

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 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790876
 研究課題名（和文） 特発性／遺伝性肺動脈性肺高血圧症の疾患特異的 iPS 細胞の樹立および解析
 研究課題名（英文） Modeling the Idiopathic/Heritable Pulmonary Arterial Hypertension with induced pluripotent stem cells
 研究代表者
 楠本 大 (KUSUMOTO DAI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：70571727

研究成果の概要（和文）：当研究では肺動脈性肺高血圧(PAH)の病態解明、新規治療法開発のため、BMPR2 あるいは Alk1 遺伝子変異を有する重症肺高血圧患者から iPS 細胞を樹立し血管内皮細胞に分化誘導し機能解析を行った。低酸素化培養によって肺環境を模倣したところ Alk1 遺伝子変異を有する肺高血圧患者由来の血管内皮細胞(PAH-EC)では管腔形成能の亢進を認め、病態形成に関与していると考えた。また Alk1 の下流である Smad1,5、BMPR2 の下流である Smad2,3 のリン酸化に関しては明らかな差異は認めず、未知のシグナル経路が病態に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated induced pluripotent stem cell(iPSC)s from patients with severe IPAH/HPAH having gene mutation of BMPR2 or Alk1, and differentiated them into endothelial cell(EC)s to clarify pathological condition and to investigate novel treatment of PAH. We found the ability of lumen formation is increasing in PAH-EC of Alk1 mutation under the hypoxic culture condition, although there were no significant change under the usual culture condition. Next, the phosphorylation of smad1,5 and Smad2,3 which are downstream of Alk1 and BMPR2 respectively were examined by western blotting, and we found no significant difference between them. It indicates unknown signal pathway affects phenotypes such as lumen formation ability under the hypoxic culture condition of PAH-ECs.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

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：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

特発性／遺伝性肺動脈性肺高血圧症(IPAH/HPAH)は、海外での発症頻度は 100 万人に 1 人とされるが、本邦における発症頻度は高く、厚労省の調査によれば 100 万人に 8.92 人と計算される。未治療の場合予後は極めて不良であり、成人例では平均生存期間は 2.8 年とされている。近年 PAH の病態に関する報告が数多くなされており、病態の進展に関与するといわれている PGI2、エンドセリ

ン、NO をターゲットとした薬剤が使用可能となり、更に新薬も開発途上にある。しかしながら、現時点で薬物療法は PAH 根治には至らず、また薬物不応例では病状は進行の一途をたどる。そのため肺移植の適応となる症例も多く、本邦における肺移植の約 25% を IPAH/HPAH が占めている。肺移植に関してもドナーの不足、免疫拒絶など解決すべき問題点があり、満足のいく治療法とはなっていない。

PAHの根治療法が開発されていない原因として、いまだに病態に関しては不明瞭なことも多いという事があげられる。PAH研究では、肺高血圧モデル動物が最も用いられている。しかしながら、本当にこれらのモデル動物が実際の病態を反映できているかどうかは分からず、患者由来の培養細胞を用いた実験が必須である。しかしながら病態形成に関わっているといわれる血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の初代培養は難しく、実験に必要な細胞を大量に得ることは困難である。

2006年京都大学の山中教授らは、マウス皮膚線維芽細胞に4つの転写因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)を導入することにより、胚性多能性幹(ES)細胞と比べて遜色のない能力を持ったiPS細胞の開発に成功し(K. Takahashi et al.: Cell 126: 663-676, 2006)、翌年にはヒトiPS細胞樹立にも成功した。iPS細胞は樹立した患者自身の遺伝背景をそのまま有していると考えられるため、難病患者から採取した体細胞からiPS細胞を樹立し目的の細胞へ分化誘導させることで、従来は細胞を得ることが困難であった心臓や神経、血管などの疾患の病態解明、あるいは新薬の開発につながる疾患モデルとなることが期待された。様々な神経疾患、血液疾患、心疾患患者からの疾患特異的iPS細胞を樹立し、目的の細胞に分化させて病態を再現したという報告が相次いでされている。本研究では、IPAH/HPAHの患者からiPS細胞を樹立し血管内皮細胞に分化させることで、PAHの病態を再現することのできる新たな疾患モデルを作成し、表現型を解析することで新規治療法や薬剤感受性などの開発に結びつけることを目標とする。

2. 研究の目的

上記のように、IPAH/HPAHは肺高血圧症をきたす予後不良の難病である。治療法も進歩しつつあるが、いまだに根治は望めず、薬剤不応例では病状は急速に進行する。近年BMP2、Alk1などの遺伝子変異が同定されつつあるが、いまだに病態の完全な解明には至っていない。当研究では、BMP2およびAlk1遺伝子変異を有する重症肺高血圧患者から疾患特異的iPS細胞を樹立し血管内皮細胞に分化誘導することで、PAHの病態を解明し新規治療法開発に結びつけることのできる新たな疾患モデルの作成を目的とする。

3. 研究の方法

(1) iPS細胞の樹立

まずは、特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症患者からiPS細胞を樹立した。対象患者としては、多くの患者が遺伝子変異を有しているという報告がされているBMP2あるいはAlk1遺伝子変異を有する重症肺高血圧患者

とした。我々は、末梢血T細胞からiPS細胞を安定的に樹立できるという報告をしており(T. Seki. et al.: cell stem cell 7:11-14, 2010)、患者への侵襲度を考えて同方法によりiPS細胞を樹立を行った。採血した血液検体はフィコール法により単核球層を分離採取し、培養ディッシュ上にて抗CD3抗体を加えた培地で培養を行った。4~7日でT細胞がコロニーを形成し増殖してきたタイミングで、センダイウィルスを用いて山中4因子(Oct4, Sox2, Klf4, C-Myc)をT細胞に導入した。フィーダー細胞上でiPS細胞培養液にて3~4週間培養を行うと、ES細胞様の形態を呈したiPS細胞が得られた。iPS細胞コロニーをピックアップし後の実験に用いた。

(2) 血管内皮細胞への分化誘導

樹立したiPS細胞より、血管内皮細胞へ分化誘導を行った。ヒトES細胞/iPS細胞から血管内皮細胞を分化誘導する方法は多くの報告がなされているが、我々はCollagen 1 coated dish上で接着培養する系(Tatsumi R. et al.: Cell Transplant: 20(9):1423-30, 2011)を参考にこの報告を参考に、若干の変更を加え血管内皮細胞の分化誘導を行った。iPS細胞を適度に砕き、collagen1 coated dish上に播種し、分化誘導培地を用いて8~10日間ほど培養すると血管内皮細胞を含んだ細胞群が増殖してくる。これらの細胞群をディッシュからはがし、血管内皮細胞マーカーを用いてFACSにて細胞の分離を行った。またソーティングした細胞をVEGF添加培地で培養することで、血管内皮細胞をさらに増殖させ、後の実験に用いた。

(3) 表現型の解析

次に、得られた肺高血圧患者由来血管内皮細胞(PAH-EC)における表現型の検討を行った。

① 定常状態での血管内皮細胞の形質解析

PAHの進展は、肺動脈内膜における血管内皮細胞の増殖による肺血管床の減少と、肺動脈中膜における平滑筋細胞の肥大増殖による肺動脈の収縮・攣縮に特徴づけられる。肺動脈内血管内皮細胞障害が生じると、血管内皮細胞にアポトーシスが生じる。その際に増殖性のサイトカインが発生し、アポトーシス抵抗性の内皮細胞が異常増殖するとされている。また平滑筋細胞の増殖も誘導し、内膜・中膜肥厚が生じる。結果的に肺動脈の血管閉塞が起り、肺高血圧を発症すると考えられる。

PAH-ECにおいても、仮説で考えられている通り異常増殖を示すかどうかEdUを用いた系にて増殖能の評価を行った。また管腔形成能異常を有するかどうかTube formation assay

を用いて評価を行った。

②ストレス下での血管内皮細胞の形質解析

PAH 患者では表現型は肺血管に限局しており、肺血管特異的に表現型を出すメカニズムがあるはずである。現在、それは環境因子やストレスが関与しているのではないかとされている。肺血管では生理的に最も酸素分圧が低い状況から、ガス交換により高濃度酸素に暴露されるという環境にあり、その事が病態開始に関与している可能性を考えた。

具体的には低酸素培養を行うことで血管内皮細胞の表現型に変化が認められるかどうかを検討した。低酸素暴露後に上記の増殖能評価、管腔形成能評価を行った。

また ALK-1, BMPR II のリガンドである BMP9, TGF- β 1, 2 を添加した条件にても表現型の差が認められるかどうか、増殖能および管腔形成能の評価を行った。

③シグナル経路の検討

PAH 発症の分子機序は、TGF- β /BMP シグナル伝達系の不均衡によるという説が一般的である。これらのシグナルは、肺動脈壁におけるアポトーシスと細胞増殖のバランスを取っており、バランスが崩れることで病態を生じるというものである。BMPR2 を介する系は、血管平滑筋に対しては細胞増殖の抑制、血管内皮細胞に対してはアポトーシスの抑制に働いているため、BMPR2 異常により血管内皮細胞のアポトーシスとそれに続く異常増殖を招き、また平滑筋細胞の異常増殖をもたらすと考えられる (J. H. Newman. et al. :Ann Intern Med 148:278-283, 2008)。

そこで本研究においても、Alk1 の下流である Smad1, 5, BMPR2 の下流である Smad2, 3 のリン酸化について検討を行った。また Alk1, BMPR2 遺伝子変異によって蛋白形成異常が起きていないかどうか免疫染色にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の樹立

今回我々は Alk1 あるいは BMPR2 遺伝子変異を有する患者より、それぞれ iPS 細胞の樹立を行った。センダイウィルスを用いて患者より得られた T 細胞にリプログラミング因子を導入し、コントロール群と同様に 3~4 週間の時点で多数の iPS 細胞コロニーを得ることができた。この中で、それぞれの患者につき 20~30 ラインほどの iPS 細胞コロニーのピックアップを行い、増殖させることにより後の実験を行った。得られた iPS 細胞は、形態学的にはコントロール群と差異を認めず、また増殖能に関しても明らかな差異は認めなかった。

iPS 細胞の未分化性を検証するために、幹

細胞マーカーである Oct3/4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81 の免疫染色を行ったところ、コントロール群、PAH 群共に強陽性であり、未分化能を有していることが明らかとなった。

また iPS 細胞が多分化能を有しているかどうか検証するため、免疫不全マウスの精巣に iPS 細胞を injection し数か月後に奇形種が得られるかどうか検討したところ、いずれの群においても奇形種の形成を行い、また HE 染色を行うことで顕微鏡下に観察し、外胚葉である神経、皮膚組織、中胚葉である軟骨組織、血管、内胚葉である腸管が得られていることを確認し、三胚葉分化能を有していることを証明した。

(2) 血管内皮細胞への分化誘導

コントロール群および PAH 群由来 iPS 細胞を、上記の方法にて血管内皮細胞へ分化誘導を行った。分化誘導開始後およそ 9 日目に FACS による解析を行ったところ、血管内皮マーカーである VE カドヘリン陽性の細胞が 5~10% 程度得ることができた。複数ラインを用いて分化効率の検討を行ったところ、両群にて差異は認めなかった。FACS にて VE カドヘリン陽性細胞を選択的に分離し、PAH 患者由来血管内皮細胞 (PAH-EC) を得た。PAH-EC のキャラクターを定量するために血管内皮細胞マーカーである CD31, VE カドヘリン, vWF にて免疫染色を行ったところいずれも強陽性であり、血管内皮細胞のキャラクターを有していることが分かった。また機能的な役割を有しているかどうか検討するため LDL の uptake を検討したところ、両群とも非常に良好な取り込みを示し、機能的血管内皮細胞であると考えられた。

(3) 表現型の検討

上記の通り、コントロール群および ALK1 遺伝子変異群、BMPR2 遺伝子変異群において増殖能および管腔形成能の評価を行った。通常培養下で血管内皮細胞を 1 度継代したのちに EdU にて評価を行ったが、3 群ともに有意差は認めなかった。また管腔形成能についても同様に有意差は認めなかった。

次に BMP9, TGF- β 1, 2 を用いたリガンド刺激にて検討を行ったが、こちらに関しても増殖能、管腔形成能ともに明らかな差異は認めなかった。

低酸素培養として酸素濃度 1-5% にて 24-48 時間培養を継続し表現型の検討を行った。増殖能に関しては 3 群共に明らかな差異は認めないようであったが、Tube formation assay を用いた管腔形成能の評価では 1% の酸素濃度下での培養により ALK-1 遺伝子変異 PAH-EC 群ではコントロール群に比べ、管腔形成の増加を認め、低酸素下での血管新生能の

亢進が病態形成に関与している可能性が考えられた。

また遺伝子変異の影響で ALK1、BMP2 タンパク発現に異常を生じていないかどうか免疫染色にて検討を行ったが、細胞膜上での発現が確認され、定性的評価にては差異は認めないようであった。

次に、Alk1 の下流である Smad1, 5、BMP2 の下流である Smad2, 3 のリン酸化についてウェスタンブロット法を用いて検討を行ったが、リン酸化に関しては明らかな差は認めず、低酸素化条件にて初めて差異が生じる可能性、または未知のシグナル経路が病態形成に関与している可能性が考えられ、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Onizuka T, Yuasa S, Kusumoto D, Shimoji K, Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. J Mol Cell Cardiol; 52(3):650-9: 2012 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① Kusumoto D, Yuasa S, Fukuda K 「Novel model of diabetic vascular complication using induced pluripotent stem cell」『Keystone symposia J6: Diabetes - New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment』Keystone, Colorado, USA (January 27 - February 1, 2013) ポスター発表

② Dai Kusumoto, Shinsuke Yuasa, Tomohisa Seki, Toru Egashira, Masaki Kodaira, Hisayuki Hashimoto, Makoto Takei, Atsushi Tanaka, Yusuke Kuroda, Kouichiro Homma, Taichi Sugisaki, Junnichi Irie, Keiichi Fukuda. 「Modeling the anti-atherosclerosis by patient-specific induced pluripotent stem cells」『第 77 回日本循環器学会学術集会 (The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society)』横浜 (March 15 - March 17, 2013) 口頭発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 大 (KUSUMOTO DAI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 70571727