

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860557

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞由来血管細胞分化誘導技術開発および血管病態機構解明への応用

研究課題名(英文) The establishment of vascular cell differentiation system from human ES/iPS cells and its application for the clarification of vascular pathology

研究代表者

田浦 大輔(Taura, Daisuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10558612

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)：心筋梗塞、脳梗塞などの動脈硬化病変を基盤とした虚血性疾患に対する血管再生療法、さらには新たな治療法開発を目的とし、ヒトES/iPS細胞からの血管内皮細胞および血管平滑筋細胞分化誘導技術の開発、改良に取り組んだ。さらに構築した血管細胞分化誘導法を血管関連疾患特異的iPS細胞に応用することで多発性嚢胞腎における動脈瘤形成機序、高安病の遺伝的要素、もやもや病の病態解明といった共同研究を推進できた。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells have the potential to serve as a tool to investigate human development/differentiation. We modified our vascular differentiation system of human ES/iPS cells and we have induced vascular cells more effectively and stably from various ES/iPS cell clones without any feeder cells. Using the iPS cells from patients with genetic abnormalities (patient-specific iPS cells) in vessels, we can observe vascular differentiation/development in vitro and identify new susceptibility genes associated with vascular abnormalities. Applying our differentiation system for Moyamoya-iPS, ADPKD-iPS and Takayasu-iPS cells, we have identified several molecules whose expression levels were upregulated or downregulated in vascular cells differentiated from patient-specific-iPSCs as compared to those from normal Japanese iPSCs. These results would contribute to a novel understanding of vascular abnormalities in each disease.

研究分野：再生医学

キーワード：血管細胞誘導 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)近年のライフスタイルの欧米化により糖尿病患者が増加しており、さらに高齢化社会に伴い、動脈硬化を基盤とする虚血性疾患患者は増加している。このため、心血管障害、脳血管障害などを含めた循環器疾患の治療は大きな課題であり、動脈硬化性疾患やメタボリックシンドロームという病態自体に対する新しいアプローチの開発は極めて重要なテーマである。PCIなどのinterventionが日進月歩している現在の循環器科臨床においても、これら疾患に対する根治的な治療法開発の意義は大きい。

(2)このため申請者の研究室では、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈硬化病変を基盤とした虚血性疾患に対する血管再生療法、さらには新たな治療法開発を目的とし、胚性幹細胞からの血管分化につき研究を重ね、マウスES細胞から血管内皮細胞と壁細胞の双方へ分化可能な血管前駆細胞と呼び得る細胞の単離同定に成功した(Nature 408: 92-96, 2000)後に、ヒトES細胞、さらにはヒトiPS細胞からの血管細胞分化誘導に成功した(ATVB 2007,2009)。これらヒトES/iPS細胞からの血管細胞分化誘導システムは、将来的な臨床の現場で再生医療への貢献以外に、血管細胞の分化、生理機構に関する各種遺伝子の新たな作用の同定といった応用研究にも貢献が期待できる。特にin vivoの動物実験では他動物種の生理機構は解明できてもそれが人体においても当てはまるかに関しては常に疑問が残るため、in vitroでの解析に限定されやすいという欠点はあるが、ヒト由来の細胞を用いることのできる実験系を確立できる。

2. 研究の目的

本研究では、まず現在までに構築されているヒトES/iPS細胞血管細胞分化誘導法の細部を再検討し改築する。次に構築した誘導法を用いてヒトにおける血管細胞の分化、発生、再生機構をより詳細に解析する。さらに先天的な異常により血管の障害を発症する患者からiPS細胞を樹立し、そのiPS細胞から血管細胞を分化誘導し、その機能や遺伝子発現の異常を研究することで、血管障害のターゲットになる蛋白や診断マーカーを見つけることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)既に構築したヒトES/iPS細胞からの血管細胞誘導法に関し、各種ES/iPS cloneを用いた検討を行い、手技に改良を加えることで、安定した分散feeder less培養法を確立する。確立した新規誘導法において、各誘導段階の細胞の性質を再検討する。

(2)血管の障害に先天的な遺伝子異常が関与していると想定される患者からiPS細胞を樹立する。具体的には当研究室では家族歴のある高安病患者の親子および若年発症の重症冠攣縮性狭心症患者からのiPS細胞樹立をすでに開始している。樹立した後にはそれら疾

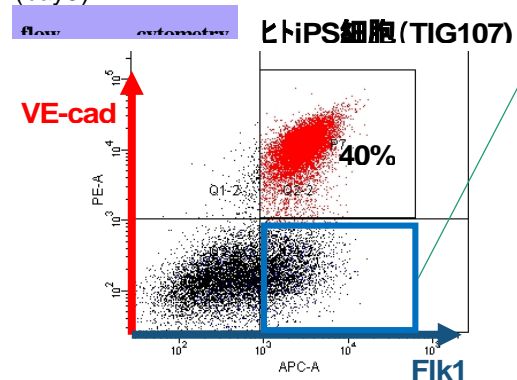
患特異的iPS細胞からの血管細胞分化を施行し、得られた血管細胞と正常iPS細胞由来血管細胞に、遺伝子発現の差や機能的な違いが見られるかを検討する。さらに当研究室では共同研究としてPKDおよびもやもや病患者から樹立されたiPS細胞を用いた血管細胞分化研究も行っているため、これら研究を継続し、網羅的な遺伝子データベース構築を目指す。

4. 研究成果

(1)血管細胞分化誘導技術の改良

これまで血管細胞分化誘導の第一段階は、ヒトES/iPS細胞の未分化コロニーを適当なサイズに分割し、培養dishに接着させることであったが、この手技の再現性が乏しく、今回、Rho/ROCK inhibitorをこのstepにのみ導入することでsingle cell状態からの分化誘導が可能となった。結果、セルラインや各実験runによる血管内皮細胞誘導効率の差異が減少し、より安定した誘導系を確立できた。さらに使用するVEGF濃度も詳細に検討し、現在ではヒトiPS細胞のラインによっては40%程度を超える誘導効率で血管内皮細胞を簡便に誘導できるシステムを構築できている(図1)。改良した誘導法において得られる細胞の性質に、従来のものとは比べ、差は見られなかった。

(図1)フローサイトメトリーによる解析(day8)



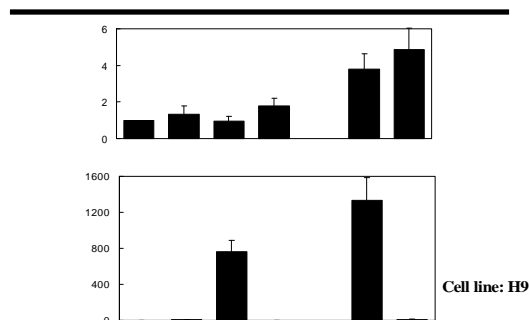
(2)血管平滑筋分化誘導法の改良

これまでもsortしたFlk1陽性VE-cadherin陰性細胞分画に追加誘導を施すことで、SMAやcalponinが陽性の血管壁細胞(mural cell)を誘導できていたが、これら細胞は血管平滑筋細胞(SMCと似た細胞性質を示すものの、DNAマイクロアレイでクラスター解析を行うとヒト成熟血管平滑筋細胞との差異が観察され、十分に成熟した血管平滑筋細胞ではなく、むしろNG2やPDGFRといったpericyteマーカーを発現しており、pericyteとしての性質を強く持つことが判明した。このため、より成熟したSMC誘導を目指し、各種液性因子添加の影響および誘導に用いる血清濃度に関して検討した。結果、誘導の中期にのみTGF-1を加え、低血清で培養することで、血管平滑筋細胞への分化誘導が促進され、SMA、calponinのみならず更にSMC分化の後期マーカーと考えられる

SM2 や SM22 陽性の細胞を誘導することに成功した。

(3) ヒト ES/iPS 細胞由来血管構成細胞の内分泌学的評価

我々が誘導した血管構成細胞 EC または MC が内分泌学的見地からもヒト血管細胞と相同するものかを確認するため、各種心血管ホルモンおよびその受容体の発現が、我々の構築した血管細胞分化誘導法において経時的にどのように変化するかにつき解析した。結果、アドレノメデュリンが EC、MC の双方で発現しているのに対し、エンドセリンは誘導して得られた EC でのみ発現しており、その発現はヒト成熟血管内皮細胞と同等であった。



(図2) 上段はアドレノメデュリン、下段はエンドセリンの mRNA 発現を示す。サンプルは左から順に 未分化 iPS 細胞、Flk1(+)Ve-cadherin(-)細胞、iPS 由来 EC、iPS 由来 MC、さらにコントロールとして、右二列にヒト成熟血管内皮細胞およびヒト成熟血管平滑筋細胞を示した。

さらに、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの中で、BNP のみが、分化誘導過程で得られる Flk1(+)Ve-cadherin(-)細胞分画で強発現、実際に培養液中にも産生されていることを見出した。その受容体である GC-A 発現は同細胞では弱く、血管内皮細胞にまで誘導した後に強い発現を示したため、血管細胞分化において、幼弱な血管細胞と考えられる Flk1(+)Ve-cadherin(-)細胞が産生する BNP はパラクラインに何らかの作用を及ぼしているのではないかと推測し、この BNP 発現・産生に生理的意義があるかに関して現在検討を重ねている。

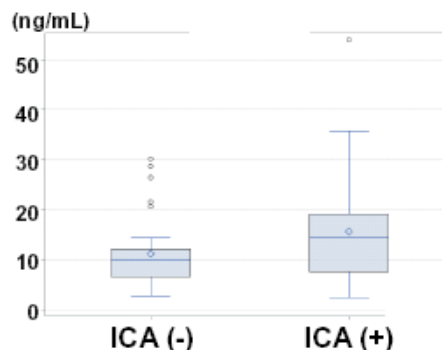
(4) 疾患特異的 iPS 細胞への応用

家族発症高安病患者の母、娘から同意の上、iPS 細胞を樹立、それらを用いた解析を行った。正常 iPS 細胞由来 EC をコントロールとして使用し、高安病 iPS 由来 EC の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により網羅的に確認した。結果、細胞免疫に関するいくつかの遺伝子が高安病 iPS 細胞で高発現していることが判明し、高安病における血管病変の病態解明に繋がる知見が得られたと考えている。

共同研究として実施しているもやもや病患者由来 iPS 細胞を用いた研究では、もやもや病患者由来 iPS 細胞から誘導して得た

EC(moyamoya-EC)の tube formation 能が低いことを見出し、さらに DNA マイクロアレイ解析から、moyamoya-EC では細胞周期に関連するいくつかの遺伝子発現が有意に変動していることを発見した。これら結果はもやもや病感受性遺伝子 RNF213 に関する研究が進むことに貢献した。

また当大学 iPS 細胞センターとの共同研究で継続して実施している ADPKD(多発性嚢胞腎)患者由来 iPS 細胞を用いた研究では、ADPKD-iPS 由来 EC を用いて ADPKD で高頻度に脳動脈瘤を呈する病態解明を目指した。コントロールとして正常 iPS 細胞を用いた他、臨床的に脳動脈瘤を呈する PKD 患者、呈さない PKD 患者それぞれから複数の iPS 細胞ラインを樹立した。結果、臨床的に脳動脈瘤を呈する PKD 患者由来 iPS 細胞から誘導した EC でのみ発現が異なる遺伝子の同定に成功、この分子の血清濃度が臨床、ADPKD 患者の中で脳動脈瘤を呈する危険因子としてスクリーニングに有用であるという結果が得られ、現在論文投稿中である。



(図3) ADPKD 患者由来 iPS 細胞からの血管内皮細胞分化誘導研究によって見出した A を臨床的に脳動脈瘤を呈しない ADPKD 患者群(ICA(-))と臨床的に脳動脈瘤を呈する ADPKD 患者群(ICA(+))で血清中濃度として測定した。結果、mean ± SD; 15.6 ± 10.9 vs 11.2 ± 6.9 ng/mL P=0.048 という結果で有意差が得られた。

上記の結果はいずれもヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞分化誘導技術を応用したものであるが、改良した血管平滑筋細胞分化誘導技術を血管関連疾患特異的 iPS 細胞に応用することで、血管病変の主体が血管内皮ではなく、血管平滑筋にある疾患に関しても更なる研究が可能となった。実際、現在 CADASIL 他の病態解明のため、CADASIL 患者由来 iPS 細胞を用いた血管内皮細胞分化および血管平滑筋細胞分化研究にも、共同研究として取り組んでいる。

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3件)

すべて査読あり

Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, Taura D, Ebihara K, Tanaka T, Hosoda K, Takahashi K, Asaka I, Inagaki N, Nakao K. Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutation.

Metabolism.2016 Apr;65(4):543-56 Epub 2016 Jan 7.

Kobayashi H, Matsuda Y, Hitomi T, Okuda H, Shioi H, Matsuda T, Imai H, Sone M, Taura D, Harada KH, Habu T, Takagi Y, Mimiya S, Koizumi A. Biochemical and functional characterization of RNF213(Mysterin) R4810K, a susceptibility mutation of moyamoya disease, in angiogenesis in vitro and in vivo. J Am Heart Assoc. 2015 Jun 30;4(7).

Sonoyama T, Sone M, Tamura N, Honda K, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K. Role of endogenous ACTH on circadian aldosterone rhythm in patients with primary aldosteronism. Endocr Connect. 2014 Dec;3(4):173-9.

〔学会発表〕(計 4 件)

第 111 回日本内科学会総会(2014 4/11)

第 87 回日本内分泌学会学術総会(2014 4/25)

第 14 回日本再生医療学会総会(2015 3/19)

第 88 回日本内分泌学会学術総会(2015 4/25)

〔図書〕(計 1 件)

田浦大輔 他

最新肥満症学 日本臨床

6. 研究組織

(1)研究代表者

田浦 大輔 (Daisuke Taura)

京都大学大学院医学研究科

糖尿病内分泌栄養内科

代謝制御学講座

特定助教

研究者番号：10558612

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

曾根 正勝 (Masakatsu Sone)