA レベルが高いことが示された。次に、P12、P17、P21 で OIR および対照マウスの網膜全層標本に対して ATF3 の免疫染色を行った。P12 の血管喪失期には、OIR マウスと対照マウスの間で ATF3 染色に違いは見られなかった。しかし、OIR マウスでは、P17 および P21 の増殖期および新生血管退縮期に ATF3 免疫反応性が増加していた。予期せぬことに、ATF3 は P17 および P21 で網膜の主要血管に発現していたが、病的血管や新生血管房 (NVT) には発現していなかった。これらの結果は、虚血性網膜症のマウスモデルにおいて、ATF3 が血管新生中に上方制御され、血管再構築に役割を果たすが、病的血管の形成には関与しない可能性があることを示唆している。

(5) in vivo における虚血性網膜症モデルにおける ATF3 の機能解析

OIR マウスの網膜に対する ATF3 欠損の影響を調査するために、OIR モデルと組み合わせた Atf3^{iECK0} マウスを作成し、P12、P17、および P21 で IB4 を用いた網膜フラットマウント染色を

行った。P12 では Atf3iECK0 マウスと対照マウスの間で無血管領域に有意な差は見られなかった。しかし、P17 および P21 では、Atf3iECK0 マウスの無血管領域が対照マウスよりも有意に大きかった。さらに、P17 および P21 で NVT 領域に有意な差は見られなかった。これらの結果は、内皮 ATF3 の欠失が病的モデルにおける血管再生を阻害するが、病的血管の形成には影響を与えないことを示唆していた。

(6)OIR マウス網膜血管内皮細胞のシングルセル RNAseq

OIR モデル WT マウスの EC を P17 で単離し、シングルセル RNAseq を行った。血管内皮クラスターの細胞を ATF3 陽性細胞と陰性細胞に分け、ジーンオントロジー (GO) 濃縮解析を行ったところ、血管新生に関与する経路である Ras タンパク質のシグナル伝達は、ATF3 陽性細胞では ATF3 陰性細胞に比べて発現が上昇していた。OIR モデルの ATF3KD HRMECs および網膜血管 EC において、ATF3 陰性細胞で共通して発現低下していた 20 遺伝子のうち、5 遺伝子は VEGFA-VEGFR2 シグナル伝達経路に関与していた。これらの結果は、ATF3 が他の血管新生関連因子とともに VEGF 経路を介して血管新生に関与していることを示唆している。

成果のまとめ

今回、ATF3 がマウス網膜における血管の正常な発達と虚血性網膜症モデルにおける血管再生に重要な役割を果たしていることを示した。また、ATF3 の発現を抑制すると、VEGF シグナル伝達経路を含むいくつかの血管新生関連因子の発現が変化していた。ATF3 が血管新生に影響を及ぼす経路のさらなる検証が必要である。これらの知見を現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Marra KV, Aguilar E, Guoqin W, Usui-Ouchi A, Ideguchi Y, Sakimoto S, Friedlander M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Bioactive extracellular vesicles from a subset of endothelial progenitor cells rescue retinal ischemia and neurodegeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e155928.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.155928.	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 Kanai M, Sakimoto S, Takahashi S, Nishida K, Maruyama K, Sato S, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Embedding Technique versus Conventional Internal Limiting Membrane Peeling for Lamellar Macular Holes with Epiretinal Proliferation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ophthalmol Retina	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oret.2022.07.009.	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 Sayanagi K, Hara C, Fukushima Y, Sakimoto S, Kawasaki R, Sato S, Ikuno Y, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 259
2. 論文標題 Flow pattern and perforating vessels in three different phases of myopic choroidal neovascularization seen by swept-source optical coherence tomography angiography.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2615-2624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-021-05134-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanai M, Shiozaki D, Sakimoto S, Shiraki A, Hara C, Kawasaki R, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 259
2. 論文標題 Association of disorganization of retinal inner layers with optical coherence tomography angiography features in branch retinal vein occlusion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2897-2903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-021-05168-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara C, Kamei M, Sakaguchi H, Matsumura N, Sakimoto S, Suzuki M, Nishida K, Fukushima Y, Nishida K.	4. 巻 259
2. 論文標題 Long-term outcomes of intravitreal activated protein C injection for ischemic central retinal vein occlusion: an extension trial.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2919-2927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-021-05072-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraki A, Sakimoto S, Eguchi M, Kanai M, Hara C, Fukushima Y, Nishida K, Kawasaki R, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Analysis of Progressive Neovascularization in Diabetic Retinopathy Using Widefield OCT Angiography.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmol Retina.	6. 最初と最後の頁 153-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2021.05.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraki A, Sakimoto S, Nishida K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Reconnection of the Severed Vein in Proliferative Diabetic Retinopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ophthalmol Retina.	6. 最初と最後の頁 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2021.06.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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