

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 :

●研究の概要について

虚血性疾患（虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、等）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位の癌に続き、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リ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。

我々は、ヒト E S ・ i P S 細胞に由来する善玉内皮細胞と悪玉内皮細胞の両者の培養系を既に有し、両者間でのマイクロRNA (miRNA) を網羅的に比較検討することにより、診断につながるマーカーの創出が可能であり、きわめて必要性の高い研究計画で有る。さらに、内皮細胞悪玉化分子 (RGS5) を用いた低分子創薬研究も展開する予定であり、臨床的な意義がきわめて大きい。細胞移植療法という観点からは、血管狭窄に対して現在は血管形成術 (ステント留置術) が広く施行されているが、血管内皮細胞の剥脱を伴うため「術後再狭窄」や「ステント血栓症」といった問題があり、「血管内皮細胞の迅速補充技術の開発」が急務となっている。即ち、虚血性疾患の根治療法の開発に向けては、従来の血管形成術に「血管内皮細胞移植治療」を組み合わせたコンビネーション療法が必須であり、これはまさに「再生医療技術を適用した細胞療法が不可欠である」ことを意味する。

血管内皮細胞の臨床的重要な性質（「善玉」 v s 「悪玉」）に関わる現象とその分子メカニズムという我々独自の基盤的なツールに根ざした開発研究であり、独創的で臨床的な成果が得られる可能性が極めて高い。とりわけ、miRNA マーカーの探索は癌の分野では既に推進されているが代謝疾患や脈管疾患の分野では未開拓で、多くの新しい知見が得られると期待される。また、創薬の標的も我々独自で、しかも、用いる低分子ライブラリーも定評の有るもので、着実な成果が期待される。さらに、これまで不可能であった圧力の高い動脈内腔に迅速かつ確実に血管内皮細胞を補充する斬新な技術も開発しており、虚血性疾患の根治に繋がる血管拡張術と善玉内皮細胞移植によるコンビネーション療法の臨床試験の扉が開かれる。

●研究開始当初の成果について

研究開始初年度において、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、申請時においては、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浅い若い時のものと、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 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 iPS 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。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、申請時においては、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。以上の顕著な研究成果は、2016 年において、3 つの英文原著論文として国際学術誌において公表された。

●miRNA に関する成果について

研究初年度の検討により、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において、継代という比較的生理的な変化に伴う悪玉化によって適当数の miRNA が変化することが確認できた。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、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。

研究次年度は、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 が 19 種、逆に善玉で顕著に高い miRNA が 4 種、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なか否かを確定するために、抽出された全ての (合計で、19 種 + 4 種 = 23 種) miRNA の定量 PCR を行った。

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。

●創薬スクリーニングに関する成果について

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。

一方で、創薬研究に関しては、miRNA の研究が大きく進捗して、その標的として、大きく浮かび上がってきた。miRNA は、もちろん低分子ライブラリースクリーニングによる創薬の標的となり得るが、未だ殆ど開拓されていない分野で、発展性と独自性が極めて高い。

まず、その手法として、大きく分けて3つのストラテジーが考えられる。

- ① 通常の蛋白をコードする遺伝子の場合と同じように、miRNA をコードするゲノム領域にゲノム編集技術を駆使してレポーター遺伝子（GFP など）をノックインし、その発現の有無を蛍光により検出して、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行う。
- ② miRNA をコードする領域の遺伝子発現機構が（例えば、non-coding RNA に有りがちな RNA ポリメラーゼⅢを介するような）蛋白翻訳が行われなかもしれないメカニズムである可能性（その場合は蛍光蛋白が出来ない）が否定できないため、異なる仕組みも用意しておく必要が有る。例えば、miRNA の標的配列と蛍光蛋白の両方をつなげたベクターを構築して、細胞内で特定 miRNA が発現されると、その標的配列を有するメッセンジャーRNA に由来する融合蛍光蛋白の量が減少して蛍光が減弱する、という新しい手法を駆使して低分子化合物ライブラリースクリーニングを行うというやり方である。
- ③ miRNA の場合は、既に、低分子核酸化合物による特異的阻害剤の開発が進んでいて、当該研究を独自に推進している東京大学医科学研究所のグループとの共同研究により、低分子化合物の網羅的なスクリーニングを行うこともなく、miRNA 候補が見つかり次第、その特異的阻害剤が用意できる、という画期的な流れである。阻害剤は、その分野の他の専門家との更なる共同研究により、様々な構造修飾を経て、より安定で特異性が高く有効な化合物（治療薬の有力候補）への発展する可能性を秘めていることは言うまでも無い。

以上の miRNA を標的とした応用的な創薬研究により、次には、創薬研究の成果が逆に miRNA の分子機構の解明という基盤研究に還元されて、miRNA 研究全体が相乗的に大きく進むと期待される。

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 :

General aspects of the present study including purposes, necessities and future directions

Ischemic organ failures including ischemic heart diseases, cerebrovascular diseases and arteriosclerosis obliterans, are increasing year by year and thus considered to be one of the important and major causes of human death. Also in diabetic patients, these vascular diseases are major complication with high risk of fatal outcome and are called as “macroangiopathy” (as compared with so-called “microangiopathy”).

Ischemic organ failures are caused by arteriostenosis, whose pathological basis is hyperproliferation of vascular smooth muscle cell. However, the role for vascular endothelial cells in arteriostenosis development remains elusive. Here we report that vascular endothelial cells are categorized into two groups: while primary cultured human vascular endothelial cells exclusively enhanced vascular smooth muscle cell proliferation (type-I, pro-proliferative), vascular endothelial cells freshly generated from bone marrow-derived endothelial progenitors cells (EPC) or embryonic stem (ES)/induced pluripotent stem (iPS) cells suppressed vascular smooth muscle cell proliferation (type-II, anti-proliferative).

By using these in vitro co-culture systems with endothelial cells and smooth muscle cells, we investigated in the present study miRNA which plays critical roles in these important phenotypes of various kinds of human vascular endothelial cells. In regard to miRNA, recent studies have been mainly focused on cancer cell biology, and the roles of miRNA in the vascular systems and metabolic diseases remain to be studied.

Results of the initial steps of the present studies

During the first year of the investigation, we succeeded in providing three major important findings to strengthen the fundamental aspects of our study to support the appropriateness of our in vitro co-culture system.

First of all, we found by using human ES cell-derived endothelial cells that young endothelial cells with minimal numbers of passages express anti-proliferative phenotypes whereas older endothelial cells with substantial numbers of passages express pro-proliferative phenotype, suggesting phenotype conversion depend upon subcultures. By using this system, we can analyze patterns of miRNA expression with the same ES-derived endothelial cell of different passage numbers. This analysis is apparently superior to the analysis using endothelial cells differentiated from entirely different origins of human iPS cells or primary cultured human endothelial cells.

Second, we have already found that RGS5 (regulator of G protein signaling 5) plays an important role for the determination of the phenotypes of endothelial cells and during the first year of the study project, we found G protein-coupled receptor, namely sphingosine-1-phosphate receptor, is major candidate for RGS5-mediated regulation of the function of G protein-coupled receptors on endothelial phenotypes. In addition, we found that p38 mitogen-activated protein kinase is down-stream signaling molecules of RGS5 and G protein-coupled receptor.

Finally, we identified N-cadherin as a possible cell membrane molecule which is involved in the interaction between endothelial cells and smooth muscle cells.

Thus, we will be able to use these molecules such as RGS5, sphingosine-1-phosphate receptor, and p38 mitogen-activated protein kinase as molecular targets of drug discovery.

These three findings have been published as three articles as follows:

1. Nishio M, et al. New categorization of human vascular endothelial cells by pro-versus anti-proliferative phenotypes. *World J Transl Med* 4:88-100, 2015.
2. Nakahara M, et al. p38 MAPK regulates type-I versus type-II phenotyping of human vascular endothelial cells. *World J Transl Med* 4:101-112, 2015.
3. Nishio M, et al. Pro- versus anti-stenotic capacities of type-I versus type-II human iPS-derived endothelial cells. *World J Transl Med* 4:113-122, 2015.

Results for miRNA studies

According to the successful results of the first year of our research using endothelial cells differentiated from human ES cells, we performed, in the initial experiment, comparative analyses of miRNA expression patterns (miRNA array) of vascular endothelial cells derived from the same human ES cells, i. e., “young” endothelial cells with the low numbers of passages versus “old” endothelial cells with high numbers of passages. As a result, we detected 17 miRNA increased, 94 miRNA decreased, 26 miRNA appeared (switch ON type), 76 miRNA disappeared (switch OFF type) during passages.

In addition, we also performed comparative analyses of miRNA expression patterns of vascular endothelial cells derived from two kinds of human iPS cells and primary cultured human vascular endothelial cells of various origins, including human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human neonatal dermal microvascular endothelial cells (HMVEC), human adult aortic endothelial cells (HAEC) and human adult coronary arterial endothelial cells (HCAEC).

As a result, we identified several miRNA specific for type-I, pro-proliferative endothelial cells or type-II, anti-proliferative endothelial cells, and analyzed them in detail (including quantitative PCR analyses). These results of our study will be published elsewhere in the near future.

Results for drug discovery

We constructed screening system for drug discovery by cooperative study with ID Pharma Company. By using SeV vector technology, scientists in this company produced human iPS cells and induced differentiation of iPS cells toward vascular endothelial cells. These iPS cells and

endothelial cells were genetically modified to support drug discovery, i.e., reporter genes were inserted around or near the marker genes for phenotypes of endothelial cells.

We also identified several miRNA to determine endothelial cell phenotypes and by using miRNA identified in this study as a marker for type-I pro-proliferative endothelial cells, we started drug discovery research to find out useful molecules to suppress pro-proliferative phenotype of endothelial cells. We used small molecules in the library open to us and searched a possible drug candidate. When we use miRNA as a molecular target for drug discovery, several interesting and important aspects would be suggested and considered. One of the most important aspects is that there already exist specific inhibitors for each miRNA and such inhibitors might be hopeful candidates for useful drug. Thus, miRNA could be a wonderful target for drug therapy.

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

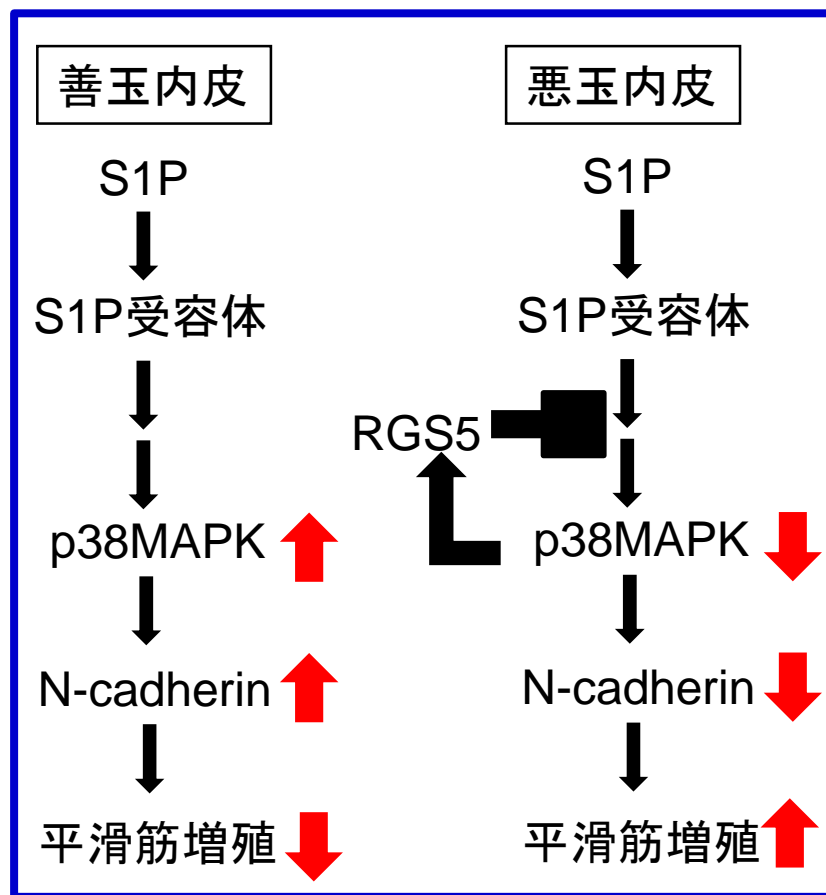
- 動脈の外側にマトリゲルと混ぜてそっと置いて、動脈内腔側に移動して生着する、という安全かつ確実な手法である
- 移植の1週間後には、ヒト由来血管内皮細胞が内腔側に確認されるが、3週間後には消失しており、宿主のマウス血管内皮細胞に置き換わっている

研究開始初期において、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。



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.

miRNAに関する成果

●研究開始当初の成果：

ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞において、継代という比較的生理的な変化に伴う悪玉化によって適当数のmiRNAが変化することが確認できた。すなわち、網羅的なmiRNA解析(miRNAアレー)の結果、ヒトES細胞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。

●研究最終年度までの成果：

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が19種、逆に善玉で顕著に高いmiRNAが4種、それぞれ抽出できた。さらに、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(合計で、19種+4種=23種)miRNAの定量PCRを行った。現時点で定量PCRでも再現性が確認されたmiRNAは複数存在した。miRNAの阻害剤の開発は十分可能で、創薬への展開が大きく期待される。

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 :

虚血性疾患 (虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、等) 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位の癌に続き、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リ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。

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ンア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 を探索した。

血管内皮細胞の臨床重要な性質 (「善玉」 vs 「悪玉」) に関わる現象とその分子メカニズムという我々独自の基盤的なツールに根ざした開発研究であり、独創的で臨床的な成果が得られる可能性が極めて高い。とりわけ、miRNA マーカーの探索は癌の分野では既に推進されているが代謝疾患や脈管疾患の分野では未開拓で、多くの新しい知見が得られると期待される。また、創薬の標的も我々独自で、しかも、用いる低分子ライブラリーも定評の有るもので、着実な成果が期待される。

研究初年度の検討により、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において、継代という比較的生理的な変化に伴う悪玉化によって適当数の miRNA が変化することが確認できた。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、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。

研究次年度以降は、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 が 19 種、逆に善玉で顕著に高い miRNA が 4 種、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（合計で、19 種 + 4 種 = 23 種）miRNA の定量 PCR を行った。

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 :

虚血性疾患 (虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、等) 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位の癌に続き、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。

我々は、ヒトES・iPS細胞に由来する善玉内皮細胞と悪玉内皮細胞の両者の培養系を既に有し、両者間でのマイクロRNA (miRNA) を網羅的に比較検討することにより、診断につながるマーカーの創出が可能であり、きわめて必要性の高い研究計画で有る。さらに、内皮細胞悪玉化分子 (RGS5) を用いた低分子創薬研究も展開する予定であり、臨床的な意義がきわめて大きい。

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。

細胞移植療法という観点からは、血管狭窄に対して現在は血管形成術 (ステント留置術) が広く施

行されているが、血管内皮細胞の剥脱を伴うため「術後再狭窄」や「ステント血栓症」といった問題があり、「血管内皮細胞の迅速補充技術の開発」が急務となっている。即ち、虚血性疾患の根治療法の開発に向けては、従来の血管形成術に「血管内皮細胞移植治療」を組み合わせたコンビネーション療法が必須であり、これはまさに「再生医療技術を適用した細胞療法が不可欠である」ことを意味する。さらに、これまで不可能であった圧力の高い動脈内腔に迅速かつ確実に血管内皮細胞を補充する斬新な技術も開発しており、虚血性疾患の根治に繋がる血管拡張術と善玉内皮細胞移植によるコンビネーション療法の臨床試験の扉が開かれる。

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。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。

ID ファーマではセンダイウイルス（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。

SeV ベクターはレンチウイルス、アデノウイルス、プラスミドベクター等と異なり、原理的に染色体挿入が無い RNA ウイルスベクターである。その特性から、最も簡便に iPS 細胞を得るためのベクターシステムとして、サーモフィッシュサイエンティフィック社から世界中に販売されており（ID ファーマが製造し、日本国内は医学生物学研究所から販売）、臨床用のベクターも開発されている。

最近、従来型のベクターと比較して温度感受性を強化した SeV ベクターの開発を行った。新規に開発された SeV ベクターは 35 度で発現が持続し、37 度で速やかに消失する温度感受性強化型の SeV ベクターである。

この温度感受性強化型の SeV ベクターを用いてヒト線維芽細胞から iPS 細胞の作製を行った。SeV ベクター感染から 21 日後にアルカリホスファターゼ陽性のコロニーが得られた。得られた iPS 細胞の継代を行い、SeV 抗体染色およびリアルタイム PCR により SeV ベクターが除去されていることを観察した。多能性は NOD-scid マウスの皮下に作製した iPS 細胞の移植を行い、テラトーマが形成され、外胚葉、中胚葉、内胚葉に分化することを観察した。温度感受性強化型の SeV ベクターを用いることで、従来型のベクターと比較して早いタイミングでベクターの除去が観察された。

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 ベクターに蛍光タンパク質遺伝子を搭載し、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。以前検討した赤色蛍光タンパク質の tagRFP や mKate2 を SeV ベクターに搭載し、ヒト iPS 細胞に感染させると、顕著な細胞毒性を示し、感染細胞が脱落してしまうため長期発現が困難であった

が、橙色蛍光タンパク質は tagRFP や mKate2 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
Human pluripotent stem cells: towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases.	Nishio M, Nakahara M, Yuo A, Saeki K	World J Stem Cells, 2016	8:56-61	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
血管内皮細胞の品質管理におけるmicroRNAの関与.	中原正子、小林徳彦、岡 雅子、湯尾 明、佐伯久美子	第16回日本再生医療学会総会	仙台	2017年3月
ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞分化誘導.	小林徳彦 西尾美和子 湯尾 明 佐伯久美子	第39回日本分子生物学会年会	横浜	2016年11月
SeVベクターを用いた褐色脂肪細胞の細胞内温度測定.	佐伯晃一、川口実太郎、佐伯 久美子、湯尾 明、井上 誠	第39回日本分子生物学会年会	横浜	2016年11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
該当なし				

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
該当なし				

※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。