



Title	血漿中microRNA網羅的発現解析によるもやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究
Author(s)	内野, 晴登
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12835号
Issue Date	2017-09-25
DOI	10.14943/doctoral.k12835
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/75031
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2339
File Information	Haruto_Uchino.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

血漿中 microRNA 網羅的発現解析による
もやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究

(Genome-wide microRNA profiling in circulating plasma
-An exploratory research in epigenetic aspects of
moyamoya disease)

2017年9月

北海道大学

内野晴登

学位論文

血漿中 microRNA 網羅的発現解析による
もやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究

(Genome-wide microRNA profiling in circulating plasma
-An exploratory research in epigenetic aspects of
moyamoya disease)

2017年9月

北海道大学

内野晴登

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	17 頁
考察	28 頁
総括および結論	31 頁
謝辞	32 頁
引用文献	32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Haruto Uchino, Masaki Ito, Ken Kazumata, Yuka Hama, Shuji Hamauchi,
Sasaki Hidenao, Kiyohiro Houkin

Circulating MicroRNome in Discordant MZ Moyamoya Twins – Implication
for Endothelial Biofunction

Neurology (submitting)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Haruto Uchino, Masaki Ito, Ken Kazumata, Shuji Hamauchi, Naoki
Nakayama, Hidenao Sasaki, Kiyohiro Houkin.

Profiling of circulating microRNAs in patients with moyamoya disease:
differential expressions in discordant monozygotic twins.

4th International Moyamoya Meeting, Berlin, July 3, 2015

緒言

もやもや病は内頸動脈終末部の狭窄もしくは閉塞を特徴とする脳血管疾患である。基底核部に微細な異常血管の発達を認めることがあるが、これらは穿通動脈の異常拡張および側副血行路の異常形成であり、脳虚血に対する代償性の現象と考えられている。1969年に、Suzukiらが本疾患を、もやもや病と命名し、国際的にも moyamoya disease (MMD) として疾患概念が確立された¹。「もやもや」という名称は、血管撮影での微細な異常血管網が、たちこめる煙のようであること、また本疾患の原因が不明であることに由来している。

本疾患の有病率・罹患率は、日本と韓国といった東アジアで高い^{2,4}。日本人 10万人あたりの有病率および罹患率は、それぞれ 3.16～6.02、0.35～1.13 人である^{5,8}。発症年齢は 2 峰性の分布をとり、5～10 歳と 40 歳前後にピークを認める。また、女性の発症率は男性の約 2 倍と性差を認め、家系内発症を 10～15%に認める^{6,7,9}。韓国や中国での罹患率は日本と同程度^{10,12}、アメリカやヨーロッパでは日本の約 1/10 とされ、日本に比べ低い数字である^{3,4}。

本疾患の主な臨床像は、脳血管の狭窄による脳虚血と、脆弱な脳血管の破綻による頭蓋内出血に大別される。小児例では脳虚血発症が大部分であるが、成人例では出血発症の割合が増加し、虚血発症と同程度となる。ただし急性脳卒中を発症していなくても、無症候性脳病変や慢性脳虚血により高次脳機能障害をきたす場合がある^{13,14}。出血性及び虚血性脳卒中の再発予防には、血行再建術の有効性が示されている^{15,16}。ただ一部の症例では、通常 of 血行再建術では効果が不十分で、追加の血行再建術が必要になる場合があるが、初回治療時に予測することは難しい。また非症候側半球や無症候例における血行再建術の適応基準や実施時期に関しては、統一された基準は確立されていない。

本疾患の診断は上述の脳血管の形態学的特徴に基づいており、厚生労働省研究班が診断基準を作成しているが¹⁵、国際的には統一されたものが存在しない。脳血管画像のみでは、治療方法・方針がやや異なる脳動脈硬化症との鑑別が困難な場合がある。また、形態学所見から発症前診断や極初期病変の診断を行うことも現状では難しい。さらに画像上の血管狭窄度と臨床的重症度・予後は必ずしも一致しない。

病変部位である内頸動脈終末部の病理像は、内膜の線維細胞性肥厚、内弾性

板の異常、中膜の菲薄化を特徴とする¹⁷。この内膜肥厚には過剰な平滑筋様細胞の集簇がみられるが¹⁸、この細胞成分が必ずしも平滑筋由来ではなく endothelial progenitor cell (EPC) や smooth muscle progenitor cell (SMPC) といった血液中を循環する vascular progenitor cell (VPC) の関連も指摘されている¹⁹⁻²¹。いまだ疾患の本態が、どの細胞や血管組織にあるのかは完全には解明されていない。複数の研究で、髄液や血液中の basic fibroblast growth factor (b-FGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、transforming growth factor β (TGF- β) の上昇が報告されており²²⁻²⁴、そうした所見が病態に関与している可能性があるが、疾患の原因なのか、単に虚血に対する応答なのかは結論が得られていない。

地域・人種偏在性、家族内発症を認めることなどから、遺伝的因子の関与は従来から疑われていた²⁵⁻²⁷。海外からは *TIMP2*, *PDGFRB*, *TGFB1* 遺伝子多型が相関するという研究もあるが^{28,29}、再現性のある報告がない³⁰。そうしたなか、2011年に日本の研究グループから、染色体 17q25.3 上の *RNF213* が疾患感受性遺伝子として同定された^{31,32}。同遺伝子の一塩基多型 (rs112735431; c.14576G>A; p.R4810K) は、日本人患者の 90%、韓国人患者の 79%、中国人患者の 23% に認められ、健常人に対するオッズ比はそれぞれ 340 倍、136 倍、15 倍であった³²。なお、これら東アジアの健常者群の 2~3% においても同遺伝子多型を認めることが判明している^{32,33}。

RNF213 多型に関連した iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) や遺伝子改変動物モデルによって本疾患の分子生物学的研究は大きく進展した。最近、Hamauchi らは、患者由来の iPS 細胞から誘導した内皮細胞 (induced pluripotent stem cells-derived-endothelial cells, iPSECs) では、細胞外マトリックス受容体関連遺伝子の発現が低下し、その中には血管新生にも重要な integrin $\beta 3$ 遺伝子が含まれることを報告した³⁴。他の報告では、内皮細胞において IFN- β 刺激により *RNF213* の発現が誘導されること、変異型 *RNF213* の強制発現では血管新生能が低下することが示されている³⁵。また、内皮細胞特異的に変異型 *RNF213* を強制発現させたトランスジェニックマウスでは、頭蓋内血管狭窄やもやもや血管は再現されなかったが、低酸素条件下では大脳皮質微小血管新生の抑制が認められた³⁵。これらの研究結果からは、疾患の発症において、*RNF213* 変異のみでなく、何らかの二次的因子が加わる必要があることが示唆される。

その他にも *RNF213* だけでは、もやもや病を説明できない点がある。1 つ目は、Caucasian 患者では、*RNF213* 多型は認められず、genome-wide association study でも他の関連遺伝子は示されていないこと³⁰、2 つ目は、*RNF213* rs112735431 保有者のもやもや病有病率、すなわち浸透率が 0.5%程度と低いこと、3 つ目は、大部分(約 80%)の日本人・韓国人患者は *RNF213* ヘテロ変異型であるが、多彩な臨床像(例えば、小児発症と成人発症、虚血発症と出血発症、両側型と片側型、進行性と非進行性など)を示す亜型を含んでいることである。

以上より、*RNF213* 以外の因子が疾患発症や病態修飾に関与していると考えられ、病態解明のためには *RNF213* の機能解明や他の遺伝子探索の他に、エピゲノム解析が展開すべき研究の 1 つであると考えられる。エピゲノムとは、DNA 配列の関与しない遺伝子発現の調節機構のことである³⁶。DNA メチル化やヒストン修飾、microRNA (miRNA) などによる遺伝子発現制御が代表的な機構とされる。エピゲノムは細胞・組織特異的な遺伝子発現に寄与し、生理的に極めて重要な役割を果たしている。また加齢や感染、炎症などの環境要因が、エピゲノム異常をきたし、その結果、腫瘍、代謝性疾患、精神・神経疾患、免疫疾患、心血管疾患といった多くの疾患に関与することも近年明らかにされつつあるが、もやもや病におけるエピゲノム研究は現時点で限られている^{37,38}。

今回、病因解明の他、上述の課題である客観的診断、発症前・早期診断、予後予測、治療適応・効果判定へと将来的につながる可能性のあるバイオマーカー探索のシーズ研究として miRNA に着目した。miRNA は 20 塩基前後の短い non-coding RNA で、特定の mRNA に作用し、遺伝子発現を抑制的に制御する。現在、ヒトにおいては 2000 種類以上の miRNA がデータベースに登録されている。1 つの miRNA が複数の mRNA を標的とするのが特徴で、多くの生理的プロセスの細かな制御にかかわり、他のエピゲノム機構と同様に、その異常が複数の疾患と関連していることが報告されてきている³⁹。また、細胞から分泌された miRNA (circulating miRNA) が血中で安定に存在するため、疾患バイオマーカーとしての期待が近年高まっている⁴⁰。さらには病態に関係する miRNA を治療標的とした miRNA 創薬研究も、すでに進められている^{41,42}。病勢に応じてダイナミックに変化したり、あるいは恒常的に発現している miRNA が存在し、もやもや病の発症および病態修飾因子となっていることは十分考えられる。以上より本研究は、もやもや病発症・病態に関与するバイオマーカー探索の pilot

study として、患者血漿中の miRNA の網羅的プロファイリングを行った。*RNF213* では説明のつかない発症素因を探索するため、対象患者の *RNF213* 遺伝子型を統一するように工夫した。また、本邦においても極めて希少な表現不一致一卵性双生児を研究コホートに加えることで、より疾患表現型に強く関連すると考えられる miRNA の探索を行ったことが本研究の特色の一つである。さらに、もやもや病患者血漿において発現変動を認めた miRNA の機能を検証するため、患者由来 iPSECs における miRNA 発現解析も実施した。既報の先行研究における iPSECs の網羅的遺伝子発現データを利用し、血漿で発現変動した miRNA の病態的意義を検討した。

【本研究の倫理面における配慮】

本研究の内容は、北海道大学大学院医学研究科、医の倫理委員会において、「もやもや病の発病素因遺伝子と病態修飾因子の解析」(医 14-053) および「難治性疾患発病素因解析のための比較対照群血液・ゲノムバンク構築に関する研究」(医 14-021) として、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会において、「もやもや病患者由来 iPS 細胞株の樹立と血管内皮細胞への分化誘導を介した病態研究」(012-0317) として承認されている。また「ヘルシンキ宣言」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し実施した。

略語表

APC	allophycocyanin
b-FGF	basic fibroblast growth factor
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EPC	endothelial progenitor cell
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FBF	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HGF	hepatocyte growth factor
iPSECs	induced pluripotent stem cells-derived-endothelial cells
KSR	knockout serum replacement
MEF	mouse embryonic fibroblast
microRNA	miRNA
MMD	moyamoya disease
PBS	phosphate buffered saline
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
SMPC	smooth muscle progenitor cell
TGF- β	transforming growth factor β
TIA	transient ischemic attack
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPC	vascular progenitor cell

実験方法

【血漿 miRNA 解析の対象者】

2014年12月までに北海道大学病院脳神経外科を受診した表現不一致一卵性双生児1組2名 (Discovery cohort)、非同一家系の成人もやもや病患者9名 (以下、一般患者群)、および同期間に研究に同意し血液を提供した特記すべき疾患背景のない健常者10名 (以下、健常対照群) を解析の対象とした (Validation cohort)。対象者は全員日本人である。また、全ての患者は、厚生労働省研究班による診断基準に従い、脳血管撮影検査にて、もやもや病の確定診断がなされた。一卵性双生児は採血時12歳で、一方 (Twin-MMD) は3歳時にもやもや病を発症し、血行再建術後、経過観察が継続されている。もう一方 (Twin-nonMMD) は12歳時点まで、もやもや病を発症していないことが画像検査で確認されている。この家系の父親がもやもや病を発症しており、母および兄は発症していない (図1)。一般患者群9名に関しては、可能なかぎり均質化するため、一過性脳虚血発作 (transient ischemic attack, TIA) 発症型で、かつ血行再建術が実施され、病態が安定している患者の中から無作為に選択した。さらに *RNF213* 遺伝子型も後述の手順で、全員ヘテロ型であることを確認した。また各患者の発症年齢、家族歴の有無も評価した。健常対照群 (平均年齢 53.5歳、男性3名、女性7名) は、一般患者群 (平均年齢 49.7歳、男性3名、女性6名) と年齢、性別に有意差が出ないように選択した。研究者はこれらの対象者に対する十分な説明の後に、文書による同意を得た上で、血液の採取を行った。未成年の対象者に関しては本人および保護者の承諾を得た。本研究の概要を図2に示す。

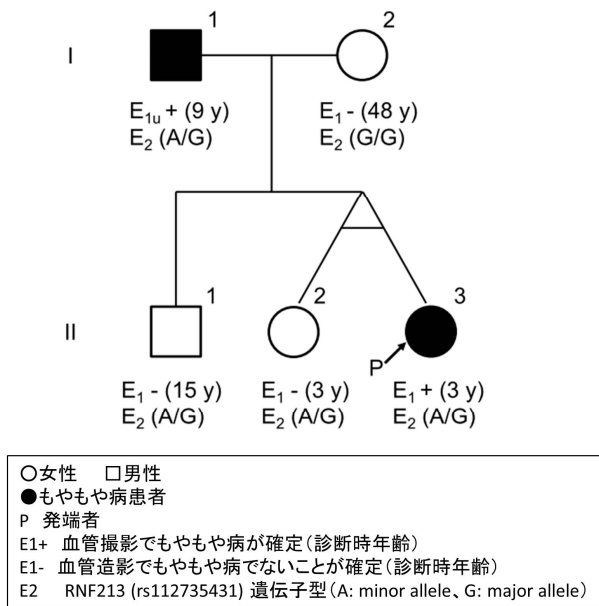


図 1 一卵性双生児の家系図

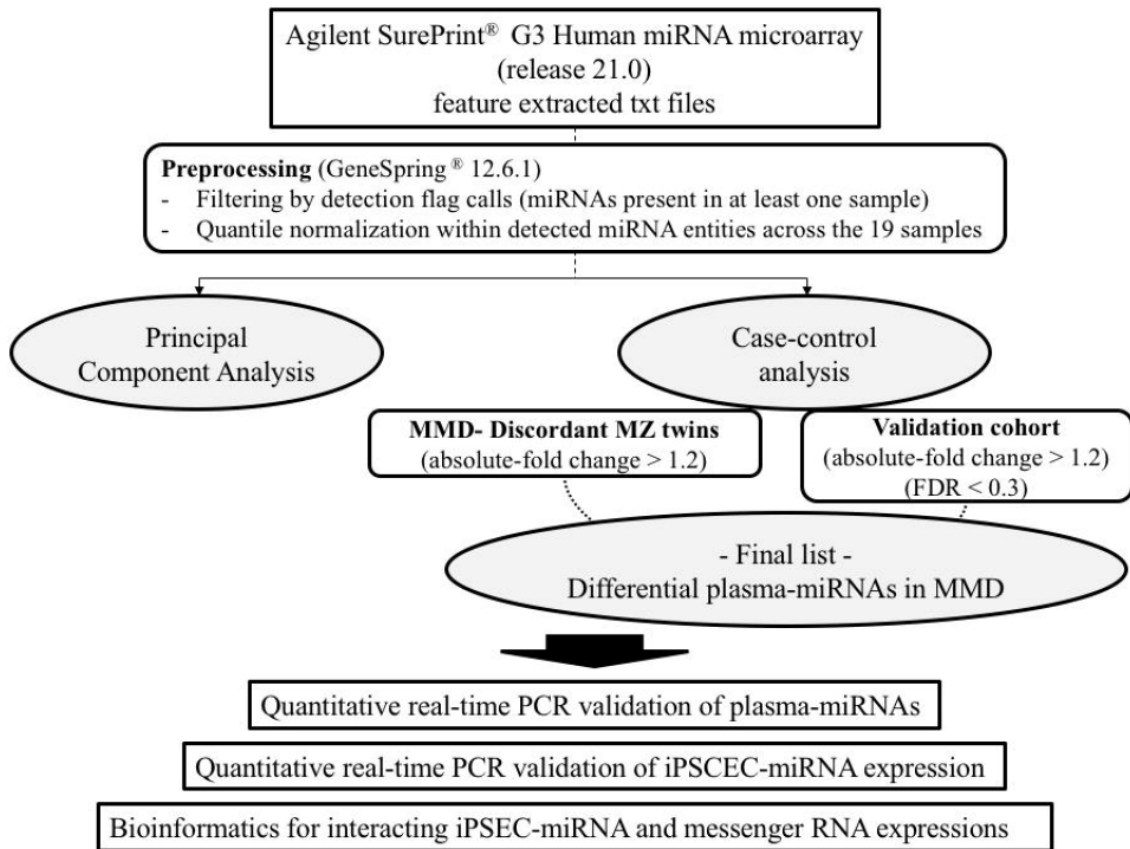


図 2 もやもや病に関連する miRNA 探索ための本研究の概要

【血液からのゲノム DNA 抽出】

血液を室温 2000 回転 5 分で遠心分離し、血球を分離回収した後、赤血球溶解バッファー*にて赤血球を破碎し、白血球ペレットを遠心分離した。これに 4N グアニジン溶液**を加えて、白血球を溶解し、99.5%エタノールを加えて、グアニジンを除去し、DNA を析出させ、これを TE バッファー***に溶解し、最終的に 500 μ l の DNA 抽出物 (TE 溶解液) とし、使用時まで 4°C で保管した。

* NH₄Cl 82.6g、KHCO₃ 10.0g、EDTA 0.37g を 1L 水溶液 (10x 赤血球溶解バッファー) とし、10 倍希釈で使用

** グアニジン 125g、0.75N クエン酸ナトリウム 8.8ml、水 146.5ml、10%サルコシル 13.2ml

***1M Tris-HCl (pH 8.0) 5ml、0.5M EDTA (pH 8.0) 1ml、水 494ml

【*RNF213* 遺伝子型解析】

1) Polymerase chain reaction (PCR)

対象者における *RNF213* rs112735431 遺伝子型 (GG : 野生型、AG : ヘテロ型、AA : ホモ型) を解析するため、以下の手順でサンガー法によるダイレクトシーケンシングを行った。全血から抽出した DNA 溶液を用い、*RNF213* rs112735431 を含む領域を、以下の配列のプライマー (北海道システムサイエンス株式会社、日本) にて PCR を行った。

フォワードプライマー : 5'-CTG CAT CAC AGG AAA TGA CAC TG-3'

リバースプライマー : 5'-TGA CGA GAA GAG CTT TCA GAC GA-3'

サンプル DNA の濃度は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) を用い 500 ng/ μ l に調整した。PCR ミックス (total 20 μ l) は以下の組成とした。

- DNA (500 ng/ μ l) 1 μ l
- プライマー 10 μ M 1 μ l/each
- 10x Ex Taq buffer (タカラバイオ株式会社, 日本) 2 μ l
- dNTP's mix (タカラバイオ株式会社, 日本) 1.6 μ l
- Taq DNA polymerase (タカラバイオ株式会社, 日本) 5000 u 0.1 μ l
- Betain (Sigma-Aldrich, MO, USA) 9 μ l
- 蒸留水 4.3 μ l

PCR は、94°C 4 分間の熱変性の後、94°C 30 秒、63°C 40 秒、72°C 1 分を

30 サイクルの後、72°C 10 分の伸長反応にて終了した。サーマルサイクラーは、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP 650 (タカラバイオ株式会社, 日本) を使用した。PCR 後、1.5%アガロースゲルにてサンプルの電気泳動を行い、非特定のバンドがないかを確認した。

2) 精製

続いて、以下の組成にて、37°C 1 時間、75°C 15 分の行程で、未反応のプライマーおよび dNTP を除去した。

- PCR 反応液 5 μ l
- TSAP (Promega, WI, USA) 2.5 μ l
- Exonuclease I (NEW ENGLAND BioLabs Japan Inc., Japan) 0.1 μ l
- 蒸留水 2.4 μ l

3) シークエンス反応

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用い、フォワード、リバースプライマーに対し、それぞれ以下の組成にて、96°C 1 分の熱変性の後、96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分を 25 サイクルの行程で、各塩基に蛍光色素を標識した。

- 精製後 PCR 反応液 0.5 μ l
- 5X Sequencing Buffer 1.5 μ l
- プライマー (1 μ M) 1.6 μ l
- BigDye Terminator 1 μ l
- 蒸留水 5.4 μ l

4) シークエンス解析

BigDye Xterminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用い、以下の組成で、20 分攪拌し、蛍光ターミネーターを除去した。

- シークエンス反応液 10 μ l
- SAM solution 45 μ l
- Xterminator solution 10 μ l

続いて ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific

Inc., Waltham, MA, USA) にて、シーケンス解析を行った。

【血漿の採取・保存、RNA 抽出】

血液を EDTA 採血管に採取後、すみやかに 4°C 3000 回転 30 分で遠心分離し、上清の血漿を回収、-80°C で超凍結分注保存した。凍結血漿 200 μ l から miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA 溶液は Bioanalyzer (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) と専用のチップ及び電気泳動溶液である Agilent RNA 6000 pico kit を用いて、その品質確認を行った。

【マイクロアレイ解析】

RNA サンプルは miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) を用いて、脱リン酸化反応、ラベル化反応の後、2549 種の miRNA を検出可能な SurePrint G3 Human miRNA microarray (8 \times 60K Rel. 21.0) (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) を用いてハイブリダイゼーションを行った。55°C で 20 時間のハイブリダイゼーションの後、SureScan Microarray Scanner (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) で信号を読み取り、Feature Extraction software で画像化および数値化を行った。Quality control (QC) report にて出力データの品質確認 (評価項目; グリッドの位置、外れデータ、シグナルの再現性・正確性など) を行った。その結果、基準を満たさなかった健常者 2 名は以降の解析から除外した。

シグナルの数値化データをデータ解析ソフト GeneSpring12.6 (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) に取り込み、全 19 サンプルで signal detect flag の立たなかった miRNA は除外した後、quantile shift 法でシグナルのノーマライゼーションを行い、box whisker plot にて全シグナルの quality check を行なった。

続いて主成分解析 (principal component analysis, PCA) を実施し、全対象者の血漿 miRNA 発現のプロファイルを確認した。さらに一卵性双生児間 (Discovery cohort) では fold change cut off を 1.2 として発現変動 miRNA を同定した。また、Validation cohort では、volcano plot による発現変動 miRNA の同定を行った。すなわち、Welch 検定 followed by multiple testing correction (Storey with Bootstrapping) による FDR < 0.3 かつ fold change cutoff 1.2 を

満たす miRNA を抽出した。これら 2 つの cohort の解析で共通発現変動する miRNA の中から、real-time PCR で定量するものを選定した (図 2)。

【生物情報学的解析】

データ解析ソフト Ingenuity Pathways Analysis (IPA version 01-07, content version 33559992) (QIAGEN, Hilden, Germany) とウェブデータベース miRmap⁴³ にて、上記の 2 つの cohort で共通発現変動を認めた miRNA の標的遺伝子を検索した。さらに、その標的遺伝子の中に、以下のもやもや病に関連する可能性のある遺伝子、血管新生因子関連の遺伝子が含まれていないか検索した^{20,21,28,34,44-46}。

RNF213, TIMP2, PDGF(RB), TGFB(1), PSRC1, BRCC3, ACTA2, PTTG1, ITB3, NF1, PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, NRAS, BRAF, MAP2K1, JAG1, GUCY1A3, NOTCH2, SAMHD1, PCNT, MTCP1, MMP3, MMP9, CCL2, IL1B, VEGF, PDGF(BB), FGF2, HGF, CSF3, ANGPT

【逆転写反応および real-time PCR】

miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) を用いて、凍結血漿 200 µl から total RNA を抽出し、-80°C で分注保管した。33 fmol の cel-miR-39 (NORGEN BIOTEK, Thorold, ON, Canada) を外部標準として manufacturer protocol に従い抽出時に混合した。RNA 抽出後、Bioanalyzer2100 と Agilent RNA 6000 pico kit を用いて各サンプルの total RNA の品質確認を行った。

各 Taqman MicroRNA Assay 5X RT primer から、0.05X RT primer pool を作成した後、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて、逆転写反応 (16°C 30 分、42°C 30 分、85°C 5 分) を行った。さらに逆転写反応液、Taqman PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)、各 20X Taqman MicroRNA Assay から作成した PreAmp primer pool にて、preamplification (95°C 10 分、55°C 2 分、72°C 2 分の後、95°C 15 秒 60°C 4 分を 12 サイクル、99.9°C 10 分) を行い、PreAmp cDNA ライブラリを作成し、-20°C で分注保管した。

Pre Amp cDNA ライブラリ、20X TaqMan MicroRNA Assay (Thermo Fisher

Scientific Inc., Waltham, MA, USA)、TaqMan Universal PCR Master Mix II (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) から、real-time PCR 反応液を作成し、StepOnePlus real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて、各 miRNA の定量を行った。

miRNA 発現量の測定は、相対定量法により行った。血漿中に含まれる miRNA は極めて微量であることと、予備実験として実施した各 Taqman assay primer の検量線の検討にて、関心 miRNA の増幅効率のばらつきが大きかったことから、単純な $\Delta \Delta Ct$ 法でなく、各プライマーの増幅効率により補正する比較定量法 (Pffafl 法) を採用した⁴⁷。算出される miRNA 発現の定量値は以下の計算式の通りである。すなわち、各関心 miRNA の発現量は、外部標準 cel-miR-39 量及び健常対象群の平均発現量に対しての比として算出されることになる。

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta Ct\text{-target (control - sample)}} / (E_{\text{reference}})^{\Delta Ct\text{-reference (control - sample)}}$$

E: Primer efficiency

なお、各プライマーの PCR 増幅効率 ($E = 10[-1/\text{slope}]$) は、real-time PCR のランごとに、定量対象のサンプル等量混合液の希釈系列を準備して測定した⁴⁷。2 群間の比較は student-t 検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

【iPS 細胞の培養】

上記とは別のもやもや病患者 3 人、健常人 3 人 (iPS cohort) の iPS 細胞 (細胞株 M1、M2、M3、C1、C2、C3) は共同研究施設である熊本大学医学研究所幹細胞誘導分野にて樹立されたものを使用した³⁴。

iPS 細胞のフィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) を使用した。マウス胎生 13.5 日胚から頭部、四肢、内臓を取り除き、残った体幹部の組織を剪断した後に 0.25% trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を加えて 10 分間 37°C でインキュベートした。次に 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を添加した Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Wako Chemicals, Osaka, Japan) を加え十分にピペティングし、細胞を単離させた。細胞培養開始後、第 3 継代で、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したマイトマイシン C (nacalai tesque, Kyoto, Japan) で 3 時間処理を行い、細胞分裂を停止させ凍結保存した。iPS 細胞の播種前日に、MEF を解凍して 0.1%ゼラチンコーティングしたディッシュ上に播種し、フィーダー細胞とした。

iPS 細胞培養液は、DMEM/F12 (Wako Chemicals, Osaka, Japan) 培地に 20% KnockOut Serum Replacement (KSR) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、2 mM L-Alanyl-L-Glutamine (Wako Chemicals, Osaka, Japan)、0.1 mM monothioglycerol (Wako Chemicals, Osaka, Japan)、0.5% 10000 units/ml ペニシリン G と 10000 µg/ml ストレプトマイシン混合溶液 (nacalai tesque, Kyoto, Japan)、5 ng/ml bFGF (Wako Chemicals, Osaka, Japan) を含有したものをを用いた。iPS 細胞の剥離には 0.1 mg/ml Collagenase type IV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、0.25 % trypsin (Invitrogen)、20% KSR、10 mM CaCl₂ (SIGMA-ALDRICH Japan, Tokyo, Japan) で構成される溶液を用いた。

コンフルエントになった iPS 細胞は phosphate buffered saline (PBS) (Wako Chemicals, Osaka, Japan) で洗浄した後に、iPS 細胞剥離液を加え、37°C で 5 分間インキュベートした。フィーダー細胞のみが剥がれ、iPS 細胞のコロニーが残るため、これに iPS 細胞培養液をかけてディッシュから剥離、回収した後、播種・継代した。培養液の交換は隔日で行った。

【iPS 細胞の内皮細胞への分化誘導とフローサイトメトリー】

コンフルエントとなった各 iPS 細胞株 (C1、C2、C3、M1、M2、M3) を、iPS 細胞剥離液を用いてディッシュから剥離し。DMEM/F12 で 30 倍に希釈した Matrigel Matrix (Corning, NY, USA) でコーティングしたディッシュに iPS 細胞の懸濁液を播種し、37°C 5% CO₂ で培養を開始した (0 日目)。1 日目にディッシュを PBS で一回洗浄した後、培養液は StemPro-34 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) に 50 ng/ml bFGF、40 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF) (R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA) を添加したものに变更した。3 日目に培養液を StemPro-34 に、50 ng/ml bFGF、40 ng/ml VEGF、20 µM SB431542 (SIGMA-ALDRICH Japan, Tokyo, Japan) を添加したものに变更した。SB431542 は TGF-β1 型受容体 activin receptor-like kinase 5 の阻害薬であり、内皮細胞への分化を促進する。6 日目に fluorescence-activated cell sorter (FACS) Aria III (Nippon BD, Tokyo, Japan) を用いて、以下の手順で CD144 と CD31 両陽性の分画細胞を iPSECs としてソーティングした。

TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて細胞をディッシュから剥離し、10% FBS/PBS で細胞を 15 ml チューブに回

収した。1200 回転で 5 分間遠心分離した後、上清を除き 100 μ l 程度の細胞懸濁液に対して抗体を加えた。使用した抗体と細胞 1×10^6 あたりの抗体の使用量は以下の通りとした。

- Allophycocyanin (APC) 標識 CD144 抗体 (eBioscience, Santa Clara, CA, USA) 1 μ l
- Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 CD31 抗体 (Nippon BD, Tokyo, Japan) 1 μ l

10% FBS/PBS で細胞を懸濁し、最終的な細胞濃度が 5×10^6 /ml となるように調整した。死細胞を除去するために、7-Amino-Actinomycin D (7AAD) (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) を細胞数 5×10^5 あたり 20 μ l 加えた。APC 標識 CD144 抗体に対する isotype control として Mouse IgG1 K Isotype Control APC (eBioscience, Santa Clara, CA, USA) を 1 μ l/細胞数 1×10^6 用いた。FACS Aria III による APC の測定には 633 nm レーザーおよび 660/20 nm フィルタ、FITC の測定には 488 nm レーザーおよび 530/30 nm フィルタ、7AAD の測定には 488 nm レーザーおよび 670 nm のロングパスフィルタを使用した。フローレートは 1.0 とし、イベント数が毎秒 2000 を超えないよう適宜、細胞濃度を調整した。ソーティング後の iPSECs は I 型コラーゲンでコーティングされたディッシュ (Corning, NY, USA) 上で培養し、培養液は HuMedia-EB2 (KURABO, Osaka, Japan) に 20 ng/ml VEGF、25 ng/ml bFGF、10% FBS、0.5% 10000 units/ml ペニシリン G および 10000 μ g/ml ストレプトマイシン混合溶液を添加したものをを使用した。

【iPSECs のエクソソーム RNA および細胞内 RNA の抽出・定量】

6cm ディッシュにコンフルエントとなった iPSECs (図 3) の培養液を 48 時間後と 96 時間後の 2 回、計 5ml 回収した。用いた各 iPSECs の継代数は、それぞれ 6、6、6、5、5、6 (C1-6、C2-6、C3-6、M1-5、M2-5、M3-6) である。培養液の回収後、細胞もペレットとして回収し、凍結保存した。この際、培養液中の FBS はウシ由来のエクソソームの混入を防ぐため、Exosome-depleted FBS (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を用いた。回収した培養液からのエクソソームの分離およびエクソソーム RNA の抽出は、SeraMir Exosome RNA Purification Kit for Media and Urine (System Biosciences, CA, USA) を用いた。細胞内 total RNA の抽出には miRNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) を用いた。これらのサンプルにおける miRNA の定量は上記

の血漿と同様の方法で行った。

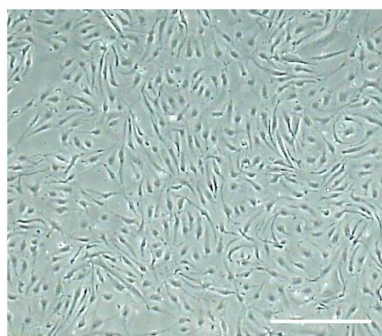


図3 iPSECs (clone M1) の明視野像
スケールバー、500 μm

【変動 miRNA の生物情報学的解析】

血漿および iPSECs で発現変動を認めた miRNA の予測標的遺伝子を IPA と miRmap の両データベースにて検索し統合した (Gene list 1)。また、過去に我々は、本実験と同一細胞株である iPSECs の total RNA を抽出し、Human Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて遺伝子発現変動を解析している (published data)³⁴。その遺伝子発現データから、患者 iPSECs で有意に発現変動 (Fold change cutoff 1.5、 $P < 0.05$) を認める遺伝子リスト (Gene list 2) を作成した。Gene list 1 と Gene list 2 の比較解析により、発現変動していた miRNA の制御に一致する発現動態を示す遺伝子を抽出した (Gene list 3)。この発現情報を含む Gene list 3 から IPA を用いて Pathway を実施した。

結果

【患者および対象群の臨床的特徴】

Discovery cohort (一卵性双生児1組) と Validation cohort (一般患者群9名、健常対象群8名) の臨床情報 (年齢、性別、発症年齢、発症型、家族歴、手術歴、*RNF213* 遺伝子型) を Table 1 にまとめた。Validation cohort の一般患者群 と健常対照群で年齢に有意差は認めなかった (49.6 歳 vs 53.5 歳、 $P = 0.58$)。同様に iPS cohort の臨床情報も Table 2 に示す。

Table 1 Discovery cohort と Validation cohort の臨床情報

Subjects	Age	Sex	Age	Disease	Familial	EC/IC	<i>RNF213</i>
	at blood		at onset				
	sampling						
Twin-MMD	12	F	3	TIA	Yes	Yes	AG
MMD 1	67	F	51	TIA	Yes	Yes	AG
MMD 2	37	M	10	TIA	Yes	Yes	AG
MMD 3	21	M	9	TIA	Yes	Yes	AG
MMD 4	57	M	48	TIA	No	Yes	AG
MMD 5	40	F	11	TIA	Yes	Yes	AG
MMD 6	63	F	61	TIA	No	Yes	AG
MMD 7	53	F	49	TIA	No	Yes	AG
MMD 8	40	F	35	TIA	No	Yes	AG
MMD 9	69	F	62	TIA	Yes	Yes	AG
Twin-nonMMD	12	F	-	-	Yes	-	AG
Healthy control 1	45	F	-	-	No	-	GG
Healthy control 2	39	F	-	-	No	-	GG
Healthy control 3	65	F	-	-	No	-	GG
Healthy control 4	63	F	-	-	No	-	GG
Healthy control 5	52	F	-	-	No	-	GG
Healthy control 6	38	M	-	-	No	-	GG
Healthy control 7	68	F	-	-	No	-	GG
Healthy control 8	58	M	-	-	No	-	GG

Table 2 iPS cohort の臨床情報

Subjects	Age at blood sampling	Sex	Age at onset	Disease type	Familial MMD	EC/IC bypass	<i>RNF213</i> rs112735431
MMD 10	39	M	34	TIA	Yes	Yes	AG
MMD 11	48	F	47	TIA	Yes	No	AG
MMD 12	36	F	36	TIA	Yes	Yes	AG
Healthy control 9	48	M	-	-	-	-	GG
Healthy control 10	54	M	-	-	-	-	GG
Healthy control 11	48	M	-	-	-	-	GG

【マイクロアレイ解析】

全 19 サンプルの抽出液において、Bioanalyzer の電気泳動像では small RNA を含む 200 nt にかけての領域に明瞭なピークがみられ、RNA 品質に問題ないことを確認した (図 4)。

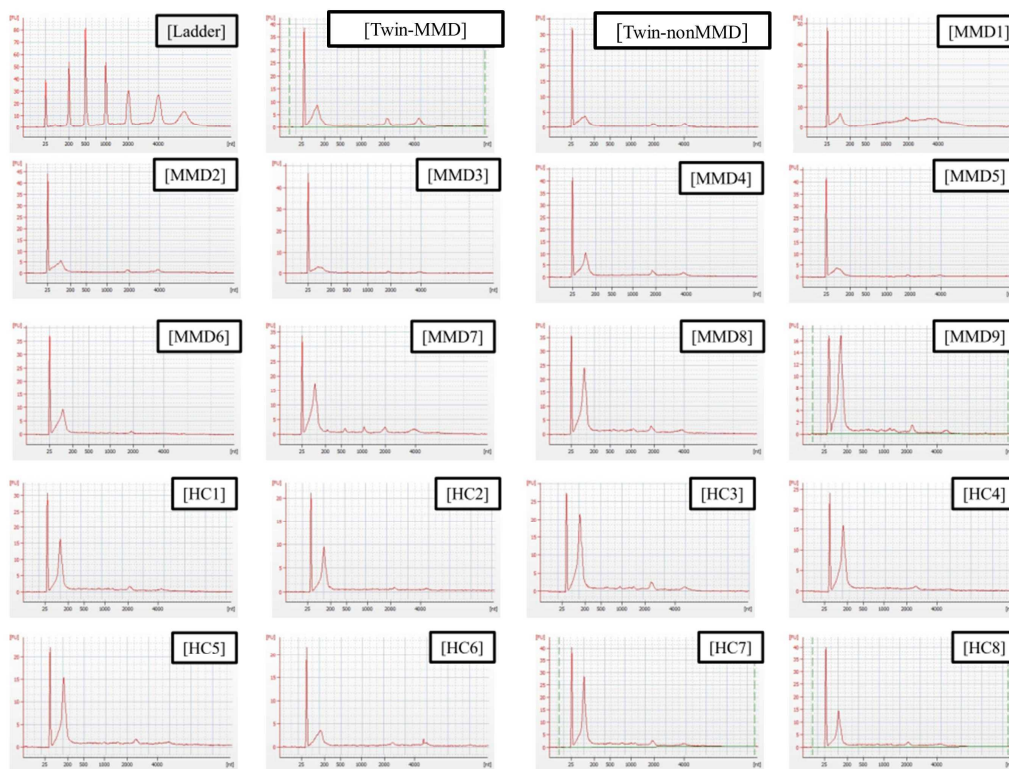


図 4 全血漿サンプル中の total RNA 電気泳動像

全対象者の血漿 miRNA を網羅的にアレイ解析した結果、搭載されている全

probe のうち、21.1% (537/2549) が flag call として検出された。quantile normalization 後の全 537 miRNA のシグナル値を用いた対象者の血漿 miRNA 発現プロファイルを、PCA 3D プロットとして、図 5 に示す。それぞれ赤色が一般患者群、青色が健常対象群、暗赤色が患者双生児、灰色が健常双生児を表している。閾値を設定しない miRNA 発現プロファイルでは、もやもや病の有無によって患者群と健常対照群がそれぞれ別クラスターとして分離できるのが確認できた。ただし、表現不一致一卵性双生児の発現プロファイルは、両者とも患者群のクラスターに属しており、発現閾値の設定なしでは、これらは類似した発現パターンであることが示唆された。

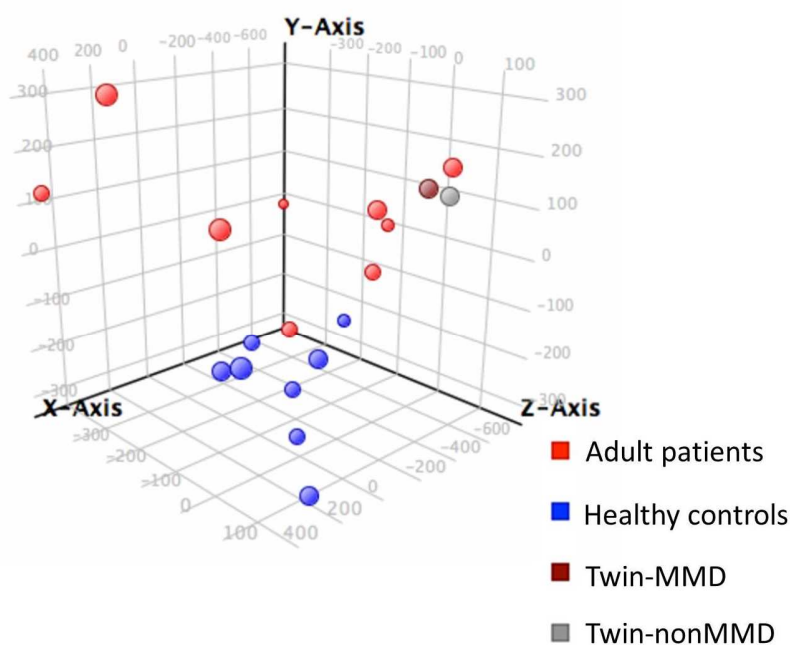


図 5 全血漿サンプルの miRNA 発現プロファイルによる主成分解析 3D プロット

全 537miRNA のうち、Discovery cohort で、発現比の絶対値が 1.2 以上であった miRNA は、計 143 種であった (upregulated in MMD: 76 miRNAs, downregulated in MMD: 47 miRNAs)。続いて Validation Cohort において volcano plot による比較解析 (Fold change cutoff 1.2, FDR < 0.3) を行うと、計 98 種の発現変動 miRNA (upregulated in MMD: 45 miRNAs, downregulated in MMD: 33 miRNAs) が検出された (図 6)。

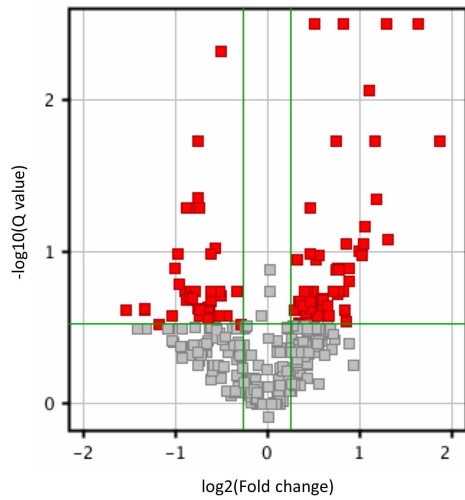


図 6 Validation cohort における miRNA 発現比較解析を示した Volcano プロット

その結果、両 cohort で共通の発現変動をしていた計 23 種の miRNA (upregulated in MMD: 10 miRNAs, downregulated in MMD: 13 miRNAs) が抽出された (図 7)。

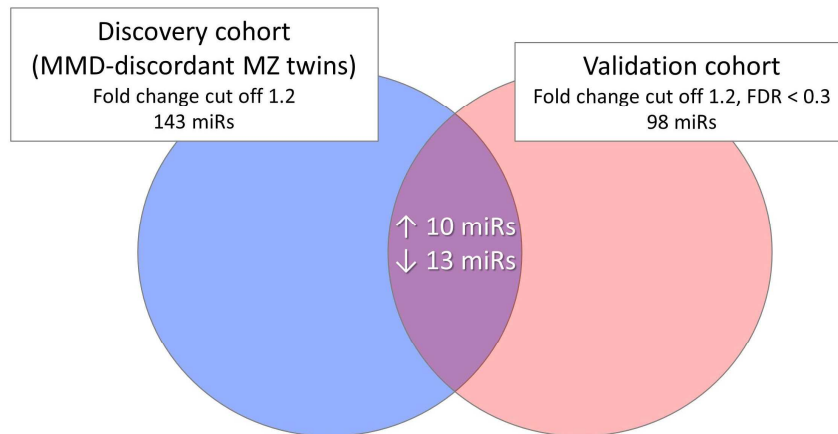


図 7 Discovery cohort と Validation cohort で共通変動した 23 種の miRNA を示すベン図

この 23 種の miRNA の患者/健常発現比を図 8 に示す。各 miRNA は Validation cohort における有意差の大きな順に示している。

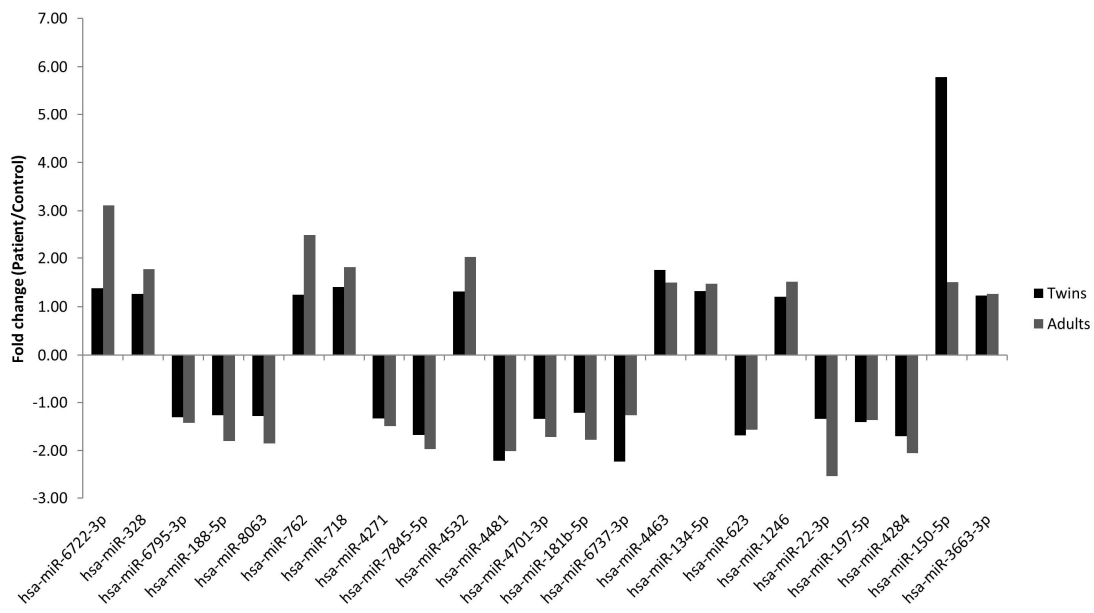


図 8 共通変動した 23 種の miRNA の相対発現値

【バイオマーカー候補の血漿 miRNA の選択と定量】

IPA と miRmap で検索された上記 23 種の miRNA の予測標的遺伝子のうち、より病態への関連が想定される遺伝子を以下に示す (Table 3)。

Table 3 共通変動した 23 種の miRNA の予測標的遺伝子

MiRNA	Fold (twins)	Fold (adults)	P value	Predicted target genes
hsa-miR-6722-3p	1.38	3.11	3.14E-03	RNF213, PDGFB, PDGFRB, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3L, PDGFB, PDGFRB, HGFAC, ANGPTL7, NOTCH2, CSF3, PTTG1 IP
hsa-miR-328	1.26	1.77	3.14E-03	IL1B, TIMP2, ANGPT4, ANGPTL2, NF1
hsa-miR-6795-3p	-1.31	-1.43	4.79E-03	VEGFD, CSF3R
hsa-miR-188-5p	-1.26	-1.80	5.14E-02	
has-miR-8063	-1.29	-1.85	1.81E-03	
hsa-miR-762	1.25	2.48	8.33E-02	PDGFRB, TGFBRAP1, TGFBR3, PTTG1IP, IL1B, VEGFA, VEGFB, PDGFRB, HGFAC, CSF3, CSF3R, ANGPT4, RAF1, PTPN11, NOTCH2, PCNT
hsa-miR-718	1.41	1.81	8.83E-02	VEGFA
hsa-miR-4271	-1.33	-1.49	9.47E-02	PDGFB, CCL2, VEGFD, NRAS
hsa-miR-7845-5p	-1.68	-1.97	1.03E-01	TGFBR3L, HGF, PTPN11
hsa-miR-4532	1.31	2.02	1.05E-01	ANGPTL2
hsa-miR-4481	-2.21	-2.01	1.28E-01	PDGFRA, VEGFA, CSF3
hsa-miR-4701-3p	-1.34	-1.72	1.80E-01	HGFAC, CSF3R, ANGPTL2, SOS1
hsa-miR-181b-5p	-1.22	-1.78	1.80E-01	PSRC1, ACTA2, KRAS, MAP2K1, PDGFRA, NRAS, SAMHD1
hsa-miR-6737-3p	-2.23	-1.27	1.80E-01	TIMP2, ANGPTL8, PTPN11
hsa-miR-4463	1.76	1.50	2.00E-01	PDGFRL, BRCC3, ANGPT2
hsa-miR-134-5p	1.32	1.47	2.00E-01	PDGFB, CSF3R, ANGPTL4
hsa-miR-623	-1.68	-1.57	2.30E-01	MMP3, ANGPT1, SOS1, NRAS
hsa-miR-1246	1.21	1.52	2.34E-01	BRCC3, VEGFD
hsa-miR-22-3p	-1.34	-2.53	2.34E-01	TIMP2, PDGFC, CCL2, NRAS
hsa-miR-197-5p	-1.41	-1.37	2.60E-01	PSRC1, CCL2, ANGPT1
hsa-miR-4284	-1.70	-2.06	2.60E-01	PDGFC, SOS1
hsa-miR-150-5p	5.79	1.50	2.61E-01	PDGFB, VEGFA, PDGFB, ITGB3, SAMHD1
hsa-miR-3663-3p	1.22	1.26	2.99E-01	PDGFD

real-time PCR による定量を行う miRNA を以下の基準で選択した。すなわち、Taqman assay が利用できるものの中で、Discovery cohort で発現差の大きいもの、Validation cohort での有意差の大きいもの、マイクロアレイでのシグナル強度が十分であるもの、病態に関連しうる標的遺伝子をもつものを基準とし、5 種 (miR-6722-3p、miR-328、miR-718、miR-6850-5p、miR-150-5p) の miRNA を選択し、Validation cohort の血漿サンプルを用いて、それらの 発現定量を行った。miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p の 3 種では、健常対照群に対する一般患者群の相対発現値はそれぞれ、1.35 (P = 0.049)、3.98 (P = 0.011)、5.01 (P = 0.043) と有意差をもって上昇しており、マイクロアレイ解析と矛盾しない結果であった (図 9)。miR-718、miR-6850-5p の増幅曲線は検出されなかったが、一定のサンプル内に含まれる RNA 量が検出以下であるか、それぞれの Taqman assay がうまく機能しなかったことが考えられた。

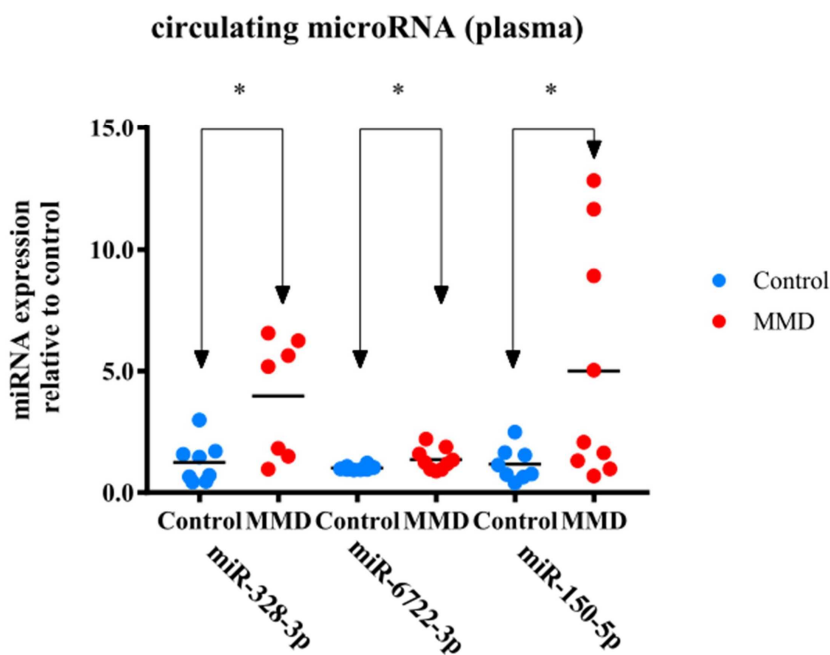


図 9 real-time PCR による血漿 miRNA の定量解析
 水平線：各群平均値、*P < 0.05.

【iPSECs の miRNA 定量】

血漿で有意な発現変動を認めた miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p については、iPSECs のエクソソーム RNA、細胞内 RNA でも同様に定量を行う方針

としたが、RNA 抽出液の Bioanalyzer による電気泳動像から、エクソソーム RNA に関しては、分解した細胞内 RNA の混入などが疑われ、解析には適さないと判断した (図 10)。

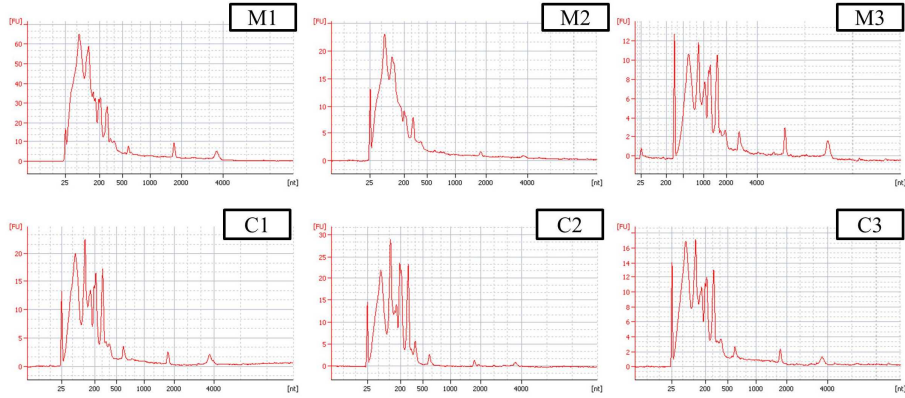


図 10 iPSECs エクソソーム RNA の電気泳動像

細胞内 RNA の品質に関しては問題なく (図 11)、各 miRNA の健常群に対するもやもや病群の相対発現値は、それぞれ 3.85 ($P = 0.15$)、6.46 ($P = 0.15$)、2.07 ($P = 0.40$) であった (図 12)。有意差は認めなかったが、全ての発現変動の方向が血漿と一致しており、特に miR-6722-3p、miR-328 は大きな発現変動を認めた。

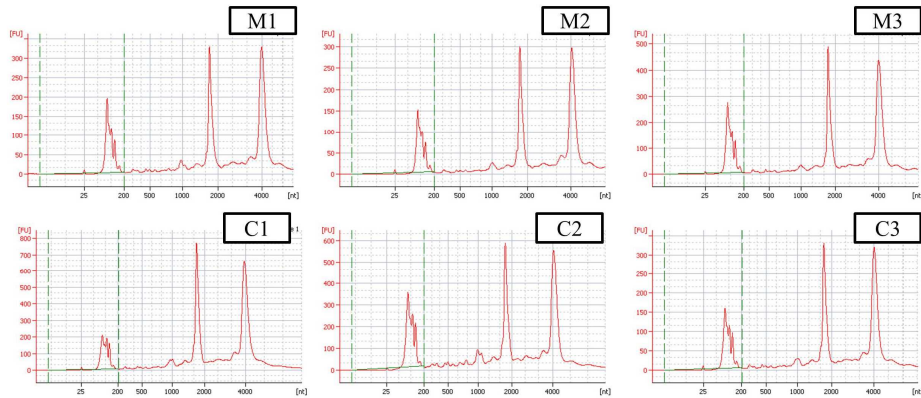


図 11 iPSECs 細胞内 RNA の電気泳動像

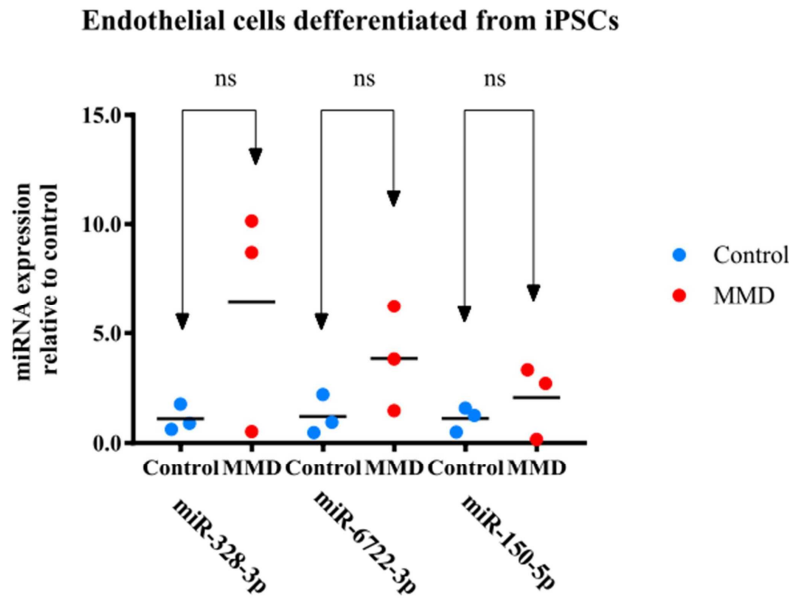


図 12 real-time PCR による iPSECs 細胞内 miRNA の定量解析
 水平線：各群平均値、ns：統計的有意差なし

【変動した miRNA の生物情報学的解析】

患者血漿および iPSECs で発現増加を認めた miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p の予測標的遺伝子は、4562 遺伝子であった (Gene list 1)。また上記の iPSECs 遺伝子発現データのうち、患者細胞で発現変動を認めたのは 4557 遺伝子であった (Gene list 2)。この 2 つの Gene list で重複する遺伝子は 503 遺伝子で、患者 iPSECs で遺伝子発現が低下、つまり miRNA による制御方向と一致するものは、296 遺伝子であった (Gene list 3)。患者 iPSECs 内で、この 296 遺伝子は、変動した miRNA による制御により有意な発現変動 (低下) をきたしている遺伝子群と考えられた (図 13)。この 296 の遺伝子発現データを元に実施した Pathway 解析における上位 Pathway を Table 4 に示す。

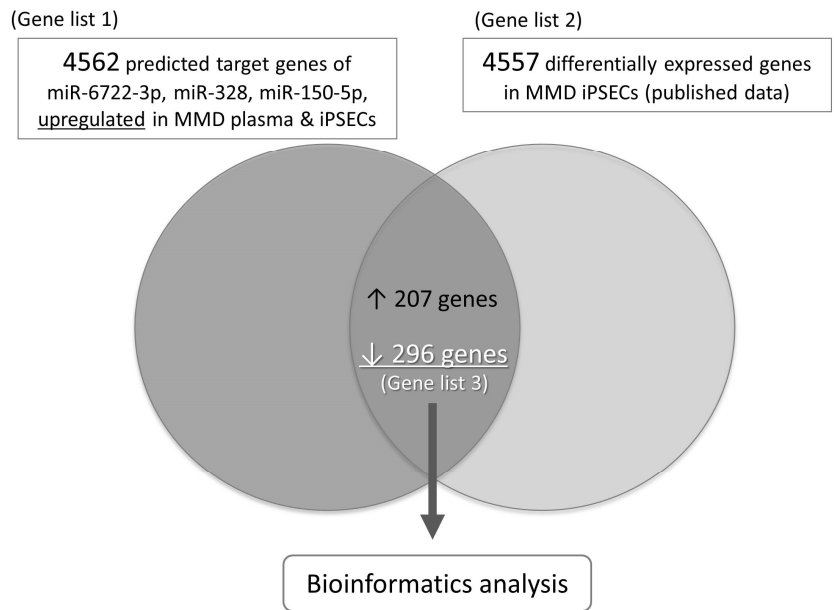


図 13 iPSECs において発現抑制した 296 種の遺伝子を示すベン図

Table 4 Pathway 解析

	Canonical Pathways	-log (p value)
1	PTEN Signaling	6.07
2	Epithelial Adherens Junction Signaling	2.99
3	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.97
4	HGF Signaling	2.95
5	Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	2.94
6	Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2.8
7	PI3K/AKT Signaling	2.76
8	Molecular Mechanisms of Cancer	2.63
9	Wnt/ β -catenin Signaling	2.59
10	FAK Signaling	2.59
11	Leukocyte Extravasation Signaling	2.56
12	Actin Cytoskeleton Signaling	2.32
13	Paxillin Signaling	2.3
14	Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	2.3
15	ERK/MAPK Signaling	2.17
16	autophagy	2.02
17	Axonal Guidance Signaling	1.98
18	Integrin Signaling	1.93
19	Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1.92
20	PAK Signaling	1.87
21	Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.87
22	Insulin Receptor Signaling	1.85
23	Aggrin Interactions at Neuromuscular Junction	1.81
24	IGF-1 Signaling	1.79
25	Inhibition of Matrix Metalloproteases	1.78
26	STAT3 Pathway	1.73
27	p53 Signaling	1.71
28	Telomerase Signaling	1.71
29	VDR/RXR Activation	1.63
30	Erythropoietin Signaling	1.61

考察

本研究では、もやもや病の疾患バイオマーカーとなり得る血液中 **circulating miRNA** の解析を行った。表現不一致一卵性双生児、一般患者・健常対照群の検体を用いてマイクロアレイによる網羅的解析を行い、両 Cohort 患者で共通発現変動した **23 miRNA** を抽出し、これらは疾患特異的に変動している **miRNA** 候補と考えた。過去に中国人もやもや病患者を対象とした血液中 **miRNA** の研究報告がなされている^{38,48}。Dai らのマイクロアレイ解析において、患者で変動を認めた **miRNA** のうち、**miR-4271** のみが本研究における **23 miRNA** と重複し、発現傾向も一致していた³⁸。ただし、人種や選択された患者背景、血液採取時期、解析方法の違いにより **miRNA** の解析結果は影響を受けると考えられる。

○対象患者の選択

miRNA は同じ疾患でも病勢・病状により発現が変化しうるため、本研究の患者群の選択に関して配慮した。脳虚血の急性期に変動する **miRNA** を除外するため、患者群は血行再建術後で状態が安定している者とした。また、より均質な群とするため、発症型、**RNF213** 遺伝子型が一致する者を選択した。もやもや病における既報の **circulating miRNA** 解析研究は限られている上、このように検体採取時期、患者背景に配慮したものは皆無である。さらに本研究では同じ **DNA** 配列でも表現型が異なる表現不一致一卵性双生児を対象に含めたことは、様々な交絡因子を除外でき、エピゲノムの観点から、より疾患の発症・病態に関連するバイオマーカーが抽出できる可能性があり、非常に意義が高いものと考えた。

○miRNA 発現解析方法

miRNA 発現プロファイリングにはマイクロアレイ、**real-time PCR**、**RNA sequencing** といった技術が用いられる。マイクロアレイでは未知の **miRNA** は検出できないものの、データベースに登録されている **miRNA** を網羅的に解析することができる利点がある。一方で他の方法に比べ、定量性や特異性がやや劣るとされている⁴⁹。**RNA sequencing** も、特異性が高く、新規 **miRNA** の同定も可能だが、定量性は **real-time PCR** に劣るうえ、高コストである。そのため、本研究ではマイクロアレイ解析で抽出された **miRNA** から一部を選択し、

real-time PCRにて再検証した。real-time PCRでは外部標準もしくは内部標準に対する相対定量法が一般に用いられるが、いくつかの検討事項が存在する。体液中 circulating miRNAの解析においては、恒常的に安定して発現している内部標準は定まっておらず、また実験系によっても異なると考えられている。また相対定量における $\Delta\Delta Ct$ 法は各miRNAの増幅効率が同じであるという前提条件にもとづいているが、今回用いたTaqman assayは各プライマーの増幅効率は一定ではなかった。従って、今回は cel-miR-39 を外部標準として用い、プライマーの増幅効率で補正可能な $\Delta\Delta Ct$ の変法 (Pffafli 法) を採用した⁴⁷。本方法は単純な $\Delta\Delta Ct$ 法よりも、手技や計算やや煩雑にはなるが、より正確な評価が可能となる。

○内皮細胞 miRNA の発現定量および生物情報学的機能解析

血液中で miRNA はエクソソームという小胞に包まれ安定的に存在していることが知られている。エクソソーム内 miRNA の機能および産生由来は、完全には解明されていないが、生体における各種細胞が能動的にエクソソームを分泌し、細胞間伝達を行っていると考えられている⁵⁰。一方、細胞内に存在する miRNA については細胞内伝達に関与している⁵¹。もやもや病患者の血漿において変動のあった miRNA の由来細胞は不明であるが、もやもや病 iPSECs では細胞内 miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p の発現が増加しており、血漿と同様の変動であった。今回、iPSECs のエクソソーム内 miRNA 解析は成功しなかったが、エクソソーム内 miRNA 量は細胞内 miRNA 量を反映すると推測されており⁵¹、これら 3 種の miRNA はエクソソーム内でも増加している可能性がある。もやもや病患者の血漿中で変動のあった miRNA は、内皮細胞においても同様の発現変動があり、病因と関連している可能性が示唆される。

これら miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p の予測標的遺伝子と、iPSECs の遺伝子発現データ (published data) において、発現方向が一致する遺伝子を抽出して行った pathway 解析では、細胞増殖・生存・分化、細胞外基質・細胞接着に関連するものが複数含まれていた。また network 解析でも、Cardiovascular disease、細胞増殖・細胞生存・細胞周期に関連するものが含まれていた。Pathway リストの第 1 位に挙げられた PTEN シグナル系は複数の血管新生因子 (VEGF、angiopoietin、b-FGF、PDGFB、TGF- β など) からの刺激や、integrin を介した shear stress 刺激などを制御し、血管恒常性において極

めて重要な役割を果たしている⁵²。さらに PTEN は、pathway リスト第 7 位の PI3K/AKT シグナル系を抑制的に制御している。この PI3K/AKT シグナル系は、血管内皮細胞の様々な機能（細胞生存、遊走、管腔形成、一酸化窒素産生）の他、EPC の細胞生存・遊走・分化にも関与する^{52,53}。また血管平滑筋においても、PI3K はその細胞収縮、細胞増殖を制御し、血管リモデリング、新生内膜肥厚に関与している⁵⁴。そして、これら血管内皮細胞、血管平滑筋の相互作用は血管リモデリング、血管形成において重要である⁵²。したがって、発現変動している miRNA が血管内皮細胞の遺伝子発現に影響し、血管恒常性・血管形成の過程に異常をきたすことで、もやもや病の発病・病態に関与している可能性が示唆される。

○本研究の限界

本研究における課題の第一は、対象数や患者の臨床型が限定されていることが挙げられ、今後、より多数例でも検証していく必要がある。第二は、マイクロアレイで絞られた 23 miRNA のうち、real-time PCR で発現定量できたのは、3 種のみで、その他にも重要な miRNA は含まれていると考えられる。2 つの cohort を用いることで、マイクロアレイ解析でも意義の高いバイオマーカー候補が絞られたと考えられるが、偽陽性が含まれている可能性がある。今後、ハイスループットで定量性の高い測定技術の開発が期待される。

総括および結論

①本研究全体から得られた新知見

- 表現不一致一卵性双生児、一般病患者群、健常対照群サンプルを用いたマイクロアレイ網羅的解析における血漿 miRNA 発現プロファイルは、もやもや病患者群と非患者群を特徴づける一定の効果を示した。
- real-time PCR における定量解析では、患者群で mir-6722-3p、mir-328、mir-150-5p の増加を認め、マイクロアレイ解析とも一致した。
- 患者 iPSECs の細胞内においても、mir-6722-3p、mir-328、mir-150-5p は血漿中と同様に増加を認めた。これらの予測標的遺伝子と iPSECs の遺伝子発現データにて、制御・発現方向が一致している遺伝子は、細胞増殖・生存・分化、細胞外基質・細胞接着などの pathway に関与していた。

②新知見の意義

- よく選択された対象者の血液検体を用いることで、有力な疾患バイオマーカーとなりうる circulating miRNA を抽出できた。
- その中には血管内皮細胞の遺伝子発現に影響し、血管恒常性・血管形成の過程に異常をきたすことで、もやもや病の発病・病態に関与している miRNA があることが示唆された。
- これまで疾患感受性遺伝子 *RNF213* 解析だけでは解明できなかった、もやもや病の病態をエピゲノムの観点から説明する研究の端緒となった。

③今後どのような研究が展開されうるか

より多数例での検証により、予後マーカー・治療効果判定マーカーの探索といったさらなるバイオマーカー研究の展開が考えられる。また平滑筋細胞など内皮細胞以外の血管細胞の miRNA の発現解析や、DNA メチル化など、他のエピゲノム機構に関しても同様の研究展開が期待される。

④今後の課題

血液中で発現変動する miRNA は、各種血管細胞の遺伝子発現や機能にどのように影響し、病態に関与するのかを in vitro/in vivo で示していく必要がある。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野 寶金清博教授に謝意を申し上げます。また本研究全般にわたり、直接ご指導・ご鞭撻をいただいた同分野 伊東雅基医師に深く感謝いたします。また、iPS細胞の培養や分化誘導などに関して、ご指導いただいた同分野 浜内祝詞医師、解析機器および健常群血液サンプルの利用などに関して、ご協力・ご指導いただいた北海道大学医学研究科神経内科学分野 佐々木秀直教授、浜結香研究員にも深く感謝いたします。最後に、本研究にご協力いただいた四戸由美子実験助手、長島里香実験助手、そして研究に関して多くの議論・助言をいただきました他の当教室員の皆様に御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Suzuki, J. & Takaku, A. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch. Neurol.* **20**, 288-299 (1969).
- 2 Goto, Y. & Yonekawa, Y. Worldwide distribution of moyamoya disease. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **32**, 883-886 (1992).
- 3 Uchino, K., Johnston, S. C., Becker, K. J. & Tirschwell, D. L. Moyamoya disease in Washington State and California. *Neurology* **65**, 956-958 (2005).
- 4 Yonekawa, Y., Ogata, N., Kaku, Y., Taub, E. & Imhof, H. G. Moyamoya disease in Europe, past and present status. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **99 Suppl 2**, S58-60 (1997).
- 5 Hoshino, H., Izawa, Y., Suzuki, N. & Research Committee on Moyamoya, D. Epidemiological features of moyamoya disease in Japan. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **52**, 295-298 (2012).
- 6 Kuriyama, S. *et al.* Prevalence and clinicoepidemiological features of

- moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Stroke* **39**, 42-47 (2008).
- 7 Wakai, K. *et al.* Epidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide survey. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **99 Suppl 2**, S1-5 (1997).
- 8 Hayashi, K., Horie, N., Suyama, K. & Nagata, I. An epidemiological survey of moyamoya disease, unilateral moyamoya disease and quasi-moyamoya disease in Japan. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **115**, 930-933 (2013).
- 9 Baba, T., Houkin, K. & Kuroda, S. Novel epidemiological features of moyamoya disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 900-904 (2008).
- 10 Ahn, I. M. *et al.* Incidence, prevalence, and survival of moyamoya disease in Korea: a nationwide, population-based study. *Stroke* **45**, 1090-1095 (2014).
- 11 Im, S. H. *et al.* Prevalence and epidemiological features of moyamoya disease in Korea. *Journal of cerebrovascular and endovascular neurosurgery* **14**, 75-78 (2012).
- 12 Kleinloog, R., Regli, L., Rinkel, G. J. & Klijn, C. J. Regional differences in incidence and patient characteristics of moyamoya disease: a systematic review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **83**, 531-536 (2012).
- 13 Kossorotoff, M. Cognitive decline in moyamoya: influence of chronic cerebral hypoxia, history of stroke, or comorbid conditions? *Developmental medicine and child neurology* **54**, 5-6 (2012).
- 14 Kazumata, K. *et al.* Chronic ischemia alters brain microstructural integrity and cognitive performance in adult moyamoya disease. *Stroke* **46**, 354-360 (2015).
- 15 Research Committee on the, P., Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of, W. & Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Infractable, D. Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis). *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **52**, 245-266 (2012).

- 16 Miyamoto, S. *et al.* Effects of extracranial-intracranial bypass for patients with hemorrhagic moyamoya disease: results of the Japan Adult Moyamoya Trial. *Stroke* **45**, 1415-1421 (2014).
- 17 Fukui, M., Kono, S., Sueishi, K. & Ikezaki, K. Moyamoya disease. *Neuropathology* **20 Suppl**, S61-64 (2000).
- 18 Masuda, J., Ogata, J. & Yutani, C. Smooth muscle cell proliferation and localization of macrophages and T cells in the occlusive intracranial major arteries in moyamoya disease. *Stroke* **24**, 1960-1967 (1993).
- 19 Achrol, A. S., Guzman, R., Lee, M. & Steinberg, G. K. Pathophysiology and genetic factors in moyamoya disease. *Neurosurg. Focus.* **26**, E4 (2009).
- 20 Houkin, K. *et al.* Review of past research and current concepts on the etiology of moyamoya disease. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **52**, 267-277 (2012).
- 21 Guey, S., Tournier-Lasserre, E., Herve, D. & Kossorotoff, M. Moyamoya disease and syndromes: from genetics to clinical management. *The application of clinical genetics* **8**, 49-68 (2015).
- 22 Hojo, M. *et al.* Role of transforming growth factor-beta1 in the pathogenesis of moyamoya disease. *J. Neurosurg.* **89**, 623-629 (1998).
- 23 Houkin, K. *et al.* Role of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of moyamoya disease. *Neurosurg. Focus* **5**, e2 (1998).
- 24 Nanba, R., Kuroda, S., Ishikawa, T., Houkin, K. & Iwasaki, Y. Increased expression of hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid and intracranial artery in moyamoya disease. *Stroke* **35**, 2837-2842 (2004).
- 25 Kuroda, S. & Houkin, K. Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol.* **7**, 1056-1066 (2008).
- 26 Mineharu, Y. *et al.* Inheritance pattern of familial moyamoya disease: autosomal dominant mode and genomic imprinting. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **77**, 1025-1029 (2006).
- 27 Roder, C. *et al.* Genetics of Moyamoya disease. *J. Hum. Genet.* **55**, 711-716 (2010).

- 28 Kang, H. S. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of tissue inhibitor of metalloproteinase genes in familial moyamoya disease. *Neurosurgery* **58**, 1074-1080; discussion 1074-1080 (2006).
- 29 Roder, C. *et al.* Polymorphisms in TGFB1 and PDGFRB are associated with Moyamoya disease in European patients. *Acta Neurochir. (Wien)* **152**, 2153-2160 (2010).
- 30 Liu, W. *et al.* Genomewide association study identifies no major founder variant in Caucasian moyamoya disease. *Journal of genetics* **92**, 605-609 (2013).
- 31 Kamada, F. *et al.* A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J. Hum. Genet.* **56**, 34-40 (2011).
- 32 Liu, W. *et al.* Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One* **6**, e22542 (2011).
- 33 Miyawaki, S. *et al.* Genetic variant RNF213 c.14576G>A in various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke* **44** (2013).
- 34 Hamauchi, S. *et al.* Cellular Functions and Gene and Protein Expression Profiles in Endothelial Cells Derived from Moyamoya Disease-Specific iPS Cells. *PLoS One* **11**, e0163561 (2016).
- 35 Kobayashi, H. *et al.* Biochemical and Functional Characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a Susceptibility Mutation of Moyamoya Disease, in Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Journal of the American Heart Association* **4** (2015).
- 36 Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**, 396-398 (2007).
- 37 Park, Y. S. *et al.* Association of the miR-146aC>G, miR-196a2C>T, and miR-499A>G polymorphisms with moyamoya disease in the Korean population. *Neurosci. Lett.* **521**, 71-75 (2012).
- 38 Dai, D. *et al.* Serum miRNA signature in Moyamoya disease. *PLoS One* **9**, e102382 (2014).
- 39 Koutsis, G., Siasos, G. & Spengos, K. The emerging role of microRNA in stroke. *Current topics in medicinal chemistry* **13**, 1573-1588 (2013).
- 40 Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based

- markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (2008).
- 41 Lanford, R. E. *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in
primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198-201
(2010).
- 42 Takeshita, F. *et al.* Systemic delivery of synthetic microRNA-16
inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation
of multiple cell-cycle genes. *Mol. Ther.* **18**, 181-187 (2010).
- 43 Vejnar, C. E. & Zdobnov, E. M. MiRmap: comprehensive prediction of
microRNA target repression strength. *Nucleic. Acids. Res.* **40**,
11673-11683 (2012).
- 44 Hitomi, T. *et al.* Downregulation of Securin by the variant RNF213
R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced
pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from
moyamoya patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 13-19
(2013).
- 45 Blecharz, K. G. *et al.* Autocrine release of angiopoietin-2 mediates
cerebrovascular disintegration in Moyamoya disease. *J. Cereb. Blood
Flow Metab.* **37**, 1527-1539 (2017).
- 46 Fujimura, M., Watanabe, M., Narisawa, A., Shimizu, H. & Tominaga,
T. Increased expression of serum Matrix Metalloproteinase-9 in
patients with moyamoya disease. *Surg. Neurol.* **72**, 476-480;
discussion 480 (2009).
- 47 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in
real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
- 48 Zhao, S. *et al.* Elevated Serum MicroRNA Let-7c in Moyamoya
Disease. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **24**, 1709-1714 (2015).
- 49 Pritchard, C. C., Cheng, H. H. & Tewari, M. MicroRNA profiling:
approaches and considerations. *Nature reviews. Genetics* **13**, 358-369
(2012).
- 50 Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and
microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.
Nature cell biology **9**, 654-659 (2007).
- 51 Finn, N. A. & Searles, C. D. Intracellular and Extracellular miRNAs

- in Regulation of Angiogenesis Signaling. *Current angiogenesis* **4**, 299-307 (2012).
- 52 Hamada, K. *et al.* The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes & development* **19**, 2054-2065 (2005).
- 53 Koide, M. *et al.* Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) controls the PI3K/Akt pathway in endothelial and endothelial progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9472-9477 (2011).
- 54 Morello, F., Perino, A. & Hirsch, E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovascular research* **82**, 261-271 (2009).