

研究終了報告書

「イメージングとオミクス解析による血管壁細胞発生の理解」

研究期間： 2019 年 10 月～2022 年 3 月

研究者： 安藤 康史

1. 研究のねらい

血管は主に管腔を形成する内皮細胞と、その周囲を取り囲み、血管構造や機能に寄与する壁細胞（血管平滑筋細胞+周皮細胞）からなる。壁細胞は組織ごとに多様な前駆細胞から派生し、段階的かつ異なる発生機構により発達する。さらに、血管は均一な性質ではなく、壁細胞は臓器特異的な性質を獲得する。しかし、特に周皮細胞に関して、その分化に関わる時空間情報や制御機構はほとんど分かっていない。その原因の一つは、壁細胞の発生を十分な時空間分解能を持って解析できる生体モデルが欠如していたことであった。そこで、申請者は蛍光タンパク質により壁細胞を可視化できる遺伝子改変ゼブラフィッシュを世界に先駆けて樹立し、ゼブラフィッシュをモデル生物とした壁細胞研究の基礎を確立してきた。

本研究課題では、独自に創出した壁細胞可視化ゼブラフィッシュを用いた生体内ライブイメージングとオミクス解析に基づいたモデリングを組み合わせ、多様な前駆細胞から段階的に進行する血管壁細胞分化の全体像とその分子制御メカニズムの解明を目指した。ゼブラフィッシュモデルの利点を活かし、高い時空間分解能を持って生体内で“前駆細胞を含む壁細胞への分化をリアルタイムで観察”し、“標的的分化状態にある壁細胞形質を1細胞レベルで解析”する。得られた時空間的壁細胞分化状態と、オミクス解析を基にしたモデリングを開始点として、段階的に進行する壁細胞分化系譜や、分化に関わる転写制御ネットワークを網羅的に解析する。さらに、これらの知見を基に不明であった壁細胞の臓器特異性の獲得機構の解明に挑戦する。

2. 研究成果

(1) 概要

単一細胞 RNA シークエンスにより発生初期の壁細胞形質を同定し、分化メカニズム解析に重要な成熟(分化)途中の壁細胞形質を得ることに成功した。解析を行った結果、壁細胞初期発生では閾値を持った周皮細胞から血管平滑筋細胞への分化とシームレスに進行または遷移状態をもつ周皮細胞が存在することが示唆された。加えて、周皮細胞から血管平滑筋細胞への分化に伴い変動する遺伝子を同定し、その役割の解析を開始した。その中から、周皮細胞から血管平滑筋細胞への分化に伴い消失する ATP 依存性カリウムチャネルを構成する *Abcc9/Kcnj8* 遺伝子に焦点を当て解析を進めた結果、本遺伝子が脳組織選択的に周皮細胞から血管平滑筋細胞への分化を正に制御することが分かった。壁細胞可視化ゼブラフィッシュを用いたイメージングや新たに樹立した遺伝子改変マウスなどを用いた解析により、ATP 依存性カリウムチャネルは膜電位依存性カルシウムチャネルを介して、周皮細胞内カルシウムイオン濃度を調節することで、血管平滑筋細胞への分化を調節することが分かった。更に脳組織選択的な血管平滑筋細胞分化調節機構として、周皮細胞の臓器間の 1) *Abcc9/Kcnj8* 遺



伝子発現差や ATP 依存性カリウムチャネル遺伝子発現差、2) 細胞内カルシウムイオン調節機構の相違が関与する可能性が示唆された。

加えて本期間に得られたオミクスデータの研究成果を背景として国際共同研究を実施し、組織特異的の周皮細胞機能を見出した。更に、イメージングを主体としたゼブラフィッシュの壁細胞発生の詳細な解析を並行して実施し、原著論文 (Ando et al., *Dev. Biol.* 2021. 筆頭かつ共同責任著者) および総説 (Ando et al., *Life*. 2021. 筆頭かつ責任著者) を報告した。

(2) 詳細

研究テーマ『発生に伴う発現遺伝子の同定と脳血管壁細胞発生様式の解析』

abcc9 プロモーター下で壁細胞が蛍光標識されるゼブラフィッシュを用いて受精後 2,3,4,6 日においてシングルセル RNA シークエンスを実施し、発生初期における脳血管を被覆する壁細胞形質を取得することが出来た。発生の早い時期では脳組織のみをサンプリングすることが困難であり、頭部全体から壁細胞の単離をする為に脳血管以外の壁細胞も含まれるが、脳血管とそれ以外の組織に由来する壁細胞は、壁細胞への運命決定直後から異なる形質を示すことが明らかになった。加えてオミクス解析から得られた脳の壁細胞集団(周皮細胞様)とその他の壁細胞で異なる発現を示す遺伝子を同定した。これにより得られたオミクスデータから脳血管選択的に壁細胞発生を追跡できるようになった。そこで次に脳血管の壁細胞のみに着目して遺伝子形質変化を基に壁細胞発生を解析した結果、壁細胞初期発生では閾値を持った周皮細胞から血管平滑筋細胞への分化(step2)とシームレスに進行または遷移状態をもつ周皮細胞が存在(step1)することが示唆された。一方で、周皮細胞および血管平滑筋細胞の発現遺伝子を見ると、成熟したそれぞれの細胞で発現すると考えられている遺伝子の発現は乏しく、6 日齢ではそれぞれの形質を獲得しつつあるものの成熟過程であることが示唆された。従って、今後は発生後期の壁細胞の発現遺伝子を明らかにし、これまで得られているデータを合わせることで段階的に進行する壁細胞分化の遺伝子発現変化とその分子制御のモデリングが可能になると期待している。

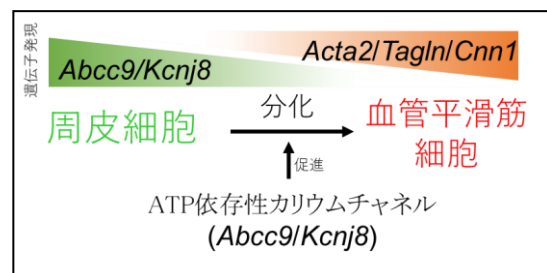
一方で、10 日胚以降の発生中期-後期の質の高いシングルセル RNA シークエンスデータを得ることは出来なかった。細胞分離方法等を検討し、シークエンス前のライブラリー調整までは上手く進行したように見える結果を得ても、実際にはほとんど発現遺伝子を検出することは出来ず、プロトコルの最適化が当初の予想より遥かに困難であった。また、周皮細胞の臓器特異性が組織環境に起因するかを明らかにする為、*snail1b* または *tbx6* プロモーター下で Cre の発現が誘導される遺伝子改変ゼブラフィッシュを樹立し、神経堤細胞・中胚葉由来壁細胞を標識可能なゼブラフィッシュラインを作成した。しかし、子孫においてそれぞれに由来する細胞が特異的に標識される個体は少なく、均質ではないことから、解析に多くの個体数を必要とする発生初期においてそれぞれに由来する壁細胞形質を解析することは出来なかった。再度、遺伝子改変ゼブラフィッシュを樹立し改善を行うとともに、匹数を必要としない成魚の実験を優先することで研究を進展させる予定であったが、上述のように発生後期ではシングルセル RNA シークエンスデータを得ることが出来ず、本期間では残念ながら進展させることが出来なかった。しかし、後述のように発生初期の解析データから、壁細胞発生に寄与する遺伝子の同定・解析を通して、脳特異的の血管平滑筋細胞分化機構の解明と、臓器特異的の制御機構を説明し得る洞察を得ることが出来た。本研究成果を背景として共同研究を実施し、共同

責任著者として論文文化を行っている。

研究テーマ『分化に伴い変動する遺伝子の同定とその役割の解析』

得られたシングルセル RNA シークエンスデータから、壁細胞分化に伴い発現変化する転写制御因子を解析し、血管平滑筋細胞への分化に伴い消失する遺伝子を見出した。今後、見出した変動遺伝子の機能解析を実施することで、壁細胞発生制御機構の解明を進める。

一方、*abcc9* は最も早期からペリサイト選択的に発現する遺伝子であることをレポーターゼブラフィッシュのイメージング解析から見出してきた。更に、これまでに得られたシングルセル RNA シークエンスデータを解析した結果、*abcc9* (*Sur2*) と複合体を形成し ATP 依存性カリウムチャネルを構成する *kcnj8* (*Kir6.1*) も同様にゼブラフィッシュにおいて発生初期から周皮細胞選択的に発現することが分かった。解析を進めたところ、ゼブラフィッシュだけではなくマウスにおいても *Abcc9/Kcnj8* 陽性の周皮細胞は脳血管が発達し血管階層性を獲得すると動脈周囲において血管平滑筋細胞へと分化することが明らかになった。一方で、血管平滑筋細胞へと分化するとこれらの遺伝子発現は消失し、周皮細胞選択的な発現になることが分かった。*Kcnj8* 欠損マウスを解析した結果、周皮細胞の密度や形態などに異常は認められないものの、脳組織選択的に血管平滑筋細胞が減少することが分かった。更に、*Kcnj8* 欠損マウス由来の脳初代培養周皮細胞では、コントロールに比べ血管平滑筋細胞分化誘導刺激による血管平滑筋細胞マーカーの発現が抑制された。一方、機能欠損マウスとは逆に、ATP 依存性カリウムチャネルの活性化を齎す *Kcnj8* または *Abcc9* の機能獲得変異体では血管平滑筋細胞の増加が認められた。上記の結果から、*Abcc9/Kcnj8* 陽性の周皮細胞は脳の血管平滑筋細胞の前駆細胞であり、その発現は血管平滑筋細胞への分化に伴い消失するものの、血管平滑筋細胞への分化を脳特異的な機構により細胞自律的に正に制御することが分かった。



3. 今後の展開

引き続き、これまで画一的に解析されてきた壁細胞の発生を丁寧により・組織・時期に分け、各要素に分解した分化過程・制御機構を再構築し、壁細胞分化の全体像を正確かつ明確に記述したい。本期間において発生後期や臓器毎のオミクスデータを得ることは出来なかったが、得られた発生初期の脳壁細胞形質情報を基にある程度の解析を進めることで、脳特異的な血管平滑筋細胞分化機構の一端を明らかにするとともに、これまで原因が分かっていた疾患背景として壁細胞発生異常が寄与する可能性が示唆された。従って、同様な手法で解析を進めることで、今後 10 年間で壁細胞発生機構の理解を推し進めるとともに、疾患背景の理解と治療戦略の開発への貢献を目指す。一方、中枢における周皮細胞から血管平滑筋細胞への分化においては血管平滑筋細胞への分化前の conditioning が重要であることを予想させる結果を得つつある。従って、これまでの遺伝子発現解析に加え、エピゲノム解析を実施することで壁細胞発生制御に対する精緻な分子制御機構の解明を目指す。

一方、遺伝的要因または加齢や生活習慣に伴った後天的要因による血管壁細胞の死滅や剥離は循環器疾患や認知症など様々な疾患の発症や増悪に寄与する。実際に、本研究期間において着目した *KCNJ8/ABCC9* 遺伝子多型や変異は壁細胞分化障害を引き起こし、これまでに原因が分かっていなかった中枢神経障害を惹起する可能性がこれまでの研究により示唆された。従って、本機構で明らかになった壁細胞発生異常と神経障害の関連をより深く明らかにするとともに、神経—血管カップリング異常を是正する方法を確立することで、これらの遺伝子異常に起因する中枢神経障害の治療や予防法の確立へと還元したい。

4. 自己評価

本期間において発生後期のオミクスデータを得ることは出来なかったが、得られた発生初期のデータを基にある程度の解析を進めることで、**脳特異的血管平滑筋細胞分化機構の一端を明らかにすることが出来た**。更に、本機構の破綻が中枢神経障害発症の背景に存在する可能性が示唆され、申請時の未来ビジョンに沿った『壁細胞発生に対する基礎的理解を健常血管を保つことによる疾患の治療や予防法の確立へと還元する』という目標の達成に向けた研究の道筋をたてることが出来た。更に、本プロジェクトの基盤となるゼブラフィッシュの壁細胞発生の制御に重要なシグナル伝達系の表現型を報告する (Ando et al., *Dev. Biol.* 2021) とともに、ゼブラフィッシュ壁細胞発生に関する総説 (Ando et al., *Life*. 2021) を報告し、自身で開拓してきたゼブラフィッシュ壁細胞領域において先導的役割を担うことが出来たと考えている。本期間では**ゼブラフィッシュに加え、世界に先駆けて壁細胞研究に有用な周皮細胞標的モデルマウスの創出に成功した**。これまでに周皮細胞を標的としたマウスにおける遺伝学的ツールの不足が、周皮細胞研究が進まないもっとも大きな弊害となっていたが、これら独自の壁細胞研究ツールを駆使することで壁細胞研究をリードしていくとともに、開発ツールも open にしており世界中に普及効果があるものと期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Koji Ando*, Yu-Huan Shih, Lwaki Ebarasi, Ann Grosse, Daneal Portman, Ayano Chiba, Kenny Mattonet, Claudia Gerrif, Didier Y.R. Stainier, Naoki Mochizuki, Shigetomo Fukuhara, Christer Betsholtz, Nathan D. Lawson. Conserved and context-dependent roles for pdgfrb signaling during zebrafish vascular mural cell development. *Dev. Biol.* 2021. Nov. Vol (479), Pages 11–22. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.06.010>

血小板由来の成長因子 β とその受容体である Pdgfrb は、周皮細胞や血管平滑筋細胞などの血管壁細胞の発生に必須の役割を果たしている。この役割がゼブラフィッシュでも保存されているかどうかを調べるために、PDGfb と PDGfrb の変異株を解析した。その結果、Pdgfrb シグナルがゼブラフィッシュの壁細胞においても必要であることが示唆された。さらに、解析したゼブラフィッシュ変異体は、循環系の欠陥による二次的な影響を受けることなく、胚の初期段階における壁細胞の決定的な研究を行うための重要なモデルとなること



を示した。

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(口演)

1. ○安藤 康史、福原 茂朋「ペリサイト選択的 ATP 感受性カリウムチャネルによる中枢特異的な血管平滑筋細胞分化制御メカニズムの解明」第 29 回日本血管生物医学学会学術集会、オンライン、2021 年 12 月 11 日
2. ○安藤 康史、福原 茂朋 演題名「Investigation of the molecular mechanism underlying mural cell specification in zebrafish」第 28 回日本血管生物医学学会学術集会、オンライン、2021 年 3 月 12 日