

令和元年5月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19403

研究課題名(和文) ヒト肺動脈内皮細胞・平滑筋細胞特異的マーカーの探索と疾患特異的iPS細胞への応用

研究課題名(英文) Identification of specific marker of human pulmonary arterial endothelial cell and smooth muscle cell

研究代表者

石田 秀和 (ISHIDA, HIDEKAZU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50467552

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)：難病である特発性肺動脈性肺高血圧症の治療開発やiPS細胞を用いた病態解明において、肺動脈に特異的なマーカーを見つけることは重要である。今回の研究では、次世代シーケンサーを用いた肺動脈の血管細胞の網羅的遺伝子発現解析により、肺動脈に特徴的な遺伝子発現パターンを解析し、そこから、肺血管に特異的なマーカーの探索を行った。まず、肺動脈の内皮細胞と平滑筋細胞に分離して解析が行えるかどうか、レーザーマイクロダイセクション法を用いて検討を行った。分離した組織から得られた微量RNAは、増幅によって十分な量のcDNAを合成できたが、クオリティに問題があった。完全に特異的なマーカーの同定には未だ至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで血管細胞における詳細な遺伝子発現解析は行われていなかった。また、iPS細胞を用いた肺動脈性肺高血圧症の病態解明においても、肺動脈細胞と体動脈細胞の遺伝子発現の違いについては意識されておらず、研究結果に影響している可能性もある。本研究では、肺組織において肺動脈内皮細胞と平滑筋細胞を分離してRNAを回収して発現解析が行うことが出来る可能性について明らかにした。今後の研究継続により、肺血管特異的なマーカーの同定に近づくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is important to identify the specific marker of pulmonary vascular cells for the development of the novel drug discovery in pulmonary arterial hypertension and further investigation by using iPS cells. In this study, we tried to identify the specific marker of pulmonary arterial endothelial cells and smooth muscle cells by next generation sequencing technology. First, we purified endothelial cells and smooth muscle cells by laser microdissection. We synthesized cDNA library from these small amount of total RNAs obtained from human samples. We checked the quantity and quality of the cDNA library, but we found it was not enough for comprehensive analysis. Finally, we did not identify the completely specific marker of pulmonary arterial cells until now.

研究分野：小児科学

キーワード：肺動脈内皮細胞 肺動脈平滑筋細胞 次世代シーケンサー レーザーマイクロダイセクション

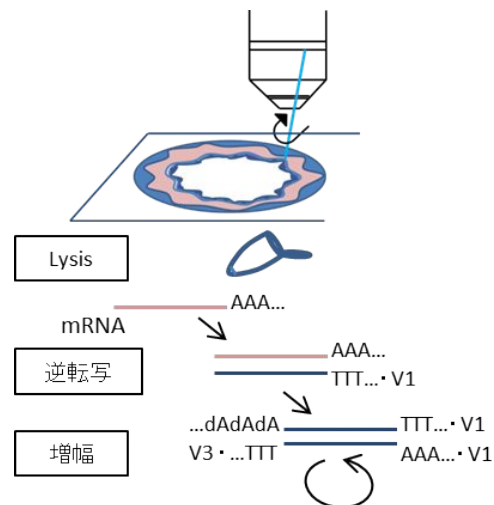
## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は、様々な原因により肺動脈圧の上昇を認める病態である。近年、様々な肺高血圧症治療薬が利用可能であるが根本治療は困難であり、進行すれば肺移植あるいは心肺同時移植の適応となりうる。肺動脈性肺高血圧症患者では、いわゆる抵抗血管と呼ばれる直径 200-500  $\mu\text{m}$  前後の肺小動脈において、中膜の肥厚や内膜の増殖に伴う肺動脈内腔の狭小化が観察される。この病態には、血管内皮細胞の機能異常と、それに伴う血管平滑筋細胞の異常増殖が関与しており、肺動脈性肺高血圧症の一部の患者ではいくつかの遺伝子変異が指摘されているものの、変異を持つもの全員が肺高血圧症を発症するわけではなく、肺血管特異的に内皮や平滑筋細胞の異常を引き起こす分子メカニズムについては未だ解明されていない。また、肺血管細胞と体血管細胞は、酸素や一酸化窒素、各種薬剤に対する反応性が異なるが、細胞として本質的に何が異なるのかという点についても全く不明である。

これら、肺血管細胞研究の進展を阻む大きな原因として、肺動脈内皮細胞と平滑筋細胞における特異的のマーカが存在しないことが挙げられる。そのために、例えば疾患特異的 iPS 細胞による病態解明を目的とした研究においても、どの内皮あるいは平滑筋細胞が肺動脈系で、どれが体動脈系に分化したのかを見分ける手段が存在しない。そのため、純粋に肺動脈細胞のみを対象として解析することができず、得られた結果が混在する体血管細胞の影響を受ける危険性がある。

## 2. 研究の目的

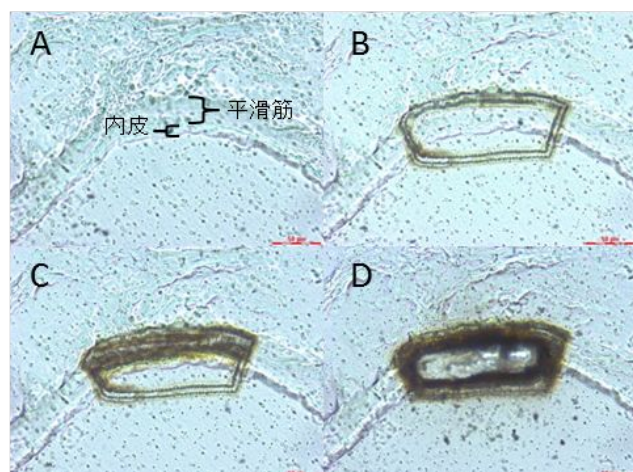
そこで本研究において我々は、ヒト肺組織からレーザーマイクロダイセクション法にて肺動脈内皮と平滑筋を単離し、微量 RNA を用いた次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析により、肺動脈内皮/平滑筋細胞特異的のマーカを同定しようと考えている(右図)。もし肺動脈内皮細胞あるいは平滑筋細胞に特異的なマーカが明らかになれば、誰もが簡単にそれらを認識・単離することが出来るようになり、疾患特異的 iPS 細胞から、肺動脈内皮/平滑筋細胞のみを選択的に培養できるようになる。これにより、in vitro における、ヒト疾患細胞を用いた病態解明だけでなく、肺動脈と体動脈の本質的な違いについての基礎研究が大きく進展すると期待される。



## 3. 研究の方法

ヒト正常肺組織は、当院で行われた脳死肺移植術の際にトリミングとして切りだされた余剰組織を用いる(本学倫理審査委員会承認済み)。この新鮮凍結肺切片を厚さ 10  $\mu\text{m}$  で切り出し、専用スライドに展開する。肺動脈は無染色でも確認可能であり、肺動脈内皮と平滑筋をレーザーマイクロダイセクション(Leica LMD7000)にて単離する(下図)。サンプリングは複数の場所から行うが、それでも得られる RNA はかなり微量であると考えられるので、既報の単一細胞由来 cDNA 作成プロトコルを用いて、微量 RNA の逆転写と cDNA の増幅を行う。得られた cDNA は、それぞれ他の細胞の混入が無いことを確認するため、内皮細胞のマーカとして PECAM1、von Willebrand Factor、平滑筋細胞のマーカとして Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC)、-Smooth Muscle Actin を PCR にて確認する。

これらの cDNA サンプルを用いて次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq を行う。我々の施設では、サンプル調製から一次解析まで学内受託サービスが行われており、すでに次世代シーケンサーを用いたゲノム解析や発現解析が数多く行われている。得られたバイオフィオマティクスデータは体動脈内皮/平滑筋細胞の発現プロファイルと比



較することで、肺動脈内皮細胞あるいは平滑筋細胞で有意に高い発現を示す遺伝子、その中でも特に細胞表面で発現するタンパクをコードする遺伝子を絞り込む。実際に肺動脈内皮/平滑筋細胞で特異的に発現しているかどうかを、ヒト肺組織切片、体動脈組織切片（内胸動脈以外にも、肝臓・腎臓といった他臓器切片）を用いた免疫組織染色にて確認する。

#### 4. 研究成果

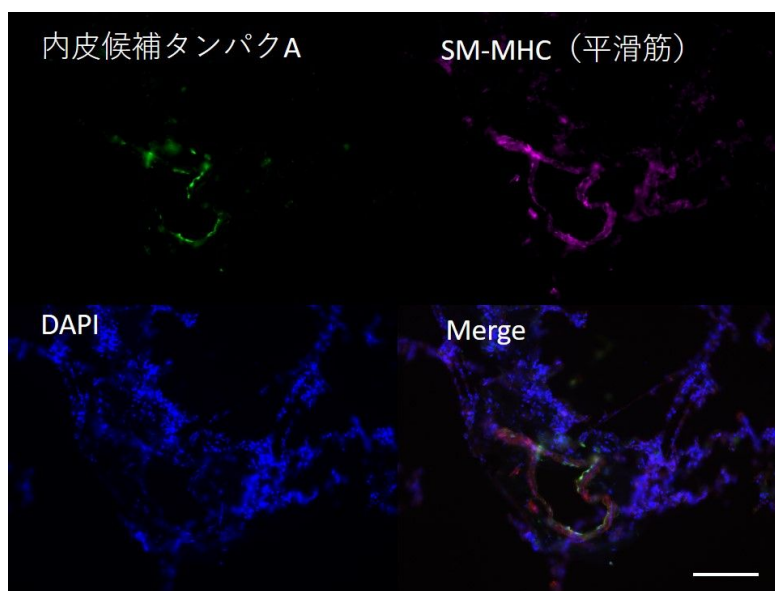
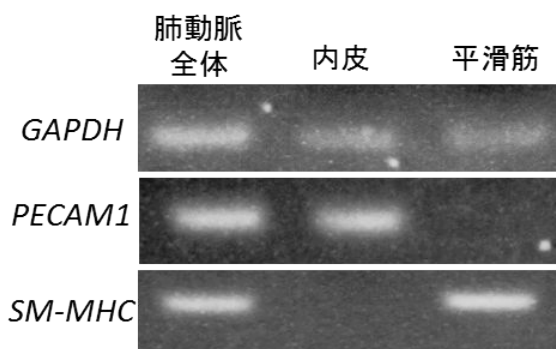
研究期間内に肺移植となった症例において、倫理審査委員会に承認された同意書を用いて説明と同意取得を行った。その症例においてトリミングされた肺動脈切片を回収し新鮮凍結保存を行った。研究方法で提示した方法にて、凍結切片を 10 μm の厚さにて切り出しを行い、乾熱滅菌済みのレーザーマイクロダイセクション専用のプレパレート上に展開した。Leica LMD7000 を用いてサンプル採取を行い、採取したサンプルはすぐさま Lysis 反応を行い、逆転写のステップへと進んだ。既報の方法にしたがい、合計 20 回の PCR による増幅を行い、cDNA ライブラリを作成した。作成した cDNA ライブラリにおいて、内皮細胞のマーカである PECAM1 と von Willebrand 因子(vWF)、そして平滑筋細胞のマーカである  $\alpha$ -smooth muscle cell actin( SMA) と smooth muscle myosin heavy chain(SM-MHC)とで、RT-PCR 反応を行い、それぞれのマーカの発現について確認した。その結果、内皮細胞での PECAM1 や vWF の発現が確認でき、平滑筋細胞では SMA や SM-MHC の発現を確認した。(右図)

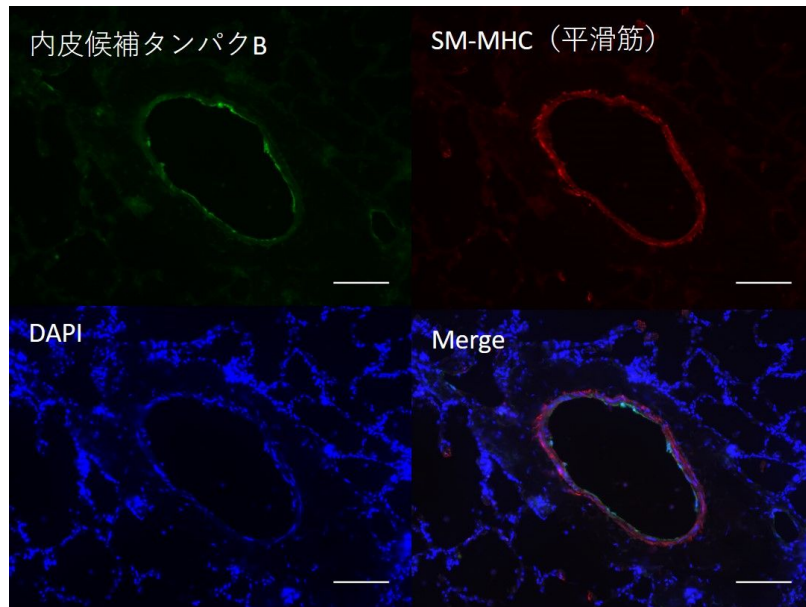
しかし、それぞれのマーカの両方とも発現していたり、片方しか発現していないなど、すべての遺伝子が様に増幅されているのか疑問を生じるクオリティでしか cDNA ライブラリを形成することができなかった。それゆえ、年度内にはこれらのサンプルを用いた RNA-seq は完了することができなかった。

そこで、肺動脈と体動脈の平滑筋細胞、内皮細胞からこれまで得られていたマイクロアレイデータを用いて、有意な発現変化をしている遺伝子について解析を行った。肺動脈内皮細胞で有意に高く発現している遺伝子をピックアップし、肺血管内皮細胞特異的のマーカ候補として同定した。

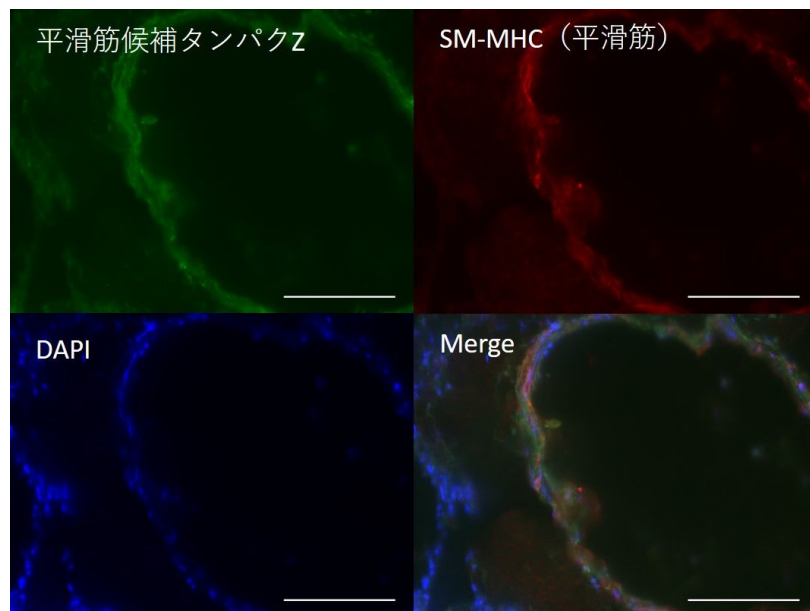
これらの遺伝子 A, B, C の 3 種について、ヒト抗原に対する抗体がコマーシャルベースで利用可能であったため、ヒト肺組織切片に対して、免疫組織染色を施行した。(下図)

これらの遺伝子がコードするタンパクは、実際にヒト肺組織における肺血管内皮細胞で発現していることが確認できた。しかし、ヒト体血管内皮細胞でも発現していることが確認され、染色濃度の違いは認められるものの有用なマーカとしての利用は困難であると考えられた。





一方で、肺血管平滑筋細胞特異的マーカー候補として遺伝子 X, Y, Z を同定した。これらについてもヒト肺組織を用いた免疫組織染色にて発現パターンの確認を行った。遺伝子 X, Y がコードするタンパクについては、コマーシャルアベイラブルな抗体においては肺動脈における染色が確認できなかった。遺伝子 Z がコードするタンパクについては、肺動脈平滑筋にて染色が確認されたものの、体動脈でも発現が確認されたため、マーカーとしては利用不可能であった。現在も、レーザーマイクロダイセクションによる肺動脈組織からの RNA 抽出や、肺門部肺動脈リングからの RNA 抽出を行っており、十分な量かつ質の RNA が得られれば、RNA-seq による網羅的発現解析を行う予定である。



5. 主な発表論文等  
なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。