

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790297

研究課題名(和文)血管は神経の働きかけにどう応答するか？血管形成におけるJunBの新しい役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of JunB function on blood vessel formation in neuro-vascular interactions.

## 研究代表者

吉富 泰央 (YOSHITOMI, Yasuo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80399039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経-血管の直接の相互作用に着目して血管が神経と並走するメカニズムを明らかにすることを目的とし、神経との接触により血管内皮細胞内で活性化される遺伝子JunBを同定した。JunBは血管内皮細胞の細胞形態に影響を及ぼしtip cellへの変換や血管新生を促進すること、shRNA-JunBによるin vivoでのJunBのノックダウンは神経との並走区間の減少を示すことを明らかにした。本研究により神経-血管並走の分子メカニズムの一端が明らかになり、血管関連疾患の応用研究に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the genes activated in endothelial cells by interacting with neurons during vascular development and neuro-vascular juxtapositional alignment. We found JunB as a new angiogenic regulator activated in neuro-vascular interactions. JunB regulated endothelial cell shape and tip cell production, and promotes angiogenesis in vivo. In vivo JunB knockdown in endothelial cells decreased branches of parallel aligned with neurons, indicates JunB expression in endothelial cells is required for neuro-vascular juxtapositional alignment. This study will facilitate a better understanding of mechanisms of neuro-vascular alignment and be useful for application studies for the vascular diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血管新生 神経血管相互作用 JunB

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物では血管と神経のネットワークは両者とも高度に枝分かれした構造をもって配置されているが、特に動脈と神経は生体内の多くの場所で並走した形で存在していることが知られている。血管の発生過程で、原始血管叢が Plexin D1 を介して神経と相互作用することにより血管内皮細胞を動脈に分化させることが示され (Cell 109:693-705, 2002)、血管形成に神経からのシグナルが必要であることがわかってきたが、神経-血管相互作用により血管内皮細胞で働く遺伝子群やその相互作用によってどのように血管ネットワークが形成されていくのかという詳細なメカニズムについてはまだほとんど分かっていない。

これまでの予備実験でマウス後根神経節初代培養神経細胞 (DRG) とヒト毛細血管内皮初代培養細胞 (HMVEC) の共培養系を確立し、マイクロアレイにより神経-血管相互作用によって血管内皮細胞で活性化される遺伝子のスクリーニングを行なった。その結果、神経細胞との相互作用により複数の独立した実験で再現性をもって発現量が上昇する遺伝子群を同定した。これらの多くが転写因子や細胞内シグナル伝達分子をコードしていた。そのうち特に強く発現が誘導された転写因子が JunB であった。JunB は多くの細胞種に普遍的に発現する転写因子であるが、幹細胞、骨、免疫系細胞を含む種々の細胞の分化誘導に重要な役割を担っていることが明らかになってきた (Braun T et al., 2011)。予備実験でマウス皮膚の免疫染色により JunB がネットワークを形成中の特有な血管の部位で強く発現することが確認され、JunB が神経との相互作用によって原始血管叢を動脈へと分化させ血管ネットワークを形成するのに重要な役割をもつのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの予備的研究成果をもとに、本研究ではこれまでほとんど明らかになっていない神経と血管の相互作用による血管形成制御に、神経-血管相互作用の網羅的解析によって見いだした転写因子 JunB が如何に関わっているのかを以下の項目について明らかにする。

(1) 神経細胞と血管内皮細胞の初代培養細胞共培養により血管内皮細胞で活性化された JunB が動脈分化にどのように関わっているのかを、分化マーカーの発現を指標に明らかにする。

(2) JunB が *in vitro* での血管内皮細胞の増殖、管腔形成にどのような機能を担っているのかを解析する。

(3) JunB を強制発現および発現抑制するレンチウイルスを用いてマウス子宮内レンチウイルス感染法によりマウス胎児の発生時期特異的に JunB の発現を抑制し、個体レベルでの血管新生、血管のネットワーク形成における JunB の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

神経-血管相互作用の網羅的解析によって見いだした JunB が血管形成においてどのような役割を担っているのかを解明するため、本研究計画では以下の項目についての研究を行なった。

(1) JunB の過剰発現および発現抑制が血管内皮細胞の細胞動態、血管新生能におよぼす影響を調べた。

(2) JunB 過剰発現による遺伝子発現の網羅的解析を行い神経-血管相互作用で変化した遺伝子との関連性を解析した。

(3) 子宮内レンチウイルス感染を介したマウス胎児への遺伝子導入法を用いて、生体内での血管ネットワーク形成における JunB の役割を解析した。

## 4. 研究成果

発生期の神経と血管の直接的な相互作用を mimic するため、*in vitro* でのマウス神経細胞 (DRG) とヒト血管内皮細胞 (HMVEC) との共培養系を用いて神経との直接の接触により血管内皮細胞ないで変化する遺伝子発現の変化を microarray を用いて解析した。DRG は神経軸索を伸ばして多くの場所で血管内皮細胞と直接接触していた。この共培養系から mRNA を精製し遺伝子発現のプロファイリングを行った。別々に調整した DRG を用いた 2 回の独立した共培養の実験の結果、遺伝子発現の変動が 1.2 倍を超えた遺伝子のうち共通して変動した遺伝子は 69 個あった。これらの遺伝子をカテゴリーに分類し、これまでに血管新生に関連することが報告されている遺伝子群と比較した。その結果、血管新生に関連した多くの膜貫通分子の発現誘導、血管新生を促進することが報告されている可溶性の増殖因子、サイトカイン、ケモカインの発現誘導が見られた。また、動脈分化に関連する EFNB2 の発現が上昇していたことから神経との相互作用で動脈分化が促進されるというこれまでの報告と一致していた (Li W. et al., 2013)。また、Cxcl12 の受容体である CXCR4 の発現も誘導されていた。興味深いことに、これまでに神経-血管相互作用によって神経から分泌された VEGF が血管に働きかけることで血管に動脈分化、遊走性をもたらすと報告されているが、血管-神経相互作用により血管内皮細胞内にも VEGF の強い発現誘導が起こることがわかった。これらの変動遺伝子の中で中心的に遺伝子発現を制御している分子を明らかにするため、我々は血管-神経相互作用で活性化する転写因子に注目し、2 回の独立した実験で安定して発現誘導が確認できた JunB に焦点を当てた。JunB のノックアウトマウスは E9.5 で胎盤形成異常により致死性を示すことが知られている (Schorpp-Kistner M. et al., 1999)。そこで、血管-神経相互作用における JunB 発現誘

導を確認したところ、RT-PCR でも 2.5 倍近い発現誘導が見られた。また、human JunB プロモーターを luciferase ベクターに連結したレポーターアッセイで血管-神経相互作用により血管内皮細胞内で JunB の転写活性の上昇が確認された。また、発生期のマウス皮下組織での JunB の発現を解析すると、JunB は血管内皮細胞の所々に強く発現していることがわかった。さらに、in vitro での 3D コラーゲン血管新生解析系で、JunB は血管新生の先端の tip-cell 様の細胞に特に強く発現していることが観察された (図 1)。

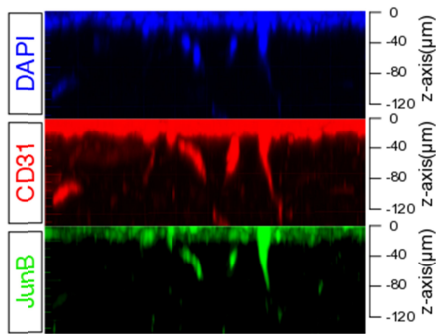


図 1. 血管新生における JunB の発現

そこで、JunB の発現を人為的に強制発現あるいは発現抑制した細胞を作成し、血管内皮細胞内での JunB の役割を調べた。その結果 JunB は血管内皮細胞の細胞形態に影響を及ぼし、高い JunB 発現は進展した細胞形態を示し、JunB の発現抑制は逆に細胞の進展を抑制し丸い細胞が増えた。また、血管内皮細胞を用いたスフェア様培養を行うと辺縁に存在する幾つかの血管内皮細胞は tip cell 形態を示して外側へ進展していくが、JunB 発現が多いとより多くの tip 様細胞がみられ、逆に JunB の発現が低いとその tip 様細胞が見られなくなった。それを反映して、in vitro での 3D コラーゲン血管新生解析系で JunB の発現量に依存した血管新生能の亢進が見られた。

次に、in vivo での血管-神経相互作用における JunB の役割を明らかにするため、発生期のマウス胎児へ shJunB レンチウイルスを導入し、血管の発生、血管-神経の並走性を解析した。マウス前足皮下組織の血管形成は E9.5 ごろに原始血管叢が形成され、E13.5 あたりで脊椎から前足組織へと末梢神経が伸びてくる。この時期から神経と血管の相互作用が始まり、周産期までに神経と並走した成熟血管網が形成されていく。そこで、末梢神経線維が伸びてくる前の E12.5 にマウス前足の皮下に shRNA-JunB のレンチウイルスを in-utero で注入し、その後 E17.5 まで成長させることで神経-血管相互作用における血管での JunB の機能を解析した。E12.5 日にマウスの前足に注入したレンチウイルスは E17.5

日に皮下組織内で感染し、ベクターに含まれる GFP の蛍光が確認された。その組織周囲での血管を免疫染色すると GFP 陽性細胞は血管内皮細胞を含む幾つかのタイプの細胞が存在していることが確認できた。この実験系を利用してモザイク解析により血管形成、神経との並走性を解析した結果、神経と並走していない部分で GFP 陽性の shRNAJunB を発現している細胞は GFP 陰性血管内皮細胞と比べて branch の長さには有意な差は見られなかった (図 2 a)。ところが、神経との併走している区間に限って branch の長さを解析すると GFP 陽性血管内皮細胞の方が branch の長さが短いことが明らかとなった (図 2 b)。このことは並走性が失われていることが原因である可能性が考えられたことから、次にそれぞれの branch の数が GFP 陰性と陽性の間に違いがないかどうかを検討した。その結果 GFP 陽性血管内皮細胞では陰性血管内皮細胞よりも並走している branch の数が減少していた (図 2 c, 左)。すなわち、shRNA-JunB を発現している血管内皮細胞の神経との並走は有意に抑制されていることを示している。さらに、分化程度が進んでいる太い血管のみを対象にしてさらに並走性を比較するとその差が更に明白となった (図 2 c, 右)。このことから、胎生 12.5~17.5 日の血管内皮細胞における JunB の発現は血管の神経との並走や血管の成熟に必須であることが示された。

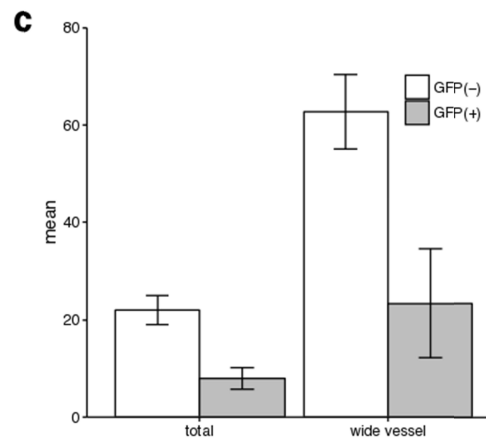
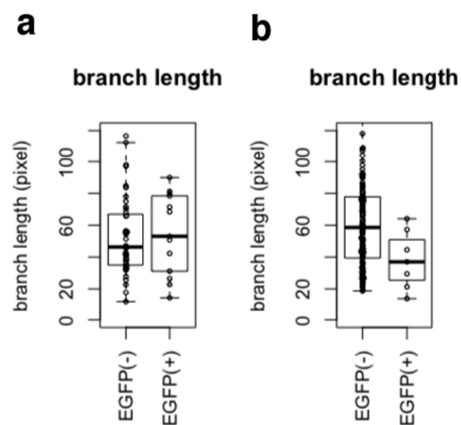


図 2. in utero lentivirus 注入法による JunB ノックダウンのマウス胎児血管形成への影響

次に、JunB を過剰発現させた血管内皮細胞での遺伝子発現プロファイリングを調べた結果、変動した遺伝子の多くが血管-神経相互作用で変動していた遺伝子と一致していた。更に 69 個の遺伝子のうち 34 個の遺伝子については血管-神経相互作用と JunB 強制発現で一致していた。このことから JunB は神経-血管相互作用で変動する遺伝子のうちの多くの遺伝子を制御している可能性が考えられた。

最後に、血管-神経相互作用における既知のシグナル伝達系の中での JunB の位置付けを明らかにするため、Cxcl12 との関連を調べた。Li らによると血管-神経相互作用で神経から分泌される Cxcl12 が血管内皮細胞に作用し、その受容体の CXCR4 を介して血管内皮細胞内にシグナルが伝わり血管のリモデリングを誘導することが示されている。そこで、Cxcl12 を介した血管-神経相互作用における JunB の関係を解析した。まず、Cxcl12 を 3D コラーゲンゲル血管新生アッセイの中に加えると血管新生が更に更新することから、既報のとおり Cxcl12 は血管形成を促進することが確認された。この Cxcl12 を加えた条件下で JunB の発現が誘導されるのかどうかを見ると RT-PCR 解析で JunB 発現の誘導は全く起こらなかった。次に、JunB 発現を抑制した時に Cxcl12 シグナルを介した血管新生が抑制されるかどうかを解析した結果、Cxcl12 が存在しているにもかかわらず JunB が無いと血管新生が抑制された。また、その他の可溶性増殖因子やサイトカインの影響を調べるために DRG のコンディションドメディウムを血管内皮細胞に加えて JunB の発現誘導を解析した結果、神経の分泌する可溶性因子を加えても JunB の発現を誘導することも、JunB のプロモーターを活性化することもなかった。このことから JunB の発現誘導は神経との直接の接触がトリガーとなり血管内皮細胞に発現誘導されるという機構が明らかとなった。以上の結果から、神経との直接の接触により血管内皮細胞で誘導される JunB は tip cell への変換と血管新生の亢進を介して、並走した形へと血管リモデリングの誘導を起こしていることが考えられた。今後、JunB の活性化を調節している神経シグナルの膜受容体が解明されれば血管の方向性やネットワーク形成を制御することができ、血管関連疾患への応用研究の可能性が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Ikeda T, Yoshitomi Y, Saito H, Shimasaki T, Yamaya H, Kobata T, Ishigaki Y,

Tomosugi N, Yoshitake Y, Yonekura H. Regulation of soluble Flt-1 (VEGFR-1) production by hnRNP D and protein arginine methylation. *Mol Cell Biochem.* 2016 Feb;413(1-2):155-64. doi: 10.1007/s11010-015-2649-y (査読有)

Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, Yonekura H, Ueda Y, Kaneuji A, Matsumoto T. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. *Med Mol Morphol.* 2015 Jun;48(2):69-75. doi: 10.1007/s00795-014-0077-9 (査読有)

Nakamura T, Yoshitomi Y, Sakai K, Patel V, Fukumoto S, Yamada Y. Epiprofin orchestrates epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *J Cell Sci.* 2014 Dec 15;127(Pt 24):5261-72. doi: 10.1242/jcs.156778 (査読有)

[学会発表](計 6件)

吉富泰央, 池田崇之, 吉竹佳の, 米倉秀人, 神経-血管相互作用により血管内皮細胞で活性化される JunB の役割, 第 88 回日本生化学会大会 (BMB2015), 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

吉富泰央, 池田崇之, 吉竹佳の, 米倉秀人, 神経-血管相互作用により活性化される JunB の血管ネットワーク形成における機能, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15-18 日, 京都国際会議場 (京都府京都市)

吉富泰央, 池田崇之, 吉竹佳の, 岡山 實, 小栗佳代子, 米倉秀人, 転移能の異なる Lewis 肺がん細胞株が形成する腫瘍中に誘導される血管の構造の差異の解明, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

吉富泰央, 池田崇之, 吉竹佳の, 八田稔久, 加藤伸郎, 米倉秀人, 神経-血管相互作用を介した血管ネットワーク形成における JunB の機能, 金沢医科大学医学会第 49 回学術集会, 2013 年 7 月 6 日, 金沢医科大学 (石川県内灘町)

池田崇之, 吉富泰央, 吉竹佳の, 米倉秀人, Flt-1 (VEGF 受容体-1) mRNA 選択的 3' 端プロセシング機構の解析, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

Yoshitake Y, Ikeda T, Yoshitomi Y, Yonekura H. Increased expression of Epac2 during in vitro tube formation in

human microvascular endothelial cells.  
22nd IUBMB & 37th FEBS Congress,  
Sept 4-9, 2012, Sevilla, Spain

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉富 泰央 (YOSHITOMI, Yasuo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80399039