

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19520

研究課題名（和文）血管研究による腸区分特異的炎症制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on intestinal region-specific inflammation regulatory mechanism; An approach from vascular research.

研究代表者

内藤 尚道（Naito, Hisamichi）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30570676

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）：本研究では、血管研究にて、大腸と小腸における部位特異的炎症制御機構を解明することを目的とした。これまでに、血管内皮細胞特異的にノックアウトすると、血管が維持されないモデルマウスを作製した。また、小腸と大腸では炎症の制御機構が異なる可能性が予備実験から明らかになっている。免疫染色、FACS解析、遺伝子発現解析、細胞培養実験にて、腸管の血管構造、血球細胞の分布、発現する遺伝子の違いを解析した。その結果、複数の遺伝子発現が異なり、特にサイトカインと免疫細胞の一分画に着目して、血管維持機構と炎症制御機構の関連を解析した。炎症制御の鍵となる分子の同定に至らなかったが、引き続き他の候補の解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸炎はヒトが生活する中で、最も頻繁に経験する炎症反応の一つである。また、原因不明の炎症性腸疾患も増加の一途をたどっている。腸で生じる炎症は、腸管の部位特異性を認めることがあるが、なぜこのような部位特異性を認めるか不明である。本研究では、血管研究を通じて、大腸と小腸における部位特異的炎症制御機構を解明に挑戦した。今回、腸管の血管構造、免疫細胞の分布を明らかにして、血管維持機構との関係を、培養実験を通じて解析した。炎症制御に関与すると考えられる候補因子を複数同定しており、今後これらを制御することで、腸管の炎症制御につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the site-specific mechanisms of inflammation control in the large and small intestines through vascular research. To date, we have created endothelial specific knockout mouse model in which the blood vessels are not maintained. Preliminary experiments have also revealed that the mechanisms controlling inflammation may differ between the small intestine and the large intestine. Using immunostaining, FACS analysis, gene expression analysis, and endothelial cell culture experiments, we analyzed the vascular structure of the intestines, the distribution of blood cells, and differences in gene expression. As a result, several genes were expressed differently, and we focused on a fraction of cytokines and immune cells to analyze the relationship between vascular maintenance mechanisms and inflammation control mechanisms. Although we could not identify the key molecule in inflammation control, we are continuing to analyze other candidates.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 腸管 炎症制御機構 恒常性維持機構 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

全身にはりめぐる血管の内腔は、扁平上皮細胞である血管内皮細胞に覆われている。我々は、これまでに血管内皮細胞の細胞多様性に関する研究に取り組み、全身の血管内皮細胞の遺伝子発現解析を行ってきた。解析過程で、全身の臓器で、血管内皮細胞で共通して高発現している遺伝子群を同定し、その中には血管内皮細胞での機能が十分解明されていない因子を多数同定した。そのうちのひとつである TAK1 は、炎症応答と自然免疫応答に関与する因子として知られている遺伝子であった。TAK1 を成体マウスで血管内皮細胞特異的にノックアウトすると、マウスは腸管出血をきたし、短期間で死亡した。その分子機序を解析すると、腸内細菌により腸管では微小な炎症が生じており、その炎症に血管は応答し、TAK1 遺伝子が存在すると、血管は正常に炎症に応答できるが、TAK1 が欠損している、細胞死が誘導され、血管が壊れ出血をきたすことが明らかになった。すなわち、TAK1 は生体のマウスの腸管で血管を維持するための機構に重要な因子であることを見出し論文報告した。さらにこの研究の過程で、腸管において、場所によって血管の維持機構が異なる可能性を見出した。このような研究背景のもと、本研究では腸管の各部位における炎症制御機構を、血管研究の視点から解析を行い、特に小腸と大腸ではどのように異なるか明らかにすることを旨とした。

2. 研究の目的

腸は長さ約 8 m、表面積は約 300m² に及び、40 兆個以上と試算される腸内細菌が生息する臓器である。体の隅々まで張り巡る血管は、腸粘膜においても特有の形態を示す血管ネットワークを形成して、酸素や栄養素を運搬するだけでなく、腸粘膜に免疫細胞を供給し、さらには消化した糖、アミノ酸、中鎖脂肪酸を血中に取り込むことで、全身の恒常性維持に貢献する。一般的に炎症反応が生じた際、血管は炎症性サイトカインに反応して血管透過性が亢進し、さらに接着因子を発現して、炎症性細胞を組織へ遊走させる。では腸という環境下において、炎症状態で血管はどのように機能して、制御されているかという点においては、現在まで詳細は不明である。

上記の研究背景のように、これまで炎症制御に関わる TAK1 遺伝子の血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスを用いて、腸血管の解析をおこない、腸粘膜では、腸内細菌により恒常的に微小な炎症が生じていて、その炎症から血管を守る機構が血管内皮細胞に備わっていることを明らかにしてきた。このような血管と腸内細菌の関係性は、これまで全く知られておらず、TAK1 以外にも複数の遺伝子が、血管の防御と維持機構に関与する可能性を見出した。さらに興味深いことに、上述のように、腸管の部位によって炎症の制御機構が異なる可能性がある。

そこで、本研究では、最初に小腸と大腸の血管の構造的および機能的な特徴を明らかにし、さらには血管を取り巻く微小環境を構成する細胞の遺伝子発現特性を明らかにすることを旨とする。そして血管内皮細胞に焦点を当て、血管内皮細胞と他の全ての細胞との細胞間相互作用を明らかにする。その上で、小腸と大腸の血管内皮細胞の炎症制御機構の違いに着目して、炎症を制御する因子を明らかにする。同定した因子の作用機序を解析することで、腸管における部位特異的炎症制御機構に基づく炎症制御法を、基礎研究レベルで確立することを目的とした。

3. 研究の方法

小腸と大腸の炎症に対する表現型が異なるモデルマウスを保有している。本研究では血管の維持機構の解明を明らかにするために、モデルマウスを用いて、小腸及び大腸の血管の形態と機能の特性を免疫染色で解析した。具体的には、形態観察は抗 CD31 抗体で血管の染色を行い、機能に関してはデキストラン、レクチンを投与して、共焦点顕微鏡で観察を行い、血管面積、分岐、透過性、血流を評価した。血管周囲の血球細胞と間質細胞を免疫染色で評価した。さらに、これらのモデルマウスと野生型マウスを、小腸と大腸それぞれで、FACS 解析を行い、細胞の特徴を明らかにした。また小腸と大腸の遺伝子発現データを入手して、恒常性維持に関わる因子の発現量を評価した。

血管形態、血管機能、血球細胞の分布、遺伝子発現情報をもとに、血管の恒常性が維持されない場合にどのような変化が生じるか解析した。特に小腸と大腸での違いに着目し、発現する因子を RT-qPCR を用いて解析した。また血管内皮細胞のネットワーク形成解析するための実験手法を確立した。上記で同定した発現因子の一部を、培養血管内皮細胞に添加して、血管形成に及ぼす効果を評価した。また同様に血球細胞を血管内皮細胞のネットワーク培養系に添加し、相互作用を解析した。また血管内皮細胞のネットワーク培養系にその相互作用を阻害する中和抗体を添加した。

4. 研究成果

腸管の血管構造の解析を行った。小腸の血管は絨毛内で複雑な網目状のネットワーク構造を形成し、絨毛の周辺部分には必ず上皮に並行して血管を認め、絨毛中心部にはリンパ管を認めた。一方で大腸粘膜固有層では腸陰窩にそって血管とリンパ管を認めた。デキストランとレクチンの解析では小腸と大腸で大きな違いは認めなかった。血球細胞を免疫染色と FACS で評価した。

抗 CD4、CD8、Gr1、Mac1、Ter119、B220、CD45、A (論文発表準備中であり A とする) B (同様に B とする) 抗体を用いて解析を行なった。その結果、小腸と大腸では免疫細胞の一分画の構成細胞が異なっている可能性が明らかになった。RT-qPCR および RNAseq 解析にて遺伝子発現解析を行うと、その分画ではサイトカイン C (同様に C とする) の発現が異なっていた。

血管の維持機構に重要な遺伝子 D (同様に D とする) の血管内皮細胞ノックアウトマウスで同様に血管形態、血管機能、血球細胞の分布、遺伝子発現の解析を行った。小腸と大腸で異なる存在比率を示した免疫細胞の 1 分画も、同様にこのノックアウトマウスで変化を認めた。またノックアウトマウスの腸管におけるサイトカイン C の発現を RT-qPCR で解析すると、そのサイトカインの発現は低下している可能性を示す結果が得られた。

上記の結果を踏まえ、血管内皮細胞の培養実験系で実験を行なった。最初に腸管の血管内皮細胞の培養実験系を確立した。次に、サイトカイン C を、培養実験系に添加した。添加の結果、血管ネットワーク構造には変化を認めなかった。また血球細胞を添加したが、同様に血管のネットワーク構造に変化を認めなかった。サイトカイン C は中和抗体が入手可能であり、その中和抗体を添加したが、同様に血管ネットワーク構造に変化を認めなかった。同様の実験を、ノックアウトマウスの血管内皮細胞を用いて行なったが、同様にネットワーク形成に変化を認めなかった。

本研究では、腸管に免疫細胞の 1 分画に着目して、血管内細胞との相互作用の解析を行った。血管の維持機構に関与する遺伝子のノックアウトマウスを用いて、その免疫細胞が発現するサイトカインに着目して、血管の維持機構との関係を解析したが、研究期間内に血管の維持および炎症機構の制御に関わる重要な因子の同定には至らなかった。一方で、今回着目したサイトカイン C 以外に、複数の候補因子を同定している。本研究を通じて、これまで困難であった血管内皮細胞と血球細胞の培養実験系を確立し、実際に実験を行うことが可能となった。今回行った実験と同様の解析を引き続き実施すれば、腸管の炎症制御機構の解明につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taku Wakabayashi, Hisamichi Naito	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellular heterogeneity and stem cells of vascular endothelial cells in blood vessel formation and homeostasis: Insights from single-cell RNA sequencing.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in cell and developmental biology	6. 最初と最後の頁 1146399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1146399	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 Zheng Jing, Tomohiro Iba, Hisamichi Naito, Pingping Xu, Jun-Ichi Morishige, Naoto Nagata, Hironao Okubo, Hitoshi Ando	4. 巻 14
2. 論文標題 L-carnitine prevents lenvatinib-induced muscle toxicity without impairment of the anti-angiogenic efficacy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in pharmacology	6. 最初と最後の頁 1182788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1182788	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 Vascular Endothelial Cell Heterogeneity and Mechanism of Vascular Formation
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 1 細胞遺伝子発現解析を応用した血管新生の理解
3. 学会等名 CVMW2022 心血管代謝週間（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 松居彩, 内藤尚道	4. 発行年 2023年
2. 出版社 炎症と免疫 (先端医学社)	5. 総ページ数 86
3. 書名 組織恒常性維持における血管の新たな役割	

1. 著者名 内藤尚道, 松居彩, 射場智大	4. 発行年 2022年
2. 出版社 生体の科学 (医学書院)	5. 総ページ数 98
3. 書名 血管系の幹・前駆細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学血管分子生理学ホームページ https://vm-physiol1.w3.kanazawa-u.ac.jp/</p>

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	射場 智大 (Iba Tomohiro) (10908205)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	遺伝子発現解析を分担。

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