

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20917

研究課題名（和文）石灰化病変における発生学的細胞起源と分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Developmental cellular origins and regulatory mechanisms of differentiation in calcified lesions

研究代表者

岩瀬 晃康（Iwase, Akiyasu）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任助教

研究者番号：10965130

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）：ワーファリンを用いた石灰化病態モデルマウスにより石灰化病変形成までの時空間的な組織学的解析を行なった。その結果、石灰化病変が大動脈と冠動脈に生じ、神経堤細胞を標識するWnt1-Cre; R26-EYFPマウス、二次心臓領域由来細胞を標識するIslet1-Cre; R26-EYFPマウスなどに石灰化病態を誘導することで各起源の石灰化との関連が明らかになってきた。また、in silico解析ではシングルセルATAC-seqデータから任意の転写因子と標的遺伝子の間のエンハンサー様候補を同定するCARTAアルゴリズムを開発し、胎生期の心臓とヒト冠動脈石灰化病変で共通するエンハンサー様領域を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の死因第2位を占める心血管疾患において、石灰化はその病態の進展や有害事象の発症に深く関与し、治療法の選択にも影響を与える重要な病態である。臨床的に抗凝固剤として用いられるワーファリン投与は副作用として石灰化が報告されており、治療法を探索する上でも本研究は重要な位置づけとなる。特に細胞起源や領域性、そして発生過程で見られるエンハンサーとの共通性などの制御機構を含めた知見は新規治療法開発の基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：Spatiotemporal histological analysis of the calcified lesion formation was performed in a mouse model of calcification pathology using warfarin. The results revealed that calcified lesions occur in the aorta and coronary arteries and are associated with calcification of various origins in Wnt1-Cre; R26-EYFP mice labelled with neural crest cells and Islet1-Cre; R26-EYFP mice labelled with cells derived from secondary heart field. In silico analysis, the CARTA algorithm was developed to identify enhancer-like candidates between arbitrary transcription factors and target genes from single-cell ATAC-seq data, identifying common enhancer-like regions in embryonic heart and human coronary artery calcification lesions.

研究分野：循環器内科学

キーワード：石灰化 細胞起源 神経堤細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は胚発生初期に神経外胚葉と表皮外胚葉の境界に生じ、複数の遊走経路から体中に遊走して、ニューロン、グリア細胞、メラノサイト、骨芽細胞、軟骨芽細胞などに分化する多能性幹細胞集団である。なかでも心臓内へ遊走した神経堤細胞は、大動脈肺動脈中隔、大血管および冠動脈平滑筋、半月弁など、領域に応じて異なる細胞種へ分化する。特に大動脈や大動脈弁、冠動脈起始部は石灰化病変の好発部位であり、頭部骨格領域での神経堤細胞の分化と類似した過程を経る。石灰化病変は平滑筋細胞、間質細胞などが老化や炎症を含む様々な刺激により骨芽細胞様、軟骨芽細胞様に形質転換することによると考えられている。抗凝固剤であるワーファリンはビタミン K 依存性のマトリクスグラ蛋白(MGP)の不活性化などを介して石灰化を促進することが臨床的にも副作用として報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、平滑筋細胞や間質細胞といった細胞種を起点とした従来の石灰化病態形成の概念を拡張させ、神経堤細胞を含めた発生学的起源や領域の多様性に基づく病態形成メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、分化段階を調整するエンハンサーを胎生期と病態形成期で比較解析を行うことで遺伝子発現制御の点にも着目する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と石灰化病態モデル

マウス: DBA2/N 系統、*Wnt1-Cre; R26-EYFP* マウス(神経堤細胞を標識)、*Is1-Cre; R26-EYFP*(二次心臓領域由来細胞を標識)を用いて、ビタミン K2 欠乏(K1 含有)+ワーファリン含有飼料(石灰化誘導群)あるいはビタミン K2 欠乏(K1 含有)飼料(対照群)にて飼育した。

(2) 組織染色

成体マウス心臓の凍結組織標本を作成し、アリザリンレッド染色により石灰化領域を特定した。さらに EYFP, SM22, CD31 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により観察した。

(3) in silico 解析

シングルセル ATAC-seq データから転写因子と標的遺伝子の間のエンハンサー様候補領域を同定する CARTA アルゴリズムを開発し、胎生期の心臓を用いたシングルセルマルチオーム RNA/ATAC-seq データ、ヒト冠動脈の動脈硬化検体を用いたシングルセル ATAC-seq データに適用した。

(4) Luciferase Assay

In silico 解析により同定したエンハンサー様領域に対し、神経堤細胞株である 09-1 細胞を用いた Luciferase Assay によりエンハンサー活性を測定した。

4. 研究成果

ワーファリンを用いた石灰化病態モデルマウスにより石灰化病変形成までの時空間的な組織学的解析を行った。その結果、アリザリンレッドで染色される石灰化病変が大動脈外膜から生じ始め、徐々にその領域が拡大すること、それに伴って血管平滑筋マーカーが本来と異なった配向性を示すことが明らかとなった。さらに、神経堤細胞を標識する *Wnt1-Cre; R26-EYFP* マウス、二次心臓領域由来細胞を標識する *Is11-Cre; R26-EYFP* マウスなどの遺伝子改変マウスに石灰化病態を誘導することで各起源の石灰化への寄与が示唆された。特に冠動脈平滑筋に生じる石灰化病変はある発生学的細胞起源の分布と類似したパターンを持つことが示唆された。また、in silico 解析ではシングルセル ATAC-seq データから任意の転写因子と標的遺伝子の間のエンハンサー様候補を同定する CARTA アルゴリズムを開発した。そこで、*Wnt1-Cre; R26-EYFP* マウス胚の心臓を用いたシングルセルマルチオーム RNA/ATAC-seq データに CARTA を適用した結果、平滑筋細胞と非筋間葉系細胞を区別するマーカー遺伝子とそのエンハンサー、特に軟骨形成に重要な役割を果たす Sox9 のエンハンサー様領域を同定した。この結果を実験的に検証するために神経堤細胞株である 09-1 細胞を用いて、同エンハンサー様領域を用いて Luciferase Assay を実施したところエンハンサー活性を認めた。さらに CARTA で同定した転写因子の結合モチーフを欠損させたエンハンサー様領域では、その Luciferase 活性が減少していることから CARTA で同定した転写因子-エンハンサーの関係が実験的にも示唆された。さらに公共のヒト冠動脈硬化検体のシングルセル ATAC-seq データを解析するとマウスの同エンハンサーと相同な領域がヒト冠動脈石灰化病変検体でも関与していることが示唆された。以上の成果は細胞起源に着目した発

生物学を主軸にした遺伝子発現制御の観点から病態形成メカニズム解明の基盤となるものである。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Yusuke, Wang Yunce, Tanaka Yuki, Iwase Akiyasu, Kawamura Teruhisa, Saga Yumiko, Yashiro Kenta, Kurihara Hiroki, Nakagawa Osamu	4. 巻 120
2. 論文標題 Hey2 enhancer activity defines unipotent progenitors for left ventricular cardiomyocytes in juxta-cardiac field of early mouse embryo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2307658120	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kurihara Yukiko, Ekimoto Toru, Gordon Christopher T., Uchijima Yasunobu, Sugiyama Ryo, Kitazawa Taro, Iwase Akiyasu, Kotani Risa, Asai Rieko, Pingault V?ronique, Ikeguchi Mitsunori, Amiel Jeanne, Kurihara Hiroki	4. 巻 133
2. 論文標題 Mandibulofacial dysostosis with alopecia results from ETAR gain-of-function mutations via allosteric effects on ligand binding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI1151536	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 Liu Norika, Kawahira Naofumi, Nakashima Yasuhiro, Nakano Haruko, Iwase Akiyasu, Uchijima Yasunobu, Wang Mei, Wu Sean M., Minamisawa Susumu, Kurihara Hiroki, Nakano Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Notch and retinoic acid signals regulate macrophage formation from endocardium downstream of Nkx2-5	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-41039-6	査読の有無 有
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14件（うち招待講演 8件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明系, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興相貴英, 宿南知佐, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 マルチモーダル情報による心臓内神経堤細胞の分化運命決定メカニズムの解析
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興相貴英, 宿南知佐, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクスと空間トランスクリプトームデータから紐解く心臓 神経堤細胞の分化多様性制御機構
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興相貴英, 宿南知佐, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 マルチモーダル解析から紐解く心臓神経堤細胞系譜の多様性と遺伝子制御ネットワーク
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akiyasu Iwase, Yasunobu Uchijima, Daiki Seya, Mayuko Kida, Hiroki Higashiyama, Kazuhiro Matsui, Akashi Taguchi, Shogo Yamamoto, Shiro Fukuda, Seitaro Nomura, Takahide Kohro, Chisa Shukunami, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Yukiko Kurihara, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara
2. 発表標題 Single-cell multi-omics analysis of fate determination during cardiac development
3. 学会等名 第6回日本循環器学会基礎フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興相貴英, 宿南知佐, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクスで明らかにする心臓神経堤細胞の血管/非血管細胞への分化運命決定様式
3. 学会等名 第30回日本血管生物医学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興相貴英, 宿南知佐, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクス及び空間トランスクリプトームによる心臓内多細胞連環解析
3. 学会等名 第21回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興相貴英, 宿南知佐, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクス及び空間発現情報に基づく心臓神経堤細胞の分化運命決定機構解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 来田真友子, 内島泰信, 田口明糸, 加藤洋人, 関真秀, 石川俊平, 鈴木穰, 和田洋一郎, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 縦隔内マクロファージの多様性を生み出す分化制御機構の解析
3. 学会等名 2023年度「先進ゲノム支援」拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬晃康
2. 発表標題 データ構造から理解するシングルセル遺伝子発現/ゲノムアクセシビリティ解析法 公共データを心臓血管発生研究に活かす
3. 学会等名 第22回日本心臓血管発生研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興梠貴英, 宿南知佐, 秋山治彦, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクスを用いた心血管発生学と病態形成の共通性
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興梠貴英, 宿南知佐, 秋山治彦, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクスを用いた多細胞連関による心血管システム構築
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akiyasu Iwase
2. 発表標題 Single-cell multi-omics analysis of fate determination mechanisms during cardiac development
3. 学会等名 Korea-Japan Blood and Vessel Symposium in Kumamoto (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬晃康, 内島泰信, 瀬谷大貴, 来田真友子, 東山大毅, 松居一悠, 田口明糸, 山本尚吾, 福田史朗, 野村征太郎, 興梠貴英, 宿南知佐, 秋山治彦, 関真秀, 鈴木穰, 和田洋一郎, 油谷浩幸, 栗原由紀子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクスと空間情報に基づく心臓神経堤細胞の血管/非血管細胞への分化運命決定機構-発生学的起源から病態を考える ~
3. 学会等名 第55回日本動脈硬化学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akiyasu Iwase, Yasunobu Uchijima, Daiki Seya, Mayuko Kida, Hiroki Higashiyama, Kazuhiro Matsui, Akashi Taguchi, Shogo Yamamoto, Shiro Fukuda, Seitaro Nomura, Takahide Kohro, Chisa Shukunami, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Youichiro Wada, Hiroyuki Aburatani, Yukiko Kurihara, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara
2. 発表標題 Single-cell multi-omics and spatial transcriptome analyses of fate determination mechanisms during cardiac development
3. 学会等名 第22回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2023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
---------	---------