

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20725

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来血管内皮細胞を用いた糖尿病性血管障害モデルの構築

研究課題名（英文）Establishment of a model of diabetic vascular dysfunction using human iPS cell-derived vascular endothelial cells.

研究代表者

堀 英生（Hori, Eisei）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・講師

研究者番号：90903526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において我々の研究室で開発したヒトiPS細胞由来血管内皮前駆細胞に高濃度の血管内皮増殖因子を添加することによって動脈血管内皮マーカーであるEphB2およびNOTCH11の遺伝子発現とEPHB2のタンパク質発現が増加した動脈様の血管内皮細胞を作製することが可能となった。また、本研究で作製した動脈様血管内皮細胞は、糖尿病患者で増加する腫瘍壊死因子TNF- α を添加し炎症反応を惹起することで動脈硬化の発症初期段階の反応を再現することが可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、糖尿病で生じる動脈硬化の発症・進展機序およびその治療法には、糖尿病モデル動物の血管組織やヒト初代血管内皮細胞が使用されている。しかし、糖尿病モデル動物では種差や動物愛護、初代血管内皮細胞では、増殖能力に限界があるなど問題が生じている。本研究で作製したヒトiPS由来動脈様血管内皮細胞は、これらの問題を解決することができる。また、今回作製した動脈様血管内皮細胞は、動脈硬化の初期段階における血管内皮細胞障害を再現することが可能であるためその治療法の開発にも使用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was possible to generate arterial-like vascular endothelial cells with increased gene expression of the arterial vascular endothelial markers EphB2 and NOTCH11 and protein expression of EPHB2 by adding high concentrations of vascular endothelial growth factor from human iPS cell derived endothelial progenitor cells developed in our laboratory. The arterial-like vascular endothelial cells were found to be able to reproduce the response in the early stages of atherosclerosis development by adding the tumor necrosis factor TNF- α , which is increased in diabetic patients, to induce an inflammatory response.

研究分野：糖尿病

キーワード：血管内皮細胞 動脈硬化 iPS細胞 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者では、動脈硬化性の疾患である冠動脈疾患および脳血管疾患の発症率が高いことが明らかとなっている。この糖尿病における動脈硬化の発症・進展を促進する機序として酸化ストレスの亢進とそれによる血管内皮障害が示唆されている¹⁾。これまでに血管における酸化ストレスの産生を亢進する機序として、NADPH オキシダーゼ (Nox) の活性化やミトコンドリアの機能異常などが報告²⁾されているが、研究の多くは、糖尿病モデル動物から単離された血管組織やヒト初代血管内皮細胞が使用されている。しかし、糖尿病モデル動物では、種差の問題があり、その結果をそのまま外挿することは困難である。また、動物愛護の観点から代替方法が模索されており、血管系についてもマイクロ流体デバイスの開発が試みられているが³⁾、血管のバリア機能、血管新生および血栓の発生など一部の機能を評価するモデルが多く、動脈硬化の発症・進展を網羅的に評価できるモデルが開発されているとは言えない。一方、ヒト初代血管内皮細胞には、増殖能力に限界があること、また、組織特異性があるにもかかわらず考慮されていないなどの問題がある。そのため、ヒト iPS 細胞を用いて血管内皮細胞への分化誘導が試みられているが、ヒト初代培養細胞と同等の機能を有していないこと、さらに、動脈の性質を持った血管内皮細胞への分化誘導も行われているが、動脈の性質を有する期間が限られている⁴⁾などの問題点が存在しており改善する余地が残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多能性幹細胞であるヒト iPS 細胞を用いて高機能を有する動脈様の血管内皮細胞の分化誘導並びに生体模倣システム (MPS) を利用したデバイスの開発を行い、糖尿病によって促進される動脈硬化に対する治療法の開発に利用可能な血管モデルを創製することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来動脈様血管内皮細胞の作製

まず初めに、当研究室で開発した ヒト iPS 細胞 (802-3 株) 由来血管内皮前駆細胞 (iEPC) を用いて以下の要因を考慮し、動脈様血管内皮細胞への分化誘導法を行った。

- 1) 添加因子の検討：血管内皮増殖因子 (VEGF)、モリデュスタット、アペリン
- 2) 血清 (代替物) の検討：(Knockout serum replacement (KSR)、ウシ血清アルブミン (FBS))

動脈様血管内皮細胞への分化は、real time PCR 法を用いた動脈特異的マーカー (EFNB2、NOTCH1) および静脈特異的マーカー (NR2F2) の遺伝子発現、並びに免疫蛍光染色法を用いた血管内皮マーカー (CD31、VE-カドヘリン、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS))、動脈特異的マーカー (EphrinB2) および静脈特異的マーカー (COUP-TF II) のタンパク質発現にて評価を行った。

(2) 作成した動脈様血管内皮細胞における血管内皮細胞障害機序の評価

高血糖条件および炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 TNF- α を 24 時間添加し炎症を惹起し、WST-8 溶液を用いた細胞生存率アッセイ、蛍光プローブを用いた蛍光染色による活性酸素種 (ROS) の産生について評価を行った。また、real time PCR 法を用いて ROS 産生の主要な機序の一つである Nox の発現および eNOS の遺伝子発現量について評価を行った。

(3) 血管チップの開発

現在、我々が開発している 2 層からなるデバイス (図 1) において血管内皮細胞が培養可能であるかの検討を行った。デバイスの 1 層を用いてヒト iPS 細胞から分化誘導した脳細小血管内皮細胞 (iBMEC) の静置培養および培地灌流時における培養の条件検討を行った。さらに、iBMEC で発現しているタイトジャンクションマーカーである ZO-1 の遺伝子およびタンパク質発現の確認を行った。遺伝子の発現の評価には real time PCR 法を、タンパク質発現確認には、免疫染色法を用いた。

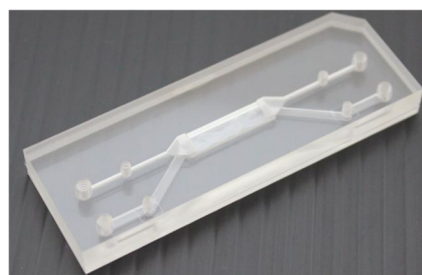


図 1 血管チップ

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞由来 EPC から分化誘導した血管内皮細胞の動脈特異性

EPC から動脈様血管内皮細胞の分化誘導条件を検討した結果、低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素阻害薬であるモリデュスタットやアペリン受容体アゴニストであるアペリンの添加では、動脈マーカーである EFNB2、NOTCH1 や静脈特異的マーカーである NR2F2 の遺伝子発現に大きな変化は認められなかった。一方、高濃度の VEGF を添加し作用させたところ動脈マーカーである EFNB2、NOTCH1 の遺伝子発現の増加および静脈特異的マーカーである NR2F2 の減少

が認められた。また、これらの遺伝子発現の結果は、ヒト臍帯血動脈血管内皮細胞と同等の傾向を示した。さらに、高濃度 VEGF で分化誘導した血管内皮細胞における各種マーカーのタンパク質発現を免疫染色法にて検討したところ、動脈マーカーである EphrinB2 と血管内皮マーカーである CD31 および VE-カドヘリンの発現が確認された。一方、静脈マーカーである COUP-TF II の発現が低いことが確認された(図 2)。続いて、高濃度 VEGF 添加条件で血清(代替物)の検討を行い、従来使用していた KSR と FBS と比較検討を行った。FBS 添加群では、動脈マーカーである EFNB2、NOTCH1 の遺伝子発現の増加が認められたものの、静脈マーカーである NR2F2 の遺伝子についても増加が認められたため、従来どおり、動脈様血管内皮細胞への分化誘導には、KSR を用いることとした。

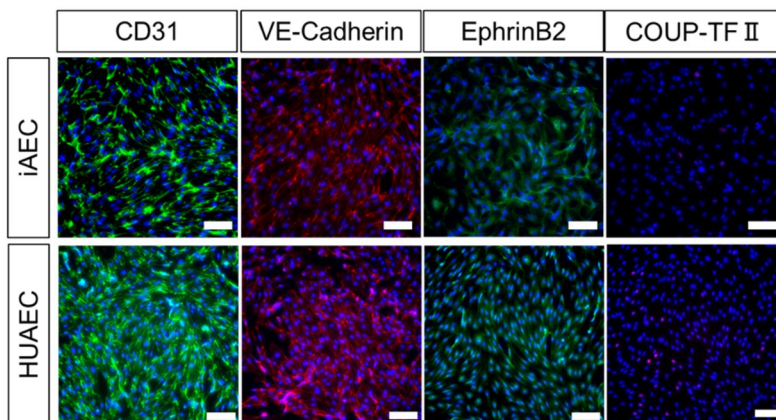


図 2 分化誘導した動脈様血管内皮細胞のタンパク質発現

方法：免疫染色法、Scale bar : 100 μm、iAEC : ヒト iPS 細胞由来動脈様血管内皮細胞、HUAEC : ヒト臍帯動脈内皮細胞

以上のことから当研究室で作製した EPC から動脈特異性のある血管内皮細胞を作製することができたと考えられる。

(2) ヒト iPS 細胞由来動脈様血管内皮細胞 (iAEC) における血管内皮障害の再現

上記で作製したヒト iAEC を高血糖条件で培養し ROS の産生を確認したところ対照群と比べ変化は認められなかった。

一方、腫瘍壊死因子 TNF- α を添加し培養したところ対象群に比べ、TNF- α 投与群では、ROS の産生増加が確認された(図 3)。続いて、ROS の主要な産生機序である Nox の遺伝子発現を確認したところ、Nox4 および p22^{Phox} の遺伝子発現の増加が確認された。また、血管を拡張する eNOS の発現減少が確認された。

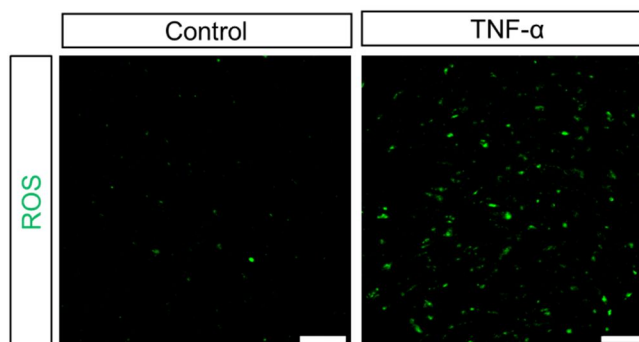


図 3 TNF- α 添加による ROS の産生

Scale bar : 100 μm

以上のことから動脈硬化を引き起こす原因とされている ROS 産生増加による血管内皮障害の一部を再現することができたと考えられる。

(3) 血管チップにおける血管内皮細胞の培養条件

開発中の血管チップの一層を用いて静置並びに培地を灌流した状態においても血管内皮細胞 (iBMEC) の培養が可能かについて検討を行った。その結果、静置培養に加え、灌流時においても培養が可能であることが分かった。また、灌流時、iBMEC で発現するタイトジャンクションマーカーである ZO-1 の遺伝子発現や免疫染色法によるタンパク質発現も確認され、既存のセルカルチャーインサートを用いて培養した iBMEC と遜色がないことを確認することができた。

<引用文献>

- 1) Joshua A Beckman, Mark A Creager, Peter Libby, Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management, JAMA, 287, 2002, 2570-2581
- 2) Zahra Fatehi-Hassanabad 1, Catherine B Chan, Brian L Furman, Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes, Eur J Pharmacol., 636, 2010, 8-17
- 3) Karli Gold, Akhilesh K Gaharwar, Abhishek Jain, Emerging trends in multiscale modeling of vascular pathophysiology: Organ-on-a-chip and 3D printing, Biomaterials., 196, 2019, 2-17
- 4) Takeshi Ikuno, Hidetoshi Masumoto, Kohei Yamamizu, Miki Yoshioka, Kenji Minakata, Tadashi Ikeda, Ryuzo Sakata, Jun K Yamashita, Correction: Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP, PLoS One., 12, 2017, e0176238

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田涼馬、森下匠、堀英生、坂下真大、岩尾岳洋、松永民秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来 動脈様血管内皮細胞の 炎症ストレス応答性の評価
3. 学会等名 第11回日本くすりと糖尿病学会学術集会
4. 発表年 2023年～2024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
---------------------------	-----------------------	----

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