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［全文の要約］
Author(s)	濵内, 祝嗣
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2227 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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	https://hdl.handle.net/2115/62754
Type	doctoral thesis
File Information	Shuji_Hamauchi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

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)

2016年3月

北海道大学
濵内　祝嗣

学　位　論　文（要約）

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)

2016年3月

北海道大学
濵内　祝嗣

目　次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・ 1頁
緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3頁
略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5頁
実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7頁
実験結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20頁
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40頁
総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・ 43頁
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45頁
引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shuji Hamauchi, Hideo Shichinohe, Haruto Uchino, Shigeru Yamaguchi, Naoki Nakayama, Ken Kazumata, Toshiya Osanai, Takeo Abumiya, Kiyohiro Houkin, Takumi Era
Cellular functions and characteristics of endothelial cells derived from moyamoya disease-specific iPS cells
Stroke（現在投稿中）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shuji Hamauchi, Akihiko Katayama, Ippei Date, Takumi Era, Hideo Shichinohe, Haruto Uchino, Naoki Nakayama, Ken Kazumata, Kiyohiro Houkin
   Analysis of the role of angiogenic factors in endothelial cells derived from iPS cells of moyamoya disease patients
   KEY Forum:From Stem Cells to Organs 熊本医学・生物科学国際シンポジウム　Sept. 4th, 2014, Kumamoto

2. 浜内祝嗣、七戸秀夫、伊東雅基、長内俊也、穂刈正昭、中山若樹、数又研、江良択実、宝金清博
   もやもや病iPS細胞由来血管内皮細胞におけるangiogenic factorへの反応性
   第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日、横浜

3. 浜内祝嗣、七戸秀夫、中山若樹、数又研、江良択実、宝金清博
   もやもや病iPS細胞由来血管内皮細胞におけるangiogenic factorの役割
   第40回日本脳卒中学会総会　2015年3月26日、広島

4. Shuji Hamauchi, Hideo Shichinohe, Haruto Uchino, Shigeru Yamaguchi, Naoki Nakayama, Ken Kazumata, Toshiya Osanai, Takeo Abumiya, Kiyohiro Houkin, Takumi Era
Analysis the response of angiogenic factors in endothelial cells derived from iPS cells of Moyamoya disease patients
4nd International moyamoya meeting, Berlin, july 3, 2015 Germany

緒言

もやもや病は1960年代に本邦において初めて発見された疾患である。内頸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、この血管網が血管撮影検査にて「もやもや」と見えることが疾患名の由来となっている[1-4]。本疾患は極東アジア、特に日本で多く、本邦での発生率は0.35人/10万人、有病率は3.16人/10万人となっている。発症年齢は5-10歳と40歳前後をピークとする二峰性の分布を呈する。また、家族発症例が10-15%に認められることが知られている[5]。もやもや病の臨床症状は、小児と成人とで大きく異なる。小児では熱い食品の吹き冷ましや吹奏楽器の演奏などにより過呼吸となった際に脳虚血発作を起こすことが多い。これは、過呼吸により血中の二酸化炭素が低下し、脳血管の収縮が起こるためと考えられている。一方、成人では約半数が脳出血で発症し、これはもやもや血管自体の脆弱性やもやもや血管の末梢に発生した動脈瘤の破裂が関わっているとされる[6]。

本疾患の主病変である内頸動脈終末部の病理所見では、内膜の肥厚、内弾性板の蛇行、中膜の菲薄化が認められる。これまで、もやもや病の病因として炎症、増殖因子の上昇、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell、EPC)の異常などが指摘されているが、未だ病態の解明には至っていない。頚部の慢性炎症に起因する血管炎を病因とする考えから、血清病血管炎モデル動物を用いた研究が過去に行われたが、もやもや病に類似した病態は再現されなかった[7-9]。また、患者から採取した血清、髄液、血管壁などにおいてvascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、transforming growth factor-β (TGF-β)などの増殖因子が上昇していることが報告されている[10-15]。しかし、これらの上昇した増殖因子がもやもや病の原因となっているのか、進行した脳虚血の結果によるものなのかが判断できない点がこれらの研究の限界となっている。EPCは骨髄で産生された後に末梢血へと放たれ、血管の修復や恒常性の維持に関与している細胞であり、Asaharaらによって1997年に報告された[16]。Kimらは、小児もやもや病患者から採取したEPCはMatrigel assayにおけるチューブ形成が健常小児から採取したEPCよりも劣っていることを報告した[17]。彼らはEPCの機能低下がもやもや病の病態に関わっている可能性を指摘している。これらのEPCの研究により、もやもや病では内皮細胞の機能異常を病態解析研究の対象とすることができる可能性が示され

た。しかし、毎回多量の末梢血の採取が必要であるため、繰り返しの実験や、多量の細胞を要する実験を行う上では課題があった。

もやもや病に遺伝的要因が関わっていることは、家族性もやもや病患者が10-15%に存在すること、一卵性双生児におけるもやもや病発症の一致率が80%と高率であることなどから支持されてきた[18]。2011年に本邦の異なる2つのグループから、もやもや病感受性遺伝子として17q25.3に存在するring finger protein 213 (RNF213)が報告された[19,20]。KamadaらはRNF213の変異(R4810K)が家族性もやもや病患者の95%、孤発性もやもや病の73%に認められ、健常者では1.4%であったと報告した。LiuらはRNF213R4810Kのもやもや病発症の危険率は111.8と報告した。RNF213は591 kDaの細胞質タンパク質をエンコードしており、このタンパク質はATPase活性とユビキチンライゲース活性を有していることが示された。Hitomiらは、変異型RNF213はmitotic arrest deficient 2 (MAD2)と結合し、有糸分裂の異常を引き起こすと報告している[21]。変異型RNF213がどのようにもやもや病の病態に関与しているのかは未だ明らかとなっていないが、もやもや病における遺伝的要因が明らかとなったことにより、動物モデルの作製やinduced pluripotent stem cells（iPS細胞）による病態解析など新たな手法による研究が可能となった。

Yamanakaらによって報告されたiPS細胞は、皮膚線維芽細胞や末梢血単核球などの体細胞にoctamer-binding transcription factor 3/4(Oct3/4)、sex determining region Y-box 2(Sox2)、c-Myc、Kruppel-like factor 4 (Klf4)の4因子を導入することによって作製され、分化多能性を有する[22]。iPS細胞は再生医療のみならず、遺伝的背景を有する疾患の病態解析に有用である。Hitomiらは、RNF213R4810Kを有するもやもや病患者から採取した皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製し、血管内皮細胞へと分化誘導させた研究を報告している[23]。RNF213R4810Kを有する血管内皮細胞ではチューブ形成能が低下していることが明らかとなった。この結果はKimらが報告したEPCの機能異常に類似しており、iPS細胞から作製した血管内皮細胞がもやもや病の病態を反映しうることが示された。また、iPS細胞によって、EPCの研究における課題であった繰り返し多量の内皮細胞を得ることも可能となった。今回の研究では線維芽細胞よりも低侵襲に採取が可能な末梢血単核球からもやもや病特異的iPS細胞を作製し、血管内皮細胞へと分化誘導させ、細胞の基本的機能解析、遺伝子発現とタンパク質発現の網羅的解析を行い、もやもや病血管内皮細胞の特性を解析した。

略語表

APC	allophycocyanin
ALK5	activin receptor-like kinase 5
α-SMA	α-smooth muscle actin
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumin
BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog
bFGF	basic fibroblast growth factor
CALML6	calmodulin like 6
CCK-8	cell counting kit-8
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DDW	double distilled water
DiI-Ac-LDL	1,1'- dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate
DNMT	DNA methyltransferase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EPC	endothelial progenitor cell
ES	embryonic stem
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GDF3	growth differentiation factor-3
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HRP	horseradish peroxidase
HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IL	interleukin
ITGB3	integrin β3
ITGB8	integrin β8
KLF4	kruppel-like factor 4

KSR	knockout serum replacement
MAD2	mitotic arrest deficient 2
MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10
MEF	mouse embryonic fibroblast
MEM	minimum essential medium
MMD	moyamoya disease
MOI	multiplicity of infection
OCT3/4	octamer-binding transcription factor 3/4
OD	opitical densitiy
PBS	phosphate-buffered saline
PE	phycoerythrin
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
REX1	reduced expression protein 1
RNF213	ring finger protein 213
SCID	severe combined immunodeficiency
SeV	sendai virus
SOX2	sex determining region Y -box 2
SSEA-1	stage-specific embryonic antigen-1
TAE	Tris Acetate EDTA
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TE	tris-EDTA
TGF-β	transforming growth factorβ
TRA-1-60	tumor rejection antigen-1-60
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vWF	von Willebrand factor

実験方法

【本研究の倫理面における配慮】

本研究は臨床研究番号012-0317「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」として北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った。また、熊本大学発生医学研究所運営協議会に共同研究申請書を提出し、2015年度の旅費支援課題として採択された。研究は「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に則り行った。本研究で用いられた末梢血単核球の採取に当たっては、主治医より提供者に対して十分な研究計画の説明を行い同意が得られた場合にのみ採血を行った。動物実験に関しては、熊本大学動物実験委員会により開催された平成25年度第3回動物実験実施者及び飼養者に対する教育訓練を受講し、動物実験実施者の資格を得た上で、熊本大学に提出し承認を受けている実験計画書に基づいて実験を行った。「熊本大学動物実験等に関する規則」に則り、熊本大学内の動物実験施設内で行った。

【細胞培養と継代】

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)フィーダー細胞を作製した。マウス胎生13.5日胚から頭部、四肢、内蔵を取り除き、メスで細断した後に0.25% trypsin/EDTAを加えて10分間インキュベートした。次に、10%牛胎児血清(fetal bovine serum、FBS)を添加したDulbecco’s modified eagle medium (DMEM+10%FBS)を加え十分にピペッティングを行い、細胞を単離させた。1:5-1:3の比率で継代を行い、第3継代で、DMEM+10% FBSで10 μg/mlに調整したマイトマイシンC (日本薬局方)で3時間処理を行い、有糸分裂を停止させた細胞を凍結保存した。MEFはiPS細胞を播種する前日に解凍して0.1%ゼラチンでコーティングされたディッシュ上に播種し、フィーダー細胞として用いた。

iPS細胞の培養は、DMEM/F12培地に20% Knock Out Serum Replacement (KSR、 Invitrogen)、2 mM L-Alanyl-L-Glutamine (Wako)、0.1 mM monothioglycerol (Wako)、0.5%の10,000units/mL ペニシリンGおよび10,000 μg/m ストレプトマイシン混合溶液 (Nacalai Tesque)、5 ng/ml

bFGF (Wako)を含んだ培地(iPS細胞培地)を用いた。iPS細胞の剥離には0.1 mg/ml Collagenase type Ⅳ(Invitrogen), 0.25 %(w/v) trypsin (Invitrogen)、20% KSR、10 mM $CaCl_2$で構成されるiPS細胞剥離液を用いた。コンフルエントになったiPS細胞をPhosphate buffered saline (PBS)で洗浄した後にiPS細胞剥離液を加え、37℃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、これをP1000のマイクロピペッターでiPS細胞培地をかけてディッシュから剥がし15 mlのチューブに回収した。その後数回ピペッティングを行い砕いたiPS細胞のコロニーを1：5の比率で継代した。培地の交換は隔日で行った。

iPS細胞由来血管内皮細胞の培養は、Ⅰ型コラーゲンでコーティングされたディッシュ上でHuMedia-EB2培地 (KURABO)に20 ng/ml VEGF (R&D)、25 ng/ml bFGF、10% FBS、0.5%の10,000 units/mLペニシリンGおよび10,000 μg/mlストレプトマイシン混合溶液を添加した培地で行った。

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC、LONZA)の培養は、Humedia-EB2培地にHuMedia-EG増殖添加剤セット(KURABO)を添加した培地を使用した。増殖添加剤セットの構成と、添加材を培地に添加した際の最終濃度は、2% FBS、10 ng/ml hEGF、1.34 μg/ml、50 μg/ml ゲンタマイシン、50 ng/ml アンフォテリシンB、5 ng/ml bFGF、10 μg/mlである。HUVECはコーティングなしのディッシュ上で培養し、培地交換を隔日で行った。

【総RNAの抽出と逆転写反応】

総RNAの抽出はSepasol Super G reagent (Nacalai Tesque)を用いて行った。抽出したtotal RNAからSuperscriptⅢ (Invitrogen)とRandom Primers (Invitrogen) を用いてcDNAを作製した。Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)を用いて、添付のプロトコール通りにPCR反応を行った。使用したプライマーの配列を表1に示す。また、センダイウイルスゲノム配列の検出には表2に示すプライマーを用いてnested PCRを行った。Tris Acetate EDTA (TAE)バッファーで、1.2%アガロースゲルを作製し、エチジウムブロマイドを0.5 μg/mlとなるように添加した。PCR反応液をウェルに注入し、100ボルトで20分間電気泳動を行った。ゲルをImage Quant LAS-4000 mini (GE Healthcare Lifesciences) に入れ、紫外線下にバンドを確認し、写真の撮影を行った。バンドのシグナル値の定量にはMulti Gauge ver3.X (FUJI FILM)を使用した。シグナル値をβ-actinのシグナル値で除することでサンプル間の遺伝子の発現量の比較を行った。

表1 RT-PCRに用いたプライマーの配列

Genes	Sequence (Forward, F; Reverse, R)	Annealing temperature (℃)	Cycle	Product size (bp)
OCT3/4	F: 5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3'	55	33	144
	R: 5'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC-3'			
SOX2	F: 5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG-3'	55	33	151
	R: 5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3'			
KLF4	F: 5'-GATTACGCGGGCTGCGGCAAAACCTACACA-3'	56	35	357
	R: 5'-TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC-3'			
c-MYC	F: 5'-GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC-3'	56	33	328
	R: 5'-TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG-3'			
NANOG	F: 5'-CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC-3'	60	30	391
	R: 5'-CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCACC-3'			
GDF3	F: 5'-CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG-3'	56	35	631
	R: 5'-GTGCCAACCCAGGTCCCGGAAGTT-3'			
REX1	F: 5'-CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT-3'	55	30	306
	R: 5'-GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA-3'			
SALL4	F: 5'-AAACCCCAGCACATCAACTC-3'	58	30	138
	R: 5'-GTCATTCCCTGGGTGGTTC-3'			
DNMT3b	F: 5'-TGCTGCTCACAGGGCCCGATACTTC-3'	55	33	242
	R: 5'-TCCTTTCGAGCTCAGTGCACCACAAAAC-3'			
ACTB	F: 5'-CAACCGCGAGAAGATGAC-3'	60	25	455
	R: 5'-AGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'			
ITGB3	F: 5'-TGTACCACGCGTACTGACAC-3'	55	30	125
	R: 5'-CACTTCTCACAGGTGTCCCC-3'			
ITGB8	F: 5'-CCCGTGACTTTCGTCTTGGA-3'	58	35	123
	R: 5'-GGGGAGGCATGCAGTCTAAA-3'			

表2 センダイウイルスゲノム検出のためのnested PCRに用いたプライマーの配列

	Sequence (Forward, F; Reverse, R)	Annealing temperature (℃)	Cycle	Product size (bp)
First PCR	F: 5'-GGATCACTAGGTGATATCGAGC-3'	58	30	181
	R: 5'-ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC-3'			
Second PCR	F: 5'-TCGAGCCATATGACAGCTCG-3'	58	30	148
	R: 5'-GAGATATGTATCCTTTTAAATTTTCTTGTCTTCTTG-3'			

【細胞の凍結】

MEF、iPS細胞由来内皮細胞は、TrypLE Express (Life Technologies)を用いて細胞を剥離した後に、それぞれの細胞の培地を用いて15 mlのチューブに回収した。1200 rotations per minute (rpm)、25℃で5分間遠心した後に上清を除いて1 mlのバンバンカー (NIPPON Genetics)を加え、クライオチューブに移して-80℃で保存した。

【iPS細胞の樹立と樹立効率の算出】

今回の研究では、健常人のiPS細胞は共同研究施設である熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野にて過去に樹立された細胞を使用した。3人のもやもや病患者の提供者より末梢血を約5ml採取し、Ficoll-Paque (GE Healthcare)を用いて単核球を分離した。分離した単核球を抗CD3抗体(eBioScience)にてコーティングしたディッシュ上でKBM502培地 (Kojin Bio) を用いて培養した。5 × 10^5 の単核球に対し、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* をコードしたセンダイウイルス(熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野より提供)をmultiplicity of infection (MOI) 10で感染させた(1日目)。本センダイウイルスは温度感受性株であり、インキュベータの温度を1℃上昇させて培養することにより感染させた細胞内からウイルスを除去することが可能である。2日目にマイトマイシンC処理されたMEFを、0.1%ゼラチン溶液でコーティングした10 cm ディッシュ上に1 × 10^6/ディッシュとなるように播種した。3日目にセンダイウイルス感染後の単核球を前日に準備したMEF上に2 × 10^4 /ディッシュとなるよう播種し、KBM502培地で培養した。5日目よりKBM502培地をiPS細胞培地に交換し培養した。15-17

日目で十分な大きさのiPS細胞のコロニーが得られるため、典型的なヒトembryonic stem cells (ES)/iPS細胞様の形態を示すコロニーを顕微鏡下にP20のマイクロピペッターで物理的にピックアップし、MEFを播種してある24 ウェルプレートに1ウェルあたり1コロニーで播種した。その後、センダイウイルスを細胞から除くため、培養温度を37℃から38℃へと上げ3日間培養した。その後継代を重ね、実験を行うのに十分なiPS細胞を増殖させた。iPS細胞の誘導効率は、17日目に10 cmディッシュ上のiPS細胞に対して後述のアルカリフォスファターゼ染色を行い、コロニー数を肉眼でカウントし、播種した単核球の細胞数である2×10^4で除して算出した。

【アルカリフォスファターゼ染色と免疫染色】

Leukocyte alkaline phosphatase kit (Sigma)を用いて製品に添付されているプロトコール通りに染色を行った。Citrate Concentrated Solutionを純粋で50倍に希釈した溶液とアセトンとを2:3で混合したFixative Solutionを、iPS細胞を培養しているディッシュに加えて1分間固定した。ディッシュを純水で2回洗浄した後にNaphtohol As-MX Phosphate Alkaline SolutionとDiazonium Solt Solutionを1:24で混合したStaining Solutionを添加し、室温で1時間静置した。

免疫染色は、細胞を培養したディッシュをPBSで一回洗浄した後に4%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。核内因子の染色を行う場合には、0.1% tritonX-100/PBS溶液で10分間の膜透過処理を追加した。1% bovine serum albumin (BSA)/PBS溶液で1時間ブロッキングを行った後に一次抗体を加えた1% BSA/PBS溶液を加え、4℃で一晩静置した。用いた一次抗体と希釈倍率は以下の通りである。抗OCT3/4 (1:500、Santa Cruz)、 抗NANOG (1:1000、R&D)、抗SSEA-4 (1:500、MILLIPORE)、抗TRA-1-60 (1:500、MILLIPORE)、抗CD144 (1:100、clone 55-7H1、BD Pharmingen)、抗von Willebrand factor (vWF、1:100、Clone F8/86、Dako)、 抗CD31 (1:100、1A10、Leica Biosystems)、抗VEGFR2 (1:200、55B11、Cell Signaling Technology)、抗α-smooth muscle actin (α-SMA、1:200、DAKO)。翌日、PBSで3回洗浄し、二次抗体を加えた1% BSA/PBS溶液を加えて1時間25℃で静置した。二次抗体にはAlexa Fluor 488標識抗マウスIgG (Life Technologies)、Alexa Fluor 488標識抗ヤギIgG (Life Technologies)もしくはAlexa Fluor 594標識抗ウサギIgG (Life Technologies)を用いた。核の染色を行う際には、300 nMに調整した4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI、Sigma) / PBS溶液で5分間細胞を処理した。また、血管内皮細胞の

リポタンパク質取り込みアッセイには、1,1'- dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI-Ac-LDL、Invitrogen)を10 μg/mlとなるよう培地中に混ぜ、4時間培養した後に細胞を固定して観察した。蛍光顕微鏡はオリンパスBX61を使用した。Alexa 488の観察には励起フィルタはBP470-490、吸収フィルタはBA510-550を使用し、Alexa 594、DiI-Ac-LDLの観察には励起フィルタはBP520-550、吸収フィルタはBA590を使用し、DAPIの観察には励起フィルタにBP360-370、吸収フィルタにBA420-460を使用した。

【ゲノムDNAの抽出】

1×10^6の単核球に100 μLのリシスバッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM EDTA、10 mM NaCl、1 mg/mL proteinase K (sigma)、0.5% SDS)を加え、55℃で2時間処理した。次いで200 μLの氷冷した75 mM NaCl/エタノール溶液を加え、12,000 rpm、25℃で5分間遠心した。上清を除き、1 mLの70% エタノールを加えた後に再度12,000 rpm、25℃で5分間遠心を行った。マイクロピペッターで上清を慎重に除いたのちに１分間ほど風乾させた。50 μLのTris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0)を加え、得られたDNAを溶解した。

【DNAシークエンシング(サンガー法)】

RNF213におけるR4810K変異の有無を調べるため、ダイレクトシークエンシングを行った。単核球から抽出したDNA溶液をテンプレートとし、RNF213のR4810を含む領域をPCRにてクローニングした。使用したプライマーの配列は、フォワードプライマー：CAAGCTCCACGCTGCATCAC、リバースプライマー：CACCCTGTTCCCCTATGCAGで、アニーリング温度60℃で30サイクルのPCR反応を行った。作製したPCR産物を1%アガロースXPゲル (NIPPON GENE)で電気泳動し、356 bpに存在するバンドを切り出した。切り出したゲルからQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて添付のマニュアル通りにPCR産物を抽出した。抽出したPCR産物を 0.5 μLをテンプレートとして、RNF213のフォワードもしくはリバースのprimerをそれぞれ1.6 pmol、4 μLのBig Dye Terminator cycle sequencing kit (Life Technologies)を混和し、蒸留水で総量を10 μLとした。プライマーはクローニングに使用したものと同じ配列を用いた。これをサーマルサイクラーにセットし96℃　1分間、(96℃―10秒、50℃―5秒、60℃―240秒)×25サイクルでシーケンス反応を行った。反応液10 μLに1.5 M 酢酸ナトリウム/62.5 mM EDTA 溶液2

μLを加え混和した後に、100%エタノールを25 μL加え、25℃で15分間暗所に静置した。その後15,000 rpm、25℃で20分間遠心した。上清を除き、70%エタノールを25 μL加え、25℃で5分間遠心した。上清を除き、暗所で1分間風乾させた。その後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems)を10 μL加え、95℃で5分加熱し、氷冷後にABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で解析を行った。得られたデータをbiological sequence alignment editor (BioEdit、Ibis Biosciences)で読み込み、配列の確認を行った。

【フローサイトメトリー】

フローサイトメトリーにはfluorescence-activated cell sorter (FACS) AriaⅢ (BD Biosciences)もしくはAttune Flow Cytometer (Life technologies)を用いた。細胞のソーティングにはFACS AriaⅢを用いた。TrypLE Express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。血球計算板を用いて細胞数を計測した後に、1,200 rpmで5分間遠心した。上清を除き100 μL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当たりの抗体の使用量は以下の通り。Phycoerythrin (PE)標識抗vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2、R&D、1 μL/細胞数1×10^6)、Allophycocyanin (APC)標識抗CD144 (eBioscience、1 μL/細胞数1×10^6)、Fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗CD31抗体 (BD Biosciences、1 μL/細胞数1×10^6)。Platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRα)の検出にはビオチン標識抗PDGFRα (BioLegend、1 μL/細胞数1×10^6)を一次抗体として反応させ、細胞を洗浄した後にStreptavidin-APC抗体 (eBioscience)を4℃で20分間反応させ、細胞を2回洗浄した。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。また、死細胞を除去するために、7-Amino-Actinomycin D (7AAD、Beckman Coulter)を細胞数5×10^5あたり20 μL加えた。APC標識抗CD144に対するisotype controlとしてMouse IgG1 K Isotype Control APC (eBioscience、1 μL/細胞数1×10^6)を用いた。FACS AriaⅢの使用において、PEの測定には488 nmレーザーおよび585/42 nm フィルタ、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2,000を超えないよう必要に応じて細胞濃度を希釈した。また、FITC

とPEを同時に解析する場合にはコンペンセーションを行った。Attune Flow Cytometerの使用において、APCの測定には638 nmレーザーおよび660/20 nmフィルタ、7AADの測定には488 nmレーザーおよび640 nmのロングパスフィルタを使用した。

【iPS細胞の内皮細胞への分化誘導】

1. iPS細胞から側板中胚葉細胞へおよび、側板中胚葉から内皮細胞への分化誘導

まず過去の報告を参考にiPS細胞から心血管系の前駆細胞の発生母地となる側板中胚葉細胞（VEGFR2陽性、PDGFRα陰性）を分化誘導することを試みた[24]。10 cmディッシュにコンフルエントとなったiPS細胞をディッシュからiPS細胞剥離液を用いて剥がし、MEFを除くために0.1%ゼラチンでコーティングした10 cmディッシュに移し、iPS細胞培地で37℃、5% CO_2で1時間培養した。MEFがディッシュの底面に接着したことを確認したら、浮遊しているiPS細胞のコロニーのみを15 mlチューブに回収し、500 rpm、25℃で3分間遠心した。上清を除き、DMEM/F12培地に20% KSR、 2 mM L-Alanyl-L-Glutamine、0.1 mM monothioglycerol、0.5% penicillin and streptomycin、10 ng/mL bone morphogenetic protein (BMP)4 (R&D)を含んだ培地で細胞を懸濁した。細胞懸濁液をペトリディッシュに移し、24時間培養し、胚葉体を形成させた。次いで、細胞を15 mlチューブに回収し、500 rpm、25℃で3分間遠心した。上清を除き、α-Modified Eagle Minimum Essential Medium (αMEM)に5 ng/ml bFGF、0.1 mM monothioglycerol、10% FBS、10 ng/ml BMP4、3 ng/ml Acticvin A(R&D)を添加した培地で細胞を懸濁した。細胞懸濁液を10 cmのⅣ型コラーゲンコートディッシュに移し、37℃、5% CO2で培養を開始した（1日目）。3日目、5日目で培地交換を行った。6日目にFACS AriaⅢを用いてVEGFR2陽性PDGFRα陰性の細胞分画をソーティングした。ソーティング後の細胞の培養は、αMEMにVEGF 50 ng/mlおよび10% FBSを添加した培地で、Ⅰ型コラーゲンコートディッシュ上で行った。

2. 無血清培地による内皮細胞の分化誘導―embryoid bodyを形成する方法―

Yangらの報告を参考に分化誘導を行った[25]。10 cmディッシュにコンフルエントとなったiPS細胞をiPS細胞剥離液を用いて剥がし、0.1% ゼラチンでコーティングしたディッシュでMEFの除去を行った。細胞を回収、遠心後に

StemPro-34 (Life Technologies) に 2 mM L-Alanyl-L-Glutamine、50 ng/ml BMP4を添加した培地で細胞を懸濁し、10 cmのUltra Low Attachment Dish (Corning)上に播種した(0日)。24時間培養した後(1日)に浮遊している胚葉体を全て15 mlチューブに回収し、500 rpm、25℃で3分間遠心を行い上清を除き、さらに5 mlのPBSを入れて500 rpm、25℃で3分間遠心した。上清を除き、StemPro-34に10 ng/ml BMP4、5 ng/ml bFGF、3 ng/ml Activin A、2 mM L-Alanyl-L-Glutamine添加した培地で懸濁し、再度Ultra Low Attachment Dishに戻した。4日目に胚葉体を回収し、PBSで洗浄した後に、StemPro-34に10 ng/ml VEGFと10 ng/ml bFGFを添加した培地に変更した。8日目でフローサイトメトリーによってCD31、CD144、VEGFR2、PEGFRαの発現の解析を行った。

3. 無血清培地による内皮細胞の分化誘導―monolayerによる分化方法―

Wangらの報告を参考に分化誘導を行った[26]。10 cmディッシュにコンフルエントとなったiPS細胞をディッシュからiPS細胞剥離液を用いて剥がし、0.1%ゼラチンでコーティングされたディッシュ上でMEFの除去を行った。DMEM/F12培地で30倍に希釈したMatrigel (Corning)でコーティングされた6 cmディッシュにiPS細胞の懸濁液を移し、37℃ 5% CO_2で培養を開始した(0日目)。1日目にディッシュをPBSで一回洗浄した後に培地をStemPro-34に50 ng/ml bFGF、40 ng/ml VEGFを添加したものに変更した。3日目に培地をStemPro-34に50 ng/ml bFGF、40 ng/ml VEGF、20 μM SB431542 (Sigma)を添加したものに変更した。SB431542はTGF-β1型受容体activin receptor-like kinase 5 (ALK5)の阻害薬であり、内皮細胞への分化を促進する。6日目にTrypLE expressで細胞を剥離し、FACS AriaⅢでCD144陽性CD31陽性の分画をソーティングした。ソーティング後の細胞をHuMedia-KB2に10% FBS、25 ng/ml bFGF、20 ng/ml VEGFを添加した培地で培養した。

【Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 細胞増殖アッセイ】

内皮細胞の増殖力をCCK-8 (Dojindo)を用いて解析した。内皮細胞がサブコンフルエントとなった状態で、培地を血清と増殖因子を含まないHuMedia-EB2に変更し一晩培養した。翌日、TrypLE Expressを用いて細胞を剥離し、15 ml チューブに回収した後に1,200 rpm、25℃で5分間遠心し、上清を除いた。5,000個/100 μLとなるようにHuMedia-KB2で細胞を懸濁し、VEGF、bFGF、TGF-β、もしくはBMP4を50 ng/mlになるように添加した。細胞懸濁液を96ウェルプレートに5,000個/ウェルで播種した。細胞を

播種して30分で10 μLのCCK-8を加えて37℃で2時間培養し、マイクロプレートリーダー(TECAN)で450 nmの吸光度を測定し、この値を基準値とした。72時間後、10 μLのCCK-8を残りのウェルに加え、450 nmの吸光度を測定した。基準値と72時間後の吸光度を比較することで細胞の増殖力を測定した。

【チューブ形成アッセイ】

サブコンフルエントとなったiPS細胞由来内皮細胞もしくはHUVECの培地をVEGF、bFGFおよびFBSを含まないHuMedia-KB2に変え一晩培養した。翌日、TrypLE Expressを用いて細胞を剥離し、15 ml チューブに回収した後に1,200rpm、25℃で5分間遠心し、上清を除いた。5,000個/100 μLとなるようにHuMedia-KB2で細胞を懸濁し、VEGF、bFGF、TGF-β、もしくはBMP4を50 ng/mlになるように添加した。96ウェルプレートに1ウェルあたり36 μLのGeltrex (Life Technologies)を加え、30分間37℃で培養した。細胞懸濁液を5,000個/ウェルとなるようにGeltrexでコーティングされた96ウェルプレートに加え、37℃で培養した。12時間後、オリンパスの倒立顕微鏡IX71を用いて4倍の対物レンズで内皮細胞によるチューブ形成を観察し、1280×1024ピクセルで写真を撮影した。画像データをImageJ software (National Institutes of Health ; http://rsb.info.nih.gov/ij/)に取り込み、プラグインツールであるAngiogenesis Analyzeを用いて解析を行った。Analyze HUVEC Phase Contrast機能を選択することで、撮影したチューブ形成の画像から自動的にチューブの部分が検出され、総チューブ長がピクセル単位のデータで得られた。さらに、チューブ形成を撮影した時と同じ倍率、画像の大きさで顕微鏡用対物マイクロメーターを撮影することで、総チューブ長をピクセルからミリメートルへと変換し、データ解析に用いた。

【奇形腫の形成】

6 cmディッシュ上でコンフルエントとなったiPS細胞を剥離し、15 ml チューブに回収し、500 rpm, 25℃で3分間遠心した。上清を除き、iPS細胞培地を1 ml加えて懸濁し、100 μLの細胞懸濁液をとり、0.25%トリプシンを100 μL加え、25℃で1分間インキュベートした。細胞数を数え2×10^6 個/100 μLとなるように調整し、400 μL用意した。1 mM Y27632 (Wako)を6 μLと、Matrigel 200 μLを細胞懸濁液400μLと混和した。Y-27632はRho結合キナーゼ阻害薬であり、シングルセルとなったiPS細胞の細胞死を抑制す

る。作製した細胞懸濁液をsevere combined immunodeficiency (SCID)マウスの両方の精巣に片方20 μLずつ注入した。約8週間後に頚椎脱臼によりマウスを安楽死させ、奇形腫を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、常法に基づき組織切片を作製してヘマトキシリンエオジン染色を行い顕微鏡下に観察した。

【核型解析】

iPS細胞のG-band解析は日本遺伝子研究所への外注で行った。T25フラスコ上にiPS細胞を培養し、フラスコ内をiPS細胞培地で満たした状態で常温にて日本遺伝子研究所へと郵送し解析を依頼した。

【DNAマイクロアレイ】

DNA マイクロアレイは株式会社バイオマトリックス研究所に外注した。iPS細胞由来血管内皮細胞からRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて総RNAを抽出し、-80℃で凍結したサンプルを、ドライアイス中で凍結したままバイオマトリックス研究所に郵送した。Human Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix)を使用し、GeneSpring GX10 vendorにてデータ解析されたエクセルデータを用いた。教師なし学習クラスタリングは以下の手順で行った。まず、遺伝子シンボルを有していないプローブを除外し、次いで6サンプルの標準偏差が0.5以上のプローブのみを抽出し、最後にシグナル値が0を下回るものを除外した。残ったプローブに対してユークリッド距離を用いて階層的クラスタリングを行った。KEGGパスウェイ解析は、DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)のFunctional annotationツールに、コントロールともやもや病とで遺伝子の発現の差が3倍以上あり、p 値(ウェルチのt検定)が0.01以下である遺伝子IDのリストを読み込ませて解析した。抽出されたパスウェイのうち、p 値(EASE Score)が0.05以下であるものを有意に濃縮されているパスウェイとした。

【ウエスタンブロッティング】

iPS細胞由来血管内皮からMinute Protein Extraction Kit (Invent Biotechnologies)を用いて、製品に添付されたマニュアル通りにタンパク質を抽出した。Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)を用いて作製したBSAの標準曲線を用いて抽出したタンパク質濃度を測定した。10 μgのタンパク質を総量が20 μLとなるようにNuPAGE LDS Sample Buffer (4×、Thermo Scientific)、NuPAGE Sample Reducing Agent (10×、

Thermo Scientific)、DWと混和し、ヒートブロック上にて70℃で10分間加熱した。20 μLの調整液をNuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel (Life Technologies)のウェルに注入し、XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen)を用いて200ボルトで35分間電気泳動した。電気泳動後のゲルをiBlot Gel transfer Stacks (Life Technologies)のニトロセルロースに重ね、iBlot Dry Blotting System (Invitrogen)を用いて7分間転写させた。ニトロセルロース膜を2% BSA/PBS溶液に浸して25℃で30分間ブロッキングした後に、Tris Buffered Saline with 0.1% Tween 20 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate、TBS-T)にて10分間×3回の洗浄を行った。その後Can Get Signal Solution-1 (TOYOBO)に混和した一次抗体を4℃で16時間反応させた。使用した一次抗体と希釈倍率は以下の通り。抗integrin β3 (ウサギ、1:1000、Cell Signaling Technology) and 抗α-tubulin (ウサギ、1:2000、Cell Signaling Technology).翌日TBS-Tにて10分間×3回の洗浄を行った後に、Can Get Signal Solution-2 (TOYOBO)に溶解したHorseradish Peroxidase (HRP)標識抗ウサギ二次抗体(1:2000, Cell Signaling Technology)を25℃で1時間反応させた。その後TBS-Tで10分間×3回の洗浄を行い、ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Lifesciences)をニトロセルロース膜上に滴下し、Image Quant LAS-4000 miniにて撮影を行った。バンドのシグナル値の定量にはMulti Gauge ver3.Xを使用した。Integrin β3のシグナル値をα-tubulinのシグナル値で除することでサンプル間の比較定量を行った。

【プロテオミクス】

プロテオミクスは東和環境科学株式会社に外注した。10 cmディッシュにコンフルエントとなった内皮細胞をPBSで2回洗浄し、東和環境科学より提供されたlysis buffer (5 M urea, 2 M thiourea、2% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS)、2% SB3-10、1% dithiothreitol (DTT)を加えタンパク質を溶出させた。セルライセートをマイクロチューブに回収し、20,000 rpm 25℃で30分間遠心した後に上清を回収し、-20℃で保存した。凍結した状態で東和環境科学株式会社へ郵送した。同社に、タンパク質の二次元電気泳動、スポットの検出とそれぞれのシグナル値の測定、統計学的解析、タンデム質量分析によるタンパク質の同定を依頼した。

【統計学的処理】

データは平均値±標準偏差で示した。コントロール群ともやもや病群間の平均値の差は、F検定を行い等分散($p > 0.05$)の場合はStudent's t 検定を用い、異分散($p < 0.05$)の場合はウェルチのt 検定を用いて統計学的解析を行った。t 検定の結果、$p < 0.05$を統計学的有意差ありと判定した。

実験結果

【末梢血単核球からのiPS細胞の樹立】

十分なインフォームドコンセントの後、3人のもやもや病患者(MMD1：39歳男性、MMD2：48歳女性、MMD3：36歳女性)から採血を行った。分離した末梢血単核球を抗CD3抗体でコーティングされたウェル上で5日間培養することで良好な細胞の増殖が得られた(図1)。これを5×10^6個とりMOI 10で*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*をコードしたセンダイウイルスを感染させた。翌日にMEFを播種した10 cmディッシュに2×10^4個/ディッシュとなるように播種した。培養15-17日程で、iPS細胞のコロニーが確認できたため(図2)、物理的にコロニーのピックアップを行った。最初は24ウェルプレートの1ウェルあたり1コロニーで培養し、継代を繰り返しながら規模を拡大した。17日目でのそれぞれの提供者由来iPS細胞の誘導効率を計算したところ、MMD1：1.5%、 MMD2：6.1%、 MMD3：7.1%であった(図3)。

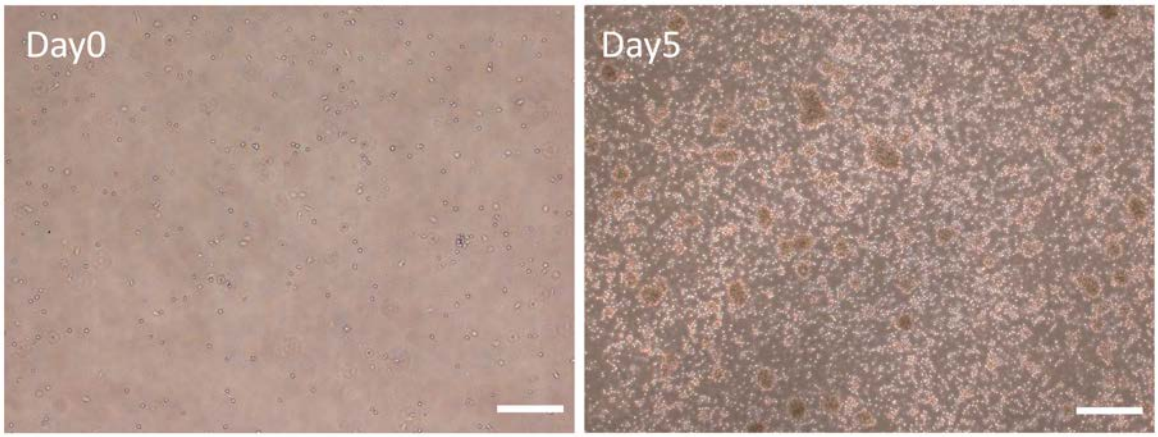


図1　抗CD3抗体によって刺激を行った末梢血単核球の明視野像
　左：刺激開始時の末梢血単核球。右：5日間刺激を行った末梢血単核球。スケールバー：500 μm

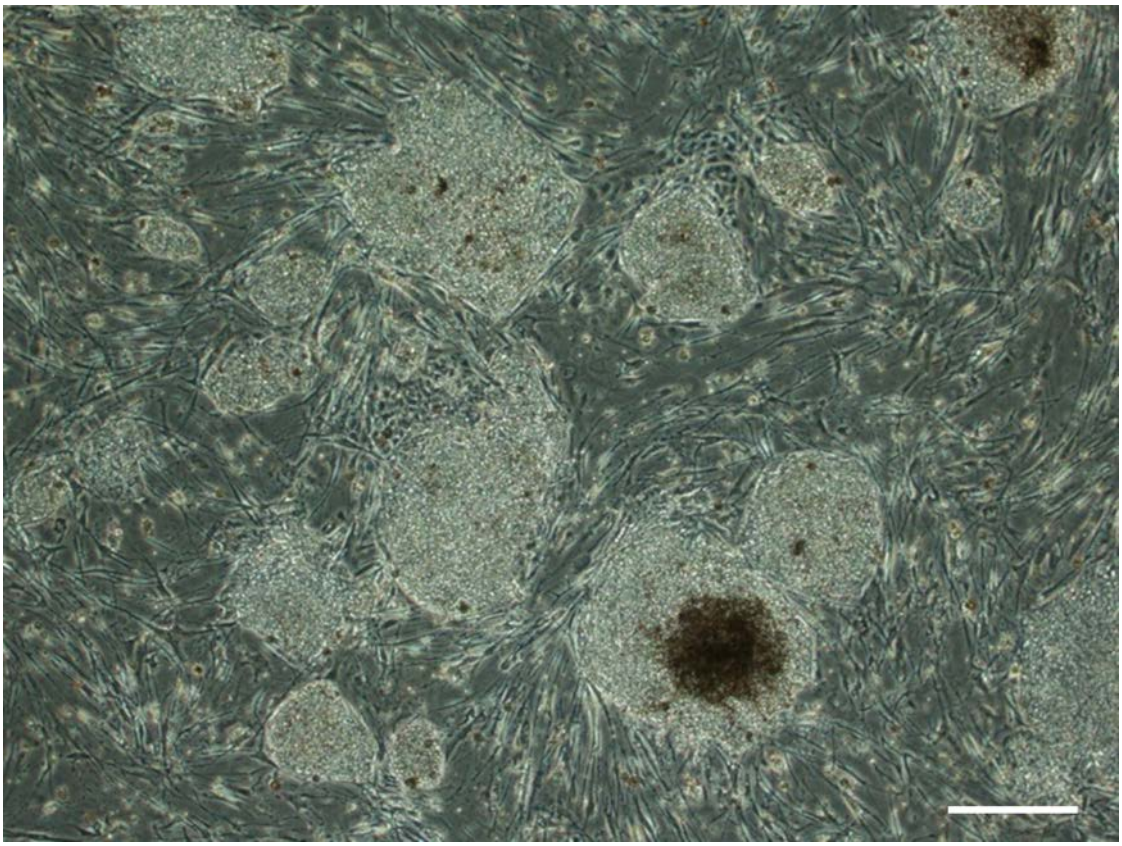


図2 iPS細胞のコロニーの明視野像

OCT3/4、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*を導入して15-17日程で観察されるiPS細胞のコロニーを顕微鏡下に撮影した。スケールバー： 500 μm

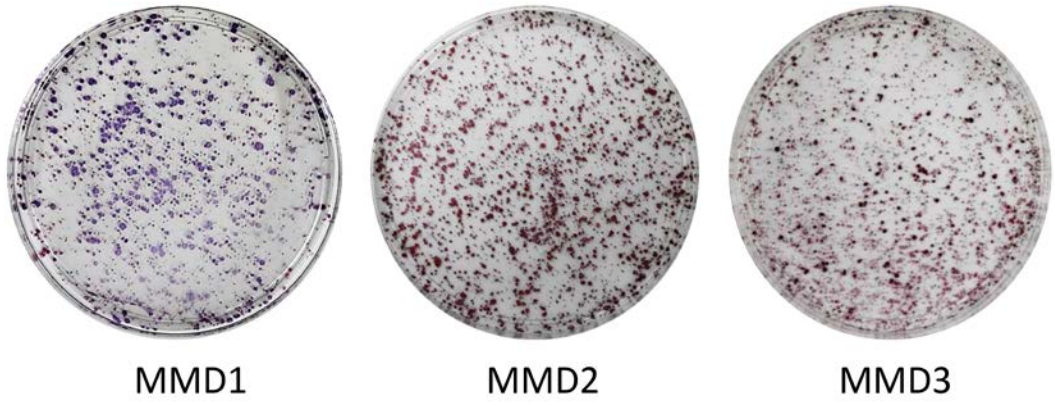


図3 末梢血単核球から発生したiPS細胞のアルカリフォスファターゼ染色

OCT3/4、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*を導入して17日目で10 cm ディッシュ上のiPS細胞に対してアルカリフォスファターゼ染色を行い、ディッシュ全体の写真を撮影した。肉眼的にiPS細胞のコロニー数のカウントを行い、播種した末梢血単核球の数(2×10^4 個/10 cm ディッシュ)でコロニー数を除しiPS細胞の誘導効率を計算した。

【RNF213のダイレクトシークエンシング】

コントロールiPS細胞およびもやもや病患者の末梢血単核球から抽出したDNAからRNF213R4810を含む領域をクローニングし、塩基配列の解析を行った。フォワードプライマーおよびリバースプライマーから得られた塩基配列をBioEditで確認した。サンプルによっては、フォワードプライマーから得られた塩基配列がノイズの混入のため確認困難な場合があったが、リバースプライマーから得られた配列からは全サンプルにおいて塩基配列の確認ができた。リバースプライマーから得られた全サンプルの塩基配列を図4に示す。コントロールでは全員がTCTで一塩基多型（single nucleotide polymorphism、SNP)を認めず、もやもや病患者では全員がTTTのヘテロタイプのSNPを有していた。(図4)

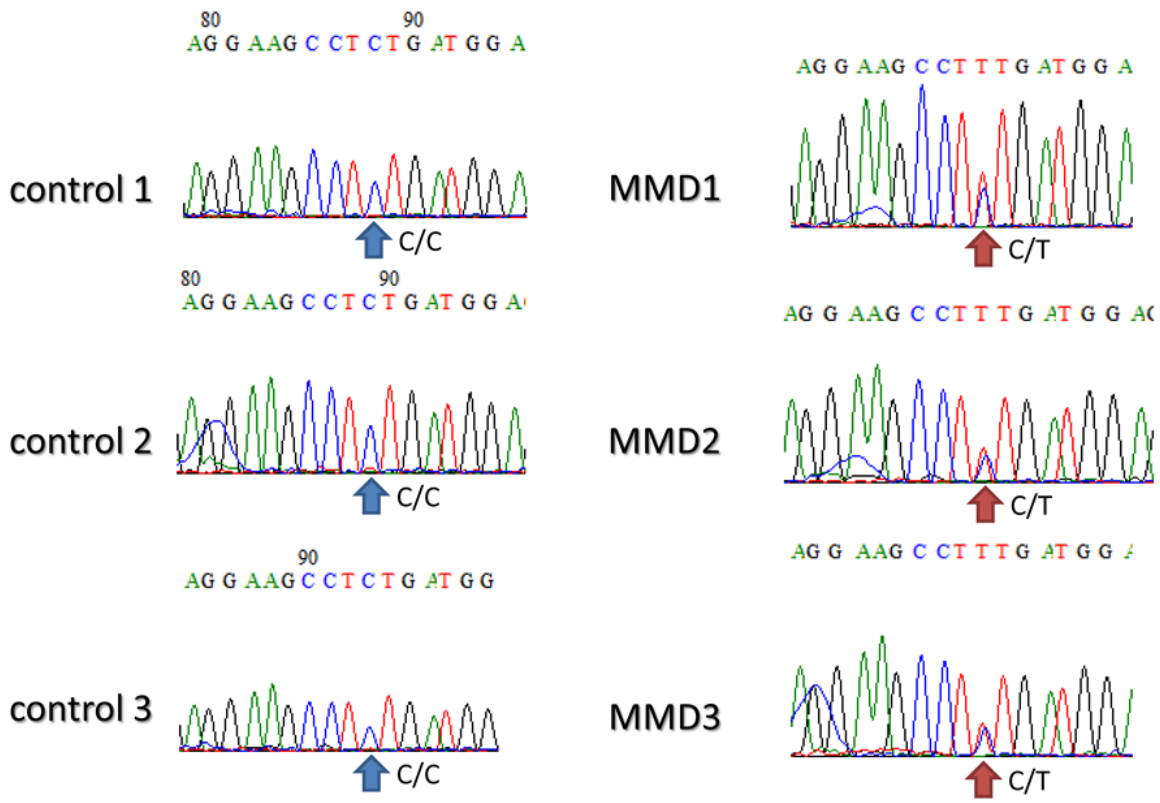


図4 RNF213のダイレクトシークエンシング

コントロールiPS細胞および、もやもや病患者末梢血単核球から抽出したDNAを用いてRNF213のR4810を含む領域のダイレクトシークエンシングを行った。リバースプライマーから得られた塩基配列を示す。

【iPS細胞の特性解析】
作製したiPS細胞の未分化マーカーの発現の確認のため、免疫染色とRT-PCRを行った。もやもや病患者から樹立したiPS細胞は、未分化ヒトES/iPS細胞のマーカーである*OCT3/4*、*NANOG*、stage-specific embryonic antigen-1 (*SSEA-1*)、tumor rejection antigen-1-60 (*TRA-1-60*)をコントロールiPS細胞と同様に発現していた。また、同様に未分化ヒトES/iPS細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼの活性を示すことも確認できた。また、RT-PCRにおいて、*OCT3/4*、*KLF4*、*SAL4F*、*NANOG*、Growth differentiation factor-3 (*GDF3*)、 DNA methyltransferase 3b (*DNMT3b*)、Reduced expression protein 1 (*REX1*)、*SOX2*、*c-MYC*を発現していることを確認した。また、nested PCRにより樹立したiPS細胞からセンダイウイルスが除かれていることを確認した。

【iPS細胞の核型解析】
ES細胞やiPS細胞は培養の過程において稀に染色体異常が発生することが知られている。本研究で作製したiPS細胞の核型異常の有無をG-band検査にて検証した。樹立したもやもや病特異的iPS細胞はいずれも正常な核型を示していた。

【奇形腫作製によるiPS細胞の多分化能の検証】
樹立したiPS細胞のin vivoでの多分化能を確認するため、SCIDマウスの精巣内にiPS細胞を注入し、約8週間後に得られた奇形腫の切片を作製し観察した。いずれのもやもや病特異的iPS細胞においても、3胚葉への分化能を有していることが確認できた。

【iPS細胞からの血管内皮細胞の分化誘導】
心血管系の前駆細胞はヒトの発生の過程においては側板中胚葉から発生し、VEGFR2陽性、PDGFRα陰性であることが報告されている[24]。そこで、iPS細胞から中胚葉への分化誘導を行い、表面マーカーがVEGFR2陽性、PDGFRα陰性の細胞をFACSでソーティングしVEGF添加培地で培養することで最終的に内皮細胞へと分化させることを試みた。胚葉体を形成した後に、Ⅳ型コラーゲンコートディッシュ上でαMEMに10% FBS、BMP4、Activin A、bFGFを添加した培地で培養を開始した。6日目になると多数の分化した細胞が認められた(図5)。フローサイトメトリーによる解析では、コントロールiPSではVEGFR2陽性、PDGFRα陰性分画、VEGFR2陽性分画、PDGFRα陽性分画、

VEGFR2陰性、PDGFRα陽性分画に十分な細胞が認められ、良好に中胚葉系の細胞への分化が起こっていることが示唆された。対して、もやもや病iPS細胞ではVEGFR2陽性、PDGFRα陰性分画以外の細胞の割合が少なく、十分な分化が得られていないと思われた(図6)。これがもやもや病iPS細胞に特異的なものなのか、偶然の結果であったのか十分な検証は行っていない。ひとまずコントロールiPS細胞におけるVEGFR2陽性、PDGFRα陰性細胞をソーティングし、内皮細胞への分化誘導が可能かどうかを検証した。ソーティングした VEGFR2陽性、PDGFRα陰性細胞をⅠ型コラーゲンコートプレート上で、αMEMに10% FBSと50 ng/ml VEGFを添加した培地で培養した。培養を続けたところ、紡錘形の細胞が増殖し、内皮細胞に典型的な敷石状の形態は認められなかった(図7)。免疫染色を行ったところ、血管内皮細胞のマーカーであるCD31、CD144は陰性で、平滑筋のマーカーであるα-SMAが陽性であった(図8)。この結果から、大部分が内皮細胞ではなく平滑筋細胞へと分化したと考えられた。Yamashitaらは、マウスES細胞から分化したVEGFR2陽性細胞を、血清を入れた培地で培養すると大部分が平滑筋細胞となり、一方、無血清培地でVEGFを添加して培養すると多くの細胞が内皮細胞に分化することを報告している[27]。本実験では、ソーティング後のVEGFR2陽性細胞を、FBSを含んだ培地で培養したことにより、結果的に平滑筋への分化を促していたものと考えられた。iPS細胞から内皮細胞へと分化誘導を行う次の方法として、ソーティング後のVEGFR2陽性、PDGFRα陰性細胞を、VEGFを添加した無血清培地で培養する手法が考えられた。しかし、Yamashitaらの報告において、VEGF添加無血清培地で培養することで大部分のVEGFR2陽性細胞が血管内皮細胞へと分化することが述べられている一方、内皮細胞の中に血管平滑筋細胞へと分化した細胞が混入することも示されていた。そのため、VEGFR2陽性細胞をソーティングし血管内皮細胞へと分化誘導する手法では、高純度の血管内皮細胞を得ることは困難であると判断し、新たな内皮細胞への分化誘導法を模索することとした。

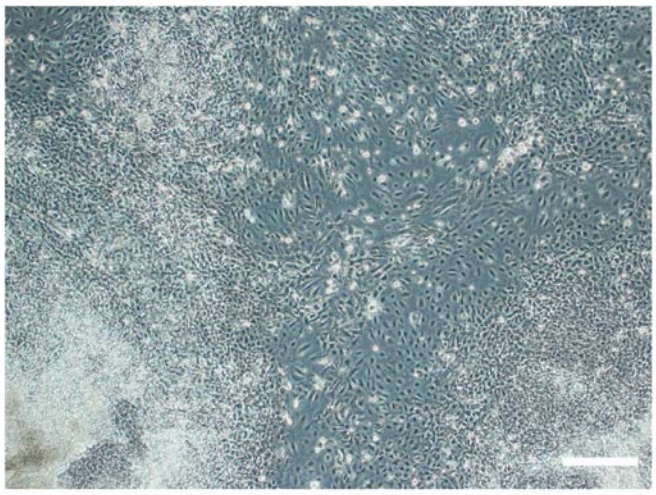


図5 iPS細胞から中胚葉細胞への分化誘導

iPS細胞に対し中胚葉への分化誘導を開始し、6日目の顕微鏡写真を示した。スケールバー：500 μm

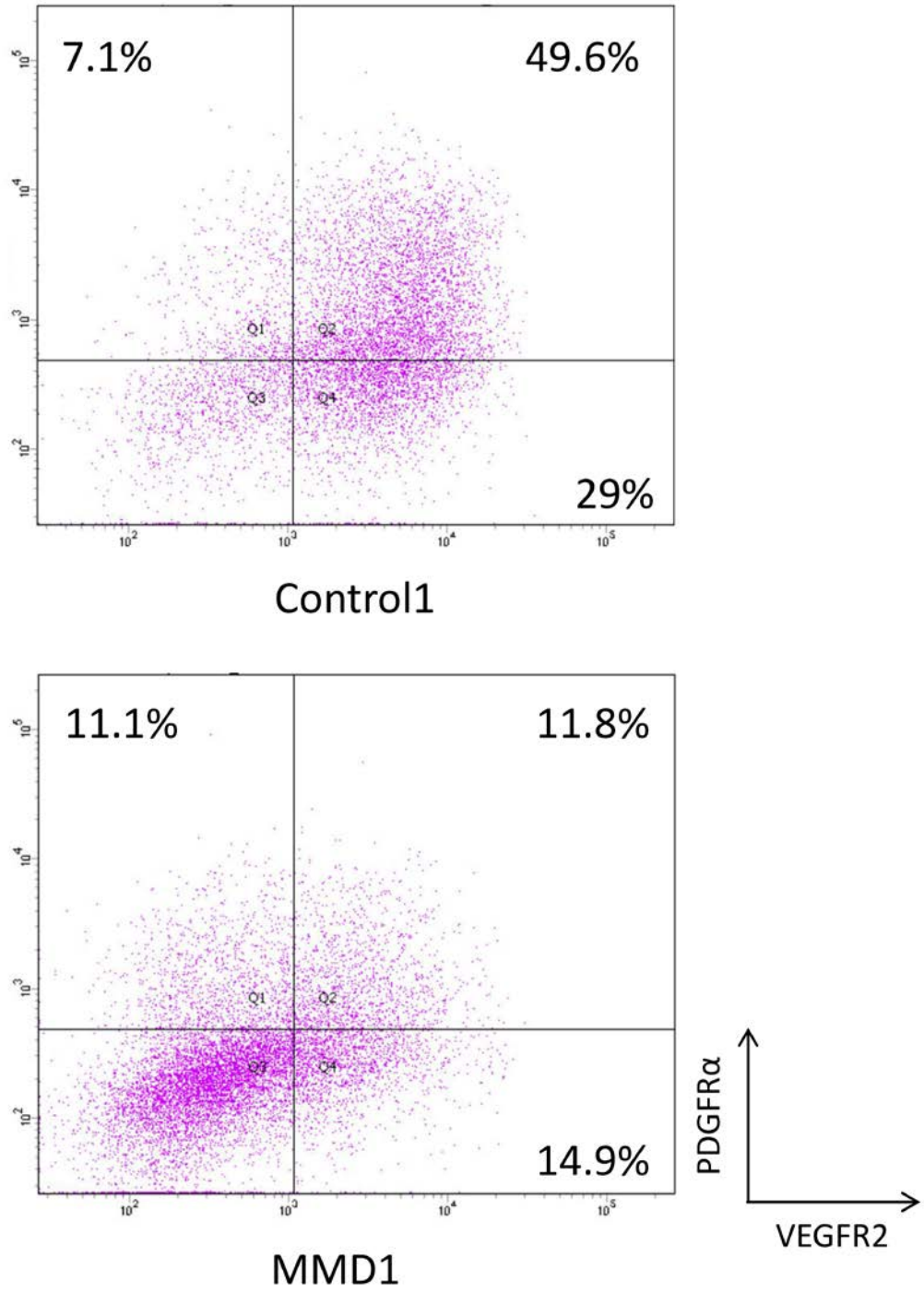


図6 分化誘導6日目のVEGFR2とPDGFRαの発現解析

分化誘導6日目にフローサイトメトリー（FACS AriaⅢ）にて中胚葉のマーカーであるVEGFR2とPDGFRαの発現を解析した。上側にコントロールiPS細胞、下側にもやもや病iPS細胞の結果を示した。横軸はVEGFR2、縦軸はPDGFRαで、各分画に存在する細胞の割合を図内に示した。Q1：VEGFR2陰性、PDGFRα陽性、Q2：VEGFR2陽性、PDGFRα陽性、Q3：VEGFR2陰性、PDGFRα陰性、Q4：VEGFR2陽性、PDGFRα陰性

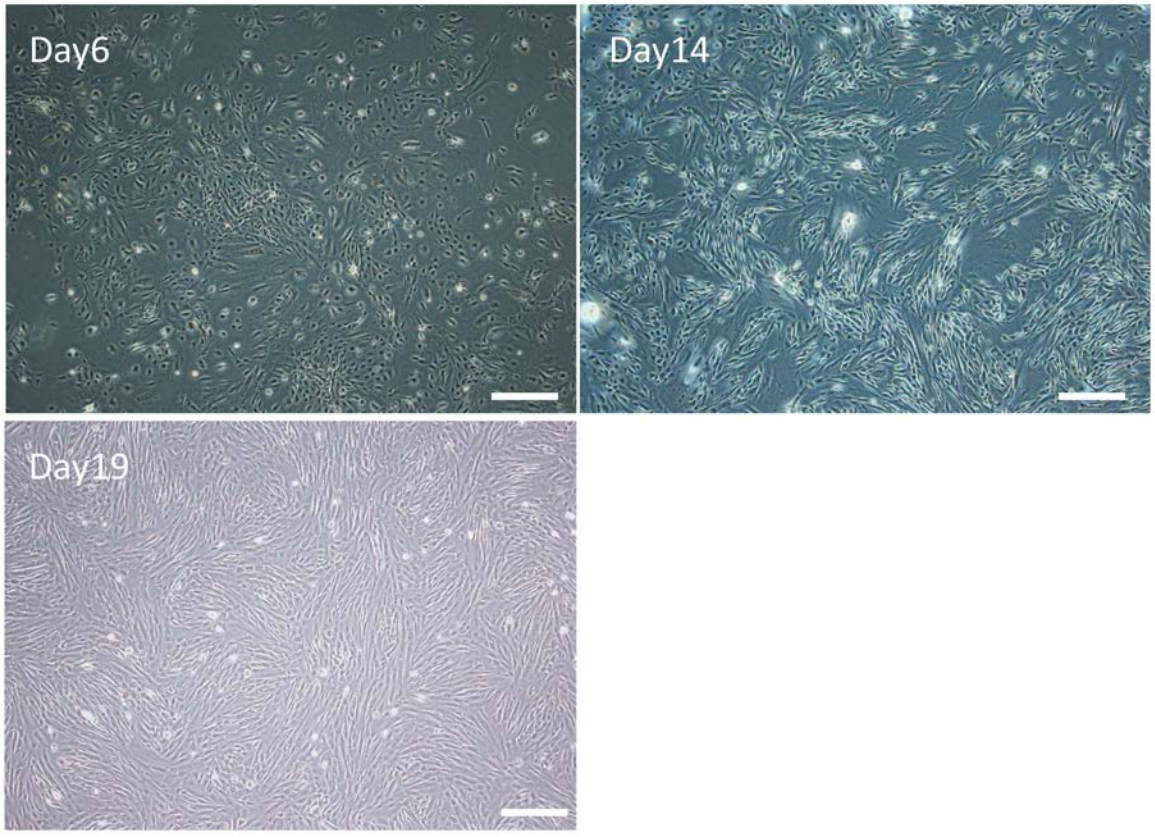


図7 ソーティングしたVEGFR2陽性、PDGFRα陰性分画の細胞の培養

コントロールiPS細胞を分化誘導させ、ソーティングして得られたVEGFR2陽性、PDGFRα陰性細胞をFBSとVEGFを添加した培地で培養した。左上：培養6日目(Day6)。右上：培養14日目(Day14)左下：培養19日目(Day19) スケールバー：500 μm

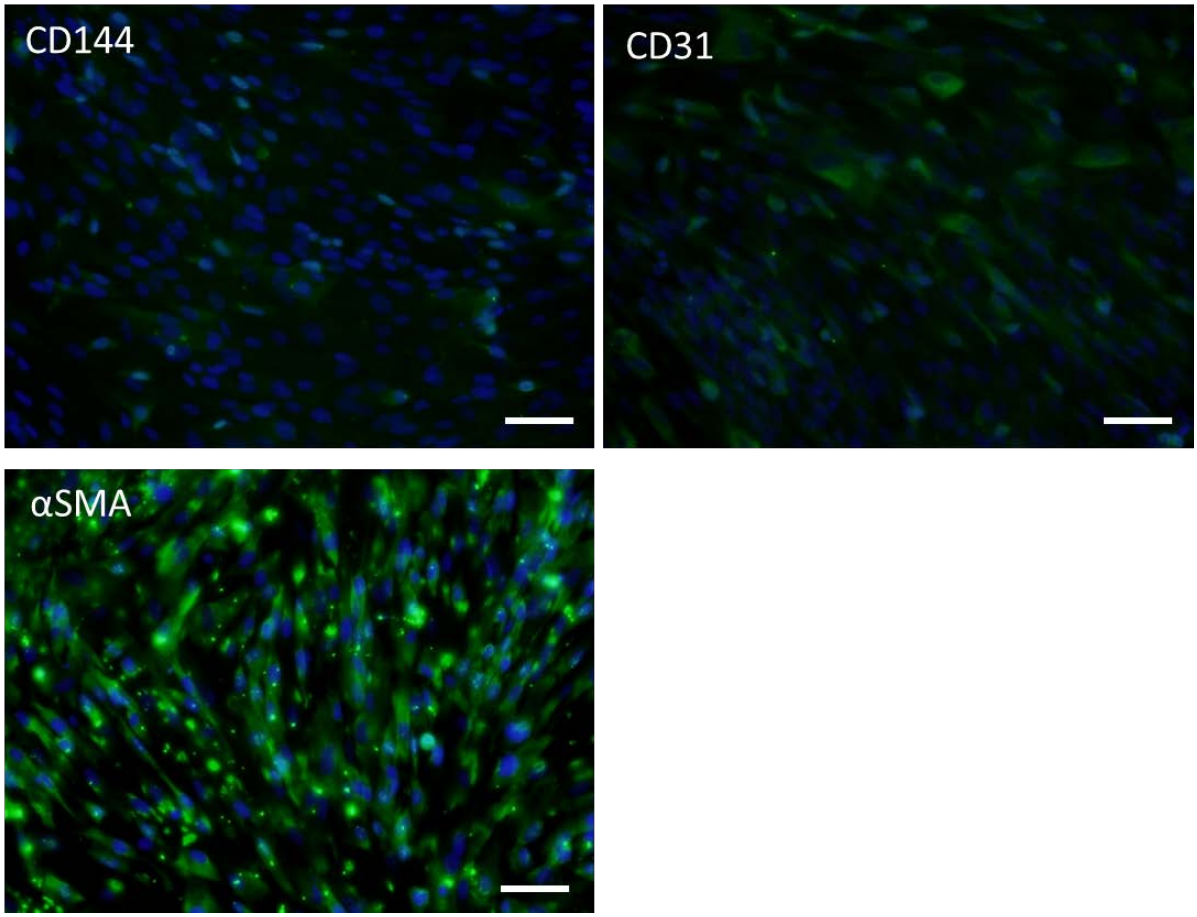


図8 培養後のVEGFR2陽性PDGFRα陰性細胞の免疫染色

ソーティングしたVEGFR2陽性、PDGFRα陰性細胞をFBSおよびVEGF添加培地で培養した後に、CD144(左上)、CD31(右上)α-SMA(左下)の免疫染色を行った。

新たな分化誘導法を検討するうえで、心血管系前駆細胞をソーティングして内皮細胞に分化誘導する方法ではなく、内皮細胞まで分化誘導を行い、内皮細胞をソーティングする方が望ましいと考えられた。Yangらの報告を参考に、新たな内皮細胞への分化誘導を試みた[25]。本方法は、iPS細胞からの分化誘導開始時から無血清培地での培養を行う点、単層の培養ではなく、胚葉体で最後まで培養を行う点で以前の方法と異なっている。最初の24時間は10 ng/ml BMP4添加培地、続く4日間は10 ng/ml BMP4、5 ng/ml bFGF、3 ng/ml Activin A添加培地で培養し、さらに3日間10 ng/ml VEGFと10 ng/ml bFGF添加培地で培養した。分化誘導8日目には大きく成長した胚葉体が観察できた(図9)。8日目にフローサイトメトリーで解析を行うと、CD31陽性、CD144陽性の分画が認められ(図10)、さらにそれらの分画は、PDGFRα陰性、VEGFR2強陽性の分画に存在していることが明らかとなった

(図11)。以前の分化誘導法におけるフローサイトメトリーの結果（図10）を見ると、この内皮細胞に相当する分画はほとんど存在していなかったことが分かった。CD31陽性、CD144陽性細胞をソーティングし、2週間培養した後に免疫染色を行い、CD144陽性の状態を保っていることを確認した(図12)。これらの結果から、無血清培地による分化誘導により、血管内皮細胞を作製することが可能であることが分かった。一方、本方法の問題点として、iPS細胞のコロニーを小さく砕きすぎた場合に胚葉体が成長せず、分化誘導が成功しないことがしばしば経験された(図13)。

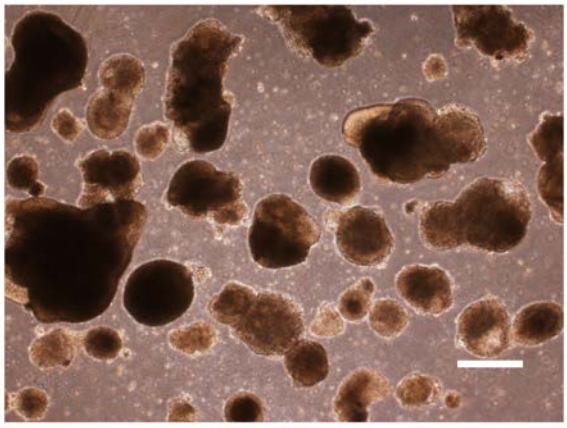


図9 分化誘導8日目の明視野像
分化誘導8日目の胚葉体を顕微鏡下に撮影したスケールバー： 500 μm

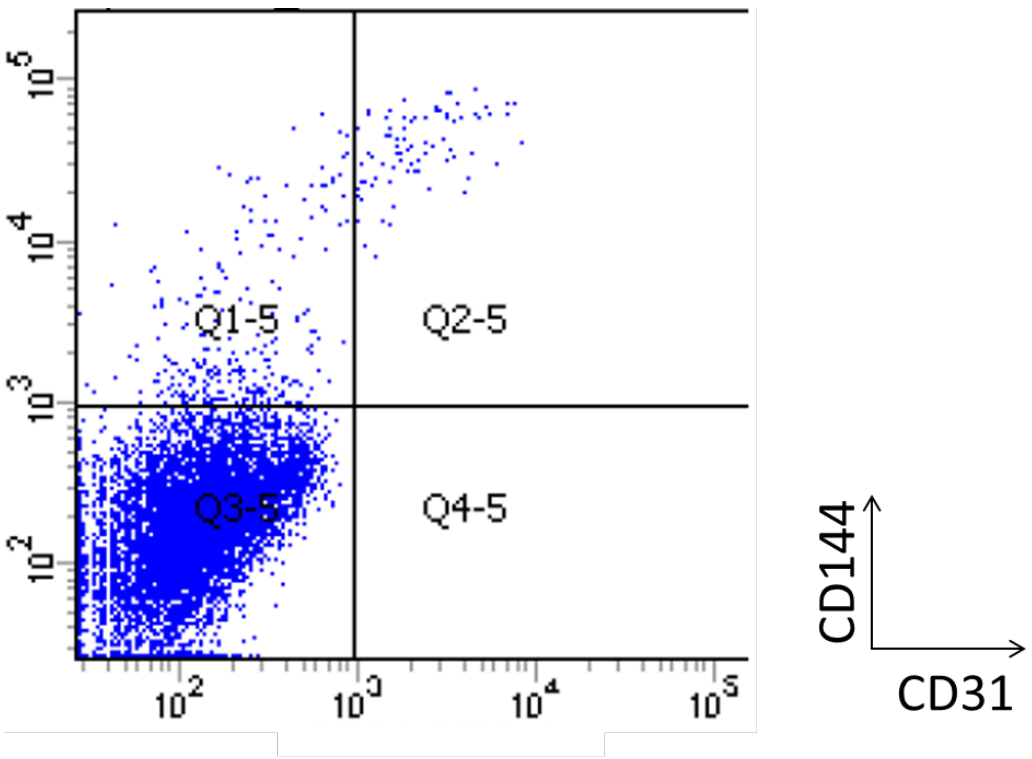


図10 分化誘導8日目でのフローサイトメトリーによる解析

分化誘導8日目の胚葉体をシングルセルにし、CD144、CD31の発現をフローサイトメトリー（FACS AriaⅢ）にて解析した。Q1-5： CD31陰性、CD144陽性、Q2-5：CD31陽性、CD144陽性、Q3-5：CD31陰性、CD144陰性、Q4-5：CD31陽性、CD144陰性

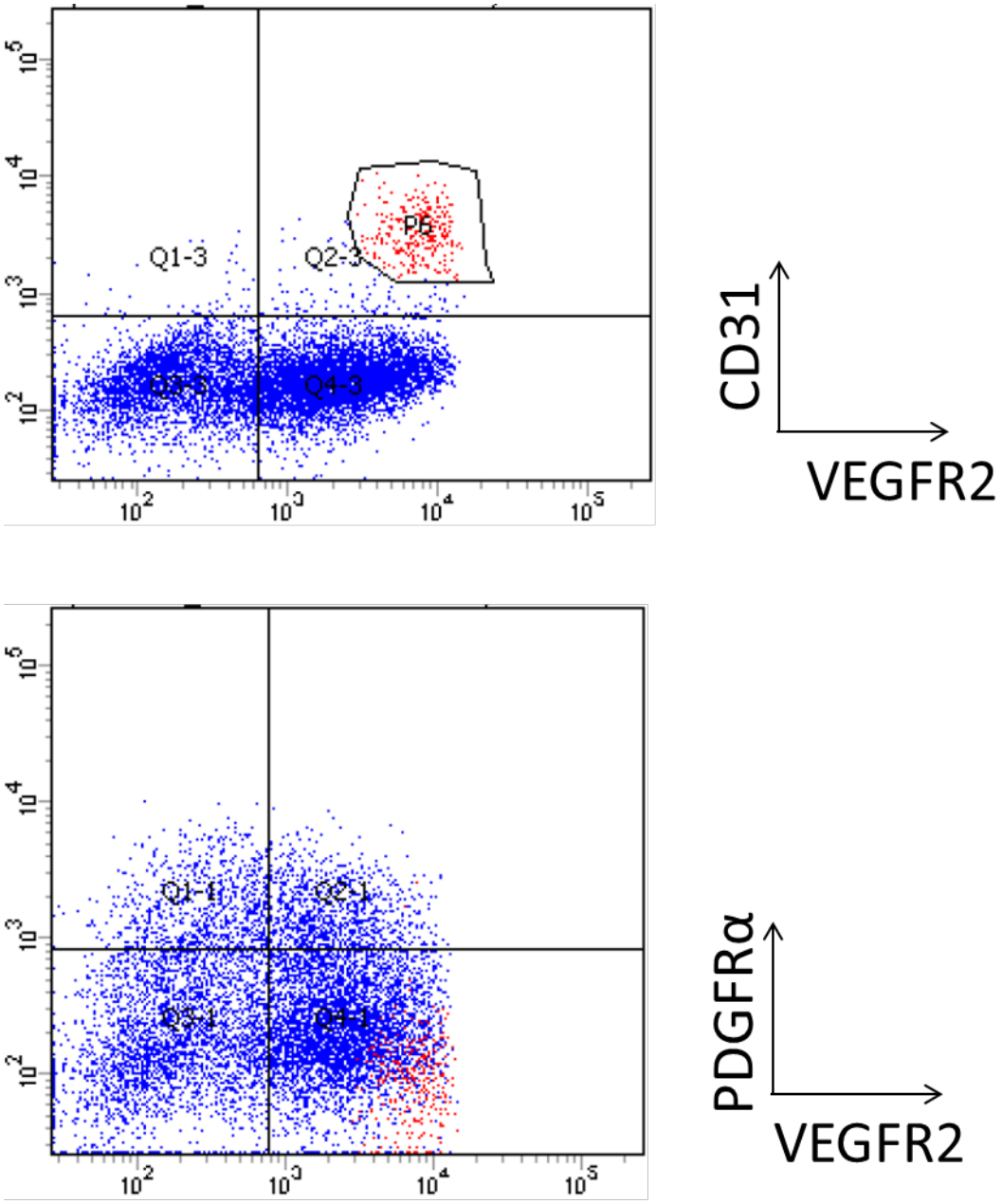


図11 分化誘導8日目でのフローサイトメトリーによる解析

分化誘導8日目の胚葉体をシングルセルにし、CD31 (FITC)、VEGFR2 (PE)、PDGFRα (APC)の発現をフローサイトメトリー (FACS AriaⅢ) で解析した。上図：横軸がVEGFR2、縦軸がCD31を示す。CD31およびVEGFR2が陽性である細胞をP5として囲み、赤の点で示した。Q1-3：CD31陽性、VEGFR2陰性、Q2-3：CD31陽性、VEGFR2陽性、Q3-3：CD31陰性、VEGFR2陰性、Q4-3：CD31陰性、VEGFR2陽性。下図：横軸がVEGFR2、縦軸がPDGFRαの発現を示す。P5の細胞を赤い点で示した。Q1-1：VEGFR2陰性、PDGFRα陽性 Q2-1：VEGFR2陽性、PDGFRα陽性、Q3-1 ：VEGFR2陰性、PDGFRα陰性、Q4-1：VEGFR2陽性、PDGFRα陰性

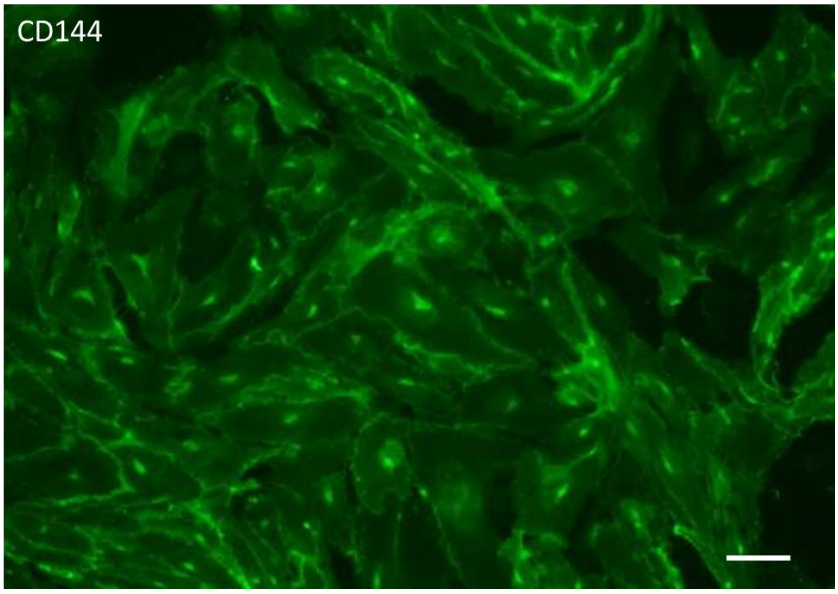


図12 ソーティングしたCD31陽性CD144陽性細胞の免疫染色
ソーティング後2週間培養しCD144の免疫染色を行った。スケールバー：50 μm

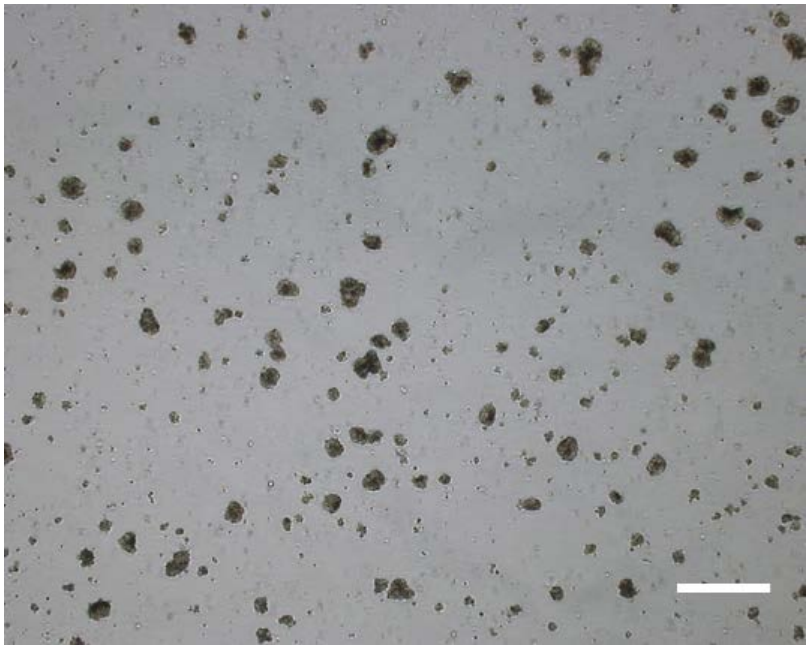


図13 分化誘導がうまくいかなかった場合の胚葉体の明視野像ピペッティングでiPS細胞を細かく砕き、分化誘導を行い、8日目で顕微鏡下に撮影を行った。iPS細胞を細かく砕きすぎた場合胚葉体が形成されず、分化誘導が進まない。スケールバー： 500 μm

この問題を解決するためには、胚葉体を形成させずに、単層培養で血管内皮細胞の分化誘導を行う方法が望ましいと考えられた。そこで、Wangらの報告を参考に新たな分化誘導方法を検証した[26]。本方法は、30倍希釈したMatrigelでコーティングしたディッシュ上で分化誘導を行うものである。最初の24時間はBMP4添加培地で培養し、続く2日間をbFGFとVEGF添加培地で培養し、最後の3日間はbFGF、VEGFに加えTGF-β1型受容体ALK5の阻害剤であるSB431542を添加して培養した。このSB431542によりTGF-βのシグナルが阻害され、平滑筋細胞への分化の抑制と内皮細胞への分化の促進が得られる。6日目の顕微鏡写真では、コロニーの周辺に細長い細胞が多数認められ、これらの細胞に一致して内皮細胞の特徴である1,1'- dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI-Ac-LDL)の取り込みが確認された(図14)。また、免疫染色を行うと、これらの細胞はVEGFR2陽性かつCD144陽性であることから内皮細胞へと分化していることが示された。。フローサイトメトリーで解析すると、CD144およびCD31陽性細胞が20%前後存在していた。この分画をソーティングし、培養した後に免疫染色を行ったところ、ほぼすべての細胞が血管内皮マーカーであるCD144およびvWFを発現していた。また、フローサイトメトリーで解析を行ったところ、98%以上の細胞でCD144陽性であることが確認できた（図15)。本方法では安定した分化誘導が可能であったため、本方法により作製された血管内皮細胞を実験に用いることとした。

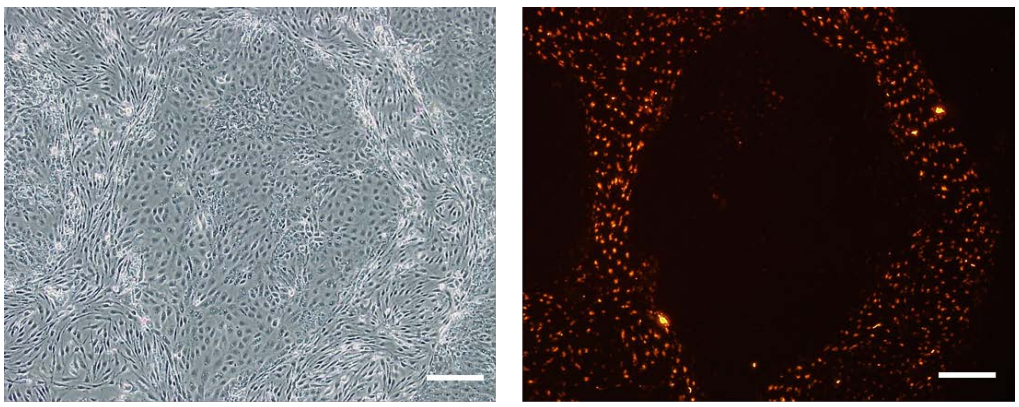


図14 分化誘導6日目の顕微鏡写真

左：明視野像　右：DiI-Ac-LDLの蛍光像。細長い形状をした細胞に一致して、内皮細胞の特徴であるDiI-Ac-LDLの取り込みが認められた。スケールバー： 500 μm

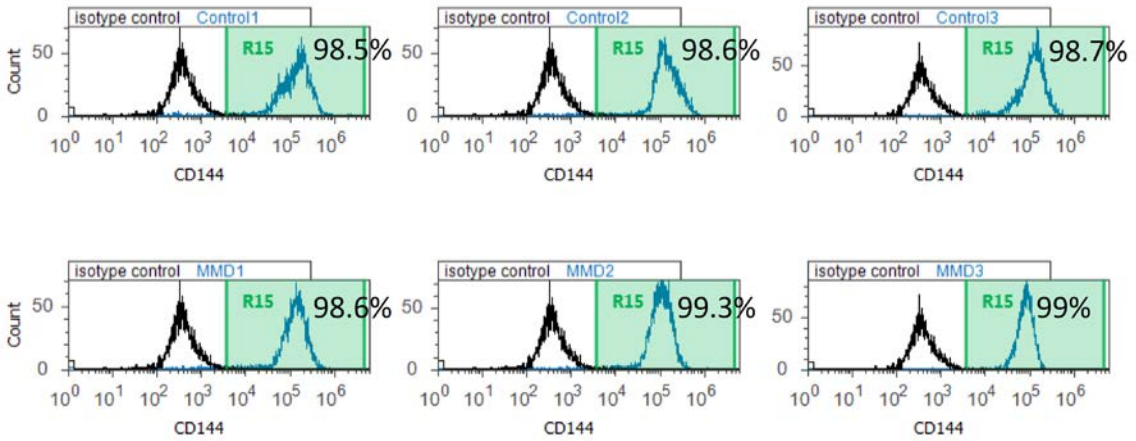


図15 ソーティングしたCD31陽性CD144陽性細胞のフローサイトメトリーによる解析

ソーティング後2週間培養し、APC標識抗CD144抗体を用いてフローサイトメトリー（Attune Flow Cytometer）で解析を行った。横軸をCD144の蛍光強度、縦軸をカウント数とし、ヒストグラムを作成した。上段：コントロール、下段：もやもや病。Isotype controlを黒い線で示し、各サンプルを青い線で示した。R15で囲んだイベントをCD144陽性とし、その割合を図内に示した。

【健常者ともやもや病患者の血管内皮細胞の機能の比較】

CCK-8 細胞増殖アッセイ

内皮細胞の増殖力を検討するためCCK-8 細胞増殖アッセイを行った。培養72時間後の450 nmの吸光度を0時間での吸光度で除することで、細胞数の変化率を計算した。予備実験として、96ウェルプレートで細胞数を0-20,000/ウェルで振って吸光度の細胞数による変化を検討した。図16の如く、細胞数が増加するに応じて吸光度が上昇することが確認できた。標準曲線を参考に、本実験では１ウェルあたりの細胞数を5,000とした。細胞接着後(day0)と72時間培養後でのOpitical Densitiy (OD450)の値の比をとり、細胞の増殖力を算出した。アッセイの結果、コントロールともやもや病では増殖力に差は認められず、各種の成長因子への反応性にも差は認められなかった。

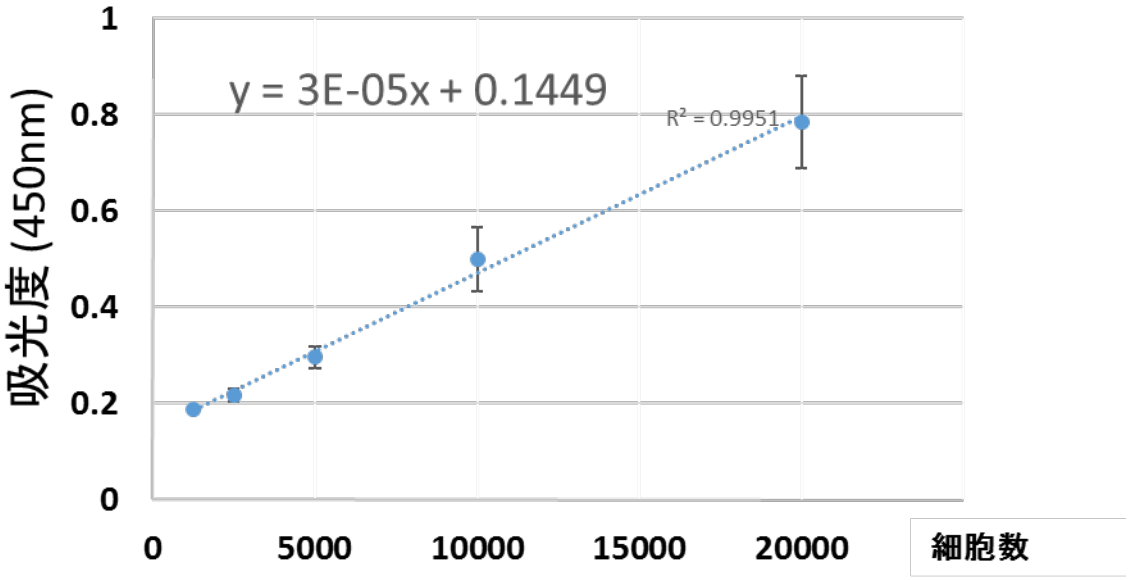


図16 CCK-8による標準曲線

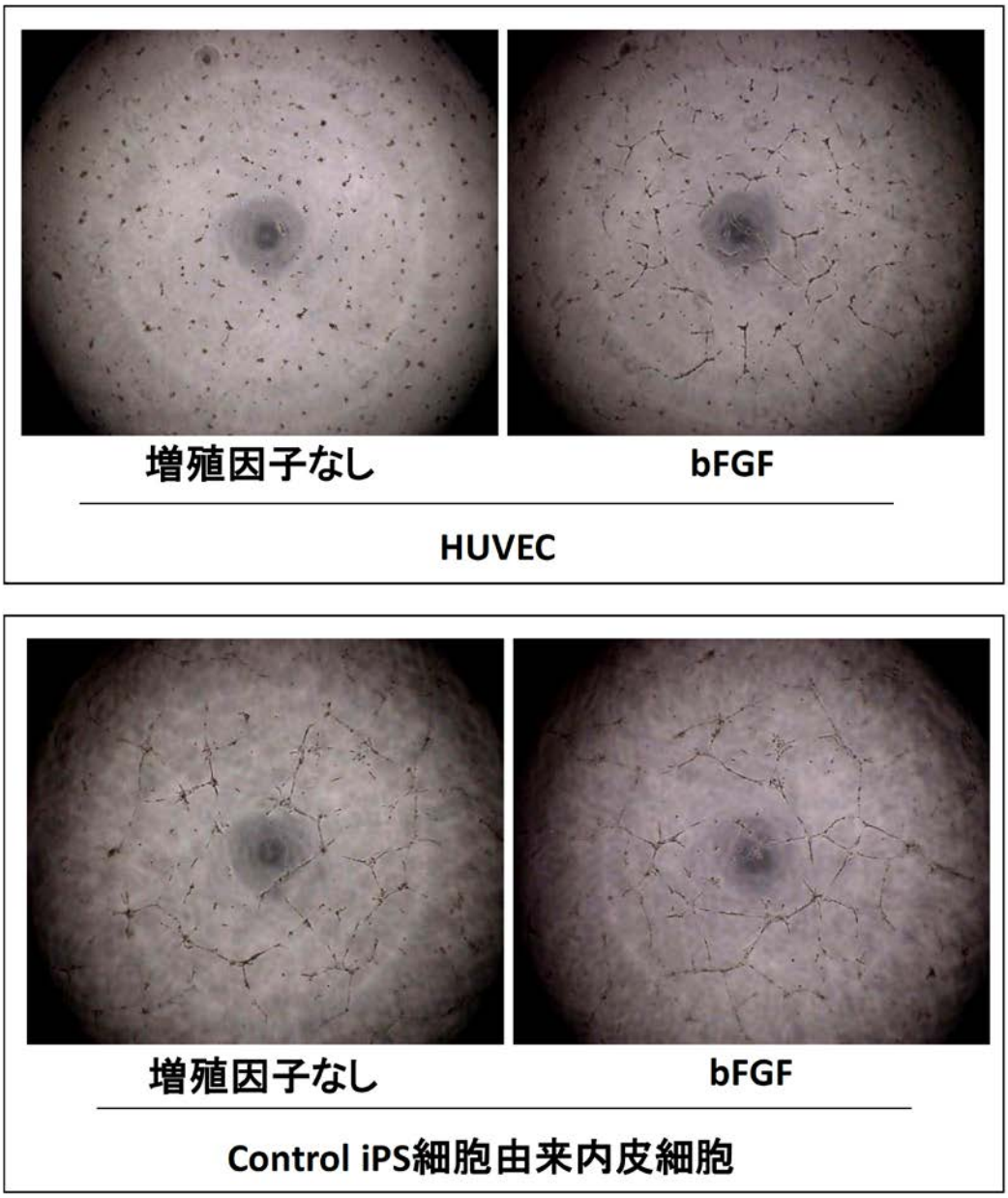
iPS細胞から作製した血管内皮細胞を用いて、CCK-8を2時間反応させた後に測定した吸光度の標準曲線を作成した（n=5)。実験は2回施行し、平均±標準偏差を示した。

チューブ形成アッセイ

内皮細胞をGeltrexでコーティングされた96ウェルプレート上に播種し、12時間後に形成されたチューブを4倍の対物レンズで撮影し、ImageJ softwareで総チューブ長の定量化を行った。もやもや病血管内皮細胞ではコントロールと比較して有意に血管新生能が低下していた。また、これは、成長因子を添加しない場合においても、添加しない場合においても同様の結果であった。一方で、添加した成長因子に対するチューブ長の変化が非常に少ないことに疑問が生じた。HUVECなどの市販されている内皮細胞を用いたアッセイでは、通常増殖因子を添加することにより血管新生が促進されることが報告されている。そこでHUVECを用いて増殖因子ありの場合となしの場合でチューブ形成アッセイを行ってみたところ、HUVECでは増殖因子を添加しない状態ではtube formationはほとんど起こらず、bFGFを添加した場合に著明にチューブ形成が促進されたのに対し、iPS細胞由来血管内皮細胞では成長因子を添加しない場合とbFGFを添加した場合とでほとんど変化が認められないことが分かった(図17)。この結果から、HUVECなどの組織から分離した細胞株と、iPS細胞由来血管内皮細胞では大きく特性が異なることが示唆された。この違いに関する具体的な原因は不明であるが、

少なくともコントロールともやもや病血管内皮で血管新生能に差があることが示された。

A



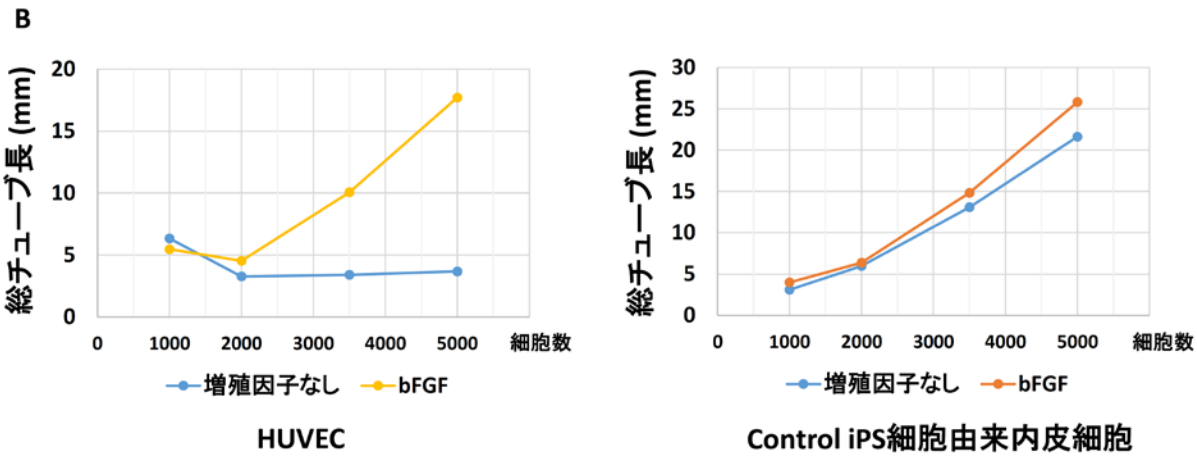


図17 HUVECとiPS細胞由来血管内皮細胞のチューブ形成の比較
A：上図にHUVEC、下図にコントロールiPS細胞由来内皮細胞のチューブ形成アッセイの明視野像を示した。それぞれ、96ウェルプレートで、細胞数を1,000から5,000個に振り分け、増殖因子なし、もしくはbFGFを添加した条件で検証した。写真は細胞数5,000/ウェルでの結果を示した。下段：撮影した画像をImageJのプラグインツールであるAngiogenesis Analyzeを用いて解析し、総チューブ長の定量化を行った。ピクセル単位で得られたデータをミリメートルに変換しグラフ化した。左側のグラフにHUVEC、右側のグラフにコントロールiPS細胞由来内皮細胞の結果を示した。縦軸に総チューブ長（mm)、横軸に細胞数を示す。

【マイクロアレイ】
教師なし学習クラスタリングの過程により1527のプローブが残った。それらのプローブに対して階層的クラスタリングを行った結果、コントロール群ともやもや病群とでは遺伝子発現が明らかに異なることが分かった。次いで、マイクロアレイの全54680プローブのデータを、横軸にlog2変換した倍率変化をとり、縦軸に-log10変換したp 値をとりプロットし、ボルケーノプロッティングを作成した。p 値はウェルチのt 検定によって算出された。コントロールとの比較において、もやもや病で優位に発現が低下しているプローブ（倍率変化<1/3、$p < 0.01$)が88 プローブ、もやもや病で優位に発現が上昇しているプローブ(倍率変化>3、$p < 0.01$)が117 プローブあることが示された。この有意な発現の差があるプローブのみを用いてKEGG pathway analysisを行った。DAVIDで解析を行い、p 値(EASE Score)順に並んだパスウェイのうち、$p < 0.05$となるパスウェイを抽出した。もやもや病で有意に発現が低下している88 プローブの解析では細胞外マトリックス受容体関連の遺伝子が有意に濃縮されていた。一方、もやもや病

で有意に発現が上昇しているプローブのパスウェイ解析の結果、卵母細胞の減数分裂、プロゲステロンを介した卵母細胞の成熟に関連したo遺伝子が有意に濃縮されていた。抽出された遺伝子の詳細を表3に示す。さらに抽出された細胞外マトリックス受容体関連遺伝子に含まれていたインテグリンβ3(ITGB3)とインテグリンβ8 (ITGB8)についてRT-PCRにて発現の解析を行ったところ、マイクロアレイの結果と同様にもやもや病血管内皮細胞において有意に発現の低下が認められた。次いで、インテグリンβ3についてウエスタンブロッティングにてタンパク質レベルでの発現を解析したところ、やはりもやもや病血管内皮細胞において有意に発現が低下していた。パスウェイ解析において抽出された遺伝子のリストを表3に示す。

もやもや病で発現低下していた88プローブのパスウェイ解析			
パスウェイ名	プローブ数(%)	*p* 値 (EASE Score)	遺伝子名
細胞外マトリックス受容体	4 (5.3)	0.0053	Glycoprotein IX HSPG2、ITGB3、ITGB8

もやもや病で発現亢進していた117プローブのパスウェイ解析			
パスウェイ名	プローブ数(%)	*p* 値 (EASE Score)	遺伝子名
卵母細胞の減数分裂	4 (4.1)	0.0041	MAD2、BUB1、CALML6 SECURIN
プロゲステロンを介した卵母細胞の成熟	3 (3.1)	0.033	BUB1、MAPK10

表3 KEGGパスウェイ解析によって抽出された遺伝子のリスト
上：もやもや病で有意に発現が低下していた88プローブのパスウェイ解析によって抽出された遺伝子のリスト　下：もやもや病で有意に発現が上昇していた117プローブのパスウェイ解析によって抽出された遺伝子のリスト
EASE Score は Fisher's Exact p-valueを改良したものである。

【プロテオミクス】

抽出されたタンパク質を二次元電気泳動した結果、各ゲルにおいて約2,000のスポットが検出された(図18)。全てのスポットのシグナル値の平均値をコントロール群ともやもや病群とで比較し、1.5倍以上の発現の差があり、かつ$p < 0.05$以下であるスポットを抽出した。もやもや病で有意に発現が低下しているスポットは6、もやもや病で有意に発現が上昇しているスポットは12認められた。これらのスポットからタンパク質を抽出し、MS/MSイオンサーチによってタンパク質の同定を行った。もやもや病で発現が有意に低下しているタンパク質の中には、cytoleratin18、caldesmon、purine nucleotide phosphorylase、glutatione S-transferaseが認められた。もやもや病で発現が有意に上昇しているタンパク質の中には、多数のheterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)タンパク質(hnRNPK、hnRNPH、hnRNPH3、hnRNPE1)やU2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1)などの、pre-mRNAに対する選択的スプライシングの調節因子が含まれていた。

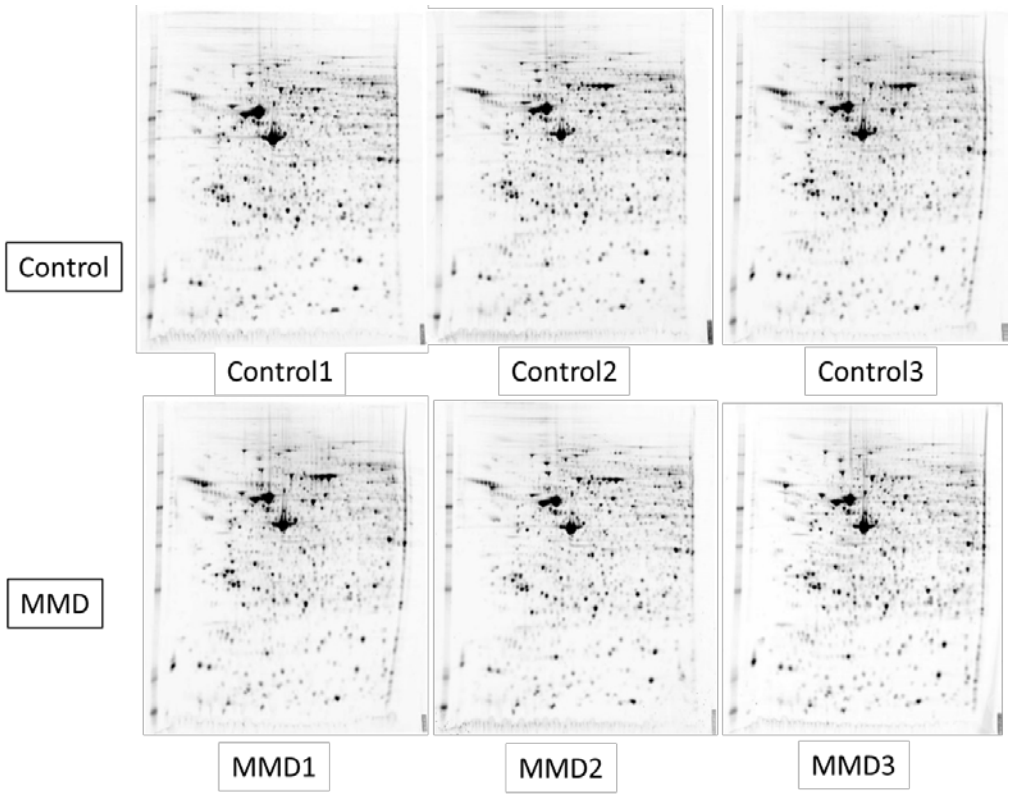


図18 二次元電気泳動後のゲル
内皮細胞から抽出したタンパク質を2次元電気泳動した結果を示した。

考察

本研究では、もやもや病患者の末梢血単核球からiPS細胞を樹立した。これまで、もやもや病患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立した報告があるが、末梢血単核球からiPS細胞を樹立した報告はまだない。末梢血単核球の採取は皮膚線維芽細胞の採取よりも侵襲度が低く、提供者に対する負担が少ない点で優れていると考えられる。また、本研究ではiPS細胞から内皮細胞を作製する手法を3種類検討した。VEGFR2陽性、PDGFRα陰性の心血管系前駆細胞をソーティングした後に血管内皮細胞への分化誘導を行う手法では、最終的に平滑筋細胞の混入、増勢が問題となることが示された。また、胚葉体を形成する手法では、iPS細胞の砕きすぎた場合に分化誘導が成功しないことがあったため、単層培養での分化誘導法の方が容易であると考えられた。最終的に選択したWangらの手法では、コントロールおよびもやもや病iPS細胞の両方で、安定的に効率よく内皮細胞を得ることが出来たため、今後のもやもや病の血管内皮の研究に有用と考えられる。本研究では内皮細胞の基本的機能解析として増殖力、血管新生能を評価した。コントロールともやもや病血管内皮との間で、増殖力では有意な差は認められなかった。一方、血管新生能においてはもやもや病で有意に低下しているという結果であった。Hitomiらは、もやもや病特異的iPS細胞由来血管内皮細胞の解析を行い、増殖力には異常を認めなかったが、血管新生能が有意に低下していると報告している[21]。これは本研究の結果においても一致を認めている。本研究では増殖力、血管新生能の解析において、4種の増殖因子の効果も検証した。過去に、もやもや病患者の浅側頭動脈から採取した血管平滑筋細胞の解析において、Interleukin (IL)-6、IL-1βとPDGFに対する反応性が正常人由来の平滑筋細胞と異なっていることが報告されている[28,29]。もやもや病血管内皮細胞では増殖因子への反応性を検討した報告はなかったため、主要な増殖因子であるVEGF、bFGF、TGF-β、BMP4に対する反応性を検討した。いずれの増殖因子に対しても、もやもや病で特異的な反応は認められなかった。一方、チューブ形成アッセイにおいては、増殖因子を添加しない条件と添加した条件とで形成された総チューブ長に有意な差が認められず、添加した増殖因子の効果を十分に評価できていないと思われる結果となった。また、今回検討した増殖因子の種類も少なかったため、今後より多くの増殖因子に関して検証することで異常を検出することができる可能性があると考えられた。HUVECを用いた実験では、増殖因子を添加しない状態ではチューブ形成はほとんど起こらず、

bFGFを添加した際に初めてチューブ形成が起こることが確認された。これらの結果から、iPS細胞由来血管内皮細胞とHUVECなどの生体組織から採取した細胞とでは性質が異なる可能性が示唆された。渉猟しえた限りでは、iPS細胞由来血管内皮細胞の増殖因子への反応性について解析した報告はなかった。コントロールともやもや病iPS由来血管内皮細胞の比較において、増殖因子を添加しない状態においてもチューブ形成に差が認められることから、チューブ形成を誘発するためにウェルをコーティングしている細胞外マトリックスに対する反応性の違いを反映している可能性が示唆された。

マイクロアレイにおいて、もやもや病で有意に発現が低下している遺伝子群内には、細胞外マトリックス受容体関連遺伝子が有意に濃縮されていることが明らかとなった。抽出された細胞外マトリックス受容体関連遺伝子の中には、血管新生において重要な役割をもつintegrin β3が含まれていた。さらにintegrin β3低下はRT-PCRおよびウエスタンブロッティングにおいてももやもや病血管内皮細胞における低下が示された。integrin β3はビトロネクチンに対するレセプターとして知られており、血管新生における重要な分子である[30]。Dallabridaらは、integrin β3の発現低下により、チューブ形成が障害されることを報告している[31]。Integrin β3の発現低下が、もやもや病血管内皮細胞における血管新生能低下に関与している可能性が示唆された。

プロテオミクスでは、もやもや病血管内皮細胞において有意に発現が亢進しているタンパク質の中には、hnRNPタンパク質(hnRNPE1、hnRNPH1、hnRNPH3、hnRNPK) やU2AF1など、多数のmRNA前駆体に対する選択的スプライシングに関わるタンパク質が含まれていた。選択的スプライシングはタンパク質に多様性を生み出す上で重要な機構であり、細胞の種類や、癌などの疾患に特異的なスプライシングパターンが存在していることが報告されている[32,33]。また、hnRNPタンパク質の強制発現により遺伝子のスプライシングパターンが変化することが報告されている[34]。本研究により、もやもや病においても、スプライシングパターンの異常がもやもや病血管内皮細胞の機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本研究にはいくつかのの限界が挙げられる。本研究では、もやもや病血管内皮細胞における血管新生能の低下が、変異型RNF213によって引き起こされるのかどうかは検証されていない。また、同様にマイクロアレイとプロテオミクスで検出された遺伝子とタンパク質のコントロール群との発現の差異が、変異型RNF213と関連しているかは検証されていない。

今後、変異型RNF213の強制発現や、SNPの修復などの遺伝子工学的な手法に

より、今回検出された異常が改善もしくは増悪するのか検証する必要があると考えられる。

総括および結論

① 本研究全体から得られた新知見

もやもや病患者の末梢血単核球からiPS細胞を作製した。
もやもや病血管内皮細胞では細胞外マトリックス受容体関連遺伝子の発現低下が認められ、血管新生に重要な機能をもつintegrin β3の発現低下がタンパク質レベルで認められた。
もやもや病血管内皮細胞において多数のスプライシング制御因子のタンパクレベルでの発現亢進が認められた。

② 新知見の意義

もやもや病においてより低侵襲な手法でiPS細胞を作製可能なことを示した。
もやもや病iPS細胞から作製した血管内皮細胞が、健常者から作製した細胞とは機能、遺伝子発現、タンパク質の発現が異なっていることが示されたことから、もやもや病の病態解析においてiPS細胞が有用な手段となりうることを示した。
もやもや病発症メカニズムにおける細胞外マトリックス受容体やスプライシング制御因子の意義はこれまで研究されておらず、今後新たな研究の対象となる可能性がある。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

変異型RNF213が、今回示された細胞外マトリックス受容体関連遺伝子やスプライシング制御因子などの発現をどのように変化させるかを解析することで、RNF213の新たな機能やもやもや病発症のメカニズムの解明につながる可能性がある。変異型RNF213の強制発現や発現阻害、もしくはSNPの修復などによりこれらの遺伝子やたんぱく質の発現の変化が認められるかを検証する研究に発展する可能性がある。
ゲノム全体での選択的スプライシング解析を行い、健常群ともやもや病群とで差があるか検証する研究により、もやもや病に特異的なスプライシングパターンが認められる可能性がある。

④ 今後の課題

変異型RNF213が実際に遺伝子やタンパク質の発現異常と関連しているの

か、関連しているとすればどのような機序によるのかを示す必要があると考えられた。

謝辞

本研究は第32回美原脳血管障害研究振興基金および平成25年度先進医薬研究振興財団の助成を受け行われました。また本実験を遂行するにあたって多大なる支援を賜りました熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野の江良択実教授、研究員、大学院生の皆さまに深謝します。最後になりますが、研究を通じて活発な議論にお付き合い頂き、終始適切な助言を賜った同科の先生方にも併せて感謝の意を表します。

引用文献

1 Kudo, T. Spontaneous occlusion of the circle of Willis. A disease apparently confined to Japanese. *Neurology* **18**, 485-496, (1968).

2 Nishimoto, A. & Takeuchi, S. Abnormal cerebrovascular network related to the internal cartoid arteries. *J. Neurosurg.* **29**, 255-260, (1968).

3 Suzuki, J. & Kodama, N. Cerebrovascular "Moyamoya" disease. 2. Collateral routes to forebrain via ethmoid sinus and superior nasal meatus. *Angiology* **22**, 223-236, (1971).

4 Suzuki, J. & Takaku, A. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch. Neurol.* **20**, 288-299, (1969).

5 Guey, S., Tournier-Lasserve, E., Herve, D. & Kossorotoff, M. Moyamoya disease and syndromes: from genetics to clinical management. *Appl Clin Genet* **8**, 49-68, (2015).

6 Kuroda, S. & Houkin, K. Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol.* **7**, 1056-1066, (2008).

7 児玉 南海雄, 藤原 悟, 笠井 直人. Moyamoya 病の原因に関する研究. 脳神経外科 10, 251-261 (1982)

8 Kamata, I., Terai, Y. & Ohmoto, T. Attempt to establish an experimental animal model of moyamoya disease using immuno-embolic material--histological changes of the arterial wall resulting from immunological reaction in cats. *Acta Med. Okayama* **57**, 143-150, (2003).

9 Ezura, M., Fujiwara, S., Nose, M., Yoshimoto, T. & Kyogoku, M. Attempts to induce immune-mediated cerebral arterial injury for an experimental model of moyamoya disease. *Childs Nerv. Syst.* **8**, 263-267, (1992).

10 Hoshimaru, M., Takahashi, J. A., Kikuchi, H., Nagata, I. & Hatanaka, M. Possible roles of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of moyamoya disease: an

immunohistochemical study. *J. Neurosurg.* **75**, 267-270, (1991).
11 Houkin, K. *et al.* Role of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of moyamoya disease. *Neurosurg. Focus* **5**, e2, (1998).
12 Albala, M. M. & Levine, P. H. Platelet factor 4 and beta thromboglobulin in Moya-Moya disease. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **6**, 96-99, (1984).
13 Hojo, M. *et al.* Role of transforming growth factor-beta1 in the pathogenesis of moyamoya disease. *J. Neurosurg.* **89**, 623-629, (1998).
14 Kim, S. K. *et al.* Elevation of CRABP-I in the cerebrospinal fluid of patients with Moyamoya disease. *Stroke* **34**, 2835-2841, (2003).
15 Ueno, M. *et al.* Moyamoya disease and transforming growth factor-beta1. *J. Neurosurg.* **92**, 907-908, (2000).
16 Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967, (1997).
17 Kim, J. H. *et al.* Decreased level and defective function of circulating endothelial progenitor cells in children with moyamoya disease. *J. Neurosci. Res.* **88**, 510-518, (2010).
18 Roder, C. *et al.* Genetics of Moyamoya disease. *J. Hum. Genet.* **55**, 711-716, (2010).
19 Kamada, F. *et al.* A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J. Hum. Genet.* **56**, 34-40, (2011).
20 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).
21 Hitomi, T. *et al.* The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439**, 419-426, (2013).
22 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872,

(2007).

23 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).

24 NatureTakebe, A. *et al.* Microarray analysis of PDGFR alpha+ populations in ES cell differentiation culture identifies genes involved in differentiation of mesoderm and mesenchyme including ARID3b that is essential for development of embryonic mesenchymal cells. *Dev. Biol.* **293**, 25-37, (2006).

25 Yang, L. *et al.* Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **453**, 524-528, (2008).

26 Wang, C. *et al.* TGFbeta inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Res.* **22**, 194-207, (2012).

27 Yamashita, J. *et al.* Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**, 92-96, (2000).

28 Yamamoto, M., Aoyagi, M., Fukai, N., Matsushima, Y. & Yamamoto, K. Increase in prostaglandin E(2) production by interleukin-1beta in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease. *Circ. Res.* **85**, 912-918, (1999).

29 Yamamoto, M., Aoyagi, M., Fukai, N., Matsushima, Y. & Yamamoto, K. Differences in cellular responses to mitogens in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease. *Stroke* **29**, 1188-1193, (1998).

30 Weis, S. M. & Cheresh, D. A. alphaV integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006478, (2011).

31 Dallabrida, S. M., De Sousa, M. A. & Farrell, D. H. Expression of antisense to integrin subunit beta 3 inhibits microvascular

endothelial cell capillary tube formation in fibrin. *J. Biol. Chem.* **275**, 32281-32288, (2000).

32 Ohta, S., Nishida, E., Yamanaka, S. & Yamamoto, T. Global splicing pattern reversion during somatic cell reprogramming. *Cell Rep* **5**, 357-366, (2013).

33 Cooper, T. A., Wan, L. & Dreyfuss, G. RNA and disease. *Cell* **136**, 777-793, (2009).

34 Topp, J. D., Jackson, J., Melton, A. A. & Lynch, K. W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. *RNA* **14**, 2038-2049, (2008).