

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 6 年 4 月 30 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 熊本大学
職 名 教授
研究代表者 南 敬

下記のとおり令和5年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:22001)

1. 共同研究課題名	ダウン症・動脈硬化病態モデルを用いた <i>in vivo</i> 血管エピゲノム動態解析		
2. 共同研究目的	早期老化病態を呈す典型的な複合疾病であるダウン症は、血管系では逆に加齢生活習慣病に対し強い抵抗性を有する。申請者らはこれまで発生から老化までの表現型を模倣するダウン症モデルマウスをもとに、加齢時間軸での非線形的事象を解明してきた。本知見はダウン症以外の肥満・生活習慣病対策にも有用であるが、更に代謝病態学の観点からも本共同研究を通じ、クロマチン・エピゲノムレベルでのシステム解明が必須である。そこでこれら疾患モデルマウスを基に肝臓・循環器血管での内皮エピゲノム動態を、本研究所が独自に開発した CUT&Tag 技術を駆使して包括的に捉え、世界的にもユニークな <i>in vivo</i> マッピングを共同で進めることを目的とする。		
3. 共同研究期間	令和5年4月1日 ~ 令和6年3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担
(研究代表者) 南 敬	生命資源研究支援センター	教授	研究の総括 連携責任者、社会発信
(分担研究者) 亀井 竣輔 (2023.10 まで)	大学院先導機構	助教	エピゲノム関連実験・解析
舟崎慎太郎 2024.3 より参画	生命資源研究支援センター	テニュアトラック助教	エピゲノム関連実験・内皮分取
堀川拓馬	生命資源研究支援センター	学生(学部4年)	CUT& Tag 実践
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	代謝エピジェネティクス	氏 名 稲垣 毅

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

マウスから内皮を単離する場合、コラゲナーゼ処理を必要とするが、その後 FACS ソートでの時間調整が長引くと大半の内皮細胞が本来の臓器内皮でのエピゲノム情報を失うだけでなく、anoixis よりアポトーシス関連の遺伝子発現も誘導される懸念がある。そこでまずは MACS 技術をもとに臓器内皮を culture することでコラゲナーゼ処理後の生存細胞のみを選択し、内皮特異的な CD31 抗体, ICAM2 抗体をもとに2次、3次セレクションを行う事で、完全なマウス由来の内皮細胞を取得する。前年度より、内皮細胞株である MS1 細胞での CUT & Tag は有意なシグナルが得られているので、次に正常内皮細胞としての HUVEC 及びマウス各臓器由来内皮細胞よりヒストン特異的の抗体を用いた CUT & Tag を行う。

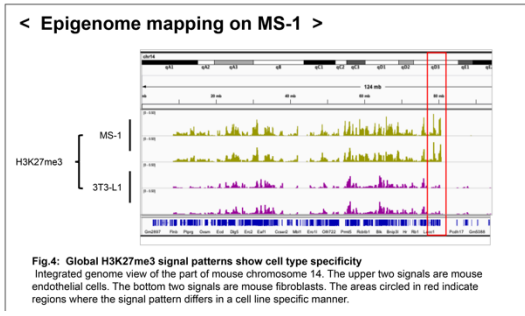
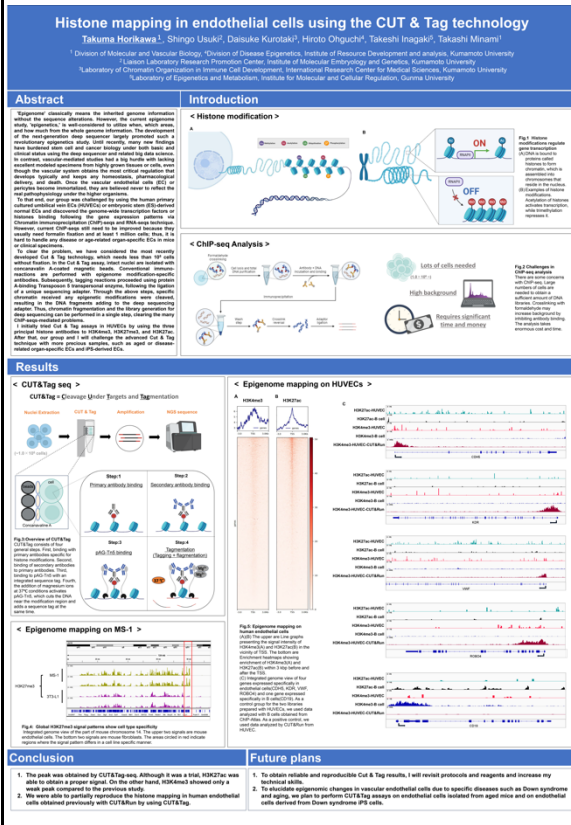
次に熊大 CARD にて維持している Ptip 内皮特異的 Conditional ノックアウトマウスをもとに CUT&Tag シーケンスを行い、今度は肝臓・心臓血管内皮細胞におけるどの遺伝子群が Ptip 依存性の H3K4me3 濃縮に影響を与えるのか解析する。臓器内皮での mRNA 発現とエピゲノム修飾と比較する際、必要に応じ、10x Genomics 技術を基本とするシングルセルシーケンスを行う計画である。遺伝子改変モデルマウスでの解析や実験は基本的に熊大内で実施し、比較する WT コントロールでのデータ取得と全体的な CUT&Tag 技術を習得するために生体調節研究所に1回/年程度伺う計画である。

7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

稲垣教授との情報交換において、CUT & Tag で用いる Concanavalin A beads がこれまで多用されてきた EpiCypher 社に比べ、SIGMA 社のデオチン化 Concanavalin A に疎水性表面をもつストレプトアビジンを conjugate した beads において安定性が高いことを知り、その有効性を確認した。昨年度の内皮細胞株 MS1 でのデータに加え、新規に Concanavalin A beads を改良した手法にてヒト内皮 primary 細胞として HUVEC を用い、H3K27Ac, H3K4me3 抗体での CUT & Tag データを試行的に検討した(堀川、稲垣、南-卒論発表 2024.3.1)。当研究室で過去行った CUT & Run での H3K4me3 抗体でのデータに比べ、SN 比が悪く、細胞数の最適化など問題点や改良すべきポイントを考慮しているところである。次に本来の目的であるマウス臓器由来内皮細胞に移行する目的で、マウス

肺からの内皮単離と培養法を抗 CD31 magnetic beads を用いた MACS 法により確立した。肺以外の臓器、心臓、肝臓、脳についてはコラゲナーゼの種類や量を最適化することで、培養手法を確立している段階である。



8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り

記載してください。なお, 論文の場合は, PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)

1. 第45回日本血栓止血学会(北九州国際会議場)

発表日:2023年6月16日

発表形式:招聘講演

発表者:南 敬

演題:New global epigenome analysis approaching the anti-vascular disease ways

2. 第55回日本動脈硬化学会(ライトキューブ宇都宮/栃木)

発表日:2023年7月8日

発表形式:招聘講演

発表者:南 敬

演題:ダウン症トリソミー因子(DSCR-1,ERG)を介した血管恒常性維持、癌・動脈硬化抵抗性の分子基盤解析

3. 第96回日本生化学会(福岡マリンメッセ)

発表日:2023年11月1日

発表形式:セミナー座長及びシンポジスト

発表者:南 敬

演題:内皮分化及び活性化を制御するエピジェネティクスの最前線

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

1, HUVEC にて先ず H3K4me3 抗体を基に CUT & Tag 予備実験を行い、その時のクロマチンの収量及び Tape Station のデータを稲垣研究室にメールにて送付した。

2, 本データをもとに稲垣教授、小松講師との相談を行い、シークエンスにかけてみる事に対する留意点など相談した。

3, CUT & Tag データ(予備実験)をもとに、当研究室の4年生が卒業論文ポスター発表を行った。

次の実績がありましたら提出願います。

1. 共同研究に関連した受賞がありましたらご記載ください。

受賞者氏名	賞名	受賞年月	受賞対象の研究課題名

2. 共同研究に関連した博士学位の取得がありましたらご記載ください。

年度	氏名	大学・研究科名

3. 共同研究が大型プロジェクトの発案, 大型プロジェクトの運営, 継続, ネットワークの構築等に役だったことがありましたらご記載ください。

CUT & Tag など少量細胞からのエピゲノム-ヒストン修飾レベルの解析が有効であることから、加齢血管のエピゲノム変化を解析するのに今後用いることの有用性が AMED-CREST 老化でのグループ研究において認識された。

共同研究活動が発展して獲得に至った大型競争的資金の情報を記載ください。

プロジェクト名	期間	受入金額 千円	支出機関 (例: 文科省)	プロジェクトの概要

4. 申請代表者及び分担研究者が入会している学会及び役職/学会賞などをご記載ください。

研究者氏名	学会名	役職/学会賞など
南 敬	日本血管生物医学会	理事、評議員
同上	日本生化学会	評議員
同上	日本薬学会	生物部会世話人(理事)
舟崎慎太郎	日本癌学会	若手ポスター賞

日本内分泌学会, 日本肥満学会, 日本糖尿病学会, 日本エピジェネティクス研究会など。

研究代表者名: 南 敬