

課題番号 : 26指113

研究課題名 : ヒト i P S 細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発 :

マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開

主任研究者名 : 湯尾 明

分担研究者名 : 佐伯久美子、福田尚司、川口実太郎、佐伯晃一

キーワード : ヒト E S ・ i P S 細胞、ヒト血管内皮細胞、マイクロRNA、RGS5、動脈狭窄

研究成果 :

虚血性の疾患は血管平滑筋細胞の増殖による動脈狭窄によって惹起され、そのような場における血管内皮細胞の役割の解明が重要である。我々は、ヒト血管内皮細胞が、ヒト血管平滑筋細胞の増殖を促進するか抑制するかにより2種類の分類できること、その鍵となる分子が、RGS5であること、以上のことが脈管疾患においても重要であること、この内皮の性質は生体内でも再現できること、等を明らかにしてきた。

今年度内に、本研究の骨格を形成する重要な点について、以下のように3つの大きな進展があった。まず1番目には、ヒト i P S 細胞やヒト E S 細胞から我々の手法で作成した血管内皮細胞のマウス生体内での平滑筋増殖抑制効果の有無については、申請時には、センダイウイルスベクター樹立ヒト i P S 細胞とレトロウイルスベクター樹立ヒト i P S 細胞という由来も樹立法も全く異なる i P S 細胞での比較検討であった。この2種類の細胞は平滑筋細胞の増殖促進か抑制かという点以外にも様々の相違点があり、このような2者の比較では、平滑筋細胞増殖抑制に対応する相違点のみにピンポイントで焦点を当てることができない。一方、今回、1種類のヒト E S 細胞に由来する血管内皮細胞の継代の若い時のものと、継代して老化したものととの比較で、前者が善玉、後者が悪玉であるという in vivo データを得ることができた。これにより、全く異なる i P S 細胞間 (センダイベクター樹立株 vs レトロベクター樹立株) の比較ではなく、より生理的でしかも1種類のヒト E S 細胞由来内皮の継代数の違いのみの比較になり、そのような比較によるマイクロRNAマーカー (善玉 vs 悪玉) の検討が、有力な比較検討対象の候補となった。この他、申請時には、市販のヒト血管内皮を悪玉群として比較対象に用いる計画であったが、比較対象としてはヒト i P S 細胞由来血管内皮細胞とは様々の面において大きく異なり、また、実験系として細胞種の新規性、独自性が乏しかった。今回の進展によりマイクロRNAマーカー検索の実現性、的確性のみならず、新規性、独自性が大いに高まった。次に2番目には、本研究の分子標的の中心であるRGS5は、その命名の示すとおり「regulator of G protein signaling」の中で5番目に見つかった分子で、7回膜貫通型G蛋白共役受容体の細胞内刺激伝達を直接に制御する分子であるが、申請時には、我々の系において関与する具体的な7回膜貫通型G蛋白共役受容体の候補が示されていなかった。その後の研究の進展により、血管内皮細胞において重要な役割を果たす生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の受容体 (7回膜貫通型G蛋白共役受容体) が我々の系でのそのような候補であることが判明し、その下流でp38MAPキナーゼが平滑筋細胞の増殖抑制に関わることも解明され、創薬の分子標的が大きく広がった。実際に、S1P受容体の特異的阻害剤 (FTY720) でも平滑筋増殖抑制作用が修飾され、創薬の標的となることが実例をもって示された。さらに3番目には、血管内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用において重要な役割を果たすカドヘリンの1種 (N-cadherin) が、我々の系でも重要な役割を果たすことが明らかとなり、S1P受容体、p38MAPキナーゼの下流で機能していることが明らかとなった。すなわち、異なる細胞間の接触による細胞間相互作用の直接の分子機構が解明され、こちらも創薬の標的として大きく発展が期待される。

Subject No. : 2 6 指 1 1 3

Title : Development of novel diagnosis and therapeutics using human endothelial cells induced from human iPS cells: microRNA marker, chemical pharmacology and cell therapy

Researchers : Kumiko Saeki, Shoji Fukuda, Jitsutaro Kawaguchi, Koichi Saeki

Key word : human ES/iPS cells, human endothelial cells, microRNA, RGS5, arteriostenosis

Abstract :

Ischemic organ failures are caused by arteriostenosis, whose pathological basis is hyperproliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC). However, the role for vascular endothelial cells (VEC) in arteriostenosis development remains elusive. Here we report that VECs are categorized into two groups: while primary cultured human VECs exclusively enhanced VSMC proliferation (type-I, pro-proliferative), VECs freshly generated from bone marrow-derived endothelial progenitors cells (EPC) or embryonic stem (ES)/induced pluripotent stem (iPS) cells suppressed VSMC proliferation (type-II, anti-proliferative). Various stressors including oxidative stress and ageing induced type-II to type-I conversion of EPC/ES/iPS-derived VECs with an induction of Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5), which bound sphingosine-1-phosphate receptor 1 and suppressed p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities. Inhibition of p38 MAPK not only caused N-cadherin mislocalization but also induced RGS5 expression, creating a vicious cycle between RGS5 induction and p38 MAPK inhibition. Immunostaining studies of clinical specimens demonstrated that VECs of normal arteries were RGS5-negative whereas VECs of pathological arteries with hypertension, atherosclerosis or autoimmune vasculitis showed enhanced RGS5 expressions in a dose-dependent manner. Transplantation of type-II human iPS-derived VECs completely blocked the development of injury-induced arteriostenosis while that of type-I human iPS-derived VECs resulted in total stenosis. Thus, VECs play dual roles: RGS5^{low} type-II VECs prevent while RGS5^{high} type-I VECs exacerbate the development of ischemic diseases.

26指113「ヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発:マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開」

主任研究者:独立行政法人国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部長 湯尾 明

動脈硬化巣における血管狭窄は血管平滑筋細胞の過剰増殖による！！

血管内皮細胞は隣接する血管平滑筋細胞の増殖を抑制すべきである！！

接触培養での平滑筋増殖抑制効果のまとめ(抑制:善玉 ←→ 促進:悪玉)

1. HUVECならびにヒト初代培養成体由来内皮細胞で増殖促進
2. ヒトEPC由来内皮細胞で増殖抑制と促進(ドナーによる)
3. ヒトEPC由来内皮細胞で継代と共に増殖促進
4. ヒトES細胞由来内皮細胞で増殖抑制 (miRNA探索に用いた系)
5. ヒトES細胞由来内皮細胞で継代と共に増殖促進 (miRNA探索に用いた系)
6. ヒトiPS細胞由来内皮細胞で増殖促進(レトロウイルスベクター)
7. ヒトiPS細胞由来内皮細胞で増殖抑制(センダイウイルスベクター)

左の全ての系で関与する分子
RGS5 (regulator of G protein signaling 5)
→ 悪玉化因子

我々の開発したヒトiPS細胞由来血管内皮細胞移植法の2つの大きなメリット

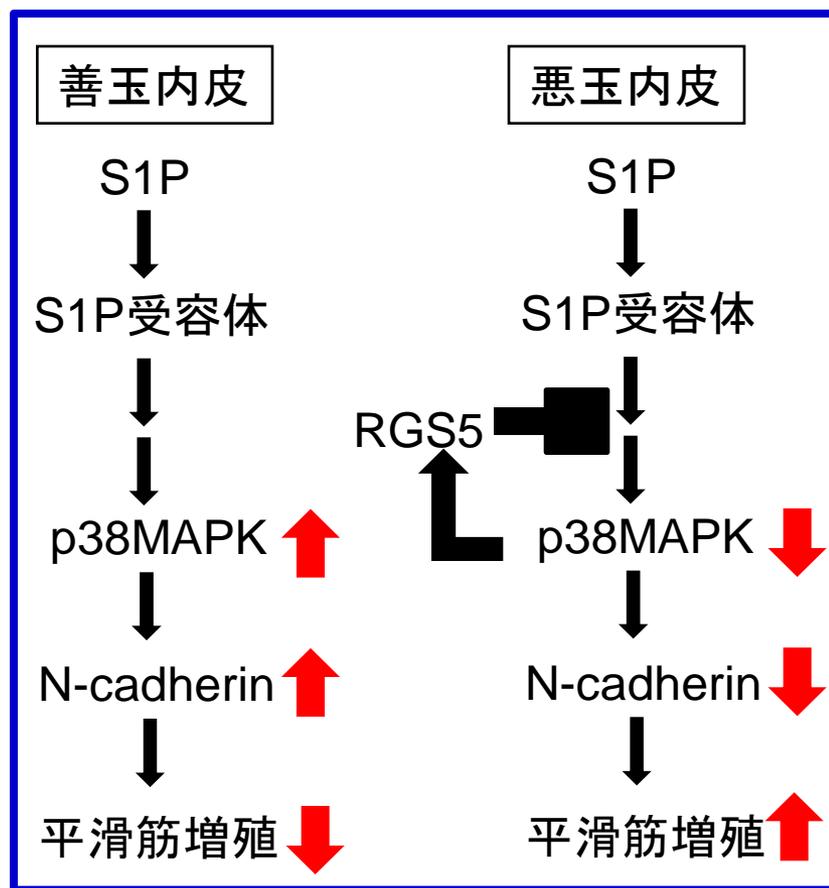
- 動脈の外側にマトリゲルと混ぜてそっと置いて、動脈内腔側に移動して生着する、という安全かつ確実な手法である
- 移植の1週間後には、ヒト由来血管内皮細胞が内腔側に確認されるが、3週間後には消失しており、宿主のマウス血管内皮細胞に置き換わっている

今年度の現時点までに、本研究の骨格を形成する重要な点について、以下のように3つの大きな進展があった。

①研究計画が採択された後に、1種類のヒトES細胞株に由来する血管内皮細胞の継代の浅い若いものと、継代して老化したものとの比較で、前者が善玉、後者が悪玉であるというin vivoデータを得ることができた。これにより、全く異なるiPS細胞間(センダイベクター樹立株vsレトロベクター樹立株)の比較ではなく、より生理的でしかも一種類のヒトES細胞由来内皮の継代数の違いのみの比較が最も適切で妥当な比較検討の候補に浮かび上がり、そのような比較によるmiRNAマーカー(善玉vs悪玉)の検討を先ずは優先的に行うこととなった。

②(右図参照)本研究の分子標的の中心であるRGS5は、7回膜貫通型G蛋白受容体のシグナル伝達を負に制御する分子であるが、我々の系において具体的な受容体の候補が示されていない。採択後の研究の進展により、血管内皮において重要な役割を果たす生理活性脂質スフィンゴシン1リン酸(S1P)の受容体が有力候補と判明し、その下流でp38MAPKが平滑筋増殖抑制とRGS5の低下に関わること、などが解明され、創薬の分子標的が大きく広がった。また、S1P受容体の特異的阻害剤(FTY720)でも平滑筋増殖抑制作用が修飾され、創薬の標的となることが実例をもって示された。

③(右図参照)血管内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用において重要な役割を果たすN-cadherinが、我々の系でも重要な役割を果たすことが明らかとなり、S1P受容体、p38マップキナーゼの下流で機能していることが明らかとなった。すなわち、異なる細胞間の接触による細胞間相互作用の直接の分子機構が解明され、こちらも創薬の標的として大きく発展が期待される。



課題番号 : 26指113

研究課題名 : ヒト i P S 細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発 :

マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開

主任研究者名 : 湯尾 明

分担研究者名 : 佐伯久美子 (分担研究課題: マイクロRNA解析)

キーワード : ヒトES細胞、ヒト i P S 細胞、ヒト血管内皮細胞、マイクロRNA、RGS5、動脈狭窄

研究成果 :

血管内皮細胞の機能として内腔裏打・血液凝固制御・血管トーン調節が報告されていたが、申請者らは血管内皮細胞の新しい機能として「血管平滑筋細胞の増殖制御」を提唱している。即ち、1) 正常 (善玉) の血管内皮細胞は血管平滑筋細胞の増殖を抑制して血管狭窄の防止に寄与すること、2) 老化や酸化ストレスにより変性 (悪玉化) した血管内皮細胞は血管平滑筋細胞の増殖を促進して血管狭窄を助長すること、3) 血管内皮細胞の悪玉化は *RGS5* 遺伝子の誘導が原因であること、を示した。以上、血管内皮細胞の変性に伴う *RGS5* 遺伝子の誘導を完全に阻止する薬剤を開発することは、血管狭窄の防止/治療の新たな扉を開く。本研究では、申請者らが開発した独自の研究ツールを駆使して、1) 生体内における血管内皮細胞の善玉/悪玉の判定に有用なバイオマーカーの探索を目的として研究を行う。

既に *RGS5* 遺伝子が血管内皮細胞の悪玉化の原因遺伝子であることを明らかにしているが、これ自体は臨床において血管内皮細胞の悪玉化状況を判定するためのマーカーとしては非常に使いにくい。その理由は、*RGS5* は細胞内蛋白であるため流血中を巡回する血管内皮前駆細胞 (EPC) を回収して発現を定量する必要があるが、単球等の血球成分においても *RGS5* が発現しており、かつ EPC と単球は細胞表面マーカーに共通性があるため EPC における *RGS5* 発現を正確に定量することは難しい。そこで本研究では、血球成分でも発現していない悪玉血管内皮細胞または善玉血管内皮細胞に特異的な新規マーカーを同定して臨床診断に役立てる。なお、善玉血管内皮細胞と悪玉血管内皮細胞に関する多くのライブラリーを用いて申請者らが既に実施しているマイクロアレイ解析では、蛋白コード遺伝子中では *RGS5* が悪玉血管内皮細胞に特異的発現様式を示した唯一の遺伝子であったことから、新規マーカーとしては「蛋白非コード遺伝子」が標的となる。近年、蛋白非コード遺伝子として micro RNA は多領域において注目を集めている。本研究では新しい診断マーカーとして有望視されている micro RNA に注目して新規な悪玉マーカーまたは善玉マーカーとなる micro RNA を探索する。

網羅的な miRNA 解析の結果、ヒトES細胞 (KhES-5、京都大学再生医科学研究所にて樹立) から分化誘導した血管内皮細胞の継代の少ない若い細胞 (p2) (善玉) と継代した細胞 (p13) (悪玉) の比較検討において、p2 に比べて p13 で 2 倍以上増加した miRNA が 17、1/2 以下に減少した miRNA が 94、SwitchON 型 (p2 で発現が無く p13 で発現) の miRNA が 26、SwitchOFF 型 (p2 で発現していて p13 で発現が無い) の miRNA が 76 という結果を得た。今後は、他のヒトES細胞株 (KhES-1、KhES-3) での若い内皮と継代した内皮での比較、複数のヒト i P S 細胞由来の血管内皮 (善玉と悪玉の両方有り) との比較、悪玉初代培養血管内皮細胞 (ヒト冠動脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、いずれも市販) などとの比較を行い、平滑筋増殖抑制 (促進) 活性と相関が高い miRNA の絞り込みを加速させて、善玉 (悪玉) miRNA マーカーの同定に進むとともに、併せて行う通常の網羅的発現解析 (mRNA のマイクロアレイ解析) の結果と比較検討して miRNA が発現を制御している作用対象 mRNA の同定も行う。

課題番号 : 26指113

研究課題名 : ヒト i P S 細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発 :

マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開

主任研究者名 : 湯尾 明

分担研究者名 : 福田尚司 (分担研究課題 : 細胞移植療法の臨床)

キーワード : ヒト E S 細胞、ヒト i P S 細胞、ヒト血管内皮細胞、マイクロRNA、RGS5、動脈狭窄

研究成果 :

申請者らは血管内皮細胞の新しい機能として「血管平滑筋細胞の増殖制御」を提唱している。即ち、1) 正常 (善玉) の血管内皮細胞は血管平滑筋細胞の増殖を抑制して血管狭窄 (動脈狭窄) の防止に寄与すること、2) 老化や酸化ストレスにより変性 (悪玉化) した血管内皮細胞は血管平滑筋細胞の増殖を促進して血管狭窄 (動脈狭窄) を助長すること、を示した。

このような血管内皮細胞の善玉形質、悪玉形質が培養系のみならず生体でも再現できるか否かについて研究を進めてきた。マウスを用いた *in vivo* の実験系を駆使して研究を行ってきたが、その際にいくつかの重要な障壁を克服して興味深い結果を得ることができた。

まず、手法の点における工夫であるが、血管内皮細胞を動脈狭窄が発生する現場にデリバリーする手法に関して、血管の内側に注入しても高い内圧と早い血流に伴う動脈の内腔側への到達は容易ではない。我々は、内皮細胞を間質基質 (マトリゲル) と混ぜて動脈 (具体的にはマウス大腿動脈) の外側にそっと置くだけで、(おそらくは血管壁を貫通する血管を養う血管 (*vasa vasorum*) を介して) 血管壁を通り抜けて動脈腔側に移動して内面を覆う、ことを確認できた。さらに、内腔側に裏打ちされたヒト由来血管内皮細胞は、移植後 1 週間後には確認されるが、移植後 3 週間では消失してマウス血管と置き換わっていることが確認できた。すなわち、ヒト i P S 細胞由来の血管内皮細胞は最終的には排除されるので治療モデルにおいても自己の i P S 細胞である必要が無いことが示唆された。また、i P S 細胞に由来する移植細胞が残存しないということは、それによる癌化などの心配も無いことは明らかである。

以上のようなマウスの *in vivo* の系により、動脈狭窄惹起操作として *wire injury* を用いて実験を行った。善玉内皮の代表として Sendai ウイルスベクター樹立 i P S 細胞由来内皮、悪玉内皮の代表としてレトロウイルスベクター樹立 i P S 採用由来内皮、をそれぞれ用いた。その結果、悪玉内皮はこのような *in vivo* の系においても動脈狭窄を悪化させ、善玉内皮は軽減させることが示された。

今後はこの系を応用して、善玉内皮の治療効果を判定するモデル系を構築して、ヒト i P S 細胞由来血管内皮細胞移植療法の試験を行ってゆく予定である。

課題番号 : 26指113

研究課題名 : ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発 :
マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開

主任研究者名 : 湯尾 明

分担研究者名 : 川口 実太郎

キーワード : ヒト iPS 細胞、血管内皮細胞

研究成果 :

虚血性疾患（虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、など）は世界的に増加し主要な死亡原因となっている。日本でも、第1位のがんに続き、第2位が脳血管障害、第3位が虚血性心疾患であるが、世界の死因の第1位は虚血性心疾患、第2位が脳血管疾患である。また、糖尿病患者においては、これらの疾病はマクロアングイオパシーと総称され、生命予後に重大な影響を与える合併症として位置づけられている。このような重要な疾患に対しての新規の有効な診断法、治療法の開発が本研究の目的である。国立国際医療研究センターではヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導する技術を有しており、その解析の過程で血管内皮細胞の平滑筋増殖抑制能の喪失に関与する分子を発見している。ディナベックでは SeV ベクター技術を用いることでヒト iPS 細胞の作製を行っており、SeV ベクターで作製されたヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞がその研究に用いられた。平滑筋増殖抑制能に関与することを発見したこの分子はマウスへの細胞移植試験の結果より、この分子の発現を抑制することで血管内皮細胞の損傷による血管狭窄に抑制できることが明らかとなっている。この分子を標的とした創薬スクリーニングを行うことを目的として周辺技術（新規 iPS 細胞の作製、血管内皮細胞分化）の研究を行った。ヒト線維芽細胞に SeV ベクターを感染させ、iPS 細胞を作製した。iPS 細胞の作製には OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC の組み合わせと共に c-MYC を L-MYC に置き換えた作製も行った。L-MYC を用いた場合においても従来の c-MYC を用いた方法と同様に iPS 細胞のコロニーが出現した。得られた iPS 細胞のコロニーは ALP 染色陽性であり、抗 SeV 抗体染色によって SeV 陰性であることを観察した。この iPS 細胞の継代を複数回行った後に凍結保存した。今回樹立されたヒト iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導する予定である。

課題番号 : 26指113

研究課題名 : ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発 :
マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開

主任研究者名 : 湯尾 明

分担研究者名 : 佐伯 晃一

キーワード : ヒト iPS 細胞、血管内皮細胞

研究成果 :

虚血性疾患（虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、など）は世界的に増加し主要な死亡原因となっている。日本でも、第1位のがんに続き、第2位が脳血管障害、第3位が虚血性心疾患であるが、世界の死因の第1位は虚血性心疾患、第2位が脳血管疾患である。また、糖尿病患者においては、これらの疾病はマクロアングイオパシーと総称され、生命予後に重大な影響を与える合併症として位置づけられている。このような重要な疾患に対しての新規の有効な診断法、治療法の開発が本研究の目的である。国立国際医療研究センターではヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞を分化誘導する技術を有しており、その解析の過程で血管内皮細胞の平滑筋増殖抑制能の喪失に関与する分子を発見している。ディナベックでは SeV ベクター技術を用いることでヒト iPS 細胞の作製を行っており、SeV ベクターで作製されたヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞がその研究に用いられた。平滑筋増殖抑制能に関与することを発見したこの分子はマウスへの細胞移植試験の結果より、この分子の発現を抑制することで血管内皮細胞の損傷による血管狭窄に抑制できることが明らかとなっている。この分子を標的とした創薬スクリーニングを行うことを目的として周辺技術（新規 iPS 細胞の作製、スクリーニング用細胞の作製）の研究を行った。ヒト線維芽細胞に SeV ベクターを感染させ、iPS 細胞を作製し、NANOG の発現上昇と SeV ベクターが除去されていることを観察した。SeV ベクターの除去は免疫染色に加えて、リアルタイム PCR による評価を行った。NOD-scid マウスの皮下に作製した iPS 細胞を移植し、テラトーマが形成されることを観察した。スクリーニング用の細胞を作製するためにライセンスフリーの緑色蛍光タンパク質の検討を行った。SeV ベクターに搭載し、HeLa 細胞やヒト iPS 細胞に感染させたところ、その蛍光は既存の蛍光タンパク質と遜色ないことを観察した。同時に赤色蛍光タンパク質についても評価を行ったが、赤色蛍光タンパク質の凝集が原因とみられる細胞毒性が観察された。標的となる分子の下流にこの緑色蛍光タンパク質を組み込むことで、標的分子の発現に連動して蛍光タンパク質が発現するようになり、蛍光アプリケーションとして創薬スクリーニングが可能と想定している。現在、ゲノムに組み込むためのベクター構築を進めている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指113

研究課題名：ヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞を駆使した新規の診断法・治療法の開発：マイクロRNAマーカー診断、低分子創薬、細胞治療の展開

主任研究者名：湯尾 明

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
白血球、特にマスト細胞による血管炎症の制御。血液内科 69:343-348, 2014.	湯尾 明	血液内科	69	2014
「脂肪細胞---疾患病態における意義」	佐伯久美子	医学のあゆみ	3000号記念特集号	2014
ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞の作製	佐伯久美子	医学のあゆみ	250巻9号	2014
Methods of Adipose Tissue Biology Part A (Chapter 10)	Nishio M, Saeki K	Methods in Enzymology	Vol. 537	2014
脂肪細胞---疾患病態における意義	佐伯久美子	医学のあゆみ	3000号記念特集号	2014
ヒト多能性幹細胞から褐色脂肪細胞への分化誘導	佐伯久美子	ホルモンと臨床	平成26年6月号	2014
ヒトiPS/ES細胞から樹立した褐色脂肪細胞の機能	佐伯久美子	The Lipid	2014年1月号	2014
iPS細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導	佐伯久美子	Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2014	平成26年1月25日発行	2014
より進歩した体細胞リプログラミング法:センダイウイルスベクター (CytoTune-iPS)による進歩	川口実太郎・伴 浩志・佐伯晃一	細胞	46	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Dual roles for endothelial cells in arteriostenosis development: unexpected impacts of human iPS-derived endothelial cells on ischemic disease control.	Saeki K, Nishio M, Nakahara M, Yuo A	The 8th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell	Busan, Korea	2015年3月
Regulator of G-protein signaling (RGS-5)による血管内皮細胞の品質管理に寄与するキナーゼの同定。	中原正子、西尾美和子、湯尾 明、佐伯久美子	第14回日本再生医療学会総会	横浜	2015年3月
血管内皮細胞による血管平滑筋増殖抑制の機序：動脈狭窄症の新規治療開発に向けて。	西尾美和子、中原正子、湯尾 明、佐伯久美子	第14回日本再生医療学会総会	横浜	2015年3月
動脈狭窄症の新規治療開発に向けた新しい細胞モデル系の開発。	西尾美和子、中原正子、湯尾 明、佐伯久美子	日本内分泌学会第32回内分泌代謝学サマーマナー	山梨	2014年7月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。