

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08514

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来血管細胞分化誘導法の血管病態解明への応用

研究課題名(英文) The application of vascular cell differentiation methods from human iPS cells into vascular physiology

研究代表者

田浦 大輔 (Taura, Dasiuke)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10558612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化に代表される血管病態に関して、その分子メカニズムの全貌は未だに不明と考えられる。本研究では先天的な異常により血管の障害を発症する患者からiPS細胞を樹立し、そのiPS細胞から血管構成細胞を分化誘導し、その機能や遺伝子発現の異常を研究することで、各種疾患の血管病態のin vitroでの再現・解明を目的とした。本研究では家族歴のある高安病、CADASILから樹立したiPS細胞等の血管細胞分化および解析を行った。結果、CADASIL-iPS由来血管壁細胞を用いて、疾患で見られるGOMといった病態が再現でき、コントロール壁細胞との比較で増殖能他が異なることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞からの血管構成細胞の分化誘導法に関してはこれまでに我々の研究室以外からも複数の報告があるが、我々の誘導法は簡便で再現性も高く、また血管内皮細胞のみならず、血管壁細胞も誘導できるというメリットを持つ。この誘導法を用いて本研究ではCADASILと高安病という遺伝的素因が病態に関連している血管関連疾患に罹患した患者様から樹立したiPS細胞を用いて、血管細胞誘導および試験管内病態再現を目指して研究した。結果CADASIL-iPSを用いた研究につき、病態解明に繋がる病態再現に成功し、これを発表した。これら血管関連疾患の新規治療法に繋がる知見が得られることが期待できる成果である。

研究成果の概要(英文)：Although many studies have been performed about human vascular pathological conditions such as arteriosclerosis, the whole picture of the molecular mechanism is still unknown. In the present study, iPS cells were established from patients who developed vascular disorders due to congenital abnormalities, and vascular cells were induced from the iPS cells using the vascular differentiation method already established by ourselves. We performed differentiation and analysis of vascular cells using iPS cells established from patients with CADASIL or Takayasu disease with a family history.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：血管再生 疾患特異的iPS細胞 血管内皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた本邦における現在の死因第一位はがんであるものの、依然、死因の2位、3位には心臓病、脳卒中が占めている。動脈硬化を基盤として発症する心血管病は単に生命を脅かすのみならず、脳卒中に代表されるように罹患者のADLを著しく損なう可能性があり超高齢者社会における介護問題とも直結するため、その予防、治療は社会的に大問題である。動脈硬化に代表される血管病態に関してこれまで多くの研究がなされたがその分子メカニズムの全貌は未だに不明と考えられる。ヒトの血管組織に対する更なる理解、また、血管を病態の本体とする各疾患に関する研究を積み重ねることで、動脈硬化に対する新たな知見、さらには新規治療法開発を目指せるのではないかと考えられる。

ヒトの血管病態を研究するためのアプローチ法としては様々なものが考えられる。その中で申請者らの教室では動脈硬化病変を基盤とした虚血性疾患に対する血管再生療法、さらには新たな治療法開発を目的とし、胚性幹細胞からの血管分化につき研究を重ねてきた。申請者はヒトiPS細胞からの血管(血管内皮細胞および壁細胞の双方)および脂肪細胞分化研究を実施し、世界に先駆けてその分化誘導に成功した。これら一連の研究成果を背景に、現在各種他研究機関との共同研究にて、複数の疾患特異的iPS細胞を用いた血管関連疾患の解析を実施している。

### 2. 研究の目的

申請者らは、すでに血管関連疾患特異的iPS細胞を用いた研究として、多発性嚢胞腎(ADPKD)およびもやもや病患者から樹立したiPS細胞を用いた血管分化研究を遂行し、その成果を報告している。本研究では、これら研究で培ったノウハウを生かし、遺伝歴のある高安病患者母娘から樹立したiPS細胞を用いた高安病解析研究および共同研究として実施しているNOTCH3変異によって引き起こされる遺伝性脳血管疾患CADASIL患者由来iPS細胞を用いたCADASILの解析の二つを実施し、臨床応用に繋がる知見を得ることを第一の目的とする。さらに既に実施したもやもや病およびPKDの疾患特異的iPS細胞血管分化研究のデータおよび健常人iPS細胞由来血管細胞のデータも追加した上で、横断的な解析を加えることで血管病態と関連する新規治療法的因子を見出したい。

### 3. 研究の方法

#### (1)家族歴を認める高安病患者、CADASIL患者から樹立したiPS細胞の血管細胞分化研究

高安病およびCADASIL-iPS細胞研究に関しては、すでにiPS細胞は樹立済みである。高安病発症の病態に関しては未だに不明な点が多いが、高安病患者では血中のTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18濃度が有意に高かったという報告もあり(Park M.C. et al. Rheumatology 2006)、特にサイトカイン発現に着目してデータ解析を行う。さらに当大学免疫膠原病内科との共同研究で、該当患者の血清、またはiPS細胞から誘導したリンパ球を使用することで、高安病における血管細胞と免疫系の相互作用に関する試験管内病態モデルの作成を行う。国立循環器病研究センターの猪原匡史先生、山本由美先生らとの共同研究であるCADASILに関しては一回膜貫通型受容体notch3の遺伝子変異により引き起こされることが既知であり、コントロールiPS由来血管細胞と分化誘導過程、効率の比較は実施済みである。現在EC、SMCの双方での遊走能、収縮能を比較検討中で、今後DNAマイクロアレイ法を用いることでNOTCH3以外のどのような遺伝子の発現変動が見られるかを検討する。

#### (2)血管関連疾患特異的iPS細胞研究の横断的データベース構築、血管関連新規治療因子探索

現在までに複数の(健常人由来)ヒトES/iPS株を対象にDNAマイクロアレイを実施し、未分化、

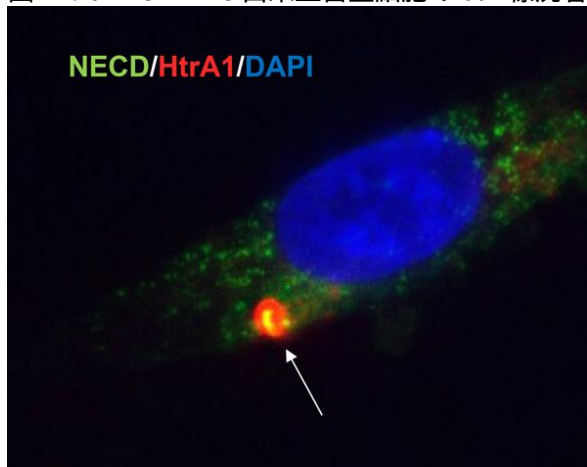
我々の血管細胞誘導システムにおける誘導過程産物、EC、MC の chip data を作成済みである。既に構築したこれらマイクロアレイデータに多発性嚢胞腎、もやもや病、CADASIL といった疾患特異的 iPS 細胞研究で得られた血管細胞サンプルを統合し、それぞれの疾患でどのような血管関連遺伝子の発現が上下しているか、さらには、比較的病態に近い血管関連疾患で共通して動く新たな治療標的遺伝子はないか、といった検索を行う。それによって、個別の疾患病態の理解だけでなく、広く血管関連病態に共通する新規治療標的因子を検出することを最終的な目標とする

#### 4 . 研究成果

まず、ヒト iPS 細胞からの血管細胞誘導技術の応用研究として、ヒト血管分化過程におけるナトリウム利尿ペプチドの発現、特に CNP とその受容体の発現について検討した。同時に血管において CNP と競合的に作用すると考えられるエンドセリン 1 およびその受容体の発現も検討した。エンドセリンは我々の血管細胞誘導系において、血管内皮細胞に分化した時のみ強発現し、血管壁細胞に分化しても発現を認めなかった。ナトリウム利尿ペプチド受容体の中の NPR - A は血管内皮細胞で強く発現し、NPR - B は分化過程、血管内皮細胞、血管壁細胞と abundant に発現を認めた。これらの検討結果は、ヒトの血管に対する CNP およびエンドセリンの作用を考える上で貴重な結果と考えられ、これを報告した。

他施設との共同で実施している血管関連の疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究では、notch3 の遺伝子異常によって引き起こされる、遺伝性の血管関連疾患である CADASIL 患者から樹立した疾患特異的 iPS 細胞の解析を完遂し、研究成果を論文報告した。この研究では、我々の誘導系を用いて、iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞のみならず、壁細胞についても解析した。CADASIL iPS 細胞由来壁細胞において、CADASIL の病態としてこれまでに知られている、NOTCH3 タンパク質の細胞外部分の凝集、細胞骨格アクチン繊維の構造異常、および PDGFR の増加が再現されていることが確認された。また、CADASIL 患者の血管壁に観察される GOM (Granular osmiophilic material) と呼ばれる凝集体が再現され、CADASIL に見られるように NOTCH3 細胞外部分と HtrA1 というタンパク質が含まれていた (図 1)。これは、CADASIL-iPS 細胞由来の壁細胞が、CADASIL の病態モデルとして信頼できることを示していると考えられる。さらに、健常コントロール群との比較の結果、CADASIL の壁細胞において細胞遊走能が亢進しており、これに変異 NOTCH3 と過剰発現した PDGFR が関わっていることが示唆された。

図 1 : CADASIL-iPS 由来血管壁細胞の GOM 様沈着物



高安病 iPS を用いた研究に関しては、母、娘双方が高安病に罹患している症例の母娘両方から複数の iPS 細胞株を樹立済みであり、こちらを用いて血管細胞分化誘導を行い、cDNA マイクロ

アレイによる遺伝子網羅的解析を既に実施している。免疫関連遺伝子に絞って解析した結果、IL7 レセプター、IL8 レセプターなどの発現が高安病 iPS 由来血管内皮細胞で亢進していると考えられた。このため、RT-PCR にてさらに検討したところ、IL7-R に関しては、PCR でも有意に高安 iPS 由来血管内皮細胞で発現が亢進していることが確認できた。他、冠攣縮性狭心症患者から樹立した iPS 細胞を用いた研究に関しても弘前大学循環器科との共同研究を新たに開始した。

これらの研究にて得られた iPS 細胞由来血管細胞に関して、順次、cDNA マイクロアレイデータに新規データとして組み込んでいる。現在、採取時期を合わせて、一括した新たな RNAseq 解析をすることを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae SI, Nakajima T, Okamoto N, Taura D, Nasu M, Shimazu T, Ryosaka M, Li Z, Sone M, Ikeya M, Watanae A, Osafune K.	4. 巻 Apr 7;31(1)
2. 論文標題 A modular differentiation system maps multipul human kidney lineages from plulipotent stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Report	6. 最初と最後の頁 107476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.040.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taura D, Nakao K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Sone M, Nakao K.	4. 巻 Sep;98(9)
2. 論文標題 C-type natriuretic peptide (CNP)/Guanylate cyclase B (GC-B) system and endothelin-1(ET-1)/ET receptor A and B system in human vasculature.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Can J Physiol Pharmacol	6. 最初と最後の頁 611-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/cjpp-2019-0686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Yumi, Kojima Katsutoshi, Taura Daisuke, Sone Masakatsu, Washida Kazuo, Egawa Naohiro, Kondo Takayuki, Minakawa Eiko N., Tsukita Kayoko, Enami Takako, Tomimoto Hidekazu, Mizuno Toshiki, Kalaria Raj N., Inagaki Nobuya, Takahashi Ryosuke, Harada-Shiba Mariko, Ihara Masafumi, Inoue Haruhisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Human iPS cell-derived mural cells as an in vitro model of hereditary cerebral small vessel disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	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) 10.1186/s13041-020-00573-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分担者	曽根 正勝  (Sone Masakatsu)  (40437207)	聖マリアンナ医科大学・代謝・内分泌内科・教授   (14301)	

	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
研究 協力者	長船 健二  (Osafune Kenji)		

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