

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K06983

研究課題名（和文）遺伝性脳小血管病iPS細胞を用いた病態モデルによる創薬：核酸医薬と既存薬再開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment of hereditary small vessel disease using iPSCs

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・病院・上級研究員

研究者番号：10614927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000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壁細胞への治療薬候補の投与実験を行い、CADASILの病態メカニズムとして、PDGFR シグナルおよび低酸素ストレスに関連した2つの経路がある可能性が示唆された。低酸素ストレスによる病態に関しては、HIF-1 の下流に位置する蛋白の投与によりある程度の改善が期待できることが、in vitroおよび治験で確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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おらず、対症療法に終始してきた。本研究により、CADASIL治療薬の候補がいくつかみつき、そのうちの1つについては、治験により一定の効果が認められることもわかった。これにより、難病の治療法開発に一步近づいたといえる。

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 treated CADASIL iPSC-derived Mural cells (MCs) and oligodendrocyte precursor cells (OPCs) with PDGFRbeta inhibitor and found that it can improve CADASIL phenotype to some extent. However, the inhibitor was not effective for the hypoxic stress response in CADASIL MCs, implying another signaling pathway involved in pathogenesis of CADASIL.

研究分野：Neurology

キーワード：CADASIL small vessel disease NOTCH3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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により認知症に至る脳小血管病である。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。

申請者らのグループは、CADASIL トランスジェニック(Tg)マウスの脳血管壁細胞および CADASIL 患者の iPS 細胞を用いて in vitro で CADASIL の病態を再現し、病態発生機序の解明と新規治療薬の開発をすべく研究を進めてきた。これまでに、既存技術の改良により iPS 細胞から成熟した壁細胞に分化誘導・維持する手法を確立し、CADASIL におけるアクチン骨格の異常や Granular osmiophilic material (GOM) と呼ばれる CADASIL に特異的な血管内凝集物などの病態を再現することに成功している。さらに、アクチン代謝に関わる PDGFR β が CADASIL で有意に増加していることが示され (Yamamoto *et al. Mol Brain*, 2020)、治療薬のターゲット候補を絞り込むことができた。

CADASIL の治療法としては、これまでもアセタゾラミド (Chabriat H, 2000; Huang L, 2010)、ドネペジル (Dichgans M, 2008)、ロメリジン (Mizuno T, 2009) などが検討されてきたが、いずれも効果は限定的で、発症の予防、進行抑制には至っていない。申請者のこれまでの研究により、CADASIL の病態メカニズムとして PDGFR β シグナルによるアクチン代謝や OPC 分化の異常が関わっている可能性が高まった。そこで、治療ターゲットとして PDGFR β 関連分子、変異 NOTCH3 タンパクが挙げられる。アクチン代謝や OPC 分化の異常は CADASIL 以外の脳小血管病にも関わっている可能性があるため、これ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。

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、PDGFR β をターゲットとした治療法および核酸医薬を用いた治療法の有効性・安全性を、iPS 細胞および CADASIL Tg マウスを用いて検証する。

3. 研究の方法

我々の CADASIL の病態研究により、CADASIL 壁細胞では PDGFR β の有意な増加とそれに伴う遊走能の亢進がみられることがわかっている。また、OPC の分化障害も認められている。これらの表現型に対して、PDGFR β の阻害作用があると報告されている候補薬剤 A および、既報告にあるエクソン・スキッピングが有効であるかどうか、培養細胞を主に使用して検討を行う。

4. 研究成果

(1) Antisense oligonucleotide (AON)によるエクソン・スキッピングの検討

Ruttenら(2016)によるNOTCH3のエクソン・スキッピングで報告されていたExon 4-5を取り除くAONが、本当に報告通りの効果を持つのか検証した。血管壁細胞に3種類のAONを遺伝子導入し、24時間後にRNA抽出をして調べたところ、Exon4-5が読み飛ばされているのが確認された。また、3つのAONのうち、2つのAONだけでも遺伝子変

異の最も多いExon4を読み飛ばすことはできたが、その効率はExon4-5を両方飛ばすものと比べて悪かった。

(2) PDGFR β 阻害薬の投与と CADASIL 壁細胞の表現型の変化

PDGFR β 阻害薬をCADASIL患者iPS細胞由来血管壁細胞に投与すると、CADASILで見られたPDGF-BBへの反応性異常に改善傾向が見られた。一方で、CADASILの低酸素による反応性異常に対しては、PDGFR β 阻害薬は効果がなく、ペプチドホルモンであるアドレノメデュリン(ADM)の方が若干の改善効果を示した。つまり、CADASILの病態を起こす機序には2つの経路が関係している可能性が示唆された。

(3) CADASIL における PDGF シグナル経路下流の変化

脳梗塞は、CADASIL患者の運動機能および認知機能の低下の原因であり、最も予後を左右する症状である。*NOTCH3*変異により脳梗塞を発症するメカニズムの検討をおこなうため、PDGFシグナル経路の下流に位置するPlasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1)の定量を行った。患者由来iPS細胞から分化誘導した壁細胞の培養上清中のPAI-1をELISAで測定し、PDGFR β 阻害薬の有無により、PAI-1の分泌濃度に変化があるかどうか検討を行ったが、これについては分泌量に有意な差はなかった。薬剤濃度や処理時間を増やすことで効果を得られる可能性はあるが、患者iPS細胞由来壁細胞の増殖速度が、コントロール間であっても差があり、長期の培養による細胞数の差が血管大きく影響してしまい、有意差を得ることが困難であった。コントロールiPS細胞にCADASILの*NOTCH3*変異を導入して、遺伝的背景因子をそろえた疾患iPS細胞を作成することにした。

(4) CRISPR-Cas9による*NOTCH3*変異の導入

*NOTCH3*変異を、コントロールiPS細胞にCRISPR-Cas9で導入する実験については、目的の点変異クローンではなく、*NOTCH3*の一部欠失株を得た。Lipofection法での導入効率が悪いいため、今後、Electroporationでの導入を検討する。

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 Yumi, Liao Yi-Chu, Lee Yi-Chung, Ihara Masafumi, Choi Jay Chol	4. 巻 19
2. 論文標題 Update on the Epidemiology, Pathogenesis, and Biomarkers of Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neurology	6. 最初と最後の頁 12～27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3988/jcn.2023.19.1.12	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
---------------------------	-----------------------	----

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