

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16163

研究課題名(和文)血管発生分化過程における内分泌因子の働きのヒトES/iPS細胞を用いた解析

研究課題名(英文) Analysis of function of endocrine factors in the process of vascular development and differentiation using human ES/iPS cells.

研究代表者

河面 恭子 (KOHMO, Kyoko)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40784153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血管発生分化に関わる内分泌因子を探索し、その機能的意義の解明を行った。今回、整備改良したヒトES/iPS細胞からの血管細胞分化誘導法において、Flk1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-)分画の細胞がBNPを高発現・分泌し、分化が進むとその発現・分泌量は低下を認めた。この分画の細胞の解析によりこれらは血管幹細胞として機能していることが示唆され、血管細胞分化にBNPが深く関与していると推測された。BNPの効果を検討するためsiRNAや添加実験を行い、BNP添加で未分化細胞の割合が減少する、血管壁細胞の増殖率が増加するなどの結果が得られており、今後さらなる検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究室は、ヒトES/iPS細胞からの血管構成細胞(血管内皮細胞、壁細胞)への分化誘導に関する研究で着実な成果を上げている。本研究は、実験動物ではなく、ヒトの血管の発生分化過程における内分泌因子の働きを解析するという点が特色であり、動脈硬化性疾患の予防・治療に関する新たなアプローチ、根治的治療の開発を目的とする。本研究により、心血管ホルモン(BNP)がヒトの血管発生分化に深く関与することが示唆された。その意義が十分に解明されれば、動脈硬化性疾患に対する新たな血管再生療法として臨床応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we searched for endocrine factors associated with vascular development and differentiation and tried to elucidate the functional significance. At first, we further improved the vascular differentiation system of human ES/iPS cells we had reported. In the improved vascular differentiation system, we found that Flk1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-) cell fraction highly expressed and secreted BNP and that the expression and the secretion decreased as the cells differentiated. The analyses of these cells indicated that they would function as vascular stem cells and we presumed BNP should be closely related to vascular development and differentiation. Then, we examined the effect of BNP on the vascular differentiation. The results suggested addition of BNP induced decreasing the percentage of undifferentiated cells and increasing the proliferation rate of mural cells, so we need further investigation in future.

研究分野：内分泌

キーワード：血管 内分泌 再生医療 心血管ホルモン ヒトES/iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では、近年の高齢化社会やライフスタイルの欧米化に伴い、肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病罹患患者が増加し、これら患者に合併する動脈硬化性疾患は、生活の質 (QOL)、生命予後を規定する重要な因子となっている。生活習慣病に対する薬物治療、および虚血性心疾患・脳血管障害に対するカテーテル治療や手術治療は大きく進歩してきたが、より効果的な動脈硬化抑制、医療費削減のためには、動脈硬化の病態を見据えた予防・治療に関する新たなアプローチ、根治的治療の開発が極めて重要である。

我々の研究室はヒト ES/iPS 細胞からの血管構成細胞 (血管内皮細胞、壁細胞) や副腎皮質ステロイド産生細胞などへの分化誘導システムの構築についての研究で着実な成果を上げている (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(10):2127-34, 2007) (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29(7):1100-3, 2009) (Endocrinology. 153(9):4336-45, 2012)。生体の血管は、おもに内面を覆う血管内皮細胞 (EC) とその外側を裏打ちする壁細胞 (MC) からなる。MC は発生分化において EC とは由来が異なると考えられていたが、我々は、ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導後、FACS にて Fli1(+)/VE-cadherin(+) および Fli1(+)/VE-cadherin(-) の細胞分画をそれぞれソーティングし、前者からは EC、後者からは MC のいずれをも分化誘導することに成功している。

一方、当研究室では、心血管ホルモンの血管障害や血管再生に与える影響についても研究実績があり、ナトリウム利尿ペプチドである ANP (Endocrinology. 149(2):483-91, 2008)、BNP (Proc Natl Acad Sci USA. 100(6):3404-9, 2003)、CNP (Circulation. 105(14):1623-6, 2002) やアドレノメデュリン (Endocrinology. 147(4):1642-53, 2006) が血管再生促進効果を有することを報告してきた。

我々のヒト ES/iPS 細胞からの血管構成細胞分化誘導技術と心血管ホルモンの研究の知見から、ヒト ES/iPS 細胞を用いることで、実験動物ではなく、ヒトにおける内分泌因子 (心血管ホルモン) の血管分化に対する影響を検討できることが本研究の特徴であり、血管の再生を促す因子の同定や動脈硬化抑制のための新規治療法の開発に繋がる考えられる。

2. 研究の目的

我々の血管細胞誘導系は血管内皮細胞 (EC) と壁細胞 (MC) の双方を簡便に誘導できることを特徴、利点として持つ。MC は細小血管では pericyte、中等度以上の血管では血管平滑筋の形態をとるとされているが、その origin についてはまだ確定的ではない。DNA マイクロアレイ法による遺伝子網羅的解析データベースを作成し検討した結果、我々の誘導した MC とヒト成熟血管平滑筋では異なる点が多く見られた。本研究では、MC 誘導の技術改良を行い、成熟した SMC を安定して誘導できる系を確立することを第一の目標とする。さらに、ヒト ES/iPS 細胞からの血管細胞分化誘導技術を用いて、内分泌因子 (各種心血管ホルモン) のヒトの血管発生・分化に対する影響を解析することで、血管の再生を促す因子を探索し、その生理的意義、作用を解明することを目的とする。本研究で動脈硬化性疾患の予防・治療に関する新たな知見が得られれば、臨床への応用も期待できる。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES/iPS 細胞からの血管平滑筋細胞 (SMC) の分化誘導技術の改良

SMC 分化に影響を与えると報告されている各液性因子や細胞外基質により、SMC、pericyte マーカーがどのように発現変動するかを解析することで、SMC と pericyte を分けて考え、双方を分化誘導できる技術を確立する。

(2) 各種心血管ホルモンのヒトの血管発生・分化における作用の解析

ヒト ES/iPS 細胞未分化状態、Flk1 陽性血管前駆細胞 (VPC)、分化誘導された血管内皮細胞 (EC)・血管壁細胞 (MC) および対象として用意したセルラインヒト大動脈 EC・ヒト大動脈 SMC の 6 検体にて、各血管分化段階での心血管ホルモンおよびその受容体の mRNA 発現を解析する。

(3) BNP 産生の人体内での生理的な意義の解明

上記の検討により、Flk1 陽性血管前駆細胞 (Flk1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-)分画の細胞) で BNP が高発現し、実際にこれら細胞が BNP を分泌するという結果が得られた。BNP の人体内での生理的意義、作用機序を明らかにするため、まず Flk1 陽性血管前駆細胞がどのような性質を持つ細胞であるかの解析を行う。また、我々の血管細胞分化誘導系において siRNA を用いて BNP 発現を低下させる実験系を確立する一方で、BNP を添加することで分化誘導に影響を与え得るかについても検討する。

4. 研究成果

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞からの血管細胞分化誘導技術の改良、血管細胞分化誘導過程における BNP の機能的意義の検討を行った。

複数のヒト ES/iPS 細胞株から誘導した EC、MC、さらにはヒト成熟 EC、SMC をサンプルとして、DNA マイクロアレイ法を用いた遺伝子網羅的解析データベースの充実を行った。その結果、我々の誘導した MC とヒト成熟 SMC の比較では異なる点が多く見られた。そのため、より成熟した MC を誘導するため、各種液性因子添加による効果を検討した。後期血管平滑筋マーカーである SM22 を用いて誘導効果判定を行った結果、TGF β を誘導初期に使用することで、より成熟した SMC を選択的に誘導する系を確立できた。その結果、血管関連疾患特異的 iPS 細胞を用いた他施設との共同研究において、これまでは、もやもや病や多発性嚢胞腎で、EC 誘導を解析の中心に据えた研究を実施し成果を挙げていたが、今回、Notch3 が病因遺伝子である遺伝性脳動脈症 (CADASIL) で MC を主に解析する研究を実施することができた (論文投稿中)。

次に、改良した血管細胞分化誘導の系において、各分化誘導過程での心血管ホルモンおよびその受容体の発現につき検討した。BNP は分化誘導過程で得られる Flk1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-)細胞分画で強発現しており、分化に従ってその発現は低下した (図 1)。さらにこれらの細胞が培養液中に BNP を産生することも確認できたため、その意義の解明を進めた。

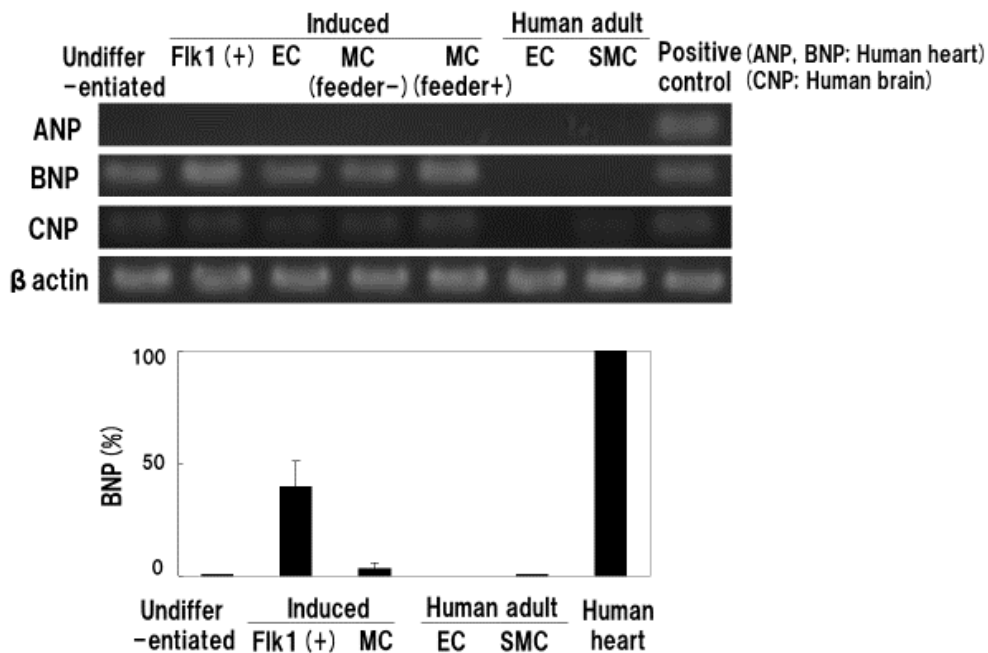
未熟な中胚葉の細胞と考えられる Flk1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-)分画は、形態的にも多様な細胞集団であるため、まず、これらがどのような性質をもつ細胞であるかを確認した。この分画の細胞は、CD73、CD90、CD105 などの中胚葉系幹細胞マーカー、Nkx2.5 などの心筋幹細胞マーカーをいずれも発現しておらず、既存の複数の誘導法にて心筋、脂肪、軟骨、骨への分化を認めなかったことより、血管幹細胞としての性質を強く持つことが示唆された。この細胞で BNP は高発現しており、分化が進むに従い、BNP 発現量の減少を認めることから、BNP は血管細胞分化自体に機能的に影響していると考えられた。また、BNP が主に作用する受容体である GC-A は壁細胞ではなく血管内皮細胞に強く発現していた。その意義を検討するため、今後、Flk1(+)/細胞または壁細胞と血管内皮細胞の共培養実験を行う予定である。

現在では、StemFit®を用いて未分化維持培養の継代状態を小細胞塊から単細胞に変更することで、血管細胞誘導も単細胞から開始可能となり、その後の解析や定量が容易となった。血管細胞誘導を単細胞から開始することで、ヘテロな細胞集団である Flk1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-)分画のうち、どのような細胞が BNP を高発現・産生しているのかを詳細に解析でき

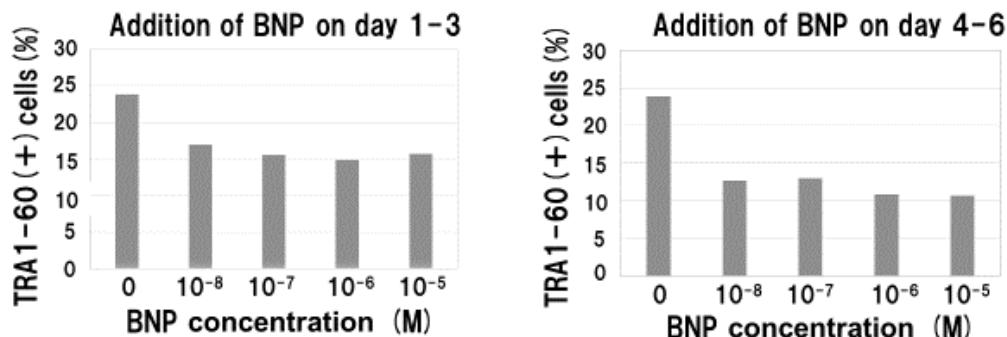
るとともに、この分画から EC, MC の双方が分化するのかということに関して直接的な証明ができると考えられる。

一方、BNP の血管細胞分化に対する効果を検討するため、siRNA 実験、添加実験を行った。Fik1(+)/VE-cadherin(-)/TRA1-60(-)分画に対する siRNA 実験で BNP 発現を 60%ほど低下させることに成功したが、誘導される血管細胞の性質および効率に明らかな変化は認めなかった。次に、未分化 iPS 細胞への siRNA 実験を行ったが、BNP 発現低下率はまだ十分ではないため、現在、至適実験法を検討中である。今後は、BNP ノックダウン iPS 細胞株の作成による解析も予定している。また、培養液への BNP 添加実験では、血管細胞誘導過程の 1-3 日目、4-6 日目に 0.01-10 μM の BNP を添加した際に複数の異なる ES/iPS 細胞株で未分化細胞 (TRA1-60(+)) 細胞) の割合の減少を認めた (図 2)。その意義に関しては、今後解析を進めていく必要がある。またソーティングした Fik1(+))細胞から MC への誘導過程において 0.01-1 μM の BNP を添加した際に MC の増殖率の増加を認めたが、濃度依存性は明らかでなく、再現性についても現在の評価法では確実ではないため、今後さらなる検討を行いたい。

(図 1) ヒト ES/iPS 細胞からの血管分化誘導過程における心血管ホルモンの発現の評価
(Cell line : H9)



(図 2) ヒト ES/iPS 細胞からの血管分化誘導過程における BNP 添加による影響の評価
(Cell line : H9)



5. 主な発表論文等（研究代表者は下線で示す）

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Honda-Kohmo K, Hutcheson R, Innes KE, Conway BN. Perfluoroalkyl substances are inversely associated with coronary heart disease in adults with diabetes. *J Diabetes Complications*. 33:407-412, 2019. 査読有
2. Ohno Y, Sone M, Taura D, Yamasaki T, Kojima K, Honda-Kohmo K, Fukuda Y, Matsuo K, Fujii T, Yasoda A, Ogawa O, Inagaki N. Evaluation of quantitative parameters for distinguishing pheochromocytoma from other adrenal tumors. *Hypertens Res*. 41:165-175, 2018. 査読有
3. Matsuo K, Sone M, Honda-Kohmo K, Toyohara T, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Ohno Y, Inoue M, Ohta A, Osafune K, Nakao K, Inagaki N. Significance of dopamine D1 receptor signalling for steroidogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 7:15120, 2017. 査読有
4. 河面恭子、榎野久士、細田公則 インスリン抵抗性改善薬の使い方
循環器内科 85(3):375-381, 2019. 科学評論社 査読無

〔学会発表〕(計4件)

1. 榎野 久士、菱田 藍、椋谷 真由、松尾 実紀、河面 恭子、肥塚 諒、大畑 洋子、玉那覇 民子、野口 倫生、富田 努、孫 徹
2型糖尿病における冠動脈疾患発症と食後高インスリン血症の関連
第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018.7.13 (大阪市)ポスター発表
2. 椋谷 真由、榎野 久士、松尾 実紀、河面 恭子、肥塚 諒、大畑 洋子、玉那覇 民子、富田 努、孫 徹、細田 公則
2型糖尿病患者における糖尿病網膜症の進行度と拡張不全型心不全の関連について
第61回日本糖尿病学会年次学術集会 2018.5.24 (東京都)ポスター発表
3. 松尾 浩司、曾根 正勝、本田 恭子、豊原 敬文、園山 拓洋、田浦 大輔、小嶋 勝利、福田 賢英、大野 洋一、井上 真由美、太田 章、長船 健二、中尾 一和、稲垣 暢也
ヒト iPS 細胞からステロイド産生細胞への分化におけるドーパミン D1 受容体シグナルの重要性 第91回日本内分泌学会術総会 2018.4.26 (宮崎市)口頭発表
4. 大野 洋一、曾根 正勝、田浦 大輔、山崎 俊成、小嶋 勝利、本田 恭子、福田 賢英、松尾 浩司、藤井 寿人、八十田 明宏、小川 修、稲垣 暢也
副腎偶発腫から褐色細胞腫を鑑別する為の定量的指標の評価とスクリーニング法の開発
第91回日本内分泌学会術総会 2018.4.27 (宮崎市)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)

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：曾根 正勝

ローマ字氏名：SONE, Masakatsu

研究協力者氏名：田浦 大輔

ローマ字氏名：TAURA, Daisuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。