

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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～ 2012

課題番号：23790938

研究課題名(和文) 血管炎の病態解明に向けたヒト多能性幹細胞を用いた血管側からの病態解析

研究課題名(英文) Modeling microscopic polyangiitis (MPA) using patient-specific iPSCs

研究代表者

荒岡 利和 (ARAOKA TOSHIKAZU)

京都大学 iPS 細胞研究所・研究員

研究者番号：40437661

研究成果の概要(和文)：血管炎症候群の病因の一つとして近年血管側の素因も疑われているが詳しい機序は分かっていない。本研究では、顕微鏡的多発血管炎(MPA)の患者3名からiPS細胞を樹立し、血管内皮細胞に分化誘導した。さらに、健康日本人3名から樹立したiPS細胞も血管内皮細胞に分化誘導し、遺伝子発現の違いをDNAマイクロアレイによって解析したところ、MPA患者由来血管内皮細胞で健康日本人に比べて2倍以上発現が増加する遺伝子が41個、2倍以上発現が低下する遺伝子が91個候補に挙がった。

研究成果の概要(英文)：Although previous reports describe that the activation of vascular endothelial cells is involved in the development of vascular inflammation in animal models, the disease mechanisms of vasculitis remain largely unknown in human. Here, we report the derivation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from skin fibroblasts of three patients with MPA by retroviral transduction of four transcription factors or three factors. The gene expression of endothelial cells derived from human iPSCs was compared between MPA patients and healthy individuals using DNA microarray. In the endothelial cells derived from MPA patients, the expression of 41 genes was up-regulated and the expression of 91 genes was down-regulated by 2-fold compared with healthy individuals.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：顕微鏡的多発血管炎、ヒトiPS細胞、疾患特異的iPS細胞、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

血管炎症候群とは小～中型の血管を中心として血管壁の炎症をきたす病態であり、小型の血管では出血をきたし、中型の血管では臓器虚血から臓器不全や死に至る疾患群である。血管炎症候群の原因として、疫学的には欧米に比べ本邦では顕微鏡的多発血管炎(Microscopic polyangiitis; MPA)が圧倒的に多いこと(Fujimoto, S. et al., 2006)や、阪神淡路大震災の際に阪神地区にてMPAが急増したこと(Yashiro, M. et al., 2000)、さ

らには、抗好中球細胞質抗体(ANCA)などの自己抗体が検出されるため、遺伝的、環境的、免疫学的な要因も疑われるものの未だ詳細は不明である。

また、血管炎症候群は前ガイドライン同様、現在欧米で作成中の新ガイドラインにも、血管径による分類が採用される予定であり、血管側にも傷害される素因があると考えられているが、患者や健康人から直接血管を採取することは難しく、血管側からの分子機序の解明は遅れている。

治療としては、ANCA などの自己抗体の存在から免疫異常の関与が疑われるため、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が使用されているが、完全に病態をコントロールすることは困難であり、重篤な副作用も多く、これらの疾患の病態形成メカニズムの正確な理解に基づき、より特異的な治療薬の開発が望まれる。さらに、ANCA 陰性の血管炎症候群も存在しており、治療への反応性や、疾患の活動性を正確に反映するバイオマーカーが現在までのところ同定されておらず、その開発は急務である。しかし、血管炎症候群の病態を模倣する動物モデルも少なく、その解析は困難なままである。

一方、発生生物学の知見に基づいた再生医学研究が、近年盛んに行われており、無限の増殖能と多分化能を有する ES 細胞 (embryonic stem cell; 胚性幹細胞) や iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) を血管内皮細胞に分化誘導することが現在可能となっている。

このヒト多能性幹細胞から作製された血管内皮細胞を用いて病態を模倣する疾患モデルの作製と、その機能解析を行うことによって、血管炎症候群の発症と進展を抑制する治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

MPA 患者および健常日本人由来の iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞を用いて、試験管内で MPA の病態を模倣する疾患モデルの作製を行う。そして、病態形成への関与が疑われる因子を同定することによって血管自体に異常が起こるか否かを明らかとし、血管炎の発症や進展のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 成熟血管内皮細胞を用いた実験系の確立

既報のヒト多能性幹細胞から血管内皮細胞への分化誘導プロトコール (Taura, D. et al., 2009) を用いて作製された血管内皮細胞は、まだ機能的に十分成熟していない可能性も残されている。そこで、MPA 患者および健常日本人から iPS 細胞が樹立できるまでの間に、ヒト ES 細胞を用いて血管内皮細胞成熟化プロトコールの開発を開始する。

ヒト ES 細胞を前述のプロトコールを用いて分化誘導し、フローサイトメトリーにて血管内皮細胞を単離する。次に、分化誘導した血管内皮細胞に Shear stress などの血行力学刺激を加えることや、3 次元培養などを行い、血管内皮細胞の成熟を促し、血管内皮細胞成熟化プロトコールを開発する。

(2) MPA 患者および健常日本人由来 iPS 細胞の樹立

MPA の診断が確定している患者 3 名及び健常日本人 3 名より、同意の元に臍横部から皮膚組織を生検にて採取し、約 1 ヶ月間の培養にて皮膚の線維芽細胞を増殖させる。その後、京都大学山中らによって開発されたレトロウイルスベクターを用いたリプログラミング 4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) および 3 因子 (c-Myc を除く) の遺伝子導入による方法 (Takahashi, K. et al., 2007) にて、iPS 細胞を樹立する。

樹立に際して、導入した遺伝子のサイレンシングの程度を定量的 PCR で確認し、未分化マーカーによる細胞染色によって未分化状態維持を確認する。また、胚様体 (Embryoid body) や奇形腫を作製し、三胚葉系への分化能の確認を行う。さらに核型異常の有無の確認を行う。

(3) 試験管内疾患モデルの作製と新規病態関連因子の同定

MPA 患者 3 名および健常日本人 3 名から樹立した iPS 細胞に、前述の血管内皮分化誘導プロトコールを用いて、血管内皮細胞を得る。次に、患者及び健常日本人 iPS 細胞由来の血管内皮細胞をフローサイトメトリーで単離し、遺伝子発現の違いを DNA マイクロアレイにて比較解析する。さらに、開発した血管内皮細胞成熟化プロトコールを用いて、患者および健常日本人 iPS 細胞由来血管内皮細胞を成熟化させる。成熟化した血管内皮細胞に、ANCA 関連血管炎発症の重要な外来因子として疑われているシリカやアスベスト、抗 MPO 抗体や抗 Lamp-2 抗体などの自己抗体、IL (interleukin)-8 や TNF (tumor necrosis factor)- α などの炎症性サイトカインを添加し、遺伝子発現の違いを DNA マイクロアレイで比較解析する。以上より、環境、自己免疫因子に対する患者および健常日本人由来血管内皮細胞の反応性の違いを検証し、試験管内疾患モデルの作製を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞の成熟化

京都大学 iPS 細胞研究所から健常日本人 3 名から樹立した iPS 細胞を分与頂いたため、以下の実験をヒト iPS 細胞を用いて行った。前述の既報にある血管内皮分化誘導プロトコールを用いて、健常日本人 iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞をソートし、Shear stress 付加を行ったが、マーカー遺伝子発現の解析上、有意な成熟の所見が得られなかったため、現在、マトリゲル中での三次元培養の準備を行っている。

(2) MPA 患者からの iPS 細胞樹立

MPA 患者 3 名から、前述のレトロウイルスベクターを用いた方法で iPS 細胞を樹立した。さらに、樹立のために導入した遺伝子のサイレンシングに加え、未分化状態の維持、三胚葉系への分化が可能であること、さらに核型異常がないことを確認した。

(3) MPA 患者由来 iPS 細胞からの血管内皮細胞への分化誘導

前述の血管内皮細胞分化誘導プロトコルを用いて MPA 患者 3 名から樹立した iPS 細胞を分化誘導したところ、フローサイトメトリーで FLK1 及び VE-cadherin 陽性細胞の出現を認めた。また、フローサイトメトリーで単離した FLK1 及び VE-cadherin 共陽性の細胞は *CD31*、*VE-cadherin*、*CXCR4*、*DLL*、*vWF* 等の血管内皮細胞マーカー遺伝子を発現しており (図 1)、さらに細胞免疫染色でも *CD31* 及び *VE-cadherin* の発現を確認できた (図 2)。以上より、MPA 患者 iPS 細胞から、既報と同様に血管内皮細胞を分化誘導できることを確認した。

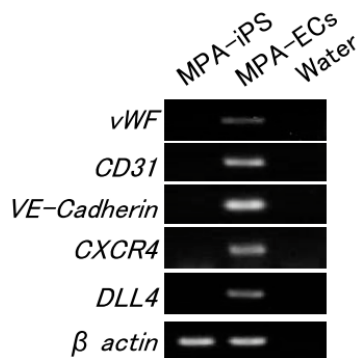


図 1 MPA 患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞の血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現

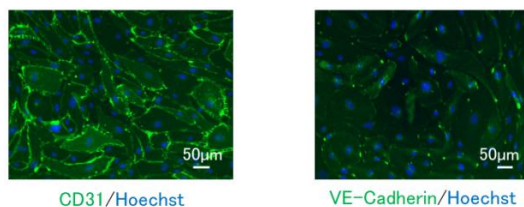


図 2 MPA 患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞の血管内皮細胞マーカー蛋白の発現

(4) MPA 患者血管内皮細胞における病態関連遺伝子の探索

MPA 患者 3 名から樹立した iPS 細胞と、健常日本人 3 名の iPS 細胞を前述の血管内皮分化誘導プロトコルを用いて血管内皮細胞に分化誘導し、DNA マイクロアレイによって発現遺伝子の差異について解析した。MPA 患者において、健常日本人に比べて 2 倍以上発現が増加する遺伝子が 41 個、2 倍以上発現が低下する遺伝子が 91 個候補に挙げられた。現在、定量的 PCR 法を用いて候補遺伝子発現の差異の再現性を確認している。

次に、血管内皮細胞の成熟化プロトコルはまだ開発途中であるため、前述の血管内皮分化誘導プロトコルにて得られた MPA 患者及び健常日本人由来血管内皮細胞を使って刺激実験を行った。これらの iPS 細胞由来血管内皮細胞を $TNF-\alpha$ 、抗 MPO 抗体及び H_2O_2 (過酸化水素) で刺激し、炎症マーカーである *IL-6*、*IL-8*、*TNF-\alpha*、*ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecule)-1* の遺伝子発現の違いを定量的 PCR 法を用いて解析したが、有意な差を見出すことができなかった。

現在、外来因子であるシリカやアスベスト、自己抗体である抗 Lamp-2 抗体、炎症性サイトカインである *IL-8* による刺激実験を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

天久 朝廷, 荒岡 利和, 長船 健二、患者由来 iPS 細胞を用いた顕微鏡的多発血管炎に対する新規疾患モデルの作製、日本臨牀(血管炎-基礎と臨床のクロストーク-)、査読なし、71 巻増刊号1、2013、pp. 512-515

〔学会発表〕 (計 3 件)

(1) 天久 朝廷, 他、Modeling vasculitis syndrome using microscopic polyangiitis (MPA)-specific iPSCs、International Society for Stem cell Research (10th annual meeting)、2012 年 6 月 14 日、横浜、神奈川

(2) 天久 朝廷, 他、「顕微鏡的多発血管炎 (MPA)」特異的 iPS 細胞の樹立と病態解析研究、第 55 回日本腎臓学会総会、2012 年 6 月 3 日、横浜、神奈川

(3) 天久 朝廷, 他、Modeling microscopic polyangiitis using patient-specific iPSCs、The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop、2012 年 3 月 29 日、品川、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒岡 利和 (ARAOKA TOSHIKAZU)

京都大学 iPS 細胞研究所・研究員

研究者番号：40437661

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

長船 健二 (OSAFUNE KENJI)

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号：80502947