

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06924

研究課題名(和文) JunB発現を誘導して血管を神経と並走させる神経-血管相互作用の実体の解明

研究課題名(英文) Analysis of JunB-related cell-cell signaling for neurovascular parallel alignment

研究代表者

吉富 泰央 (YOSHITOMI, Yasuo)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：80399039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経と血管の並走過程で血管内皮細胞に誘導される転写因子JunBが神経との並走過程でどのような役割を担っているのかを明らかにするため、JunBの活性化を指標にして神経-血管の直接接触による細胞間シグナル伝達に関わる分子を同定することで神経-血管並走メカニズムの解明を目指した。JunBのプロモーターレポーターをもつヒト血管内皮細胞を作成し、CRISPR-Cas9を応用した遺伝子活性化ライブラリーを利用して神経-血管接触シグナルによってJunBレポーターの活性を上昇させる分子をゲノムワイドで探索した。その結果、いくつかの転写因子や細胞内シグナル伝達分子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究により神経-血管並走過程でJunBが誘導されることが神経と血管の並走に必須であることが明らかとなっていたが、JunBがどのような役割を担っているのかは不明であった。神経との接触によって血管内皮細胞にJunBが誘導されるとTip細胞に転換され血管のリモデリングが誘導される。この過程に関わるシグナル伝達分子の解明は神経との並走を介した血管ワイヤリング機構の理解に繋がり、組織再生での人工血管網の構築方法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to clarify the role of JunB in the process of nerve-blood vessel parallelism, we aimed to identify molecules involved in intercellular signaling by direct neuro-vascular cell attachment and interaction using JunB activation as an indicator to elucidate the mechanism of nerve-vessel parallelism. We generated human vascular endothelial cells with a JunB promoter-reporter and used a gene activation library based on CRISPR-dCas9 for genome-wide screening the molecules that increase the activity of the JunB reporter in response to nerve-vessel contact signals. The results shows that several transcription factors and intracellular signaling molecules were identified in the JunB-induced angiogenesis pathways.

研究分野：血管新生

キーワード：血管新生 脈管形成 JunB

1. 研究開始当初の背景

生体内で神経と血管が並走することは古くから知られる現象であり、神経が血管網ワイヤリングのガイドランスとしての役割を果たすことが示唆されているが、その詳細なメカニズムはこれまでほとんど明らかにされていない。これまでに、神経から分泌される VEGF や CXCL12 等の液性因子が神経と血管の並走に関わることが報告されたが、その並走過程で、神経との接触シグナルを伝える細胞膜受容体や血管内皮細胞内でのシグナル伝達は分かっていた。我々はこれまでに、神経と血管の並走過程を詳細に検討して細分化し、3つのステージに分けられることを見出した。すなわち、神経からの液性因子のシグナルを受容した血管内皮細胞が神経へと「遊走」する過程、その後、神経と血管の直接の「接触」が起こり、それに引き続いて、血管の「リモデリング」が行われて神経と並走した血管網が構築されていくことを明らかにしてきた。また、神経-血管接触を模倣した神経と血管内皮細胞共培養系で血管内皮細胞内に最初期遺伝子群の一つである JunB の発現が強く誘導されることを見出した。神経との接触を介した JunB の活性化のシグナル伝達機構の解明はいかにして血管が整然と成体組織全体に構成されているのかという血管ワイヤリングの基本原則の理解につながり、固形組織への血管網再構築方法の開発につながるものと考えられた。

2. 研究の目的

これまでに神経と血管の並走過程は神経からの可溶性因子による「誘因」、神経と血管の「接触」、神経との「並走」の順に進行することを明らかにしており、このうち、神経との接触シグナルが血管内皮細胞に JunB 発現を誘導し、それが引き金となって血管内皮細胞を tip cell 様に変化させ血管のリモデリングが進んでいく。本研究の目的は神経との接触シグナルの実体が何かを明らかにし、神経と血管の並走シグナル伝達全容を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) JunB 発現による Tip cell 形成能の解析

ヒト微小血管内皮細胞株である TIME cells にそれぞれ mcherry または JunB-EGFP 蛍光タンパク質を発現させ、これらの細胞の混合培養でスフェロイド細胞塊を形成させた。その後、マトリゲル上でこれらの細胞塊から出芽し伸長する血管を蛍光顕微鏡下で観察した。それぞれの細胞塊の境界面に位置する細胞の蛍光色(緑および赤)をそれぞれカウントし、その中で伸長先端に位置する Tip cell 様の形態を示す細胞の割合を定量化した。

(2) 種々の血管内皮細胞サブタイプにおける JunB 発現の in silico 解析

公共データベースで得られるマウス由来血管内皮細胞のすべてのサブタイプを網羅的に同定した single cell RNA-seq データを利用して JunB 発現がどのような組織の血管、あるいはどのような種類の血管サブタイプで発現が増加しているのかを調べた。EC Atlas (<https://www.vibcancer.be/software-tools/EC-atlas>) (Kalucka et al., Cell. 2020 Feb 20;180(4):764-779) より single cell RNA-seq データを抽出し、in silico 解析によりそれぞれの血管内皮サブタイプ細胞ごとの JunB 発現を定量化し比較した。

(3) CRISPR/dCas9 ライブラリーを用いた JunB シグナル伝達解析

神経-血管並走過程に必須の因子である血管内皮細胞転写因子 JunB のシグナル伝達において上流に位置する分子、特に神経からのシグナルを受け取る細胞膜受容体、およびその関連シグナル因子を同定するために、JunB プロモーターレポーター-GFP を安定発現したヒト微小血管内皮細胞を用い、CRISPR-Cas9 を応用した遺伝子活性化 SAM (Synergistic Activation Mediator) ライブラリー (Joung J. et al. Nat Protoc. 2017) を用いて全遺伝子を対象にした 1 遺伝子活性化システムを構築して JunB を活性化させる上流因子を探索した。SAM ライブラリーを導入した血管内皮細胞をフローサイトメーターで分離し、JunB 活性化の強度の異なる 3 画分を回収し、MiSeq を用いた NGS 解析により対象遺伝子のガイド RNA 出現頻度を比較して、JunB パスウェイに関わる上流因子を同定した。

(4) JunB 発現誘導後の血管内皮細胞のシグナル伝達および細胞動態

神経-血管並走に関与する転写因子 JunB が血管内皮細胞内でどのような遺伝子の発現制御を行っているのかを明らかにするため、JunB 発現による血管内皮細胞の遺伝子発現の変化を RNA-seq

により解析し、JunB の下流シグナル伝達を網羅的に解析した。レンチウイルスを介して JunB を微小血管内皮細胞に発現させ、7日後に細胞を可溶化し、QIAGEN RNeasy kit で total RNA を精製し、vector control のサンプルとともに RNA-seq により網羅的遺伝子発現の解析を行った。

4. 研究成果

(1) JunB 発現による Tip cell 選別実験

Tip cell 選別実験の結果、JunB を発現した血管内皮細胞ほど血管新生先端に位置している割合が多いことが明らかとなった(図1)。このことは血管内皮細胞に JunB が誘導されると Tip cell に変換することを示唆している。

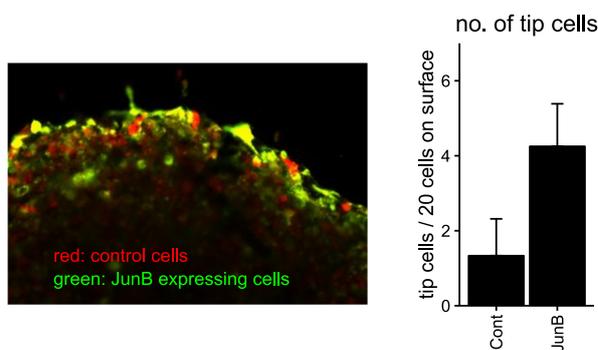


図1. JunBおよびGFPを発現するヒト微小血管内皮細胞(緑)とコントロールベクター-mCherry発現微小血管内皮細胞(赤)を用いてスフェア形成からの血管新生能を比較した。コントロールの細胞と比べてJunB発現血管内皮細胞は有意に血管新生先端に位置し、Tip cell特有なフィロポディアを持つ伸長した細胞形態を示した。

(2) 種々の endothelial subtype cells における JunB 発現の in silico 解析

EC Atlas の single cell RNA-seq データを利用した in silico 解析の結果、JunB は静脈血管内皮細胞よりも動脈の血管内皮細胞で発現が高いこと、微小血管内皮細胞に限ると、動脈微小血管も静脈微小血管も同様に強く JunB を発現していることが明らかとなった(図2)。興味深いことに、増殖中の血管内皮細胞では JunB の発現が低いことが明らかとなった。また、リンパ管内皮細胞では JunB 発現は非常に低いことも明らかとなった(図2)。このことから、JunB は動脈および Tip cell が存在する微小血管内皮細胞で機能していること、増殖活性の高い stalk cell では JunB の関与が低いことが示唆された。

能していること、増殖活性の高い stalk cell では JunB の関与が低いことが示唆された。

(3) CRISPR/dCas9 ライブラリーを用いた JunB シグナル伝達解析

神経-血管相互作用に関与する膜受容体を明らかにする目的であるが、まずは JunB 発現の血管内皮細胞内での上流因子を同定する試みを行った。CRISPR/dCas9-SAM ライブラリーを用いて JunB-プロモーター-GFP 発現血管内皮細胞の誘導を指標にライブラリーをスクリーニングし、得られたガイド RNA を NGS 解析することで JunB 発現を誘導する因子のガイド RNA 出現頻度を計測した。その結果、JunB 発現とガイド RNA 出現頻度が正の相関を示す分子が 102 種類同定され、その中には血管内皮細胞での転写調節に関わることが報告されている転写因子が複数存在していた。膜受容体分子はこのシステムでは確認できなかったが、受容体分子の同定は今後の課題として残された。

(4) JunB 発現誘導後の血管内皮細胞のシグナル伝達および細胞動態

JunB は微小血管内皮細胞の Tip cell 変換に関わる因子であることが明らかとなったが、JunB が血管内皮細胞のどのような遺伝子の調節を行っているのか、JunB 発現による血管内皮細胞の遺伝子発現の変化を RNA-seq により解析し、JunB の下流シグナル伝達を網羅的に解析した。その結果、いくつかの Tip cell 関連因子および Ca²⁺チャネル分子が JunB により制御されていることが明らかとなった。今後これらの分子の JunB 依存的 tip cell 転換を介した血管のリモデリングへの関与を明らかにしていきたい。

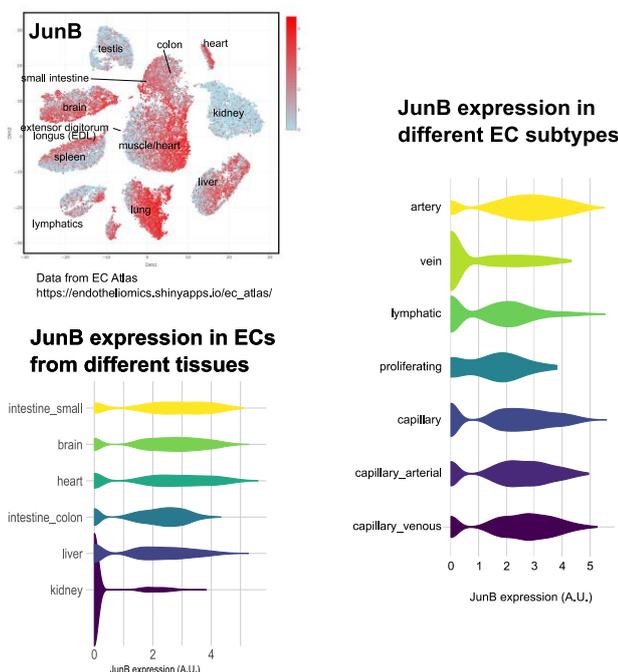


図2. 種々の血管内皮細胞サブタイプにおけるJunB発現の比較。EC Atlasより抽出したデータをもとにin silico解析でJunBの発現を血管内皮の種々のサブタイプにおけるJunB発現と比較した。その結果、JunBは静脈血管内皮細胞よりも動脈の血管内皮細胞で発現が高いこと、微小血管内皮細胞に限ると、動脈微小血管も静脈微小血管も同様に強くJunBを発現していることが明らかとなった。また、増殖中の血管内皮細胞ではJunBの発現が低いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Saito-Takatsuji Hidehito, Yonekura Hideto	4. 巻 22
2. 論文標題 Emerging Role of AP-1 Transcription Factor JunB in Angiogenesis and Vascular Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2804 ~ 2804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062804	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 Shibata Shinsuke, Shibata Naoko, Ohtsuka Satoshi, Yoshitomi Yasuo, Kiyokawa Etsuko, Yonekura Hideto, Singh Dharendra P., Sasaki Hiroshi, Kubo Eri	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Decorin in Posterior Capsule Opacification and Eye Lens Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 863 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040863	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 Kawakita Emi, Yang Fan, Kumagai Asako, Takagaki Yuta, Kitada Munehiro, Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Nakamura Yuka, Ishigaki Yasuhito, Kanasaki Keizo, Koya Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Metformin Mitigates DPP-4 Inhibitor-Induced Breast Cancer Metastasis via Suppression of mTOR Signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 61 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0115	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 Ikeda Takayuki, Saito-Takatsuji Hidehito, Yoshitomi Yasuo, Yonekura Hideto	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of Arginine Methylation in Alternative Polyadenylation of VEGFR-1 (Flt-1) pre-mRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6460 ~ 6460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186460	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 Yoshitomi Yasuo, Osada Hiromi, Satake Haruka, Kojima Masami, Saito-Takatsuji Hidehito, Ikeda Takayuki, Yoshitake Yoshino, Ishigaki Yasuhito, Kubo Eri, Sasaki Hiroshi, Yonekura Hideto	4. 巻 8
2. 論文標題 Ultraviolet B-induced Otx2 expression in lens epithelial cells promotes epithelial?mesenchymal transition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio035691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.035691	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 Yang Fan, Takagaki Yuta, Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Li Jinpeng, Kitada Munehiro, Kumagai Asako, Kawakita Emi, Shi Sen, Kanasaki Keizo, Koya Daisuke	4. 巻 79
2. 論文標題 Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial?Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 735 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-0620	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柴田伸亮, 柴田奈央子, 柴田哲平, 石田秀俊, 吉富泰央, 大塚 哲, 清川悦子, 米倉秀人, 佐々木洋, 久保江理
2. 発表標題 Decorin過剰発現がマウス水晶体とヒト水晶体上皮細胞に与える影響
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田伸亮, 柴田奈央子, 柴田哲平, 石田秀俊, 吉富泰央, 大塚 哲, 清川悦子, 米倉秀人, 佐々木洋, 久保江理
2. 発表標題 Decorinを水晶体特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスの作成
3. 学会等名 第59回日本白内障学会総会・第46回水晶体研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉富泰央、長田ひろみ、池田崇之、高辻英仁、佐々木洋、米倉秀人
2. 発表標題 UB-B照射により水晶体上皮細胞に誘導されるOtx2は水晶体繊維の遺伝子発現を抑制し上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Ikeda, Yasuo Yoshitomi, Hidehito Saito-Takatsuji, Ken Inoki, Hideto Yonekura
2. 発表標題 Role of Rheb interacting proteins in mTORC1 signaling pathway
3. 学会等名 The 92nd annual meeting of the japanese biochemical society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富 泰央、長田ひろみ、佐竹 悠、高辻 英仁、池田 崇之、石山 尚史、石垣靖人、久保 江理、佐々木 洋、米倉 秀人
2. 発表標題 UV照射により水晶体上皮細胞で誘導されるOtx2の機能解析
3. 学会等名 第57回白内障学会総会・第44回水晶体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉富 泰央、佐竹 悠、高辻 英仁、池田 崇之、石山 尚史、米倉 秀人
2. 発表標題 UVB照射により水晶体上皮細胞に誘導されるOtx2は上皮間葉転換(EMT)を誘導して水晶体上皮細胞の水晶体繊維への分化を抑制する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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	高辻 英仁 (齋藤) (TAKATSUJI-SAITO Hidehito) (40768959)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	
研究 分担者	米倉 秀人 (YONEKURA Hideto) (80240373)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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