

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21481

研究課題名（和文）ダイレクトリプログラミング技術を用いた新しい線維化疾患治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment for fibrotic diseases using direct reprogramming technology

研究代表者

岡田 欣晃（Okada, Yoshiaki）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50444500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：臓器の線維化は、線維芽細胞の増殖により誘導され、臓器機能を低下させる。しかし、線維化した臓器を正常化する根治療法はない。そこで我々は、線維芽細胞を血管の細胞に転換する戦略で、臓器を脱線維化できるかを検討した。今回は、血管内皮細胞の遺伝子発現を調節する転写因子とDNAメチル化制御因子の改変体を活用し、線維芽細胞を高効率に血管内皮細胞に転換する技術を開発し、これらの線維化疾患モデルマウスへの効果を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器は炎症などで繰り返しダメージを受けると、線維芽細胞が増加し線維化する。線維化は臓器機能を低下させるが自然治癒しないため、患者の生活の質は生涯にわたり低下したままになる。現在の線維化疾患治療法の多くは、線維化の進行を抑える現状維持の戦略であり、線維化した臓器を元に戻す根治戦略はない。本研究は、血管を活用する新しい概念で、線維化疾患の根治を目指す点で、学術的・社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Organ fibrosis is caused by the proliferation of fibroblasts and results in a decline in organ function. However, there is currently no curative treatment to reverse fibrosis and restore normal organ function. Therefore, we investigated a strategy to reverse fibrotic organs by converting fibroblasts into vascular cells. In this study, we developed a technique to efficiently convert fibroblasts into vascular endothelial cells by utilizing transcription factors and modified DNA methylation regulators that control endothelial cell-specific gene expression, and tested its effects on mouse fibrotic disease models.

研究分野：血管生物学

キーワード：線維化疾患 ダイレクトリプログラミング 血管内皮細胞 線維芽細胞 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

臓器は障害を受けると創傷治癒等の過程を経て修復される。しかし、臓器が、繰り返し障害を受けると修復が正常に行われず、線維化が誘導される。臓器の線維化は、線維芽細胞の活性化と増殖、それに続く細胞外マトリックスの過剰な産生により誘導され、臓器の構造と機能の異常を誘導する。現在の線維化疾患の治療戦略のほとんどは、線維化の進行を遅らせ、現状維持を目指すものである。例えば、治療薬として用いられる TGF- $\beta$  や FGF シグナルの阻害薬は、線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生を抑制し、線維化進行を抑える。しかし、この治療薬は線維化病態の増悪を抑制できるものの、線維化した臓器を元通りに修復できない。

近年、線維化臓器を修復する治療戦略として、ダイレクトリプログラミングを活用した治療法が注目されている。つまり、線維化した臓器の線維芽細胞を、実質細胞に転換することで、臓器の修復を目指す戦略であり、これまでに臓器内で線維芽細胞を肝細胞や心筋細胞に転換できることや、心機能を回復できることが報告されている。しかし、実質細胞への転換は、特定臓器にしか適用できず汎用性が低いこと、特定臓器の細胞を別臓器に誘導してしまうリスクなどが問題となる。そこで我々は、線維芽細胞を血管内皮細胞に転換し、臓器を脱線維化する方法を考えた。つまり、線維芽細胞を内皮細胞に転換し、内因性の血管正常化機構を介して、転換後の細胞を除去する手法である。内皮細胞は、全ての臓器に存在する細胞であるため、理論上あらゆる臓器に適用できる。

## 2. 研究の目的

血管内皮細胞特異的遺伝子の発現を制御する転写因子 ETV2 と DNA 脱メチル化誘導因子 TET2 を活用し、線維芽細胞を高効率に血管内皮細胞に転換する技術を開発する。また得られた因子をマウス繊維症モデルに投与する。

## 3. 研究の方法

ETV2 と TET2 の二因子を活用し、線維芽細胞を高効率に内皮細胞に転換する技術を確立する。細胞の転換には、両因子を線維芽細胞に効率よく発現させる必要があるが、TET2 は分子量が大きく、発現効率が低いことが問題となった。そこで低分子量の TET2 改変体を創製し、転換効率を高めることを目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 低分子量 TET2 改変体の創製と内皮細胞マーカー遺伝子発現の誘導能

複数の低分子量の TET2 改変体を設計し、アデノウイルスベクターを用いてヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) に導入した。導入細胞における、血管内皮細胞特異的遺伝子の DNA 脱メチル化割合の解析から、最も強い脱メチル化活性を有する改変体 IC を取得した。IC は ETV2 と TET2 の二因子導入時以上の脱メチル化活性を有していた。次に、IC と ETV2 の共発現が、内皮細胞マーカーの発現に与える影響を解析した。ETV2 と IC を線維芽細胞に感染させ、遺伝子発現量を解析したところ、ETV2 と TET2 の共発現時以上に、内皮細胞マーカーを効率よく誘導できることが示された。また、ETV2 と IC を導入した線維芽細胞のフローサイトメトリーによる解析から、IC が野生型 TET2 以上の効率で、ETV2 と協調的に内皮細胞遺伝子の発現を誘導することが示された。

### (2) ETV2 と IC がマーカー遺伝子発現に与える影響

ここまでの検討から、ETV2 と IC の共発現により、線維芽細胞に内皮細胞遺伝子を誘導できることが示された。そこで、本手法で、先行研究の ETV2 のみを用いた細胞転換より効率的にマーカー発現を誘導できるのかを解析した。まず、ETV2 と IC を共発現させると、ETV2 単独発現時より Robo4 と VE-cadherin 発現が強く誘導された。さらに同条件下で、他の内皮細胞マーカー遺伝子を解析したところ、ETV2 と IC の共発現は ETV2 単独発現時に比べ CD31 を強く、Tie2 を同等に誘導した。これらの発現は、正常血管内皮細胞 (HUVEC) と同等以上であった。これらの結果から、ETV2 と IC の共発現により、ETV2 単独発現時より、高効率に線維芽細胞に内皮細胞マーカーを発現させられることが示された。また、フローサイトメトリーを用いて VE-cadherin と CD31 を発現する細胞の割合を解析したところ、ETV2 単独導入時と、ETV2 と IC 共発現時の両方で、VE-cadherin 陽性細胞の割合は約 90% であった。一方で、CD31 陽性細胞の割合は、ETV2 単独導入時に比べ、ETV2 と IC 共発現時に増加していた。これらの結果から、ETV2 と IC の共発現により、ETV2 単独発現時より高効率に内皮細胞マーカーの発現を誘導できることが示された。また、ETV2 と IC が線維芽細胞マーカーの発現に与える影響を解析したところ、ETV2 と IC は、ETV2 の単独発現時と同様に、COL1A1 と FSP-1 両遺伝子の発現を抑制した。この結果から、ETV2 と IC の発現は、ETV2 と同等に、線維芽細胞のマーカー遺伝子発現を抑制することが示された。以上の結果から、ETV2 と IC の共発現は、ETV2 単独発現時より、効率的にマーカー遺伝

子発現を制御できることが示された。

さらに、TGF- $\beta$ 1で活性化した線維芽細胞に ETV2 と IC を導入したところ、ETV2 単独時より強く Robo4 発現が誘導され、ETV2 単独時と同等に COL1A1 発現が抑制された。これらの結果から、ETV2 と IC は、活性化された線維芽細胞においても、内皮細胞と線維芽細胞のマーカー遺伝子の発現を制御できることが示された。

### (3) ETV2 と IC を導入した線維芽細胞と血管内皮細胞の類似性の解析

ETV2 と IC を導入した線維芽細胞が、内皮細胞の形質を有するのかを、細胞の形態と機能の観点から解析した。まず、ETV2 と IC を導入することで、線維芽細胞は細長い形態から、丸い内皮細胞様の形態に変化した (図 1A)。次に、免疫蛍光染色により、VE-cadherin の発現が、タンパク質レベルで確認できた (図 1B)。また、ETV2 と IC 導入細胞が内皮細胞の機能を持つかを、Ac-LDL 取り込み能と管腔形成能の観点で評価した。まず、ETV2 と IC を導入した線維芽細胞に Ac-LDL を処理したところ、内皮細胞と同様に Ac-LDL の取り込みが確認された (図 1C)。また、同細胞をマトリゲル上に播種したところ、内皮細胞と同様に管腔が形成された (図 1D)。これらの結果から、ETV2 と IC を導入した線維芽細胞は、内皮細胞の形態と機能を有することが示された。以上の結果から、IC と ETV2 を用いて高効率に線維芽細胞を内皮細胞に転換する技術を確立できた。現在、両因子をマウス線維化疾患モデルに投与し、臓器の脱線維化効果を検証している。

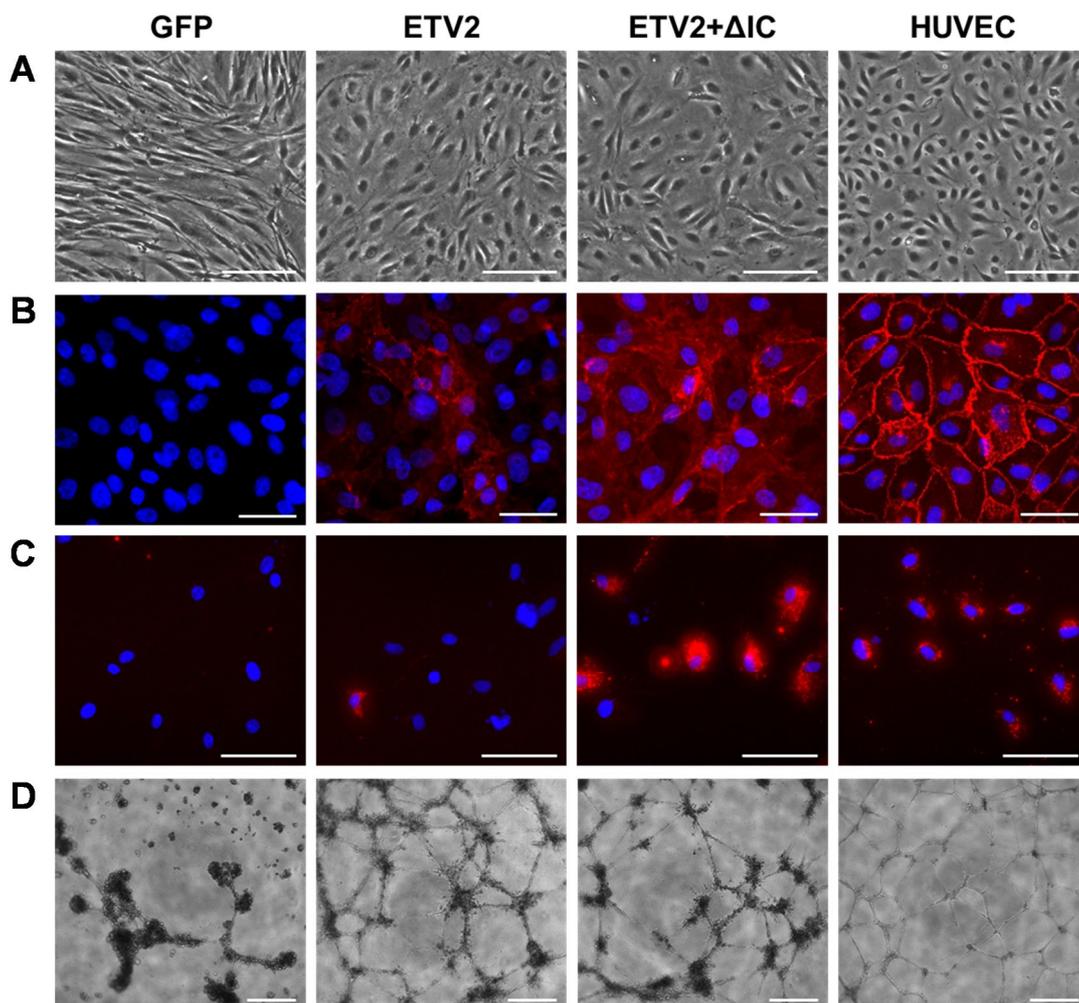


図1 ETV2 と IC 導入細胞が有する血管内皮細胞の形態と機能

(A) ETV2 と IC 導入細胞の位相差像。(B) ETV2 と IC 導入細胞における VE-cadherin 発現。VE-cadherin (赤)、核 (青)。(C) ETV2 と IC 導入細胞の Ac-LDL 取り込み。Ac-LDL (赤)、核 (青)。(D) ETV2 と IC 導入細胞のマトリゲル中の管腔形成能の評価。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Morita M, Yoneda A, Tokunoh N, Masaki T, Shirakura K, Kinoshita M, Hashimoto R, Shigesada N ..., Takayama K, Yoshioka Y, Fujio Y, Okada Y.	4. 巻 120
2. 論文標題 Upregulation of Robo4 expression by SMAD signaling suppresses vascular permeability and mortality in endotoxemia and COVID-19 models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2213317120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2213317120	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 -

1. 著者名 Hashimoto R, Takahashi J, Shirakura K, Funatsu R, Kosugi K, Deguchi S, Yamamoto M, ..., Torisawa YS, Date H, Fujio Y, Nagao M, Takayama K, Okada Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabo6783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo6783	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 -

1. 著者名 Tomimatsu M, Matsumoto K, Ashizuka M, Kumagai S, Tanaka S, Nakae T, Yokota K, Kominami S, Kajiura R, Okuzaki D, Motooka D, Shiraishi A, Abe T, Matsuda H, Okada Y, Maeda M, Seno S, Obana M, Fujio Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Myeloid cell-specific ablation of Runx2 gene exacerbates post-infarct cardiac remodeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-21202-7	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 -

1. 著者名 Miyake Y, Obana M, Yamamoto A, Noda S, Tanaka K, Sakai H, Tatsumoto N, Makino C, Kanemoto S, Shioi G, Tanaka S, Maeda M, Okada Y,	4. 巻 5
2. 論文標題 Upregulation of OASIS/CREB3L1 in podocytes contributes to the disturbance of kidney homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03709-x	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 Wahyuni T, Tanaka S, Igarashi R, Miyake Y, Yamamoto A, Mori S, Kametani Y, Tomimatsu M, Suzuki S, Yokota K, Okada Y, Maeda M, Obana M, Fujio Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 CXCL10 is a novel anti angiogenic factor downstream of p53 in cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15304	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 -

1. 著者名 Kametani Y, Tanaka S, Wada Y, Suzuki S, Umeda A, Nishinaka K, Okada Y, Maeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Obana M, Fujio Y.	4. 巻 237
2. 論文標題 Yes associated protein activation potentiates glycogen synthase kinase 3 inhibitor induced proliferation of neonatal cardiomyocytes and iPS cell derived cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2539 ~ 2549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30724	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 Miyake Y, Obana M, Nakae T, Yamamoto A, Tanaka S, Maeda M, Okada Y, Fujio Y.	4. 巻 571
2. 論文標題 PKNOX2 regulates myofibroblast functions and tubular cell survival during kidney fibrosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.067	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 Tachibana K, Hashimoto Y, Shirakura K, Okada Y, Hirayama R, Iwashita Y, Nishino I, Ago Y, Takeda H, Kuniyasu H, Kondoh M.	4. 巻 336
2. 論文標題 Safety and efficacy of an anti-claudin-5 monoclonal antibody to increase blood-brain barrier permeability for drug delivery to the brain in a non-human primate.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Control Release.	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2021.06.009	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 Kashio T, Shirakura K, Kinoshita M, Morita M, Ishiba R, Muraoka K, Kanbara T, Tanaka M, Funatsu R, Hino N, Koyama S, Suzuki R, Yoshioka Y, Aoshi T, Doi T, Okada Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 HDAC inhibitor, MS-275, increases vascular permeability by suppressing Robo4 expression in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 1911195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1911195	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 -

[学会発表] 計18件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡田欣晃
2. 発表標題 血管透過性を標的とする重症感染症治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中雅人、白倉圭佑、松井美紀、渡邊幸夫、高山結衣、土井健史、高山和雄、藤尾慈、岡田欣晃
2. 発表標題 血管安定化分子Robo4が炎症性疾患を緩和するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神原知明、井澤洸栄、前田星、土井健史、藤尾慈、岡田欣晃
2. 発表標題 線維化疾患治療に資する線維芽細胞の血管内皮細胞への転換技術の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田真綾、木下真由美、米田安希、高橋潤也、正木辰実、藤尾慈、土井健史、岡田欣晃
2. 発表標題 血管透過性抑制分子を標的とする敗血症治療法の開発
3. 学会等名 第21回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 欣晃
2. 発表標題 血管透過性を標的とする新戦略でのがん・炎症性疾患治療の可能性
3. 学会等名 Angiogenesis & Immunology Research-Hepatocellular Carcinoma (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中雅人、小西博堯、松井美紀、高山結衣、土井健史、藤尾慈、岡田欣晃
2. 発表標題 Robo4が病態特異的に血管透過性を抑制するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下真由美、樫尾泰斗、白倉圭佑、村岡康介、小山正平、吉岡靖雄、鈴木 亮、青枝大貴、藤尾慈、土井健史、岡田欣晃
2. 発表標題 HDAC阻害剤MS-275が血管透過性とがん免疫賦活化核酸の活性に与える影響の評価
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村岡康介、白倉圭佑、船津梨彩、井上采人、土井健史、竹田浩之、橘敬祐、近藤昌夫、藤尾慈、岡田欣晃
2. 発表標題 血液脳関門構成分子Claudin-5に結合する分子を用いた脳内薬物送達技術の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田欣晃、木下真由美、白倉圭佑、櫻尾泰斗、村岡康介、藤尾慈、土井健史
2. 発表標題 血管安定化分子Robo4の発現を変化させ血管透過性を制御する低分子化合物の探索
3. 学会等名 CVMW2021 心血管代謝週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田欣晃、土井健史、藤尾慈
2. 発表標題 血管透過性を標的とする新戦略での重症感染症・炎症疾患治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神原知明、井澤洸栄、土井健史、藤尾慈、岡田欣晃
2. 発表標題 線維症治療に資する線維芽細胞の血管内皮細胞への転換技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神原知明、井澤洸栄、田中亨、岡田欣晃、土井健史
2. 発表標題 線維芽細胞を高効率に血管内皮細胞に転換する技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白倉圭佑、William Aird、土井健史、岡田欣晃
2. 発表標題 炎症時の血管透過性を抑制する分子機構の解明と炎症・感染症治療への応用の可能性
3. 学会等名 第27回日本免疫毒性学会 学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下真由美、樫尾泰斗、村岡康介、白倉圭佑、岡田欣晃、土井健史
2. 発表標題 HDAC阻害剤MS-275がメラノーマ細胞の肺転移を促進するメカニズムの解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田安希、前河直樹、正木辰実、岡田欣晃、土井健史
2. 発表標題 血管サイズ依存的なRobo4発現を生み出す新規メカニズムの探索
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田真綾、木下真由美、米田安希、高橋潤也、岡田欣晃、土井健史
2. 発表標題 血管透過性抑制分子Robo4の発現制御機構の解明と敗血症治療への応用
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井美紀、白倉圭佑、石破亮祐、岡田欣晃、土井健史
2. 発表標題 血管内皮細胞特異的タンパク質Robo4が炎症疾患とCOX-2発現を抑制する機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中雅人、小西博堯、松井美紀、岡田欣晃、土井健史
2. 発表標題 Robo4が炎症時の血管透過性を抑制するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田欣晃	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野  
<https://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b014/index.html>  
大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野 血管チーム  
<https://okadabos.wixsite.com/websiite>

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	小山 正平  (Koyama Shohei)  (80767559)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長   (82606)	
研究分担者	樋野 展正  (Hino Nobumasa)  (90469916)	大阪大学・大学院薬学研究科・講師   (14401)	

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