

## 血管内皮細胞の心筋虚血による特性変化と時相に応じた成熟化制御

横山真隆

千葉大学 大学院医学研究院

## 【研究の背景】

形質転換による間葉系細胞化は、上皮細胞における Epithelial to Mesenchymal transition: EMT が古くからある概念である。発生や線維化に関わる現象とされる一方、がん転移における migration の役割が新たな治療ターゲットとして注目されている。Endothelial to mesenchymal transition (EndMT)は血管内皮細胞における同様の形質転換であるが、発生段階における弁形成に関わるほかは十分な意味づけは不明であった。しかし最近、fate mapping の手法から心筋虚血部位の新生血管の Clonality が示され、虚血急性期に一過性に EndMT 変化が起こることが scRNAseq 解析から分かった。ただその現象が担う血管新生の意義は明らかになっていない。

申請者はこれまで血管内皮細胞のストレス応答性について研究を行い、特に転写因子 p53 の活性化がインスリン抵抗性・肥満の悪化を惹起していることを明らかにした。一方で同分子が血管肉腫においても防御的な役割を果たしており、そのノックアウト(KO)により腫瘍形成ならびに血栓・溶血を誘導することも見出した。さらに p53 が上皮細胞の間葉移行”EMT”を抑えがん抑制に関わることは知られていたが、p53KO が血管内皮細胞においても EndMT を促進させることを確認した。

## 【目 的】

本研究では虚血性変化による血管内皮細胞の変化を Lineage Tracing モデルで解析し、特に内皮間葉移行 EndMTが担う血管新生と血管成熟化の制御を明らかにする。申請者らが見出した p53-EndMT 連関が心筋虚血に対する新しい治療アプローチにならないか、その基盤的検証を目的とする。

## 【方 法】

loxP-stop-loxP-tdTomato と血管内皮細胞特異的 Cre マウス(Cdh5Cre<sup>ERT2</sup>)の交配にて血管内皮細胞 Lineage tracing マウスを作成し、flox p53 マウスと交配することで、**p53<sup>BCKO</sup>-tdTomato<sup>BC</sup>** マウスを樹立する。これより血管内皮細胞を単離し、EndMT 亢進について確認する。次に心筋虚血前後の血管内皮細胞を単離し、心筋虚血急性期において、tdTomato ラベルされた血管内皮細胞を虚血領域・非虚血領域で比較する。さらに、梗塞巣から血管内皮細胞を単離し急性期に見られる EndMT 遺伝子の発現を評価するとともに、遠隔期の血管成熟に影響しないか評価する。

## 【結 果】

- ① **p53<sup>BCKO</sup>-tdTomato<sup>BC</sup>** マウスから心臓血管内皮細胞を単離し、血管内皮培養を行った。その結果、経時的に認められる血管内皮細胞マーカーの消失が、p53KO において加速されることが確認できた。また、RNAseq にて遺伝子発現を確認したところ、Acta2/Snai2/Twist などの EndMT マーカーの上昇が確認された(図 1)。

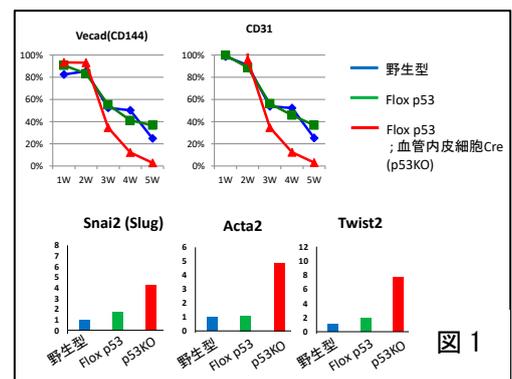
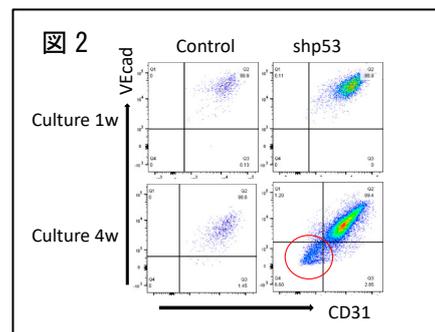


図 1

- ② p53<sup>ECKO</sup>-tdTomato<sup>EC</sup> マウスに心筋梗塞モデルを作成し血管内皮細胞の分布を共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、血流を識別したデキストランとの共染色にて、血流を含まない血管内皮細胞の分布が p53KO において増加していることが明らかとなった。
- ③ EdU 染色を用いて、血管内皮細胞の細胞分裂を評価した。心筋梗塞直後からタイムコースを折ったところ、梗塞後急性期に血管内皮細胞の分裂促進が見られるが、その割合に関して p53KO は寄与していなかった。
- ④ p53KO による血管内皮細胞マーカーの消失が primary culture に特異的でないことを確認するために、培養血管内皮細胞 HUVEC に shRNA を用いて p53 をノックダウンする実験系で確認したところ、血管内皮細胞マーカーの消失が同様に確認された(図 2)。



## 【考 察】

p53 が EMT(上皮細胞)を抑えがん抑制に関わることは知られていたが、同様の分子発現が p53KO により血管内皮細胞でも見られることを確認できた。組織傷害時に起こる血管内皮細胞の形質変化は分化・機能の細分化とは正反対に、血管としての Identity を喪失する分子発現が活性化される。これが間葉系細胞への転換を引き起こす EndMT と言われる現象であるが、実は細胞の Migration を手助けし細胞の可塑性を獲得する働きの可能性がある。さらにこのような分子発現は回復期には漸減することから、心臓血管としての成熟化するタイミングには消失するものと考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで、虚血ストレスが血管内皮細胞 p53 の活性化を惹起するものの、その抑制は心臓傷害モデルにおける有用性に両面的な報告がされていた。本提案のように p53-EndMT axis が持つ意味が傷害早期と回復期に異なるとすれば、今後心筋梗塞後の血管新生に対して新たな治療戦略になりうると考えられる。

## 【参考・引用文献】

1. **Yokoyama M**, Shimizu I, Nagasawa A, Yoshida Y, Katsuomi G, Wakasugi T, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, Ota Y, Okada S, Fruttiger M, Kobayashi Y, Tsuchida M, Kubota Y, Minamino T. p53 plays a crucial role in endothelial dysfunction associated with hyperglycemia and ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2019, 129:105-117
2. **Yokoyama M**, Okada S, Nakagomi A, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Yoshida Y, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Fruttiger M, Lozano G, Minamino T. Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity. *Cell Rep.* 7(5):1691-703. 2014
3. Yosif Manavski, Tina Lucas, Simone F Glaser, Lena Dorsheimer, Stefan Günther, Thomas Braun, Michael A Rieger, Andreas M Zeiher, Reinier A Boon, Stefanie Dimmeler Clonal Expansion of Endothelial Cells Contributes to Ischemia-Induced Neovascularization *Circ Res.* 2018 Mar 2;122(5):670-677.
4. Ziwen Li, Emmanouil G Solomonidis, Marco Meloni, Richard S Taylor, Rodger Duffin, Ross Dobie, Marlene S Magalhaes, Beth E P Henderson, Pieter A Louwe, Gabriela D'Amico, Kairbaan M Hodivala-Dilke, Ajay M Shah, Nicholas L Mills, Benjamin D Simons, Gillian A Gray, Neil C Henderson, Andrew H Baker, Mairi Brittan Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction *European Heart Journal*, Volume 40, Issue 30, 7 August 2019, Pages 2507-2520
5. Chang-Lung Lee, Everett J Moding, Kyle C Cuneo, Yifan Li, Julie M Sullivan, Lan Mao, Iman Washington, Laura B Jeffords, Rafaela C Rodrigues, Yan Ma, Shiva Das, Christopher D Kontos, Yongbaek Kim, Howard A Rockman, David G

Kirsch p53 functions in endothelial cells to prevent radiation-induced myocardial injury in mice Sci Signal. 2012 Jul 24;5(234):ra52.

6. Rajnikanth Gogiraju , Xingbo Xu , Magdalena L Bochenek , Julia H Steinbrecher , Stephan E Lehnart , Philip Wenzel , Michael Kessel , Elisabeth M Zeisberg , Matthias Dobbelstein , Katrin Schäfer Endothelial p53 deletion improves angiogenesis and prevents cardiac fibrosis and heart failure induced by pressure overload in mice J Am Heart Assoc. 2015 Feb 24;4(2):e001770.