

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08796

研究課題名(和文) 新規治療の確立を目的とした全身性強皮症の血管病変モデルの作製

研究課題名(英文) Establishment of a disease model for the vasculopathy in systemic sclerosis to develop a novel therapy

研究代表者

後藤 瑞生 (Goto, Mizuki)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：70433050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症(以下SSc)の血管障害の機序を明らかにするためにSSc患者のiPS細胞から多様化能力を持った血管内皮細胞を誘導し、その血管内皮細胞を用いて管腔形成を行い、試験管内での血管病変モデルを作製した。この血管病変モデルを解析した結果、SSc患者iPS細胞由来の血管内皮細胞の増殖能及び管腔形成能が健常人と比較して劣っていることが判明した。その原因因子を探索するため、健常人及びSSc患者iPS細胞由来の血管内皮細胞から抽出したRNAを用いて網羅的マイクロアレイ解析を行ったところ、15個の遺伝子にて健常人とSSc患者の間に発現の有意差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症(以下SSc)は免疫異常に加えて線維化と血管障害が複雑に絡み合って症状を来すが、これらの関係は未だ良くわかっていない。また、線維化の機序は解明されつつあるが、血管障害の機序はほとんど明らかになっていない。これは、患者の血管内皮細胞を使った適切な病変解析モデルが存在しないためである。そこで、本研究ではSSc患者のiPS細胞から多様化能力を持った血管内皮細胞を誘導し、その血管内皮細胞を用いて管腔形成を行い、試験管内での血管病変モデルを作製することとした。管腔形成を行うことによって試験管内実験ではあるが、単層培養した血管内皮細胞の解析とは違い、より生体内に近い病態の解析ができる。

研究成果の概要(英文)：To reveal mechanisms of vascular disorders in systemic sclerosis (SSc), we established iPS cells from SSc patients and healthy controls and differentiated them into vascular endothelial cells. It was found that the proliferative ability and tube-forming ability of vascular endothelial cells derived from SSc patient iPS cells were inferior to those of healthy subjects. In order to explore the causative factors, a comprehensive microarray analysis was performed using RNA extracted from iPS cell-derived endothelial cells from SSc patients and healthy subjects. Significant differences in the expression levels of 15 genes were observed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 血管障害 iPS細胞 血管内皮細胞 管腔形成

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(以下SSc)は皮膚や内臓の線維化をきたす指定難病の慢性疾患であり、レイノー症状、皮膚硬化、肺線維症、逆流性食道炎などが認められる。特に、強皮症の80%以上でみられるレイノー症状をはじめとする血管病変は、難治性の末梢性皮膚潰瘍、肺高血圧症、強皮症腎クリーゼといった病状を生み出し、患者の日常生活や予後に大きな影響を及ぼす。

最近、SScの病態としてtransforming growth factor (TGF)- 1のシグナルによって、患者の線維芽細胞がI型又はIII型コラーゲンを多量に産生し、組織の線維化を起こすことが明らかとなってきた。また、潜在的TGF- 1を活性型TGF- 1へと変換する機能を持つインテグリン α 5と β 3の発現がSSc患者の線維芽細胞において上昇していることも確認されている。

このように、SScにおいて、組織の線維化に関しては、その病態が分かってきているものの、血管病変に関しては、未だ十分に解析されていない。これは、SScの患者から組織を採取することは、患者の皮膚の性質上、採取部の難治性皮膚潰瘍形成の可能性など患者への負担が非常に大きいことに加えて、血管内皮細胞の単層平板培養のみでは血管特有の構造評価ができないからである。血管構造を解析する上では、採取した血管内皮細胞を用いて、単純な構造が階層化し複雑化する血管の再構築が必要であり、その為には血管内皮細胞が多様化能力を保持していなければならないが(西川:第120回日本医学会シンポジウム)患者組織からその様な血管内皮細胞を選択的に多量に精製するのは困難である。従って、この問題を解決し、新たな試験管モデルを作製することが、SSc患者の今後の血管病変の解析、新たな治療方法の開発に重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SSc患者のiPS細胞から多様化能力を持った血管内皮細胞を誘導し、その血管内皮細胞を用いて試験管内での血管病変モデルを作製することである。

iPS細胞は患者より採取した血液より作製するため、少ない侵襲で作製可能であり、かつ作製後は無制限に増やすことができるため、血管内皮細胞も無制限に作製可能である。また、フローサイトメーターなどによって本研究にとって適切な分化段階での血管内皮細胞の選別も可能である。さらに、管腔形成を行う研究は試験管内実験ではあるが、単層培養した血管内皮細胞の解析とは違い、より生体内に近い病態の解析ができる。そして健常人の管腔形成と比較することによって(図1)患者の管腔形成能がどの程度障害されているかを解析し、その原因を探る。

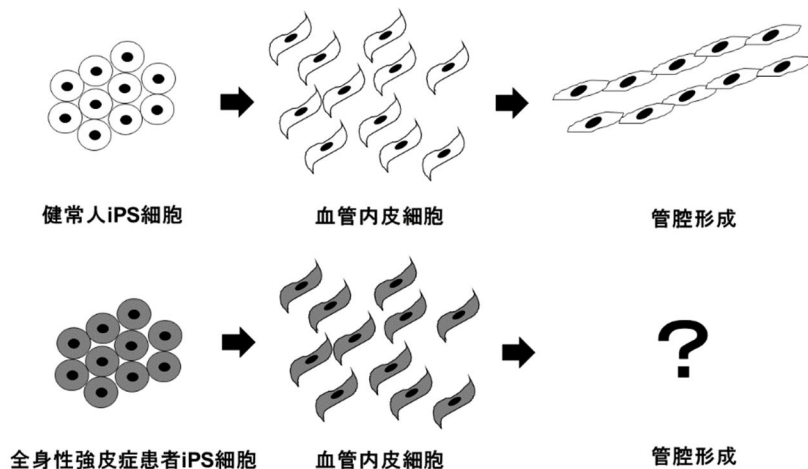


図1

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞を誘導する方法は過去に報告 (Hamauchi: PLoS One 2016) があり、この方法によって、SSc 患者及び健常人の iPS 細胞より血管内皮細胞を作製する。既に我々は、SSc 患者由来の iPS 細胞を樹立している。そして、健常人由来 iPS 細胞と SSc 患者由来 iPS 細胞から血管内皮細胞の誘導を行い、フローサイトメーターにて純化することに成功しており、SSc 患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞の増殖能力が健常人と比較して劣っている可能性が示唆されている (図 2)。今回、我々は、過去の報告 (Hamauchi: PLoS One 2016) を用いて血管内皮細胞の管腔形成能も健常人と比較した。評価方法は管腔形成を来した細胞集塊の長さを画像解析ソフトで測定し、その差を比較する手法である。

さらに今回は、健常人と SSc 患者の iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞の RNA を用いて網羅的マイクロアレイ解析を行い、両者を比較し、血管内皮細胞の増殖能力に影響を及ぼす原因因子を探索した。

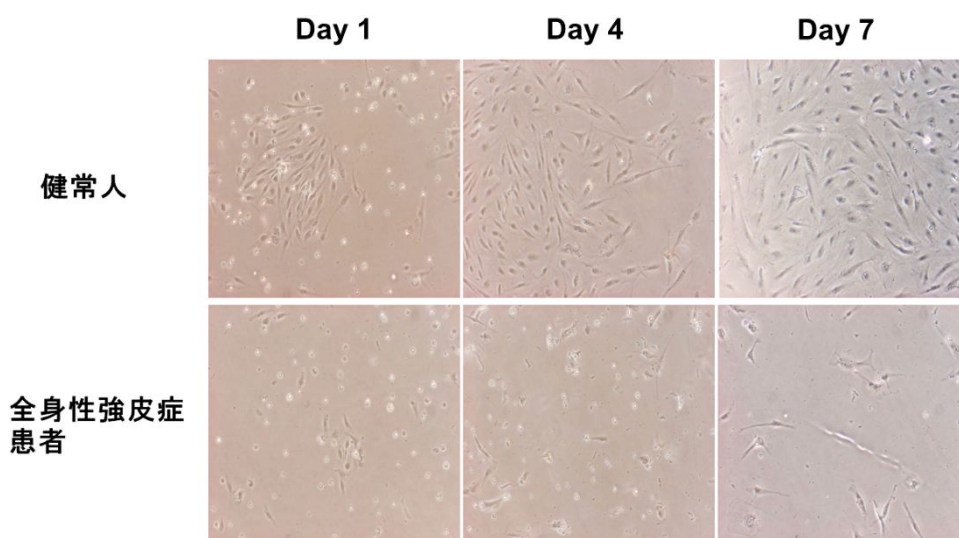


図 2 : 健常人及び SSc 患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞を同じ密度で播種し培養した結果。SSc 患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞(下段)は健常人(上段)と比較し、増殖能力が低いことが分かる。

4. 研究成果

我々は、健常人 (2 名) と SSc 患者 (2 名) の iPS 細胞からそれぞれ血管内皮細胞の誘導を行った。健常人 iPS 細胞由来の血管内皮細胞は 2 名とも問題なく増殖し、さらに管腔形成実験でも問題なかった。一方、SSc 患者 iPS 細胞由来の血管内皮細胞は、2 名とも iPS 細胞からの誘導は問題なかったが、誘導後の増殖能は極めて低く、健常人と比較して明らかに管腔形成能は劣っていた (図 3)。

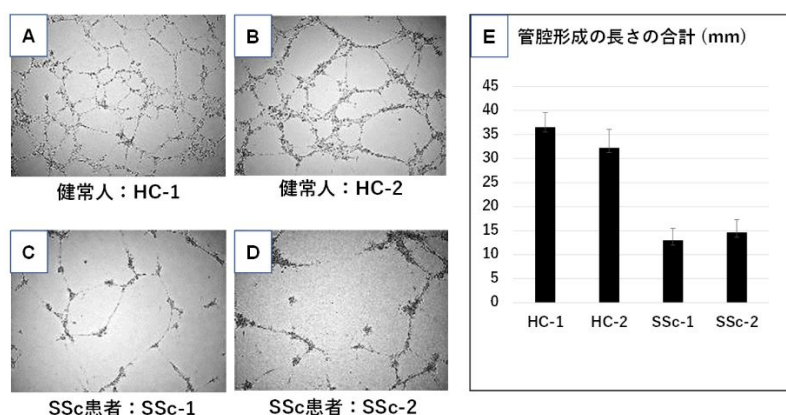


図 3 : 健常人 iPS 細胞由来血管内皮細胞 (A、B) と比較して SSc 患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞 (C、D) では管腔形成能が低下している。E: 管腔形成の長さを測定すると健常人と SSc 患者で有意差を認めた ($P < 0.01$)。

次に SSc 患者 iPS 細胞由来の血管内皮細胞の増殖能及び管腔形成能が健常人と比較して劣っている原因因子を探索するため、健常人及び SSc 患者 iPS 細胞由来の血管内皮細胞から抽出した RNA を用いて網羅的マイクロアレイ解析を行った。Z-score 値から健常人と SSc 患者の 4 通りの組み合わせから、SSc 群において有意な発現変動があると予想された遺伝子のうち、上位及び下位 20 遺伝子を抽出した。4 通りで共通した遺伝子は 18 遺伝子であった。次にこれら 18 遺伝子の実際の発現をリアルタイム PCR にて確認し、15 個の遺伝子にて健常人と SSc 患者の間に有意差を認めた。今後これら遺伝子を解析し、SSc の原因究明及び新規治療の開発につなげていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 瑞生
2. 発表標題 難治性皮膚疾患の再生医療
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizuki Goto, Takumi Era, Yutaka Hatano
2. 発表標題 Differential therapeutic effects between mesoderm-like and neuroepithelium-like cells of mesenchymal stem cells derived from human iPS cells
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

〔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	波多野 豊 (Hatano Yutaka) (80336263)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

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
---------	---------