

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20716

研究課題名（和文）血管内皮の時空間的トランスクリプトームの理解と病態研究への応用

研究課題名（英文）Spatial transcriptome analysis in endothelium and its application for endothelial cell-related diseases

研究代表者

亀井 竣輔（KAMEI, SHUNSUKE）

熊本大学・大学院先導機構・助教

研究者番号：10949647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性循環疾患や癌病態に深く関与する血管病変の増生（血管新生）時において、中心的役割を担う血管内皮細胞の発芽・伸長に至る転写調節機構の原理解明が求められる。本研究では、正常および病態異常を引き起こすマウスを用いた血管内皮1細胞レベルでの細胞多様性・遺伝子発現パターン解析を行い、VEGF-Calcineurin-NFATシグナルの血管発芽や分岐への意義を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の血管の状態変化やプロセスにおける、血管内皮の遺伝子発現変化やエピゲノム調節因子の詳細な関与などは不明であり、血管の発芽から新生血管の安定化までの全過程における個々の内皮細胞の転写制御のダイナミズムや運命決定におけるその意義を統合的に解析した本研究は、病的血管新生や血管疾患治療のアプローチの観点からも重要である。また本研究成果は、血管新生時の遺伝子発現変化を体系的に理解するのみならず、遺伝子発現プロファイルの一部を既にデータベース上で公開しており、血管生物学研究自体を推進していく意味でも非常に意義深いと考えている。

研究成果の概要（英文）：Sprouting and branching angiogenesis in blood vessels are tightly regulated and the hyperactivation and dysfunction are related to the onset of many diseases. In this project, we demonstrated single-cell transcriptomic analysis using endothelium derived from wildtype and pathological mouse models, and revealed the role of VEGF-Calcineurin-NFAT signal in the process of sprouting and branching angiogenesis.

研究分野：薬理学、分子生物学、血管生物学

キーワード：血管内皮 VEGF-NFAT/DSCR-1 シグナル エピジェネティック 内皮多様性 シングルセル解析 内皮特異的遺伝子改変マウス

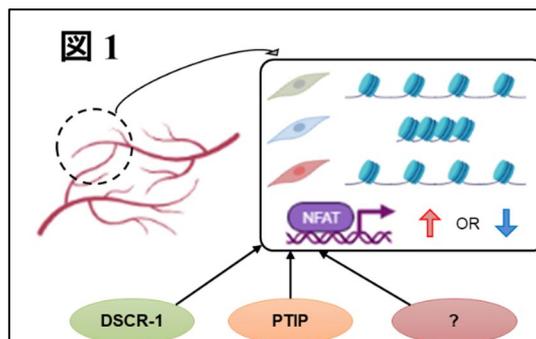
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管新生は既存血管から新規に血管を形成することである。通常の組織傷害や修復過程では厳密にそのプロセスが制御される一方で、慢性疾患や病的炎症、癌の増殖などにおいては、無秩序な血管新生が引き起こされることで異常組織の形成や癌の増悪化に寄与していることが広く知られている。

血管新生の中核を為すのは血管内皮細胞であり、ニッチを形成する周囲の細胞から産生される VEGF やその他成長因子の刺激を受けて血管内皮で主に Calcineurin-NFAT シグナルが活性化することで、既存血管から糸状仮足を発現する先端 (Tip) 細胞が発芽することが見出されている。また発芽血管の後方では Tip と特性の異なる Stalk 細胞が増殖し血管が伸長する。これらの血管発芽は Phalanx 細胞の出現によって適切なタイミングで終息する (高倉 伸幸, 日本血栓止血学会誌 2014)。これら一連のプロセスは、Tip-Stalk 間の Notch シグナルを介した VEGF 応答感受性の違いに基づいて厳密に制御されており、それぞれの細胞の分化調節が血管新生には必須である。Tip/Stalk 細胞を特徴付けるマーカー遺伝子の発現が示されている一方で、個々の血管の状態変化やプロセスにおける血管内皮の遺伝子発現変化やエピゲノム調節因子の詳細な関与などは不明であり、病的血管新生や血管疾患治療のアプローチの観点からも、”血管の発芽から新生血管の安定化までの全過程における、個々の内皮細胞の転写制御のダイナミズムや運命決定におけるその意義“を統合的に明らかにする必要がある (図 1)。



2. 研究の目的

本研究では、「血管内皮の 1 細胞レベルでのエピジェネティックな転写制御 (エピゲノムおよびトランスクリプトーム) の経時的な変化、および異なる細胞ごとの転写制御の空間的違いを明らかにすると同時に、この遺伝子発現に關する各種相互作用因子の血管内皮機能への影響を明らかにすること」を目的とする。これまでの多くの先行研究は解析技術の限界で、血管を構成する各細胞の一過的かつ一部の遺伝子発現変化に着目した研究に限られていた。昨今の 1 細胞解析の発展により、各細胞の詳細なエピゲノムおよびトランスクリプトーム解析が可能になってきており、申請者や共同研究者の解析技術や知識、各種ツールを統合することで、これまで不可能であった血管内皮細胞ごとの特性評価が可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、下記 3 つの方法および期待される成果を軸に研究を行った。

Single cell RNA-seq および Single cell ChIP-seq などの解析技術を用いて、新生血管の各活性化内皮細胞の遺伝子発現パターンを経時的に明らかにする。

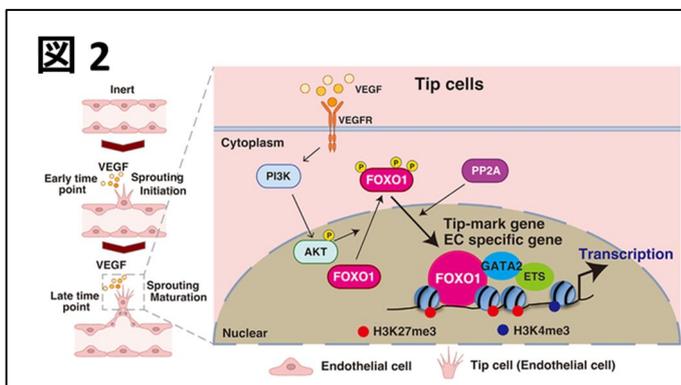
における遺伝子発現調節の根幹を為す、NFAT シグナルの調節・相互作用因子の遺伝子改変マウスや細胞を用いて、同様に各細胞の遺伝子発現パターンを解析・比較する。

の各遺伝子改変マウスの生理学的な解析、および各病態誘導時の病態生理学的な解析を通して、血管内皮細胞の 1 細胞レベルでの NFAT シグナルの活性化調節の変化が如何に各細胞での遺伝子発現変化やその先の表現型の変化に影響するかを明らかにする。

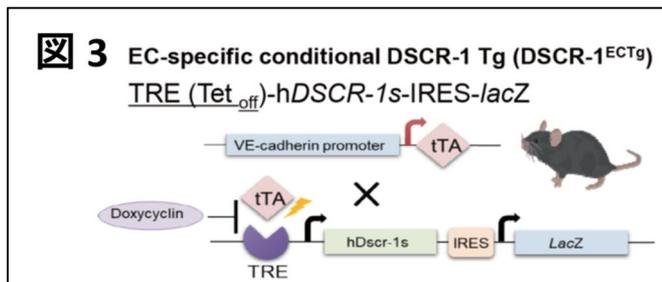
4. 研究成果

における Single cell RNA-seq 解析は野生型マウス組織血管およびヒト初代培養血管内皮細胞 (HUVEC) それぞれで実施した。マウス組織血管では 3 週齢の網膜組織を用いて細胞の viability を十分に保つ Collagenase による適切な分解条件の検討を行った。その結果、MACS ピーズによる内皮細胞単離後に、90% 以上が評価可能な内皮細胞集団であることを確認した。これら単離細胞、および HUVEC の RNA-seq や ChIP-seq も含めた詳細な解析の結果から、NFAT の結合モチーフをプロモーター上に持つ VEGF-NFAT シグナルの下流遺伝子などは、発芽血管内皮や 3 次元培養血管内皮細胞において特に活性化されており、その活性化に伴い Tip 細胞マーカーの遺伝子

発現増加と Stalk 細胞マーカーの遺伝子発現抑制が引き起こされることを証明した。また VEGF 刺激後早期の NFAT シグナルによる反応に加えて、VEGF シグナル後期においては FOXO1 が活性化することで、エピジェネティック制御を介した Tip 細胞特異的な遺伝子発現調節を担うことを明らかにした(図 2; Miyamura and Kamei et al., *iScience*, 2024)。



・ においては、VEGF-NFAT シグナルの強力な抑制因子 DSCR-1 を、VE-Cadherin プロモーターの下流で内皮特異的に過剰発現し、Tet-OFF システムでその発現の ON/OFF が調節可能なマウスを樹立し解析を行った(図 3)。本マウスは DSCR-1 遺伝子の誘導量に応じて表現型が異なり、ホモでテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) 配列を持つマウスは胎生致死であった。一方で、ヘテロで保有するマウスは出生が可能であるが、DSCR-1 発現依存的な NFAT シグナル抑制に伴う脳や網膜組織の血管形成不全や分岐異常を引き起こすことを組織学的解析および遺伝子発現解析などから明らかにした。



に関する細胞ごとの遺伝子発現プロファイルについては、DSCR-1 内皮特異的過剰発現マウスの網膜血管内皮 Single cell RNA-seq を行い、野生型マウスとの比較を行った。その結果、DSCR-1 過剰発現によって *Esm1* や *Apln*, *Angpt2* などの Tip 細胞マーカー遺伝子発現が陽性の細胞集団数が減少しており、一方で静脈由来の内皮細胞に分類される細胞集団の代償的な増加が確認された。本結果は発芽血管の先端に位置する Tip 細胞の分化不全を示唆しており、組織学的解析結果における血管形成不全や分岐異常を裏付けるものである。

以上の結果から、VEGF の下流で活性化される NFAT を中心とした内皮シグナルは、血管発芽の中でも特に Tip 細胞分化に必須の遺伝子発現をエピジェネティックに制御しており、DSCR-1 活性化による VEGF-NFAT シグナルの恒常的抑制が Tip 細胞分化不全から血管発芽や分岐の異常を引き起こすことを確認した。また本知見は DSCR-1 遺伝子を含む 21 番染色体のトリソミー(ダウン症候群)など、DSCR-1 遺伝子量が変化する状態と VEGF-NFAT シグナル抑制による血管形成変化を伴う病態との関連を示唆するものである。

これらの成果は、各種学会発表や一部成果は論文発表も行い、多くの専門家の方々からフィードバックをいただいた。その他成果においても、順次論文発表の準備を進める。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyamura Yuri, Kamei Shunsuke, Matsuo Misaki, Yamazaki Masaya, Usuki Shingo, Yasunaga Keiichiro, Uemura Akiyoshi, Satou Yorifumi, Ohguchi Hiroto, Minami Takashi	4. 巻 27
2. 論文標題 FOXO1 stimulates tip cell-enriched gene expression in endothelial cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109161 ~ 109161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.109161	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 Ueno-Shuto Keiko, Kamei Shunsuke, Hayashi Megumi, Fukuyama Ayami, Uchida Yuji, Tokutomi Naofumi, Suico Mary Ann, Kai Hirofumi, Shuto Tsuyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 A Splice Switch in SIGIRR Causes a Defect of IL-37-Dependent Anti-Inflammatory Activity in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7748 ~ 7748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147748	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shunsuke Kamei, Takashi Minami
2. 発表標題 Transcription factor ERG modulates endothelial cell function in tumor angiogenesis
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Kamei, K. Arata, Y. Miyamura, K. Araki, Y. Kubota, T. Minami
2. 発表標題 Endothelial cell-specific transcription factor ERG promotes tumor vascular normalization and anti-cancer drug efficacy
3. 学会等名 22ND INTERNATIONAL VASCULAR BIOLOGY MEETING (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀井 竣輔, 福嶋 葉子, 植村 明嘉, 有馬 勇一郎, 西山 功一, 南 敬
2. 発表標題 VEGF-NFAT-ダウン症因子-1 シグナル軸を介した血管分岐制御機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀井 竣輔, 福嶋 葉子, 植村 明嘉, 有馬 勇一郎, 西山 功一, 南 敬
2. 発表標題 VEGF-NFAT-ダウン症因子-1シグナル軸を介した血管内皮分化や血管分岐制御機構の解明
3. 学会等名 第27回日本血管病理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀井 竣輔, 荒田 佳菜子, 宮村 優里, 荒木 喜美, 久保田 義顕, 南 敬
2. 発表標題 転写因子ERGIは血管内皮機能調節と腫瘍血管正常化に関与する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会/ 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀井 竣輔, 福嶋 葉子, 植村 明嘉, 有馬 勇一郎, 西山 功一, 南 敬
2. 発表標題 VEGF-NFAT-ダウン症因子-1 シグナル軸を介したTip細胞分化および血管分岐制御メカニズムの解明
3. 学会等名 CVMW2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/skamei 熊本大学 生命資源研究・支援センター 分子血管制御分野 http://irda-vascular.kuma-u.jp/ 熊本大学 生命資源研究・支援センター http://irda.kuma-u.jp/

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
研究協力者	南 敬 (Minami Takashi)		

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