

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890298

研究課題名(和文)加齢・老化関連疾患の発症に関わる恒常性維持変容としての糖鎖機能の解明

研究課題名(英文)The clarification of functional roles of glycoconjugates in onset of age- and senescence-related diseases

研究代表者

佐々木 紀彦(Sasaki, Norihiko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：80639063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血管の加齢や老化を試験管内で検証するため、様々な年齢のヒト由来iPS細胞について分化誘導を行い、主な血管構成細胞である血管内皮細胞を樹立した。分化効率には由来年齢や糖鎖発現が関連していることが示唆された。樹立されたヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞について加齢や老化現象を検討するため、ヒト初代培養血管内皮細胞を用いて、自然細胞老化やストレス性老化の評価系を検討した。自然細胞老化およびストレス性老化を再現良く検出できた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate aging and senescence of human blood vessel in vitro, I have established human vascular endothelial cells, main component of blood vessel, from human induced pluripotent stem cells (iPS cells), which are various in age. The efficiency of endothelial differentiation is various and it has been suggested that various efficiency may be related to derivation age of iPS cells and expression pattern of glycoconjugates. Next, to evaluate aging and senescence of vascular endothelial cells derived from iPS cells, I tested assay of aging, replicative senescence and stress-induced senescence using primary human vascular endothelial cells. In primary human vascular endothelial cells, aging, replicative senescence and stress-induced senescence have been observed reproducibly.

研究分野：幹細胞生物学、糖鎖生物学、血管生物学

科研費の分科・細目：実験病理

キーワード：血管内皮細胞 加齢 老化 糖鎖 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う疾患は恒常性維持機構の変容、破綻によって起こると考えられ、超高齢社会にある日本において健康長寿の達成のために小児期からの疾患対策と予防は、急務の課題である。そのためには、加齢や老化に関わる疾患発症の分子メカニズムの解明が必要である。しかし、ヒトにおいては個体での長期間の解析の難しさや環境要因の問題により、加齢に伴った臓器機能の低下の分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった。

人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、細胞医療への応用だけでなく、疾患モデルとしての期待も高い。実際に疾患患者由来の iPS 細胞を用いた研究の例があり、患者由来の細胞が疾患を反映し、個体レベルでの研究が難しい疾患の分子メカニズムの解明に役立つと考えられている。一方、ヒト iPS 細胞を用いた加齢や老化現象に関する研究成果は報告されていなかった。

細胞表面には、膜蛋白質や脂質に修飾された形で糖鎖が発現しており、多彩な機能を担っている。これまでに申請者らは、多能性幹細胞であるマウス ES 細胞やヒト iPS 細胞について、未分化および分化状態で細胞表面の糖鎖の発現様式が変化し、それぞれの発現様式が各分化状態に関わるシグナル応答性の制御に重要であることを明らかにした (Sasaki et al. *JBC*, 283, 3594-3606, 2008; Sasaki et al. *Plos One*, 4, e8262, 2009; Sasaki et al. *BBRC*, 401,480-486, 2010; Sasaki et al. *Stem Cells*, 29, 641-650, 2011)。加齢による長期の時間経過においても糖鎖の発現様式に変化が認められるという報告が少数あり、加齢に伴った機能変化に糖鎖が関係していると考えられていた。

2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では、ヒト iPS 細胞由来の血管細胞がヒト血管の加齢、老化モデルとして有用であるか、さらに血管細胞の機能変化に関わる糖鎖を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)由来年齢の異なるヒト iPS 細胞からの血管細胞の誘導

由来年齢の異なるヒト iPS 細胞から、血管細胞として血管内皮細胞の誘導を行う。方法としては、胚様体を介する方法(Gokoh et al. *Cellular Reprograming*, 13, 361-370, 2011)と胚様体を介さない方法(Tatsumi et al. *Cell Transplantation*, 20, 1423-1430, 2011)について検討を行う。血管内皮細胞の確認は、LDL の取り込みアッセイ及び各種血管内皮細胞マーカーの発現を FACS 解析で行う。

(2)血管細胞における加齢、老化現象の評価

系の検討

自然細胞老化の検討

ヒト血管細胞として、ヒト大動脈血管内皮細胞を用い、継代数により細胞老化が誘導されるか老化マーカーである p16 や SA-β-Gal 活性の発現を検討する。さらに、細胞レベルで個体年齢を反映した結果が得られるか由来年齢の異なる細胞で比較を行う。

ストレス誘導性老化の検討

ヒト大動脈血管内皮細胞において、酸化ストレスとして過酸化水素で短時間処理した後、数日後に細胞老化が誘導されるか検討する。

4. 研究成果

(1)由来年齢の異なるヒト iPS 細胞からの血管細胞の誘導

まず、胚様体を介する方法により血管内皮細胞の誘導を試みた。由来年齢の異なる iPS 細胞の種類に寄らず、胚様体は形成された。しかし、胚様体形成後、方法に従い接着培養を行ったが、血管内皮細胞マーカーの発現はほとんど誘導されず、この方法での血管内皮細胞の誘導は難しいと考えられた。



図1: 血管内皮細胞誘導の流れ

次に、胚様体を介さない方法(図1)を検討した。GSK3β阻害剤である BIO の処理により Wnt シグナルを活性化させることで中胚葉マーカーの発現と共に中胚葉分化が誘導され、さらに7日目から SFM+VEGF で培養することで、由来年齢により効率は異なるが、血管内皮細胞のマーカーである VE-cadherin 陽性細胞が誘導されることがわかった(図2)。

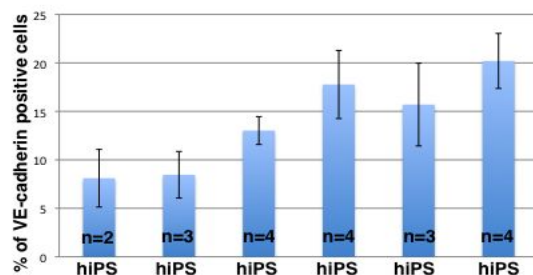


図2: 血管内皮細胞の誘導効率

誘導9日目の VE-cadherin 陽性細胞についてソーティングで分離し、SFM+VEGF にて培養を行った。2回目の継代後に各種血管内皮細胞マーカーで確認した結果、LDL の取り込み及び血管内皮細胞マーカーの発現が確認され、血管内皮細胞を樹立できたことがわかった(図3)。

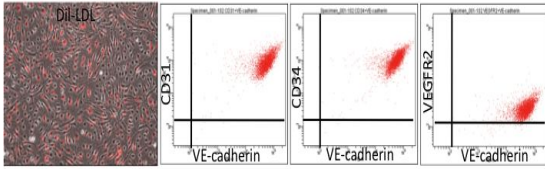


図3: 血管内皮細胞マーカーの発見

図2の結果のように、由来年齢によって血管内皮細胞の分化効率に違いが見出された。その違いが何に起因しているかを検討するため、手始めに各iPS細胞の血管内皮細胞の誘導過程における糖鎖発現の検討を行った。Q-PCR法により糖鎖関連遺伝子の発現について解析を行った結果、誘導効率の違いを反映するように明らかに発現パターンに違いのある遺伝子が見出された(図4)。

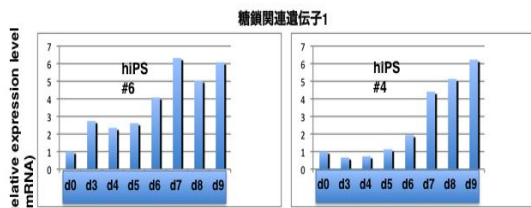


図4: 血管内皮細胞誘導過程における糖鎖関連遺伝子の違い

(2) 血管細胞における加齢、老化現象の評価系の検討

自然細胞老化の検討

ヒト大動脈血管内皮細胞について継代を繰り返し、継代ごとに老化マーカーであるSA-β-Gal活性の検出及びp16遺伝子の発現についてQ-PCR法で検討した。その結果、培養期間の増加と共にSA-β-Gal活性陽性細胞率の増加とp16遺伝子の発現増加が認められ、自然細胞老化を検出することができた。

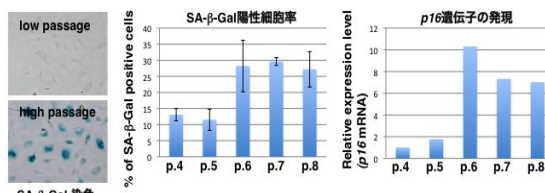


図5: 継代数に伴う細胞老化の検出

さらに、由来の個体年齢を反映した老化が検出されるか、3種類の年齢の異なるヒト大動脈血管内皮細胞について、少ない継代数で合わせた状態でSA-β-Gal活性及びp16遺伝子の発現について比較を行った。2つの老化マーカーに関して、由来年齢に比例して高いことがわかった(図6)。

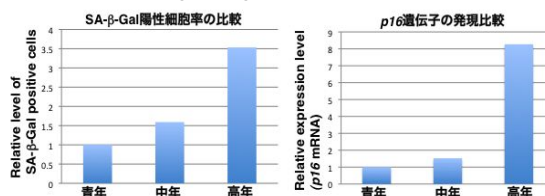


図6: 由来年齢の違いによる比較

ストレス誘導性老化の検討

まずは、酸化ストレスとして過酸化水素で2時間処理を行い、アポトーシスが誘導されない過酸化水素の濃度を検討した。ヒト大動脈血管内皮細胞について、各過酸化水素濃度で2時間処理を行い、3日間培養後にアポトーシスの有無について検討した。250μM~300μMまではアポトーシスは誘導されなかった(図7)。

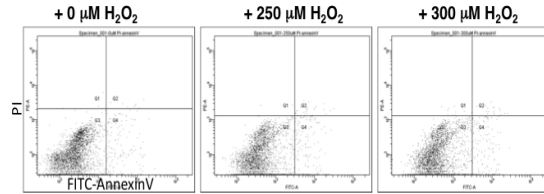


図7: アポトーシスを誘導しない酸化ストレス条件の検討

250μM または 300μM の過酸化水素で2時間処理後、3日目に細胞老化の検討を行った結果、老化マーカーであるSA-β-Gal活性及びp16蛋白の発現が確認され(図8)、この条件においてストレス誘導性老化が誘導されることがわかった。

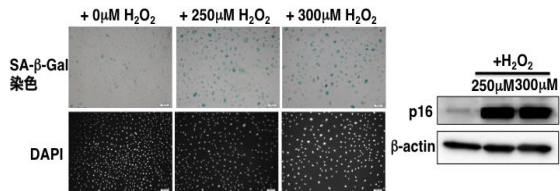


図8: ストレス誘導性老化の検出

さらに、3種類の年齢の異なるヒト大動脈血管内皮細胞について、ストレス誘導性老化の比較を行った結果、由来の年齢に関わらず、酸化ストレス後48時間前後からSA-β-Gal活性陽性細胞が増加することがわかった(図9)。

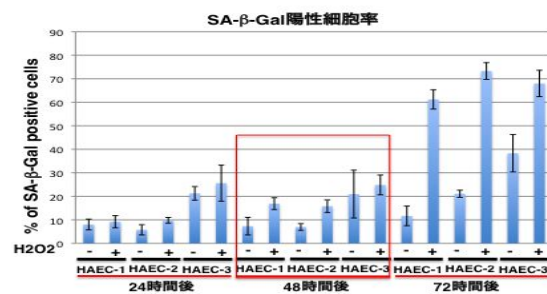


図9: ストレス誘導性老化の比較

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)

Sasaki N and Toyoda M, Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells, *Int. J. Vasc. Med.*, 査読有り, VOL2013, 2013, pp. 1-10, DOI: 10.1155/2013/963596

〔学会発表〕(計 1 件)

Sasaki N and Toyoda M, “ The identification of aging and senescence-related glycoconjugates in human vascular endothelial cells ”, 18th International Vascular Biology Meeting, at Kyoto, April, 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 紀彦 (NORIHICO, Sasaki)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所) ・ 東京都健康長寿医療センター研究所 ・ 研究員
研究者番号 : 80639063