

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16620

研究課題名(和文)もやもや病iPS由来血管内皮細胞でみられるインテグリン発現低下の病態的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenic significance of reduced integrin expression in vascular endothelial cells derived from moyamoya disease specific induced pluripotent stem cells

研究代表者

浜内 祝嗣(Hamauchi, Shuji)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：70794387

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):実験誤差を減らす目的で行ったフィーダーフリー培養の検討で、iPS細胞からの分化誘導はBMP4、FGF2、VEGF、SB431542で刺激する方法を取った。しかし分化誘導効率が安定せず、FGF2、BMP4、VEGF、cAMPの刺激で分化誘導を行った。分化後の細胞を培養液灌流下で培養したが、灌流早期に剥離してしまい、実験を進行していくことが出来なくなった。

今回の現象はiPS分化誘導細胞として避けられない細胞脆弱性のためか、もしくはフィーダーフリー培養の影響なのかは現状不明である。今後は以前のマウス胎児由来線維芽細胞をフィーダー細胞としたiPS細胞培養法で再検討する必要があるものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、フィーダーフリー培養によりiPS細胞からの分化誘導を試みたが、当初用いていた分化誘導の方法では血管内皮細胞の分化誘導効率が安定せず、試薬の変更・調整に時間を要してしまった。最終的にcAMPを使用することが有効であることが分かったが、そのプロトコルで得られた患者群、健常群の分化細胞とも灌流培養下で早期に剥離してしまい、本実験の結果が得られない状態で現在に至っている。今回の結果はiPS細胞を扱う上での難しさを明らかにした点では学術的意義があったが、本実験の結果が得られていない事より、もやもや病の病態解明という当初の目的は果たせておらず、社会的意義については乏しい内容となってしまった。

研究成果の概要(英文):To reduce the experimental error, we tried feeder-free culture with differentiation induction of iPS cells by BMP4, FGF2, VEGF, and SB431542. However, induction efficiency was not so stable that we switched to using FGF2, BMP4, VEGF, and cAMP for differentiation induction. Although the differentiated cells were subjected to be cultured in a flow condition, the cells were peeled off in the early phase of flow culture, resulting in little progress of the experiments. So far, it has been uncertain whether inevitable cellular vulnerability as iPS-differentiated cells or feeder-free culture condition contributes to this peeling-off phenomenon. We have to do the experiments again under conditions with feeder cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：もやもや病 iPS細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、日本で最初に発見され、女性・小児に好発する特異な脳血管障害である。主幹動脈狭窄病変ともやもや血管と呼ばれる側副血行が形成されるが(図1)その発病メカニズムは未だよく分かっていない。分子生物学的検討により疾患感受性遺伝子として RNF213 が同定され、その遺伝子変異がもやもや病患者に高率に認められることが明らかとなった。しかし、RNF213 の遺伝子改変動物はもやもや病の疾患モデルとはならず、この遺伝子異常だけでは発病メカニズムに踏み込めていなかった。

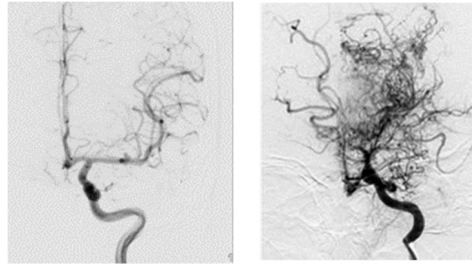


図1 正常者(左)ともやもや病患者(右)の血管造影像

近年、疾患の病態解明において、患者 iPS 細胞を用いた研究が注目されている。患者 iPS 細胞由来で誘導された臓器細胞を用い、細胞レベルの疾患モデルとしての解析が進められている。我々も RNF213 遺伝子変異を持つもやもや病患者の末梢血単核球から iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞に分化誘導することに成功した。この先行研究では分化誘導された血管内皮細胞において血管新生能が低下しており、さらに細胞外マトリックスの構成成分であるインテグリン 3、8 の発現が低下していた(図2)。インテグリンは細胞の接着のみならず、形態維持・刺激感知・伸展・増殖・修復、等の多くの機能に参与している。血管病変においてインテグリンの作用が注目されており、もやもや病の発病においても何等かの関与の可能性が考えられた。

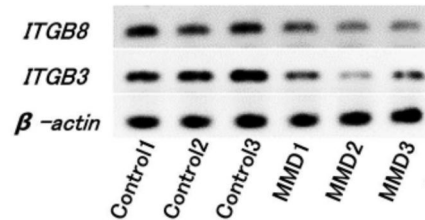


図2 もやもや病(MMD) iPS 由来血管内皮細胞でのインテグリン発現の低下

我々は先行研究で樹立したもやもや病患者3名、コントロール3名の iPS 細胞を凍結保存しており、これを解凍、再培養することで新たな研究を実施することを可能であり、今回の後続研究を想起するに至った。

2. 研究の目的

今回の研究では、患者 iPS 由来血管内皮細胞におけるインテグリン発現低下の病態的意義を検討することで、もやもや病の発病メカニズムの解明につながる知見を得ることを目的とした。先行研究ではもやもや病由来血管内皮細胞において、インテグリン 3、8 の発現の低下を認めているが、インテグリン 3、8 とインテグリン α_v とヘテロダイマーを形成し、血管新生での働きが報告されてきた。インテグリン 3 のノックアウトマウスでは腫瘍内の過剰な血管増殖が生じ、インテグリン 8 のノックアウトマウスでは脳内血管欠陥が生じ、致死的になる。ノックアウトモデルでは、このような著しい異常が生じるのかもしれないが、発現低下だけの場合は、別の病態形成(慢性進行性の形をとるような病変)の可能性もあってよいのではと我々は考えた。今回の研究では、インテグリンの持つ多面的な機能(シェアストレス応答、細胞間接着/細胞基質接着、内皮細胞物質透過性)を検討し、もやもや病の血管病変形成メカニズムに迫りたいと考えた。

3. 研究の方法

従来のプロトコールでは、マウス胎児由来線維芽細胞をフィーダー細胞として iPS 細胞の培養に用いていた。しかし、動物由来細胞では細胞のロットの差により実験結果にも差が出てしまうことがあるため、これに伴う実験誤差を減らす目的で、フィーダーフリー培養(ビトロネクチンコーティング培養皿上で、Essential 8 培地を使用し培養する)へと変更を行い、次いで本実験としての以下の項目の検討を行うこととした。

(1) シェアストレス応答の検討

細胞にシェアストレスを負荷し、形態変化、細胞修復能、インテグリンの発現/分布、シェアストレス依存性の物質産生/遺伝子発現について、もやもや病とコントロールで差があるかを明らかにする。

(2) 細胞間接着/細胞基質接着の検討

インテグリンの最も基本的な機能である結合リガンドとの細胞接着について、もやもや病とコントロールで差があるかを明らかにする。

(3) 内皮細胞物質透過性の検討

トランズウェルで培養した細胞シート膜における物質透過性について、もやもや病とコントロールで差があるかを明らかにする。

4. 研究成果

実験誤差を減らす目的で行ったフィーダーフリー培養の検討で、iPS細胞から内皮細胞への分化誘導は当初、以下の3段階(BMP4 + FGF2、 FGF2 + VEGF、 FGF2 + VEGF + SB431542)で刺激する方法を取った。しかし、血管内皮細胞の分化誘導効率が安定せず、分化誘導プロトコールの検証を行った。特に Y-27632 による血管内皮細胞の誘導効率改善効果を検討したが、明らかな効果は認められなかった。

このため文献を検索し、VEGF + cyclic AMP(cAMP)での刺激が分化誘導に有効であることを知り、改変した3段階(FGF2、 FGF2 + BMP4、 VEGF + cAMP)の刺激を用いることにより、分化誘導を行い、内皮細胞を得た(図3)。この新たなプロトコールでの分化後の細胞を灌流培養装置の ibidi pump 用のプレパレートに撒き、培養液の灌流下での培養を行った。しかし、分化後の細胞は、灌流早期に剥離してしまい、条件をいくつか変えて施行したが、同じ結果が続いており、実験を先に進めていくことが出来ない状態が続いてしまった。剥離の状態は患者由来誘導細胞、健常人由来誘導細胞の両方で同様にみられており、両群間で表現形質の差を認めなかった。

患者群、健常人群ともに同様に細胞接着が悪い結果であることより、今回の現象は先行研究で両群間に遺伝子発現の差を認めたインテグリンの機能に基づくものではないものと考えている。iPS由来血管内皮細胞の持つ性質として避けられない細胞の脆弱性によるものなのか、もしくはフィーダーフリー培養による影響なのかは現在のところ明らかではない。今後、先行研究で用いていた分化誘導方法であるマウス胎児由来線維芽細胞をフィーダー細胞とした iPS 細胞の培養で再検討する必要があるものと考えている。

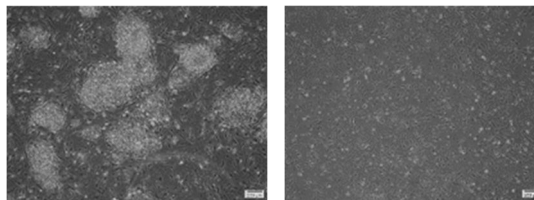


図3 iPS細胞(左)と分化誘導された血管内皮細胞(右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----