

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15909

研究課題名（和文）オンチップ血管網を用いたSturge-Weber症候群モデル構築と発症機序の解明

研究課題名（英文）Vessel-on-a-chip models for studying molecular mechanisms of Sturge-Weber syndrome

研究代表者

坂野 公彦（Banno, Kimihiko）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40865630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：スタージ・ウェーバー症候群は、顔面のポートワイン斑に加え、脳表面の血管病変が生じることで、難治性てんかんや発達遅滞を引き起こされる。申請者は、ヒトiPS細胞とゲノム編集を組み合わせ、さらに微小チップ上で灌流可能な血管網を作製することで、本症候群の血管病変の研究モデルを確立した。シングルセルRNA解析を用いることで、本症候群の血管で灌流を行った際に特異的に変化する遺伝子・遺伝子経路の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スタージ・ウェーバー症候群は生涯にわたり医療介護支援が必要な指定難病である。近年、原因となる遺伝子が同定されたが、詳しい病態は明らかになっていない。今回の研究では、本症候群のモデルiPS細胞の作製を行い、脈管疾患に対する新しい研究手法としての「微小チップ上の血管網と、その灌流技術」を用いることで、病態の一端を明らかにすることができた。今後さらに本研究手法を利用・応用することで、本疾患のみならず他の脈管疾患の病態解明や治療法開発への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Sturge-Weber syndrome causes intractable epilepsy and developmental delay due to vascular lesion on the brain surface in addition to port-wine stain on the face. Here, we established a perfusable vessel-on-a-chip model of the vascular lesions by combining human iPS cells and genome editing. Moreover, single cell RNA sequencing allowed us to identify the responsible genes and gene pathways that are specifically altered under perfusion conditions.

研究分野：小児科学

キーワード：スタージ・ウェーバー症候群 血管奇形 脈管奇形 オンチップ血管網 shear stress GNAQ ヒトiPS細胞 ゲノム編集

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スタージ・ウェーバー症候群 (Sturge-Weber syndrome, 以下 SWS) は、神経皮膚症候群の 1 つであり、本邦の患者数は約 1000 人、年間出生数は 10~20 人とされ、乳幼児期に発症、進行し、生涯にわたって医療介護支援が必要な指定難病である。顔面の赤あざ (ポートワイン斑) に加えて認められる脳表面の異常血管が、難治性てんかん・発達遅滞の原因とされるが、根本的治療法は存在していない。近年、GNAQ 遺伝子の体細胞変異 (R183Q 変異) がほぼ全症例の脳血管病変で認められることが報告された。GNAQ 遺伝子がコードする G<sub>q</sub> は、G タンパクファミリーに属し、R183Q 変異による G<sub>q</sub> の恒常的活性化によりホスホリパーゼ C の下流シグナルの活性化を起こすと考えられている。しかし、なぜ Sturge-Weber 症候群に特異的に生じる脳血管病変を引き起こすのか、ほとんどわかっていない。近年、野生型の G<sub>q</sub> については、Shear Stress (ずり応力) の種類に応じた活性化や、脳血流調節メカニズムへの関与など、血管灌流との関係性が示唆されている。しかし、これらの生理機構が変異型 G<sub>q</sub> の場合どうなるのかを検証できるような、研究モデルは存在していない。

2. 研究の目的

患者検体に山中 4 因子を導入して樹立される疾患 iPS 細胞は、非常に貴重な実験材料であるが、各 iPS 細胞同士で遺伝的背景の違いがあるため、表現型が本当に異なるのか、遺伝的背景の差なのか判別が付きにくい。そこでゲノム編集を用いると、遺伝的背景が均一 (isogenic) な疾患・コントロール iPS 細胞を作製でき、変異の有無に応じた表現型変化の評価が行いやすくなる。ゆえに、本研究に先立ち、正常コントロール (wild-type, 以下 WT) iPS 細胞 (WT-iPS) にゲノム編集を加えることで、SWS 特異的 iPS 細胞 (SWS-iPS) を作製した (図 1)。

本研究では、この SWS-iPS 細胞と WT-iPS 細胞を、血管内皮細胞へと分化誘導し、以下の微小チップを用いることで、チップ上で三次元の血管網を作製する。さらに血管網に対して灌流を加えることで細胞にどのような変化が生じるか、比較検討することで、GNAQ 変異が血管内皮細胞に与える影響について明らかにすることを目的とした。

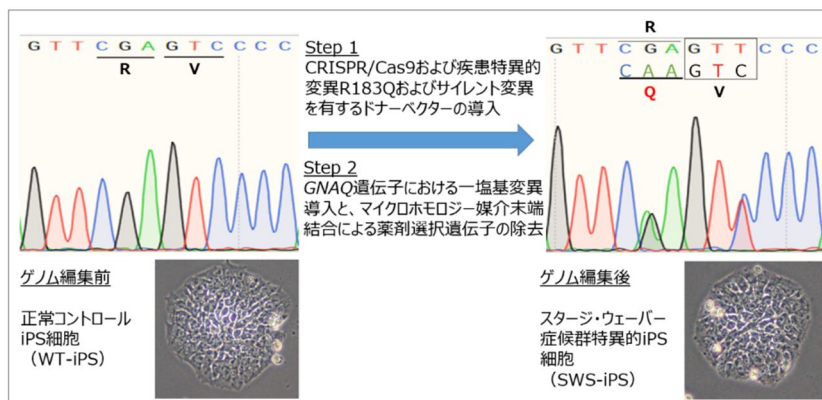


図1. スタージ・ウェーバー症候群特異的iPS細胞の作製

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞を用いたオンチップ血管網の作製と灌流

まず、ヒト iPS 細胞からの分化誘導により得られる血管内皮細胞を用いて、微小チップ上で血管網を作製させることに取り組んだ。京都大学工学研究科横川隆司研究室にて作成された微小チップ (図 2A) を用いて、中央のチャンネルに血管内皮細胞を懸濁したゲルを導入し、導入後約 7 日で、管腔形成することを確認した (図 2B)。形成された管腔は、薄い三次元構造になっており (図 2C) ローダミンデキストランを流すことで、灌流が可能になっていることが確認できた (図 2D)。また、作製された血管網は内径に差を有する多様な血管が構築されており、シミュレーションによって、血管に生じるずり応力にも高低が生じていることが予想された (図 2E)。さらに、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で、ミニポンプを用いることで、灌流しながらの培養を行うことに成功した (図 2F-G)。なお、当該実験を行うにあたり、播種する細胞数、培地に加えるサイトカインの種類・量・投与期間、また微小デバイス自体の形状 (チャンネル数・幅等) 灌流におけるマイクロポンプの流量、時間等について条件検討を行い、最適な条件を設定することができた。

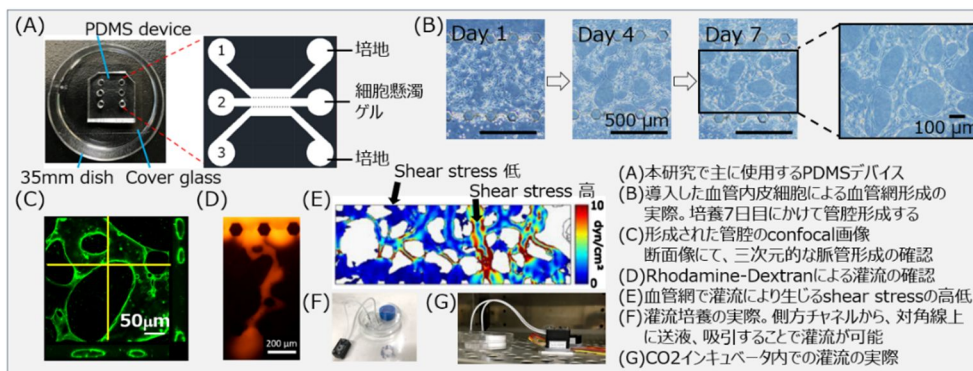


図2. 血管内皮細胞を用いたオンチップ血管網作製と灌流の実際

(2) WT-iPS および SWS-iPS 細胞由来血管網を用いたシングルセル RNA 解析と解析結果についての検証実験

WT-iPS 細胞由来血管内皮細胞も、SWS-iPS 細胞由来血管内皮細胞も、いずれも微小チップ上で血管網を形成することが確認できた。よって、それぞれの血管網で灌流を行ったものと、行わなかったものを比較した。図 2E のように、ヘテロな細胞集団によって血管網が構築されていることを踏まえ、1 細胞レベルで網羅的遺伝子発現解析を行うことのできる、シングルセル RNA 解析 (10x Genomics Chromium および Illumina Nova-seq) を行うことにした (図 3)。なお、当該実験を行うにあたり、デバイスからの細胞剥離法について、剥離酵素の種類、量、処理時間、ピペティングの手順や回数等の条件検討を行い、細胞の生存率をなるべく低下させないような最適な条件を設定した後に施行した。結果解析については、米国インディアナ大学内科の波戸岳博士と Jered Myslinski 研究員と共に行った。また、一部の結果については、細胞培養実験を再び行うことで検証を行った。

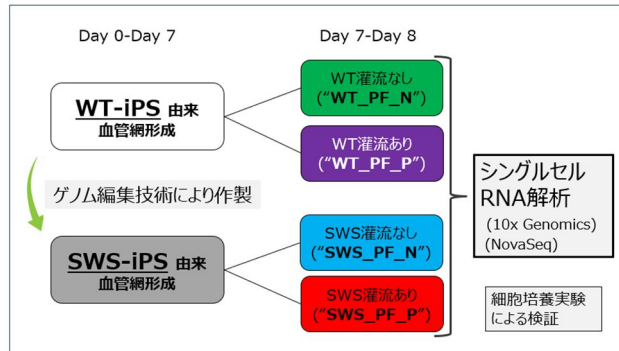


図3 疾患特異的血管網と灌流を組み合わせた解析手法

#### 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞にゲノム編集を行うことによる、SWS 特異的 iPS 細胞の作製、さらに灌流可能なオンチップ血管網とシングルセル RNA 解析を行うことで、以下のことが判明した。

オンチップ血管網は、ヘテロ性のある血管内皮細胞の集団 (および細胞分裂期の血管内皮細胞) と周皮細胞もしくは線維芽細胞の集団によって構成されていた。それぞれの集団の構成細胞の割合は、WT と SWS で異なっていた (図 4)。

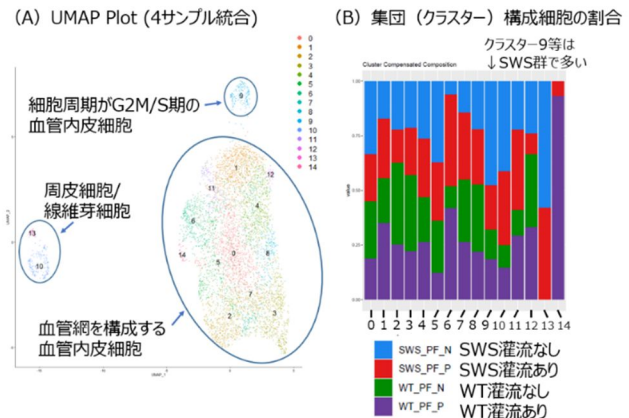


図4. シングルセルRNA解析の結果1

図 4 において細胞分裂期の血管内皮細胞の割合が SWS 群で多いことが示唆されたため、フローサイトメリーにて細胞増殖能について解析を行った (CFSE アッセイ) と、SWS 群で有意に細胞増殖が亢進していることが示された (図 5)。

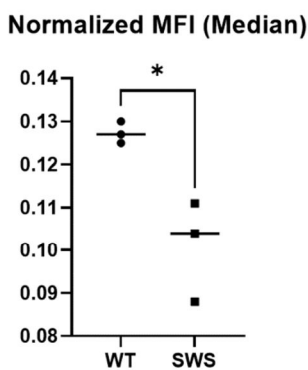


図5 シングルセルRNA解析の検証結果 (CFSE) (Mean Fluorescence Intensity; MFIが低いほど、細胞増殖性が高い)

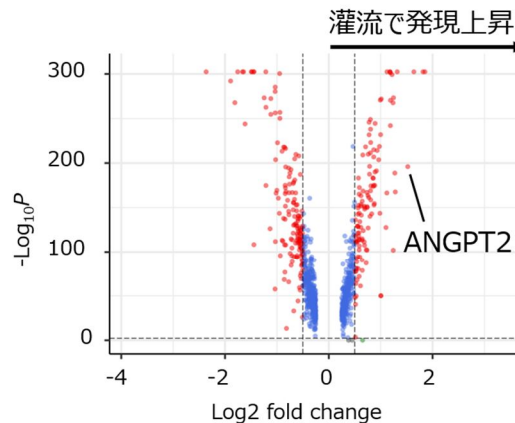


図6 シングルセルRNA解析の結果2 (DEG) (SWS群で灌流するとANGPT2の発現が上昇)

SWS 灌流あり群と灌流なし群で有意に発現変化する遺伝子 (differentially expressed genes; DEG) を調べたところ、灌流あり群で、ANGPT2 遺伝子発現が有意に上昇していた (図 6)。

これらの結果により、SWS 血管は増殖性を有すること、さらに灌流に対して特異的な遺伝子発現変化を起こすことにより、SWS の病態発現に寄与していることが示唆された。今後さらに、疾患病態に最も寄与している遺伝子・遺伝子経路を見出し、治療法開発に繋がるような病態解明を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文3件/うち国際共著2件/うちオープンアクセス3件）

1. 著者名 Kawatani K, Nambara T, Nawa N, Yoshimatsu H, Kusakabe H, Hirata K, Tanave A, Sumiyama K, <u>Banno K</u> , Taniguchi H, Arahori H, Ozono K, Kitabatake Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 A human isogenic iPSC-derived cell line panel identifies major regulators of aberrant astrocyte proliferation in Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02242-7	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	国際共著 該当しない

1. 著者名 Gil CH, Chakraborty D, Vieira CP, Prasain N, Li Calzi S, Fortmann SD, Hu P, <u>Banno K</u> , Jamal M, Huang C, Sielski MS, Lin Y, Huang X, Dupont MD, Floyd JL, Prasad R, Longhini ALF, McGill TJ, Chung HM, Murphy MP, Kotton DN, Boulton ME, Yoder MC, Grant MB.	4. 巻 8
2. 論文標題 Specific mesoderm subset derived from human pluripotent stem cells ameliorates microvascular pathology in type 2 diabetic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abm5559	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	国際共著 該当する

1. 著者名 Lin Y†, <u>Banno K</u> †*, Gil CH†, Myslinski J, Hato T, Shelley WC, Gao H, Xuei X, Liu Y, Basile DP, Yoshimoto M, Prasain N, Tarnawsky SP, Adams RH, Naruse K, Yoshida J, Murphy MP, Horie K, Yoder MC*. (†equal contribution)(*Corresponding author)	4. 巻 8
2. 論文標題 Origin, prospective identification, and function of circulating endothelial colony-forming cells in mice and humans	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.164781	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	国際共著 該当する
---------------------------	--------------

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演1件/うち国際学会2件）

1. 発表者名 <u>Banno K</u> , Woltjen Knut, Yoshida J, Horie K.
2. 発表標題 Disease modeling of Sturge-Weber syndrome by seamless genome editing in human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 <u>坂野公彦</u>
2. 発表標題 臍帯血に存在し、脈管形成能を有する血管内皮細胞集団の詳細解析
3. 学会等名 第66回日本新生児成育医学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 <u>坂野公彦</u> 、Lin Y、Gil CH、Myslinski J、Hato T、成瀬勝彦、吉田純子、堀江恭二、Mervin C Yoder.
2. 発表標題 ヒトおよびマウスの循環血液中に存在し、脈管形成能を有する血管内皮細胞集団の由来、前方視的的同定、および機能評価
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 <u>Banno K</u>
2. 発表標題 Perfusable vasculature-on-chip for modeling Sturge-Weber syndrome
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Angiogenesis) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 <u>Banno K</u>
2. 発表標題 Perfusable vasculature-on-chip for modeling Sturge-Weber syndrome.
3. 学会等名 The Sturge-Weber Foundation SWFIRN and Clinical Care Network Conference (招待講演・国際学会)
4. 発表年 2023年

〔その他〕

The Scientist's Journal Club (Transcriptomics) にてweb講演 (2023年) <u>Banno K</u> Origin, Prospective Identification, and Function of Circulating Endothelial Colony-Forming Cells in Mice and Humans ( <a href="https://www.the-scientist.com/the-scientist-s-journal-club-transcriptomics-71384">https://www.the-scientist.com/the-scientist-s-journal-club-transcriptomics-71384</a> )
--

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	
アメリカ	インディアナ大学	コーネル大学



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gil CH, Chakraborty D, Vieira CP, Prasain N, Li Calzi S, Fortmann SD, Hu P, Banno K, Jamal M, Huang C, Sielski MS, Lin Y, Huang X, Dupont MD, Floyd JL, Prasad R, Longhini ALF, McGill TJ, Chung HM, Murphy MP, Kotton DN, Boulton ME, Yoder MC, Grant MB.	4. 巻 8
2. 論文標題 Specific mesoderm subset derived from human pluripotent stem cells ameliorates microvascular pathology in type 2 diabetic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abm5559	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 Kawatani K, Nambara T, Nawa N, Yoshimatsu H, Kusakabe H, Hirata K, Tanave A, Sumiyama K, Banno K, Taniguchi H, Arahori H, Ozono K, Kitabatake Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 A human isogenic iPSC-derived cell line panel identifies major regulators of aberrant astrocyte proliferation in Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02242-7	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 Lin Y, Banno K (筆頭著者, 責任著者), Gil CH, Myslinski J, Hato T, Shelley WC, Gao H, Xuei X, Liu Y, Basile DP, Yoshimoto M, Prasain N, Tarnawsky SP, Adams RH, Naruse K, Yoshida J, Murphy MP, Horie K, Yoder MC.	4. 巻 8
2. 論文標題 Origin, prospective identification, and function of circulating endothelial colony-forming cells in mice and humans.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e164781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.164781	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Banno K, Woltjen Knut, Yoshida J, Horie K.
2. 発表標題 Disease modeling of Sturge-Weber syndrome by seamless genome editing in human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂野公彦
2. 発表標題 臍帯血に存在し、脈管形成能を有する血管内皮細胞集団の詳細解析
3. 学会等名 第66回日本新生児成育医学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂野公彦、Lin Y、Gil CH、Myslinski J、Hato T、成瀬勝彦、吉田純子、堀江恭二、Mervin C Yoder.
2. 発表標題 ヒトおよびマウスの循環血液中に存在し、脈管形成能を有する血管内皮細胞集団の由来、前方視的同一性、および機能評価
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Banno K
2. 発表標題 Perfusable vasculature-on-chip for modeling Sturge-Weber syndrome
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Angiogenesis) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Banno K
2. 発表標題 Perfusable vasculature-on-chip for modeling Sturge-Weber syndrome.
3. 学会等名 The Sturge-Weber Foundation SWFIRN and Clinical Care Network Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

The Scientist's Journal Club (Transcriptomics) にてweb講演 (2023年)  
Banno K  
Origin, Prospective Identification, and Function of Circulating Endothelial Colony-Forming Cells in Mice and Humans  
(<https://www.the-scientist.com/the-scientist-s-journal-club-transcriptomics-71384>)

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

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			
米国	Indiana University School of Medicine	Cornell University		