慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	移植に適したヒトES・iPS細胞由来内皮作成と腎不全進行に対する新規治療法の開発
Sub Title	Human ES・iPS-derived endothelial cells for chronic kidney disease
Author	本間, 康一郎(Honma, Koichiro)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	ヒトES・iPS細胞由来血管内皮の細胞機能が成人内皮と比較し高いことを確認し、この差異にSirt1が重要であることが示唆された。低酸素刺激によりmicroRNA210の上昇及びiron-sulfur cluster assembly proteinの低下を確認したため、ES・iPS-ECは低酸素耐性が強い可能性も考えられ、慢性低酸素状態であるCKDに対して有用な移植ツールとなりうる可能性が示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21790805 研究分野：再生医学・腎臓内科学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21790805seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21790805
研究課題名（和文）
移植に適したヒトＥＳ・ｉＰＳ細胞由来内皮作成と腎不全進行に対する新規治療法の開発
研究課題名（英文）
human ES・iPS-derived endothelial cells for chronic kidney disease
研究代表者
本間　康一郎　(HOMMA KOICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10383762

研究成果の概要（和文）：
ヒト ES・iPS 細胞由来血管内皮の細胞機能が成人内皮と比較し高いことを確認し、この差異に Sirt1 が重要であることが示唆された。低酸素刺激により microRNA 210 の上昇及び iron-sulfur cluster assembly protein の低下を確認したため、ES・iPS-EC は低酸素耐性が強い可能性も考えられ、慢性低酸素状態である CKD に対して有用な移植ツールとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：
We compared the functionality of human adult ECs (HAECs), human ES-derived ECs (ESECs) and human iPS-derived ECs (iPSECs). ESECs were significantly superior to HAECs in cell functions. Sirt1 plays a key role in the high cellular function of ESECs and iPSECs. Although further in vivo investigations are required, this study initially demonstrated the potential of ESECs and iPSECs as the cell source for regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総　計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：再生医学；腎臓内科学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学
キーワード：ヒト ES 細胞；ヒト iPS 細胞；血管内皮細胞；慢性腎臓病

１．研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞はヒトの embryo から樹立された幹細胞であり、多能性と無限の増殖能を持ち、ヒトの発生・分化を解明するツールとして様々な研究が行われている。最近、成人の細胞にレトロウイルスにて 4 つまたは３つの遺伝子を導入し初期化することにより、ES 細胞と同等の性質を持つ幹細胞である iPS 細胞が樹立され、再生医療の材料として注目されている。レトロウイルスを使わず遺伝子導入し iPS を作製する技術も確立されつつあり、細胞材料としての倫理的な問題が克服され、ヒト ES 細胞の知見を再生医療に応用する基盤が整いつつある。

一方、成人の死因において、動脈硬化などの血管の老化による疾患は重要な位置を占め、血管の老化には血管内皮細胞機能の低下

が重要な役割を果たしていることが知られている。血管内皮細胞の老化抑制・抗加齢治療が確立されれば大きな医療上の進歩となる。

２．研究の目的

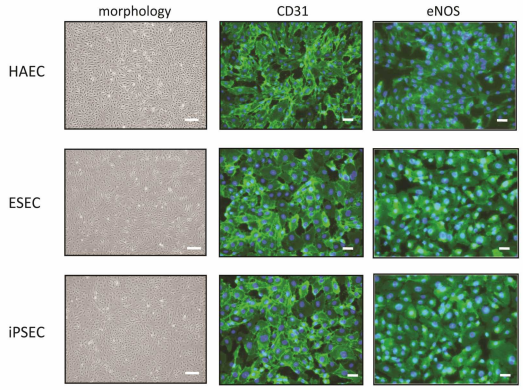
本研究では、成人の血管内皮細胞とヒト ES 細胞由来血管内皮細胞、さらにヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞との機能的な差異を解析するとともに、それらの機能的差異をもたらす因子について検討し、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞・ヒト iPS 由来血管内皮細胞の血管再生細胞材料としての有用性を検討するとともに、血管老化メカニズムの一端の解明を目指した。

３．研究の方法

成人血管内皮細胞（HAEC）、Human ES 由来血管内皮細胞（ESEC），iPS 由来血管内皮細胞（iPSEC）の形態学的な比較

HAEC・ESEC・iPSEC はいずれも培養 dish 上で cobblestone 状の形態を示し、いずれも eNOS 陽性で、CD31 染色にて内皮細胞に特徴的な marginal staining pattern を示し、血管内皮細胞に compatible であり、形態学的な差違は認めなかった(Figure1)

Figure 1

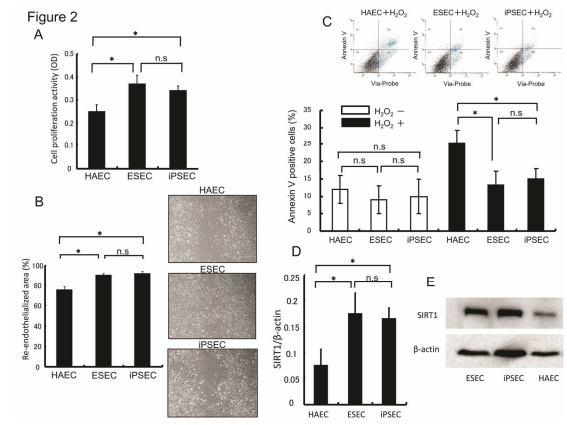


成人血管内皮細胞（HAEC）、Human ES 由来血管内皮細胞（ESEC），iPS 由来血管内皮細胞（iPSEC）の細胞増殖能、wound healing 能、酸化ストレス耐性能の比較

しかしながら、HAEC・ESEC・iPSEC の細胞機能についての解析を行ったところ、３者間で差違が認められた。MTT アッセイにて細胞増殖能を検討したところ、ESEC・iPSEC は HAEC に比べ有意に細胞増殖能が高かった。ESEC・iPSEC 間では有意な差は認められなかった(Figure 2 A)。また、内皮欠損の修復能を in vitro にて wound healing assay にて解析したところ、ESEC・iPSEC は HAEC に比べ有意に修復能が高かった。ESEC・iPSEC 間では有意な差は認められなかった(Figure 2 B)。さらに、酸化ストレスに対する耐性能を比較したところ、Annexin V assay にて、酸化ストレス刺激で annexin V 陽性細胞の比率は ESEC・iPSEC では HAEC に比べ有意に低かった。ESEC・iPSEC 間では有意な差は認められなかった(Figure 2 C)。

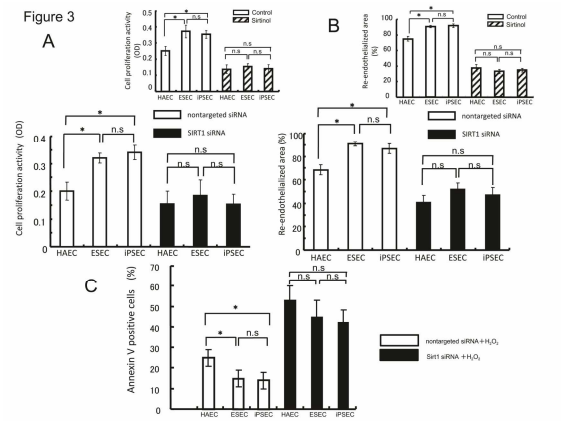
成人血管内皮細胞（HAEC）、Human ES 由来血管内皮細胞（ESEC），iPS 由来血管内皮細胞（iPSEC）における Sirt1 発現の差違

次に、我々は、この ESEC・iPSEC と HAEC の機能的な差違をもたらす因子を同定するために、GeneChip による遺伝子発現解析を行ったところ、老化関連遺伝子の一つである Sirt１の発現が HAEC に比べ ESEC・iPSEC で共に高いことを見いだした。そこで、Sirt1 の遺伝子発現についてリアルタイム PCR で定量的に比較したところ、ESEC・iPSEC ともに HAEC より有意に高い発現を示した(Figure 2 D)。ESEC・iPSEC 間では Sirt1 の発現に有意な差は認めなかった。 Western blot による蛋白発現の解析でも同様の結果が得られた(Figure 2 E)。



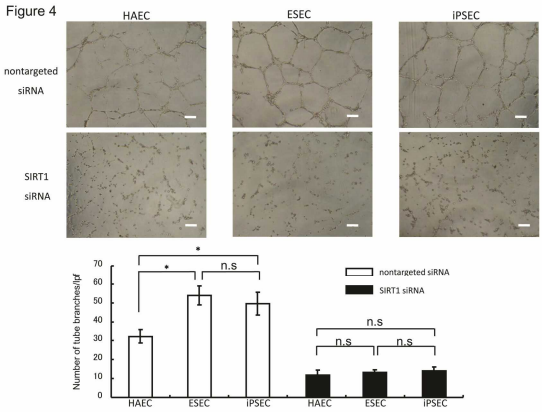
成人血管内皮細胞（HAEC)、Human ES 由来血管内皮細胞（ESEC），iPS 由来血管内皮細胞（iPSEC）の細胞機能の差違に対する Sirt１の contribution

そこで、老化遺伝子である Sirt1 発現の差違が ESEC・iPSEC と HAEC との細胞機能の違いをもたらしている可能性を考え、Sirt1 の特異的抑制薬である sirtinol および siRNA を用いて Sirt1 をノックダウンし各種細胞機能の差違への寄与を検討した。 ESEC・iPSEC は HAEC に比べ有意に細胞増殖能が高かったが、Sirt1 をノックダウンすると、ESEC・iPSEC と HAEC の差は消失した(Figure 3 A)。内皮欠損の修復能についても、Sirt1 をノックダウンすると、ESEC・iPSEC と HAEC の差は消失した(Figure 3 B)。酸化ストレスに対する耐性能においても同様に Sirt1 のノックダウンにより ESEC・iPSEC と HAEC の差は消失した（Figure 3 C)。これらの結果は Sirt1 阻害薬である Sirtinol 100μM 投与における検討においても同様であった。



成人血管内皮細胞（HAEC)、Human ES 由来血管内皮細胞（ESEC），iPS 由来血管内皮細胞（iPSEC）の angiogenic activity の差異に対する Sirt１の contribution

ここまで検討した細胞機能の差異が angiogenic activity に影響するか否かを tube formation assay にて検討した。 ESEC, iPSEC は HAEC に比べて tube formation が増加していたが Sirt1 をノックダウンするとこの差は消失した(Figure 4)。 この結果は Sirt1 阻害薬である Sirtinol 100μM 投与においても同様であった。



４．研究成果

ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞およびヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は、成人の血管内皮細胞に比べ、より若く高い viability を持った細胞であることが示され、血管再生医療の細胞材料としての有用性が示唆された。また、その機能的な差異は Sirt1 の発現を介するものであることが示され、ヒトの血管内皮細胞の老化に伴う機能低下における Sirt１の重要性が示唆された。

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１件）

1. Homma K 他 10 名． Human ES- and iPS-derived vascular endothelial cells show greater functionality than adult endothelial cells due to greater expression of Sirt1.
   Atherosclerosis. 212 42-47 2010
   (査読あり)

〔学会発表〕（計０件）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

本間　康一郎（HOMMA KOICHIRO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10383762

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし