

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18387

研究課題名(和文) 遺伝性脳小血管病におけるアクチン代謝異常の分子メカニズムの解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The mechanism of actin metabolism abnormality in a hereditary small vessel disease and development of novel treatment

研究代表者

山本 由美 (Yamamoto, Yumi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：10614927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が開発したiPS細胞から血管壁細胞を分化誘導する技術を用い、遺伝性脳小血管病CADASILの患者から採取したiPS細胞から血管壁細胞を分化誘導し、コントロールとの比較を行ったところ、PDGFR の増加と細胞遊走能の亢進が、CADASILの病態に密接に関係している可能性が示唆された。変異NOTCH3またはPDGFR のノックダウンにより遊走能の亢進が抑制されたことから、これらをターゲットとする新規治療法が有望であると思われる。

研究成果の概要(英文)：We have established a technique to differentiate iPS cells into mural cells (iPSMCs). We differentiated iPS cells from patients with hereditary small vessel disease, CADASIL into iPSMCs and compared their properties with controls. The CADASIL iPSMCs showed increased expression of PDGFRbeta and promoted migration, which were suggested to be closely involved in CADASIL pathogenesis. The knockdown of mutant NOTCH3 and/or PDGFRbeta significantly suppressed the promoted migration in CADASIL iPSMCs. These genes may be ideal targets for novel treatment of CADASIL.

研究分野：脳血管障害

キーワード：CADASIL 脳血管障害 脳梗塞 壁細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴う医療費の増加が社会問題として取り上げられる中、要介護状態の主な原因の一つである脳血管障害が注目を集めている。近年、脳血管障害が認知症の直接の原因となるだけでなく、アルツハイマー型認知症の発症・進行にも深く関わっていることがわかり、神経変性疾患の治療においても脳血管からのアプローチが試みられている。ところが、脳血管障害の一つである脳小血管病については、孤発例のみならず、遺伝性脳小血管病のうち原因遺伝子の特定に至った CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) や CARASIL などにおいてすら、未だ病態機序に不明な点が多い。

CADASIL は、血管壁細胞の変性などの血管病変と大脳白質障害を特徴とする優性遺伝性の若年性血管性認知症である。20代頃から偏頭痛や鬱等の症状が現れ始め、一過性脳虚血発作や脳梗塞を繰り返して50~60代で認知症、死に至る。原因遺伝子が壁細胞(血管平滑筋細胞・ペリサイト)特異的な細胞膜受容体 *NOTCH3* に特定されて以来(Joutel A, 1996)、多くの研究がなされてきたが、未だに血管の形態・機能異常に至るメカニズムは不明であり、有効な治療法が全く存在しない。申請者は、英国ニューカッスル大学大学院在籍時から10年以上CADASIL患者剖検脳の病理解析と病態解明に取り組み、CADASILにおける脳血管障害と脳白質障害の重要性について明らかにしてきた(研究業績1, 3, 4)。しかし、今後の治療法開発に際しての最大の問題は、CADASILの病態を *in vitro* で再現することの難しさにある。これまでに、Loss of function という観点から変異 *NOTCH3* 遺伝子導入による様々な実験が行われてきたが、シグナル活性の変化に一貫した結果が得られておらず、遺伝子導入による *in vitro* での病態の再現の限界が伺える (Peters N, 2004; Low WC, 2006)。また、変異 *NOTCH3* 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスも、CADASILの白質病変の再現には至っていないのが現状である。つまり、まずはCADASILの病態を *in vitro* で再現できる実験系を確立することが、今後の病態メカニズム解明および薬物スクリーニングを行う上で必要不可欠であった。そこで、申請者らは京都大学 糖

尿病・内分泌・栄養内科学講座 曽根正勝講師との共同研究により、iPS細胞を壁細胞に分化誘導・維持する手法の確立を行い、その細胞機能の解析を進めてきた。

2. 研究の目的

申請者は、CADASIL Tg マウスの脳血管壁細胞およびCADASIL患者のiPS細胞を用いて *in vitro* でCADASILの病態を再現し、病態機序の解明と新規治療薬の開発への道筋をつけるべく研究を進めてきた。これまでの研究により明らかとなったCADASILのiPS細胞由来の壁細胞(iPSMC)の遊走能の亢進が、どのようなシグナル経路によるものなのか、その分子メカニズムの解明と実際の病態との関わりを調べた。

3. 研究の方法

遊走能亢進の分子メカニズム

iPSMCの壁細胞特異的分子や遊走関連分子の発現をコントロールとCADASILで比較した。特に有意差を認めた分子に関しては、変異 *NOTCH3* の siRNA によるノックダウンによる発現の変化をWestern blottingにより評価した。また、当該分子のノックダウンにより遊走能の亢進が抑制されるか検討を行った。

PDGF反応性(増殖)

血管新生時に内皮細胞から産生されるPDGFは、低濃度(<2ng/ml)では壁細胞の遊走を、高濃度(30ng/ml)では増殖を誘導すると言われている (De Donatis 2008)。そこで、0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 30ng/mlのPDGFで培養したiPSMCの増殖能をCell counting kit (WST-8, Dojindo)で評価した。

4. 研究成果

iPSMCで、これまでに報告されているアクチン骨格の異常が再現されただけでなく (Domenga V, 2004; Tikka S, 2012)、CADASILにおいて遊走が亢進していることがわかった。さらに、マイクロアレイ解析とWestern blottingによりアクチン骨格制御および遊走に関係するシグナル経路構成分子の発現に変化があることや、アクチン代謝の制御に関わるPDGFRβがCADASILで有意に増加していることが示された。PDGFRβの増加は

CADASIL 剖検脳免疫染色により既に報告されており(Craggs LJJ, 2015)、我々の iPSC が *in vitro* 病態モデルとして有用であることが確認された。

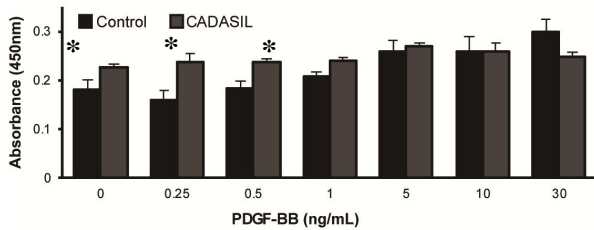


図 1 . PDGF 濃度と増殖能 . PDGF 処理 2 日目の細胞数を定量したところ、CADASIL では低濃度でも増殖能が高かった。

血管新生の際には、内皮細胞が発芽、伸長して血管腔を形成し、外側を遊走してきた壁細胞が覆って内皮細胞の安定化を行う。この時遊走を制御するシグナルの一つが PDGFRβ を介した経路である。血管壁細胞は、PDGF が低濃度であれば遊走し、高濃度になると増殖を行うというように、濃度依存性に性質が変化する。申請者は、CADASIL の壁細胞において、PDGFRβ の増加に伴い、PDGF 濃度依存的な壁細胞の反応が変化していることを発見した(図 1)。つまり、CADASIL では通常遊走を促進する低 PDGF 濃度で遊走が抑制され増殖が亢進し始めることで、被覆すべき部位で壁細胞の被覆がおこらず、そのために小血管の壁の脆弱化が起こるのではないかと考えられる。このように、PDGFRβ を介するシグナルが CADASIL の病態に関係している可能性が高まった。

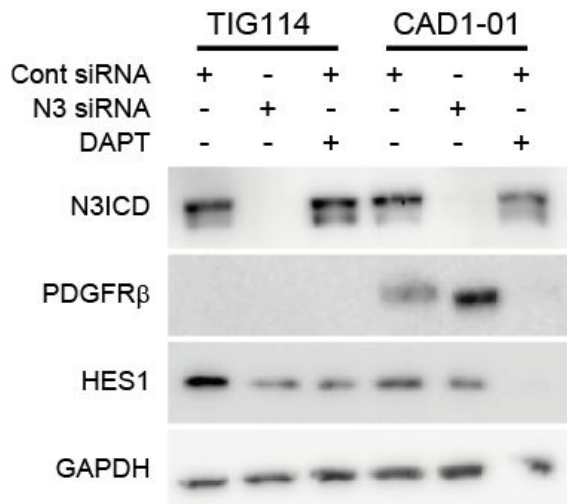


図 2 . NOTCH3 knockdown と -secretase inhibitor (DAPT)による PDGFR 発現の変化

遺伝子ノックダウン実験により、Notch3 シグナルにより PDGFRβ の発現量が変化することが示唆されているが、NOTCH3 のノックダウンでは PDGFRβ が増加し、Notch シグナル阻害剤の添加では PDGFRβ が減少するにも関わらず(図 2)、どちらも遊走の亢進が抑制されるという結果が示すように(図 3)、単純な上下関係ではなく拮抗するなんらかのシグナルが関わっている可能性がある。いずれにせよ、変異 Notch3 または PDGFRβ をターゲットとした治療法が CADASIL に有効か今後検証していく必要がある。

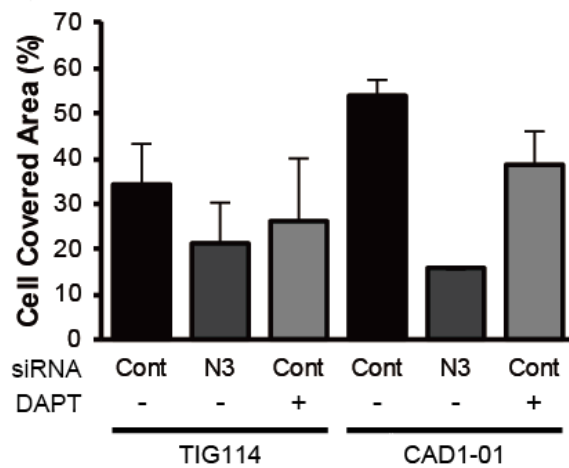


図 3 . NOTCH3 knockdown と -secretase inhibitor (DAPT)による遊走能の変化 (Scratch assay).

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)

[学会発表](計 1 件)

Yumi Yamamoto, Katsutoshi Kojima, Daisuke Taura, Masakatsu Sone, Kazuo Washida, Naohiro Egawa, Takayuki Kondo, Eiko N Minakawa, Kayoko Tsukita, Takako Enami, Hidekazu Tomimoto, Toshiki Mizuno, Ryosuke Takahashi, Masafumi Ihara, Haruhisa Inoue. In vitro model of CADASIL: iPS cell-derived mural cells for unraveling the pathogenesis of a hereditary small vessel disease. ConBio2017 (招待講演)(国際学会)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：細胞増殖分化誘導方法

発明者：猪原匡史、山本由美、井上治久、月
田香代子、江浪貴子

権利者：猪原匡史、山本由美、井上治久

種類：特許

番号：特願 2016 - 254919

出願年月日：2016 年 12 月 28 日

国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)

国立循環器病研究センター・研究所・流動
研究員

研究者番号：10614927