

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13601  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25860853  
研究課題名(和文) Patient-specific iPS cell-derived vessel smooth muscle cells of DD-EDS syndrome  
  
研究課題名(英文) Patient-specific iPS cell-derived vessel smooth muscle cells of DD-EDS syndrome  
  
研究代表者  
岳 鳳鳴 (YUE, Fengming)  
  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
  
研究者番号：20532865  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：エーラス・ダンロス症候群(EDS)とはコラーゲン線維形成機構の異常を原因とする症候群である。このプロジェクトでは、DD-EDS患者皮下血腫のメカニズムを調べるために、3人のDD-EDS患者からiPS細胞を確立し、血管平滑筋細胞の分化を誘導し、それらの収縮機能を調べた。結果はDD-EDS患者iPS由来VSMCは血管作動性アゴニスト、エンドセリン-1およびカルバコールなどに減少した収縮反応と少ない血管管様構造形成を示した。そして、不十分な収縮特性と異常な血管形成がDD-EDSの患者で繰り返し起こった皮下血腫の理由と結論付けることができる。

研究成果の概要(英文)：The Ehlers-Danlos syndrome (EDS) is a heterogeneous group of heritable connective tissue disorders. In order to investigate the mechanism of subcutaneous hematoma in DD-EDS patient, in this project, we established DD-EDS specific iPS cells from three patients, and then induced the differentiation of vessel smooth muscle cells, examined the contractility function of them. All the findings showed reduced contractile response to vasoactive agonists such as endothelin-1 and carbachol and fewer vessel tube-like structure formation in DD-EDS patient iPS-derived VSMCs. Therefore, we can conclude that the insufficient contractile properties of VSMCs and abnormal blood vessel formation might be some reasons of subcutaneous hematoma which repeatedly happened in DD-EDS patient.

研究分野：幹細胞

キーワード：DD-EDS 疾患 患者 iPS 細胞 血管平滑筋 収縮能力 血管形成

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エーラス・ダンロス症候群 (Ehlers-Danlos syndrome; DD-EDS) は、コラーゲン線維形成機構の異常を原因とし、皮膚の異常な伸展性・脆弱性、血管脆弱性に伴う易出血性、靭帯や関節の過伸展性等を呈する疾患である。

2. 研究の目的

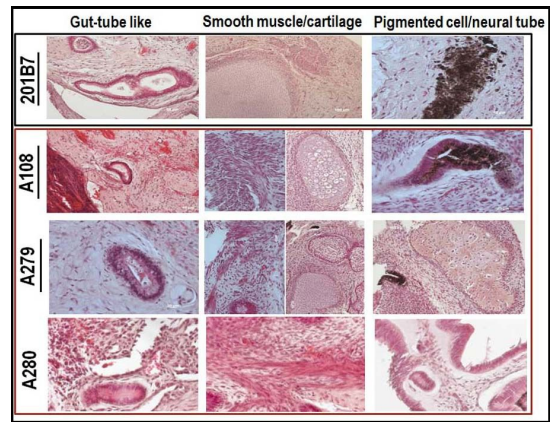
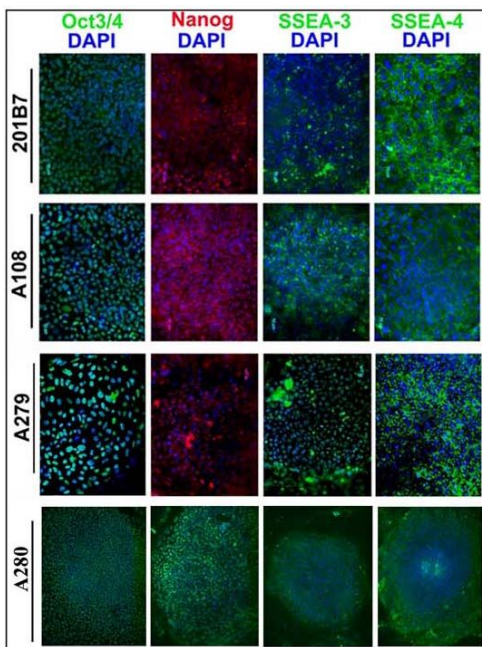
我々は、DD-EDS 患者の皮下血腫は小動脈の脆弱性と動脈筋の不十分な収縮が原因と考えた。しかし患者の動脈の生検は困難であるため、DD-EDS 患者から提供された線維芽細胞から確立した iPS 細胞を分化誘導し、作成した血管平滑筋を解析することで、DD-EDS における血管病変の病態生理学的特徴の解明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

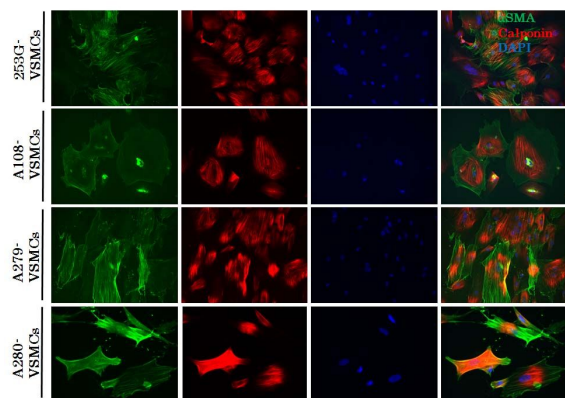
3名の DD-EDS 患者より皮膚線維芽細胞の提供を受け、iPS 細胞 (A108、A279、A280) を確立した。正常ヒト iPS 細胞と患者由来 iPS 細胞を分化誘導し、血管平滑筋細胞 (VSMC) を作成した。血管平滑筋の遺伝子発現および収縮能力について検討した。

4. 研究成果

(1). 患者由来 iPS 細胞 3 株を樹立した。幹細胞の自己複製能と多能性を確認した。



(2). 患者由来 iPS 細胞 3 株を分化誘導し、血管平滑筋 (VSMC) を作成した。

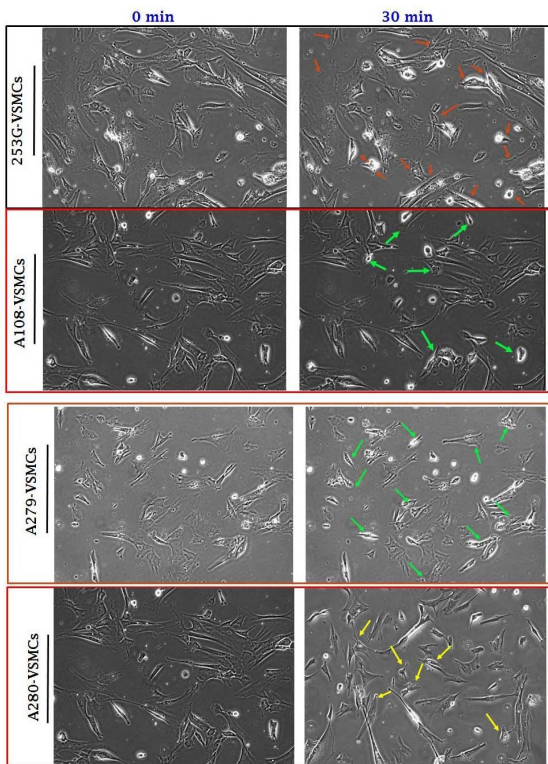


(3). 血管平滑筋の遺伝子発現と収縮能力を解析した。

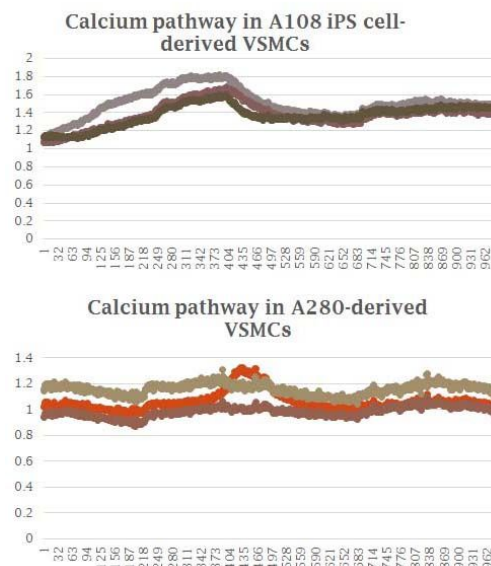
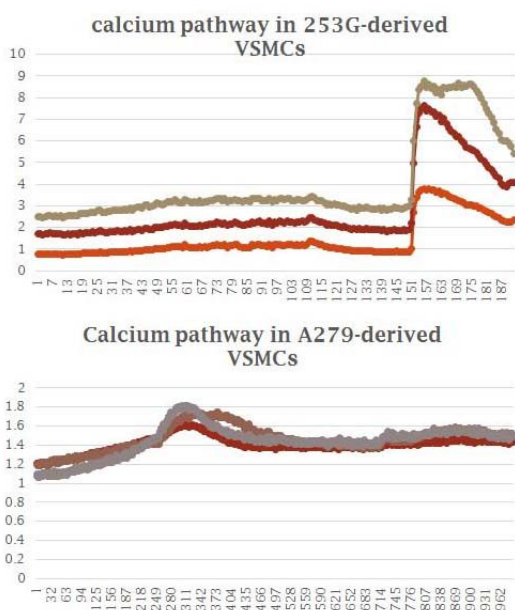
1 平滑筋収縮に関するマーカー遺伝子 (SMTN と TAGLN) の発現は、正常ヒト iPS 由来 VSMC (正常 VSMC) と比較して 3 株全ての DD-EDS 患者 iPS 由来 VSMC (DD-EDS VSMC) で低値を示した。



2 VSMC をカルバコール(ムスカリン性コリン作動薬)で刺激して、細胞表面積の変化を記録した。正常 VSMC と比較して、DD-EDS VSMC では表面積の変化が抑制された。

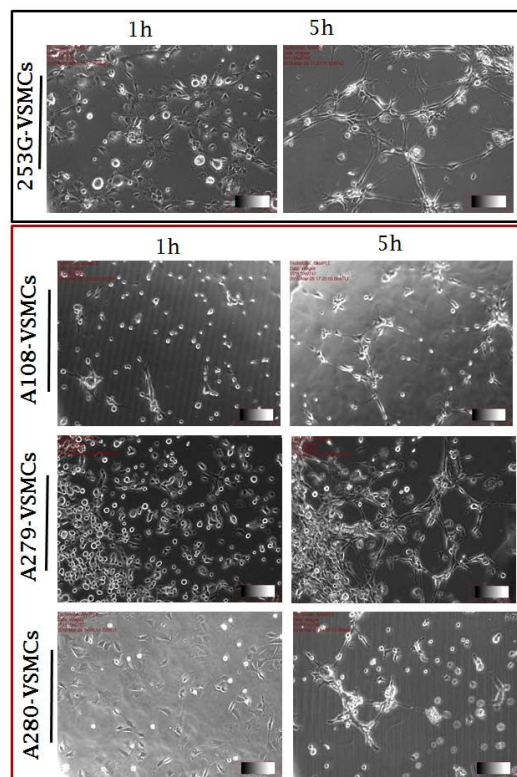


3 カルシウムフラックスアッセイにより各 VSMC の endothelin-1 (カルシウムアゴニスト) に対する応答を観察した。カルシウム放出に伴う蛍光強度は、正常ヒト VSMC と比較して、DD-EDS VSMC では低値を示した。



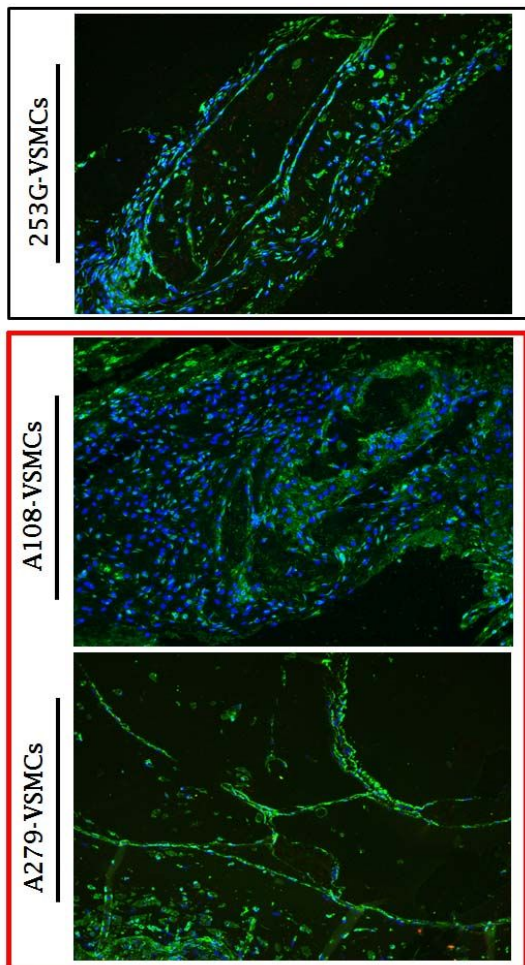
(4) .血管平滑筋の血管形成能力を解析した。

1 各 iPS 由来 VSMC をマトリゲル上に播種して血管様構造を形成し、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。正常 VSMC 患者と比較して、DD-EDS VSMC では、形成された血管様構造の数が少なかった。



2 各 iPS 由来 VSMC をマトリゲルと混合して SCID マウスに移植した。In vitro の刑と同様に、DD-EDS VSMC では正常 VSMC と比較し

て形成された血管様構造が少数であった。



(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :

#### 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)

[学会発表](計1件)

1 Fengming Yue, Tomoki Kosho, Katsunori Sasaki

Disease Model with iPS cells from D4ST1-deficient Ehlers - Danlos syndrome (DD-EDS).

International Symposium of Regenerative Medicine in Matsumoto.

再生医療国際シンポジウム

April.02, 2016

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岳 鳳鳴 (YUE Fengming)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号 : 20532865

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :