

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08772

研究課題名(和文) マルファン症候群患者由来iPS細胞から作製した血管細胞モデルでの治療薬の探索

研究課題名(英文) The drug screening for individuals of Marfan syndrome using the in vitro vascular cell model made from patient-derived iPS cells

研究代表者

大門 雅広 (Daimon, Masahiro)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：20388268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：若年期に致命的な大動脈解離や大動脈瘤破裂を発症するマルファン症候群と類縁疾患において、確実に生命予後を改善するのは解離発症前の人工血管置換手術のみである。患者ごとに発症様式が異なり、治療介入の時期と方法に関して苦慮する場合が多い。原因遺伝子の変異の多様さが、患者ごとに発症様式が異なる原因であると考えられる。そこで本研究では、FBN1遺伝子変異を有するマルファン症候群患者の末梢血からiPS細胞を経由して誘導した血管平滑筋細胞培養系を用い、大動脈でみられる病態を再現(血管細胞モデル)することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルファン症候群等類縁結合組織疾患で生命予後を大きく左右するのは大動脈の脆弱性で、本研究では40歳台までの若年期に大動脈拡大や大動脈解離を有する患者を対象として遺伝子解析を行い、多様な遺伝子変異を有する患者から分化誘導した血管平滑筋細胞を用いて血管モデルを作製することを目的とした。異常な結合組織を分泌する細胞を用いた研究は困難を伴うが、希少難病こそiPS細胞を樹立することの意義が大きい。今後も本研究を継続し、iPS細胞で、患者それぞれの大動脈脆弱性の原因を検討し、さらに化合物ライブラリーのスクリーニングを行うことで治療効果を有する薬剤を探索するとともに、病態の解明につなげることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In Marfan syndrome and related disorders, in which fatal aortic dissection or rupture of an aortic aneurysm occurs at a young age, only surgical replacement before the onset of dissection can reliably improve the prognosis. The mode of onset differs from patient to patient, and the timing and modalities of therapeutic intervention are often difficult to determine. The diversity of causative gene mutations may be the reason for the differences in the mode of onset from patient to patient. In this study, we attempted to reproduce the pathogenesis seen in the aorta (vascular cell model) using a vascular smooth muscle cell culture system derived from peripheral blood via iPS cells from a Marfan syndrome patient with an FBN1 gene mutation.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：iPS細胞 Marfan症候群 平滑筋細胞 大動脈解離

1. 研究開始当初の背景

マルファン症候群は、高身長、長い手足などの特徴的な体格を有し、水晶体偏位や若年性大動脈解離・瘤を合併する常染色体優性遺伝の全身結合組織疾患であり、1896年にフランス人小児科医である Antoine Marfan により初めて報告された。1991年にフィブリリン-1をコードする *FBNI* 遺伝子の変異が原因であることが同定された。次世代シーケンサーが日常的に使用できるようになり、世界中で様々な *FBNI* 変異が同定されている。同じ *FBNI* 変異を共有するマルファン症候群の患者や家系内でも症状が様々である。フィブリリン-1は、細胞外マトリックスの直径 10-12nm マイクロフィブリルの主要な構成要素で、荷重支持をする結合組織における構造的な役割のみならず、組織の恒常性維持のためのホルモンやサイトカインのシグナリングを制御する役割がある。*FBNI* 遺伝子は 15 番染色体長腕(15q15-q21.1)に位置し、65 エクソン、2871 アミノ酸をコードする 230kb からなる巨大な遺伝子である。変異は全エクソンにわたり、ナンセンス変異やフレームシフトによるアミノ酸の挿入・欠失や、システイン基の欠失や挿入を生じるミスセンス変異が報告されている。この遺伝子変異の多様さが患者ごとに発症様式が異なる原因であると考えられる。

2. 研究の目的

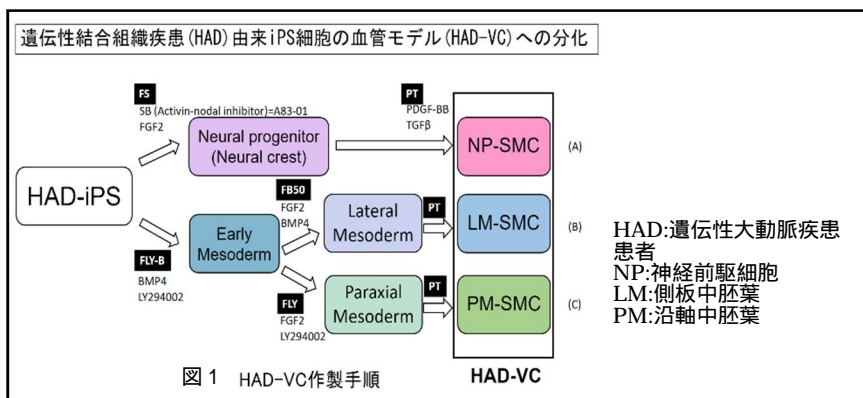
疾患発症機序の探索手法は、2007年にヒトで iPS 細胞作製技術が報告される以前は、動物疾患モデルが作製されていたが、数年を要するモデル確立にもかかわらず、動物モデルで有効性を認めた多数の薬剤がヒトでは無効であるなど、必ずしもヒトの病態を再現できない点が問題であった。体細胞から多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作製する技術は、倫理的観点から問題の多い胎児幹細胞を用いず、体細胞に山中 4 因子と言われる 4 種類の遺伝子を導入することで病態に関与する体細胞を作製することができる。遺伝子変異を原因とする疾患の場合、患者の体細胞から作成した iPS 細胞は遺伝子変異を有するため、その細胞を分化誘導して得た細胞を適切な条件下で培養することで、疾患モデル細胞系として疾患発症基盤解明のための解析や治療標的の同定ができる。さらに、細胞培養皿上では CRISPR/cas9 によるゲノム編集によってこの遺伝子変異は高効率で修復が可能である。マルファン症候群等類縁結合組織疾患で生命予後を大きく左右するのは大動脈の脆弱性のため、本研究では 40 歳台までの若年期に大動脈拡大や大動脈解離を有する患者を対象として遺伝子解析を行い、そのうち *FBNI* 遺伝子に変異を有する患者の培養細胞系を確立する。末梢血単核球細胞から iPS 細胞を誘導し、培養皿上で分化誘導した血管平滑筋細胞を培養して血管細胞モデルを構築する。

3. 研究の方法

大阪医科薬科大学倫理委員会において研究の承認を得た後、50 歳までに大動脈解離や大動脈瘤を合併し *FBNI* 遺伝子に変異を有するマルファン患者の末梢血単核球細胞から iPS 細胞を作製することにした。iPS 細胞からの血管平滑筋への分化にあたっては Nature Genetics で Granata et al. が報告した 3 系統 (神経前駆細胞、沿軸中胚葉、側板中胚葉) の発生経路を介した誘導で作製することとした (Nature Genetics. An iPS-derived vascular model of Marfan syndrome identifies key mediators of smooth muscle cell death. Granata et al. (2017).)。本研究では、患者由来 iPS から作成した血管平滑筋細胞の性質の差異や薬剤効果を検討するため、安定した iPS 細胞の樹立と維持、分化方法の確立が優先される。細胞の性質は、細胞障害レベルを調べるのみならず、細胞外マトリックスの分泌量と微細構造、タンパク質-タンパク質連関、物理的耐性を含めて検討する。その後、384 ウェルプレートに細胞を播種し、化合物ライブラリーの有効性をスクリーニングする。この解析にはハイスループット・セルイメージングを用い、スコア化によって有効薬剤を抽出する。さらに、細胞培養皿上では CRISPR/cas9 によるゲノム編集によってこの遺伝子変異し、薬剤の有効性が変異によるものかどうかを検討する。患者細胞によって有効薬剤が異なることが予測され、遺伝子変異様式と血管脆弱性の関連を検討し、血管脆弱性の機序を解明するとともに治療標的の同定を行う。

4. 研究成果

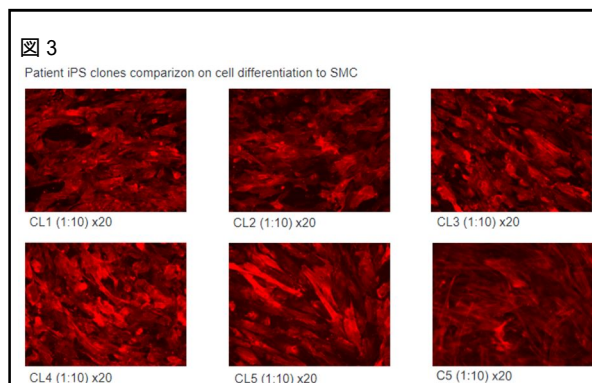
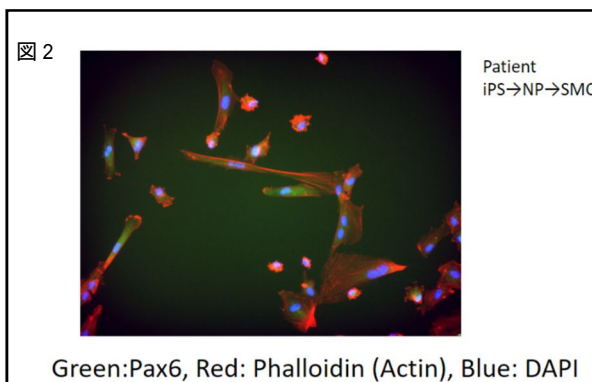
大阪医科大学研究倫理委員会(ゲノム)で遺伝子解析研究と iPS 細胞樹立の承認を得た。患者由来 iPS 細胞の樹立は大阪医科薬科大学薬理学教室で行うこととし、維持と分化方法の検討



は胸部外科学教室で行った。胸部外科学教室では、薬理学教室で安定して維持継代ができていた健常人 iPS 細胞で iPS 細胞の培養技術を習得した。ついで、研究同意が得られた *FBN1* 変異を有するマルファン症候群患者 1 名から iPS 細胞 11 クローンを樹立し、10 継代で凍結保存した。分化実験は、凍結細胞を解凍し、2 継代安定的維持した細胞を用いることとした。10 クロンのうちの 5 クローンを選択し平滑筋細胞への分化方法を調整した (図 1)。この際、健常人から樹立した iPS 細胞であっても平滑筋細胞への分化は困難であった。そのため、前出の論文を発表している英国 Sanjay 研究室と連絡を取りながら分化方法を研究した。神経前駆細胞経由の血管平滑筋分化は容易であった (図 2 , Pax6 陽性) が、中胚葉経由の分化が困難であった。薬理学教室で確立している方法を用いたところ心筋細胞への分化を確認し得た。継代前の細胞の播種の濃度、ROCK 阻害剤添加の有無、培養皿のコートニングマトリクス、培地交換のタイミングを調整し、沿軸中胚葉と側板中胚葉を経由した平滑筋細胞分化も可能となった (図 3、SMA

陽性)。同意の得られたマルファン症候群患者から iPS 樹立を試みたが臨床上重篤な遺伝子変異を有する家系員からの iPS 細胞樹立は困難であったが (1 例は不可)、再採血が可能であった患者は、採血から単核球細胞分離までの時間短縮や愛護的手技の導入によって、iPS 細胞を樹立することができた。研究期間中に 4 名から iPS 細胞を樹立し、2 名の患者で 3 系統の経路で平滑筋細胞への分化が可能であることが確認できた。

マルファン症候群患者由来 iPS 細胞の樹立は、健常人由来 iPS 細胞よりも困難であったが、方法の最適化を行うことで最終的に可能であった。血管平滑筋への分化は、中胚葉経由では難しかったが、それがマルファン症候群の遺伝子変異に由来するものであるかどうかは、今後の患者数を増加させることで検討する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神吉 佐智子 (KANKI SACHIKO) (40411350)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	渡邊 房男 (WATANABE FUSAO) (40183719)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	友田 紀一郎 (TOMODA KIIICHIROU) (50362843)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関