

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09411

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた脂肪細胞分化・機能に及ぼすヒトPAI-1の役割

研究課題名(英文) The intrinsic roles of human PAI-1 in adipocyte differentiation and function with using patient-derived iPS cells.

研究代表者

佐野 秀人 (Sano, Hideto)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80623842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、PAI-1欠損患者よりiPS細胞を樹立し(PAI-1 iPS)、成熟細胞に分化させ、ヒトPAI-1の本質的な役割を解析してきた。PAI-1 iPSから脂肪細胞分化を試みてきた。間葉系幹細胞(MSC)様の細胞は確認できたが、効率の良い脂肪分化の系を探索中である。一方で既に樹立しているiPS細胞由来内皮細胞(iPS-EC)の遺伝子発現解析では、IGFBP3/5等の脂肪細胞分化に関与する分泌蛋白遺伝子の発現変化が観察された。現在、このiPS-ECと、上記MSC様あるいは脂肪細胞前駆細胞株などと共培養させ、脂肪細胞分化への影響を観察している。

研究成果の概要(英文)：We have generated iPS cells (PAI-1 iPS) from PAI-1 deficient patients, then differentiated them into mature cells, and analyzed the intrinsic function of human PAI-1. We have attempted adipocyte differentiation from PAI-1 iPS. Mesenchymal stem cell (MSC) - like cells could be detected, but we are still inquiring into efficient condition of adipocyte differentiation. On the other hand, in the gene expression analysis of iPS cell-derived endothelial cells (iPS-ECs) which are already established, we observed the expression of hormone-like protein genes that involved in adipocyte differentiation such as IGFBP 3 and 5. Currently, this iPS-ECs are co-cultured with the above MSC-like or adipocyte precursor cell line such as 3T3-L1 cells, and confirmed PAI-1 functions and the effects on adipocyte differentiation.

研究分野：細胞生理学

キーワード：PAI-1 adipocytes endothelial cells iPS cells

1. 研究開始当初の背景

血管内で線維素溶解活性を制御する

Plaminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) は、メタボリック症候群で血中濃度が上昇し血栓症のリスクを高めることから、血栓症発症の原因分子として注目されている。我々は世界第2、3例目の PAI-1 欠損症例を報告してきた。本症例の発現型は月経時の致死的大出血と創傷治癒遅延であった。これらの表現型は PAI-1 遺伝子欠損マウスとも大きく異なっており、動物モデルの限界を示唆すると共に PAI-1 のヒトにおける生理機能の見直しを迫る重要な症例と位置づけられる。

真のヒト PAI-1 機能の解明のためにも、また PAI-1 欠損症治療の開発のためにも、マウスモデルのみでなくヒトの細胞による解析も必要であり、早急に行われるべき課題であった。

そこで我々は、PAI-1欠損症患者よりiPS細胞を樹立し、成熟細胞へ分化させ解析するという手法をとった。血管内線溶を制御するPAI-1機能解析ということで、まずは血管内皮細胞へ分化させ、細胞機能をコントロールiPS細胞から分化させた内皮細胞と比較検討を行ってきた。細胞接着・遊走能、遺伝子発現の相違等を発表してきた。

2. 研究の目的

血管内皮細胞機能解析の結果より、ヒト PAI-1 の血管新生能への関与が示唆された。一方で PAI-1 は、脂肪細胞で発現しており、アディポサイトカインの一つとして注目されている。また、脂肪細胞分化への関与も指摘されている。PAI-1 欠損マウスでは、野生型マウスに比べ若干肥満傾向にあるが、ヒト PAI-1 欠損患者ではそのような表現系は観察されていない。以上より、ヒト PAI-1 の生理的な脂肪細胞での機能及び、白色・褐色・ベージュといった種々の脂肪細胞分化への PAI-1 の関与について検証を行うため、PAI-1 欠損 iPS 細胞から脂肪細胞へ分化させ、機能解析することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

既に樹立済みの PAI-1 欠損患者由来 iPS

細胞及びコントロール iPS 細胞を用い、既知の方法で白色・褐色脂肪細胞分化を行った。また、他の成熟細胞あるいは幹細胞・前駆細胞との共培養を行い、それぞれの細胞動態の観察を行った。

4. 研究成果

コントロール iPS 細胞及び PAI-1 欠損患者由来 iPS 細胞を、Nishio らの方法 (Methods Enzymol 2014, Cell Metab 2012)、Mohsen-Kansen らの方法 (Stem Cells 2014) さらには Hafner らの方法 (Scientific Reports 2016)、Xiong らの方法 (Aging 2013) などを参考に、脂肪細胞への分化を試みてきた。間葉系幹細胞様の細胞への分化は認められたが、脂肪滴を有する脂肪細胞への分化までは確認できず、至適条件の検討を継続している。

一方で、脂肪細胞と共培養にて細胞間相互作用の確認を行う予定であった iPS 細胞由来血管内皮細胞への分化は確立されており、増殖・遊走等の細胞動態の検討を行った。細胞増殖については、コントロールとの差は認められず、遊走能については顕著に PAI-1 欠損内皮細胞において促進された。この細胞遊走促進作用は、VEGF 非依存的であった。管腔形成アッセイでは未熟な血管形成が観察され、血管発芽アッセイではコントロールに比べ短い発芽が大量に確認された。これらの結果は全般的に、血管新生が未熟であることを示唆したものであり、PAI-1 欠損患者の創傷治癒の遅延の一つの原因ではないかと考えている (投稿準備中)。

また、血管内皮細胞のマイクロアレイによる遺伝子変異の探索の結果、脂肪細胞代謝・分化に関連の深い遺伝子変化が検出された。代謝に関しては ATP 合成酵素や NADH dehydrogenase などミトコンドリアでのエネルギー産生や電子伝達系に関する遺伝子発現の変化が見られた。また、脂肪細胞分化に必須である Insulin に関して IGFBP3、5、7 のそれぞれの遺伝子が PAI-1 欠損内皮細胞で顕著な発現減少

が見られており、脂肪細胞分化への関与が示唆された。現在、iPS 細胞由来内皮細胞と上記 iPS 細胞由来間葉系幹細胞あるいは 3T3-L1 のような脂肪細胞前駆細胞株との共培養により iPS 細胞由来内皮細胞から分泌される因子による脂肪細胞分化への影響を観察している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 7 件)

1. Tanaka H., Unno N., Suzuki Y., Sano H., Yata T., Urano T. : Hypoperfusion of the aortic wall secondary to degeneration of adventitial vasa vasorum causes abdominal aortic aneurysms. *Curr Drug Targets*. 2018 Jan 22. In press
doi: 10.2174/1389450119666180122154409. 査読有
2. Tanaka H., Iida Y., Iwaki T., Suzuki Y., Sano H., Miyajima C., Zaima N., Sasaki T., Sumioka A., Hakamata S., Shimizu H., Umemura K., Urano T. : Elevated Plasma Levels of LDL Cholesterol Promote Dissecting Thoracic Aortic Aneurysms in Angiotensin II-Induced Mice. *Ann Vasc Surg*. 2018 Apr;48:204-213.
doi: 10.1016/j.avsg.2017.10.006. 査読有
3. Iida Y., Tanaka H., Sano H., Suzuki Y., Shimizu H., Urano T. : Ectopic Expression of PCSK9 by Smooth Muscle Cells Contributes to Aortic Dissection. *Ann Vasc Surg*. 2018 Apr;48:195-203.
doi: 10.1016/j.avsg.2017.10.005. 査読有
4. Tanaka H., Zaima N., Sasaki T., Yamamoto N., Inuzuka K., Yata T., Iwaki T., Umemura K., Sano H., Suzuki Y., Urano T., Setou M., Unno N. : Lysophosphatidylcholine Acyltransferase-3 Expression Is Associated with Atherosclerosis Progression. *J Vasc Res*. 2017;54(4):200-208. doi: 10.1159/000473879.

査読有

5. Brzoska T., Suzuki Y., Sano H., Suzuki S., Tomczyk M., Tanaka H., Urano T. : Imaging analyses of coagulation-dependent initiation of fibrinolysis on activated platelets and its modification by thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Thromb Haemost*. 2017 Apr 3;117(4):682-690.
doi: 10.1160/TH16-09-0722. 査読有
6. Tomczyk M., Suzuki Y., Sano H., Brzoska T., Tanaka H., Urano T. : Bidirectional functions of thrombin on fibrinolysis: Evidence of thrombin-dependent enhancement of fibrinolysis provided by spontaneous plasma clot lysis. *Thromb Res*. 2016 Jul;143:28-33.
doi:10.1016/j.thromres.2016.04.018. E 査読有
7. Suzuki Y., Sano H., Tomczyk M., Brzoska T., Urano T. : Activities of wild-type and variant tissue-type plasminogen activators retained on vascular endothelial cells. *FEBS Open Bio*. 2016 Apr 1;6(5):469-76.
doi: 10.1002/2211-5463.12057. 査読有

(学会発表) (計 11 件)

1. Sano Hideto : Vascular Endothelial Cells Derived from Human PAI-1 Deficient iPS Cells Reveal Physiological Function of PAI-1 in Angiogenesis, 26th ISTH・63rd SSC, July 7-15 2017, Berlin Germany
2. 佐野 秀人 : The roles of PAI-1 in angiogenesis revealed by vascular endothelial cells derived from human PAI-1 deficient iPS cells, 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、平成 29 年 6 月 8 日 ~ 平成 29 年 6 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
3. 佐野 秀人 : PAI-1 deficient endothelial cells derived from patient specific iPS cells behave as tip-cells in angiogenesis, 第 94 回日本生理学会大会、平成 29 年 3 月 28 日 ~ 平成 29 年 3 月 30 日、浜松アクティビコ

- ングレスセンター(静岡県浜松市)
4. 佐野 秀人: Tip-cell like behavior in endothelial cells derived from human PAI-1 deficient iPS cells、第24回日本血管生物医学学会学術集会、平成28年12月8日~平成28年12月10日、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)
 5. Sano Hideto: Predominance of tip-cell like behavior in endothelial cells derived from human PAI-1 deficient iPS cells, The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop, October 17-21 2016, Shizuoka Japan
 6. 佐野 秀人: ヒト Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1)欠損内皮細胞における血管新生の異常、第21回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、平成28年8月5日~平成28年8月6日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
 7. 佐野 秀人: ヒト PAI-1 の内皮間葉移行 (EndMT) における機能について、第38回日本血栓止血学会学術集会、平成28年6月16日~平成28年6月18日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県奈良市)
 8. Sano Hideto: Functional Analysis of Inducible Pluripotent Stem Cell derived Vascular Endothelial Cells From Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficient Patients, AHA ATVB/PVD Scientific Sessions 2016, May 3-9 2016, Nashville TN
 9. 佐野 秀人: Functional analysis of Endothelial cells derived from Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficient patients、第93回日本生理学会大会、平成28年3月22日~平成28年3月24日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
 10. 佐野 秀人: PAI-1 欠損患者由来 iPS 細胞を用いた血管内皮細胞機能解析、第23回日本血管生物医学学会学術集会、平成27年12月10日~平成27年12月12日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

11. 佐野 秀人: PAI-1 欠損患者由来 iPS 細胞を用いた血管内皮細胞機能の解析、第37回日本血栓止血学会学術集会、平成27年5月21日~平成27年5月23日、甲府市総合市民会館(山梨県甲府市)

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

○出願状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 秀人(SANO, Hideto)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号:80623842

(2)研究分担者

浦野 哲盟(Urano, Tetsumei)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:50193967

鈴木 優子(Suzuki, Yuko)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号:20345812

田中 宏樹(Tanaka, Hiroki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号:50456563

