

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591420

研究課題名(和文)線溶系インヒビター(PAI-1)欠損症iPS細胞から成熟分化細胞の確立と機能解析

研究課題名(英文)Generation of iPS cells from PAI-1 deficient patient and differentiation into mature cells

研究代表者

佐野 秀人(Sano, Hideto)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80623842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、独自に見出した2例のPAI-1欠損患者よりiPS細胞を樹立した(PAI-1 iPS)。得られたiPS細胞を成熟細胞に分化させ、個々の細胞におけるヒトPAI-1の本質的な役割を解析した。PAI-1 iPSから分化させた内皮細胞では、血管新生先端部のtip-cell機能に重要なDII4遺伝子の発現が上昇していた。また管腔形成過程において分枝形成数の減少が認められた。さらにゼラチンコート培養皿よりの剥離が亢進していた。これよりヒトPAI-1が内皮細胞の分化と成熟、機能発現に重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have identified two independent PAI-1 deficient patients having apparent phenotypes of severe bleeding and impaired wound healing, both of which are not seen in the PAI-1 deficient mice. To investigate the intrinsic function of PAI-1 in different cell types, iPS cells from the patients were generated, and their phenotypes have been analyzed after being differentiated to mature cells. We have first differentiated the iPS cells to endothelial cells. The expression of DII4 gene, known to be associated with the angiogenic development, was increased and the branching in the tube formation was reduced in PAI-1 deficient iPS derived endothelial cells (PAI-1 iPS-ECs). Furthermore, PAI-1 iPS-ECs were detached from dish-bottom more easily than control iPS-ECs when the cells were cultured on gelatin-coated dishes. These results suggest that PAI-1 could play critical roles in differentiation and maturation of endothelial cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：PAI-1 iPS cells endothelial cells angiogenesis 凝固・線溶

1. 研究開始当初の背景

血管内で線溶活性を制御するPAI-1はメタボリック症候群で血中濃度が上昇し血栓症のリスクを高めることから、血栓症発症の原因分子として注目され、治療標的としてその活性阻害薬の開発が盛んに行われている。最近我々は致死的な月経出血を繰り返す症例を解析し、世界第2例目のPAI-1欠損症例として報告した。また、3例目も報告予定である。本症例の発現型は月経時の致死的大出血であった。これは出血症状を示さないPAI-1遺伝子欠損マウスとも大きく異なっており、動物モデルの限界を示唆すると共にPAI-1の生理機能の見直しを迫る重要な症例と位置づけられる。本症例はまた異常出血の他に創傷治癒障害も認めた。創傷治癒には当然内皮細胞の関与が重要であり、PAI-1の欠損した内皮細胞の増殖能等機能においても何らかの異常の可能性が高い。PAI-1は種々細胞機能を変化させ、血管新生、炎症反応、腫瘍増殖及び転移に関わることが動物モデルの実験によって示されている。これは、細胞外基質のVitronectinに結合するPAI-1が細胞膜インテグリンと細胞外基質との結合を変化させることによるとされるが、その詳細は不明である。

真のPAI-1機能の解明のためにも、またPAI-1欠損症治療の開発のためにも、マウスモデルのみでなくヒトの細胞による解析も必要であり、早急に行われるべき課題であった。

2. 研究の目的

Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)は血管内線溶反応の主要な調節因子であるが、細胞接着あるいは細胞増殖を修飾することにより、組織線溶、創傷治癒、腫瘍増殖、血管新生等様々な生理反応にも関わる事実が報告されている。本研究では、PAI-1欠損患者細胞よりinduciblePluripotent Stem (iPS)細胞を樹立し、種々の成熟機能細胞に分化させることにより、各機能細胞の分化過程、並びに成熟

細胞の生理機能発現におけるPAI-1の役割並びにその分子機構を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

京都大学iPS細胞研究所との共同研究により、PAI-1欠損患者より細胞を採取し、Oct3/4、SOX-2、Klf4、c-Mycの各因子を導入することによりiPS細胞を樹立する。このiPS細胞を用いて、既報の方法を用いて血管内皮細胞などを分化させる。これら成熟細胞の基本的な細胞動態、遺伝子発現の変化等を観察すると共に、各種細胞の共培養系を確立し、各細胞間の相互作用の検討を行う。

4. 研究成果

二例のPAI-1欠損患者よりiPS細胞の樹立を行った。これらPAI-1iPS細胞から分化させた内皮細胞では、血管新生先端部のtip-cell機能に重要なDII4遺伝子の発現が上昇していた。また管腔形成過程において分枝形成数の減少が認められた。さらにゼラチンコート培養皿よりの剥離が亢進していた。これよりヒトPAI-1が内皮細胞の分化と成熟、機能発現に重要な役割を担っていると考えられた。今後はヒトPAI-1の内皮細胞における機能解析を継続するとともに、他の成熟細胞系(脂肪細胞、血小板、平滑筋細胞、肝細胞等)に分化させ、解析を行っていく。

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 4件)

Brzoska T., Tanaka-Murakami A., Suzuki Y., Sano H., Kanayama N., Urano T. : Endogenously generated plasmin at the vascular wall injury site amplifies lysine binding site-dependent plasminogen

accumulation in microthrombi. PLoS One. 2015;10(3):e0122196.

doi:10.1371/journal.pone.0122196. 査読有

Kapitsinou P.P., Sano H., Michael M., Kobayashi H., Davidoff O., Bian A., Yao B., Zhang M.Z., Harris R.C., Duffy K.J., Erickson-Miller C.L., Sutton T.A., Haase V.H. : Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. J Clin Invest. 2014 Jun 2;124(6):2396-409.

doi: 10.1172/JCI69073. 査読有

Yasui H., Suzuki Y., Sano H., Suda T., Chida K., Dan T., Miyata T., Urano T. : TM5275 prolongs secreted tissue plasminogen activator retention and enhances fibrinolysis on vascular endothelial cells. Thromb Res. 2013 Jul;132(1):100-5.

doi: 10.1016/j.thromres.2013.04.003. 査読有

Brzoska T., Suzuki Y., Mogami H., Sano H., Urano T. : Binding of thrombin-activated platelets to a fibrin scaffold through $\alpha(\text{IIb})\beta_3$ evokes phosphatidylserine exposure on their cell surface. PLoS One. 2013;8(2):e55466.

doi: 10.1371/journal.pone.0055466. 査読有

[学会発表](計 5件)

Sano Hideto. : Generation and Differentiation of Inducible Pluripotent Stem (iPS) Cells Derived From Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficient Patient. 22nd International Congress on Fibrinolysis & Proteolysis : July 6-9, 2014 Marseille, France

佐野 秀人 : Plasminogen Activator Inhibitor-1 欠損患者からの iPS 細胞樹立、第 36 回日本血栓止血学会学術集会、

平成 26 年 5 月 29 日 ~ 平成 26 年 5 月 31 日、大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

Sano Hideto. : Generation of inducible pluripotent stem (iPS) cells from plasminogen activator inhibitor-1 deficient patient and differentiation into endothelial cells. The 18th International Vascular Biology Meeting : April 14-17, 2014 Kyoto, Japan

Sano Hideto. : Generation of Inducible Pluripotent Stem (iPS) Cells from Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficient Patient. XIVth International Workshop Molecular & Cellular Biology of Plasminogen Activation : June 4-8, 2013 Nortre Dame IN

佐野 秀人 : 内皮細胞特異的 HIF ノックアウトマウスにおける急性腎炎モデルの解析、第 35 回日本血栓止血学会学術集会、平成 25 年 5 月 30 日 ~ 平成 25 年 6 月 1 日、山形国際ホテル (山形県山形市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/phys2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 秀人 (SANO, Hideto) 浜松医科大学・
医学部・助教 研究者番号：80623842

(2)研究分担者

浦野 哲盟 (Urano, Tetsumei) 浜松医科大学・
医学部・教授 研究者番号：50193967

鈴木 優子 (Suzuki, Yuko) 浜松医科大学・
医学部・准教授 研究者番号：20345812

(3)連携研究者

()

研究者番号：