

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830039

研究課題名(和文)脳小血管病におけるアクチン代謝異常のメカニズム解明と新規治療法の開発に向けた挑戦

研究課題名(英文)Pathogenic roles of actin metabolism in cerebral small vessel disease

## 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・研究所・流動研究員

研究者番号：10614927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CADASILは、血管壁細胞の変性などの血管病変と大脳白質障害を特徴とする遺伝性脳小血管病である。原因遺伝子が壁細胞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、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。本研究では、我々はCADASIL患者の皮膚生検サンプルからiPS細胞を作成し、壁細胞に分化させて、その細胞機能を健常人iPS細胞由来の壁細胞と比較した。その結果、細胞の遊走・接着能に異常がみられることがわかり、病態メカニズムにアクチン代謝が関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) is a hereditary cerebral small vessel disease caused by the mutations in NOTCH3 gene expressed in mural cells. Although many studies have conducted, the exact pathogenesis remains unclear. Here, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from CADASIL patients and differentiated them into mural cells (MCs) to replicate the pathology in vitro. Comparison between control and CADASIL MCs revealed altered migration and adhesion ability of CADASIL MCs. Those results suggests that actin metabolism is deeply involved in the pathogenesis of CADASIL.

研究分野：細胞生物学

キーワード：CADASIL 脳小血管病 脳梗塞

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い増加する白質障害は、認知症、うつ、運動障害などの発症に重要な役割を果たすことが示唆されてきた。近年、この白質の変化の背景にある脳小血管病が注目を集めているが、ヘテロな集団である Binswanger 病のみならず、遺伝性脳小血管病のうち原因遺伝子の特定に至った CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) などの疾患においてすら、未だ病態機序に不明な点が多い。

脳小血管病の特徴的病理所見として血管平滑筋細胞の変性・消失と血管反応性異常が挙げられ、血管平滑筋細胞の機能異常が病態機序に密接に関係していると考えられる。血管平滑筋細胞は非筋細胞に近い性質を有しており、フィラメント状の F-アクチンが大部分を占める心筋や骨格筋に比べ、アクチンの単量体である G-アクチンが比較的多く存在している。血管平滑筋細胞では、血圧上昇に伴い G-アクチンが重合して F-アクチンが形成され、収縮能が増強されるが、アクチン重合阻害剤を投与すると G-から F-アクチンへの再編成が阻害されるため、圧誘発性の血管反応性が低下し、最終的に basal tone の低下と血管拡張に至る。一方、アクチン重合促進安定化剤を投与すると、F-アクチンの脱重合が阻害されるため収縮能が増強するが、過重合によりアクチンの凝集が起ると細胞死に至る。

以上の点に加え、CADASIL の原因遺伝子 Notch3 が血管平滑筋特異的に発現していること、Notch3 が動脈平滑筋の分化・成熟に関わっていること、CADASIL 患者において血管拡張能、血管収縮能の異常が数多く報告されていることなどから、Notch3 変異により G-アクチン F-アクチン間の代謝が障害されている可能性が示唆される。実際、Notch3 欠損マウスの血管平滑筋細胞ではアクチンの脱重合障害が報告されている。その一方で、CADASIL での検討は十分に行われておらず、アクチンの脱重合障害または重合障害が原因か、あるいは遺伝子変異型により障害機序が異なるのかについては結論に至っていない。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、Notch3 変異による CADASIL の病態機序として、Notch3 変異により下流の Ras ファミリー G 蛋白質の RhoA シグナルに異常が起こり、RhoA で制御されるアクチン代謝が障害されることで平滑筋細胞の変性(細胞死)と血管反応性の障害に至り、脳血流の低下および血管周囲排出経路による老廃物や Notch3 細胞外ドメイン凝集物の排出の障害を経て白質障害が起こるといふ仮説を立て(図1)、Notch3 変異とアクチン代謝の関係の解明を行った。

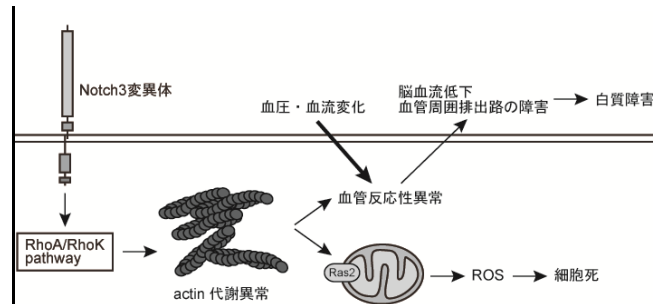


図1 Notch3 変異と白質障害

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS 細胞の樹立

NOTCH3変異が検出されたCADASIL患者3人(C106R, R141C, R182C)の皮膚生検から得られた繊維芽細胞に、OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28 をレンチウイルスまたはエプソーマルベクターを用いて遺伝子導入し、iPS細胞を樹立した。これらのiPS細胞は、染色体異常もなく、テラトマ形成による3胚葉への分化能も確認された。コントロールのiPS細胞としては、脳血管疾患および神経変性疾患のない、N177, TIG107, TIG114, TIG120を使用した。

#### (2) iPS 細胞から壁細胞の分化誘導

iPS細胞から壁細胞への分化誘導は、京大代学制御学の曾根正勝准教授らの手法を改変して行った。まず、iPS細胞を剥離、小塊にピペティングで破碎した後、WiCell培地に懸濁してコラーゲンIコートディッシュに播種した。次の日にiPS細胞が接着後、WiCell培地にBioおよびB27/N2を加えた培地で3日間培養、その後さらにStemPro-34にVEGFを加えた培地でさらに4日間分化誘導を行った。FACSによりTRA-1-60陰性・CAD144陰性・flk1陽性細胞を壁細胞として採取し、実験に使用した。壁細胞のValidationは細胞を平滑筋マーカーであるSMA, Calponin, SMMHC2, PDGFRで染色することで行った。

#### (3) 細胞機能の解析

壁細胞の基本的細胞機能の評価を行った。評価項目は増殖能、収縮能、遊走能、接着能、虚血応答性で、コントロールとCADASIL4クローンずつで比較を行った。

- ◆ 増殖能：テトラゾリウム塩であるWST-8を96well plateに播種した壁細胞の培地に加え、37℃1時間培養、450nmの吸光度を測定することで細胞数を定量した。

- ◆ 収縮能：コラーゲンをういた contraction assay をで収縮能を評価した。壁細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/ml で 0.5mg/ml のコラーゲンIゲルに懸濁し、24well plate に播種した。37℃で1時間培養してゲルを固ませた後、培地を加えてゲルを剥離し、3日間ゲルの写真を撮影して大きさの変

化を観察した。ゲルの大きさの評価は ImageJ を用いて行われた。

- ◆ 遊走能: ibidi culture insert in  $\mu$ -dish を用いて創傷治癒アッセイを行った。Culture insert に壁細胞  $3.8 \times 10^5$  cells/ml を  $70 \mu\text{l/well}$  播種し、次の日に insert を除去してアッセイを開始した。開始直後から 3 時間ごと、12 時間目まで写真撮影を行い、画像の解析には WimScratch (Wimasis) を使用した。
- ◆ 接着能: 細胞の細胞外基質への接着能を調べるため、壁細胞を細胞外基質 (laminin 421, laminin521, collagenI, collagenIV, poly-L-lysine, fibronectin) でコーティングした 96 well plate に  $2 \times 10^4$  cells/well で播種した。血清中の因子の影響を最小限にするため、播種の 6 時間前から無血清培地で培養を行った。播種後、37 で 1 時間半培養し、PBS で洗浄して非接着細胞を除去し、4%PFA で固定した。残った接着細胞は Toluidine blue で染色し、これを 2%SDS/PBS で溶解することで、それぞれの細胞外基質に対する接着細胞数の定量を行った。
- ◆ 虚血応答性: 細胞が虚血状態に置かれると、HIF-1 が増加することが知られている。虚血条件での培養は、三菱ガス化学のアネロパック・ケンキ 5% を使用して、 $\text{O}_2$  濃度 1% 以下、 $\text{CO}_2$  濃度 5% 前後で行われた。虚血条件培養 6 時間後の HIF-1 の発現量を western blotting で定量評価した。

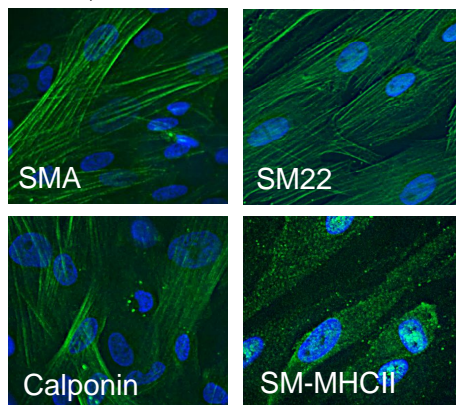
#### (4) アクチン構造の解析

細胞内骨格である F-アクチンの構造および分布を評価した。チャンバースライドに播種した壁細胞を 4%PFA で固定後、Alexa Fluor 488 で修飾された Phalloidine で染色し、写真撮影を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) iPS 細胞由来壁細胞の validation

iPS 細胞から誘導した壁細胞は、血管平滑筋マーカーの SMA, Calponin, SMMHC2, PDGFR で染色され、壁細胞に



分化していることが確認された。得られた壁細胞は、コーティングや培地の組成の違いにより形態を変化させる、血管平滑筋の特徴を有していた。

##### (2) 細胞機能の解析

iPS 細胞由来壁細胞は、増殖能に差はなかったものの、遊走能および接着能に変化が見られた。また、それに関連して、遊走および接着に関わる PDGFR および Integrin 1 の発現量にも Control と CADASIL で有意差が認められた。この際、血管平滑筋の収縮に関係する H-Caldesmon の発現にも変化が見られたため、遊走および接着だけでなく、収縮能にも何らかの変化が見られる可能性がたため、現在解析中である。CADASIL 患者では、発症のごく初期から血管の収縮や拡張機能異常が認められることが報告されており、今回の結果はこのような病態を裏付けるものであると考えられる。

虚血応答性については、壁細胞を虚血状態で培養したところ、6 時間では細胞死などの差異は認められなかったものの、CADASIL で HIF1 の誘導量の有意な減少が見られ、虚血への耐性が低下している可能性が示唆された。

##### (3) アクチン構造の解析

(2) の結果を受け、遊走および接着に係るアクチン代謝の関わりを調べるために、壁細胞を phalloidine で染色し、F-actin の分布を調べたところ、F-Actin 線維の節状の凝集や分布異常などが認められた。また、一部の細胞で、遊走に関わる Bleb と呼ばれる構造体が有意に増加していることもわかった。

これらの結果より、CADASIL の病態にアクチン代謝が深く関わっている可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表](計 2 件)

山本由美、小嶋勝利、田浦大輔 他「患者 iPS 細胞から壁細胞への分化誘導と CADASIL 病態研究への応用」VASCOG Japan 2015/9/19 (口演)

Yumi Yamamoto, Katsutoshi Kojima, Daisuke Taura et al. Patient-derived iPS cells for unraveling the molecular pathogenesis of CADASIL. VASCOG world 2015/9/16-2015/9/19 (Poster)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)

国立循環器病研究センター・研究所・流動  
研究員

研究者番号：10614927