

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011～2013
 課題番号：23790847
 研究課題名（和文） ヒト iPS /ES 血管誘導技術によるヒト血管分化機構の解析と疾患 iPS 研究への応用
 研究課題名（英文） Analysis of differentiation process from human ES/iPS cells into vascular cell components and researches using disease-specific iPS cells with vascular disorders.
 研究代表者
 曾根 正勝 (SONE MASAKATSU)
 京都大学・医学研究科・講師
 研究者番号：40437207

研究成果の概要（和文）：

ヒト iPS 細胞/ES 細胞から血管を構成する内皮細胞・壁細胞へ分化する過程において各種ホルモン及びその受容体がどのように変化するかを明らかにした。また、血管が傷害される難病（脳動脈瘤合併多発性嚢胞腎、もやもや病、大動脈炎症候群など）の患者から樹立した疾患 iPS 細胞から、申請者らが開発した分化誘導法を用いて血管内皮細胞と壁細胞を誘導・単離し、その解析により脳動脈瘤では診断のバイオマーカーの発見、もやもや病では疾患の血管障害の病態の再現などに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We clarified the transition of the expression of humoral factors and their receptors in the differentiation process from human ES/iPS cells to vascular cell components.
 We induced vascular endothelial cells and mural cells from patient-specific iPS cells of inherited vascular disorders, and compared these cells with those of healthy volunteers. In some diseases, we succeeded in detecting a diagnostic marker and showing the significance of a susceptibility gene mutation in vascular cell dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：幹細胞、iPS 細胞、ES 細胞、血管、再生医療

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、動脈硬化性疾患・虚血性疾患の治療を目指し、血管リモデリングおよび血管再生における血管ホルモン作用の解明と血管再生治療への応用の研究を行ってきた。また、申請者は、世界で初めて霊長類であるサル ES 細胞から血管構成細胞の分化誘導に成功し、霊長類 ES 細胞では血管分化過程においてマウスとの間に違いがあることを見出

した (Circulation. 2003 ;107(16):2085-8.)。その知見を応用し、ヒト ES 細胞から血管構成細胞、すなわち血管内皮細胞および壁細胞へと至る分化過程を解明している (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 ;27(10):2127-34.)。また、適切な分化段階を選んでマウス下肢虚血モデル等へ経動脈的に移植すると、これらの細胞が宿主の血管に取り込まれ血流を回復させるという

結果を得ている (PLoS ONE. 2008;3(2):e1666., J Transl Med. 2008;6:54.)。さらに、このヒト ES 血管分化誘導技術をヒト iPS 細胞に応用・適用することにも成功し (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 ;29(7): 1100-3.)、その血管分化系をフィーダーフリー・血清フリーに改良し、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞を高効率に単離・純化する技術の確立に成功している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト ES 細胞血管分化誘導系を用いたヒト血管分化・成熟・老化過程での各種因子の働きの解明と、ヒト iPS 細胞血管分化誘導技術を用いた疾患特異的 iPS 細胞による各種疾患の血管障害の病態解明である。ヒトでは胎児やノックアウト人間を用いた研究は倫理的に不可能であり、iPS 分化研究はマウスでなくヒトで行うことに大きな意義があり、これらの手法はヒトの臓器分化過程の解明やヒト疾患の病態における遺伝子の働きの解明に有用なツールとなり得る。申請者らがこれまで培ってきたヒト iPS/ES 細胞血管分化誘導技術を用い、各種ホルモン・液性因子およびその受容体、物理的的刺激や外部環境、酵素、薬剤などが血管の分化・成熟に与える影響を解析しヒトの血管分化・成熟に関わる因子の知見を得る。またそれらの結果をフィードバックして血管分化誘導系をさらに改良し、ヒト ES/iPS 細胞を用いた血管研究の基盤技術をより有用なものにする。

そして、その技術を用いて先天的な要因によって生じる各種血管障害疾患の疾患特異的 iPS 細胞から血管構成細胞を誘導し、健常人 iPS 細胞由来の血管構成細胞とその遺伝子発現の際や機能面の差異を解析することにより、血管障害の病態解明および診断のバイオマーカーや治療標的分子の発見を目指す。

3. 研究の方法

ヒト iPS/ES 細胞→中胚葉→血管前駆細胞→血管構成細胞へと至る血管分化各ステップ毎の液性因子の産生能及びその受容体の発現の変化を解析し、血管分化過程におけるそれらの変化と働きを調べる。

京都大学 iPS 細胞研究センターの長船らが樹立した動脈瘤を有する多発性嚢胞腎患者 iPS 細胞、京都大学環境衛生学分野の小泉らが樹立したもやもや病患者 iPS 細胞、京都大学神経内科の猪原らが樹立した遺伝性脳症血管病 (CADASIL) 患者 iPS 細胞、その他血管障害疾患の患者 iPS 細胞から、申請者らの技術を用いて血管内皮細胞、壁細胞を誘導・単離し、健常人 iPS 細胞由来の血管内皮細胞、壁細胞と遺伝子発現の差異や機能的差異について比較解析する。

4. 研究成果

ヒト ES/iPS からの血管構成細胞分化誘導系を用いて各種薬剤や細胞外マトリクスの働きを解析し、ヒト ES/iPS→中胚葉→血管前駆細胞→血管構成細胞へと至る血管分化過程において、細胞外マトリクスの違いにより細胞の接着効率と分化誘導効率が異なることがわかった。また、ヒト ES/iPS 細胞から血管構成細胞に至る過程でのステップバイステップでの遺伝子発現の解析において、エンドセリンは血管内皮細胞に分化して初めて発現する、アドレノメデュリンは血管壁細胞・内皮細胞の両方に発現する、B 型ナトリウム利尿ペプチドは血管前駆細胞の段階で強い発現が認められる、その受容体のうち GC-B はユビキタスに存在するが GC-A は血管内皮細胞に分化して初めて出現するなど、各種血管ホルモンとその受容体の発現が経時的に変化することを解明した。現在それらの意義について検討中である。

また、ヒト iPS/ES 由来の血管内皮細胞と、成人大動脈血管内皮細胞、伏在静脈血管内皮細胞などとの遺伝子発現を比較解析したところ、我々の血管分化誘導法で誘導したヒト iPS/ES 由来血管内皮細胞は CXCR4、DLL4 等の発現が成人の動脈内皮細胞と同等以上に高く、静脈内皮細胞より動脈内皮細胞の系統に分化していると考えられた。

また、ヒト iPS/ES 細胞からの血管構成細胞の分化誘導法について、これまでフィーダーフリーの分化誘導と単離技術を確立していたが、クローン間による分化誘導効率の差異が大きかったため、single cell に分散して血管細胞分化誘導を開始する分散培養誘導法を確立し、血管細胞分化誘導効率のばらつき、分化過程タイムコースのばらつきの両方の減少を認めた。

一方、血管障害疾患の疾患特異的 iPS 細胞研究については、大動脈炎症候群、冠攣縮性狭心症について患者の同意を得て線維芽細胞の採取を行い、最近 CiRA で開発されたエピソードベクターを用いたゲノムへの外来遺伝子の挿入のない手法を用いて疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。

また、他グループとの共同研究にて、我々が開発したヒト iPS/ES からの血管構成細胞分化誘導系を用いて、脳動脈瘤を伴う多発性嚢胞腎、もやもや病などからの血管構成細胞分化誘導にも成功した。

脳動脈瘤を合併した多発性嚢胞腎患者の疾患 iPS 細胞の共同研究においては、脳動脈瘤合併例の iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞では、脳動脈瘤非合併例から誘導した血管内皮細胞に比べマトリクスメタロプロテアーゼ 1 の発現が高いことを見出した。その差異は未分化 iPS 細胞同士では認められず、血管

内皮細胞に分化した段階でのみ認められる変化であり、脳動脈瘤合併多発性嚢胞腎患者の血清中での測定においても健常人に比べマトリクスメタロプロテアーゼ1の発現が高いことがわかった（投稿中）。また、もやもや病の疾患特異的 iPS 細胞の共同研究においては、疾患感受性遺伝子 *Mysterin* の RNF213 領域に変異のある患者と健常人では、線維芽細胞同士では差がないにもかかわらず、iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞を3次元培養するとその tube formation 能に差が生じることを見だし、その原因として細胞分裂に関わる因子を同定している（投稿中）。これらの成果は、血管障害疾患における疾患特異的 iPS 細胞を用いた我が国での初めての成果であり、今後の疾患特異的 iPS 細胞を用いた血管研究において重要なマイルストーンであると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計8件）

(1) Sone M, Nakao K.

Vascular research using human pluripotent stem cells and humoral factors .

Endocr J. 2013 Apr 28;60(4): 397-402. (Review, 査読無)

(2) Koyama N, Miura M, Nakao K, Kondo E, Fujii T, Taura D, Kanamoto N, Sone M, Yasoda A, Arai H, Bessho K, Nakao K.

Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells.

Stem Cells Dev. 2013 Jan 1;22(1):102-13. doi: 10.1089/scd.2012.0127. (査読有)

(3) Sonoyama T, Sone M (corresponding author), Honda K, Taura D, Kojima K, Inuzuka M, Kanamoto N, Tamura N, Nakao K. Differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells into steroid-producing cells.

Endocrinology. 2012 Sep;153(9):4336-45. doi: 10.1210/en.2012-1060. (査読有)

(4) Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K, Nakao K.

Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation.

Diabetologia. 2012 Jun;55(6):1689-98. doi: 10.1007/s00125-012-2508-2. (査読有)

(5) Inuzuka M, Tamura N, Sone M, Taura D,

Sonoyama T, Honda K, Kojima K, Fukuda Y, Ueda Y, Yamashita Y, Kondo E, Yamada G, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Mikami Y, Sasano H, Nakao K.

A case of myelolipoma with bilateral adrenal hyperaldosteronism cured after unilateral adrenalectomy.

Intern Med. 2012;51(5):479-85. (査読有)

(6) Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Nakao K.

Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver. Endocrinology. 2012 Jan;153(1):492-500. doi: 10.1210/en.2011-1310. (査読有)

(7) Sonoyama T, Sone M (corresponding author), Miyashita K, Tamura N, Yamahara K, Park K, Oyamada N, Taura D, Inuzuka M, Kojima K, Honda K, Fukunaga Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K.

Significance of adrenocorticotropin stimulation test in the diagnosis of an aldosterone-producing adenoma.

J Clin Endocrinol Metab. 2011 Sep;96(9):2771-8. doi: 10.1210/jc.2011-0573. (査読有)

(8) Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, Nakatsuji N.

Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells.

Cell Transplant. 2011;20(9):1423-30. doi: 10.3727/096368910X547444. (査読有)

〔学会発表〕（計7件）

(1) 田浦大輔、曾根正勝、長船健二、小嶋勝利、錦見俊雄、本田恭子、荒井宏司、中尾一和

ヒト iPS 細胞を用いた血管細胞分化研究の疾患解析への応用

第86回 日本内分泌学会学術総会
2013. 4. 26 (仙台市)

(2) 園山拓洋、曾根正勝、本田恭子、田浦大輔、小嶋勝利、犬塚 恵、金本巨哲

田村尚久、中尾一和

ヒト ES 細胞・iPS 細胞からのステロイド産生細胞の分化誘導法の開発

第86回 日本内分泌学会学術総会 若手研究奨励賞

2013. 4. 25 (仙台市)

(3) 曾根正勝、田浦大輔、中尾一和
ヒト ES/iPS 細胞を用いた血管障害の病態解明と創薬の可能性
第 35 回 日本高血圧学会総会
2012. 9. 21 (名古屋市)

(4) 園山拓洋、曾根正勝、本田恭子、田浦大輔、小嶋勝利、犬塚 恵、金本巨哲、田村尚久、中尾一和
ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発
第 11 回 日本再生医療学会学術総会 若手研究奨励賞
2012. 6. 12 (横浜市)

(5) 田浦大輔、曾根正勝、小嶋勝利、長船健二、園山拓洋、本田恭子、福田賢英、錦見俊雄、中尾一和
ヒト ES 細胞からの血管細胞分化過程における各種血管ホルモンの発現、作用機序の検討
第 85 回 日本内分泌学会学術総会
2012. 4. 21 (名古屋市)

(6) 曾根正勝、中尾一和
血管の保護・再生への幹細胞と心血管ホルモンを用いたアプローチ
第 85 回 日本内分泌学会学術総会 研究奨励賞受賞講演
2012. 4. 20 (名古屋市)

(7) 田浦大輔、曾根正勝、錦見俊雄、長船健二、小嶋勝利、園山拓洋、本田恭子、中尾一和
The Application of Human ES/iPS Cell Differentiation System into Vascular Cells for Vascular Pathology
第 76 回 日本循環器学会学術総会
2012. 3. 16 (福岡市)

[図書] (計 1 件)
Sonoyama T, Sone M, Nakao K.
Gene therapy and regenerative medicine for metabolic syndrome.
Nihon Rinsho. 2011 Jan;69 Suppl 1:716-20.
Review.

[産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)
名称 : METHOD OF EXAMINING POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE AND METHOD OF SCREENING FOR THERAPEUTIC AGENT OF THE DISEASE
発明者 : 長船健二、塩田文彦、豊田太郎、中尾一和、曾根正勝、田浦大輔
権利者 : 京都大学、長船健二、塩田文彦、豊田太郎、中尾一和、曾根正勝、田浦大輔
種類 : 特許権

番号 : PCT/JP2011/006203
出願年月日 : 2011/11/7
国内外の別 : 国際出願 (PCT)

名称 : MITOCHONDRIAL DISEASE-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, METHOD OF PRODUCING SAME AND USE THEREOF
発明者 : 中尾一和、藤倉純二、細田公則、曾根正勝、中尾一泰
権利者 : 京都大学、中尾一和、藤倉純二、細田公則、曾根正勝、中尾一泰
種類 : 特許権
番号 : PCT/JP2012/067256
出願年月日 : 2011/6/30
国内外の別 : 国際出願 (PCT)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
曾根 正勝 (SONE MASAKATSU)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号 : 40437207