

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08710

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた凝固・線溶機能と血管内皮 血小板相互作用解析

研究課題名(英文) Analysis of coagulation and fibrinolytic functions and vascular endothelium-platelet interaction using disease-specific iPS cells

研究代表者

佐野 秀人 (SANO, Hideto)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80623842

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)： PAI-1欠損患者由来iPS細胞から血管内皮細胞及び血小板分化を行った。分化段階について、血管系細胞分化は種々試行し、ストローマ細胞OP9細胞上での共培養法が最も効率が良いことを確認した。PAI-1欠損iPS細胞由来内皮細胞は、血管発芽解析により短い発芽数の増加が認められたが血管伸長が抑制された。血小板分化については継続解析中である。

一方で、ヒト血管内皮細胞株のゲノム編集にてPAI-1欠損内皮細胞を樹立したところ、細胞動態変化及び管腔形成アッセイにおいて血管新生への影響を示唆した。さらなるPAI-1役割解明のため、複数のPAI-1欠損患者由来iPS細胞の樹立が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果として、これまでに関与が示唆されていた線溶系の血管新生への影響について、さらに踏み込んだ解析を行った。近年血管新生は、血管内皮細胞の多様性により開始・伸長・安定化の3ステップにより成立することが判明してきた。本研究の結果、PAI-1欠損内皮細胞では血管新生開始を促進するが、伸長が抑制される新たなメカニズムが示唆された。以上より、線溶系の時空間的調節により血管新生の制御の可能性が広がり、創傷治癒、腫瘍、末梢血管障害等の疾患への応用へ繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We performed vascular endothelial cell and platelet differentiation from iPS cells derived from PAI-1-deficient patients. Regarding the differentiation stage, various differentiation methods were tried. We have confirmed that the co-culture method on stromal OP9 cells was the most efficient in endothelial differentiation. PAI-1-deficient iPS cell-derived endothelial cells showed an increase in the number of short sprouts by vascular sprouting assay, but vascular outgrowth was suppressed. Platelet differentiation is under ongoing analysis.

On the other hand, when PAI-1-deficient endothelial cells were established by genome editing of a human vascular endothelial cell line, the cell dynamics and tube formation were totally different compared to control cells suggested PAI-1 would be involved in angiogenesis. To further elucidate the role of PAI-1, it is necessary to establish further iPS cells derived from PAI-1-deficient patients.

研究分野：生理学、血栓止血学、血管生物学

キーワード：線溶反応 iPS細胞 血管内皮細胞 血小板 細胞動態機能

1. 研究開始当初の背景

血管内で線維素溶解活性を制御するPlasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)は、炎症や悪性腫瘍、生活習慣病等においても関与し重要な指標ともなっている。我々は世界第2、3例目のPAI-1欠損症例を報告してきた。本症例の発現型は月経時の致死的大出血と創傷治癒遅延であった。これらの表現型はPAI-1遺伝子欠損マウスとも大きく異なっており、動物モデルの限界を示唆すると共にPAI-1のヒトにおける生理機能の見直しを迫る重要な症例と位置づけられる。

真のヒトPAI-1機能の解明のためにも、またPAI-1欠損症治療の開発のためにも、マウスモデルのみでなくヒトの細胞による解析も必要であり、早急に行われるべき課題であった。

そこで我々は、PAI-1欠損症患者の一例よりiPS細胞を樹立し、成熟細胞へ分化させ解析するという手法をとった。血管内線溶を制御するPAI-1機能解析を行うため、血管内皮細胞へ分化させた。細胞機能についてコントロールiPS細胞由来血管内皮細胞と比較検討を行ってきた。細胞接着・遊走能、遺伝子発現の相違等を発表してきた。

またPAI-1欠損患者は重篤な出血傾向にあり、血小板機能あるいは分化等についても関与が示唆されており、PAI-1欠損iPS細胞から巨核球・血小板分化についても考慮する必要があった。

2. 研究の目的

「ヒトPAI-1は血管内でどのようなメカニズムによって出血と関連しているのか。」という疑問の解決が本研究の最終目的であった。出血は血管内皮細胞で内腔が覆われた血管内イベントであり、血管が損傷し血管内皮細胞が傷害を受けると血小板が凝集し止血機構が働く。PAI-1は血管内皮細胞・血小板ともに発現しており、血小板凝集に続く凝固線溶系に寄与している。PAI-1が欠損している患者が出血傾向を示すのは、まさにこれらの止血機構が破綻していると考えられるが、一方で創傷治癒遅延が生じている原因が判明しない。より詳細な検討を行うため樹立した疾患特異的iPS細胞を用いて解析していくこととした。

3. 研究の方法

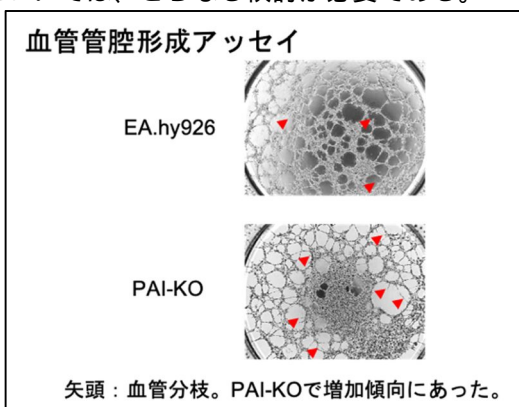
既に樹立済みのPAI-1欠損患者由来iPS細胞を用いて血管内皮細胞へ分化させた。ストローマ細胞であるOP9細胞との共培養により血管内皮細胞を分化誘導する他、既報の合成化合物や増殖因子等を用いた誘導法も試みた。OP9細胞との共培養では血小板分化についても検討した。

また、疾患由来iPS細胞の問題点として、家族由来等による遺伝子背景の一致したコントロールiPS細胞樹立の難しさと、希少疾患によるサンプル数の確保が挙げられる。この問題点を解消するため、ヒト血管内皮細胞株であるEA.hy926細胞とゲノム編集CRISPR/Cas9システムを用いてPAI-1欠損血管内皮細胞株の樹立を行った。細胞動態解析として、細胞増殖能・細胞遊走能について解析を行った。また、血管新生機能解析のためin vitro管腔形成アッセイを行った。

4. 研究成果

iPS細胞とOP9細胞との共培養系について、血管内皮細胞分化については他の方法に比較して効率よく分化したことが確認できた。このiPS細胞由来血管内皮細胞について、PAI-1欠損由来iPS細胞とコントロール(正常ヒト細胞からPAI-1欠損と同様にして樹立したiPS細胞)の比較を行った。細胞増殖についてはほぼ同様であった。一方で血管発芽アッセイにおいて、PAI-1欠損内皮細胞では発芽自体の促進は行ったが、伸長を抑制していた(投稿準備中)。また、iPS細胞とOP9細胞の共培養では血小板分化も観察される報告(Takayama et al. 2011)があるが、免疫染色等では血小板分化が確認できなかった。血小板分化については、さらなる検討が必要である。

我々は希少疾患iPS細胞の問題点を克服するため、ヒト血管内皮細胞株(EA.hy926)をゲノム編集により遺伝子置換したモデルを樹立した。シークエンス解析したところ、世界第2例目として報告のPAI-1欠損患者とほぼ同一な変異を持つ血管内皮細胞(PAI-KO)が樹立された。PAI-KOについて細胞表面プラスミン活性を測定したところ、非常に素早く高い活性が観察された。細胞増殖については患者由来iPS細胞での結果と同様、コントロール内皮細胞(EA.hy926)と同様であった。細胞遊走能についてスクラッチアッセイを行ったところ、EA.hy926はスクラッチした方向に細胞が遊走することを観察したが、PAI-KOではスクラッチした部分への移動ではなくランダムな方向に長距離遊走することを確認した。また、血管管腔形成アッセイにおいてPAI-KOは主軸となる管腔形成に影響はなかつ



た。また、血管管腔形成アッセイにおいてPAI-KOは主軸となる管腔形成に影響はなかつ

たものの、そこから生じる血管分枝の増加を認めた（図：投稿準備中）。これらは、PAI-1欠損患者において血管異常や成長には影響ないが、創傷治癒時の未熟血管新生が影響して遅延が生じることに繋がる可能性を示唆した。

以上より、PAI-1が血管新生初期段階で関与することが示唆されたため、PAI-1による時空間的制御を行い、血管新生を調節することによって、創傷治癒遅延のみならず腫瘍血管、末梢血管障害、糖尿病性網膜症等の治療に貢献できることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mochizuki Liina, Sano Hideto, Honkura Naoki, Masumoto Kazuma, Urano Tetsumei, Suzuki Yuko.	4. 巻 123
2. 論文標題 Visualization of Domain- and Concentration-Dependent Impact of Thrombomodulin on Differential Regulation of Coagulation and Fibrinolysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 16-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0042-1757407	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito Tae, Suzuki Yuko, Sano Hideto, Honkura Naoki, Castellino Francis J, Urano Tetsumei	4. 巻 122
2. 論文標題 Demonstration of Three Distinct High-Molecular-Weight Complexes between Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 and Tissue-Type Plasminogen Activator.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis and haemostasis	6. 最初と最後の頁 336-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1508-7919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mathews Nitty Skariah, Suzuki Yuko, Honkura Naoki, Sano Hideto, Iwashita Toshihide, Urano Tetsumei	4. 巻 210
2. 論文標題 Pre-administration of a carboxypeptidase inhibitor enhances tPA-induced thrombolysis in mouse microthrombi: Evidence from intravital imaging analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis research	6. 最初と最後の頁 78-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2021.12.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yuko, Tanaka Hiroki, Horinouchi Takahiro, Sano Hideto, Honkura Naoki, Unno Naoki, Miwa Soichi, Urano Tetsumei	4. 巻 10
2. 論文標題 Fibrinolysis-resistant carbonylated fibrin detected in thrombi attached to the vascular wall of abdominal aortic aneurysms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77582-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Yuko, Sano Hideto, Mochizuki Liina, Honkura Naoki, Urano Tetsumei	4. 巻 4
2. 論文標題 Activated platelet-based inhibition of fibrinolysis via thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activation system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5501 ~ 5511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hiroki, Zaima Nobuhiro, Kugo Hirona, Yata Tatsuro, Iida Yasunori, Hashimoto Keisuke, Miyamoto Chie, Sasaki Takeshi, Sano Hideto, Suzuki Yuko, Moriyama Tatsuya, Shimizu Hideyuki, Inuzuka Kazunori, Urano Tetsumei, Unno Naoki.	4. 巻 63
2. 論文標題 The Role of Animal Models in Elucidating the Etiology and Pathology of Abdominal Aortic Aneurysms: Development of a Novel Rupture Mechanism Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Vasc Surg	6. 最初と最後の頁 382-390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2019.08.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Sano Hideto
2. 発表標題 TAFI-dependent inhibition of fibrinolysis by thrombomodulin.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野秀人
2. 発表標題 Impact of cellular fibrinolytic systems on angiogenesis and wound healing
3. 学会等名 第44回 日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野秀人
2. 発表標題 プラスミン活性亢進による血管内皮細胞動態への影響について
3. 学会等名 第69回中部日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sano Hideto
2. 発表標題 Effects of enhanced plasmin activity on the surface of vascular endothelial cells on their motilities
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis. (国際学会)
4. 発表年 2022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	浦野 哲盟 (Urano Tetsumei) (50193967)	浜松医科大学・医学部・特命研究教授 (13802)	
研究分担者	鈴木 優子 (Suzuki Yuko) (20345812)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	田中 宏樹 (Tanaka Hiroki) (50456563)	浜松医科大学・医学部・特任研究員 (13802)	

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