

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 7 年 4 月30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 熊本大学生命資源研究支援センター
職 名 教授
研究代表者 南 敬

下記のとおり令和6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。昨年度は本共同研究にて Cut&Tag 法の検討を更に加え、内皮研究において欠かせない HUVEC 細胞にて安定したエピゲノムデータを得る技術を安定化することに成功した。そこで本手法を基に、疾患モデルマウスの肝臓・循環器血管での内皮エピゲノム動態を、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6年4月1日 ~ 令和7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	熊本大学生命資源研究支援センター		教授		研究の総括 内皮研究総括責任
(分担研究者) 舟崎 慎太郎	熊本大学生命資源研究支援センター		助教		エピゲノム関連実験・解析
黒滝 大翼	熊本大学 IRCMS		特任准教授		ゲノムデータ精度比較
堀川 拓馬	熊本大学大学院生命科学研究部		大学院生 (M1)		CUT & Tag 実験遂行
三木 日菜子	熊本大学大学院生命科学研究部		大学院生 (M1)		疾患モデルマウス維持・解析
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

ダウン症は早期アルツハイマー病、骨粗鬆症を含め典型的な早期加齢病態を呈す複合疾病であるが、血管系では非線形的に抗炎症作用を獲得し、加齢疾患進展に強い抵抗性を有する。申請代表南らがヒト疾患解析用に最適化したダウン症モデルマウスや患者由来 iPS 細胞、更にその分化内皮においても、ヒトでの疫学データ同様、抗炎症作用を有する遺伝子が高発現する。表現型としては、加齢に伴う高血圧や動脈硬化病変は全く進行せず、更に抗血管新生能を獲得することで固形がん増殖にも抵抗性を示すことが明らかとなった。これらの知見は代謝制御学の観点からダウン症以外の肥満・生活習慣病対策にも極めて有用である一方、分子・エピゲノムレベルでの更なるシステム解明が創薬の観点から必要不可欠である。更にダウン症因子と相関するエピゲノム修飾因子 PTIP が脂肪細胞分化 (*Cell Met.* 2009) のみならず、発生後の血管新生に不可欠であることも明らかにした (*Cell Rep.* 2022)。そこでこれらモデルマウスでの肝血管・循環器血管に特化し、そのエピゲノム動態を共同研究として CUT & Tag 手法を中心に進めることを目的とする。

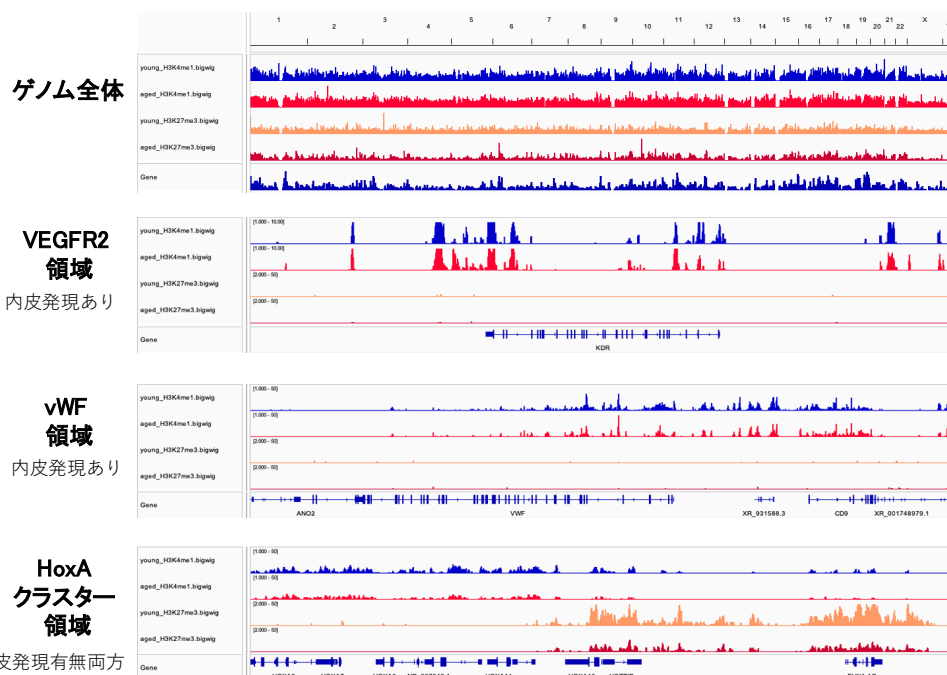
7. 共同研究の成果

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。

これまでマウス培養内皮細胞 MS1 にて H3K27me3 ヒストン修飾の全体像が CUT & Tag 法にて得られることを共同研究にて確認している。更に、Concanavalin ビーズの不安定性を改善した protocol (Fujiwara Y et al. PlosOne2021)を参考に今度は正常ヒト培養内皮細胞 HUVEC にて 1×10^4 の細胞数にて安定的に H3K4me1, H3K27me3, H3K4me3 の濃縮フラグメントが得られることを昨年度までに確認した。そこで、今回、HUVEC の若齢と replicative senescence を迎えた(加齢) HUVEC を基に、CUT & Tag-seq と RNA-seq を行った。成果の一部を 2025 年 3 月の日本薬学会にて稲垣教授との共著にて報告した。但し、H3K4me1 と H3K27me3 に関しては安定的にデータ取得できること(マッピング率 90% 以上)が確認できた一方、H3K4me3 と H3K27Ac 抗体では primer-dimer 含め PCR 増幅で得られる配列にてヒトゲノム hg38 にて mapping できた比率が 40% 未満となった。問題解決においては抗体の種類、PCR サイクル含め、かなりの試行錯誤が必要と思われる。

マウスの内皮細胞単離・培養においては、若齢であれば心臓、肺、肝臓より安定的にできているが、最終的な内皮細胞数が 10^6 を超えることは難しい。従って、CUT & Tag で有効なヒストン抗体ではそれを優先し、H3K4me3 や H3K27Ac に関しては、既存の ChIP-seq 手法をもとに細胞数を下げたときにどの程度まで信頼率の高いデータが得られるか、あるいは CUT & Tag と前半までは共通の作業で共有可能な CUT & Run の手法を取り込み行うか、現在その調整を HUVEC や MS1 をコントロールとして行っている段階である。

以下に CUT & Tag 後、sequence したデータの一例を示す。



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, 日本薬学会、2025年3月28 日, ダウン症モデル内皮細胞を用いた包括的なエピゲノム制御解析基盤の開発

2. 日本薬学会、2025年3月29 日, 新生血管内皮特異的な新規遺伝子 DESM の包括的な発現制御機構解析

3. 国際血管生物学会、2024 年7月2日 アムステルダム、Epigenomic dynamic landscape in VEGF-stimulated endothelial cells

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, 2024 年4月 メールにて小松先生の取得したデータ (H3K4me3 を含む)を送って貰った

2, 2024年6月10日、メールにて H3K4me3 抗体や二次抗体の情報の供与願いを行った。

3, 2024 年12月8日、メールにて稲垣先生と今後の計画について相談した。