

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22679

研究課題名(和文) 拍動流等によるくも膜細胞の造血能誘導における分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism in hematopoiesis of arachnoid cell induced by pulsatile flow

研究代表者

和田 洋一郎 (Youichiro, Wada)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：10322033

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)：初代培養したラットくも膜細胞を致死放射線被ばくしたラットに静脈投与した結果、全例が1年以上生存し、くも膜組織における造血能の可能性が示唆されたことから、ヒト初代培養くも膜細胞を用い、混合培養装置下に拍動流刺激を加えたところ、造血能関連遺伝子群が誘導された。この結果を踏まえ、力学的刺激を中心とした分化誘導環境下での分子メカニズムを解明するための実験系を確立した。この実験系で得られたヒト培養くも膜細胞のトランスクリプトームデータによる統合的オミックス解析によって、内皮からの血球分化で報告されている一連の分化遺伝子群の誘導が確認され、転写カスケードの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管システムにおけるくも膜細胞の役割において、血管系細胞との相互作用及び内皮細胞への分化能を示唆する所見に加え、本研究では造血能を有する可能性が示された。こうしたくも膜細胞の多分化能によって、脳血管システムを超えた全身の恒常性維持に関与していることが明らかになれば、頭蓋内外における造血システムの解明及び治療法開発に向けた応用を目指すことが可能となる。また、培養くも膜細胞の臨床応用は、iPS細胞等とは異なる生体の自己修復能の応用技術の開発という意味で、今後の再生医療における新たな一領域の開拓という意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：As a result of intravenous administration of primary cultured rat arachnoid cells to rats exposed to lethal radiation, all rats survived for more than one year, suggesting the possibility of hematopoietic potential in arachnoid tissues. Using primary cultured human arachnoid cells, pulsatile flow stimulation under a mixed culture system induced a group of genes related to hematopoietic potential. Based on these results, we established an experimental system to elucidate the molecular mechanism of differentiation in an environment where mechanical stimulation is mainly used to induce differentiation. Integrative omics analysis of transcriptome data of cultured human arachnoid cells obtained in this experimental system confirmed the induction of a series of differentiation genes reported in hematopoietic differentiation from endothelium, and the transcriptional cascade was successfully identified.

研究分野：内科循環器病学

キーワード：くも膜 シェアストレス エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管は発生学的にも解剖学的にも他の血管にない特徴を有しているが、この脳血管と頭蓋内で密接な関係にあるくも膜について、申請者らは臨床経験を通じ、症例によってくも膜の肥厚、白濁、色調変化など多彩な形態変化が起きていることを学び、くも膜の高い生物学的活性に注目するに至った。くも膜に関する初めての記述は300年前に遡るものの、近年でもその遺伝子発現の報告は乏しく、申請者らは、これらを解明すべく脳血管と同時に、くも膜細胞のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、くも膜組織には予想以上に豊富な遺伝子発現が認められ、くも膜と周囲脳血管の間に、神経血管発生に重要な遺伝子群である Notch, Bone Morphogenetic Protein (BMP), Ephrin, Neuropilin, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)を介したクロストークが存在する可能性が明らかとなった(H.Wada ら、*JAT*, 2002)。実際、くも膜初代培養細胞を用いた *ex vivo* の実験や内皮細胞との混合培養を行った結果、くも膜細胞は内皮細胞が形成する管腔の径を一定に維持する能力があることを確認し、くも膜細胞と血管系細胞の機能的相互作用を見出した。

また、くも膜下出血モデルの樹立によって、くも膜細胞が血管系細胞をはじめとする多能性分化能を有することを見出した。内皮細胞分化に関しては、標準エピゲノムデータの取得に続いて、くも膜下出血モデルにおける病態エピゲノムデータも取得し、その分子機序の一端を解明し報告した。

さらに、マウス脳血管内皮細胞が致死的骨髄抑制からの造血回復に寄与するという報告(John P.ら、*Blood*, 2007)を参考に、血管内皮細胞に分化可能な、くも膜細胞を致死的放射線照射後ラットに径静脈的に移植する実験を行った。その結果、サブコンフルエント状態のくも膜細胞投与群では全例が生存し、それ以外の群は、全例重度の貧血によって死亡した。生存例では無血管組織である正常くも膜組織において、末梢には存在しない幼弱な赤血球の存在が電子顕微鏡下に確認できたことから、くも膜細胞由来の赤血球産生が生存の理由である可能性が示唆された(未発表データ)。また、申請者らの共同研究グループが、造血幹細胞の発生母地である Hemogenic Endothelium の分化誘導実験において、拍動流が分化に重要な要素であることを発見していたため(Luigi A.ら、*Nature*, 2009)、申請者らはこの成果に着想を得て、くも膜細胞からの造血を *in vitro* で検証するにあたっては、拍動流を含む刺激が必要であると考え、*in vitro* の実験を行ったところ示すような、Hematogenic Endothelium が造血幹細胞に分化する際に誘導される *KLF2*, *MYB*, *RUNX1* 等の遺伝子群の誘導を示す予備データを得ることができた。

従来脳神経外科領域においては、くも膜細胞は治療に際して切開剥離すべき組織であり、くも膜組織の生理機能に注目した研究は極めて限られ、組織特異的幹細胞としての機能は充分認知されていない。また、申請者が検索した限りにおいて、くも膜細胞の造血能に関する研究のみならず、くも膜細胞静注による骨髄造血能回復に類似する研究も報告例を見出すことはできなかった。

くも膜細胞が脳血管システム維持に重要な役割を果たすだけでなく、多分化能によって全身の恒常性維持に関与していることが明らかになれば、くも膜細胞の臨床応用への糸口を得ることになり、iPS 細胞等とは異なる生体の自己修復能の応用技術の開発が可能になる。

特に本研究では、こうした組織特異的幹細胞の存在意義を明らかにすると同時に、頭蓋内外における造血システムの解明及び治療法開発に向けた応用を目指すものであり、今後の再生医療における新たな一領域の開拓という意義があると考えている。

## 2. 研究の目的

脳血管疾患は、我が国死因の第4位を占める重要な病態である。その脳血管には外膜や栄養血管が存在せず、代わりに平滑筋層外側にくも膜細胞が位置して血管を取り囲み、クモの巣のように支えている点で他の血管と比べて極めて特徴的である。申請者らは、脳血管研究の過程で、くも膜組織が健常時の脳血管システム維持に重要な役割を担っているばかりでなく、病的環境下で血管内皮細胞に分化する現象を見出し、平成29年度に採択された挑戦的研究(萌芽)において、その分化誘導分子機序において TGFbeta 経路が重要であることを報告した。

加えて、くも膜細胞には内皮細胞以外の多系統細胞へ分化する可能性が推測されている。従来申請者らは、くも膜細胞を致死的放射線被ばくしたラットに静脈投与する実験を行った結

果、サブコンフルエント状態のくも膜細胞投与群では全例が生存し、病理解析の結果、くも膜における造血能を見出した。そこで、以前血管壁環境を再現するために独自に開発した、混合培養装置を用いて拍動流刺激を加えたところ、造血能関連遺伝子群の誘導を確認した。

そこで、本研究では力学的刺激を中心に、低酸素などを含む分化誘導環境下で、くも膜細胞において造血能が誘導される分子メカニズムを解明する。既に、内皮細胞分化時における分子機序解析を経験しており、この結果との対比において、効率的な解析を行うことができる。

以上の準備状況を踏まえ、トランスクリプトーム解析に基づく上流解析によって、転写制御メカニズムを同定し、さらにエピゲノム解析、クロマチン構造解析、単一細胞解析、及び数理モデル解析によって造血能誘導の分子機序を解明することを目的とする。多能性分化能を有するヒトくも膜細胞の生理的機能や、脳血管システムの病態における役割を理解することによって、培養くも膜細胞移植による脳血管障害の機能予後改善や、体外造血といった臨床応用の可能性を開拓する。

### 3. 研究の方法

#### 1. くも膜組織の採取、初代培養

連携医療機関で開頭手術の際不要となったくも膜組織から細胞を単離・精製し、一部を専用培地を用いて Explant 法によって初代培養、残りを病理学的解析(電顕、パラフィン切片作成)に用いる。

#### 2. 拍動流刺激・低酸素培養

申請者が動脈硬化体外モデルとして開発した混合培養装置 MK-2000(ヤマト科学製、図1b、*ATVB* 2002)を用いて、くも膜細胞を造血幹細胞専用培地において5~10 dynes/cm<sup>2</sup>の拍動流を加え、1%の低酸素状態で、培養する。培養液中の血球系細胞を観察し、Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay (Bio Rad)による培養液中の27種類のサイトカイン(造血に関係するG-CSF,GM-CSF等)測定、病理組織学的解析(造血系コロニー形成観察等)とトランスクリプトーム解析を行う。

#### 3. 単一細胞トランスクリプトーム解析

くも膜細胞自体は均質な細胞集団であっても、分化の過程は不均一と考えられ、C1-single cell analyzer (Fluidigm 社)により単一細胞の遺伝子発現プロファイルを取得し、クラスタリング解析や主成分分析によって不均一性の実態を解析し、造血能誘導の時系列変動の解明に役立つ。

#### 4. エピゲノム解析

造血能の発現と共に誘導される遺伝子発現の制御機構を探索するため、経時的エピゲノム解析を行う。促進的なヒストン修飾に加えて、抑制的な修飾や、転写因子が結合可能なヌクレオソームアクセシビリティ領域の分布、RNAポリメラーズII(RNAPII)結合部位、DNAメチル化領域を全ゲノム的に解析し、遺伝子の活性化と抑制における複数メカニズムの使い分けを明らかにする。細胞特異的なエンハンサー領域を同定し、モチーフ解析によって関係する転写因子を抽出、転写因子自体の発現量変動や、組織局在を確認して重要性を評価する。

#### 5. クロマチン構造解析

ゲノム・エピゲノム解析によって、転写制御領域や、RNAPII結合領域等、ゲノム上の相互作用領域を推定した後、これらの領域を介したクロマチン相互作用解析を行う。相互作用候補領域内にプライマーを設計し、必要領域だけを濃縮して効率的にシーケンスする、capture Hi-Cを行う。これにより、転写制御領域、コヒーシオン結合部位、転写活性部位が関与する網羅的な相互作用情報を得る。

#### 6. 数理モデル解析

網羅的な相互作用データに基づき、数学的な前提を定めた上で、最も低いエネルギーを取る安定なクロマチン構造の数理モデルを作成し、造血能の誘導にともなって引き起こされるクロマチン動態を推測する。これにより、クロマチン相互作用データに基づく、クロマチン構造モデルを得ることができ、造血能の誘導に関わる遺伝子領域に起こる変化の解明に役立つ。

#### 4. 研究成果

脳血管には外膜や栄養血管が存在せず、平滑筋層外側にくも膜細胞が位置して血管を取り囲む。申請者らは、病的環境下でこのくも膜細胞が血管内皮細胞に分化する現象と分化誘導分子機序を明らかにした。加えてくも膜細胞を致死放射線被ばくしたラットに静脈投与した結果、サブコンフルエント状態のくも膜細胞投与群では全例が生存し、くも膜における造血能を見出した。また、混合培養装置を用いて拍動流刺激を加えたところ、造血能関連遺伝子群が誘導された。本研究では力学的刺激を中心とした分化誘導環境下で、くも膜細胞において造血能が誘導される分子メカニズムを解明するため、初代培養くも膜細胞を用いて、共同研究者が開発した拍動流または定常流刺激を加える装置における培養条件を決定し、統合的オミックス解析によって、細胞分化の分子機序を明らかにする実験を行った。初年度は、まず定常流刺激装置及び培養条件の検討を行った。回転円盤型で定常流を加える培養装置を用いた予備実験では、コラーゲンタイプ1でコーティングした 10 cm dish にくも膜細胞を播種し、1.5 dynes/cm<sup>2</sup> の刺激を 24 時間および 48 時間加えた。その後、RNA を回収して分化マーカーの発現誘導をリアルタイム PCR によって定量して、予備実験を行った。その結果培養環境の条件検討が必要であることが判った。平行平板型で定常流を加える培養装置による培養条件を検討するため、コラーゲンタイプ1、ファイブロネクチン、新田ゼラチンタイプ IV などを用いたコーティング条件の検討を行った。その結果、ファイブロネクチンでコーティングしたガラス板にくも膜細胞を播種し、0.5dynes/cm<sup>2</sup> および 1.0dynes/cm<sup>2</sup> の刺激を 24 時間添加後、RNA を抽出してリアルタイム PCR による分化マーカーの発現変動を現在確認している。第二年度は、確定した培養条件に基づいて遺伝子発現解析を行った。その結果、内皮からの血球分化で報告されている一連の分化遺伝子群の誘導が確認され、トランスクリプトームデータを取得した。その結果、一連の転写カスケードの同定に成功し、現在投稿準備中である。

以上の結果から、多能性分化能を有するくも膜細胞の生理的機能や、脳血管システムの病態における役割を理解することにより、培養くも膜細胞移植による脳血管障害の機能予後改善や、体外造血といった臨床応用の可能性を明らかにする事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wada Hiromi	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive epigenome characterization reveals diverse transcriptional regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 77-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-019-0319-0.	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 H. Wada
2. 発表標題 Contribution of arachnoid cells in arterial stenosis of Moyamoya Disease suggested by ex vivo functional assay
3. 学会等名 European Stroke Organization Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 裕美
2. 発表標題 もやもや病くも膜細胞の血管狭窄に対する機能解析
3. 学会等名 第78回 日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019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	和田 裕美  (wada hiromi)  (60645042)	東京大学・アイソトープ総合センター・特任研究員    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中戸 隆一郎  (nakato ryuichiro)  (60583044)	東京大学・定量生命科学研究所・講師    (12601)	
研究分担者	中田 庸一  (nakata yoichi)  (40584793)	東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教    (12601)	

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