

【12】

氏 名	中 村 祐 介 <small>なか むら ゆう すけ</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第711号
学位授与の日付	平成30年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (内科学（呼吸器・アレルギー）)
学位論文題目	Changes of plasmalogen phospholipid levels during differentiation of induced pluripotent stem cells 409B2 to endothelial phenotype cells (iPS細胞409B2株の血管内皮細胞分化過程でプラズマローゲンフォスホリピッドは変化する)
論文審査委員	(主査) 教授 菱 沼 昭 (副査) 教授 井 上 晃 男 教授 麻 生 好 正

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

血管内皮細胞は血栓形成、血圧調節、脈管形成、炎症反応と種々の生理機能を担う細胞であり、その機能障害は多くの疾患の病態生理に関与する。呼吸器疾患では脈管機能を介した気流閉塞と気管支喘息の関連、血管内皮障害と慢性閉塞性肺疾患の関連が報告されている。心血管疾患でも血管内皮障害は動脈硬化のファーストステップとされる。

人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells : iPSC）から誘導された血管内皮細胞は病態解析や疾病治療への応用が期待されている。グリセロリン脂質は細胞膜の構成物質であり、3つのグループに分類される。その一つであるplasmalogenは内因性の抗酸化物質として働き、加齢、冠血管疾患、喫煙、アルツハイマー病で減少すると報告されている。Sphingomyeline (SM) も同様に細胞膜の成分であり、気腫肺や冠動脈疾患で上昇することが報告されている。

【目 的】

iPSCから血管内皮細胞への分化誘導過程においてplasmalogenやSMの動態を明らかにすること。

【対象と方法】

本研究ではiPSC（409B2株、理研BRCより提供）を使用した。血管内皮細胞の分化はiPSCをfeeder-free条件で培養し6穴プレートに播種したのち、線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor 2 : FGF2）10ng/mL、血管内皮細胞増殖因子A（vascular endothelial growth factor A : VEGF A-165）

50 ng/mL、骨形成タンパク質4 (bone morphogenetic protein 4 : BMP-4) 2 ng/mLで5日間刺激した。次に細胞をFACS Aria[®] (BD) にて、抗血小板/内皮細胞接着分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1 : PECAM-1) -PE抗体ならびに、抗VEカドヘリン-APC抗体で初期血管内皮表現型細胞 (iEC) を分離した。得られたiECを培養、継代させた細胞を後期血管内皮表現型細胞 (ECpa) と定義した。

ECpaに対して、PECAM-1抗体、VEカドヘリン抗体、血管内皮細胞増殖因子受容体2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 : VEGFR2) 抗体、フォン・ヴィルブランド因子 (von Willebrand Factor : vWF) 抗体にて免疫染色をした。iEC、ECpaにおけるvWFの発現を相対的定量 polymerase chain reaction (相対的定量PCR) にて評価した。ECpaにおける細胞ネットワーク形性能はendothelial Tube Formation Assay[®] kit (Cell Biolabs) と胎児肺由来正常線維芽細胞 (Human fetal lung fibroblast 1 : HFL-1) 共培養法で評価した。

脂質抽出はBligh-Dyer法にて実施し、測定は5500QTRAP[®] mass spectrometer (SCIEX) を使用した。実験結果は少なくとも3回の独立した結果から得た。群間の比較はStudent's t-testを用いて $p < 0.05$ を有意とした。

【結 果】

iPSCから血管内皮細胞への分化誘導過程で中胚葉細胞 (mesodermal cell : MC) をVEGFR2陽性/VE-カドヘリン陰性、iECをVEGFR2陽性/VE-カドヘリン陽性と定義し、分化効率を評価した。第5日時点における全分化誘導細胞に対する分化効率はMC $10.9 \pm 2.6\%$ 、iEC $11.0 \pm 5.5\%$ であった。ECpaのVEGFR2、VEカドヘリン、PECAM-1発現は免疫染色で陽性であった。iEC、ECpaにおいて、iPSCに対する相対的定量PCRにおいて有意なvWFの発現上昇を認めた。Endothelial Tube Formation Assay[®] kitならびに、HFL-1の共培養モデルにおいて、ECpaのネットワーク形成が認められた。

iPSC、iEC、ECpa、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) 及びHFL-1の脂質解析は、plasmalogen phosphatidylethanolamine (pPE)、plasmalogen phosphatidylcholine (pPC)、SMを測定した。iPSからiEC、iECからECpaへの分化誘導過程でpPE (38:5)、pPE (38:4)、pPE (40:6)、pPE (40:5)、pPE (40:4) の有意な増加が認められ、特にpPE (38:5)、pPE (38:4) は顕著であった。これらのpPEはHUVECと同程度であったが、HFL-1と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。pPE (38:6) はiECからECpaへの分化誘導過程で有意に上昇し、pPCはpPC (36:3)、pPC (36:2)、pPC (36:1)、pPC (36:0)、pPC (38:4)、pPC (38:3)、pPC (38:2) 等がiECからECpaへの分化誘導過程で有意に上昇した。一方SMはSM (36:1)、SM (36:0)、SM (38:1)、SM (38:0)、SM (40:1)、SM (40:0)、SM (42:1)、SM (42:0) がiPSからMC、iECへの分化誘導過程で一過性に低下し、iECからECpaの過程でベースラインへ戻った。

【考 察】

本研究ではiPSCからiEC、ECpaへの分化誘導過程でpPE (38:5)、pPE (38:4) などのplasmalogenが有意に増加し、SMが一過性に低下した。iECからECpaにかけてのplasmalogenの上昇は、内皮細胞分化初期から後期成熟期にかけてplasmalogenが上昇したと考えられた。plasmalogenの不足は正常

な脈管形成を障害するという報告もあり、iPSC由来血管内皮細胞の臨床応用を考えた際にpPE (38:5) やpPE (38:4) などのplasmalogenを評価することは有用である。Plasmalogenにおける*sn-1*の脂肪酸はC16:0、C18:0、C18:1が多く、*sn-2*の脂肪酸はアラキドン酸 (arachidonic acid : AA C20:4) もしくはドコサヘキサエン酸 (C22:6) が一般的と報告されている。すなわちpPE (38:5)、pPE (38:4) はC18:0もしくはC18:1とAAの組み合わせの可能性が推測される。

plasmalogen上昇の生理学的意義として、AAは脂質メディエータの起点となる脂質でありその貯蔵としての役割や血管内腔における酸化ストレスに対して、保護的に働いている可能性が考えられた。

一方で、SMの代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate : S1P) は胎生期の脈管形成に関わるという報告があり、S1Pが血管内皮細胞の分化過程において代謝、消費された結果、SMが一過性に減少した可能性が考えられた。

【結 論】

本研究は、pPE (38:5) 並びにpPE (38:4) の上昇が血管内皮細胞の分化や成熟の指標となり、SMの一過性の低下はMCもしくは未成熟血管内皮のメタボリックな指標となり得ることを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

血管内皮細胞は多彩な生理機能を示す細胞であり、血管内皮障害は動脈硬化を通じて冠動脈疾患、脳血管障害の誘因になる。また、喘息、COPDなどの呼吸器疾患とも関連があると報告されている。細胞膜のリン脂質であるplasmalogenやsphingomyeline (SM) がこれらの疾患に関わると報告され、induced pluripotent stem (iPS) 細胞から分化誘導させた血管内皮細胞は、病態解析や疾病治療への応用が期待されている。本研究では、臨床応用が期待されるiPS細胞由来血管内皮細胞に対して、その分化誘導過程で各種疾患と関わりの深いplasmalogenやSMを評価した。

結果 1) iPS細胞から血管内皮表現系細胞を10%ほどの効率で分化誘導させ、血管内皮細胞に特徴的な表面マーカーを確認し、細胞の性質であるネットワーク形成能を評価した。2) 分化誘導過程での細胞から脂質を抽出し、それぞれ液体クロマトグラフ質量分析にて評価した。分化誘導過程でplasmalogen phosphatidylethanolamine (pPE) (38:5)、pPE (38:4) が顕著に上昇し、SMが一過性に低下したことを示した。3) 分化誘導し得られた血管内皮表現系細胞に対してヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) と比較し、pPE (38:5)、pPE (38:4) はHUVECでは同程度である事を確認し、胎児肺由来正常線維芽細胞 (human fetal lung fibroblast 1 : HFL-1) とは異なっていることを明らかにした。

これらの結果から、pPE (38:5) 並びにpPE (38:4) の上昇が血管内皮細胞の分化や成熟の指標となり、SMの一過性の低下は中胚葉細胞もしくは未成熟血管内皮のメタボリックな指標となり得ると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では分与されたiPS細胞の未分化マーカーを確認し、その後血管内皮表現系細胞に分化さ

せた。血管内皮細胞の特徴である表面マーカーを血小板／内皮細胞接着分子-1、vascular endothelial (VE) カドヘリン、血管内皮細胞増殖因子受容体2、フォン・ヴィルブランド因子の4種類で確認し、特性である自己ネットワーク形成能も評価している。分化させた細胞は限りなく血管内皮細胞に近いと判断される。分化誘導過程のそれぞれの細胞に対して質量解析を用いて脂質解析し、得られたデータに対して適切に統計が処理されている。研究方法は妥当であると判断できる。

【研究結果の新奇性・独創性】

申請者は臨床的に重要である血管内皮細胞、plasmalogenやSMなどのリン脂質、今後の再生医療として期待されるiPS細胞に着目した。iPS細胞から血管内皮表現系細胞への分化過程でplasmalogenが増加することを示し、この知見が分化成熟のマーカーとして有用であると報告した。これまで血管内皮細胞の分化誘導過程での脂質変化を報告したものはなく、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文は確立された実験手法を用いて、iPS細胞から分化誘導された血管内皮表現系細胞を分離し、それぞれの分化過程における細胞に対して液体クロマトグラフ質量分析計を用いてplasmalogen並びにSMを測定した。統計解析を実施しpPE (38:5)、pPE (38:4) が顕著に上昇し、SMが一過性に低下したことを示し、これらの変化が血管内皮細胞の分化や成熟の指標となると結論付けた。論理的に矛盾するものではなく、また、発生学、細胞生物学、脂質生化学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では臨床応用の期待されているiPS細胞において、血管内皮細胞分化誘導過程でのplasmalogen並びにSMの変化を明らかにした。脂質生化学や細胞生物学的に興味深い知見であるとともに、分化血管内皮の臨床応用を考えた際にplasmalogenの測定が分化成熟のマーカーとなり、再生医療の研究の進歩にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、発生学や脂質生化学の理論を学び、臨床の問題点から、実験計画を立案した。その後、適切に本研究を遂行し、新規の知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Scientific Reports

7 : 9377, 2017