

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07058

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞のゲノム編集・アクチン再構成による遺伝性脳小血管病の治療開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for CADASIL using induced pluripotent stem cells

研究代表者

山本 由美 (Yamamoto, Yumi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：10614927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未だ治療法のない遺伝性脳小血管病CADASILの治療法を、患者由来iPS細胞を用いて開発することを目的としていた。CADASIL特異的なGOMと呼ばれる凝集体や、アクチン骨格の異常などを再現できるin vitroモデルを確立することに成功し、PDGFR などの治療標的候補を絞り込むことができた。また、oligodendrocyte precursor cell(OPC)への分化実験により、発達段階でOPCの分化異常が起きている可能性もできた。また、この分化障害は、PDGFR を阻害する薬剤の投与により改善できるという結果も得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らのグループは、世界に先駆けてCADASIL患者由来のiPS細胞を用いた2つのin vitroの実験系で実際の病態を再現することに成功した。さらに、申請者がCADASILの病態発生機序として着目している過剰PDGFR シグナルによるOPCの分化障害は、近年注目されているOPCと白質障害の関係性を明らかにするうえでも有用であると考えられる。本研究により、治療薬候補が2つ見いだされており、さらなる研究による治療法の開発に期待もてる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a novel treatment for the hereditary cerebral small vessel disease, CADASIL, using patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs). We successfully established in vitro model of CADASIL which can recapitulate disease-specific features such as deposition of granular osmiophilic materials and abnormal actin cytoskeleton. The analysis of iPSC-derived mural cells, we identified PDGFRbeta as a possible target for a treatment of CADASIL. Indeed, PDGFRbeta inhibition improved differentiation defect of oligodendrocyte precursor cell in CADASIL.

研究分野：血管性認知症

キーワード：血管性認知症 CADASIL 血管平滑筋細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) は、血管平滑筋細胞の変性などの血管病変と大脳白質障害を特徴とする血管性認知症である。原因遺伝子が壁細胞(血管平滑筋細胞・ペリサイト)特異的な細胞膜受容体 NOTCH3 に特定されて以来、多くの研究がなされてきたが(Joutel A, 1996)、血管の形態・機能異常に至るメカニズムは依然として明らかになっていない。最大の問題は、CADASIL の病態を *in vitro* で再現することの難しさにある。これまでに、Loss of function という観点から変異 NOTCH3 遺伝子導入による様々な実験がなされてきたが、シグナル活性の変化に一貫した結果が得られておらず、遺伝子導入による *in vitro* での病態の再現の限界が伺える (Peters N, 2004; Low WC, 2006)。また、変異 NOTCH3 遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)マウスも、完全に CADASIL の病態を再現するに至っていないのが現状である。

これまでに、CADASILの治療法として様々な薬剤が検討されてきたが、認知機能障害の原因である脳卒中・白質障害を予防できる薬剤は依然として見つかっていない。そのため、申請者のこれまでの研究により見いだされた、病態メカニズムの可能性の一つであるPDGFR $\beta$ シグナルによるアクチン代謝の異常をターゲットとした治療法を開発することは大いに意義がある。一方で、CADASILの新規治療法として、エクソン・スキッピングも新たに提案されている (Rutten JW, 2016)。実現できればパラダイムシフトを生み出せる可能性を秘めているが、現在のところ、エクソン・スキッピングしたNOTCH3蛋白のシグナル活性が正常であることしかわかっておらず、実際にCADASILの病態を改善できるかは未知数である。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究課題では、CADASILの新規治療法として、アクチン代謝異常をターゲットとした治療法およびエクソン・スキッピングを用いた治療法の有効性・安全性を、iPS細胞由来壁細胞およびCADASIL Tgマウスを用いて検証する。具体的には、以下の3点について明らかにする。

CADASILにおけるアクチン代謝異常に関わるシグナル経路の詳細  
新規治療法の*in vitro*スクリーニング  
CADASIL Tgマウスでの有効性・安全性

## 3. 研究の方法

### (1) CADASILにおけるアクチン代謝異常に関わるシグナル経路

NOTCH3変異がPDGFR $\beta$ の増加やアクチン代謝の異常に至る分子メカニズムの詳細を検討する。正常/変異NOTCH3 ノックダウンやNotchシグナル阻害剤によるアクチン代謝関連分子やPDGFR $\beta$ シグナル分子などの発現変化を評価し、変異NOTCH3の下流シグナルを解明し、治療ターゲットとなり得る分子の同定を行う。

### (2) 新規治療法の*in vitro*スクリーニング

1)の結果を踏まえ、アクチン代謝に影響を及ぼす薬剤の投与、またはantisense oligonucleotideによるエクソン・スキッピングにより、CADASILの血管平滑筋細胞の形態異常および機能異常が改善または増悪するか評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1) NOTCH3 と PDGFR $\beta$ の関係

NOTCH3 や PDGFR $\beta$  のノックダウンにより、亢進していた CADASIL の遊走がコントロールレベルまで下がったことから(図1A)、変異 NOTCH3 と増加した PDGFR $\beta$  が遊走亢進に関わっていることが示された。NOTCH3 や PDGFR $\beta$  をダブルノックダウンした際は、遊走の抑制効果はどちらか1つの時と有意な差は見られなかったことから、この2分子による遊走の制御には上下関係があるとみられた。実際に、NOTCH3 経路の下流に PDGFR $\beta$  があるという論文があった。(Jin S, 2008)そこで、NOTCH3 をノックダウンした際の PDGFR $\beta$  の発現量をウェスタンブロットティングで確認したところ、予想に反して PDGFR $\beta$  の発現量は増加していた(図1B)。一方で、NOTCH シグナルの非選択的阻害剤である DAPT で壁細胞を処理した場合は、PDGFR $\beta$  の発現量は有意に下がっていた。つまり、NOTCH3 ノックダウンにおいては、NOTCH1 などによる代償的な反応が起きている可能性がある。PDGFR $\beta$  が CADASIL の病態発生に関わっているならば、NOTCH3 自体などのノックダウンではむしろ病態を悪化させる可能性がある。

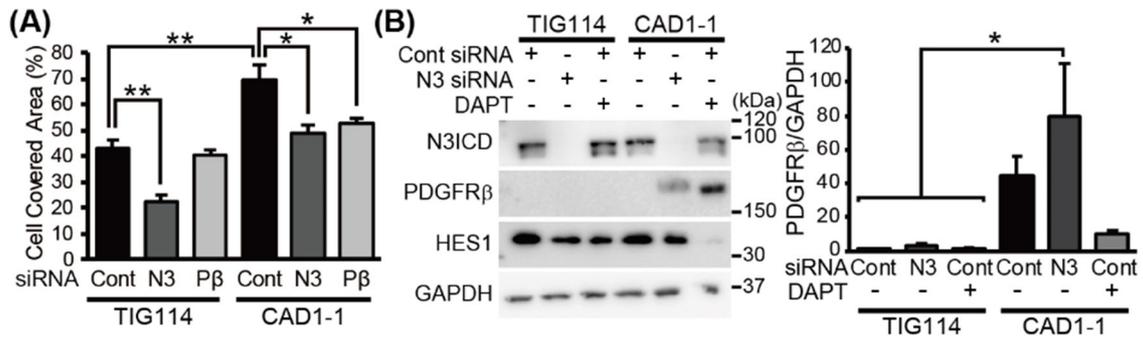


図1. ノックダウンによる血管壁細胞の遊走とタンパク発現量の変化

(2) オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化障害

近年、白質病変の病態にオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が関係しているとして注目を集め始めているが、CADASILも、いわゆるOPC病ではないかという説がでてきた (Zaucker A, 2013; Tang M, 2017)。そこで、申請者らが Douvarasら (2015)の手法をもとにiPS細胞をOPCに分化誘導したところ、CADASILでは、Spheroidから浸潤してくるO4陽性OPCが極端に少なく、分化が障害されている可能性が示唆された (図2)。壁細胞の分化誘導にPDGFRβがかかわる一方、OPCの分化には、PDGFRαが関係している (Funa K, 2014)。CADASIL壁細胞でPDGFRβが過剰発現していたことから、分化誘導中のPDGFRαとPDGFRβシグナルの不均衡がOPCの分化に影響したと仮説をたて、PDGFRβ阻害薬を分化誘導中に投与してみたところ、CADASILのOPC分化障害が改善された。この薬物は、分化誘導培地にPDGFaaを加えるより前に薬物を投与した時のみ効果を発揮したことから、過剰なPDGFRβシグナルがOPCの分化を阻害している可能性が高まった。つまり、PDGFRβは、CADASILの脳小血管病変とOPC病変の両方の治療ターゲットとして有望であると考えられる。

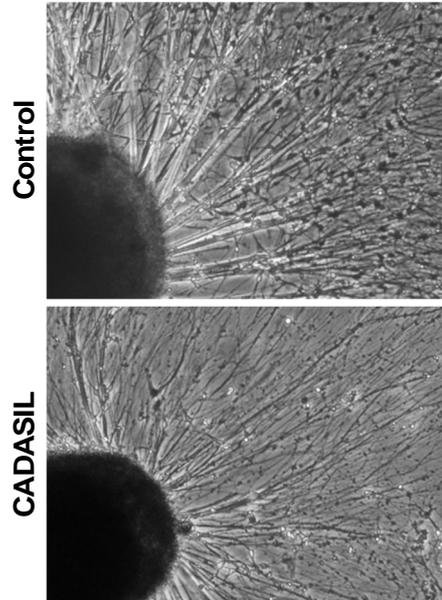


図2. CADASILのOPC分化障害

(3) 虚血反応性と治療薬

上記のPDGFRβに起因すると思われる病態とは別に、CADASILでは虚血への反応性にも異常が見られている。我々のグループでは、CADASIL iPS細胞由来の壁細胞を低酸素培養すると、HIF1αの増加が低く、細胞死が多いことがわかってきたが、そのメカニズムは不明であった。

本研究で、壁細胞を低酸素ストレス誘導剤である、塩化コバルトで処理してみたところ、やはりHIF1αの増加はコントロールと比べると低く、細胞死がより誘導された。この実験条件で、脳卒中治療薬として治験が行われている生理活性ペプチドを加えてみたところ、細胞死が抑制される可能性が示唆された。HIF1αの下流にこの生理活性ペプチドが位置しており、低酸素ストレスへの反応に関与しているということがわかっているため、今回の実験結果は足りないHIF1αの活性を補ったことによるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamamoto, Y., Kojima, K., Taura, D., Sone, M., Washida, K., Egawa, N., Kondo, T., Minakawa, E. N., Tsukita, K., Enami, T., Tomimoto, H., Mizuno, T., Kalaria, R. N., Inagaki, N., Takahashi, R., Harada-Shiba, M., Ihara, M., & Inoue, H.	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 38
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 由美
2. 発表標題 患者由来iPS細胞を用いた遺伝性脳小血管病の病態研究
3. 学会等名 第38回認知症学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

CADASIL研究班ホームページ 病態研究についての情報提供 <a href="http://square.umin.ac.jp/cadasil/medical-info/research.html">http://square.umin.ac.jp/cadasil/medical-info/research.html</a>
---

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

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