

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 : 佐伯久美子、福田尚司、川口実太郎、佐伯晃一

キーワード : ヒトES・iPS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促進するかにより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。

今年度は、マイクロRNAに関する研究において大きな成果が得られた。すなわち、網羅的なmiRNA解析(miRNAアレー)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、Switch ON型(p2で発現が無くp13で発現)のmiRNAが26、Switch OFF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。

さらに、本年度は、当初の研究計画に立ち戻り、顕著な差を示す2群、すなわち、悪玉度の高い市販初代培養内皮と安定的な善玉内皮細胞であるSendaiウイルスベクター樹立ヒトiPS細胞由来内皮の2群での網羅的なmiRNA解析(miRNAアレー)を行った。その結果、悪玉で顕著に高いmiRNAと逆に善玉で顕著に高いmiRNAをそれぞれ抽出できた。これらの結果は、あくまでアレーの結果であり、本当に発現がそのようであるか否かを確定するために、抽出された全てのmiRNAの定量PCRを行っている。現時点で定量PCRでも再現性が確認されたmiRNAは複数存在し、さらに、様々の解析を行っているが、今後の論文発表や特許出願を考慮して、公表は差し控えたい。

また、IDファーマ社との共同研究により、創薬スクリーニングの作成において進捗があった。IDファーマ社のSeVベクター技術を用いることでヒトiPS細胞の作製し、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研究に用いられた。平滑筋増殖作用を担保する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。

Subject No. : 26指113

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).

This year, we investigated miRNA expression in both type-I and type-II VEC to find novel miRNA marker for the typing of VEC. As a result, we found several miRNA specific for type-I and type-II VEC and analyzed them in detail. These results of our study will be published elsewhere in the near future.

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

本研究の成果に関して、以下のように4つの論文発表が行われた。

Nishio M, Nakahara M, Sato C, Saeki K, Akutsu H, Umezawa A, Tobe K, Yasuda K, Yuo A, Saeki K: New categorization of human vascular endothelial cells by pro- versus anti-proliferative phenotypes. World J Transl Med 4:88-100, 2015.

Nakahara M, Nishio M, Saeki K, Yuo A, Saeki K: p38 MAPK regulates type-I versus type-II phenotyping of human vascular endothelial cells. World J Transl Med 4:101-112, 2015.

Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Fujiu K, Iwata H, Manabe I, Yuo A, Saeki K: Pro- versus anti-stenotic capacities of type-I versus type-II human iPSC-derived endothelial cells. World J Transl Med 4:113-122, 2015.

Nishio M, Nakahara M, Yuo A, Saeki K: Human pluripotent stem cells: towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases. World J Stem Cells 8:56-61, 2016.

課題番号 : 26指113

研究課題名 : マイクロRNA解析

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iPS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ナップ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。

本年度は、顕著な差を示す2群、すなわち、悪玉度の高い市販初代培養内皮と安定的な善玉内皮細胞である Sendai ウイルスベクター樹立ヒト iPS 細胞由来内皮の2群での網羅的な miRNA 解析 (miRNA アレー) を行った。その結果、悪玉で顕著に高い miRNA と逆に善玉で顕著に高い miRNA をそれぞれ抽出できた。これらの結果は、あくまでアレーの結果であり、本当に発現がそのようであるか否かを確定するために、抽出された全ての miRNA の定量 PCR を行っている。現時点で定量 PCR でも再現性が確認された miRNA は複数存在し、さらに、様々の解析を行っているが、今後の論文発表や特許出願を考慮して、公表は差し控えたい。

課題番号 : 26指113

研究課題名 : 細胞移植療法の臨床

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ES細胞、ヒトiPS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が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iPS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iPS細胞である必要が無いことが示唆された。また、iPS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 iPS 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 iPS 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iPS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 : iPS細胞作製およびRGS5のゲノム編集
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。ID ファーマでは 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。ヒト線維芽細胞に温度感受性強化型の SeV ベクターを感染させ、アルカリホスファターゼ陽性の iPS 細胞を作製し、SeV 抗体染色により SeV ベクターが除去されていることを観察した。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青色蛍光タンパク質および橙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。HeLa 細胞において、橙色蛍光タンパク質は以前検討を行った赤色蛍光タンパク質に比べて、顕著な蛍光タンパク質の凝集や強い細胞毒性は観察されなかった。これまで検討を行った緑色蛍光タンパク質を標的となる分子の下流に組み込む一方、上記の青色蛍光タンパク質や橙色蛍光タンパク質を組み込むことで、バックグラウンドの補正を行いつつ標的分子の発現解析が行えるようになり、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。

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
New categorization of human vascular endothelial cells by pro- versus anti-proliferative phenotypes.	Nishio M, Nakahara M, Sato C, Saeki K, Akutsu H, Umezawa A, Tobe K, Yasuda K, Yuo A, Saeki K	World J Transl Med	4:88-100	2015
p38 MAPK regulates type-I versus type-II phenotyping of human vascular endothelial cells.	Nakahara M, Nishio M, Saeki K, Yuo A, Saeki K	World J Transl Med	4:101-112	2015
Pro- versus anti-stenotic capacities of type-I versus type-II human iPS-derived endothelial cells.	Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Fujiu K, Iwata H, Manabe I, Yuo A, Saeki K	World J Transl Med	4:113-122	2015
センダイウイルスベクターを用いた体細胞リプログラミング法の改良と臨床用キットの開発。	川口実太郎, 佐伯晃一	BIO Clinica	30:453-454	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Dual roles for endothelial cells in arteriosclerosis 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

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。