

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15520

研究課題名(和文) もやもや病患者由来iPS細胞を用いた血管平滑筋細胞の分化誘導と機能解析

研究課題名(英文) Induction of smooth muscle cells from iPS cells derived from moyamoya disease patient

研究代表者

寶金 清博(Houkin, Kiyohiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：90229146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病の病態を解析するため、もやもや病特異的iPS細胞から平滑筋細胞を分化誘導した。まず、iPS細胞から神経堤細胞を分化誘導し、それらの細胞は99%以上でp75陽性であることを確認した。それらの細胞に対して平滑筋細胞へと分化誘導を行ったが、分化誘導の途中で細胞の老化、増殖能力の低下が認められた。最終的に残った細胞に対して免疫染色を行ったところ、ほぼ全ての細胞で -SMA、SM22陽性であり、平滑筋細胞へと分化していることが示された。しかし、細胞の増殖能力低下のため、解析に必要な十分な細胞数を得ることが困難であった。今後、細胞の老化を防ぐために分化誘導方法を改良する必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathogenesis of moyamoya disease, we induced smooth muscle cells from iPS cells derived from moyamoya disease patients. First, we induced neural crest cells from iPS cells. We found more than 99% of the cells were positive for p75. Next we differentiated these neural crest cells into smooth muscle cells, however, the cells become senescent during differentiation. Although surviving cells were almost positive for -SMA and SM22, these cells could not be used for next analysis because of cell senescence. Improvement of the protocol is necessary to prevent cell senescence in the future.

研究分野：neurosurgery

キーワード：もやもや病 iPS細胞 平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

もやもや病の原因として、近年 RNF213 が感受性遺伝子として報告されたが、未だ病態の解明には至っていない。もやもや病の主病変である内頸動脈終末部の病理所見は、著明に肥厚した内膜による狭窄を呈する。そのため、血管細胞の増殖亢進などの機能異常の存在が推測されるが、これまで *in vitro*, *in vivo* において、もやもや病の疾患モデルは報告されておらず、病態解析、治療薬開発を進める上で大きな壁となっている。2008 年に山中らがヒト iPS 細胞作製の成功を報告して以来、疾患 iPS 細胞から分化誘導させた細胞を用いた病態解析が注目されている。もやもや病においても、患者由来の iPS 細胞から作成した血管内皮細胞を用いた研究が報告されている。しかし、予想に反し、もやもや病血管内皮細胞では血管形成能が低下しており、増殖能力に関しては正常血管内皮細胞と有意な差が認められていない。この結果は、臨床上観察される phenotype と明白な関連があるとは言えず、血管内皮のみを標的とした研究の限界を示唆するものと考えられる。そこで、我々は、もやもや病発症の原因として、新たに血管平滑筋細胞に注目した。もやもや病患者から作成した iPS 細胞由来の血管平滑筋細胞を解析することで、血管内皮細胞では明らかにできなかった、もやもや病の特性を解明できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

これまで、もやもや病の内膜肥厚を形成する原因として血管内皮細胞が注目され、近年ではもやもや病 iPS 由来血管内皮細胞を用いた研究が報告されている。しかし、この細胞では血管形成能が低下しており、増殖能力は正常血管内皮細胞と有意な差が認められず、内膜肥厚による血管狭窄を呈する本疾患の病型を反映しているとは言い難い。本研究では、内膜肥厚を形成する要因として新たに血管平滑筋細胞に注目する。もやもや病患者由来 iPS 細胞を血管平滑筋細胞へと分化誘導し純化した後に、増殖力、浸潤能などの解析を行い、もやもや病血管平滑筋細胞の特性を明らかにし、平滑筋細胞が新たな疾患モデルとなりうるかを検討する。

3. 研究の方法

健常者由来 iPS 細胞 3 クローン、もやもや病由来 iPS 細胞 3 クローンから血管平滑筋細胞を誘導する。iPS 細胞を collagenase により dish から剥がし、ゼラチンコートした dish へと播種し、FGF2 および ActivinA 添加培地で 24 時間培養する。その後 FGF2 および SB431542 を含む培地へと切り替え、7 日間培養する。細胞を剥がして single cell とし、PDGF-BB および TGF- β 添加培地に懸濁し、ゼラチンコートした dish に播種する。その後 11 日間ほど培養すると、血管平滑筋細胞が認められるようになる。

PDGF-BB および TGF- β 添加培地にて平滑筋細胞を増殖させる。その後、細胞増殖能、遊走能、マイクロアレイ、内皮細胞と平滑筋細胞間の paracrine regulation の解析を行う。

4. 研究成果

(1) まず、iPS 細胞から神経堤細胞の分化誘導を行った。分化誘導 8 日目にフローサイトメトリーにて p75 陽性率を測定したところ、99% 以上で陽性を示し(図 1)、高い効率で神経堤細胞への分化誘導が起こっていることが示された。

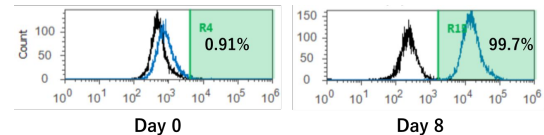


図1 フローサイトメトリーによるp75陽性率の評価

(2) 次に、神経堤細胞から平滑筋細胞への分化誘導を行った。作成した神経堤細胞に対して平滑筋細胞への分化誘導を行い、平滑筋細胞マーカーの免疫染色を行った。大部分の細胞で SMA, SM22 が陽性であり(図 2)、平滑筋細胞へと分化していることが示された。

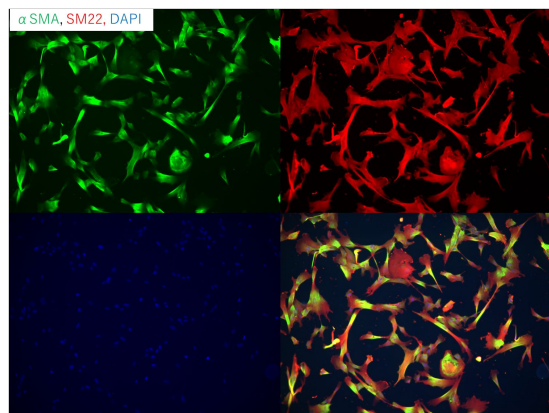


図2 作製した平滑筋細胞の免疫染色

(3) 本プロトコールにより得られた平滑筋細胞は大部分が老化現象により増殖能力を失っており、機能解析に適した細胞を得ることができなかった。

(4) 今後、老化を起こす原因を究明し、分化誘導のプロトコールを見直していく必要があると考えられた。

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 10 件)

Yuzawa S, Nishihara H, Yamaguchi S, et al. (13 名 11 番目): Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical-sequencing system., Modern

pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, Vol.29, pp.708-716、2016、査読有

Shimoda Y, Osanai T, Nakayama N, et al. (9名9番目): De novo arteriovenous malformation in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia., Journal of neurosurgery. Pediatrics, Vol.17, pp.330-335、2016、査読有

Ishi Y, Yamaguchi S, Iguchi A, et al.(10名10番目): Primary pineal rhabdomyosarcoma successfully treated by high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation: case report., Journal of neurosurgery. Pediatrics, Vol.18, pp.41-45、2016、査読有

Fujima N, Osanai T, Shimizu Y, et al.(9名8番目): Utility of noncontrast-enhanced time-resolved four-dimensional MR angiography with a vessel-selective technique for intracranial arteriovenous malformations., Journal of magnetic resonance imaging : JMRI, Vol.44, pp.834-845、2016、査読有

Yamada S, Oki K, Itoh Y, et al. (9名5番目): Effects of Surgery and Antiplatelet Therapy in Ten-Year Follow-Up from the Registry Study of Research Committee on Moyamoya Disease in Japan. Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (Moyamoya Disease)., Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association, Vol.25, pp.340-349、2016、査読有

Takahashi JC, Funaki T, Houkin K, et al. Significance of the Hemorrhagic Site for Recurrent Bleeding: Prespecified Analysis in the Japan Adult Moyamoya Trial. JAM Trial Investigators., Stroke; a journal of cerebral circulation, Vo.47, pp.37-43、2016、査読有

Hamauchi S, Seki T, Sasamori T, et al. (4名4番目): Development of a nonintermediate-incision ventriculoperitoneal shunt procedure using a nasogastric feeding tube for infant patients with hydrocephalus:

technical note., Journal of neurosurgery. Pediatrics, Vo.17, pp.540-543、2016、査読有

Takamiya S, Osanai T, Ushikoshi S, et al. (13名13番目): Efficacy of Stent-Assisted Coil Embolization for a Dissecting Aneurysm of the Cervical Internal Carotid Artery Caused by a Systemic Vascular Disease: A Case Report]., No shinkei geka. Neurological surgery, Vo.44, pp.39-45、2016、査読有

Uchino H, Kim JH, Fujima N, et al.(8名8番目): Synergistic Interactions Between Direct and Indirect Bypasses in Combined Procedures: The Significance of Indirect Bypasses in Moyamoya Disease., Neurosurgery, Vol.80, pp.201-209、2016、査読有

Seki T, Hida K, Yano S, (6名6番目): Surgical Outcomes of High-Grade Spinal Cord Gliomas., Asian spine journal, Vol.9, pp.935-941、2015、査読有

〔学会発表〕(計 3件)

竇金 清博 細胞治療の新展開 2017年3月16日~19日 第42回 日本脳卒中学会 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

七戸 秀夫 脳梗塞の細胞治療と『革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業』2017年3月7日~9日 第16回 日本再生医療学会総会 仙台国際センター(宮城県仙台市)

竇金 清博 脳梗塞の細胞治療と『革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業』2016年9月9日~9月10日 第6回レギュラトリーサイエンス学会 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)

〔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

竇金 清博 (Houkin Kiyohiro)
北海道大学・北海道大学病院・教授
研究者番号：90229146

(2) 研究分担者

中山 若樹 (Nakayama Naoki)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号：40421961

数又 研 (Kazumata Ken)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：60634144

七戸 秀夫 (Shichinohe Hideo)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号：80374479

鏡谷 武雄 (Abumiya Takeo)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：80270726