

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年4月13日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究機関：2011～2011

課題番号：23650182

研究課題名（和文） 遺伝性血管性認知症 CADASIL 患者由来 iPS 細胞とモデル動物を用いた治療法探索

研究課題名（英文） Exploration of treatment of hereditary vascular dementia CADASIL using patient-derived iPS cells and its model mice

研究代表者 猪原 匡史 (IHARA MASAFUMI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00372590

研究成果の概要（和文）：Notch3 の変異部位が異なる 3 名の CADASIL 患者のヒト皮膚線維芽細胞を採取した。CADASIL 患者の iPS 細胞から誘導した血管内皮・平滑筋細胞を用いて、表現型解析を行い、健常者から誘導された血管内皮・平滑筋細胞との比較を行い、CADASIL の病態機序を *in vitro* で検討した。さらに、新規入手した Notch3 トランスジェニックマウスを用いて、*in vitro* の系で確認した表現型をモデル動物にて確認を行うことで、CADASIL の病態解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：Skin fibroblasts were isolated from three CADASIL patients with different mutations in Notch 3 gene. Three lines of iPS cells have been established by using the fibroblasts derived from one patient with CADASIL and endothelial cells and vascular smooth muscle cells were induced from the iPS cells. Their phenotypes were compared with those derived from normal controls. Furthermore, Notch 3 transgenic mice were obtained to investigate the pathogenesis of CADASIL *in vivo* and to compare the *in vitro* and *in vivo* phenotypes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2900000	870000	3770000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：血管性認知症

1. 研究開始当初の背景
脳血管障害はわが国における三大死因の一

つであると同時に、認知症や身体障害などによる要介護・寝たきり状態の最大の原因であ

る(平成19年国民生活基礎調査).近年では、血管病変のアルツハイマー病への関与が示唆され(Bell RD and Zlokovic BV. Acta Neuropathol 2009),血管性認知症への関心も高まっている.しかし、血管性認知症を研究する上で障壁となるのが、その多くが孤発性であるが故の危険因子あるいは病型の多様性である.年齢、高血圧、糖尿病や脂質代謝異常症などの要因が複雑に絡み合い、病態生理の特定を困難にしている.そこで、遺伝性の脳血管障害である CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) が注目される. CADASIL は、血管平滑筋細胞の変性を主とする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.主に20~40代頃から前兆を伴う片頭痛(22%)や鬱などの気分障害(20%)が現れ、50代頃からは皮質下梗塞および一過性脳虚血発作(84%)を繰り返し、進行性の認知症(31%)に至る(Chabriat H, et al. Lancet 1995).病理学的特徴としては、MRI上の特徴的な白質病変、血管平滑筋膜上のNotch3細胞外ドメインの凝集、血管平滑筋近傍のGOM (granular osmiophilic material)などが挙げられる.これまで、Notch3遺伝子変異が原因遺伝子として特定され(Joutel A, et al. Nature 1996),Notch3が血管平滑筋に特異的に発現するタンパク質であることが明らかにされたが、Notch3変異から血管平滑筋細胞の変性、さらに脳組織障害に至る機序は不明である.そのため、CADASILの病態を研究することで、孤発性血管性認知症の病態解明・治療法開発のヒントが得られると期待される.

2. 研究の目的

世界で初めて樹立を試みるCADASIL iPS細胞

とその誘導血管内皮・平滑筋細胞を用いてCADASILの病態生理を検証すると同時に、CADASILモデルマウスを用いて、生体内の病態生理と低酸素細胞選択的薬物送達法による新規治療法の可能性を探る.

3. 研究の方法

1) CADASIL iPS細胞の誘導:

CADASIL患者から採取したiPS細胞を用いて血管平滑筋の分化能を評価する.京都大学代謝内分泌内科との共同研究によりiPS細胞からの血管平滑筋細胞および血管内皮細胞への分化法は既に確立されている(Taura D, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009).また、CADASIL患者から採取した皮膚線維芽細胞からiPS細胞を現在樹立中である.

具体的には、まず、皮膚生検によりCADASIL患者のヒト皮膚線維芽細胞を採取する.その線維芽細胞を100mm培養皿で培養し、それにレンチウイルスを含有した培地を入れることによりマウスエコトロピックレセプター-Slc7a1を導入する.更に、このエコトロピックレセプターを介して感染するレトロウイルスを含有した培地を入れることにより4つの初期化因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を線維芽細胞に導入する.レトロウイルス感染後6日目に、感染済み線維芽細胞をSNLフィーダー細胞(mytomicin C処理したもの)でコーティングされた100mm培養皿に播種すると約2週間後にiPS細胞コロニーが出現してくる.このiPS細胞コロニーをピックアップし、新たに調製したSNLフィーダー細胞上に播種する.更に拡大培養を行い、十分な細胞数になったものを品質確認した後に、iPS細胞として使用する.

2) iPS細胞から誘導された血管内皮・平滑筋細胞の機能解析:

血管平滑筋細胞の誘導は次の通り行う。まず、CADASIL 患者由来 iPS 細胞を分化培地を用いて OP9 フィーダー上で 10 日間培養する。更に FACS を用いて Flk1 陽性 VE-cadherin 陰性 TRA-60 陰性細胞をソーティングし、PDGF-BB を添加した培地で培養することにより α SMA 陽性かつ calponin 陽性の血管平滑筋細胞が誘導される。この CADASIL 患者由来血管平滑筋細胞の形態学的解析および一酸化炭素負荷や張力負荷による生理機能解析を行うことにより、CADASIL の病態解析を試みる。コントロールの iPS 細胞から分化させた血管平滑筋と比較して、その分化能が異なるのか、TGF- β シグナルの異常が見られるのか、さらには、Endothelial Tube Formation Assay を用いて血管内皮細胞の血管形成能の変化を評価する。

3) CADASIL モデルマウスに対する慢性脳低灌流負荷実験：

Notch3 トランスジェニックマウス（長寿研渡辺教授グループ，Harvard Medical School，Artavanis-Tsakonas 教授グループより入手約束）に申請者が独自に確立した慢性脳低灌流侵襲（Stroke 2004, 2006, 2007, 2010a/b/c）を加え、画像診断、認知行動解析や病理組織学的観察によりこれらの経時的変化を観察する。

4. 研究成果

Notch3 の変異部位が異なる 3 名の CADASIL 患者のヒト皮膚線維芽細胞を採取した。1 患者において、その線維芽細胞を 100 mm 培養皿で培養し、それにレンチウイルスを含有した培地を入れることによりマウスエコトロピックレセプターSlc7a1 を導入した。更に、このエコトロピックレセプターを介して感染するレトロウイルスを含有した培地を入

れることにより 4 つの初期化因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を線維芽細胞に導入した。レトロウイルス感染後 6 日目に、感染済み線維芽細胞を SNL フィーダー細胞でコーティングされた 100 mm 培養皿に播種し約 2 週間後に出現してきた iPS 細胞コロニーをピックアップし、新たに調製した SNL フィーダー細胞上に播種する。更に拡大培養を行い、十分な細胞数になったものを品質確認した後に、iPS 細胞として使用した。iPS 細胞の 3 ラインを樹立した。

CADASIL 患者の iPS 細胞から血管内皮・平滑筋細胞を誘導することができた。CADASIL 患者由来の iPS 細胞から誘導した血管内皮・平滑筋細胞を表現型解析を行った。健常者から誘導された血管内皮・平滑筋細胞との比較を行い、CADASIL の病態機序を in vitro で検討した。さらに、新規入手した Notch3 トランスジェニックマウスを用いて、in vitro の系で確認した表現型をモデル動物にて確認を行うことで、CADASIL の病態解析を試みた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 16 件）

- ① [Ihara M, Okamoto Y, Takahashi R.](#) Greater suitability of the Montreal Cognitive Assessment against the Mini-Mental State Examination in the detection of vascular cognitive impairment. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, in press
【10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.01.001 [doi]】
- ② Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase

- Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M. Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia. *Neurobiol Aging* 2012 ;33(5):1012. e25-35.
【10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.033[doi]】
- ③ Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2012;233(1):523-533.
【10.1016/j.expneurol.2011.11.038[doi]】
- ④ Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Kihara T, Kinoshita A. Environmental enrichment ameliorated high fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2012;33(5):1011. e11-23.
【10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.028 [doi]】
- ⑤ Okamoto Y, Yamamoto T, Kalaria RN, Senzaki H, Maki T, Hase Y, Kitamura A, Washida K, Yamada M, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R, Ihara M. Cerebral hypoperfusion induces microinfarcts in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 2012;123(3):381-394.
【10.1007/s00401-011-0925-9[doi]】
- ⑥ Matsumura K, Ono M, Kimura H, Ueda M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. 18F-labeled Phenyldiazenyl Benzothiazole for in vivo Imaging of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer' s Disease Brains. *ACS Med Chem Lett* 2012; 3(1):58-62.
 DOI: 10.1021/ml200230e
- ⑦ Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, Takahashi R, Ito H. An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology* 2011;77(22):1993-1995
【10.1212/WNL.0b013e31823a0cfc [doi]】
- ⑧ Ihara M, Tomimoto H. Lessons from a mouse model characterizing features of vascular cognitive impairment with white matter changes. *J Aging Res* 2011;2011: 978761
【10.4061/2011/978761 [doi]】
- ⑨ Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H. Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. *Acta Neuropathol* 2011;122(2):223-229
【10.1007/s00401-011-0842-y [doi]】

- ⑩ Maki T, Wakita H, Mase M, Itagaki I, Saito N, Ono F, Adachi K, Ito H, Takahashi R, Ihara M, Tomimoto H. Watershed Infarcts in a multiple microembolic model of monkey. *Neurosci Lett* 2011;**499**(2):80-83
【10.1016/j.neulet.2011.05.036
[doi]】
- ⑪ Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H, Takahashi R. Colocalization of 14-3-3 Proteins with SOD1 in Lewy Body-Like Hyaline Inclusions in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Cases and the Animal Model. *PLoS ONE* 2011;**6**(5):e20427
【10.1371/journal.pone.0020427
[doi]】
- ⑫ Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, Harada H, Ito H, Nakao K, Tomimoto H, Takahashi R. Angiogenic roles of adrenomedullin through VEGF induction. *Neuroreport* 2011;**22**(9):442-447 (featured in the cover article)
【10.1097/WNR.0b013e32834757e4
[doi]】
- ⑬ Matsumura K, Ono M, Hayashi S, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Mori H, Saji H. Phenylidiazanyl benzothiazole derivatives as probes for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer' s disease brains. *Med Chem Comm* 2011;**2**(7):596-600. DOI: 10.1039/C1MD00034A
- ⑭ Ono M, Hayashi S, Matsumura K, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Mori H, Saji H. Rhodanine and thiohydantoin derivatives for detecting tau pathology in Alzheimer' s brains. *ACS Chem Neurosci* 2011;**2** (5): 269-275. DOI: 10.1021/cn200002t
- ⑮ Coltman R, Spain A, Tsenkina Y, Fowler JH, Smith J, Scullion G, Allerhand M, Scott F, Kalaria RN, Ihara M, Dumas S, Deary IJ, Wood E, McCulloch J, Horsburgh K. Selective white matter pathology induces a specific impairment in spatial working memory. *Neurobiol Aging* 2011;**32**(12):2324.e7-12
【10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.005 [doi]】
- ⑯ Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, Miyashita K, Yamada M, Washida K, Nishio K, Ito H, Harada H, Yokoi, H, Arai H, Itoh H, Nakao K, Takahashi R, Tomimoto H. Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke*, 2011;**42**(4):1125-1131.
【10.1161/STROKEAHA.110.603399
[doi]】

〔学会発表〕（計6件）

- ① *Masafumi Ihara. Animal models for vascular cognitive impairment due to large vessel disease. Stroke Symposium in National University of Singapore (Invited lecture). (Singapore) Oct 31, 2011
- ② *Masafumi Ihara. Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. Vas-Cog 2011 (Lille, France) Sep 14, 2011
- ③ 猪原匡史. β アミロイドの血管依存性クリアランス. 第30回日本認知症学会学術集会（東京）. 2011年11月12日
- ④ 猪原匡史, 岡本洋子, 眞木崇州, 鷺田和夫, 伊東秀文, 富本秀和, 高橋良輔. 脳低灌流により β アミロイドの血管依存性クリアランスが障害される. 第30回日本認知症学会学術集会（東京）. 2011年11月11日
- ⑤ 猪原匡史, 岡本洋子, 伊東秀文, 高橋良輔. モントリオール認知評価法 MoCA は MMSE よりも皮質下血管性認知障害の検出感度が高い. 第52回日本神経学会総会（名古屋）. 2011年5月18日.
- ⑥ Masafumi Ihara. Poster review session. Vas-Cog 2011 (Lille, France) Sep 13, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪原 匡史 (IHARA MASAFUMI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00372590