

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22665

研究課題名（和文）リンパ管は腸管粘膜構造維持に機能する

研究課題名（英文）Physiological and pathological analysis of intestinal mucosa lymphatic endothelial cells.

研究代表者

久米 努（Kume, Tsutomu）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・客員教授

研究者番号：60786474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ管新生の分子基盤を解明する目的で、FOXC 転写因子の下流で作用すると考えられる RASGAP ファミリー、RASAL3, RASA4 の内皮特異的なコンデショナルノックアウトマウスの樹立に成功した。また、リンパ管の炎症において血管内皮で認められる凝固系が関与するのか検証するため、vWF の発現制御をマウスレベル及び培養内皮にて定量的に計測したところ、恐らくエピゲノム変化を介し、厳密な血管系での vWF 発現が培養環境下では変化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管やリンパ管内皮細胞は存在する微小環境、即ち存在する組織での異種細胞間での相互作用やサイトカイン、血流やリンパ流、酸素分圧の影響を受けて、主にエピゲノムレベルでの可逆的あるいは不可逆的な制御下、その微小環境に即した遺伝子発現やそれに伴う内皮細胞の構造変化を行うことが想定されている。今回 vWF を基に、in vivo と培養細胞での違いが顕著に示されたことで、この微小環境を考慮してリンパ管の解析を進める重要性とエピゲノムレベルでの今後の研究展開の重要性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The lymphatic endothelial cells (ECs) have critical roles in maintaining tissue homeostasis. To analyze the signals for lymphatic vessel formation, we have initially focused on the RASGAP family, Rasa4 and Rasal3, as the downstream of the FOXC transcription factor and have generated the Tamoxifen-inducible conditional these knockout mice, crossed with EC-specific VE-cadherin-CreERT2 transgenic line. Next, to study the correlation between coagulation systems in lymphatic ECs, we have verified the von Willebrand factor (vWF) expression in vivo and cultured cells. The vWF promoter activity and expression were predominantly observed in vascular but not lymphatic ECs in mice. However, in cultured conditions, vWF changed to express lymphatic ECs. The epigenetic status regulated such tissue-specific expression patterns since EZH2 inhibitor treatment leaked to vWF expression in cultured fibroblasts. Further analysis will uncover the lymphatic EC's specific signals and the expression machinery.

研究分野：血管生物学、循環器医学

キーワード：リンパ管 VEGF-C 小腸虚血再灌流障害モデル 虚血性腸疾患 リンパ管内凝固

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 小腸は胃に繋がる消化器官で、水分と栄養素のほとんどは、小腸によって吸収される。小腸の内面に輪状に走るヒダがあり、その粘膜の表面にある腸絨毛が消化と吸収を司る。その絨毛の中心部にある一本の細いリンパ管(中心乳び管)は、小腸上皮細胞で構成された中性脂肪、コレステロール、リン脂質からなるカイロミクロン(リポ蛋白質)を吸収して血流に戻す役割を持つことも知られているが、その吸収作用以外の、小腸粘膜構造維持に関するリンパ管の機能については全く不明である。そこで本研究では、小腸リンパ管の基本原理の統合的解明を基に、その小腸恒常性維持が破綻した虚血性腸疾患の新しい治療法の開発に繋げることを計画した。

(2) 血管やリンパ管内皮細胞は存在する微小環境、即ち存在する組織での異種細胞間での相互作用やサイトカイン、血流やリンパ流、酸素分圧の影響を受けて、主にエピゲノムレベルでの可逆的あるいは不可逆的な制御下、その微小環境に即した遺伝子発現やそれに伴う内皮細胞の構造変化を行うことが想定されている。そこで、エピゲノム解析においては、共同研究ベースで行う事を計画した。

2. 研究の目的

(1) 病態時における腫瘍リンパ管新生の分子基盤、特にリンパ管内皮の増殖制御機構とリンパ行性がん転移のメカニズムを解明する。そこで、まず、久米らが中心となって進めてきた FOXC 転写因子の新規下流標的候補因子 (Rasa4 と Rasal3) のリンパ管制御への関与を解明することを目的とする。

(2) 腸管虚血はさまざまな要因で血液循環が悪くなることで小腸粘膜が虚血になり、炎症や潰瘍を生じる疾患である。移植手術などの外科的処置における虚血再灌流によっても誘導される。小腸粘膜の損傷によりそのバリアー機能が低下して吸収障害、さらに重篤な場合には全身性炎症反応症候群や遠隔臓器障害を惹起して、死に至る。虚血性腸疾患への臨床的治療法は未だ確立しておらず、粘膜障害機序の解明と腸管保護を目的とした新たな治療法の開発が必要である。そこで本研究では、先ず、リンパ管が炎症を起こし、リンパ流が滞る際に、血管系での凝固系因子が発現するのか、エピゲノム制御の変化を伴うのか解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リンパ管特異的 RasGAP 欠損マウスでの表現型解析

FOXC 転写因子の新規下流因子 RasGAP (Rasa4 及び Rasal3) については Flox を用いたコンディショナルノックアウトのマウス系統が樹立されていないので、先ず熊本大学生命資源研究支援センターとの共同として、CRISPR/CAS9 系を用いて作製する。LoxP をイントロンに導入する系で C57BL6 由来の ES 細胞を基に、マウス樹立を行う。セレクションに用いた puromycin 耐性遺伝子カセットはホモ化の際に Flip 酵素をもとに除去する。

得られたマウスに関しては、ホモ化後、血管内皮・リンパ管内皮細胞特異的に tamoxifen 投与に応じて CRE 酵素が核内に移行する (CRE^{ERT2}) VE-cadherin- CRE^{ERT2} トランスジェニックマウスとかけ合わせ、胎仔期、及び成体期において血管・リンパ管での表現型がどのように変化するか、臓器での免疫染色などを介し、解析を進める。

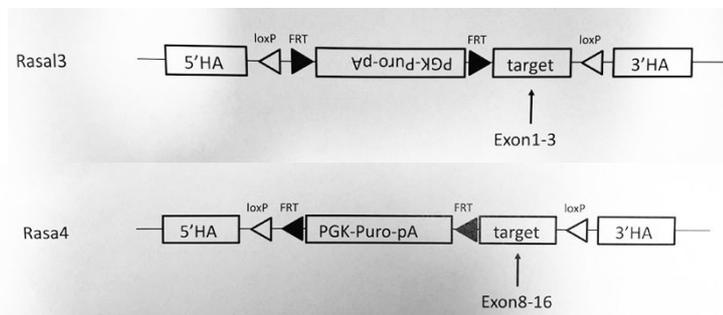
(2)血管内皮での凝固関連因子、von Willebrand factor (vWF) の発現制御解析

ヒト正常リンパ管内皮細胞、微小血管内皮細胞（これらは市販化されている）を培養し、凝固関連遺伝子の発現レベルを確認する。更に、ヒト vWF 遺伝子プロモーター活性を *in vivo* にて確認するため、Hprt-locus にヒト vWF プロモーターを knock-in したマウス (Minami and Aird WC et.al. Blood 2002) をもとに主要臓器での whole mount lacZ 染色を行う。また、vWF の抗体を用いた免疫染色を行い、培養細胞及び生体内での凝固系遺伝子の発現を比較する。またエピゲノム制御の関与があるかどうか確認するため、まずは DNA メチル化酵素阻害薬、5-Aza-deoxycytidine や ポリコーム 2 EZH2 阻害薬 DZ-nep を用いて、内皮系以外の細胞にて vWF の発現レベルに変化が見られるか検証する。

4. 研究成果

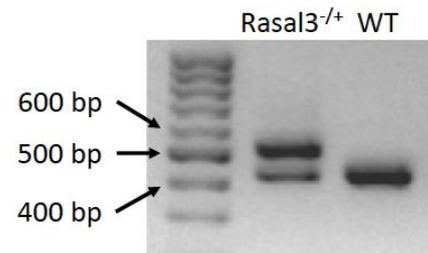
(1) Rasa3l, Rasa4 conditional knockout マウスの樹立

代表者のこれまでの基盤研究と連動して連携研究者である熊本大学教授の南 博士と共同にて行った。まず、Rasa3 ゲノム及び Rasa4 ゲノムへの LoxP, FRT 配列導入は各々初年度に行った。基本的にES 細胞の改変は Nickase を用いる CRISPR/Cas9 の系にて2カ所のガイド RNA にて行った。コロニーPCR、サザンプロットを介して組み換え ES 細胞の評価を行い、ES 細胞 2 種類を aggregation 法にてマウス blastocysts に導入し、個体化を行った。B6 細胞の寄与率の高い 3 種類のカメラマウスを各々維持し、B6 wild type マウスと掛け合わせ、ヘテロ knock-in マウスの作製に至った。血管・リンパ管



内皮特異的 Cre 発現マウス (VE-cadherin-CreERT2) はシカゴ Northwestern 大学において既に維持しているので、熊本から凍結精子の輸入手続きをとり、両マウスの受け入れを完了させた。LoxP ノックインマウスのホモ化を行い、かけ合わせその genotype を完了させた段階である。なお、この研究代表者と協力者の連携はコロナ禍の影響を強く受け、マウス維持や凍結精子保存の順番待ちなど大きく遅延する要因が多々生じた。

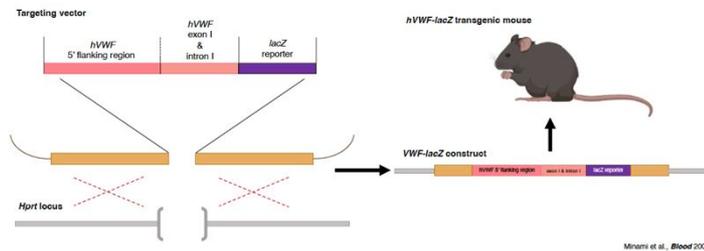
まず、成体期でのリンパ管内皮への Rasa3, Rasa4 の影響を見る目的で Tamoxifen を投与し、3日後耳を採取し、wholmount にて Lyve1 の抗体を用い、リンパ管の遡行などみる計画である。6月にてシカゴ northwestern 大学より発送し、客員教授としての熊本大学にて観察を行う予定としている。



(2) vWF の発現制御

公共のゲノムデータベース (UCSC) から凝固に關与する vWF は血管内皮細胞で高発現しているが、培養のリンパ管内皮細胞では示されていない。まずは vWF プロモーターの活性を lacZ

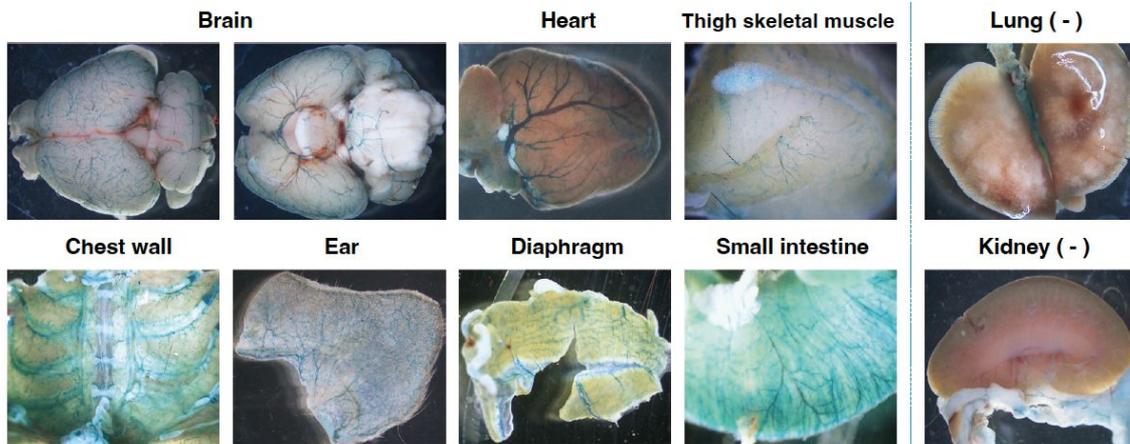
活性を示す Hprt-locus vWF promoter ノックインマウスを用い、再度 lacZ 活性が血管に局限しているか確認した。



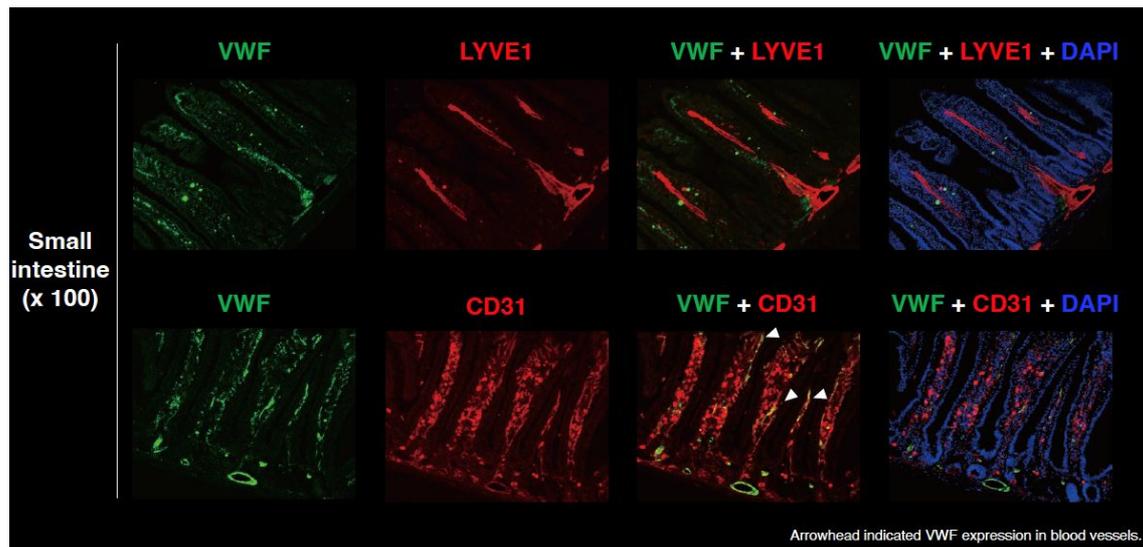
その結果、肺・腎臓を除く主要臓器の血管(大血管を中心とする)にて

vWF promoter の活性化が認められた。なお、耳や横隔膜、腸では細い規則正しい逆行状態の様子から血管を中心とした lacZ 染色像であると想定されたが、リンパ管内皮での発現有無に関しては、切片を含めた更なる解析が必要である。

次に心臓及び小腸においてリンパ管内皮特異的な発現様式を示す Lyve1、血管内皮細胞でより強く発現する CD31 を比較コントロールとして vWF の抗体を用いた免疫染色を試みた。まず

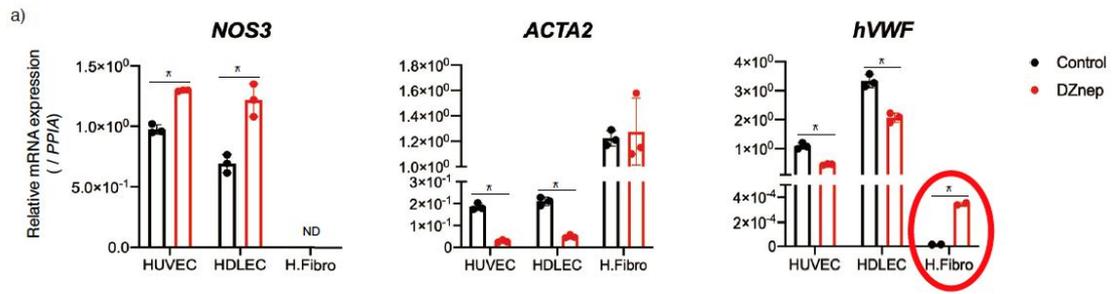


本来解析を進める予定であった小腸において、vWF 陽性の領域は乳び管の外側の血管領域に限定しており、Lyve1 陽性のリンパ管と一致は認められなかった。



次に培養リンパ管内皮では vWF の発現が抑制されているか、qPCR にて検証した。想定外に培養条件下では vWF mRNA の発現が微小血管内皮よりも強く認められ、NOS3 同様に、内皮特異的な発現様式であった。次に、エピゲノム制御について関連があるか検証する目的で、EZH2 阻害剤である DZ-nep を加えたところ、本来の発現を有する血管・リンパ管内皮では発現が下がったものの、興味深いことに本来発現のない線維芽細胞において vWF の発現がリークする傾向が認められた。これらの発現制御の詳細、さらには vWF の血管内皮特異的な発現がどうして培養条

件下では変化するのかについては今後の更なる解析が必要である。



a) HUVEC, HDLEC, human fibroblasts were treated with histone methylation enzyme-EZH2 inhibitor; DZnep (5 μ M) for 48hr.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 14件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Tan Can, Norden Pieter R, Yu Wei, Liu Ting, Ujiie Naoto, Lee Sun Kyong, Yan Xiaocai, Dyakiv Yaryna, Aoto Kazushi, Ortega Sagrario, De Plaen Isabelle G, Sampath Venkatesh, Kume Tsutomu	4. 巻 -
2. 論文標題 Endothelial FOXC1 and FOXC2 promote intestinal regeneration after ischemia?reperfusion injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202256030	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 Motojima Masaru, Tanaka Masayuki, Kume Tsutomu	4. 巻 135
2. 論文標題 Foxc1 and Foxc2 are indispensable for the maintenance of nephron and stromal progenitors in the developing kidney	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.260356	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 Ujiie Naoto, Kume Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanical forces in lymphatic vessel development: Focus on transcriptional regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.1066460	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 Zhang Chi, Wang Dongmei, Wang Jingjing, Wang Li, Qiu Wenli, Kume Tsutomu, Dowell Robin, Yi Rui	4. 巻 1
2. 論文標題 Escape of hair follicle stem cells causes stem cell exhaustion during aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 889 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-021-00103-w	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 Takenoshita Manami, Takechi Masaki, Vu Hoang Tri, Furutera Toshiko, Akagawa Chisaki, Namangkalakul Worachat, Aoto Kazushi, Kume Tsutomu, Miyashin Michiyo, Iwamoto Tsutomu, Iseki Sachiko	4. 巻 250
2. 論文標題 Cell lineage- and expression-based inference of the roles of forkhead box transcription factor Foxc2 in craniofacial development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.324	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 Almubarak Asra, Lavy Rotem, Srnica Nikola, Hu Yawen, Maripuri Devi Priyanka, Kume Tsutomu, Berry Fred B.	4. 巻 297
2. 論文標題 Loss of Foxc1 and Foxc2 function in chondroprogenitor cells disrupts endochondral ossification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101020 ~ 101020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101020	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 Yang Jingping, Zhang Difei, Motojima Masaru, Kume Tsutomu, Hou Qing, Pan Yu, Duan Aiping, Zhang Mingchao, Jiang Song, Hou Jinhua, Shi Jingsong, Qin Zhaohui, Liu Zhihong	4. 巻 32
2. 論文標題 Super-Enhancer-Associated Transcription Factors Maintain Transcriptional Regulation in Mature Podocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1323 ~ 1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020081177	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 Sanchez Joshua, Miyake Risa, Cheng Andrew, Liu Ting, Iseki Sachiko, Kume Tsutomu	4. 巻 58
2. 論文標題 Conditional inactivation of Foxc1 and Foxc2 in neural crest cells leads to cardiac abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23364	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 Norden Pieter R, Sabine Amelie, Wang Ying, Demir Cansaran Saygili, Liu Ting, Petrova Tatiana V, Kume Tsutomu	4. 巻 9
2. 論文標題 Shear stimulation of FOXC1 and FOXC2 differentially regulates cytoskeletal activity during lymphatic valve maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.53814	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 Zhang Xian, Beckmann Lisa, Miller David A., Shao Guangbin, Cai Zhen, Sun Cheng, Sheibani Nader, Liu Xiaorong, Schuman Joel, Johnson Mark, Kume Tsutomu, Zhang Hao F.	4. 巻 61
2. 論文標題 In Vivo Imaging of Schlemm's Canal and Limbal Vascular Network in Mouse Using Visible-Light OCT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 23 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.2.23	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 Norden Pieter R., Kume Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Lymphatic Vascular Function in Metabolic Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00404	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 Norden Pieter R., Kume Tsutomu	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular Mechanisms Controlling Lymphatic Endothelial Junction Integrity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 627647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.627647	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 Norden Pieter, Kume Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Lymphangiogenesis and Lymphatic Collecting Vessel Function in Metabolic Disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00404	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 Minami Takashi, Muramatsu Masashi, Kume Tsutomu	4. 巻 42
2. 論文標題 Organ/tissue-specific vascular endothelial cell heterogeneity in health and disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1609-1619.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00531	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Morphogenesis of Schlemm's canal via the crosstalk with the trabecular meshwork in glaucomatous pathology
3. 学会等名 Lymphatic Forum 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Gene expression profiling of murine neural crest-derived cells in the anterior segment
3. 学会等名 XXVth biennial meeting of the International Society of Eye Research (ISER) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Forkhead (Fox) Transcription Factors in Vascular Formation
3. 学会等名 9th Mayo Clinic Symposium on Immuno-Oncology and Tumor Microenvironment Crosstalk 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Organ-specific lymphatic formation and function in health and disease
3. 学会等名 第46回リンパ学会総会. Tokyo (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc Transcription Factors in Organ-Specific Lymphatic Function
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Lymphatics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pieter R. Norden, Lisa J. Beckmann, Zhen Cai, Xian Zhang, Hao F. Zhang, and Tsutomu Kume
2. 発表標題 Neural-crest derived Foxc2 expression is required for proper morphogenesis of the Schlemm's Canal
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Lymphatics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Can Tan, Ting Liu, and Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc1 and Foxc2 are required in blood and lymphatic vasculatures for small intestinal mucosal repair after ischemia/reperfusion injury
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Lymphatics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pieter R. Norden, Amelie Sabine, Ying Wang, Ting Liu, Tatiana V. Petrova, and Tsutomu Kume
2. 発表標題 Foxc1/Foxc2 regulation of RHO/ROCK activation in postnatal lymphatic valve maturation
3. 学会等名 Lymphatic Forum 2019 (国際学会)
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

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		
米国	Northwestern University		