

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03435

研究課題名(和文) 血管内皮細胞の多様性の解明と疾患治療への応用

研究課題名(英文) Endothelial cell heterogeneity and mechanism of diseases

研究代表者

内藤 尚道(Naito, Hisamichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30570676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管の内腔を覆う血管内皮細胞は、機能的・形態的に多様性に富む細胞であるが、現在の血管研究では、全ての血管内皮細胞は本質的に同じであるとされ、血管内皮細胞が示す細胞多様性は環境依存的であるとされている。私たちは、このような概念は必ずしも正確ではなく、血管内皮細胞には分化段階での細胞多様性が存在することを明らかにしてきた。本研究では、これまでの研究を発展させ、単細胞遺伝子発現解析を利用することで、血管内皮細胞の細胞多様性を解明し、新たな血管内皮細胞分類の確立を目指す。また血管内皮細胞の細胞多様性という概念を確立することで、さまざまな疾患の病態形成機序を捉え直すことを目的として研究に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管はさまざまな疾患病態と深く関わる。日本人の死因の上位を占める悪性疾患、心疾患、脳血管障害も血管が深く関与する。本研究では血管の機能に重要な血管内皮細胞に着目した。血管内皮細胞は均一な細胞であるとされているが、本研究を通じて血管内皮細胞は非常に多様性を示すことが明らかになった。さらには疾患ごとにその多様性はさらに複雑になった。血管内皮細胞の細胞多様性を標的とすることで、疾患の制御ができる可能性を明らかにできた。将来的にはさまざまな疾患治療に応用できる新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cells (VECs) exhibit functional and morphological heterogeneity. However, current vascular research assumes that all VECs are essentially the same and that cellular heterogeneity is due to environmental factors. We previously challenged this concept and demonstrated that there is cellular heterogeneity in VECs at the differentiation stage. In this study, we aim to develop our previous research and elucidate the cellular heterogeneity of VECs using single-cell RNA sequencing analysis, with the goal of establishing a new classification of these cells. By establishing the concept of cellular heterogeneity in VECs, we also aim to reevaluate the pathogenesis of various diseases. As a result, we show that VECs exhibit heterogeneity at the gene expression level, and we showed that targeting specific clusters of vascular endothelial cells could be feasible for treating diseases. Elucidating the microenvironment of VEC clusters will be essential for future study.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 シングルセル解析 細胞多様性 血管内皮幹細胞 疾患特異的血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

血管は様々な疾患の病態に深く関与する。例えば、腫瘍が増大するためには血管新生が必要であり、虚血性疾患では、血管障害が一因である。炎症が生じると、血管から炎症細胞が組織に遊走する。線維化の進行には、血管新生が関与する。このような血管の役割には、全ての血管の内腔を覆う血管内皮細胞が深く関与する。すなわち、血管が関与する疾患の病態を理解するためには、血管内皮細胞の機能を理解する事が重要である。現在、血管を阻害または再生させる治療が実臨床に用いられているが、十分な効果は得られていない。例えば腫瘍の治療に広く使用されている血管新生阻害剤も、有効性は認められるが、効果は不十分で、生命予後を劇的に改善する効果はない。また虚血に対する治療として、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた血管再生治療の有効性が検討されているが、長期間血流を維持できる血管を構築することはできていない。

我々は、このように血管新生の阻害や血管再生が不十分であるのは、血管内皮細胞の細胞多様性が一因であり、「血管内皮細胞を標的とした現在の治療法は、細胞多様性が考慮されておらず、治療標的的的確ではない」との仮説のもと、これまで研究に取り組んできた。血管内皮細胞が生体内で細胞多様性を示す事は広く知られている。例えば、脳、肝臓、腎臓の血管を構成する血管内皮細胞は、それぞれの臓器で異なる形態と機能を示す。臓器内でも解剖学的な局在の違いにより、血管内皮細胞の形態と機能は異なる。また動脈、静脈、毛細血管では、血管内皮細胞の遺伝子発現パターンは異なる。しかし、生体から血管内皮細胞を分離すると、それらの特徴は失われ、特に血管内皮細胞は培養すると、同じ細胞特性を示すことから、血管内皮細胞は本質的には全て均一な細胞集団であると考えられてきた。そのため、血管新生や血管再生をはじめ、血管内皮細胞が関与する様々な生命現象を理解する上で、血管内皮細胞の細胞多様性は考慮されていない。例えば、血管新生が生じる際には、活性化する血管内皮細胞は確率論的に選択されると考えられてきた。

我々は、成体マウスから末梢血管の血管内皮細胞を分離してフローサイトメーターで解析する事で、血管内皮細胞には、増殖能力が非常に高い一群が存在することを明らかにしてきた。さらに、網羅的遺伝子解析にて CD157 抗原を発現する血管内皮細胞が、血管の幹細胞としての性質を持つ血管内皮幹細胞であることを明らかにした。これらの結果は、血管内皮細胞には、分化段階の多様性が存在している事を示唆している。血管内皮細胞の細胞多様性を解明することで、血管を制御する標的的的確に定めることができる可能性を示す一例であると考えられる。

2. 研究の目的

血管内皮細胞は 19 世紀中頃に Wilhelm His により報告されて以降、全ての血管内皮細胞は同じ性質を持つとされている。我々は、独自の血管内皮細胞の分離法とシングルセル解析を組み合わせることで、既存の概念を転換し、血管内皮細胞が様々な性質を持つことを証明して、遺伝子発現に基づく新たな血管内皮細胞の分類が可能なのではないかと仮説を立てた。またマウス疾患モデルを用いて、血管内皮細胞の細胞多様性と病態の関連を明らかにする事ができれば、治療標的を絞った効果的な血管制御が可能になると仮説を立てた。

そこで、上記の研究背景のもと我々の仮説を証明するために、本研究では、1. 一細胞レベルで遺伝子発現解析を行うと、血管内皮細胞にはどのような細胞多様性が存在して、どのように分類できるか、2. 血管内皮細胞の細胞多様性は病態にどのように影響するか、3. 細胞多様性に基づき病態を捉えると、現在の治療の問題点を克服でき、真の治療標的を発見できるか、という 3 つの課題を解明することを目的として、研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

上記の 3 つの課題を解明するために以下の方法で研究を実施した。

1. 一細胞レベルでの遺伝子発現解析に基づく血管内皮細胞の細胞多様性の解明

成体マウスから、肝臓、肺、皮膚、筋肉を摘出して、ジスパーゼと 2 種類のコラゲナーゼを用いて酵素的に組織処理するとともに、機械的な力を加えることで、組織を分散した。分散した組織は 40 μ m のフィルターを通して、単細胞とした後、赤血球溶解試薬である ACK バッファーを用いて赤血球を破碎した。血管内皮細胞マーカー CD31、血球マーカー CD45 を、モノクローナル抗体を用いて染色し、FACS にて CD31+CD45-血管内皮細胞の解析を行なった。さらに同細胞を分離した。分離した細胞はリアルタイム PCR 解析を実施するために、mRNA を分離して、逆転写酵素を用いて cDNA とし、cDNA ライブラリーを作製した。同時にシングルセル解析を行うために、10X 社のプロトコールに従って細胞調整を行い、1 回の解析で標的細胞数を 6000 から 10000 細胞とし、1 細胞あたり 5 万から 10 万リードのシークエンスを実施した。得られた遺伝子発現情報は R およびオープンリソースである Cellenics を用いて解析した。ダブレット除去、死細胞除去、細胞周期補正を行い、主成分解析の後、UMAP 圧縮にて 2 次元で細胞分布を可視化し、また既知の遺伝子発現情報をもとに、各細胞クラスターの分類を行った。また各クラスターの発現変動遺伝子 (DEGs) を抽出した。そのうち表面抗原タンパク質は、FACS 用の抗体が市販されていれば、

購入して血管内皮細胞のクラスターの分離を試みた。さらには分離した血管内皮細胞の細胞増殖能力、薬剤耐性能力を評価した。

2. 血管内皮細胞の細胞多様性と疾患病態との関係

マウスに下肢虚血モデル、皮下腫瘍モデル、毒素による炎症モデルを作製して、上記 1. と同様に解析を行なった。虚血下肢では一部は新たにシングルセル解析をおこない、腫瘍血管内皮細胞および炎症モデルは新たに血管内皮細胞のシングルセル解析を行なった。上記 1. と同様に UMAP で可視化して、各クラスターの DEGs を抽出した。さらに正常組織の遺伝子発現パターンと比較して、疾患病態特異的な遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子は、マウス血管内皮細胞培養株 MS-1 および bend3 を用いて機能解析を行った。

3. 血管内皮細胞の細胞多様性解析に基づく治療標的の探索

上記 2. で同定した病態モデルにおいて変動を示す遺伝子のノックアウトマウスの入手と血管解析に取り組んだ。また血管内皮細胞と周囲の細胞の細胞間相互作用に着目して解析を行い、血管内皮細胞クラスターと周囲細胞の間に働く因子の探索をバイオインフォマティクス解析で行なった。同定した因子の阻害実験を、血管内皮細胞培養系で実施した。また生体マウスを用いた解析系の確立に取り組んだ。

4. 研究成果

上記に記載した 1-3 に沿って研究成果を示す。

1. 一細胞レベルでの遺伝子発現解析に基づく血管内皮細胞の細胞多様性の解明

肝臓、肺、皮膚、筋肉から CD31⁺CD45⁻細胞を分離して、シングルセル解析を行なった。その結果、血管内皮細胞は複数のクラスターに分かれ、各クラスターで、1.5 倍以上に発現亢進している遺伝子と、0.67 倍以下に発現が低下している変動遺伝子遺伝子 (DEGs) を抽出した。得られた遺伝子一覧を用いて、各クラスターの pathway 解析を行うと、血管新生に関わる経路、炎症にかかわる経路、細胞接着に関わる経路などが活性化していることが明らかとなった。また、一部のクラスターでは特異的 surface 抗原タンパクを認めた。RT-qPCR で、血管内皮細胞全体で、発現を確認すると Δ CT 値が低く、従来の方法では高発現していることがわからない遺伝子 A (論文発表前のため A とする)、遺伝子 B (同様に B とする) を同定した。実際に肝臓の血管内皮細胞と下肢筋肉の血管内皮細胞で FACS 解析を行うと、血管内皮細胞の一部が A の発現を認めた。培養実験を行なった結果、明らかな細胞増殖能力の変化は認めなかった。一方で B は、一部の血管内皮細胞で発現を認め、培養実験を行うと、細胞増殖能力が高いことがわかった。この B は、これまでに報告した CD157 を発現する血管内皮細胞と FACS 解析上で一部重複し、シングルセル解析でも重複していた。B 陽性血管内皮細胞に関しては、血管内皮細胞の阻害剤を培養液中に添加し、増殖能力を評価すると、B 陰性血管内皮細胞に比べ、高濃度の血管内皮細胞阻害剤に耐性であることがわかった。以上の結果から、従来、血管内皮細胞は均一な細胞であるとされていたが、生体内で遺伝子発現はさまざまであり、機能的にも多様性を認めることが明らかになった。

2. 血管内皮細胞の細胞多様性と疾患病態との関係

下肢虚血筋肉の血管内皮細胞、皮下腫瘍の血管内皮細胞、毒素による筋炎を誘導した際の血管内皮細胞を分離してシングルセル解析を行なった。その結果、血管内皮細胞は正常組織と同様に、複数のクラスターに分かれていた。正常組織と比べると、免疫応答、炎症応答、細胞増殖をしている血管内皮細胞など、複数の特徴的な血管内皮細胞クラスター (疾患特異的血管内皮細胞) が存在することが明らかになった。そのうちの遺伝子 C (同様に C とする) は、細胞増殖をしている病態モデルで特異的に発現を認める遺伝子であった。遺伝子 C は血管新生のマーカーとしても知られている遺伝子であった。培養細胞では遺伝子 C は発現していることから、siRNA を用いて発現を阻害した。その結果、細胞増殖能力が低下することが明らかになった。この結果から、疾患モデルでは、血管内皮細胞の遺伝子発現および、クラスター分布が変化することが明らかになり、またその変化した遺伝子の発現を操作することで、血管内皮細胞の細胞動態を変化させることができる可能性が示された。

3. 血管内皮細胞の細胞多様性解析に基づく治療標的の探索

疾患モデルの血管内皮細胞で発現が変動している遺伝子の機能解析を行った。既知の遺伝子に関しては、これまでの報告と同様の解析結果が得られた。血管内皮細胞の細胞多様性に基づき、血管内皮細胞の新たな機能を同定すべく、DEGs の情報を確認した。その上で、血管周囲の情報と統合して解析することで、血管内皮細胞の各クラスターに働く因子を同定して、DEGs の中で細胞間相互作用に関与する遺伝子を抽出した。血管周囲の情報はパブリックデータベースを活用した。血管内皮細胞クラスターは、マクロファージ、好中球、T 細胞と相互作用していた。腫瘍では、そのうち T 細胞と相互作用に働く因子を絞り込み、in vitro の血管と T 細胞の共培養系で、相互作用の阻害実験をおこない、血管形成および血管新生に及ぼす影響を解析した。阻害効果が得られた薬剤を、マウス担癌モデルに投与したところ、腫瘍の縮小効果を認める薬剤を同定した。虚血下肢筋肉ではマクロファージと相互作用する因子を同定した。その因子をマウス下肢虚血モデルで阻害すると、下肢血流の回復が阻害される可能性を示す結果が得られている。また、血管内皮細胞特異的 KO マウスを作製するために、Flox マウスの作製に取り組んでいる。以上の結果から、疾患特異的に特定の血管内皮細胞の因子を阻害すると、疾患病態の変化を誘導で

きる可能性を示すことができた。また、周囲の細胞との相互作用が重要である可能性が示唆され、血管内皮細胞クラスターの微小環境の解明が、今後重要な課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taku Wakabayashi, Hisamichi Naito	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellular heterogeneity and stem cells of vascular endothelial cells in blood vessel formation and homeostasis: Insights from single-cell RNA sequencing.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in cell and developmental biology	6. 最初と最後の頁 1146399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1146399	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 Zheng Jing, Tomohiro Iba, Hisamichi Naito, Pingping Xu, Jun-Ichi Morishige, Naoto Nagata, Hironao Okubo, Hitoshi Ando	4. 巻 14
2. 論文標題 Lenvatinib is an oral tyrosine kinase inhibitor that acts on multiple receptors involved in angiogenesis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in pharmacology	6. 最初と最後の頁 1182788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1182788	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 Wakabayashi T., Naito H., Iba T., Nishida K. & Takakura N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Identification of CD157-Positive Vascular Endothelial Stem Cells in Mouse Retinal and Choroidal Vessels: Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.63.4.5	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 8件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 Vascular Endothelial Cell Heterogeneity and Mechanism of Vascular Formation
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 腫瘍進展における血管内皮細胞多様性の役割
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisamichi Naito
2. 発表標題 The role of vascular endothelial stem cells and their characterization at single cell resolution
3. 学会等名 Asia-Australia Vascular Biology Meeting (AAVBM) 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内藤尚道
2. 発表標題 血管内皮細胞の多様性の解明とその臨床応用
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 松居彩, 内藤尚道	4. 発行年 2023年
2. 出版社 炎症と免疫（先端医学社）	5. 総ページ数 86
3. 書名 組織恒常性維持における血管の新たな役割	

1. 著者名 内藤尚道, 松居彩, 射場智大	4. 発行年 2022年
2. 出版社 生体の科学 (医学書院)	5. 総ページ数 98
3. 書名 血管系の幹・前駆細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学医薬保健研究域医学系・血管分子生理学 https://vm-physiol1.w3.kanazawa-u.ac.jp/ 金沢大学医薬保健研究域医学系 血管分子生理学ホームページ https://vm-physiol1.w3.kanazawa-u.ac.jp 日本の研究.com論文ページ https://research-er.jp/articles/view/86906 大阪大学微生物病研究所研究成果 http://www.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/research/2020/136</p>
--

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	坂野 公彦 (Banno Kimihiko) (40865630)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

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