

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20741

研究課題名（和文）血管リバースエイジングを目指した血管内皮細胞老化の分子機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanisms underlying the aging process in vascular endothelial cells.

研究代表者

射場 智大（Iba, Tomohiro）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10908205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：血管系異常を伴う疾患は時として死に直結するが、加齢はこの血管系異常を引き起こす最大の要因である。その為、加齢に伴う血管系細胞の変化を明らかとし、これを抑制する手法を確立する事は重要な課題である。本研究では、血管内皮細胞の加齢変化を生命情報科学的手法により解析し、機能的変化を制御する因子の探索を通じ、心血管系疾患の予防治療法に繋がる基礎的理論の確立を目標に研究を行った。研究の結果、若齢マウスと老齢マウスでは多くの細胞分子機構に相違が見られ、特定の機構について阻害薬を投与する事で若齢マウスでも再生能力が減弱する事を見出した。この事より、加齢に伴う血管系異常の要因の1つを同定できたと示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生命情報科学的手法を用いた解析によって、加齢と血管内皮細胞の小集団との関連について研究を行ったものである。これらの小集団は従来の形態学的な分類等では同定する事が難しい細胞集団であったが、本手法により従来以上に血管内皮細胞は機能的な異なりを伴って分類可能であることが示唆された。今後は加齢のみならず様々な病態について同手法を用いることで、新しい治療標的などが探索できると考えられる。また、本研究では加齢に伴う血管系異常の治療標的候補の1つを同定することができた。高齢者を対象とした新しい予防医療法の確立に向けた足掛かりの1つとして、今回得られた知見を今後発展させたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Cardiovascular diseases are considered to be the leading cause of death. Aging is the strongest trigger for dysfunction in blood vessels. Therefore, it is important to reveal the mechanisms of age-related changes in cells of blood vessels and establish methods to inhibit these changes. In this research, we analyzed age-related changes using bioinformatic techniques, with a particular focus on identifying molecular targets that can inhibit these changes. The goal is to establish a basic theory of preventive medicine for cardiovascular diseases in aging individuals.

As a result of this research, we discovered that activity levels in several molecular mechanisms differ between young mice and old ones. Furthermore, by using inhibitors targeting specific pathways, we found that the ability of blood vessel regeneration is reduced in young mice. Therefore it is supposed that this research identified a major mechanism associated with age-related dysfunction in blood vessels.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 バイオインフォマティクス 老化研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身に限らず張り巡らされている血管は、頭部では脳血管障害や網膜症、体幹部では虚血性心疾患や肺線維症、炎症性腸疾患、下肢では閉塞性動脈硬化症、さらには全身で生じる悪性腫瘍など全身のあらゆる臓器の様々な疾患病態と深く相関していることが知られている。これらの疾患は時として死に直結する。その中でも虚血性疾患は死因別割合の上位にあること、また加齢によってその割合が増加する疾患であることから、超高齢化社会となり、また、今後も高齢者率が高くなると予測されている日本においては、虚血性疾患の予防法と治療法の確立は重要な課題であると言える。

加齢に伴う虚血性疾患の機序の解明、またその予防治療法を確立するに当たり、本研究では血管を構築する細胞の中で、特に血管内皮細胞に着目して研究を行う。血管内皮細胞は組織ごとに、小孔の有無や大きさの差異など形態的な多様性を認めることが知られている。また動脈、静脈の血管内皮細胞は、血流が生じる前の発生初期から成体に至るまで遺伝子発現プロファイルが異なることが知られ、さらには発生初期には造血能力を持つ特殊な血管内皮細胞が存在することもよく知られた事実である。しかし、これまでこれらの血管内皮細胞が示す形態的・機能的な多様性は、単純に周囲の環境要因に依存するとされ、本質的には血管内皮細胞は1種類であるとされている。これは、発生学的に共通の中胚葉系細胞に由来する血球系細胞とは、非常に対照的な特徴である。近年、シングルセル解析技術の発展に伴い、遺伝子発現パターンに基づく新たな細胞分類がさまざまな細胞種で提唱されている。血管内皮細胞でも、昨年、肺の毛細血管内皮細胞は機能的・形態的な多様性が存在し、自己複製能が高い毛細血管内皮細胞とガス交換に特化した毛細血管内皮細胞が存在することが、Nature など複数の論文で報告され、血管内皮細胞の細胞分類に関する概念の転換が生じている。

現在までに、血管内皮細胞の老化研究では p53 シグナルを介した細胞老化メカニズムが重要であることが知られ、動脈硬化症や肥満症、糖尿病など生活習慣病に対する治療標的となる可能性が明らかになっている*1。しかし未だに血管内皮細胞の老化に関する基本的な分子機序の解明は十分とは言えないのが現状である。

<引用文献>

*1 I Shimizu and T Minamino “Cellular senescence in cardiac diseases”, *Journal of Cardiology*, 74(4) 2019, 313-319

2. 研究の目的

本研究の目的は、老化に伴う虚血性疾患の治療法について、その基礎理論を構築する事である。従来の形態学的・機能的血管解析手法に、網羅的遺伝子発現解析およびシングルセル解析を組み合わせたアプローチによって、加齢とともに血管内皮細胞に生じる変化を一細胞レベルから個体レベルまで統合的に解明する。加齢による変化を解明することで、血管内皮細胞の老化現象を抑制し、さらには若返らせる方法(リバースエイジング法)を確立することを目指す。具体的には以下の3つを目標として研究を行う。

- (1) 加齢に伴う血管内皮細胞の変化を明らかとする
- (2) 加齢に伴う変化に相関するメカニズムについて明らかとする
- (3) 同定されたメカニズムについて虚血性疾患との関連を明らかとする

3. 研究の方法

- (1) 加齢に伴う血管内皮細胞の変化を明らかとする

老齢マウス及び若齢マウスそれぞれから血管内皮細胞をセルソーティングにより分離しシングルセル解析を行う。具体的にはスクリプト言語 R 用のシングルセル解析パッケージ Seurat を用いたクラスター解析により、2 群から得られた血管内皮細胞を小集合(クラスター)に分類する。分類された各クラスターについて、加齢によってその存在が減少・消失するようなクラスター、あるいは老若両方に存在が認められるも、その遺伝子発現パターンが加齢により変化を示すようなクラスターを同定する。

同定された加齢に伴う変化が見られる血管内皮細胞集団のうち、血管機能の低下につながる集団を同定する。これを加齢変性血管内皮細胞とする。具体的には、老若のマウスで下肢を虚血状態としたモデルを作製し、シングルセル解析を行う。初めに得られたデータとの重ね合わせにより、変化した血管内皮細胞のいずれによって虚血状態からの回復が担われているかを明らかにする。解析手法としては細胞の遺伝子プロファイル変化ベクトルを推測する RNA Velocity 解析など複数の解析系を用いる。

- (2) 加齢に伴う変化に相関するメカニズムについて明らかとする

加齢変性血管内皮細胞の機能変化のメカニズムを同定する。特異的に活性化しているシグ

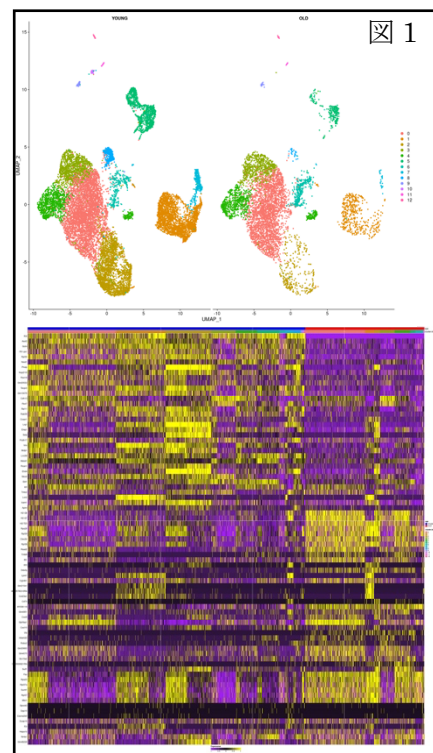
ナル経路や転写因子を Regulon 解析により検討する。また、血管内皮細胞だけでなく、血管内皮細胞を取り囲む細胞や組織の機能低下によってこれらの変化が惹起される事も視野に入れ、細胞間インタラクションの解析を行う。具体的には、組織全体の細胞をシングルセル解析にかけ、リガンド・レセプター解析を行うことで加齢によりインタラクションが低下している分子の探索を行う。

- (3) 同定されたメカニズムについて虚血性疾患との関連を明らかにする
 同定されたメカニズムについて、サイトカインや阻害剤の投与、目的遺伝子ウイルスベクターの投与によって、いずれのメカニズムが加齢に伴う虚血性疾患と関連しているか明らかとすると共に、治療標的の探索を行う。

4. 研究成果

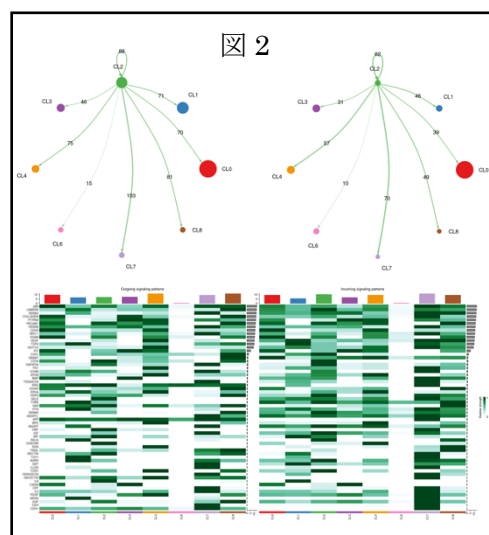
(1) 加齢に伴う血管内皮細胞の変化を明らかにする

老齢マウス及び若齢マウスそれぞれから採取した細胞について主成分解析を元とした細胞クラスタリングを行った所、血管内皮細胞は複数の細胞亜集団へと分類された(図 1 上)。分類された細胞亜集団の構成について着目すると、老齢マウスにおいてはその存在比が若齢マウスと比較して顕著に少数となる細胞亜集団の存在が同定された。1つの亜集団の存在比は若齢マウスにおける3分の1を下回っているなど、加齢によって血管内皮細胞の細胞構成が大きく異なることが明らかとなった。同定された、存在比が異なる細胞亜集団、加齢変性血管内皮細胞について特徴遺伝子を解析した所、36の遺伝子について特徴的に発現していることが明らかとなった。更に、各細胞亜集団について、加齢によって遺伝子発現変動が見られるか解析を行った。解析の結果、これらの細胞亜集団は加齢によってその遺伝子発現についても大きく異なることが明らかとなった(図 1 下)。特に、加齢変性血管内皮細胞については104の遺伝子について、その発現が変動していることが明らかとなった(発現変動閾値:1.25倍)。以上のことから、加齢によって血管内皮細胞は、その亜集団の存在比が変化するだけでなく、各亜集団における発現遺伝子も大きく変化していることが明らかとなった。



(2) 加齢に伴う変化に相関するメカニズムについて明らかにする

先の解析で同定された、加齢変性血管内皮細胞について、これらの変化を誘引するような分子機構の探索を行った。各亜集団内で特徴的に活性化しているシグナル経路を探索する Regulon 解析を行った所、24個の特徴的なパスウェイが同定された。更に、細胞間相互作用について、Cellchat 解析、nichnet 解析を行った所、加齢によって検出された細胞間相互作用が減少していることが示された(図 2 上)。また、若齢マウスで特徴的な細胞間相互作用について解明した(図 2 下)。これらの発見により、加齢によって多くのシグナル経路、また細胞間相互作用が変動する事が明らかとなった。



(3) 同定されたメカニズムについて虚血性疾患との関連を明らかにする

(2)で同定されたメカニズムについて、いずれのパスウェイ或いは細胞間相互作用が加齢とともに失われることによって、虚血性疾患からの回復が損なわれるのか、解析を行った。若齢マウスの下肢虚血モデルマウスを作出し、同定されたシグナル経路の阻害剤を投与することにより、虚血性疾患からの回復にどのような変化があるか、経時的に解析を行った。解析の結果、現在までに、市販されている阻害剤のうち、少なくとも1つの候補阻害剤について、若齢マウスに投与することにより虚血からの回復が低下することが明らかとなった。

以上のことから、加齢によってその活性が低下するシグナル経路には、虚血回復期に見られる血管の再生において重要な役割を担うものが含まれていることが示された。現在、研究期間内に入手することができなかった阻害剤を加え、更なる候補因子の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohiro IBA
2. 発表標題 Characterization of CD157 positive endothelial cells at the single-cell resolution.
3. 学会等名 The 22nd International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------