HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	もやもや病患者由来iPS細胞の血管平滑筋細胞への分化誘導；機能解析および遺伝子発現解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	東海林, 菊太郎
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14078号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/78029
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2543
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kikutaro_Tokairin_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　東海林 菊太郎

学 位 論 文 題 名

もやもや病患者由来 iPS 細胞の血管平滑筋細胞への分化誘導；
機能解析および遺伝子発現解析
(Differentiation of vascular smooth muscle cell from iPS cell of moyamoya disease patients; functional and gene expression analysis)

【背景と目的】もやもや病は内頚動脈終末部の進行性狭窄を主病変とし、それにより生じる脳虚血を代償するために大脳基底核部に側副血行路の発達が認められる疾患である。2011 年にもやもや病感受性遺伝子として ring finger protein（RNF）213 が報告されたが、未だ病態の解明には至っていない。もやもや病の脳動脈病理所見は内膜の線維細胞性肥厚と中膜の菲薄化を呈し、血管平滑筋細胞（smooth muscle cell: SMC）や T リンパ球が内膜に集積していることが組織学的に示されているが、もやもや病疾患動物モデルが確立されていないため、病因解明の妨げになってきた。このため、2007 年に人工多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞の樹立方法が報告されて以降、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導させた細胞を用いた病態解析が研究手法として増えており、もやもや病においても iPS 細胞を用いた研究モデルが報告されるようになった。先行研究ではもやもや病患者の末梢血単核球から iPS 細胞を樹立し、さらに血管内皮細胞（endothelial cell: EC）への分化誘導を行い、健常者 EC と比較して管腔形成能が低下しているなど、もやもや病における EC の機能異常を明らかにした。しかし、SMC の機能異常については不明なままであった。そこで本研究では、発生学的に頭頚部動脈の SMC が神経外胚葉に由来することに着目し、iPS 細胞から神経堤幹細胞（neural crest stem cell: NCSC）を分化誘導してから SMC を樹立することで、もやもや病の SMC モデルを確立することを目的とした。さらに、もやもや病 SMC モデルを用いて細胞機能や遺伝子発現上の特徴を解析して、EC 同様 SMC にも異常があるかを明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】アジア人もやもや病における RNF213 遺伝子創始者変異（p.R4810K）ヘテロ接合の成人もやもや病患者 3 名と、その野生型の健常成人 3 名を対象とし、先行研究にて樹立した iPS 細胞を用いた。iPS 細胞をフィーダーフリー馴化させ、第一段階として、basic fibroblast growth factor、SB421542、noggin、Y-27632 添加培地を用いて iPS 細胞から NCSC への分化誘導を行った。第二段階として、tumor growth factor-β1、platelet-derived growth factor-BB 添加培地を用いて NCSC から SMC への分化誘導を行った。免疫細胞化学、定性的および定量的ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction: PCR）を行い、樹立した細胞株の SMC への分化と、幹細胞や平滑筋前駆細胞としての未分化性がないことを確認した。そのうえで、もやもや病と健常者の二群間で SMC の増殖能、遊走能、収縮能を比較検証した。また、SMC のマイクロアレイ網羅的遺伝子発現解析を行い、もやもや病と健常者の遺伝子発現プロファイルを解析した。発現変動解析の結果は定量的 PCR により検証した。さらに、先行研究にて同じ iPS 細胞株から分化

誘導した EC の同一マイクロアレイプラットフォームで得た生データを用いて、同一の解析手法で遺伝子発現遺伝子発現プロファイルを解析し、SMC の遺伝子発現プロファイル結果と比較検討した。

【結果】フィーダーフリー馴化させた 6 株全ての iPS 細胞で、Oct 3/4、Nanog、TRA-1 60、SSEA-4 が免疫細胞化学的に陽性で、多能性が維持されていることを確認した。分化誘導した NCSC は、フローサイトメトリーで 94.9%以上の純度で CD57 と CD271 が二重陽性で、免疫染色でも Nestin と CD271 が二重陽性であり、NCSC 特性を有することを確認した。引き続き SMC への分化誘導を行い、免疫染色および定性的 PCR により SMC 特異的なマーカーである MYH11、calponin、SM22α、αSMA の発現を認めた。定量的 PCR では CD31 と CD34 の発現は認めず、NCSC から分化誘導した細胞が幹細胞や平滑筋前駆細胞ではないことも確認した。各々もやもや病 vs 健常者で比較した場合、SMC の増殖能（培養経過時間あたりの細胞数を線形回帰した際の回帰係数：0.0059±0.0026 vs 0.0090±0.0021; P=0.45）、遊走能（単位面積あたりの遊走細胞数：53.9±9.0 vs 49.6±6.0; P=0.30）、収縮能（収縮物質添加前後の細胞表面積［μm^2］の変化：8363±723 から 7718±656 vs 9735±784 から 9105±760; P=0.18）はいずれも二群間で差はなかった。SMC のマイクロアレイ網羅的遺伝子発現プロファイルはもやもや病と健常者で非常に近似しており、発現変動解析で有意な 3 倍以上の発現変動を示したのは 6 遺伝子に留まった。定量的 PCR で検証した結果、そのうち DCN（平均発現変動比 4.5、P=0.12）、SLITRK4（平均発現変動比 5.9、P=0.12）、PCDHB（平均発現変動比 0.32、P=0.12）の 3 遺伝子でマイクロアレイと一致したもやもや病での発現変動の傾向を認めた。一方 EC のマイクロアレイ網羅的遺伝子発現プロファイルは先行研究でも確認していた通りもやもや病と健常者間で明瞭な差があることが確認され、発現変動解析でも 120 遺伝子で有意な 3 倍以上の発現変動を認めた。

【考察】iPS 細胞から NCSC を経て樹立された SMC は脳血管平滑筋の in vitro モデルといえる。SMC の増殖能や遊走能、収縮能といった細胞機能に健常者ともやもや病の間で差はなく、網羅的遺伝子発現状態にも差がなかったが、EC についてはもやもや病に特異的な細胞機能異常が先行研究で示されており、本研究の解析でももやもや病特異的遺伝子発現変動が確認されたことから、SMC よりも EC がもやもや病の血管病理に寄与することが示唆される。もやもや病 SMC で発現亢進を認めた遺伝子のうち DCN（decorin）は、正常血管の恒常性だけでなく様々な血管疾患の病因にも関わるなど複雑な役割を担っているとされる。興味深いことに、EC のマイクロアレイ解析で得られた発現変動遺伝子に DCN は含まれていなかった。さらに、既報文献にて EC と SMC の共培養モデルで DCN が EC の増殖や遊走を促進すると報告されており、もやもや病の脳血管では SMC で発現亢進した DCN が間接的に EC に作用して機能異常をもたらし、線維細胞性内膜肥厚などのもやもや病の血管病理を引き起こす可能性が考えられた。本研究で検証できなかった将来展望として、成長因子や血行力学的シェアストレスなどの内的、外的要因や EC と SMC の相互影響が血管病理に及ぼす作用についてさらなる研究が必要である。

【結論】もやもや病患者由来の iPS 細胞から、神経堤幹細胞由来の頭頚部動脈特異的血管平滑筋細胞を分化誘導することに初めて成功した。もやもや病の血管平滑筋細胞は細胞機能も遺伝子発現プロファイルも健常者との差は少なく、血管内皮細胞の結果と対照的であった。細胞生物学的には、平滑筋細胞よりも内皮細胞の方が中心的役割を果たしていることが示唆される。