私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

『慢性炎症性疾患の再生医学を応用した革新的予防法･治療法創成の拠点形成』

平成 27 年度事業報告会プログラム

平成 28 年 3 月 25 日

○13:05-13:20

小林 秀行、中島 耕一 (泌尿器科学講座(大森))

「SCID マウス精巣内投与によって形成されたクラインフェルター症候群由来 iPS 細胞における奇形腫の病理学的解析」

○13:20-13:35

杉山 篤 (薬理学講座)

「超小型ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた慢性心不全病態モデル開発：iPS 細胞由来心筋シート移植の有効性と有害作用の評価」

○13:35-13:50

赤坂 喜清 (先端医科学研究センター)

「慢性炎症の組織再改築を制御する microRNA の探索」

○13:50-14:05

近藤 元就 (免疫学講座)

「SATB1 欠損による臓器特異的自己免疫疾患発症機構の解明」

○14:05-14:20

佐藤 洋志、楠 夏子、村岡 成、南木 敏宏、川合 眞一 (内科学講座膠原病学分野)

「関節リウマチ滑膜細胞におけるレジスチンによるケモカイン発現増強作用」

○14:20-14:35

澁谷和俊, 若山 恵, 福武勝典[1]**, 高橋 寛**[1] (病院病理学講座(大森), 整形外科学講座(大森)[1])

「非破壊断層撮影による脊椎後縦靭帯内骨化生機序の解明」

○14:35-14:50

木下 利雄, 小池 秀樹, 池田 隆徳 (内科学講座循環器内科学分野)

「心筋組織の修復機構と制御分子の探索」

○14:50-15:05

中道 美保、大西 清 (形成外科学講座)

「骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による血管新生メカニズムと組織修復」

○15:05-15:20

浜之上 誠、高松 研 (生理学講座細胞生理学分野)

「細胞外リン酸化酵素によるミクログリア活性化と瘢痕除去作用の解析」

SCID マウス精巣内投与によって形成されたクラインフェルター症候群由来 iPS 細胞における奇形腫の病理学的解析

小林　秀行、中島　耕一

泌尿器科学講座(大森)

【目的】男性不妊症患者である 47, XXY の染色体を有するクラインフェルター症候群患者から iPS 細胞を誘導し、染色体異常が奇形腫の形成に変化がみられるかどうか検討を行なった。

【方法】顕微鏡下精巣内精子採取術にて採取した精巣組織を実験に用いた。クラインフェルター症候群患の精巣組織を 7%FBS/DMEM にて培養を行ない、ヒト繊維芽細胞を樹立した。次にセンダイウイルスを用いて Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc を導入し、数日間培養後、MEF フィーダー細胞上にまき直し、ES 細胞培養液および bFGF で培養を行ない、iPS 細胞の誘導を試みた。誘導後、iPS 細胞を 8 週齢の SCID マウスの精巣内に接種した。接種には、iPS 細胞を剥離液でバラバラにしたあと、23G の針および 1ml のシリンジを用いた。3 カ月後に、奇形腫の形成を確認し摘出した。奇形腫は H.E. 染色を施したパラフィン包埋・薄切切片について病理組織学的に検索した。

【結果】外胚葉成分として扁平上皮、神経管、希突起膠細胞、唾液腺、内胚葉成分として気管支、小腸、分泌腺、中胚葉成分として結合組織、平滑筋、毛細血管、脂肪組織、軟骨組織、骨組織への分化を示唆するような組織像が観察した。特に、47, XXY という染色体異常を持つ iPS 細胞であったが、特徴のある違いは観察できなかった。

【考察】クラインフェルター症候群由来 iPS 細胞の解析は、X 染色体不活化のメカニズムをつかさどる Xist 遺伝子の研究に非常に役に立つと思われる。また、iPS 細胞の 3 次元培養を行なうことにより、臓器に似た立体構造であるオルガノイドの研究は着目を浴びている。クラインフェルター症候群は、IQ がやや低く、広汎性発達障害や、社会への適応が低いと言われている。そのため、クラインフェルター症候群由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作成した場合、正常との脳との比較で違いがみられる可能性が考えられる。

超小型ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた慢性心不全病態モデル開発：iPS 細胞由来心筋シート移植の有効性と有害作用の評価

杉山　篤、中村裕二、岸江拓也、曹　　新、和田　剛、中瀬古（泉）寛子、安東賢太郎

薬理学講座

【目的】iPS 細胞を用いた心臓再生治療は拡張型心筋症や虚血性心筋症などの末期心不全患者に対する治療法として期待されている。我々は超小型ミニブタ心筋梗塞モデルを用いて慢性心不全病態モデルを作製し、iPS 細胞由来心筋シート移植の有効性と有害作用を評価した。

【材料と方法】マイクロミニピッグの左冠動脈前下行枝第 2 対角枝分岐部末梢を 2 段結紮して心筋梗塞を作製した。2 週間後に再開胸し、iPS 細胞由来心臓組織シート 4 枚を梗塞部位とその周囲を全て覆うように移植した（T 群：n=5）。開胸のみ行う sham 群（S 群：n=3）も作製した。移植したシートに対する拒絶反応を抑制するために、術前 3 日から術後 56 日までタクロリムス 0.1 ㎎/㎏を経口投与した。

【結果】心エコー評価では、T 群の左室内径短縮率は移植後 8 週の時点で S 群より改善していた（T 群：36.7±2.3% vs S 群：25.2±2.2%, $p<0.05$）。ホルター心電図において、T 群では心室頻拍（VT）は観察されなかったが、S 群では 2 例の個体で VT を認めた。また心室再分極時間の 1 拍ごとのばらつきは、T 群が S 群より低値の傾向を示した（T 群：1.95±0.6 ㎳ vs S 群：3.65±0.47 ㎳）。心室プログラム電気刺激法により T 群では 2 例で、S 群では全例で VT が誘発された。

【考察】ヒト iPS 細胞由来心臓組織シートは、不整脈リスクを増大させることなく、慢性心不全病態モデルの心機能を回復させた。

慢性炎症の組織リモデリングを制御するmicroRNA の解析

赤坂 喜清

先端医科学研究センター

【背景･目的】 慢性炎症性疾患で機能障害を惹起する組織リモデリングの進行には間質線維化が重要な役割をはたしている。ここでは炎症性サイトカインや組織修復分子の関与が示唆されているが、そのメカニズムは不明である。最近microRNAは標的mRNA発現抑制から蛋白発現を制御する重要な分子として注目されている。そこで今回Basic fibroblast growth factor (bFGF)による皮膚線維化抑制過程で発現するmicroRNAを網羅的解析から探索し、関連蛋白の発現性を解析した。

【方法】ラット皮膚線維芽細胞由来 microRNAについてReal-time PCR arrayを施行した。選定分子の組織発現をIn situ hybridization法とImmunofluorescence法で検索し、mRNA発現量はReal-time PCRおよびNorthern Blot法で，蛋白発現はWestern Blot法で評価した。

【結果】bFGF投与48時間と96時間群でともに発現増加するmiR-146b-5pを選定した(Fold change > 1.0)。In situ hybridization法によるmiR-146b-5p発現性は皮膚創部に比較的限局して発現し、bFGF投与創で有意な発現増加を示した。Northern Blot法では培養皮膚線維芽細胞(GF)ではbFGF投与よるmiR-146b-5pの発現増加が確認できた。従来の報告ではmiR-146b-5pによるSMAD4蛋白やPDGFRα蛋白の発現抑制が示されている。そこでGFへmiR-146b-5p inhibitor遺伝子を導入したところPDGFRα蛋白の発現増加が確認された。さらにmiR-146b-5p Mimic遺伝子導入では、逆にPDGFRα蛋白の発現減少が確認された。なおSMAD4蛋白には上記の有意な変化が確認できなかった。

【結論】: miR-146b-5pは標的mRNAを介してPDGFRα蛋白の発現抑制に関与していると考えられた。よってbFGF による線維化抑制過程で誘導されるmiR-146b-5pはPDGFRα蛋白の発現抑制から一連の連続的に進行する修復反応を制御し線維化抑制に寄与していることが示唆された。

SATB1 欠損による臓器特異的自己免疫疾患発症機構の解明

近藤　元就

免疫学講座

【目的】染色体構造調節機能を有する核タンパク、special AT-rich sequence binding protein-1 (SATB1)を血球特異的に欠損するSATB1 conditional knockout (SATB1 cKO)マウスは、autoimmune prone mice である。しかし、SATB1 cKO マウスの具体的な臓器障害の実態は明らかではなく、生後 20 週齢以降に死亡する個体が見られたが、その死因の特定には至っていない。本研究では、SATB1 cKO マウスにおける自己免疫疾患の詳細を精査、検討することを目的とした。

【材料と方法】週齢の異なる SATB1 cKO マウスの様々な臓器から標本を作製し、異常の有無を観察した。唾液量または涙液量は、ピロカルピン投与後に測定した。血清中の抗体価は ELISA で測定した。末梢組織中のリンパ球は、種々の蛍光抗体により染色し、FACS で解析した。さらに、生後 3 日の SATB1 cKO マウスに、野生型マウス由来 regulatory T (Treg)細胞を移入後、自己免疫疾患発症の有無を調べた。

【結果】死亡率が上昇する 24 週齢以降の SATB1 cKO マウスの尿中アルブミンは野生型マウスに比べ、有意に高値を示し、腎臓にはループス腎炎様の所見が見られた。SATB1 cKO マウスの唾液量、涙液量はともに離乳直後より低値を示したが、この時期には腎炎症状は見られなかった。抗 SSA、抗 SSB 抗体は 6–8 週齢程度から上昇した。野生型マウス由来 Treg の移入により、シェーグレン症候群の症状は軽減した。

【考察】上記の結果より、SATB1 cKO マウスは一次性シェーグレン症候群を発症し、死因となり得る腎炎は、加齢とともにシェーグレン症候群に伴う、または独立した病変として起こることが示唆された。また、SATB1 cKO マウスにおける自己免疫疾患発症は、SATB1 遺伝子欠損による Treg 細胞分化異常が一因となっていると考えられた。

関節リウマチ滑膜細胞におけるレジスチンによるケモカイン発現増強作用

佐藤　洋志、楠　夏子、村岡　成、南木　敏宏、川合　眞一

内科学講座膠原病学分野

【目的】我々は関節リウマチ（RA）患者において血清レジスチン濃度が健常者と比較して高値であることを報告してきた。しかし、レジスチンの RA 病態への関与は明らかではない。本研究は、RA 滑膜細胞に対するレジスチンの作用を解明し、RA の病態形成におけるレジスチンの関与を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】RA 患者の人工関節置換術時に得た滑膜組織から RA 滑膜線維芽細胞（RSF）を分離後、レジスチンで 18 時間刺激し、total RNA を用いて DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現プロファイルを網羅的に検討した。一部のケモカイン発現を半定量 RT-PCR にて解析した。また、培養上清中のケモカイン濃度を ELISA で測定した。レジスチンの受容体である adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1)発現を RT-PCR で解析した。

【結果】レジスチン刺激により 45 個の遺伝子の発現が 3 倍以上増加し、レジスチン濃度依存性を認めた。その中に 13 個のケモカインが含まれていた。半定量 RT-PCR にて追認したところ、レジスチン濃度依存的に CCL2、CCL3、CCL4、CXCL1、CXCL2、CXCL8 の発現上昇がみられた。さらに ELISA で培養上清中の CXCL8 の発現上昇を認めた。また RSF に CAP1 発現を認めた。

【結論】レジスチンは RSF からのケモカイン産生亢進を介して、RA の病態形成に関与している可能性が示唆された。

非破壊断層撮影による脊椎後縦靭帯内骨化生機序の解明

澁谷和俊，若山　恵，福武勝典[1]，高橋　寛[1]

病院病理学講座(大森)、整形外科学講座(大森)[1]

【背景】 後縦靭帯骨化症（OPLL）は厚生労働省指定難病の一つであり、骨化が進行すると脊髄を圧迫して脊髄症を来す。組織学的には、enthesis（靭帯付着部）における線維軟骨層の拡大に伴う靭帯肥厚や、椎間板線維輪の微小な破綻による後縦靭帯の軟骨様組織形成などが観察されているが、詳細はいまだ明らかではない。本研究の目的は、非 OPLL 剖検例の後縦靭帯に出現する微小な骨化を観察し、骨化メカニズムの一端を明らかにすることである。

【方法】2009 年 1 月から 2013 年 12 月までに東邦大学医療センター大森病院で行われた連続した病理解剖例を対象とした。試料は L1/2 椎間板を含む L1,L2 椎体を使用した。マイクロ CT 画像および再構築３D 画像により後縦靭帯に見られる微細な骨化を観察し、さらに病理組織学的考察を行った。また過去に報告されている骨化に関連する因子との関連を調査した。

【結果・考察】全 267 剖検例のうち、後縦靭帯が観察可能であった 103 例を対象とした。103 例中 48 例（46.6％）で後縦靭帯内に 0.1 mm2 以上の骨化を認め、その半数に骨梁構造が観察された。微小な骨化は大きく 3 つの形態に分類された。椎間板後方連続型(23 例)は enthesis との連続性を認め、骨皮質・骨髄は既存骨と連続して延長するように存在し、その先進部では軟骨様組織への化生・石灰化を認めた。enthesis から進展する骨化機序と捉えることができた。椎間板後方遊離型(11 例)では、椎間板線維輪の破綻部や椎間板線維輪と軟骨終板の亀裂に脱出した髄核を認める他、線維化・石灰化・骨化を認めた。椎間板線維輪の破綻に起因する骨化機序と捉えることができた。一方、椎体後方型(29 例)では、後縦靭帯内に長軸方向に伸びる線状の石灰化を認め、症例によってはその内部に骨組織を認めた。異栄養型の石灰化を介して化生骨が形成されているものであり、石灰化から異所性骨化への進展による骨化機序が想定された。骨化率と骨化関連因子の相関では、年齢・HbA1c との間に正の相関を認めた。

bFGF による心筋組織修復の制御と機能分子の探索

木下 利雄，小池　秀樹，池田 隆徳

内科学講座循環器内科学分野 (大森)

【目的】高血圧心不全で進行する組織修復では心筋リモデリングが重要であり、この過程では間質の反応性線維化による遠心性心拡大と収縮不全が惹起される。この間質線維化では心筋線維芽細胞(CF)による組織修復関連蛋白発現の主要な役割が想定されている。これまで我々は Basic Fibroblast Growth Factor(bFGF)による高血圧性心不全ラット(Dahl rat)における心拡大・収縮不全の抑制を in vivo で実証した。その機序として同ラットの培養 CF を用いて、bFGF により MMP-9,TIMP-1 といった組織修復関連蛋白の発現変化が間質線維化抑制能に重要な働きをしていることを in vitro で実証した。そこで今回我々は、心筋細胞と間質線維芽細胞の相互作用に重要な miRNA を想定して、圧負荷不全心筋における bFGF 誘導性の間質線維化抑制に関与する CF 由来 miRNA を探索した。

【材料と方法】高血圧心不全モデルの Dhal rat より樹立した培養 CF に bFGF を添加し、bFGF 誘導性 CF 由来の miRNA の網羅的解析を行った。bFGF 投与群で発現増加する miRNA を選定し、その高血圧心での発現を確認するため in situ hybridization を用いて組織レベルでの発現を確認した。

【結果】網羅的解析により bFGF 添加 CF で増加する miR-29c-3p を bFGF 非添加 CF との比較から選定した。In vivo における局在観察を in-situ hybridization から解析すると高血圧心の血管周囲間質に miR-29c-3p の発現が確認され、正常血圧心と比較し発現は増加している傾向が認められた。

【結論】bFGF 誘導性の CF 由来 miR-29c-3p は、高血圧心不全で進行する組織修復において間質線維化の発現調節に関与する可能性が示唆された。

骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による血管新生メカニズムと組織修復

中道美保、大西 清

形成外科講座

【目的】 骨髄間葉系前駆細胞 (Fibrocyte) の細胞外基質産生能の証明から Fibrocyte の組織修復能が in vitro で実証された。しかし慢性炎症性疾患で徐々に進行し機能障害を惹起する組織リモデリングでその修復組織における Fibrocyte の機能は不明である。今回は Basic fibroblast growth factor (bFGF)による人為的な血管新生促進期における Fibrocyte の血管新生における役割を検討した。

【方法】 SD ラット全層性皮膚潰瘍作成後、bFGF(10μg)添付人口真皮を移植し、投与後 2、4、6、7、14、21 日目に創部潰瘍組織を採取した。Fibrocyte 同定は CD34、CD45、CD11b と Pro-collagen I 抗体による蛍光二重染色から、創部 CD34, CD31, Podoplanin, FGFR1 mRNA の発現性は Real-time PCR で解析した。Fibrocyte 発現特異性はラット皮膚 FGFR1siRNA 遺伝子導入実験から確認した。

【結果】CD34+/pro-collagen I+ fibrocyte は bFGF 投与後 6 日目には血管内皮様配列からなる管腔様構造を示した。同細胞は投与後 4、6、7 日目に有意な増加を認めたが、異なるタイプの Fibrocyte である CD45+/pro-collagen I+ fibrocyte と CD11b+/pro-collagen I+ fibrocyte の有意な増加や管腔様構造は認められなかった。FGFR1siRNA 遺伝子導入創部では bFGF 刺激下で CD34+/pro-collagenI+ fibrocyte 構成の管腔様構造はなく、同細胞による血管形成に bFGF が必須と考えられた。

【結論】新生血管における Fibrocyte の直接的参画が明らかになり、同細胞は bFGF 誘導可能よりその人為的制御から慢性創傷皮膚炎の血行改善による組織修復促進の可能性が示唆された。

細胞外リン酸化酵素によるミクログリア活性化と瘢痕除去作用の解析

浜之上　誠、高松　研

生理学講座細胞生理学分野

【目的】本研究は、慢性期損傷脊髄に内在する静止型ミクログリアを再活性化させ、残存線維性瘢痕や成長因子欠乏等といった再生に不適な脊髄環境を、再生に適した環境に再整備する新規治療法開発を目的としている。本年度は、細胞外からの p38MAP キナーゼ蛋白質投与によるミクログリア活性化機構の解析を行った。

【材料と方法】 p38 組み換え蛋白質は、大腸菌にて発現させカラムにて精製した。蛋白質のリン酸化活性は、合成基質 ATF-2 を用いたウェスタンブロット解析によって検討した。培養ミクログリア株化細胞（MG5）は、刺激前に 8 時間 Serum Starvation した後、p38 蛋白質を含む培養液中で氷上、5 分間の刺激を行った。刺激した細胞は Tx-100 存在下で可溶化し、抗リン酸化セリン・スレオニン抗体を用いたウェスタンブロット解析法によってミクログリア活性化機構を検討した。

【結果】キナーゼ活性を有する p38 蛋白質(p38WT)を培養液中に添加することよって、分子量約 38kDa のリン酸化蛋白質の増強が検出された。キナーゼ活性に必要なアミノ酸を置換した p38 蛋白質（p38KD）やキナーゼ部位を欠失した N 末部分蛋白質（p38DEL）ではこのようなリン酸化蛋白質の増強は確認できなかった。またミクログリア活性化因子であるリポポリサッカライド(LPS)ではこの増強は確認できなかった。

【結論】キナーゼ活性を有する p38WT 蛋白質を細胞外から投与することにより、ミクログリア細胞に速やかなリン酸化が誘導されることを示した。これまでの活性化ミクログリアによる線維性瘢痕除去作用や運動機能改善作用の結果と併せ、細胞外に投与した p38 蛋白質のキナーゼ活性によってミクログリア活性化が誘導されることが強く示唆された。現在有効な治療法に乏しい慢性期の脊髄損傷治療に対して、細胞外から髄腔内等に投与可能な新規治療法としての有効性が示された。