

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860583

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた新規動脈硬化抑制因子の探索

研究課題名(英文) The exploratory research to investigate the novel anti-atherosclerotic factor using iPS cells

研究代表者

楠本 大 (Kusumoto, Dai)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70571727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の進展には糖尿病などの環境リスク因子が大きな影響を及ぼすが、患者の遺伝的要因も同様に重要である。中には大変稀であるが、動脈硬化リスクが非常に高いにもかかわらず動脈硬化の進展が全く認められない患者(抗動脈硬化患者)が存在する。そのような患者は内因性の非常に強い抗動脈硬化機構を有しているはずである。本研究では抗動脈硬化患者より作成した疾患iPS細胞を用いて内因性の抗動脈硬化機構を解明し、根治を目指した新規治療法開発を行いたいと考えた。

研究成果の概要(英文)：Throughout our lives, we are exposed to cellular stress, which causes age-related diseases, such as metabolic syndromes, atherosclerosis, and cancer. Although we have evolved several innate protective mechanisms from cellular stress, the damage is often cumulative and irreversible. However, in rare cases, patients with strong chronic stress such as uncontrolled diabetes, exhibit minimal organ damage, suggesting that they would have strong innate protective mechanisms. Although there are several methods of genetic analysis, including genome-wide association study and exome sequencing, the vascular protective mechanisms are still unknown. In this study, we used the endothelial cells (ECs) derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) of severe diabetic patients with mild atherosclerosis to examine these innate protective mechanisms and explore a molecular target, to propose a novel vascular protective mechanism against cellular stresses.

研究分野：循環器内科

キーワード：動脈硬化 iPS細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の進展には糖尿病などの環境リスク因子が大きな影響を及ぼすが、患者の遺伝的要因も同様に重要である。中には大変稀であるが、動脈硬化リスクが非常に高いにもかかわらず動脈硬化の進展が全く認められない患者(抗動脈硬化患者)が存在する。そのような患者は内因性の非常に強い抗動脈硬化機構を有しているはずである。近年発達した、網羅的ゲノム解析にもかかわらずその十分な機構は未解明である。理由として患者の遺伝的情報と実際の細胞動態をリンクさせた解析が不足している事がある。近年、患者の遺伝的背景に伴う細胞動態をよく反映させる手法として、患者から iPS 細胞を樹立し目的の細胞に分化させることで解析を行う、疾患 iPS 細胞の技術が注目されている。本研究では抗動脈硬化患者より作成した疾患 iPS 細胞を用いて内因性の抗動脈硬化機構を解明し、根治を目指した新規治療法開発を行いたいと考えた。

動脈硬化を含む老化関連疾患の進行において、様々な慢性ストレスに起因する細胞老化、及び老化細胞より生じる炎症惹起が臓器老化に大切であると言われている。動脈硬化は血管における老化関連疾患であり、やはり細胞老化から始まる炎症惹起というプロセスが最も重要である。動脈硬化進行には様々な細胞や因子が関与しているが、中でも血管内皮細胞の役割は非常に大きい。動脈硬化の始まりにおいて、血管内皮細胞は血液中の様々なリスク因子と直接接触することで生じる酸化ストレスに暴露され、細胞老化が誘導され炎症惹起することが非常に重要であると言われている。すなわち抗動脈硬化患者から樹立した iPS 細胞由来血管内皮細胞(iPSC-ECs)は、抗老化・炎症に働く機構を有していると考え、同機構を利用して新規治療法に結びつけたいと考えた

2. 研究の目的

抗動脈硬化患者より iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞に分化させることで、内因性の抗動脈硬化機構の解明を行う。抗動脈硬化の Key となる因子を同定し、その効果を細胞・動物を用いた実験にて検証を行い、将来の臨床応用へと繋げる。

3. 研究の方法

(1) 抗動脈硬化 iPSC-ECs(Athero-R-iPSC-ECs)の作成

まず始めに、抗動脈硬化患者の選定を行った。動脈硬化の強力な促進因子を有しているにもかかわらず血管障害を有していない症例を抗動脈硬化(Athero-R)として選別し、コントロール群としてはリスク相応に血管障害を有する患者を選択した。これらの患者群より iPS 細胞を樹立した。我々は、患者より採

血を行い末梢血 T 細胞を増殖させ、センダイウイルスを用いてリプログラミングファクターを感染させることで、3~4 週間で iPS 細胞を安定的に樹立できるという報告を過去に行っており(T.Seki. et al.:cell stem cell 7:11-14,2010) 患者への侵襲度を考えて同方法により iPS 細胞の樹立を行った。iPS 細胞から血管内皮細胞へ分化誘導を行った。接着培養による系で7-9日間分化誘導を行い、PECAM、VEcadherin 陽性の細胞を FACS により分離を行い、血管内皮細胞を安定的に得ることができた。

(2)Athero-R-iPSC-ECs の表現型解析と、Transcriptome による Key factor の探索

糖尿病、高血圧、脂質異常症などの心血管リスクファクターは、血管内皮細胞において酸化ストレスを生じ、細胞老化、炎症惹起、などを生じることで動脈硬化が進展することが知られている。そこで、Athero-R-iPSC-ECs において酸化ストレス誘導性の老化が抑制されているかどうか、B ガラクトシダーゼ染色、あるいは DNA damage response、p53-p21 経路の活性などにより検討を行った。また細胞老化の結果として炎症惹起因子にどのような影響を与えるか、qRT-PCR にて定量評価した。

また、Athero-R-iPSC-ECs における表現型の違いがどのような因子によってもたらされているか抽出するため Microarray を用いた網羅的 Transcriptome 解析を行った。Microarray の結果よりバイオインフォマテイクスの手法を用いて、再現性高く発現上昇している因子の抽出を行った。

(3)抽出した抗動脈硬化因子の in vitro における抗老化、抗炎症効果の検証

網羅的解析により抽出した抗動脈硬化因子が、実際に Athero-R-iPSC-ECs で観察された表現型に関して説明出来るか検討を行う。抗動脈硬化因子をクローニングし、血管内皮細胞ラインである HUVEC に強制発現を行う。それにより、老化・炎症が抑制されるかどうか、同様の手法において検討を行った。またストレスに誘導される炎症惹起を媒介する有名な転写因子である、NFkB 活性が抗動脈硬化因子により抑制されるかどうか、免疫染色あるいはレポーターアッセイを用いて検討を行った。

(4)抽出した抗動脈硬化因子が、動脈硬化を抑制するメカニズムの検討

抗動脈硬化因子が、どのようにして動脈硬化を抑制しているか検討するために、抽出した抗動脈硬化因子の結合蛋白質を質量分析法を用いた網羅的プロテオーム解析により詳細なメカニズムの検討を行った。

(5) in vivo モデルにおける、抗動脈硬化因子の抗炎症効果検討

抗動脈硬化因子が、実際にマウスモデルにおいてどのような効果を有するか検討を行う。血管内皮細胞特異的な影響を検討するため、Tie2 プロモーター下に抗動脈硬化因子を強制発現させるマウスを作成した。特に抗炎症効果の実証に焦点を当てるため、大腿動脈カフモデルを用いて血管炎症を誘導し、抗動脈硬化因子が炎症抑制できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) Athero-R-iPSC-ECs の作成

上述の通り、選択した Athero-R 患者より iPSC 細胞を作成した。作成した iPSC 細胞は、Oct4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-81 などの各種未分化マーカー陽性であり、形態学的にもコントロール iPSC と比較し差異は認めなかった。また Taratoma formation により 3 杯葉分化能を確認し、染色体検査により染色体異常がない事を確認した。次に iPSC 細胞を血管内皮細胞へと分化を行った。血管マーカーである PECAM, VEcadherin, vWF 陽性であり、またマトリジェル上にて管腔構造形成可能、DiI-acLDL 取り込み可能であり、機能的な血管内皮細胞であることが証明された。

(2) Athero-R-iPSC-ECs の表現型解析

SA-B-gal 染色により酸化ストレス誘導性の細胞老化を検討したところ、Athero-R-iPSC-ECs では明らかに細胞老化が抑制されていた。また H2AX による DDR foci も減少し、P53 リン酸化、P21 発現も低下しており、DNA damage response による細胞老化が抑制されていることが分かった。また qRT-PCR により、炎症マーカーである CCL2, ICAM1, IL6 などを測定したところ Athero-R-iPSC-ECs で明らかに抑制されており、老化細胞による炎症惹起も抑制されていることが分かった。Microarray による網羅的解析を行い、Athero-R-iPSC-ECs で再現性高く発現上昇している因子を抽出したところ、動脈硬化抑制因子 A を Key となる抗動脈硬化因子候補として抽出した。

(3) 動脈硬化抑制因子 A 強制発現による抗老化・抗炎症効果

抽出した動脈硬化抑制因子 A の in vitro における効果を検討するため、クローニングし、血管内皮細胞ラインである HUVEC に強制発現を行なった。同様に酸化ストレス誘導性の細胞老化、炎症惹起を抑制できるかどうか検討を行なったところ、動脈硬化抑制因子 A が明らかに抑制できる事が分かった。また細胞老化、炎症惹起を誘導すると言われてい

る有名な転写因子である NFkB の活性化を測定したところ、動脈硬化抑制因子 A が活性を抑制できる事が判明した。興味深いことに、酸化ストレス誘導性の NFkB 活性化のみではなく、TNFa 誘導性の活性化に関しても抑制することがわかり、酸化ストレスなどの消去系ではなく、直接的に NFkB 活性を抑制していることが示唆された。

(4) 動脈硬化抑制因子 A による抗老化・抗炎症機構のメカニズム探索

動脈硬化抑制因子 A がどのように NFkB の活性化を抑制するか検討するために、結合蛋白質の網羅的解析を行った。その結果、核内外の蛋白質輸送に関わるタンパク質群が検出された。動脈硬化抑制因子 A は NFkB の核外輸出を促進することで、抗老化・抗炎症の作用を有すると思われた。

(5) 血管内皮細胞特異的動脈硬化抑制因子 A 強制発現マウスの解析

動脈硬化抑制因子 A を血管内皮細胞特異的に強制発現するマウスを作成し、大腿動脈にプラスチックカフを装着し抗炎症効果を検証した。免疫染色を行うと、動脈硬化抑制因子 A は ICAM1, CCL2, IL6 などの炎症惹起因子発現を抑制し、NFkB 活性も抑制した。内膜肥厚に関しても明らかに抑制されており、血管内皮細胞においてカフに誘導されるストレスレスポンスを抑制することで、血管保護的に働いていると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Shimojima M, Yuasa S, Motoda C, Yozu G, Nagai T, Ito S, Lachmann M, Kashimura S, Takei M, **Kusumoto D**, Kunitomi A, Hayashiji N, Seki T, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Egashira T, Hayashi K, Nakanishi C, Sakata K, Yamagishi M, Fukuda K. Emerin plays a crucial role in nuclear invagination and in the nuclear calcium transient. **Sci Rep.** 2017 Mar 14;7:44312. 査読有
2. Kunitomi A, Yuasa S, Sugiyama F, Saito Y, Seki T, **Kusumoto D**,

- Kashimura S, Takei M, Tohyama S, Hashimoto H, Egashira T, Tanimoto Y, Mizuno S, Tanaka S, Okuno H, Yamazawa K, Watanabe H, Oda M, Kaneda R, Matsuzaki Y, Nagai T, Okano H, Yagami K, Tanaka M, Fukuda K. H1foo Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**. 2016 Jun 14;6(6):825-33. 査読有
3. Hashimoto H, Yuasa S, Tabata H, Tohyama S, Seki T, Egashira T, Hayashiji N, Hattori F, **Kusumoto D**, Kunitomi A, Takei M, Kashimura S, Yozu G, Shimojima M, Motoda C, Muraoka N, Nakajima K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Fukuda K. Analysis of cardiomyocyte movement in the developing murine heart. **Biochem Biophys Res Commun**. 2015 Sep 4;464(4):1000-7. 査読有
 4. Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, Hara M, Ito N, Hashimoto H, **Kusumoto D**, Seki T, Tohyama S, Kodaira M, Kunitomi A, Kashimura S, Takei M, Saito Y, Okata S, Egashira T, Endo J, Sasaoka T, Takeda S, Fukuda K. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. **Nat Commun**. 2015 Apr 13;6:6745. 査読有
 5. Kodaira M, Hatakeyama H, Yuasa S, Seki T, Egashira T, Tohyama S, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Hashimoto H, **Kusumoto D**, Kunitomi A, Takei M, Kashimura S, Suzuki T, Yozu G, Shimojima M, Motoda C, Hayashiji N, Saito Y, Goto Y, Fukuda K. Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels. **FEBS Open Bio**. 2015 Mar 20;5:219-25. 査読有
 6. Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, **Kusumoto D**, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **J Am Heart Assoc**. 2014 Nov 11;3(6). 査読有
- 〔学会発表〕(計 2 件)
1. **Dai Kusumoto**, Shinsuke Yuasa, Tomohisa Seki, Makoto Takei, Akira Kunitomi, Shin Kashimura, Shugo Tohyama, Chikaaki Motoda, Yoshikazu Kishino, Nozomi Hayashiji, Sarasa Isobe, Toshiya Tanaka, Koichiro Homma, Hiroshi Itoh, Keiichi Fukuda. [Primate specific gene, POTEE has a protective role against vascular injury 1 in endothelial cells].(第 81 回日本循環器学会 学術集会 (The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society)). ANA クラウンプラザホテル (石

川島金沢市) (March 17 – 19 (March 17),
2017). 口頭発表 YIA Basic Research 部
門 優秀賞

2. Dai Kusumoto, Shinsuke Yuasa,
Keiichi Fukuda. [Modeling the
anti-atherosclerosis with patient specific
induced pluripotent stem cells]. (第 79 回
日本循環器学会学術集会(The 79th Annual
Scientific Meeting of the Japanese
Circulation Society)).リーガロイヤルホテ
ル大阪 (大阪府大阪市) (April 24 – 26
(April 25), 2015) 口頭発表

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
楠本 大 (KUSUMOTO DAI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70571727

研究者番号：

(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
()