



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | もやもや病特異的iPS細胞由来血管内皮細胞の多角的解析 [論文内容及び審査の要旨]                                                                                 |
| Author(s)           | 濱内, 祝嗣                                                                                                                    |
| Description         | 配架番号 : 2227                                                                                                               |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                                    |
| Dissertation Number | 甲第12123号                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2016-03-24                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/61721">https://hdl.handle.net/2115/61721</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Shuji_Hamauchi_review.pdf, 審査の要旨                                                                                          |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名   濱   内   祝   嗣

|       |    |            |
|-------|----|------------|
| 主査    | 教授 | 大 場 雄 介    |
| 審査担当者 | 副査 | 教授 岩 永 敏 彦 |
|       | 副査 | 教授 三 輪 聡 一 |
|       | 副査 | 教授 廣 瀬 哲 郎 |

### 学 位 論 文 題 名

もやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞の多角的解析  
(Comprehensive analysis of endothelial cells  
derived from moyamoya disease-specific induced pluripotent stem cells)

本研究では RNF213 遺伝子に R4810K 変異を有する 3 人のもやもや病患者から新規に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) を樹立した。また、熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野にて樹立された 3 人の健常者由来 iPS 細胞をコントロールとして用いた。作製したもやもや病特異的 iPS 細胞は、未分化マーカーの発現、奇形腫形成による多能性の確認、核型の検査を経て血管内皮細胞への分化誘導がなされた。分化誘導された内皮細胞の機能解析として増殖能、血管新生能の評価を行い、それぞれの評価項目について、血管内皮増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、骨形成タンパク質 4 (BMP4) とった増殖因子に対する反応性も検討した。また、内皮細胞のマイクロアレイおよびプロテオミクス解析を行った。

内皮細胞の増殖能に関しては、コントロールともやもや病との間で有意な差は認められなかった。また、両者の間で増殖因子に対する反応性の違いも認められなかった。一方、血管新生能に関しては、増殖因子の有無によらず、もやもや病において有意な低下が認められた。マイクロアレイ解析の結果、もやもや病で有意に発現が低下している遺伝子群の中に、細胞外マトリクス受容体関連遺伝子が有意に濃縮されていることが示された。その中には、血管新生に重要な役割を担うインテグリン  $\beta 3$  が含まれており、もやもや病血管内皮におけるチューブ形成能の低下に関連している可能性が示唆された。また、プロテオミクス解析の結果、もやもや病で有意に発現が亢進しているタンパク質の中にヘテロ核 RNA タンパク質 (hnRNP) や U2AF1 などのスプライシング制御因子が多く含まれており、もやもや病においては特異的なスプライシングパターンが存在する可能性が示唆された。

今後、変異型 RNF213 (RNF213R4810K) が、実際にこれらの遺伝子やたんぱく質発現の異常に関わっているのか、内皮細胞の機能にどのような影響を与えるのかを検証していく必要があると考えられる。

審査にあたり、副査の三輪教授から、T細胞から作製したiPS細胞および内皮細胞には、T細胞の性質が残っているのではないかと質問があった。申請者は、iPS細胞はリプログラミング後も元の体細胞の性質を有していることが知られており、今回用いた内皮細胞においてもその性質が引き継がれている可能性があること、今回の研究において内皮細胞マーカーの発現などで内皮細胞としての性質を有していることを示したが、DNAメチル化などエピジェネティクスのレベルでヒト臍帯静脈内皮細胞など既存の内皮細胞との比較は行っていないと回答した。また、もやもや病iPS細胞の先行研究では、線維芽細胞からiPS細胞を樹立して内皮細胞への分化誘導をおこなっているが、その研究においても、誘導後の内皮細胞と元の線維芽細胞との類似性や違いについて、厳密な評価はなされていない旨を回答した。つづいて、先行研究と同様に線維芽細胞からiPS細胞を作製するべきではなかったかと質問があった。申請者は線維芽細胞を採取するためには皮膚切開が必要であり、提供者にとって負担が大きいこと、最近では末梢血単核球から作製する手法が主流となってきたことから、本研究でもより侵襲の低い末梢血単核球からのiPS細胞樹立を選択したと回答した。さらに、副査の三輪教授から、インビトロにおいては血管新生が低下しているのに対し、臨床像としては血管新生の亢進が見られる点に矛盾があるのではないかと質問があった。申請者は、過去のRNF213ノックアウトマウスを用いた研究の報告を引用し、RNF213ノックアウトマウスにおいて、血管内膜障害後の内膜新生は抑制されていたが、下肢の慢性虚血実験では血管新生が亢進していたことから、もやもや病に特徴的な表現型が出現するためには、低酸素のような何らかの条件が必要である可能性があると回答した。次に副査の岩永教授から、変異型RNF213では、本来のRNF213の機能であるユビキチンライゲース活性が低下するかとの質問があった。申請者は、変異型RNF213を発現する細胞においてユビキチン化のレベルは低下しないと報告されている旨を回答した。副査の廣瀬教授からは、最も表現型の差が見られるチューブ形成中の細胞からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行うのが良いのではないかと指摘があった。申請者は、チューブ形成アッセイに用いるゲルには様々な物質が含まれており、ゲル中から細胞を単離することが現時点では困難であること、今後細胞の単離法を検討した上で解析をしたいと回答した。また、変異型RNF213とマイクロアレイやプロテオミクス解析の結果との関連性について質問があった。申請者は、現時点では不明であり、今後、変異型RNF213の強制発現や発現阻害などの実験が必要であると回答した。最後に、主査の大場教授より、今回の研究の過程で分化誘導された平滑筋細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、内皮細胞との遺伝子発現の差を比較してはどうかと質問があった。申請者は、興味深いアイデアであり、今後の研究で検討したいと回答した。

この論文は、もやもや病と細胞外マトリックス受容体、スプライシング制御因子という新たな病因の可能性を示した点において高く評価され、今後のもやもや病の病態研究への貢献が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。