

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20668

研究課題名（和文）血管内皮幹細胞を標的とした新規治療法探索のためのヒトVHL病モデルの構築

研究課題名（英文）Development of a disease model for von Hippel-Lindau syndrome to identify novel therapeutics targeting for vascular endothelial stem cell

研究代表者

伊藤 秀矩 (Ito, Hidenori)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：10907984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：フォン・ヒッペル・リンドウ（von Hippel Lindau: VHL）病は、過剰な血管新生を介した全身性血管芽腫を特徴とする遺伝性難病である。これまでに、十分なヒトVHL病の疾患モデルが確立できておらず、本疾患の治療法開発を行う上で課題となっている。申請者は、VHL病患者特異的iPS細胞を用いて、疾患標的細胞となる血管内皮細胞への分化誘導法を確立し、さらに分化誘導後の血管内皮細胞を用いた血管オルガノイドモデルを開発した。患者由来の血管オルガノイドでは、過剰な血管新生を誘導することから、疾患モデルとしての有用性が明らかとなり、新規治療法の開発への貢献が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのVHL遺伝子改変動物モデルでは、十分な疾患モデルとして確立できていないことから、患者由来のiPS細胞を用いてヒトVHL病モデルを新規に作製したことは、独自性が高く、この疾患の発症機序の解明と治療法の開発に大いに貢献できると考えられる。また、VHL病自体は遺伝病であるが、遺伝素因のない孤発性の悪性腫瘍、特に腎がんにおいてもVHL遺伝子の変異が高頻度で見出されており、重要なドライバー変異であることが明らかとなっている。本疾患モデルを用いて新規治療法を提案することは、希少疾患であるVHL病のみならず、VHL遺伝子変異が関与する他の悪性腫瘍に対する新たな治療戦略に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Von Hippel Lindau (VHL) disease is a genetic disorder characterized by hemangioblastoma in many different parts of the body. Previous studies tried to develop the VHL disease model with a genetically modified mouse model, however, it was difficult to imitate the human disease characteristics. We herein induced a vascular differentiation from the patient-specific iPS (induced pluripotent stem cell) into vascular endothelial cells, which are the target cells of the disease. Then, we developed a blood vessel organoid model with the vascular endothelial cells, which sprouted blood vessels in 3D culture. We found that the patient-derived organoids induced excessive angiogenesis compared to the healthy donor-derived organoids. This model demonstrates their usefulness as the disease model and is expected to contribute to the development of novel therapeutic factors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：VHL病患者特異的iPS細胞 血管オルガノイド

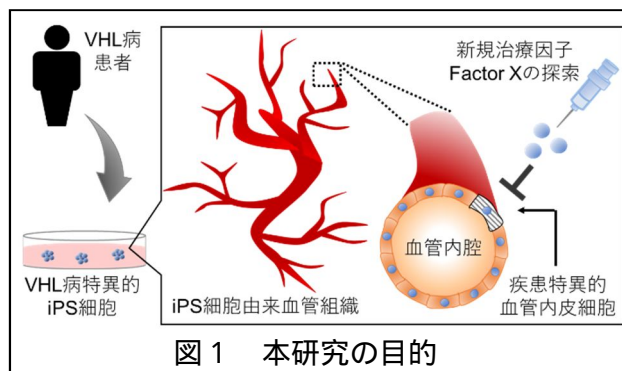
1. 研究開始当初の背景

(1) VHL 病の発症機序において主要な場となる血管新生は、既存の血管から新たな血管が芽・伸長する生理的現象であり、血管を構成する血管内皮細胞が標的部位に向かって増殖・遊走して進行する。従来、個々の血管内皮細胞の機能は画的であり、血管新生への関与は全て均一であると考えられてきた。しかしながら、近年の単一細胞機能解析技術の発展により、高い遊走能を持つ Tip cell、それに後続して高い増殖能を有する Stalk cell といった血管内皮細胞内での機能分化の多様性が明らかとなってきた。そのため、VHL 病由来の血管組織では、その発症機序から、血管内皮細胞の機能異常・機能分化が顕著に促進することで、疾患発症に繋がることが仮説として考えられる。

(2) がん抑制遺伝子に分類される VHL 遺伝子は、VHL 病患者の 80~90 % で遺伝子変異が起こり、その機能が消失している。E3 コピキチンリガーゼとしての機能を有する VHL タンパク質は、転写因子 HIF (Hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) を標的としており、正常酸素環境下で HIF に直接結合し、タンパク質分解を誘導する。よって、遺伝子変異により VHL が不活性化した血管内皮細胞では、正常酸素環境下における HIF タンパク質が安定化し、HIF 下流の血管新生関連因子が恒常的に発現することが考えられ、全身性血管芽腫をもたらす一因となるという説が出されている。しかしながら、HIF 以外の疾患発症原因は未だ確定的なものはなく、新規治療因子の探索が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト VHL 病患者特異的 iPS 細胞を用いて、新規ヒト VHL 病モデルを構築し、疾患特異的血管内皮細胞を標的とした治療因子 Factor X の探索を目的とする(図1)。これまで、VHL 遺伝子欠損マウスを用いた解析では、ホモ欠損では胎盤の血管新生の欠損による胚性致死となり、ヘテロ欠損では、マウスの遺伝子背景に応じて、全く表現型に異常がないか、あるいは高齢での肝臓における血管芽腫が一部で見られたという報告がある。しかしながら、これらの遺伝子改変動物モデルでは、高い頻度での全身性血管芽腫は観察されず、十分な疾患モデルが確立できていない。そのため、患者由来の iPS 細胞を用いてヒト VHL 病疾患モデルを新規に作製することは、独自性が非常に高く、この疾患の発症機序の解明と治療法の開発に大いに貢献できると考えられる。



3. 研究の方法

(1) 理化学研究所バイオリソース研究センターで保有している VHL 病患者特異的 iPS 細胞 (患者 3 名分、18 株) を使用し、iPS 細胞としての機能評価 (自己複製能、多分化能) を実施後、主因となる VHL 遺伝子変異を同定する。

(2) 健常者 iPS 細胞、ならびに VHL 病患者特異的 iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導条件を確立し、分化した血管内皮細胞の 3 次元培養を行うことで、血管オルガノイドモデルを開発する。

(3) (2) で分化誘導した血管内皮細胞、および血管オルガノイドモデルを用いて、疾患特異的な特徴 (形態的表現型、分子的表現型) を探索する。

(4) 血管内皮細胞、あるいは血管オルガノイドモデルを免疫不全マウスに移植する in vivo 高次評価系の立ち上げを目的として、赤色発光のルシフェラーゼ Akaluc で標識した健常者 iPS 細胞、VHL 病患者特異的 iPS 細胞を作製する。これにより、移植した血管内皮細胞、あるいは血管オルガノイドについて、マウス生体内での可視化が可能となる。

4. 研究成果

(1) VHL 病患者特異的 iPS 細胞 (患者 3 名分、18 株) に対し、自己複製能マーカーである Nanog、Oct3/4 の免疫染色、フローサイトメトリーを用いた SSEA-4、TRA1-60 の発現解析、また、胚様体における多分化能マーカーの免疫染色、マウスでのテラトーマ形成能等々を評価した。結果、VHL 病患者特異的 iPS 細胞は、90% 以上で自己複製能マーカーを発現していることを確認した (図 2 a)。また、in vitro での胚様体形成実験、ならびに in vivo でのマウステラトーマ形成実験により、外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化能を有することが明らかとなった (図 2 b)。これらの結果は、VHL 病患者特異的 iPS 細胞が iPS 細胞としての基本的性質を保持していることを示している。また、VHL 病患者特異的 iPS 細胞の VHL 遺伝子に対し、シーケンス解析を実施し、実際のヒト患者で報告のあるヘテロ型の遺伝子変異箇所を同定した。

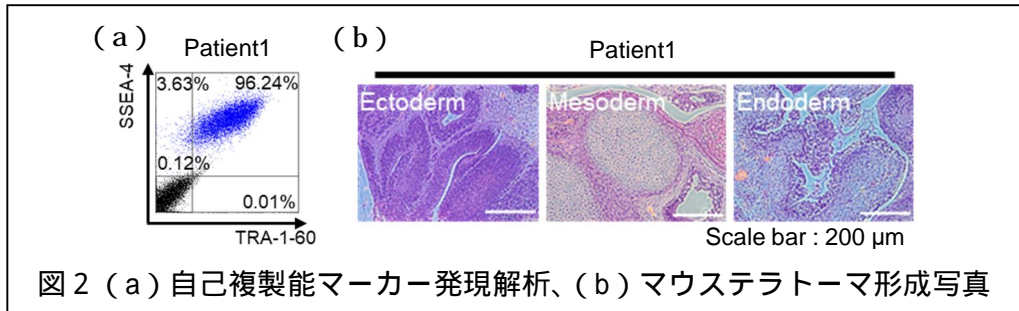


図 2 (a) 自己複製能マーカー発現解析、(b) マウステラトーマ形成写真

(2) 健常者 iPS 細胞、VHL 病患者特異的 iPS 細胞に対し、当研究室独自で開発した分化プロトコルを使用して血管内皮細胞を分化誘導した。作製した血管内皮細胞に対し、フローサイトメトリーを用いて、血管内皮マーカーである CD31 の発現解析を行ったところ、90% 以上で CD31 陽性細胞であることが明らかとなった。さらに、qRT-PCR を用いて、作製した血管内皮細胞内の遺伝子発現を解析した結果、未分化状態の iPS 細胞と比較して、血管内皮細胞マーカー (CD31、VE-cadherin など) の発現が著しく高いことを確認した。また、当研究室独自で開発したプロトコルに従い、分化した血管内皮細胞を三次元培養することで、血管が発芽・伸長する血管オルガノイドモデルを構築した (図 3)。これにより、VHL 病患者由来の血管オルガノイドでは、健常者由来の血管オルガノイドと比較して、過剰な血管新生を誘導することが明らかになった。

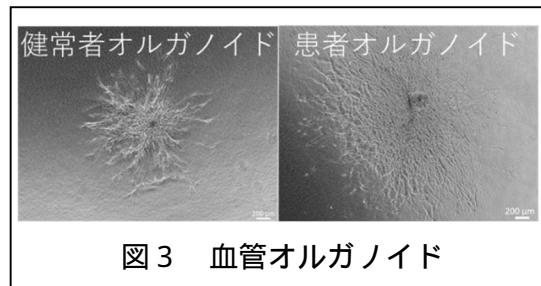


図 3 血管オルガノイド

(3) 健常者 iPS 細胞、VHL 病患者特異的 iPS 細胞、および分化誘導した血管内皮細胞に対し、RNA シーケンス解析を実施し、疾患特異的血管内皮細胞で発現変動する遺伝子を新規に同定した。これらの遺伝子が、実際に血管オルガノイドモデルにおける血管新生能に関与するのか、また、VHL 遺伝子あるいは HIF 遺伝子の下流に位置する因子なのか詳細に解析中である。

(4) マウス体内における移植細胞のモニタリング解析を目的に、赤色発光のルシフェラーゼ Akaluc で標識した健常者 iPS 細胞、VHL 病患者特異的 iPS 細胞を樹立した。フローサイトメトリーを用いた発現解析により、樹立した iPS 細胞は 90% 以上で Venus-Akaluc 陽性細胞であることが分かった。予備実験として、樹立した Venus-Akaluc 発現 iPS 細胞株を免疫不全マウスの精巣に移植し、in vivo イメージング装置を用いて撮影したところ、移植細胞の経時的な変化を解析可能であることが明らかになった (図 4)。現在、健常者由来、患者由来の Venus-Akaluc 発現 iPS 細胞株から、血管内皮細胞をそれぞれ分化誘導し、マウスへの移植実験を進めている。

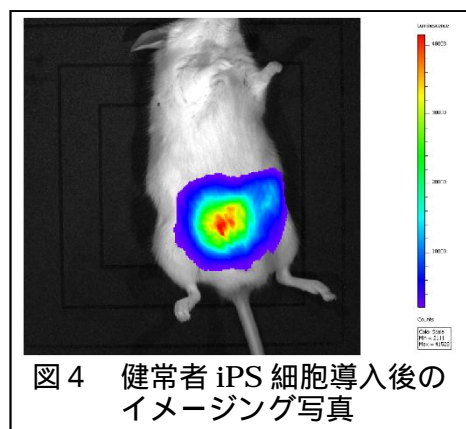


図 4 健常者 iPS 細胞導入後のイメージング写真

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤秀矩
2. 発表標題 患者特異的iPS細胞由来の血管オルガノイドを用いた病態モデルの構築
3. 学会等名 第1回東京理科大学-明治大学-理研 生命科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------