

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19622

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた自己炎症性疾患における血管炎・動脈硬化の機序解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of vasculitis and atherosclerosis in autoinflammatory disease using iPS cell

研究代表者

山村 健一郎 (Kenichiro, Yamamura)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30532858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CINCA症候群患者由来iPS細胞を用いて、血管内皮細胞(EC)や血管平滑筋細胞(VSMC)へと分化誘導する系を確立した。誘導した細胞は特徴的なマーカーを有しており、ECはtube formationやLDLの取り込み、サイトカイン産生などの機能を有していた。得られた細胞のNLRP3 inflammasomeを刺激し、Mutant type由来細胞とWild type由来細胞を比較した。しかし炎症性サイトカイン産生能力や白血球接着因子に明らかな差は認めなかった。今後は分化系の見直しと、primary細胞でのNLRP3 inflammasomeの機能を評価していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We established a system of differentiation into vascular endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) from iPS cells of patients with CINCA syndrome. Differentiated cells had discriminative markers. EC had functions of tube formation and cytokine production. We stimulated the NLRP3 inflammasome of the obtained cells with LPS and TNF (priming signal), ATP and silica(activation signal). There was no significant difference in production of the inflammatory cytokines and adhesion molecules between the differentiated cells from mutant iPS cells and wild-type iPS cells. NLRP3 expression in EC and VSMC from iPS cells was scarce compared with primary cells such as HUVEC and HASMC. Further study is needed to reevaluate the differentiation system, and to investigate the functions of the NLRP3 inflammasome in primary cells.

研究分野：小児科学

キーワード：自己炎症性疾患 動脈硬化 CINCA症候群 NLRP3 inflammasome iPS細胞 血管内皮細胞 血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患とは、発熱、関節炎などの症状を認め、特定の病原体や抗原の関与なく自然免疫系の機能亢進がみられる慢性炎症性疾患である。CINCA症候群は、乳児期早期より発症する関節症、中枢神経病変、皮疹を特徴とする重症の自己炎症症候群である。NLRP3遺伝子がコードする蛋白NLRP3(cryopyrin)の異常によるIL-1 β の過剰産生が原因であり、クリオピリン関連周期性発熱症候群の中でも最重症型とされている。

動脈硬化の病態は、血管内皮細胞機能低下、血液免疫細胞の血管内浸潤、そして血管平滑筋細胞の遊走および増殖である。慢性炎症は動脈硬化の要因であり、高脂血症などの成人における動脈硬化でもNLRP3 inflammasomeによる炎症は重要な役割を示す。慢性炎症性疾患である自己炎症疾患においても動脈硬化が報告されている。また我々は、2014年にCINCA症候群において幼少期から動脈効果の所見が見られることを報告した。

iPS細胞とは、人工的に自己複製能と3胚葉に分化可能な能力をもった細胞である。iPS細胞を用いて、病態解明や再生医療、創薬の分野で様々な研究が行われている。疾患由来のiPS細胞を作成し、疾患の特徴を反映する細胞へ分化誘導させ、細胞の分析を行うことが可能となった。iPS細胞は血管内皮や血管平滑筋細胞への分化能も保持している。

2. 研究の目的

自己炎症性疾患における血管炎および動脈硬化合併における、血管壁細胞の役割を解明する。動脈硬化における炎症は、マクロファージなど血球の活性化が主要因と考えられているが、血管内皮細胞(EC)や血管平滑筋細胞(VSMC)など血管壁を構成する細胞自体を詳細に検討した報告はない。自己炎症性疾患ではこれらの細胞もautonomousな炎症を引き起こす遺伝子変異を持っているため、動脈硬化に関与している可能性がある。

自己炎症性疾患由来iPS細胞をEC、VSMCに分化誘導し、炎症性サイトカインや mRNA の発現解析などの手法を用いて多角的に解析することで、自己炎症性疾患における血管炎・動脈硬化の機序解明に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 疾患 iPS 細胞の樹立、分化誘導

すでに作成していたCINCA 症候群、家族性地中海熱 (FMF) のiPS細胞に加え、PAPA 症候群の疾患由来 iPS 細胞を樹立する。末梢血由来の T リンパ球に、センダイウイルスを用いてOct3/4, c-Myc, Klf4, Sox2の4遺伝子を組み込み、iPS 細胞へと再プログラムする。樹立したiPS細胞をEC、VSMCに分化誘導する。

(2) 分化誘導したEC、VSMCの機能評価

分化誘導した細胞を刺激し、各種炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-18)をLEGENDplex (BioLegend)で検出、BD LSRFortessa (BD Biosciences)で測定する。また刺激による白血球接着因子(ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin)、炎症性遺伝子発現を測定し、疾患の特徴を反映しているかを確認する。

(3) 自己炎症性症候群における血管炎・動脈硬化の機序解明

2で得られたdataを元に、阻害剤や遺伝子発現を調整し、疾患における炎症・動脈硬化の機序を機能的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) 疾患 iPS 細胞の樹立、分化誘導

PAPA 症候群患者の末梢血 T リンパ球より iPS 細胞を樹立した。自己炎症性疾患の中でも最も炎症所見の強く、同一患者から健常対照細胞が得られる体細胞モザイクの CINCA 症候群を用いて、実験を継続した(図1)。

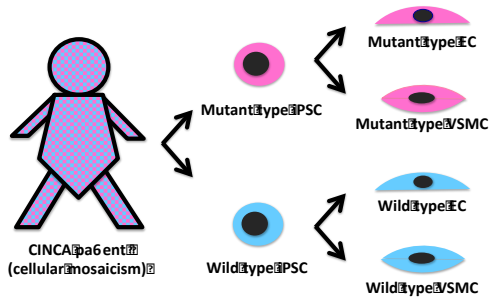


図 1. 体細胞モザイク CINCA 症候群患者から血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を作成

iPS 細胞を図 2、図 3 に示す分化系を用いて、EC および VSMC へと分化誘導する系を確立した。誘導した細胞は特徴的なマーカーを有しており、また今後の実験に十分な細胞数、純度を確保できた。

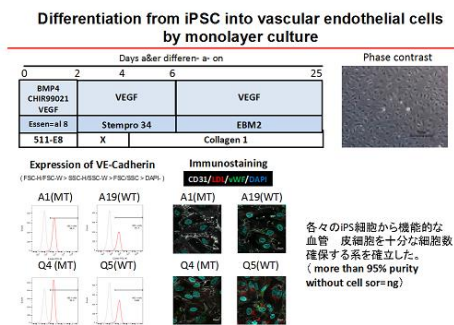


図 2. iPS 細胞から分化誘導した EC

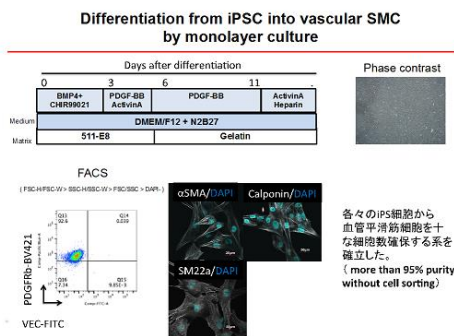


図 3. iPS 細胞から分化誘導した VSMC

(2) 分化誘導した EC、VSMC の機能評価

EC は tube formation や LDL の取り込み、サイトカイン産生などの機能を有していた (図 2)。得られた細胞の NLRP3 inflammasome

を活性化するために、LPS や $TNF\alpha$ (priming signal)、ATP や Silica (activation signal) などで刺激し、Mutant type 細胞と Wild type 細胞とを比較した。VCAM-1、ICAM-1、E-selectin、P-selectin などの白血球接着因子は、刺激に反応して発現上昇を認めたが、MT 細胞と WT 細胞で、明らかな差は認められなかった (図 4)。

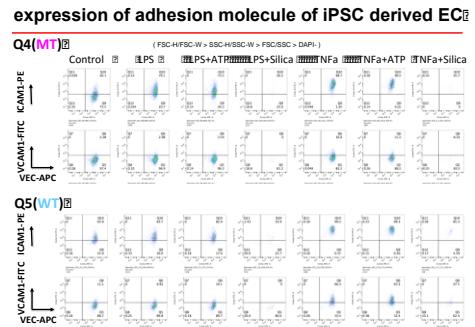


図 4. 各種刺激における iPS 細胞由来 EC の白血球接着因子発現

また炎症性サイトカイン産生能力は乏しく、IL-1 β は検出されなかった (図 5) (図 6)。

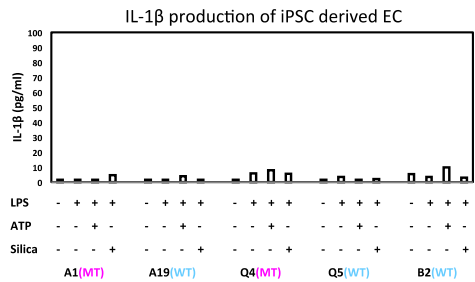


図 5. 各種刺激における iPS 細胞由来 EC の上清中 IL-1 β 産生

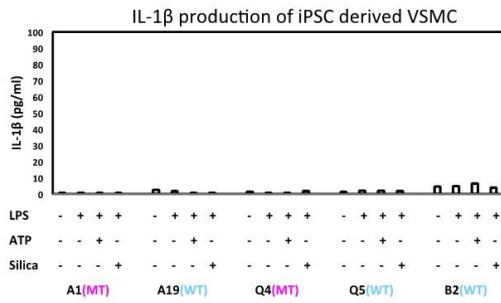


図 6. 各種刺激における iPS 細胞由来 VSMC の上清中 IL-1 β 産生

iPS 細胞由来の EC および VSMC の NLRP3 発現は、HUVEC や HASMC などの primary 細胞に比べ乏しい (mRNA レベル、タンパクレベル) ため、現時点では疾患由来 EC, VSMC がどのように関わっているかの評価はできていないと考える。

考察

自己炎症性疾患における動脈硬化の病態は、まだ十分な知見が得られていない。動脈硬化においては、血管内皮細胞、免疫担当細胞 (マクロファージなどの血球)、血管平滑筋細胞がその疾患形成に大きく関わっている。自己炎症性疾患では、これらの細胞全て (または一部) に自然免疫が亢進する遺伝子変異を獲得している。我々は NLRP3 inflammasome に関わる変異を持つ、CINCA 症候群、FMF、PAPA 症候群に着目した。特に CINCA 症候群は 10 歳以下の若年時においても動脈硬化所見が見られる。iPS 細胞は疾患の特徴を反映する細胞へ分化誘導させることで、病態解明や創薬スクリーニングに使用できる強力なツールとなる。今回、体細胞モザイク CINCA 症候群患者から樹立した、WT iPS 細胞と MT iPS 細胞をそれぞれ血管内皮細胞、平滑筋細胞へと高純度に分化誘導することができた。また、これらの細胞は成熟し、ある程度の機能を有していた。しかし炎症性サイトカインの産生や NLRP3 inflammasome の評価としては十分な機能を持

つレベルに達していなかった可能性がある。そのため今後は、分化系の見直しと primary 細胞での NLRP3 inflammasome の機能評価を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yamamura K, Sakamoto I, Yamasaki Y, Fujiwara A, Nagao M, Takada H: Silent progression of coronary artery thrombosis in a pregnant woman with anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery. *Circ J*, epub ahead of print, 2017

2. Onouchi Y, Fukazawa R, Yamamura K, Suzuki H, Kakimoto N, Suenaga T, Takeuchi T, Hamada H, Honda T, Yasukawa K, Terai M, Ebata R, Higashi K, Saji T, Kemmotsu Y, Takatsuki S, Ouchi K, Kishi F, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Sato Y, Honda A, Kobayashi H, Sato J, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Yoshiyama M, Miyashita R, Murata Y, Fujino A, Ozaki K, Kawasaki T, Abe J, Seki M, Kobayashi T, Arakawa H, Ogawa S, Hara T, Hata A, Tanaka T. Variations in ORAI1 Gene Associated with Kawasaki Disease. *PLoS One*. 20;11(1):e0145486, 2016

3. Matsuura T, Takahashi Y, Yanagi Y, Yoshimaru K, Yamamura K, Morihana E, Nagata H, Uike K, Takada H, Taguchi T. Surgical strategy according to the anatomical types of congenital portosystemic shunts in children. *J Pediatr Surg*. 51(12):2099-2104, 2016

4. Tocan V, Koga Y, Ono H, Nakashima K, Terashi E, Morihana E, Yamamura K, Sakamoto T, Takada H. Is Metastatic Rhabdomyosarcoma an Indication for Cardioverter Defibrillator Implantation? *Pediatr Blood Cancer*. 63(8):1501-2, 2016

5. Toda N, Hoshina T, Koga Y, Ochiai M, Kaku N, Yamamura K, Torisu H, Ihara K, Takada H, Maehara Y, Hara T. Analysis of Death Due to Infectious Diseases in Patients Hospitalized in the Pediatric Ward of a Single Japanese Tertiary Medical Facility. *Jpn J Infect Dis*. 22;69(6):464-470, 2016

6. Yamasaki Y, Nagao M, Kamitani T, Yamanouchi T, Kawanami S, Yamamura K, Sakamoto I, Yabuuchi H, Honda H. Clinical

impact of left ventricular eccentricity index using cardiac MRI in assessment of right ventricular hemodynamics and myocardial fibrosis in congenital heart disease. Eur Radiol. 26(10):3617-25, 2016

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Yamamura K, Sakamoto I, Kawaguchi N, Muraoka M, Nakashima Y, Terashi E, Uike K, Hirata Y, Morihana E, Ohga S. Liver fibrosis in adult patients late after repair of tetralogy of Fallot. Asian Society of Pediatric Research 2016. Nov 10-11, 2016, Bangkok, Thailand

2. Ono H, Saito M, Ohta R, Yamamura K, Nakahata T, Takada H: Function of Endothelial cells in Atherosclerosis with Autoinflammatory Disease. CiRA Retreat 2016. July 28-29, 2016, Hyogo, Japan

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 健一郎 (Yamamura Kenichiro)
九州大学病院小児科助教

研究者番号：30532858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし