



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
Author(s)	東海林, 菊太郎
Description	配架番号：2543
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14078号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14078
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80657
Type	doctoral thesis
File Information	Kikutaro_Tokairin.pdf



学 位 論 文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

東海林 菊太郎

学 位 論 文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

東海林 菊太郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	9 頁
結果	22 頁
考察	60 頁
結論	65 頁
謝辞	67 頁
利益相反	68 頁
引用文献	69 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。

Comparative characterization of induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle and endothelial cell transcriptomes in Moyamoya disease

“Journal of Neuroscience Research” 投稿中

なお、学位申請の時点では本論文に関する学会発表は行っていない。

要旨

【背景と目的】もやもや病は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、発生学的に頭頸部動脈の 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) へ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- β 1、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。次に、得られた SMC を用いて、細胞機能と遺伝子発現プロファイルの解析を行った。細胞機能解析として、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。増殖能は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で、遊走能は単位面

積あたりの遊走細胞数で、収縮能は収縮物質であるカルバコール添加前後の細胞表面積 [μm^2] の減少率で、各々定量化した。遺伝子発現プロファイルの解析では、SMC から RNA を抽出し、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。二群間の発現状況のばらつきは主成分分析で解析し、発現変動解析では 3 倍以上の発現変動比を示し、 $P<0.05$ の遺伝子を発現変動遺伝子とした。発現変動解析の結果は定量的 PCR により結果の妥当性を検証した。さらに、先行研究にて同じ iPS 細胞株から分化誘導した EC の遺伝子発現結果を用いて、同一の解析手法で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、SM22 α 、 α SMA 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。対象症例の iPS 細胞から分化誘導した SMC を用いた細胞機能の解析では、SMC の増殖能（もやもや病 vs 健常者 = 0.0059 ± 0.0026 vs 0.0090 ± 0.0021 ; $P=0.45$ ）、遊走能（もやもや病 vs 健常者 = 53.9 ± 9.0 vs 49.6 ± 6.0 ; $P=0.30$ ）、収縮能（もやもや病 vs 健常者 = 8363 ± 723 から 7718 ± 656 vs 9735 ± 784 から 9105 ± 760 ; $P=0.18$ ）はいずれももやもや病と健常者の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（decorin; 平均発現変動比 4.5、 $P=0.12$ ）、SLITRK4（slit guidance ligand and neurotrophic tyrosine kinase receptor like family member 4; 平均発現変動比 5.9、 $P=0.12$ ）、PCDHB8（protocadherin beta cluster 8; 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】本研究では、もやもや病患者と健常者から得られた iPS 細胞を用いて、神経外胚葉に由来する、すなわち頭頸部領域に特異的な SMC を分化誘導するプロトコ

ルを確立することができた。また、樹立した SMC を用いて、もやもや病と健常者で細胞機能の解析を行ったが増殖能、遊走能、収縮能には二群間で差がなかった。それを裏付けるように、遺伝子発現プロファイルでも二群間の mRNA の発現の差異はわずかであった。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 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頸部動脈特異的血管平滑筋細胞を分化誘導することに世界で初めて成功した。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、血管平滑筋細胞よりも血管内皮細胞の方がもやもや病の血管病理における中心的役割を果たしていることが示唆される。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACTA2	actin- α 2
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CDM	chemically defined medium
CNN1	calponin
CT	threshold cycle
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCN	decorin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EC	endothelial cell
EDTA	ethylene-diamine-tetra-acetic acid
EPC	endothelial progenitor cell
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HNK-1	human natural killer-1
IL-1	interleukin-1
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPSC	induced pluripotent stem cell
KSR	knockout serum replacement
MAS5	MicroArray Suite 5
MEF	mouse embryonic fibroblast
MMD	moyamoya disease
MYH11	myosin heavy chain-11
N/A	not applicable
NCSC	neural crest stem cell

NDP	norrie disease protein
n.s.	not significant
PBS	phosphate buffered saline
PC	principal component
PCA	principal component analysis
PCDHB	protocadherin beta cluster
PCR	polymerase chain reaction
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB
PVA	polyvinyl alcohol
QC	quality check
RIN	RNA Integrity Number
RNF213	ring finger protein 213
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SLITRK4	slit guidance ligand and neurotrophic tyrosine kinase receptor like family member 4
SM22 α	smooth muscle 22- α
SMC	smooth muscle cell
SPC	smooth muscle progenitor cell)
TAGLN	transgelin
TGF- β 1	tumor growth factor- β 1
TIA	transient ischemic attack
TIPRL	target of rapamycin signaling pathway regulator
WST-8	water-soluble tetrazolium salt-8
α SMA	α -smooth muscle actin

緒言

もやもや病は、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異常な側副血行路の発達が認められ、この微細な血管網が血管撮影検査において立ち登ぼる煙のように「もやもや」と見えることが疾患名の由来となっている (Suzuki and Takaku, 1969)。本疾患の有病率、罹患率は、日本、韓国、中国といった東アジアで高く、本邦での発病率は 10 万人あたり 0.35～1.13 人、有病率は 10 万人あたり 3.16～5.22 人となっている (Hayashi et al., 2013; Wakai et al., 1997)。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し、家族発症例が 10-15%に認められる (Guey et al., 2015)。また、男女比が 1:1.8 と女性に多く認められる疾患である (Wakai et al., 1997)。無症候性で発見される症例もあるが、慢性の経過で脳虚血を呈し、一過性脳虚血発作や脳梗塞で発症することが多い。また、特に成人例において、大脳基底核部に代償性に発達する微細で脆弱な側副血行路が破綻し、脳出血を呈することもある。脳虚血や脳出血などを発症した症候性の症例に対しては基本的に外科手術（脳血行再建術）が標準的治療となっている (Miyamoto et al., 2014; Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis, 2012)。

2011 年、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 (Kamada et al., 2011; Liu et al., 2011)。RNF213 の変異には複数のバリエーションがあるが、c.14576G>A (rs112735431, p.R4859K) が最も多い (Koizumi et al., 2016)。しかし、RNF213 変異は家族発症例の 95%で認められるものの、孤発例では 73%であり、また健常者でも 1.4%で認められる (Liu et al., 2011)。さらに、RNF213 をノックアウトしたマウスモデルではもやもや病でみられる脳血管異常を導くことができなかった (Sonobe et al., 2014)。これらの結果から、RNF213 の異常だけが病態を引き起こすものではないことはわかったが、未だもやもや病の病態の解明には至っていない

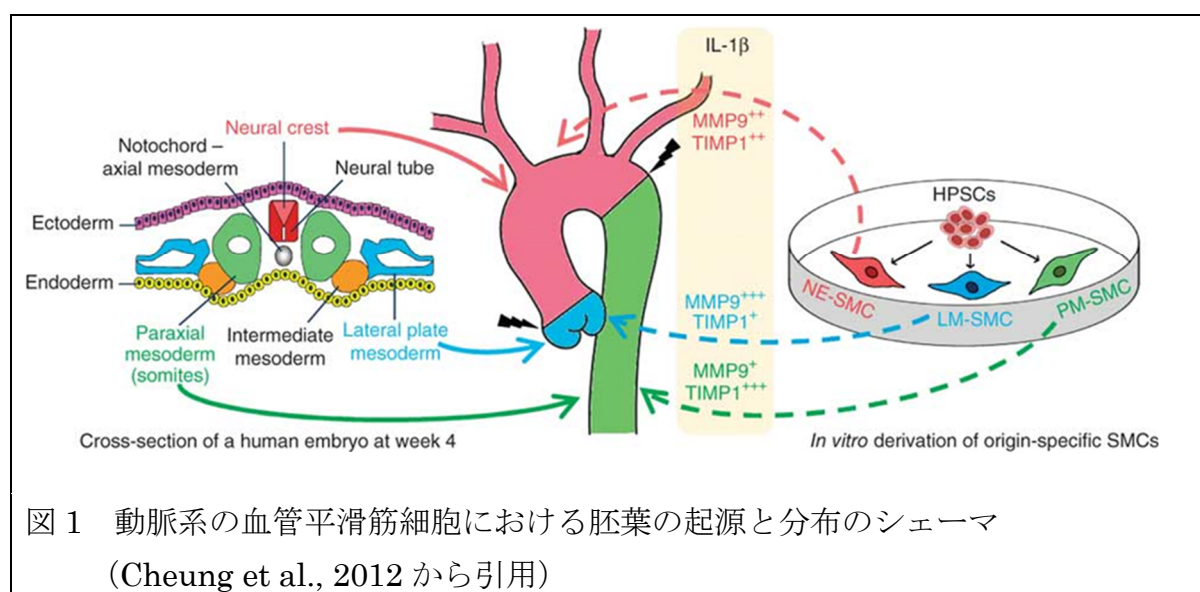
もやもや病の主病変である内頸動脈終末部の病理所見は、著明に肥厚した内膜による狭窄を呈する (Nanba et al., 2004)。そのため、血管を構成する内皮細胞や平滑筋細胞の増殖亢進などの機能異常の存在が推測されるが、これまで *in vitro*、*in vivo* において、もやもや病の疾患モデルは報告されておらず、病態解明を進める上で障壁となっている。

2007 年、山中らが人工多能性幹 (iPS: induced pluripotent stem) 細胞作製を報告して以来、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注目されている (Takahashi et al., 2007)。もやもや病においても、患者由来の iPS 細胞から作

製した血管内皮細胞を用いた研究が報告されており、もやもや病血管内皮細胞では管腔形成能が低下していることが報告された (Hamauchi et al., 2016; Hitomi et al., 2013)。管腔形成能低下が、もやもや病の臨床像とどのように関連するのかは大部分が不明であるが、この先行研究により、もやもや病特異的 iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞がもやもや病の病態解析において有用な手段となる可能性が示された。

これら血管内皮細胞の機能異常のみではなく、血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cell: SMC) の機能異常も過去の基礎研究において報告されている (Aoyagi et al., 1991; Aoyagi et al., 1997; Fukai et al., 1994; Yamamoto et al., 1998; Yamamoto et al., 1999)。いずれの研究も患者の血管組織や血液中より分離した細胞を解析する手法であり、追試研究や研究推進が困難であったが、iPS 細胞の登場により、これらの障壁が取り払われる可能性がある。一方、動脈系の SMC の発生起源に関しては同じ血管を構成するものであっても部位により発生起源が異なることが知られており、大動脈起始部の SMC は側板中胚葉由来、上行大動脈と頭頸部動脈の SMC は神経外胚葉由来、下行大動脈の SMC は沿軸中胚葉由来ということがわかっている (図 1) (Cheung et al., 2012)。さらに、幹細胞の分化誘導方法の発展により、単に SMC を作製するのみなく、発生起源特異的な SMC を得ることが可能となってきた (Cheung et al., 2014)。もやもや病においては、頸部内頸動脈、頭蓋内血管に特異的に病変を生じるため、神経外胚葉 (神経堤幹細胞: neural crest stem cell、以下 NCSC) 由来の SMC に特に強い機能異常が出現する可能性がある。

以上の事実を踏まえ、本研究ではもやもや病特異的 iPS 細胞から NCSC 由来の SMC を分化誘導し、もやもや病における SMC の細胞機能や遺伝子発現上の特徴を解析し、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。また、iPS 細胞由来 SMC がもやもや病の病態解析における新たな手段となりうることも検証した。



方法

【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院医の倫理委員会内規に基づき、「もやもや病患者由来 iPS 細胞株の樹立と、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への分化誘導を介した 病態研究」（承認番号 012-0317）として承認されている。本研究の対象となった被験者には研究計画書に基づいた説明を行い、被験者本人からの同意を得ている。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。

【iPS 細胞株】

iPS 細胞は先行研究で樹立した株を用いた。RNF213 における R4810K 変異を有さない (wild type) 成人の健常者 (コントロール) 3 名から得られた iPS 細胞と、RNF213 における R4810K 変異を有する (heterozygous type) 成人のもやもや病 (moyamoya disease: MMD) 患者 3 名から得られた iPS 細胞の、合計 6 株を用いた。由来となった健常者および MMD 患者の背景を表 1 に示す。

表 1 iPS 細胞の作製元となった症例の背景 (TIA: transient ischemic attack)

細胞株	採取時 年齢	性別	発症形式	発症時 年齢	家族性 もやもや病	RNF213 創始者変異
Control-1	48	男	—	—	—	— (GG)
Control-2	54	男	—	—	—	— (GG)
Control-3	48	男	—	—	—	— (GG)
MMD-1	39	男	TIA	34	+	+ (GA)
MMD-2	48	女	TIA	47	+	+ (GA)
MMD-3	36	女	TIA	36	+	+ (GA)

【細胞培養と継代】

iPS 細胞を培養する際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) を用いた。先行研究でマウス胎児から作製したフィーダー細胞を用いた。凍結保存していた MEF 初代培養株を解凍し、コーティングなしの

フラスコで 10%牛胎児血清 (FBS: fetal bovine serum、Thermo) と 50U/mL ペニシリン - 50 μ g/mL ストレプトマイシン混合溶液 (Nacalai Tesque) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、Thermo) にて培養した。コンフルエントに達したら TrypLE Express (Thermo) で細胞を剥離し 1:5~1:3 の比率で継代を行い、第 3 継代で 10 μ g/ml に調整したマイトマイシン C (日本薬局方) にて 3 時間処理を行うことで有糸分裂を停止させ、得られた細胞を凍結保存した。MEF は iPS 細胞を播種する 2~3 日前に解凍して 0.1%ゼラチンでコーティングされた 60mm 培養皿上に播種し、37°C、5% CO₂ で 2~3 日培養して培養皿表面が MEF で覆いつくされた状態を確認してからフィーダー細胞として用いた。

iPS 細胞の培養には、DMEM/F12 (Wako) 培地に 20% knockout serum replacement (KSR、Thermo)、2mM L-alanyl-L-glutamine (Wako)、0.1mM monothioglycerol (Wako)、50U/mL ペニシリン - 50 μ g/mL ストレプトマイシン混合溶液、5ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF、Wako) を含んだ培地 (iPS 細胞培地) を用いた。

液体窒素中にクライオチューブに入れて凍結保存されている iPS 細胞 (コロニー状態) を起眠させる際には、液体窒素から取り出したクライオチューブの蓋をすばやく開けて 37°C 温浴槽で温めた iPS 細胞培地 1ml をクライオチューブ内に注入しやさしくピペッティングすることで凍結した iPS 細胞を解凍し回収し、加温した iPS 細胞培地 10mL にやさしく注入した。空になったクライオチューブに再度 iPS 細胞培地 1mL を加えてクライオチューブ内に少量残存する iPS 細胞も回収した。iPS 細胞が懸濁された iPS 細胞培地は 300 rotations per minute (rpm) で 2 分間遠心し、上清を吸引除去し、ペレット状になった iPS 細胞にやさしく iPS 細胞培地を加え、MEF 上に播種した。播種した翌日に、位相差顕微鏡にて iPS 細胞がコロニー状態を保ったまま生着しているのを確認して、iPS 細胞培地を新しいものに交換し培養を継続した。その後は 1~2 日ごとに培地を交換しながら培養し、7~10 日でおおよそ 50%コンフルエントに達した。

iPS 細胞の剥離には 0.1mg/ml Collagenase type IV (Thermo)、0.25 % (w/v) trypsin (Thermo)、20% KSR、10mM CaCl₂ 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°C、5% CO₂ で 5 分間培養した。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 細胞培地をかけて培養皿から剥がし 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。

【マイコプラズマ検出アッセイ】

凍結保存から起眠させた iPS 細胞株が、マイコプラズマに感染していないことを確認するために、MycoAlert マイコプラズマ検出キット (Lonza) を用いて、マイコプラズマ検出アッセイを行った。前述の iPS 細胞の継代時に残った細胞懸濁液の上清を 1.5mL エッペンドルフチューブに回収し、12000×g で 20 秒間遠心し、その上清 100μL を 0.5mL エッペンドルフチューブに回収した。回収した検体に、MycoAlert リエージェントを 100μL 添加し、5 分間静置し、ルミノメーター (GloMax 20/20 Luminometer、Promega) で蛍光を測定した (値 A)。さらに MycoAlert 基質 100μL を添加し、10 分間静置し、同様に蛍光を測定し (値 B)、B/A の数値が 0.9 未満であることをもってマイコプラズマに感染していないものと判断した。

【iPS 細胞のフィーダーフリーへの馴化】

フィーダーフリー培養を行う培養皿は 60mm 培養皿 (BD biosciences) を用い、vitronectin (Thermo) を 2mL 添加し室温で 60 分間培養することでコーティングした。フィーダーフリーへの馴化および培養用の培地には Essential 8 (Thermo) を用いた。MEF 上で培養した iPS 細胞を PBS で洗浄し、0.5mM EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetic acid、Thermo) 1mL を添加し室温で 3~5 分培養することで剥離し、Essential 8 で懸濁し 15ml のチューブに回収した。この際、シングルセルにならないようコロニーのまま剥離した。1:1 の比率でフィーダーフリー用の vitronectin コーティングの培養皿に播種し、37°C、5% CO₂ で培養した。iPS 細胞がフィーダーフリーでの培養に馴れるまで 2~3 回継代行った。継代時も、同様に PBS で洗浄後に 0.5mM EDTA でコロニー形態を保ったまま剥離し、Essential 8 で懸濁し、播種した。継代比率は徐々に下げていき、3 回継代を経た後は 1:5~1:20 とした。馴化したあとの iPS 細胞は、そのまま以降の実験に用いるか凍結保存した。

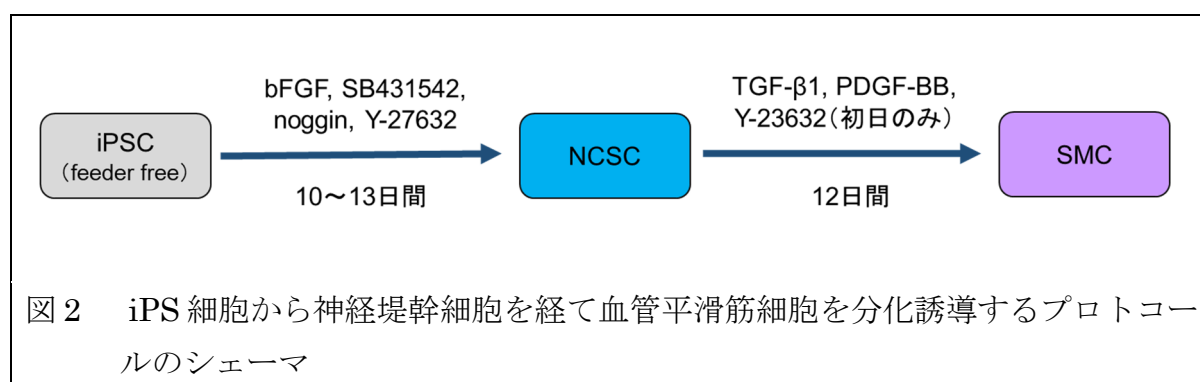
【細胞の凍結と起眠】

MEF 上で培養した iPS 細胞と MEF は、TrypLE Express 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。1200rpm、16°C 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°Cで保存した。フィーダーフリーの iPS 細胞は、0.5mM EDTA で剥離し、氷上で冷却した 10% v/v の DMSO (Sigma) を添加した Essential 8 にて回収し、クライオチューブに移して-80°Cで保存した。

起眠時は、37°C の温浴槽で氷の結晶が消える寸前まで復温したのち、各々の培地で懸濁し、遠心し上清を吸引除去し、再度培地で懸濁して各々の用途に使用した。

【神経外胚葉由来血管平滑筋細胞の分化誘導】

過去の報告から、神経外胚葉由来血管平滑筋細胞を分化誘導する場合、第一段階として iPS 細胞から神経堤幹細胞 (NCSC: neural crest stem cell) への分化誘導を行い、第二段階として NCSC から SMC への分化誘導を行うのが標準的手法であり、その手法に準じた分化誘導を行った (図 2) (Cheung et al., 2014; Jiao et al., 2016)。培地の共通成分である基礎培地は、Essential 6 (Thermo) 250mL、50mM monothioglycerol、chemically defined lipid concentration (Thermo) 5mL、50U/mL ペニシリン - 50µg/mL ストレプトマイシン混合溶液から成る。



1. iPS 細胞から NCSC への分化誘導

フィーダーフリー状態の iPS 細胞を PBS で洗浄後に 0.5mM EDTA を添加し室温で 3~5 分培養することでコロニー形態を保ったまま細胞を培養皿から剥離し、Essential 8 で懸濁し、vitronectin でコーティングした 6 ウェルプレート (BD biosciences) に 1:20~1:30 の比率で播種し、37°C、5% CO₂ で培養した。翌日、Essential 8 を吸引除去し、NCSC 誘導用の培地に変更した (培養 1 日目)。NCSC 誘導用の培地は、基礎培地、12ng/mL bFGF、10µM SB421542 (Wako)、200ng/mL noggin (RayBiotech)、10µM Y-27632 (Wako) から成る。その後は 1 日おきに培地を交換し、継代はせずに 10~13 日間培養し、コンフルエントになった段階で NCSC への分化誘導を完了した。

2. NCSC から SMC への分化誘導

PBS で洗浄後、Accutase (Thermo) を用いて NCSC を 6 ウェルプレートから剥離し (37°C、5% CO₂ で 5 分)、NCSC 誘導用の培地で回収した。この際、NCSC はコロニーではなくシングルセルの状態となる。200×g、16°C で 4 分間遠心し、上清を破棄し、細胞ペレットを SMC 誘導用の培地で懸濁し、細胞数を計測した。新しい vitronectin コーティングの 60mm 培養皿を用意し、SMC 誘導用の培地を加え、NCSC

を 30,000 個/cm² となるように播種し 37°C、5% CO₂ で培養した（1 日目）。SMC 誘導用の培地は、基礎培地、2ng/mL tumor growth factor- β 1 (TGF- β 1、Peprotech)、10ng/mL platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB、R&D Systems) から成るが、1 日目の播種時のみこれに 10 μ M Y-27632 を加えた。翌日、培地を吸引除去し、Y-27632 を含まない SMC 誘導用の培地に交換した。その後は 1 日おきに培地を交換し、12 日間培養した。なお、12 日間の期間の途中でコンフルエントになるため一度継代を行った（継代比率は 1:2）。その際は、同様に PBS で洗浄後に Accutase で剥離し、Y-27632 を含む SMC 誘導用の培地に懸濁し、新しく用意した vitronectin コーティングの 60mm 培養皿に 30,000 個/cm² の密度で播種し、翌日に Y-27632 を含まない培地に交換した。13 日目の時点で SMC への分化誘導が完了する。

誘導が完了した SMC は Accutase で剥離し、SMC 維持用の培地で回収した。SMC 維持用の培地は、DMEM、10% FBS、50U/mL ペニシリン - 50 μ g/mL ストレプトマイシン混合溶液からなる（以下、DMEM/10% FBS）。回収した SMC は、継代するか、以降の各種アッセイに用いた。継代時は、同様に Accutase で剥離し、コーティングしていない 60mm 培養皿に 1:2 の比率で播種し、SMC 維持用の培地にて 37°C、5% CO₂ で 4~7 日間培養することでコンフルエントな状態とした。

【表現型の異なる血管平滑筋細胞の作り分け】

SMC には Contractile タイプ（収縮型）と Synthetic タイプ（合成型）の二通りの表現型が存在するとされる（Ayoubi et al., 2017; Beamish et al., 2010; Wanjare et al., 2013）。上述の方法で作製される SMC は収縮型であり、合成型の作製を試みるために、Yang らの報告を参考にして、NCSC から SMC への分化誘導を行う際に、上述の培地に加えて、4mM 乳酸（Nacalai Tesque）と 10% FBS を加えた培地を用いて、同様に 12 日間培養した（Yang et al., 2016; Yang et al., 2017）。

【位相差顕微鏡による細胞形態の確認】

細胞形態の確認は位相差顕微鏡（IX71、Olympus）で行った。

【免疫染色】

各細胞を 4 チャンバースライドに播種し、維持用の培地で 37°C、5% CO₂ で培養した。1~2 日後、細胞の生着を確認し、PBS で 1 回洗浄した後に 4%パラホルムアルデヒド（Wako）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。PBS で 3 回洗浄後に、PBS に 1% bovine serum albumin (BSA、Wako) 溶液を混合した溶液（1% BSA/PBS 溶液）を添加し室温で 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、湿潤器に入れて振盪器上に置いて 4°C で一晩振盪した。用いた一次抗体と希釈倍率は表 2 に示した。翌日、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体を加えた 1% BSA/PBS 溶液を加えて振盪器上にて 16°C で 1 時間振盪した。用いた二次抗体と希釈倍率は表 3 に示した。核の染色を行うため、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI、Thermo) を用いてカバーガラスを被せて封入した。染色した細胞は蛍光顕微鏡 (BZ-X710、Keyence) で観察した。

マーカーの発現状況を評価する際には、各サンプルの各抗体に対して 10 箇所の重ならない視野 (1440 μ m $\times$ 1080 μ m) の撮影を行い、全細胞 (DAPI 陽性細胞) に占める、二次抗体の発色を認める細胞の比率を算出し、陽性率として定量化し、各サンプル間および各マーカー間で比較した (Kawabori et al., 2012)。

表 2 免疫染色に用いた一次抗体のリスト

	一次抗体	抗原	希釈濃度	製造会社	カタログ No.
iPSC	Oct 3/4	マウス	1:400	Santa Cruz	SC-5279
	Nanog	ウサギ	1:200	Reprocell	RCAB004PF
	TRA-1 60	マウス	1:400	Millipore	MAB4360
	SSEA-1	マウス	1:400	Novus	NB100-1831
NCSC	Nestin	ウサギ	1:200	Novus	NB300-265
	CD271	マウス	1:200	Santa Cruz	SC-71695
SMC	MYH11	ウサギ	1:400	Abcam	ab82541
	Calponin	マウス	1:200	Sigma	C2687
	SM22 α	ウサギ	1:200	Abcam	ab14106
	α SMA	マウス	1:200	Dako	M0851

表 3 免疫染色に用いた二次抗体のリスト

	二次抗体	抗原	希釈濃度	製造会社	カタログ No.
抗マウス	Alexa Fluoro 594	ヤギ	1:1000	Thermo	A-11005
抗ウサギ	Alexa Fluoro 594	ヤギ	1:1000	Thermo	A-11012
抗ウサギ	Alexa Fluoro 488	ヤギ	1:1000	Thermo	A-11008

【フローサイトメトリー】

TrypLE Express を用いて細胞 (NCSC) を培養皿から剥離し、PBS に 10% FBS を溶解した溶液 (10% FBS/PBS) に懸濁し 15 ml チューブに回収した。1,200 rpm、16°C で 5 分間遠心し、上清を吸引除去した後、10% FBS/PBS で再度懸濁し自動細胞数計測器 (Countess、Thermo) を用いて細胞数を計測した。10% FBS/PBS で細胞を懸濁し、最終的な細胞濃度が $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるように調整した。使用した抗体は Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD271 抗体 (BD Biosciences) と Allophycocyanin (APC) 標識抗 CD57 抗体 (BD Biosciences) で、いずれも細胞 1×10^6 個当たり 1 μL を添加した。FITC 標識抗 CD271 抗体と APC 標識抗 CD57 抗体に対するアイソタイプコントロールとしてそれぞれ FITC 標識マウス IgG κ 抗体 (BD Biosciences) と APC 標識マウス IgM κ 抗体 (BD Biosciences) を用い、いずれも細胞 1×10^6 個当たり 1 μL を添加した。Attune Acoustic Focusing Cytometer (Thermo) を使用し、FITC の測定には 488nm レーザーおよび 530/30nm フィルタを、APC の測定には 638nm レーザーおよび 660/20nm フィルタを、それぞれ使用した。フローレートは 1.0 とし、イベント数が毎秒 2,000 を超えないようにした。

【RNA の抽出と cDNA 作製】

フィーダーフリー馴化後の iPS 細胞、NCSC の総 RNA は、培養皿から細胞を回収し PBS で洗浄してからペレット状にして、また SMC についてはコンフルエントに達した培養皿を 2 回 PBS で洗浄して 60mm 培養皿 1 枚から、総 RNA を抽出した。総 RNA の抽出には RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いた。得られた RNA の濃度と純度は、Nanodrop Lite (Thermo)、DS-11 NanoPad (DeNovix)、および Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) で測定した。Bioanalyzer (Agilent) での測定には Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent) を用いた。濃度と純度を測定したそれぞれの RNA は、後述のポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) と遺伝子発現マイクロアレイ解析に用いるため -80°C で保存した。

cDNA の作製は試薬の異なる 2 つの方法で行った。定性的 PCR に使用したものは、PrimeScrip 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) で、定量的 PCR に使用したものは High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo) で、それぞれ作製した。いずれも PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Takara Bio) を用いて作製した。

【定性的ポリメラーゼ連鎖反応】

iPSC から NCSC を経て SMC を誘導する過程で、iPSC や NCSC では SMC 特異的な遺伝子を発現しておらず、SMC では発現していることを確認するために、定性的

PCR を行った。プライマーには、SMC 特異的な遺伝子として、MYH11、ACTA2 (actin- $\alpha 2$: α SMA)、TAGLN (transgelin: SM22 α) を選び、内在性対照として GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を選択した。プライマーの設計は、過去の論文で使用されているプライマー配列を米国国立医学図書館のプライマー設計ウェブサイト “Primer-BLAST” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) に入力し、プライマー産物のサイズ (base pair) が大きくかつ他の標的遺伝子とオーバーラップしない配列を選んだ (表 4)。プライマーの作製は株式会社 Eurofins Genomics に依頼した。cDNA を Quick Taq HS Dye Mix (Toyobo) およびプライマーと混合し、PCR Thermal Cycler Dice Gradient にて反応させた。PCR 施行の際の annealing temperature とサイクル数は試行錯誤が必要であったが、最終的に表 4 に示した条件とした。PCR 産物は tris borate EDTA 緩衝液と ethidium bromide (Wako) を混合して作製したアガロースゲルのウェルに注入し、電気泳動槽 (Mupid-2x、Thermo) にて 25 分間電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) を用いてバンドの撮影を行った。遺伝子発現の有無についてバンドの吸光度を定性的に評価することで判断した。

表 4 定性的 PCR に用いた各遺伝子のプライマー配列と PCR 条件および PCR 産物のサイズ

遺伝子	プライマー配列 (Forward, F; Reverse, R)	アニーリ ング温度 (°C)	サイクル 数	PCR 産物 サイズ (bp)
MYH11	F: AGAGACAGCTTCACGAGTATGAG R: CTTCCAGCTCTCTTTGAAAGTC	58	30	204
ACTA2	F: GCGTGGCTATTCCTTCGTTACT R: ATCAGGCAACTCGTAACTCTTC	60	25	148
TAGLN	F: AGTGCAGTCCAAAATCGAGAAG R: CTTGCTCAGAATCACGCCAT	60	22	154
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	58	30	197

【定量的ポリメラーゼ連鎖反応】

作製した SMC の平滑筋および平滑筋前駆細胞マーカー遺伝子の発現解析、マイクロアレイ解析で得た発現変動遺伝子の発現量検証のために、前述の方法で SMC の

RNA から作製した cDNA を用いて、TaqMan 法にてリアルタイム PCR、すなわち定量的 PCR を行った。使用した TaqMan Gene Expression Assay (Thermo) は、SMC マーカー：ACTA2 (Hs00426835_g1)、平滑筋前駆細胞マーカー：CD31 (Hs01065279_m1)、CD34 (Hs02576480_m1)、もやもや病 SMC 発現変動遺伝子：DCN (Hs00754870_s1)、NDP (Hs00181129_m1)、SLITRK4 (Hs00331273_s1)、TIPRL (Hs00295580_m)、PCDHB8 (Hs00910055_s1)、PCDHB13 (Hs00251745_s1) である。内在性対照として housekeeping gene に GAPDH (Hs02786624_g1) を選択した。定量的 PCR 増幅反応には Light Cycler 96 (Roche) を用いた。すなわち、TaqMan Gene Expression Assay、TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo)、SMC の RNA から作製した cDNA を混合した 25 μ L の PCR 混合液に対し、1) 50°C で 2 分間、2) 95°C で 10 分間、3) 95°C で 15 秒間と 60°C で 1 分間の 2 段階増幅を 40 サイクルのプロトコールでリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR の測定結果は、GAPDH と健常者群を対照とする相対定量法 ($\Delta\Delta$ CT 法) により遺伝子発現定量に用いた。定量結果は Pfaffl らの方法 (Pfaffl, 2001) によりプライマー増殖効率で補正した。

また、SMC の 2 つの表現型の作り分けに際して、作製した SMC が収縮型か合成型かを判断する目的でも定量的 PCR を施行した。こちらの解析は、FastStart Essential DNA Green Master (Roche) と各々の遺伝子のプライマーを用いた SYBR Green I 色素法による定量的 PCR を行った。この際、iPS 細胞からの 2 つの表現型の SMC の作り分けのプロトコールについて報告した Yang らの論文と同一のプライマーを用いるため (Yang et al., 2016)、定性的 PCR で用いたプライマーとは異なるプライマーを使用した (表 5)。なお、GAPDH は定性的 PCR で用いたものと同じ配列のプライマーを使用した (表 4)。Yang らの論文では、 $\Delta\Delta$ CT 法により、収縮型と比較して合成型では MYH11、ATGLN、CNN1 (以上 $P < 0.01$)、ACTA2 ($P < 0.05$) が有意に発現低下していることをもって、2 つの表現型を区別しており、本研究でもその判断に基づいた (Yang et al., 2016)。

表 5 定量的 PCR に用いた各遺伝子のプライマー配列。

遺伝子	プライマー配列	
	(Forward, F; Reverse, R)	
MYH11	F:	AGGCGAACCTAGACAAGAATAAG
	R:	CTGGATGTTGAGAGTGGAGATG
ACTA2	F:	GATCTGGCACCCTCTTTCTAC
	R:	CAGGCAACTCGTAACTCTTCTC
TAGLN	F:	GAAGAAAGCCCAGGAGCATAA
	R:	CCAGGATGAGAGGAACAGTAGA
CNN1	F:	ATGTCCTCTGCTCACTTCAAC
	R:	CACGTTACCTTGTTTCCTTTC
GAPDH	F:	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	R:	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

【マイクロアレイ解析】

遺伝子発現マイクロアレイのハイブリダイゼーション反応、染色、測定実施は、株式会社ジェネティックラボの GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) 受託解析サービスを利用した。測定実施と測定結果のクオリティチェック (QC) は、GeneChip の仕様書に準じて実施した。iPS 細胞由来 SMC から抽出保存した RNA サンプルは、ジェネティックラボ社の仕様準拠に準じて同社に送付した。

QC を満たした SMC の遺伝子発現マイクロアレイ測定結果は mas5.CHP ファイルとして取得し、先行研究で同じアレイプラットフォームを使用して取得した EC の遺伝子発現マイクロアレイ測定結果と共に、GeneSpring14.9.1 (Agilent) を用いて以後の解析に用いた。すなわち、本研究ではマイクロアレイ測定結果の QC 測定、取得プローブデータの統合 (summarization) と正規化は、Affymetrix MicroArray Suite 5 (MAS5) algorithm に従った。SMC、EC それぞれで、全 6 サンプルで present flag がたったプローブデータを GeneSpring に取り込み、quantile normalization し解析に用いた。第一に、教師なし主成分分析 (principal component analysis: PCA) により、SMC、EC それぞれ 6 サンプルの遺伝子発現プロファイルの均質性を視覚的に 2 次元および 3 次元でプロットした。2 次元プロットは第 1 主成分 (principal component 1: PC1) と PC2 で行い、二群間の差異が認められなければ PC1 と PC3、PC1 と PC4、と組み合わせて差異が見られるまで行った。3 次元プロットには PC1~3 を用いた。第二に、もやもや病と健常者の二群間の発現変動遺伝子解析を行った。発現変動比較

は、GeneSpring に搭載された対応の無い Student の t 検定の変法である moderated t 検定を行い、多重比較補正は行わなかった。発現変動比が二群間で 3 倍以上かつ P 値が 0.05 未満の遺伝子を発現変動遺伝子と定義した。SMC、EC それぞれで得られた発現変動遺伝子は、距離尺度にユークリッド距離、クラスター化法に Ward 連結法を用いて、階層的クラスター解析に供した。

【細胞増殖能アッセイ】

分化誘導した SMC の増殖力を Cell Counting Kit-8 (CCK-8、Dojindo) を用いて解析した。SMC がコンフルエントになり継代を要するタイミングで、SMC を Accutase にて剥離し、15mL チューブに回収し、 $200\times g$ 、 16°C で 5 分間遠心を行い、上清を取り除いた。10,000 個/100 μL になるように DMEM/10% FBS で細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を、96 ウェルプレートに 10,000 個/ウェル (=100 μL /ウェル) となるように播種し (コーティングはなし)、 37°C 、5% CO_2 で培養した。細胞を播種して 2 時間後に、10 μL の CCK-8 を加えた。150 分後にマイクロプレートリーダー (Sunrise-Basic、Tecan) で 450 nm の吸光度を測定し、この値を基準値とした。450nm はホルマザン色素の発する波長で、生細胞数に比例する。さらに、別のウェルで 24 時間、72 時間培養したものを同様に CCK-8 で処理し、450 nm の吸光度を測定した。24 時間、72 時間時点における測定値の基準値に対する比を各時点における相対的生細胞数とし、基準値から 24 時間後および 72 時間後の相対的生細胞数の推移を回帰直線に近似し、その回帰直線の係数を細胞増殖能として解析した。

【細胞遊走能アッセイ】

SMC の遊走能 (移動能) を解析するため、トランズウェルメンブレンを有するインサート (トランズウェルインサート) とインサート用細胞培養プレート (24 ウェルプレート) のキットを利用した。プレートのサイズは 24 ウェルとし、インサートメンブレンの小孔径は過去の論文を参考に、SMC の遊走に適した 8 μm (BD bioscience) を選択した (Phi et al., 2017)。メンブレンの素材やコーティングの組み合わせも複数の選択肢があったが、途中で顕微鏡にて状態を観察可能な polyethylene 製で、コーティングなしのものを使用した。細胞増殖能アッセイと同様に細胞を回収し、5,000 個/100 μL になるように DMEM/10%FBS で細胞を懸濁し、インサートに 25,000 個/ウェル (=500 μL /ウェル) となるように播種した。同じ培地でウェルを満たした 24 ウェルプレートの各ウェルにインサートを静置し、 37°C 、5% CO_2 で 24 時間培養した。その後、インサートを引き上げ、綿棒でインサートの表側 (細胞を播種した側) を優しくぬぐい取り、小孔を通過して裏側へ遊走せずに残った細胞を除去した。インサートの膜の裏側に遊走し残った細胞は、100%メタノール (Wako) で固定し、ライトギム

ザ染色溶液 (Muto Pure Chemicals) にて染色し、メスでインサートとの付着部を切断し膜のみとして、プレパラートに埋包した。膜の辺縁のインサートの隅に当たる部分には綿棒で拭い取られていない細胞も存在することから、膜の中心部のみを顕微鏡にて観察し、単位面積あたりに染色された細胞の個数を遊走細胞数として計測した。

【細胞収縮能アッセイ】

SMC の収縮能を解析するため、過去の論文を参考にして、収縮誘発物質であるカルバコール (コリン作動薬の一種) を SMC に添加した際の収縮の程度を定量的に評価した (Jiao et al., 2016; Kinnear et al., 2013; Yang et al., 2016)。細胞増殖能アッセイと同様に細胞を回収し、5,000 個/100 μ L になるように DMEM/10% FBS で細胞を懸濁し、6 ウェルプレートに 45,000 個/ウェル (=900 μ L/ウェル) となるように播種した。37°C、5% CO₂ で 24 時間培養し、細胞が接着し SMC の形態となっていることを確認後、培地を交換し、6 ウェルプレートごと収納できて 37°C、5% CO₂ の環境を維持できる恒温装置 (Keyence) に移し、タイムラプス撮影が可能な顕微鏡 (BZ-H3XT、Keyence) で細胞の様子を培養状態のまま観察できるようにセッティングした。その状態で 30 分培養して恒温装置内の環境が安定したところで、一時的に恒温装置を開けて対象となるウェルにカルバコール (Sigma) を最終濃度 1mM となるように加え、優しくピペッティングすることで攪拌した。カルバコール添加直後を 0 分として、45 秒ごとに 50 回の撮影を行った (合計 37.5 分)。顕微鏡の多点撮影機能を利用して、5 視野の定点撮影を行い、合計 20 個の細胞の面積の変化率を計測した。具体的には、BX Analyzer (Keyence) を用いて 0 分と 37.5 分後の細胞の面積を計測し、その変化率 (収縮率) を算出した。また、50 回の撮影を動画にすることで視覚的に収縮の様子が観察できるビデオデータも作成した。なお、カルバコールにより収縮していることを証明するために、全 6 サンプルで、カルバコールの代わりに同量の培地 (vehicle) を添加して同様にタイムラプス撮影を行い細胞の収縮率を算出した。

【管腔形成能アッセイ】

SMC の管腔形成能を解析するため、先行研究を参考にして Geltrex 上に細胞を播種した (Hamauchi et al., 2016)。96 ウェルプレートに 40 μ L/ウェルずつ Geltrex (Thermo) を加え、30 分間 37°C、5% CO₂ で培養した。SMC は細胞増殖能アッセイと同様に回収し、5,000 個/100 μ L になるように DMEM/10%FBS で細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を、Geltrex を添加した 96 ウェルプレートに 5,000 個/ウェル (=100 μ L/ウェル) となるように播種し、37°C、5% CO₂ で培養した。12 時間後、位相差顕微鏡 (IX71、Olympus) を用いて 4 倍の対物レンズで内皮細胞による管腔形成を観察し、写真を撮影した。

【統計学的解析】

マイクロアレイ解析を除く統計学的解析は Prism 8.2.1 (GraphPad Software) を用いて行い、連続変数は平均値±標準誤差で表記した。マイクロアレイ実験のために使用した統計学的手法は先の項目で述べた。NCSC のフローサイトメトリー測定結果、SMC 増殖能の線形回帰、遊走能解析には、対応の無い Student t 検定（両側検定）を行った。定量的 PCR や免疫細胞化学での SMC のマーカー発現比較、SMC の収縮能解析では通常および反復測定二元配置分散分析をそれぞれ行い、Sidak の多重比較補正を行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意と判定した。

結果

【iPS 細胞の起眠とフィーダーフリーへの馴化】

6 サンプルとも、iPS 細胞を凍結保存から起眠させた。実験開始初期には、起眠した iPS 細胞が MEF 上に生着せず、細胞死に至ることが多かったが、細胞の融解から培地内への回収までの時間を短縮し、細胞融解時のピペッティング回数を最小限に抑えることで、融解後の細胞生着率を改善することができた。最終的に、6 サンプルすべての iPS 細胞を MEF 上で安定的に培養、継代することに成功した (図 3)。

マイコプラズマ検出アッセイを行い、6 株すべての iPS 細胞で MycoAlert の測定値 (B/A) が 0.9 未満であることを確認した。

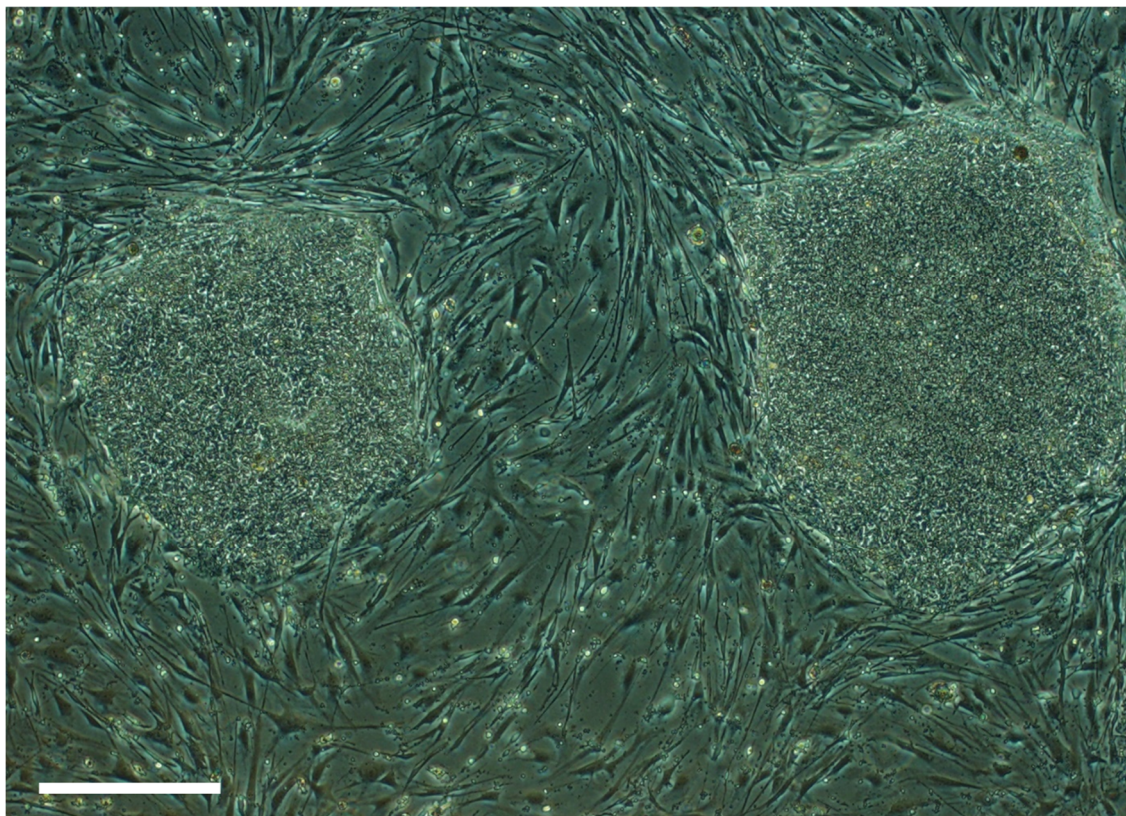


図 3 MEF 上に起眠し培養した iPS 細胞 (MMD-1)。Scale bar: 400 μ m

引きつづき、iPS 細胞のフィーダーフリーへの馴化を行った。MEF 上で安定培養状態にある iPS 細胞を、フィーダーフリー状態へ馴化する際、最も安定的に馴化するのに適切なコーティングと培地を選択することに時間を要した。iPS 細胞のフィーダーフリーへの馴化やフィーダーフリー状態の iPS 細胞の培養に関して述べられた過去の

論文や製薬会社や研究所のウェブサイトで公開されているプロトコルを参照し、コーティングは fibronectin、vitronectin を、培地は BSA を添加した chemically defined medium (CDM) -BSA、Essential 8 を試した (Chen et al., 2011; Cheung et al., 2014; Hayashi et al., 2010)。CDM-BSA は chemically defined lipid concentration、transferrin、insulin、monothioglycerol、BSA から成る培地で、Essential 8 は iPS 細胞の成育に最低限必要な DMEM/F12、L-アスコルビン酸、セレン、transferrin、insulin、bFGF、TGF- β 1、NaHCO₃ の 8 成分のみから成る培地である (それぞれの濃度は非公開)。最も馴化効率がよく、馴化後の培養も安定していた組み合わせが、vitronectin コーティングで Essential 8 を培地にした組み合わせであった。そのため、以後の実験も同様の組み合わせにて進めた。

全 6 サンプルについて、MEF 上で培養していた iPS 細胞を起眠から 4 継代以内に、フィーダーフリーへの馴化を行った。全 6 サンプルとも、フィーダーフリーへ馴化後の細胞 (コロニー) 形態は過去の論文やプロトコルで報告されているフィーダーフリーの iPS 細胞と同一で、サンプル間に形態上の差異はなく、いずれのサンプルも問題なく増殖し、継代しても分化せずに未分化状態を維持していた (図 4)。未分化状態 (多能性) を維持していることを証明するために免疫染色を行ったが、図 5 に示したように多能性のマーカーである Oct 3/4、Nanog、TRA-1 60、SSEA-4 に陽性であり、多能性を維持していることが証明された。

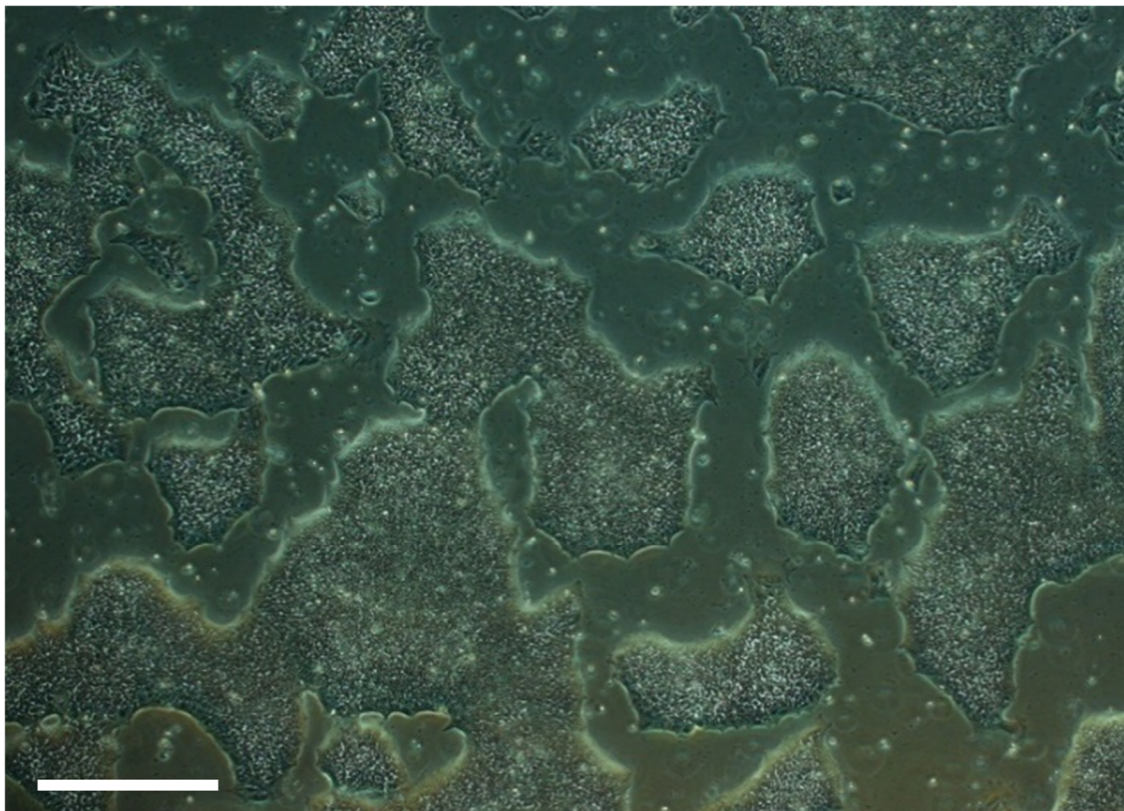


図4 フィーダーフリーに馴化した iPS 細胞 (MMD-2)。Scale bar: 400 μ m

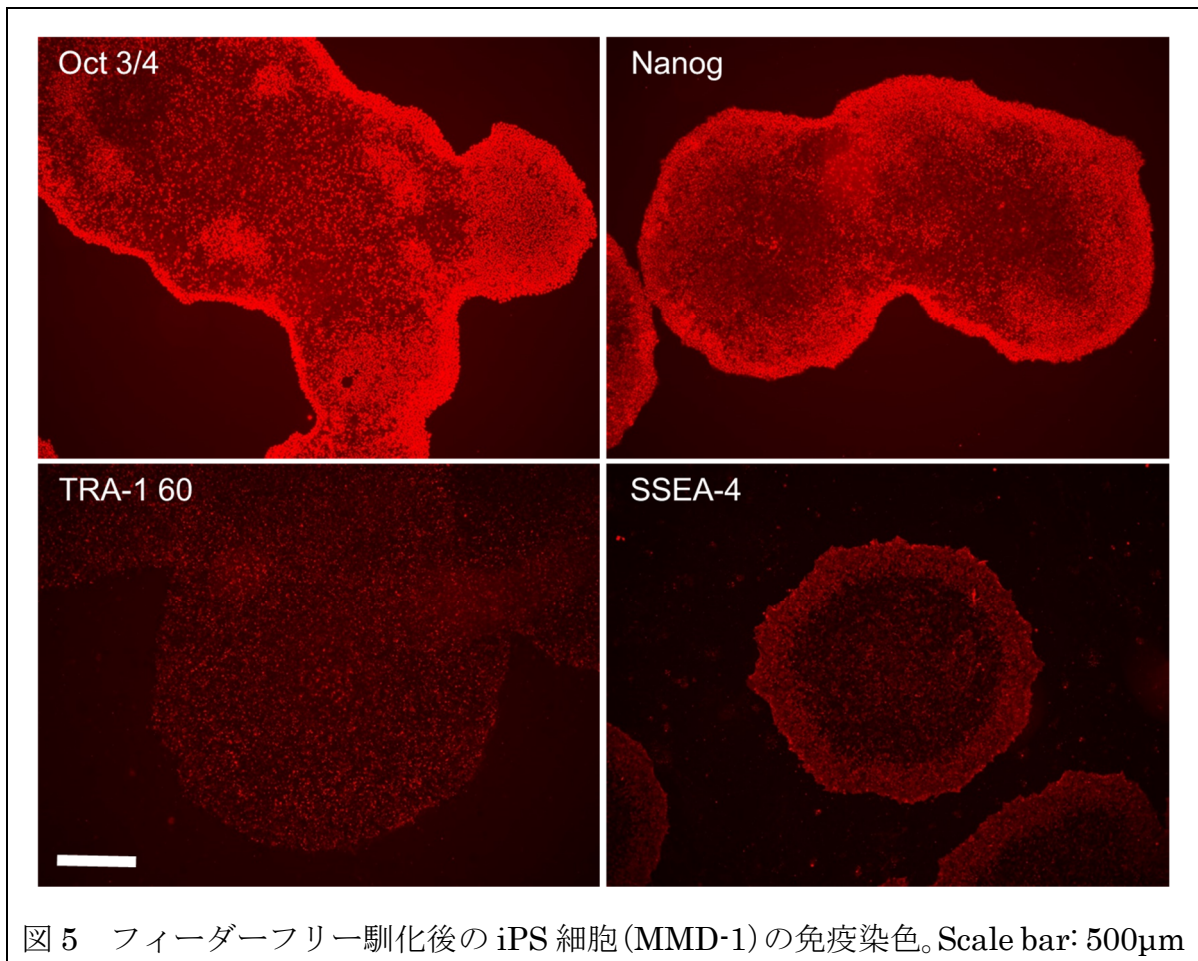


図 5 フィーダーフリー馴化後の iPS 細胞 (MMD-1) の免疫染色。Scale bar: 500μm

【神経堤幹細胞への分化誘導】

フィーダーフリーに馴化させた iPS 細胞を神経堤幹細胞 (NCSC) へ分化誘導する際には、培養皿、培地の成分、播種時の密度に後述するような工夫を要し、それらの組み合わせで最適なものを見出すのに時間を要した。

まず、培養皿に関しては、とくに過去の論文ではコーティングについて述べられているものはないものの、コーティングなしでは iPS 細胞が播種翌日に接着せず死滅してしまうため、iPS 細胞培養時と同様に vitronectin でコーティングすることとした。培養皿は Thermo 社製の 60mm 培養皿を用いた。しかし、この条件では、播種翌日には細胞は接着していたが、培養日数を重ねるごとに徐々に細胞がコロニーから脱落、死滅してしまい、10~13 日間経過してコンフルエントになるまでにほとんどコロニーが崩壊し十分な密度、細胞数の NCSC を安定的に確保することが困難であった (図 6)。そのような中、60mm 培養皿 Thermo ではなく、6 ウェルプレート (BD biosciences) を用いて NCSC の培養を行った際、明らかに播種した細胞の生存率が高いという現象が認められた。他の iPS 細胞株でその検証を行っても同様であった。これらの 60mm 培養皿と 6 ウェルプレートの底面加工の差異に関して調べた結果、Thermo 社製の

60mm 培養皿は Nunclon Delta という物質による親水性処理が施されている一方、BD bioscience 社製の 6 ウェルプレートは何ら特殊なコーティングはなされていないことがわかった。vitronectin でコーティングを施した状態でこの親水性処理がどのように細胞の接着や分化に影響を及ぼすかの検証まではしていないが、以後 BD biosciences 製のプレコーティングなしの 60mm 培養皿を使用するようにしたところ、6 ウェルプレートと同様に安定した細胞の接着、培養を遂行することができた。

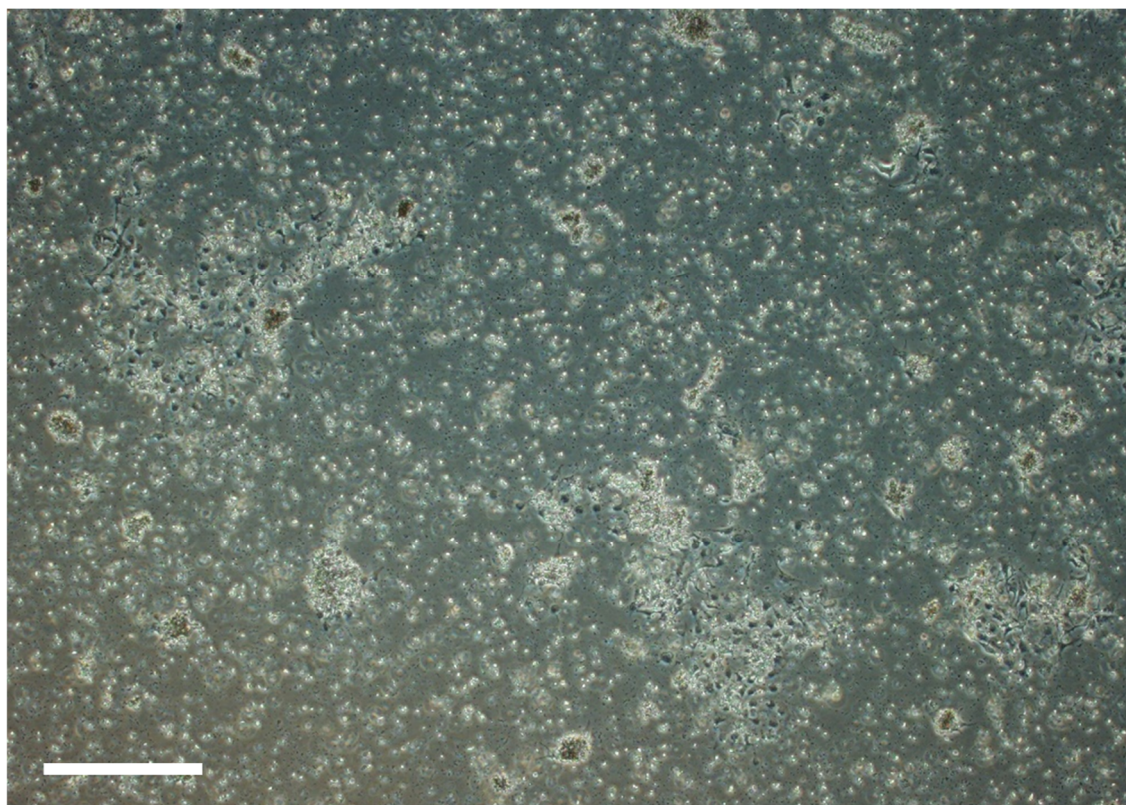


図 6 iPS 細胞から NCSC への分化誘導 (MMD-3) を開始し、培養 11 日目の顕微鏡写真 Scale bar: 400 μ m

培地の成分に関しては、最初は過去の論文で報告されている培地の成分にならうこととした。Cheung らの論文では、CDM-polyvinyl alcohol (CDM-PVA) をメインに、12ng/mL bFGF と 10 μ M SB431542 が添加物として用いられていた (Cheung et al., 2014)。CDM-PVA は、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium、Thermo)、DMEM/F12 (Wako) をメインに chemically defined lipid concentration、transferrin、insulin、monothioglycerol、PVA、ペニシリン - ストレプトマイシンが含まれている培地である。また、Jiao らの論文では、播種直後からは Y-27632 を添加した TesRE8 (Stemcells) を使用し、40~60%コンフルエントになった段階で DMEM/F12 をメイ

ンに N2 (Thermo)、noggin、SB431542 が添加物として用いられていた (Jiao et al., 2016)。TesRE8 は現在多数の会社から発売されているフィーダーフリー iPS 細胞用の動物由来成分を含まない培地の一種であり、本研究では同様のカテゴリーの培地である Essential 6 に細胞の生育をより安定化させる目的で chemically defined lipid concentration、monothioglycerol、50U/mL ペニシリン - 50µg/mL ストレプトマイシンを加えたものを基礎培地とした。Essential 6 は Essential 8 の成分のうち bFGF と TGF-β1 が入っていない、iPS 細胞の生存に最低限必要な DMEM/F12、L-アスコルビン酸、セレン、transferrin、insulin、NaHCO₃ の 6 成分のみから成る、分化誘導に適した培地である (それぞれの濃度は非公開)。

しかし、それぞれの論文で記載されている培地の構成では、分化誘導効率が悪く安定的に NCSC を分化誘導できなかった。そのため、2 つの論文で記載されている試薬を組み合わせることでの最適条件を模索した (Cheung et al., 2014; Jiao et al., 2016)。施行錯誤の結果、Essential 6 から成る基礎培地をメインに、bFGF、SB421542、noggin、Y-27632 の組み合わせにすると分化誘導効率が良かったため、以後の実験ではこの培地で行うこととした。

播種時の密度に関しては、上述の論文で 10～13 日間の培養の間に継代を行わないとされていたため、継代をせずに培養を行って 10 日以内にオーバーコンフルエントとならないように密度を低く播種する必要があった。しかし、播種時の密度 (継代比率) が低すぎると、iPS 細胞の接着、生存が不良となるというジレンマがあった。そのため、全 6 サンプルで、1:5～1:50 の播種密度を複数回試すことで、1:20～1:30 であれば、10～13 日後にちょうど 70～90%コンフルエントになるということがわかった。

これらの施行錯誤を経て、最終的には方法の項で示したプロトコールとなり、安定的に iPS 細胞から NCSC を分化誘導することが可能となった。分化誘導した NCSC はコロニーを形成し、ときにその中心部に細胞の盛り上がりによる塊の形成を認めた。分化誘導の日数ごとの経過を図 7 に、分化誘導後の NCSC を図 8 に、それぞれ示した。

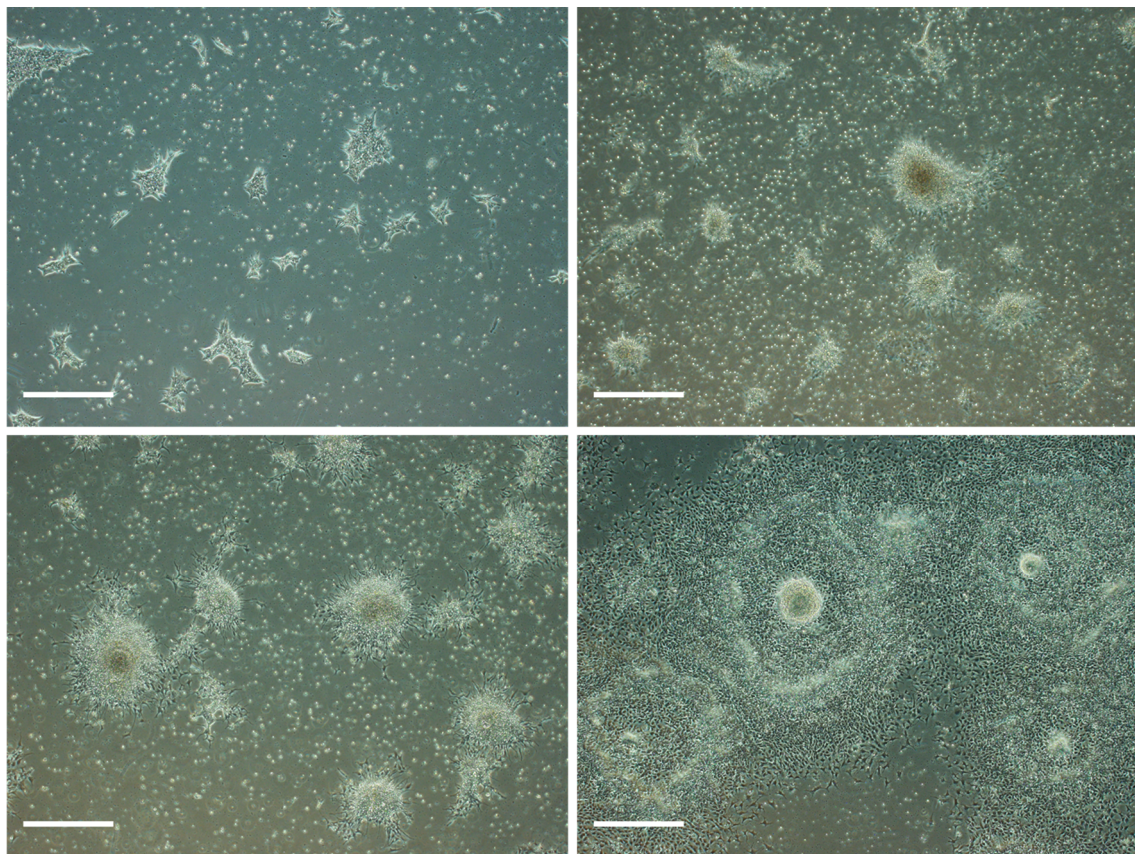


図 7 iPS 細胞から神経堤幹細胞への分化誘導過程 (MMD-2)。左上：培養 3 日目。右上：培養 7 日目。左下：培養 9 日目。右下：培養 12 日目。Scale bar: 400 μ m

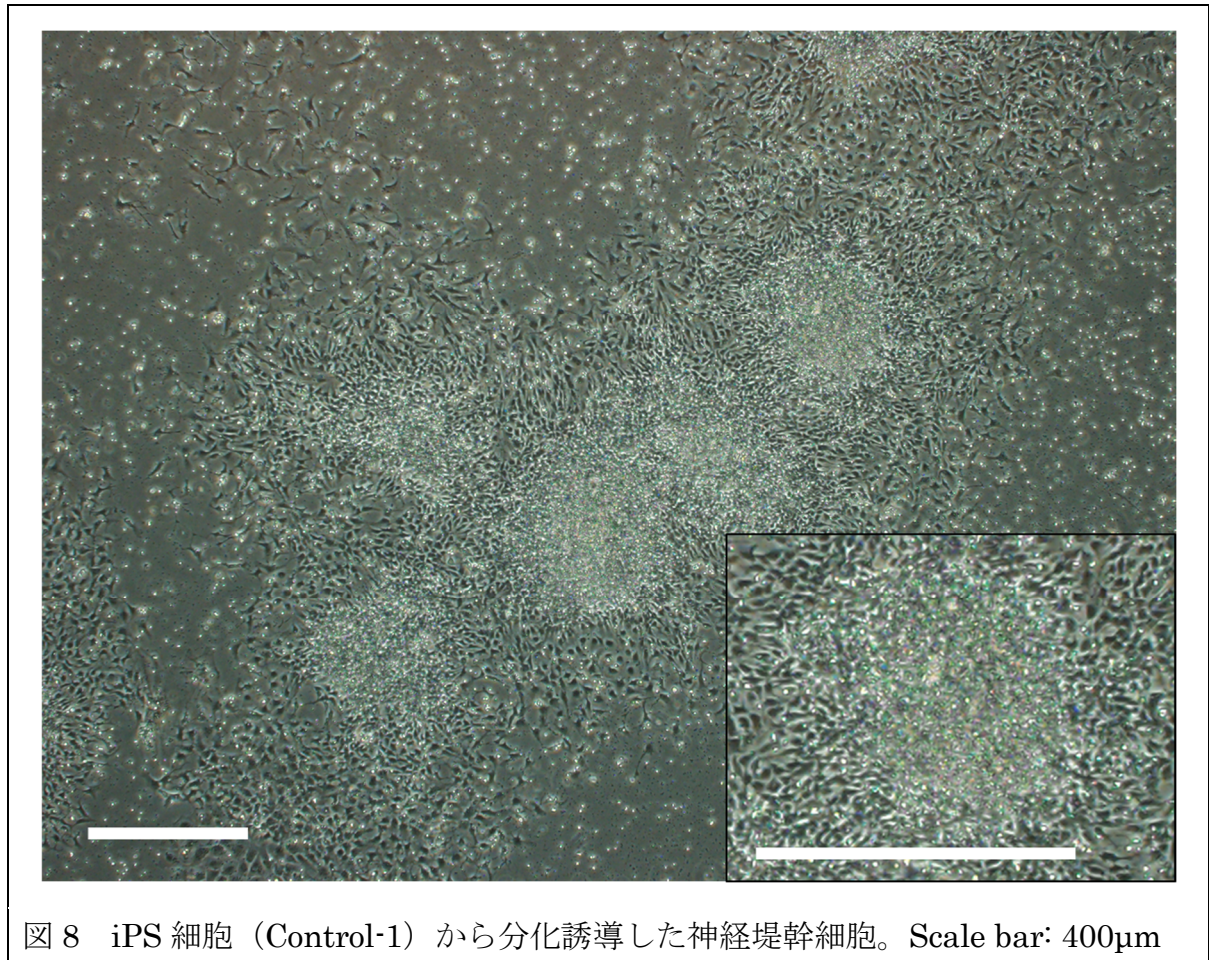
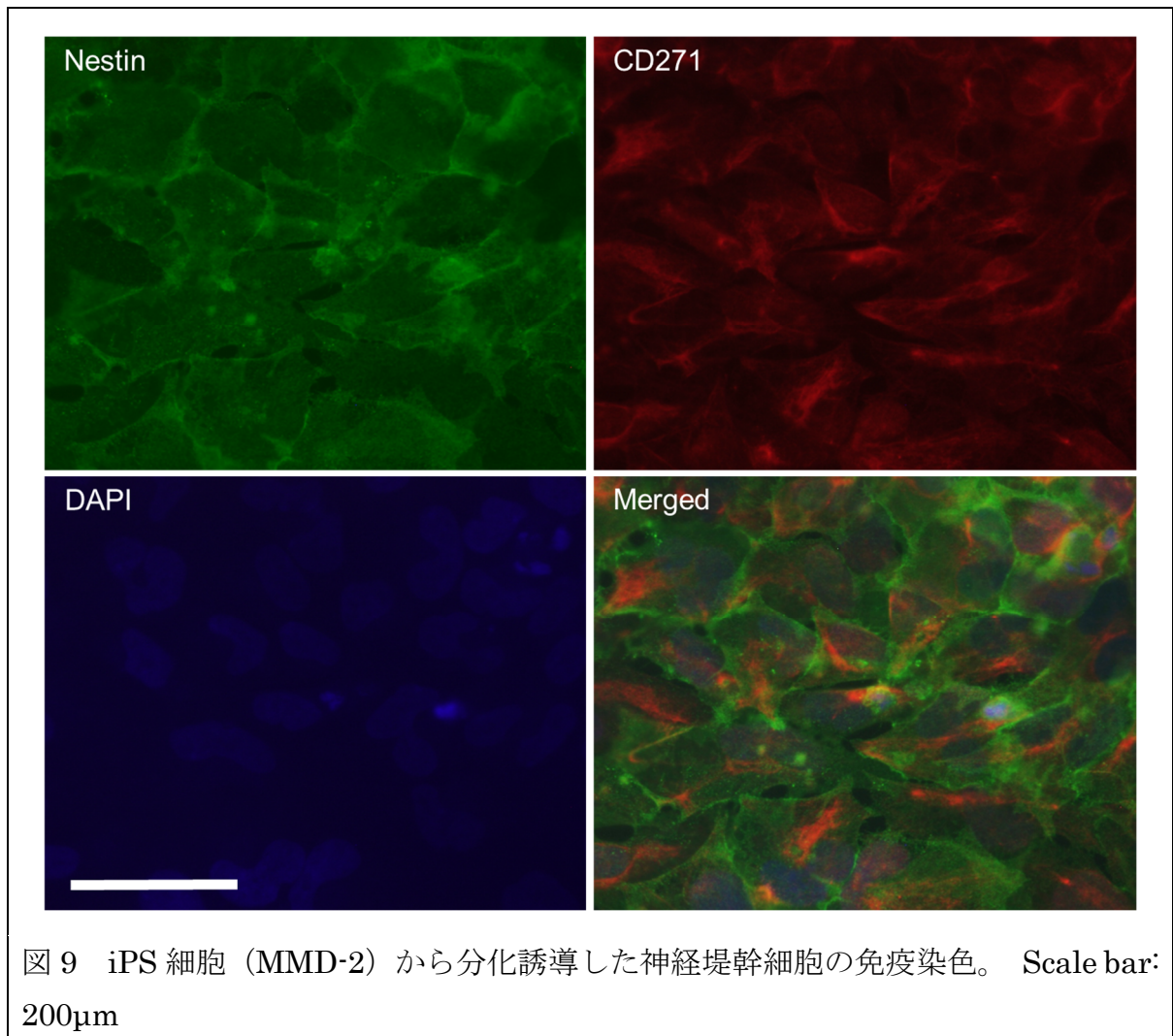


図 8 iPS 細胞 (Control-1) から分化誘導した神経堤幹細胞。Scale bar: 400 μ m

我々のプロトコールで分化誘導した細胞が、NCSC であることを証明するために、免疫染色とフローサイトメトリーを行った。免疫染色では、中枢神経系の幹細胞や神経前駆細胞のマーカーである Nestin と、nerve growth factor receptor であり神経細胞に分布する CD271 の抗体で染色し、いずれも陽性であることが確認できた (図 9)。フローサイトメトリーでは、CD271 と同じく NCSC のマーカーとして認知されている CD57 の陽性率も測定した。CD57 は神経外胚葉組織に発現している human natural killer-1 (HNK-1) 糖鎖抗原のことである。いずれも高い陽性率を示し、全 6 サンプルで二重陽性率が 94.9%以上であった (図 10)。このため、CD271 および CD57 によるソーティングを行う必要はないものと判断し、分化誘導した細胞は NCSC として以後の実験にそのまま使用した。



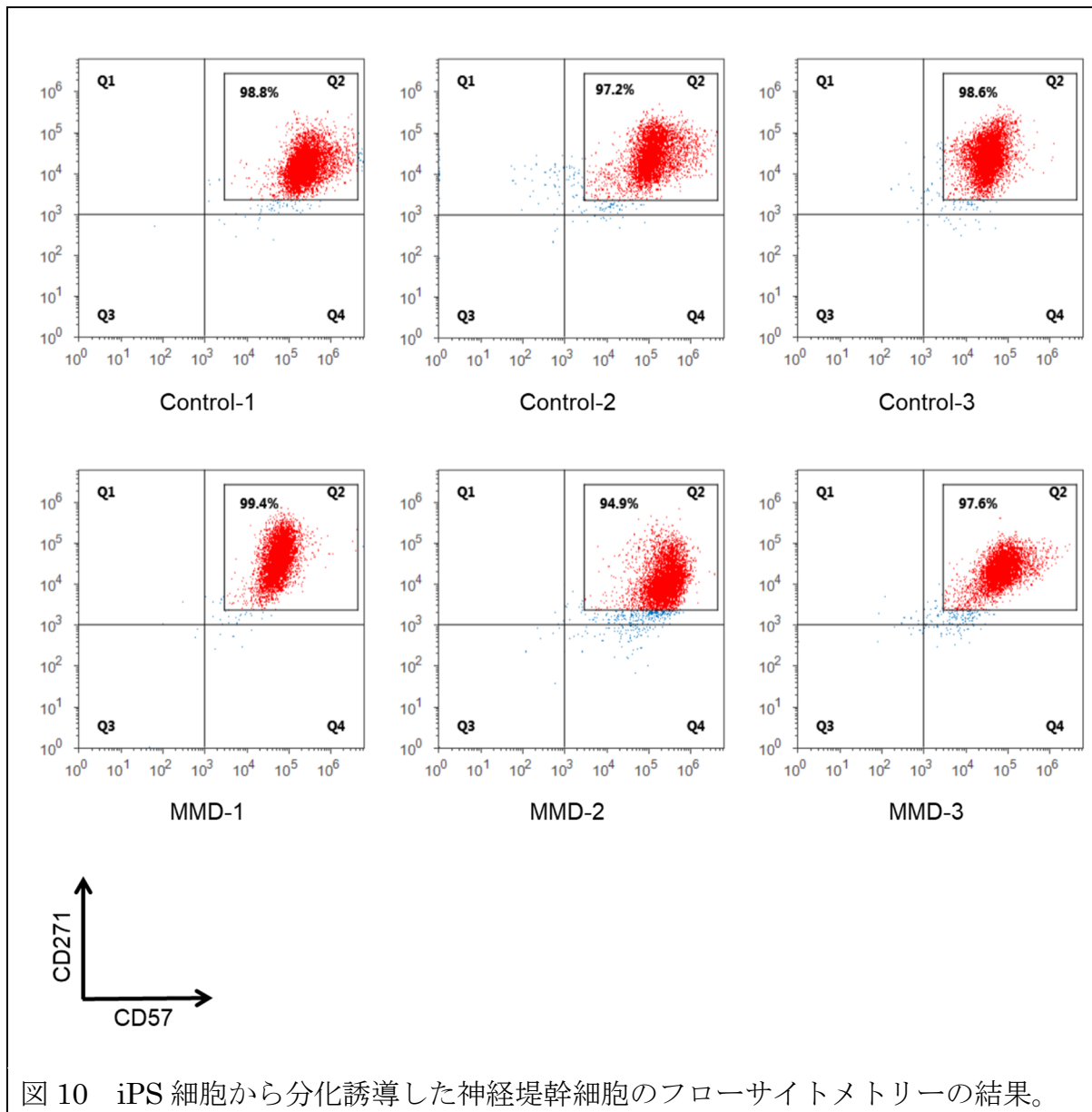


図 10 iPS 細胞から分化誘導した神経堤幹細胞のフローサイトメトリーの結果。

【神経堤幹細胞から血管平滑筋細胞への分化誘導】

神経堤幹細胞 (NCSC) から血管平滑筋細胞 (SMC) へ分化誘導する際も、過去の論文通りのプロトコルを施行してもやはり安定して SMC まで分化誘導させることができず、培養皿のコーティング、培地の成分に試行錯誤を要した。

培養皿のコーティングに関しては、ゼラチンコーティングの報告や Matrigel (BD biosciences) コーティングの方法があったが、結果的にこれまでフィーダーフリー状態の iPS 細胞の培養や NCSC の分化誘導に用いてきたのと同じく、vitronectin でコーティングする方法が一番安定的であった。ただ、培養期間中の継代時や分化誘導した SMC の完成時、細胞を剥離する際にコーティングした vitronectin ごと剥がれてしまうという現象があり、オーバーコンフルエントには注意する必要がある。

培地の成分に関しては、Cheung らの論文では CDM-PVA に TGF- β 1 と PDGF-BB を添加した構成で、Jiao らの論文では最初の 3 日間は DMEM/F12 に N2 (Thermo)、epithelial growth factor、bFGF を添加した構成で(さらに初日のみ Y-27632 も添加)、その後は DMEM/F12、KSR、TGF- β 1 に切り替える、といった培地構成であった。いずれのプロトコールも試したが、細胞死が多く、SMC を誘導することができなかった。そこで、まずは培地を NCSC への分化誘導時と同様に Essential 6 からなる基礎培地に変更した。そのうえで、Cheung らの論文にならって TGF- β 1 と PDGF-BB を添加した培地での分化誘導を試みたが、やはり生育が不良であった。SMC への分化誘導では NCSC への分化誘導の際の教訓から培養皿は最初からコーティングなしの Thermo 製の 60mm 培養皿を用いていたが、それでも最初の数日での細胞の接着、生存が不良という現象がメインであった (図 11)。

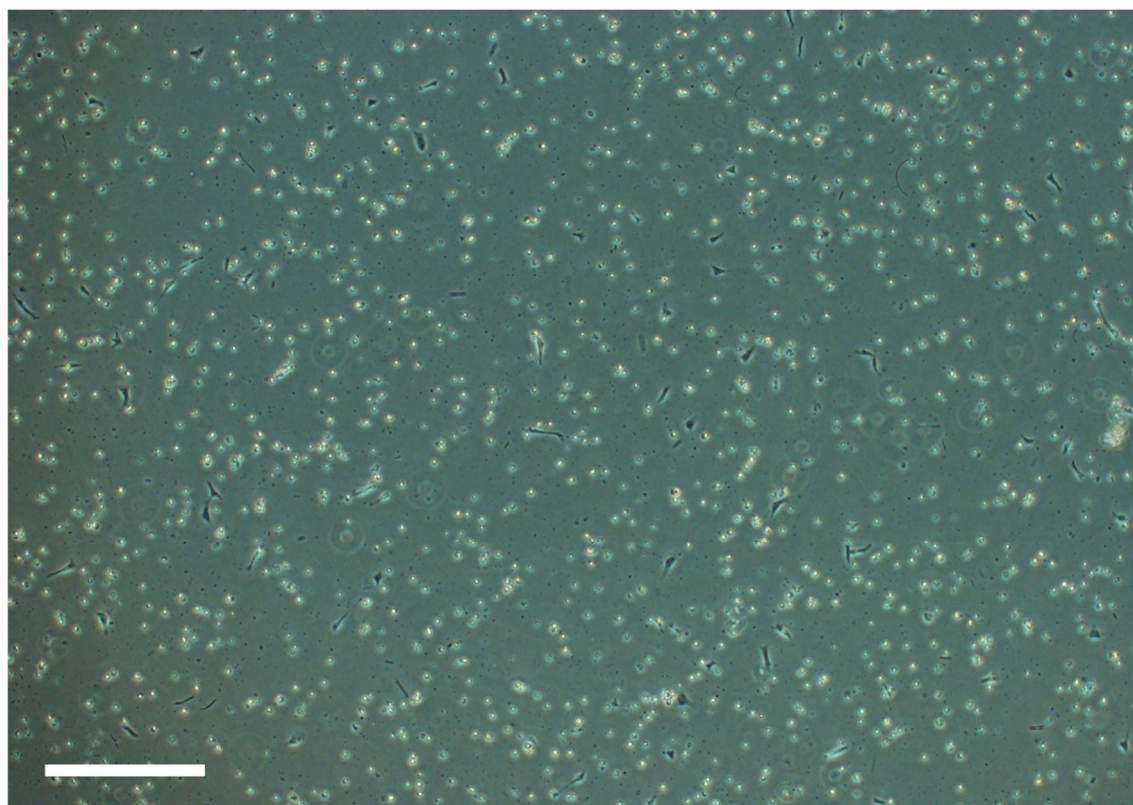


図 11 Essential 6 からなる基礎培地に TGF- β 1 と PDGF-BB を添加した培地で NCSC から SMC への分化誘導を開始し、培養 5 日目に撮影した顕微鏡写真。Scale bar: 400 μ m

Y-27632 は細胞接着を促進すると報告されており、Jiao らの論文にならって分化誘導の初日のみ培地に添加すると、格段に接着、生存率が改善した (Jiao et al., 2016)。

その後は、培養により順調に細胞数が増加するとともに SMC の形態に近づいていき、一度の継代を経て 12 日間で安定的に SMC が樹立できるようになった。全 6 サンプルで、安定的に SMC を作製できるようになった。分化誘導の日数ごとの経過を図 12 に、分化誘導後の SMC を図 13 (コントロール) と図 14 (MMD) に、それぞれ示した。

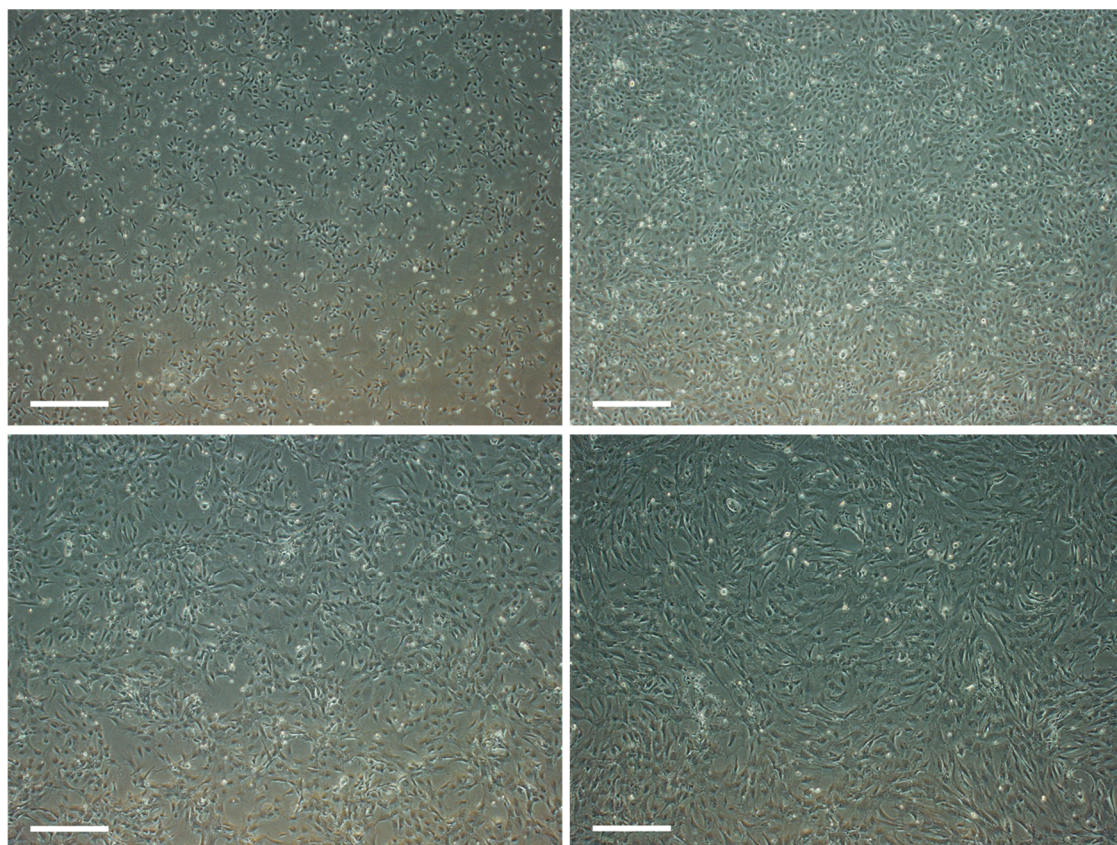


図 12 神経堤幹細胞から血管平滑筋細胞への分化誘導過程 (MMD-2)。左上：培養 2 日目。右上：培養 5 日目。左下：培養 9 日目。右下：培養 13 日目。 Scale bar: 400 μ m

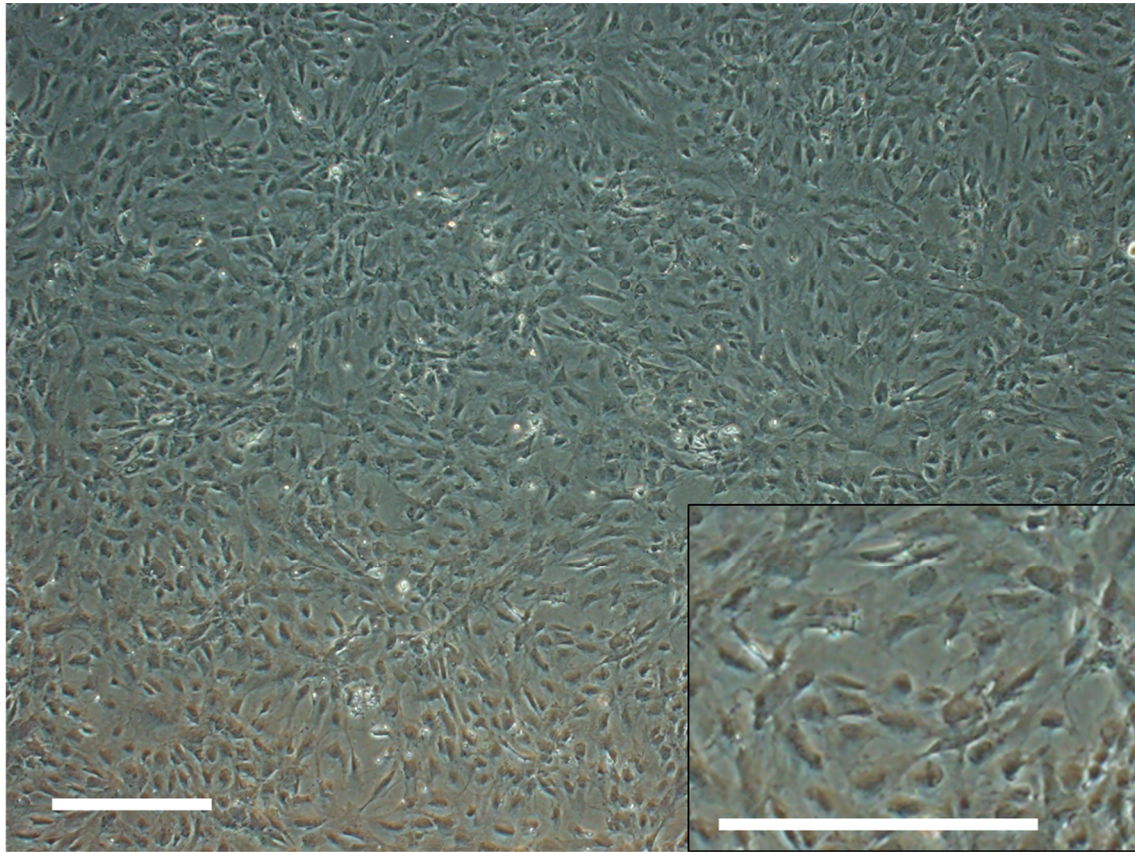


図 13 iPS 細胞 (Control-2) から神経堤幹細胞を経て分化誘導した血管平滑筋細胞の顕微鏡写真。Scale bar: 400 μ m

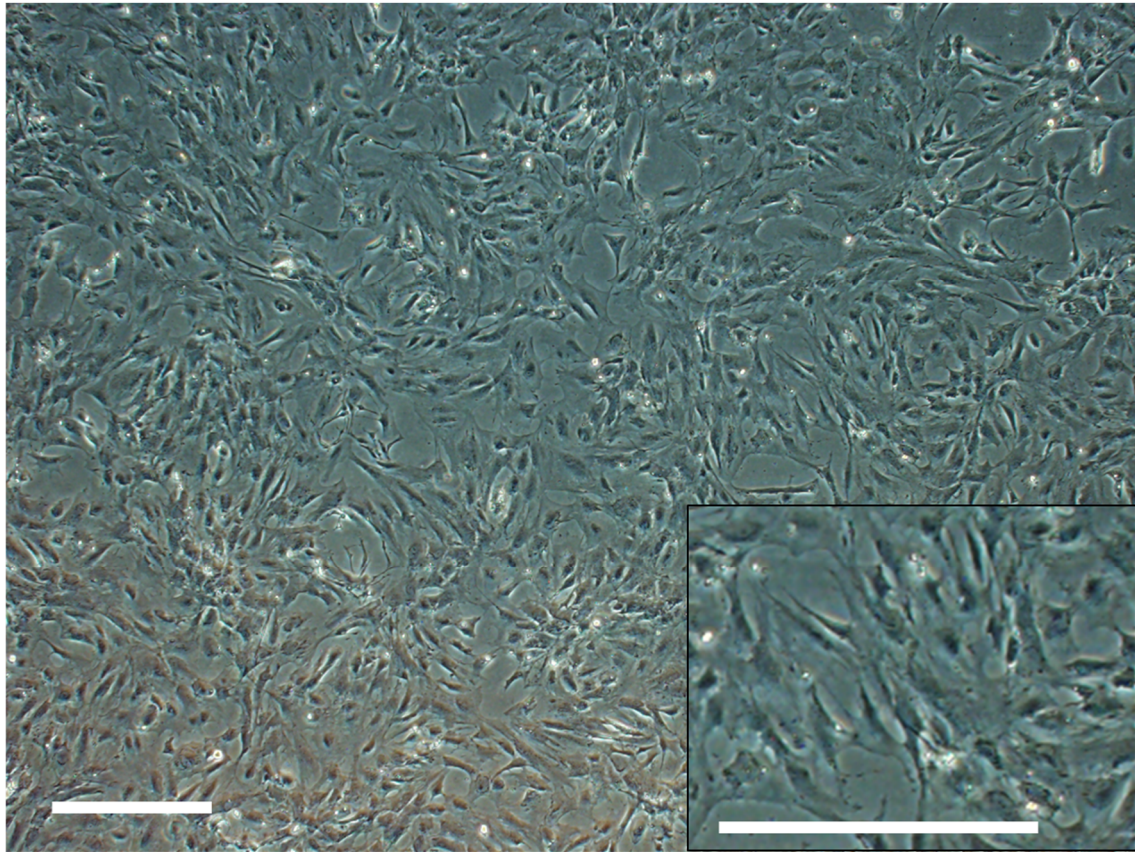


図 14 iPS 細胞 (MMD-3) から神経堤幹細胞を経て分化誘導した血管平滑筋細胞の顕微鏡写真。Scale bar: 400μm

分化誘導した細胞に対して免疫染色を行ったところ、SMC に特徴的なマーカーである myosin heavy chain-11 (MYH11)、calponin、smooth muscle 22- α (SM22 α)、 α -smooth muscle actin (α SMA) がいずれも陽性であり、我々のプロトコールで得られた細胞は SMC であることが証明できた (図 15、図 16) (Steinbach and Husain, 2016)。

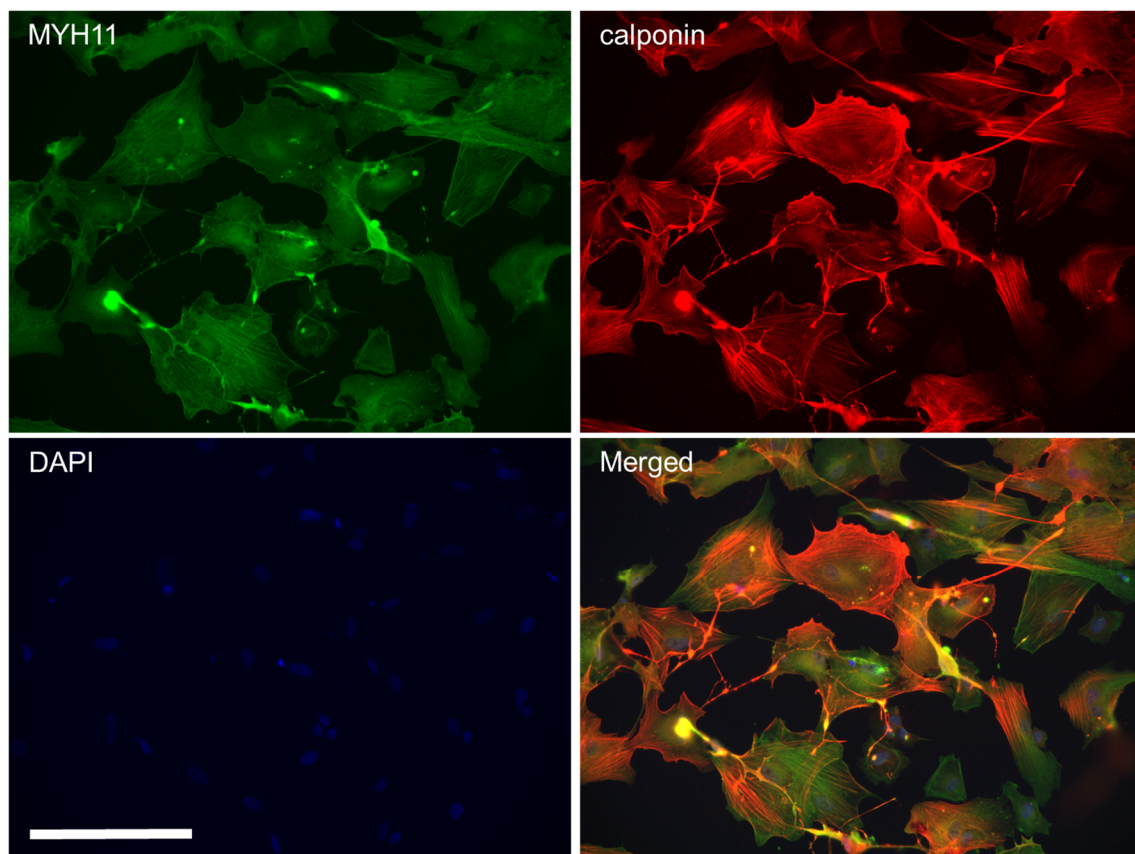
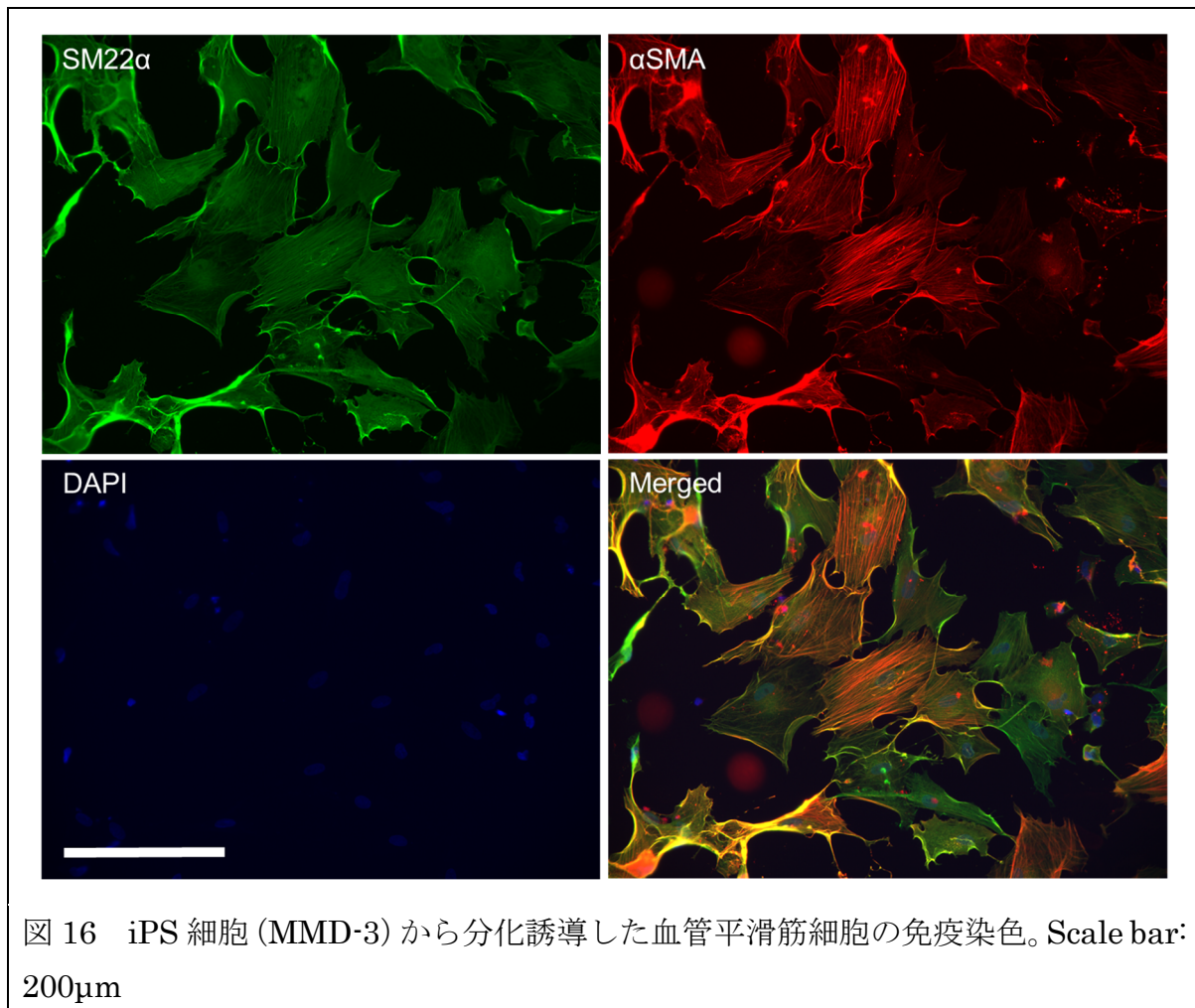
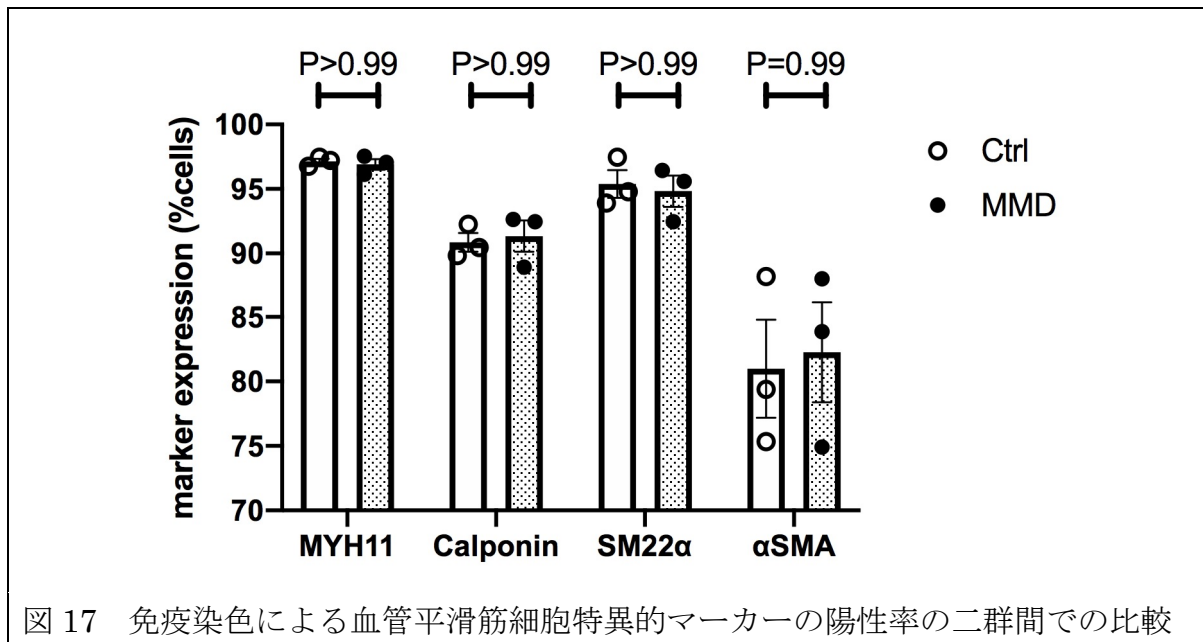


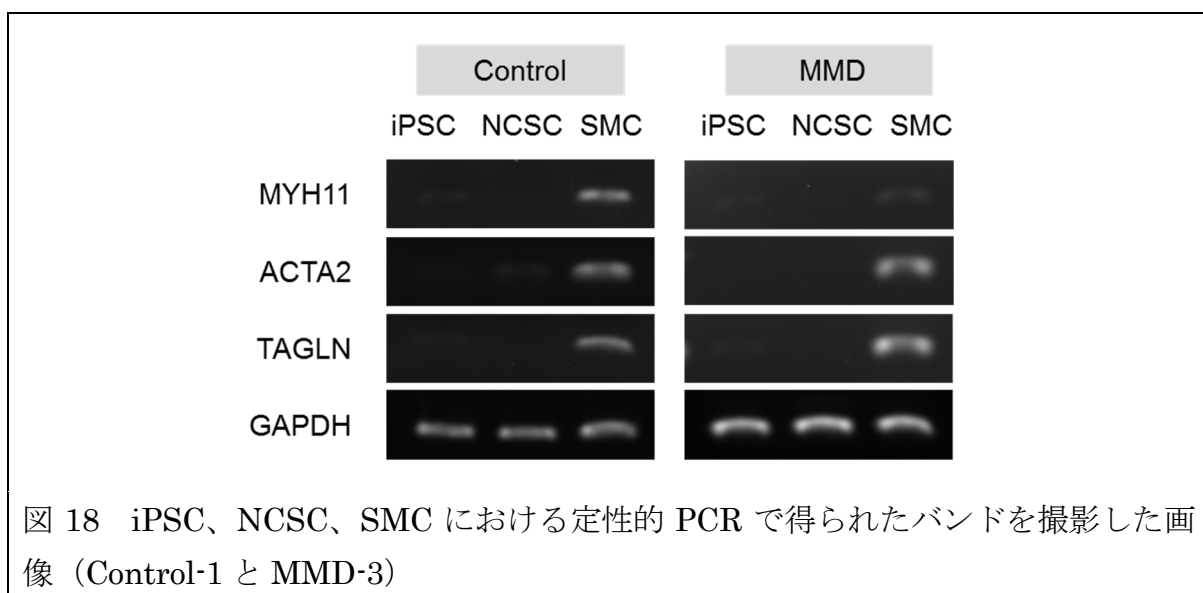
図 15 iPS 細胞 (MMD-3) から分化誘導した血管平滑筋細胞の免疫染色。Scale bar: 200μm



さらに、これらの SMC に特徴的なマーカーの発現が、コントロール群と MMD 群で差違があるか調べるため、マーカーの陽性率も半定量的に計測したが、図 17 に示したように、どのマーカーの発現率も二群間で有意差は認めなかった。



ここまでの二段階の分化誘導で、iPS 細胞 (iPSC) から NCSC、SMC が誘導されたが、iPSC と NCSC で SMC に特徴的な遺伝子が発現していないことを証明するために、コントロールと MMD で 1 サンプルずつ、定性的 PCR を行った。その結果を図 18 に示した。内在性対照 GAPDH はどの段階の細胞においても発現しており、ACTA2 と TAGLN は SMC では発現を認め、iPSC と NCSC では認めなかった。MYH11 も MMD で発現がやや弱いものの、同様の結果であった。



さらに、SMC として分化誘導した細胞が、SMC の特徴の他に、血管内皮細胞 (EC) の特徴も持ち合わせていないか、また分化能を有する細胞の特徴がないかを検証するために、血管内皮前駆細胞 (EPC: endothelial progenitor cell) に特異的に発現する CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) や未熟な幹細胞のマーカーで血管平滑筋前駆細胞 (SPC: smooth muscle progenitor cell) で発現する CD34、および SMC 特異的遺伝子である ACTA2 (α SMA) について、定量的 PCR で検証した(Jung et al., 2008; Kang et al., 2014)。6 検体の cDNA を pooled cDNA サンプルとして等量混合して 10 倍から 10,000 倍までのスタンダード段階希釈系列を作製し、CD31 と CD34 について定量的 PCR を行ったが、増幅効率が悪く、表 6 に示すように CD31 と CD34 は 1000 倍希釈の段階で CT 値が算出されなかった。SMC 特異的遺伝子である ACTA2 (α SMA) の増幅効率には問題がなく、内部標準遺伝子 GAPDH を対照とした $\Delta\Delta$ CT 法による比較を CD31、CD34 とともに行ったところ、図 19 に示すように、CD31、CD34 は発現量がきわめて低く、EPC や SPC といった前駆細胞の特徴を有していないことが確認できた。また、図 19 に示すように、ACTA2 の発現に関してはコントロールともやもや病の二群間において差が無かった。なお、表 7 に示した通り、コントロールともやもや病の二群間において内部標準遺伝子 GAPDH の発現に差が無いことは確認している。

表 6 各遺伝子の希釈率毎の CT 値と増幅効率および相関係数 (N/A: not applicable)

CD31			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	33.27	33.16	0.11
10^{-2}	35.13	N/A	N/A
10^{-3}	N/A	N/A	N/A
10^{-4}	N/A	N/A	N/A
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	N/A	N/A	N/A
相関係数	1.00	N/A	N/A
CD34			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	34.39	35.29	-0.9
10^{-2}	36.75	37.61	-0.86
10^{-3}	N/A	N/A	N/A
10^{-4}	N/A	N/A	N/A
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	N/A	N/A	N/A
相関係数	1.00	1.00	1.00
ACTA2			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	20.19	20.08	-0.19
10^{-2}	23.62	23.51	-0.06
10^{-3}	27.18	27.13	-0.12
10^{-4}	30.28	30.56	-0.16
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	97.5	92.9	102.0
相関係数	1.00	1.00	1.00

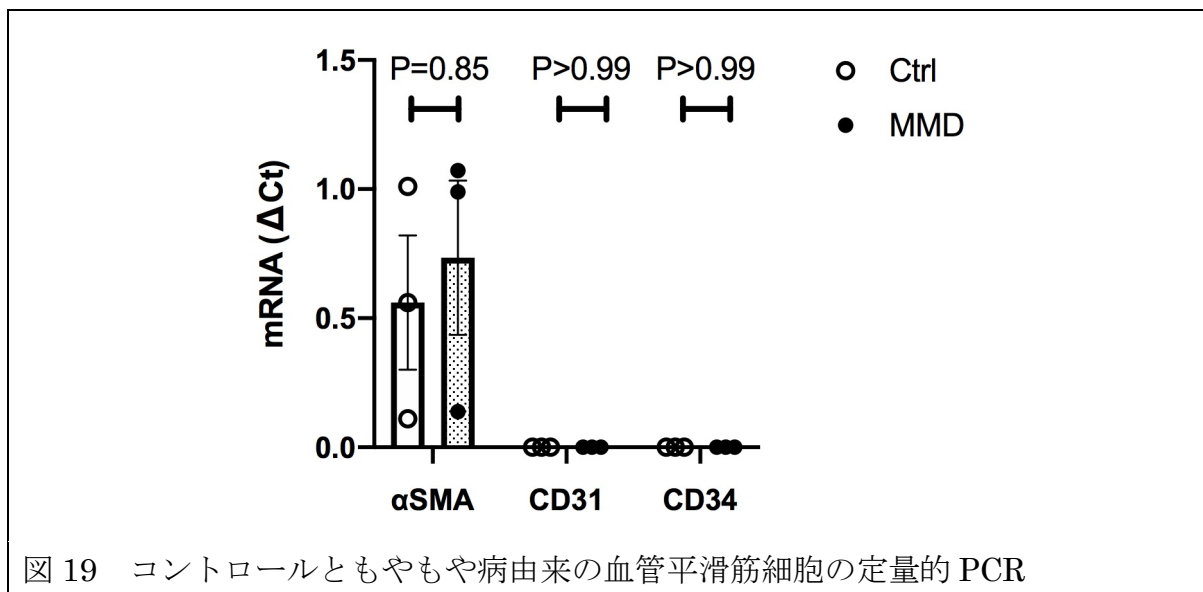


表 7 内部標準 GAPDH 遺伝子の定量的 PCR 測定結果

CT 値		CT 値	
Control-1	19.940	MMD-1	18.545
Control-2	19.610	MMD-2	20.975
Control-3	21.330	MMD-3	19.915
平均値	20.293	平均値	19.812
標準誤差	0.52702	標準誤差	0.7033
P=0.612822			

【血管平滑筋細胞の維持培養】

分化誘導により得られた SMC を Accutase で剥離し、SMC 維持用の培地で回収し継代を行ったが、第 1 継代では細胞の安定した接着と増殖を認めコンフルエントとなったが、第 2 継代以降は増殖能力が減少し、細胞形態も老化したような細長い細胞が多くなり、コンフルエントとなるまで増殖することが難しい状態であった (図 20)。

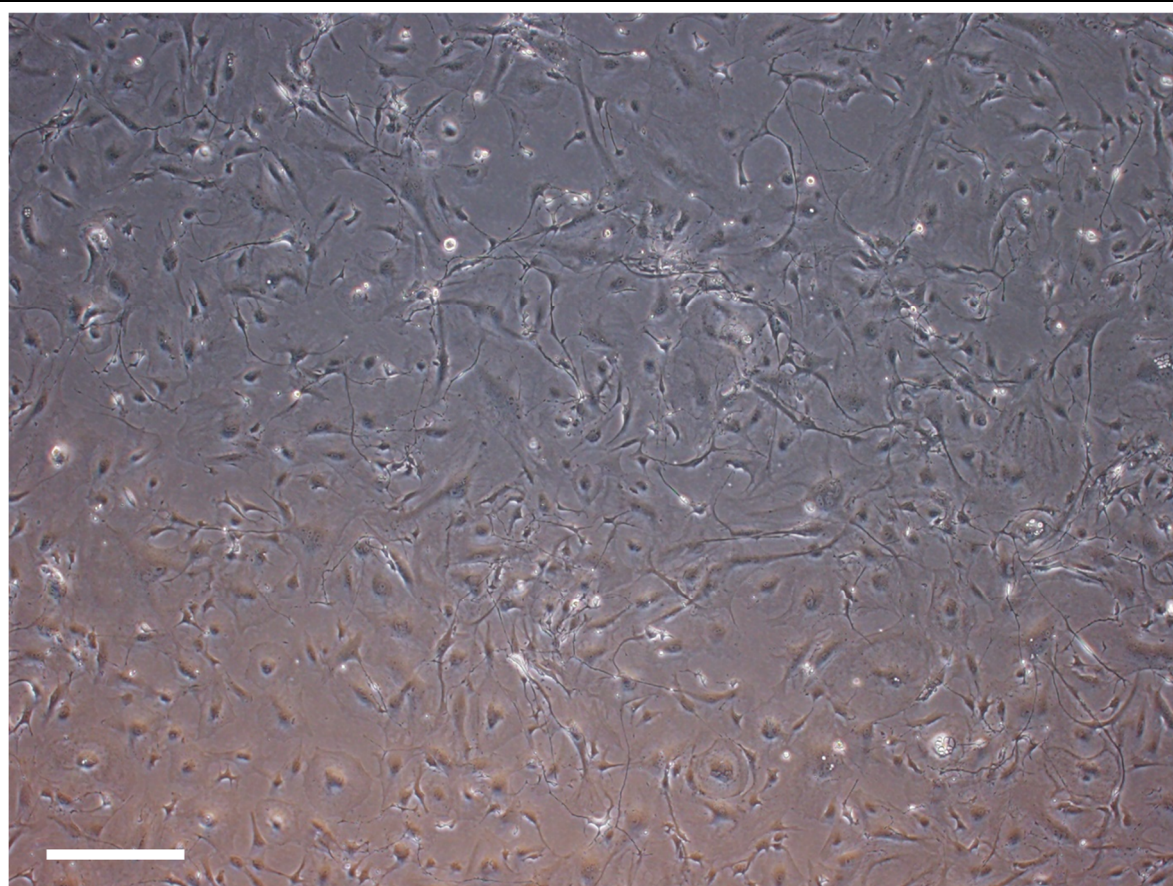


図 20 iPS 細胞 (Control-2) から分化誘導した血管平滑筋細胞を継代し、第 2 継代に移行して培養 2 日目の顕微鏡写真。

【表現型の異なる血管平滑筋細胞の作り分け】

上述のプロトコロールで作製した SMC は、免疫染色で発現していたマーカーのパターンから **Contractile** タイプ（収縮型）であると考えられた。一方、**Synthetic** タイプ（合成型）を作製するために NCSC から SMC への分化誘導を行う際に、乳酸と FBS を加えた培地を用いた SMC も作製した。細胞の接着や増殖は問題なく、収縮型と同様の推移を示して SMC の作製ができた。収縮型と比較すると細胞形態が紡錘状で細胞配列がより密な印象であった（図 21）。

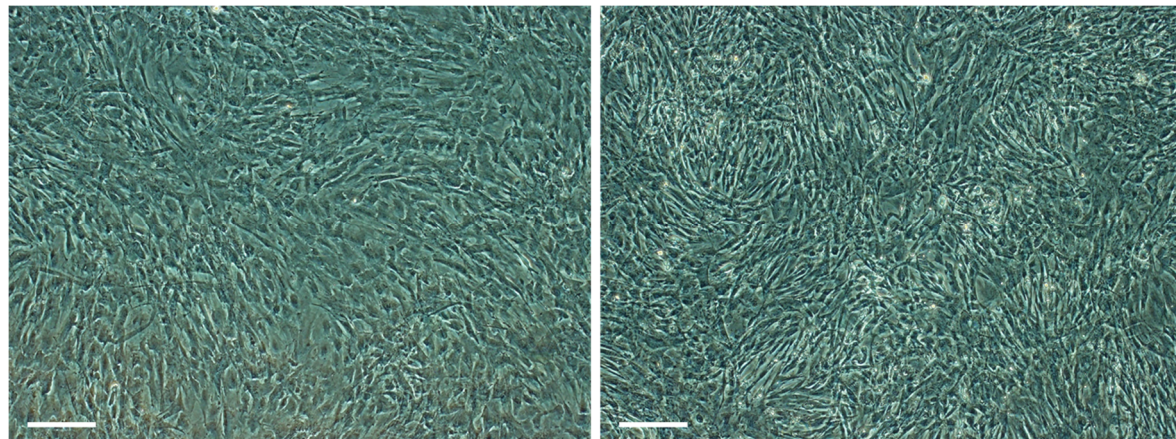


図 21 乳酸と FBS を加えて作製した、合成型と思われた血管平滑筋細胞の顕微鏡写真。左：Control-3、右：MMD-2。Scale bar: 400μm

しかし、乳酸と FBS を加えて作製した、合成型と思われる SMC の免疫染色を行ったところ、収縮型と同様の陽性パターンを示し（図 22、23）、リアルタイム PCR による発現の定量的解析を行っても、収縮型と比較した際に合成型で認められるような MYH11、ACTA2、TAGLN、CNN1 の相対的発現低下も認めず（図 24）、作製した SMC は合成型の表現型を有していると断定することはできず、細胞形態に若干の差違を認めるのみで、収縮型の SMC であることが示唆された。そのため、以降のアッセイでは、乳酸と FBS を加えて作製した SMC は用いず、乳酸と FBS を加えないで作製した収縮型の SMC のみを用いることとした。

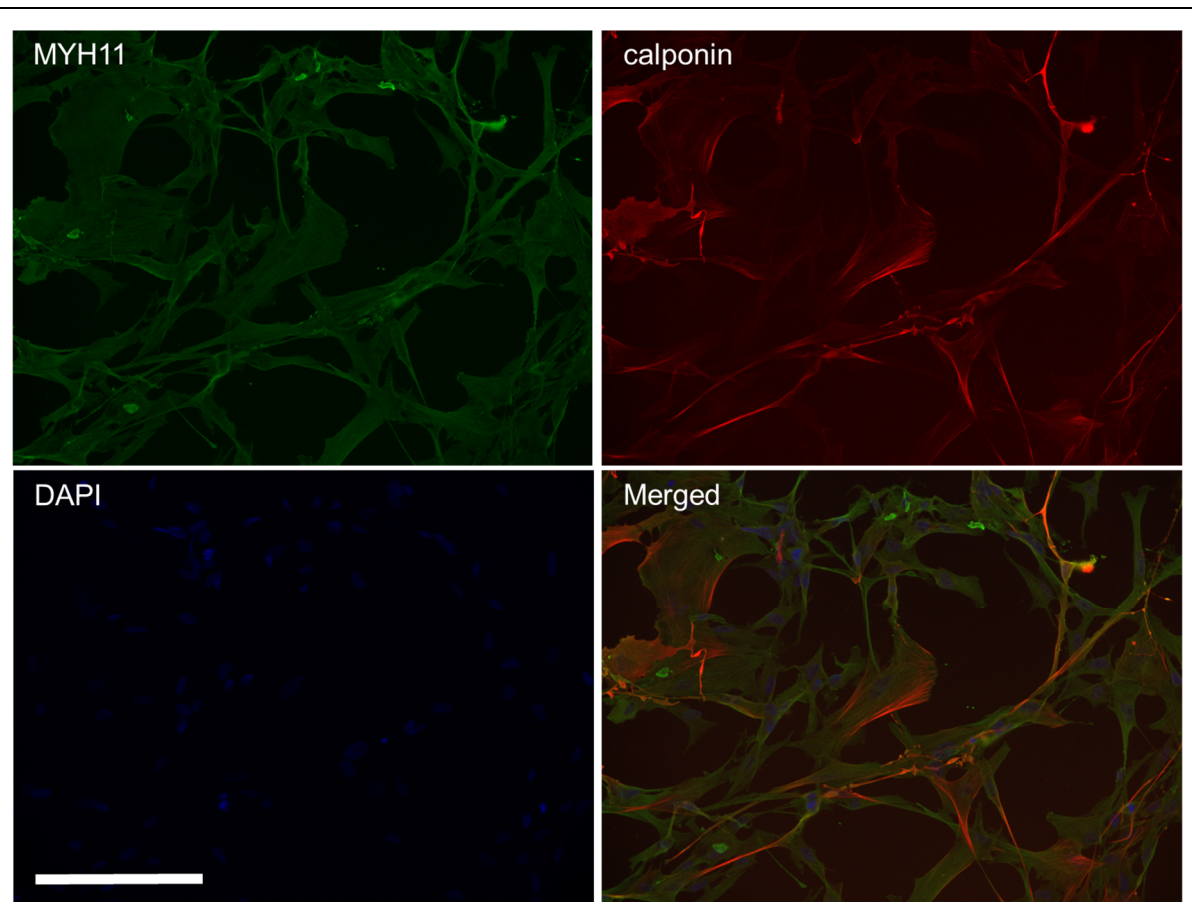


図 22 乳酸と FBS を加えて作製した、合成型と思われた血管平滑筋細胞の免疫染色 (MMD-2)。Scale bar: 200 μ m

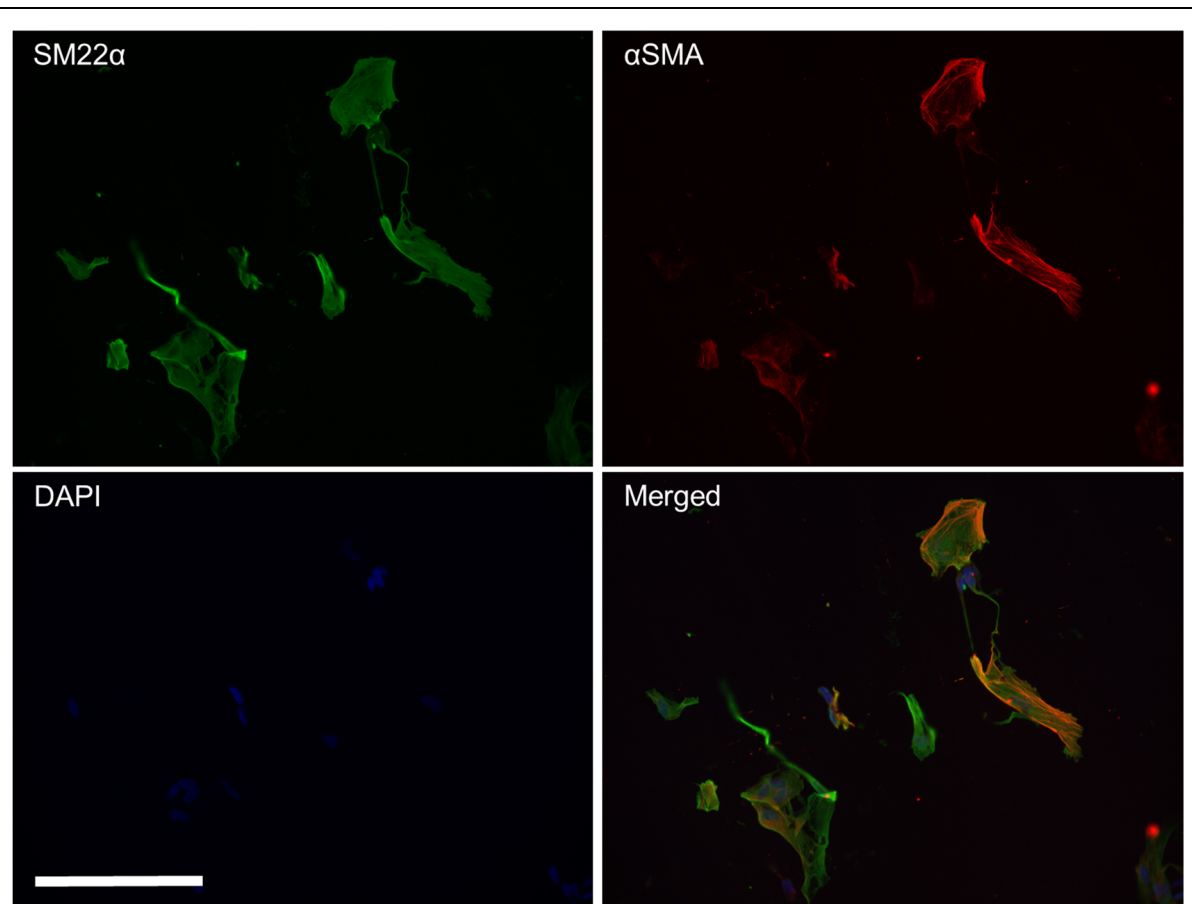


図 23 乳酸と FBS を加えて作製した、合成型と思われた血管平滑筋細胞の免疫染色 (MMD-2)。Scale bar: 200μm

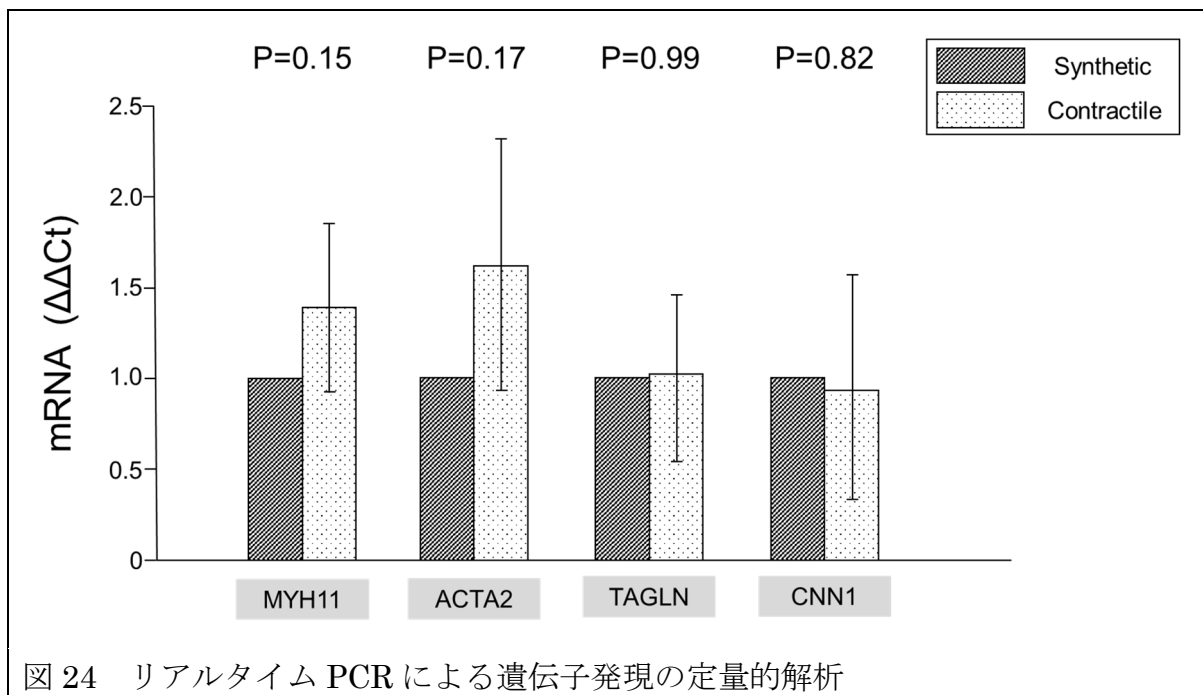


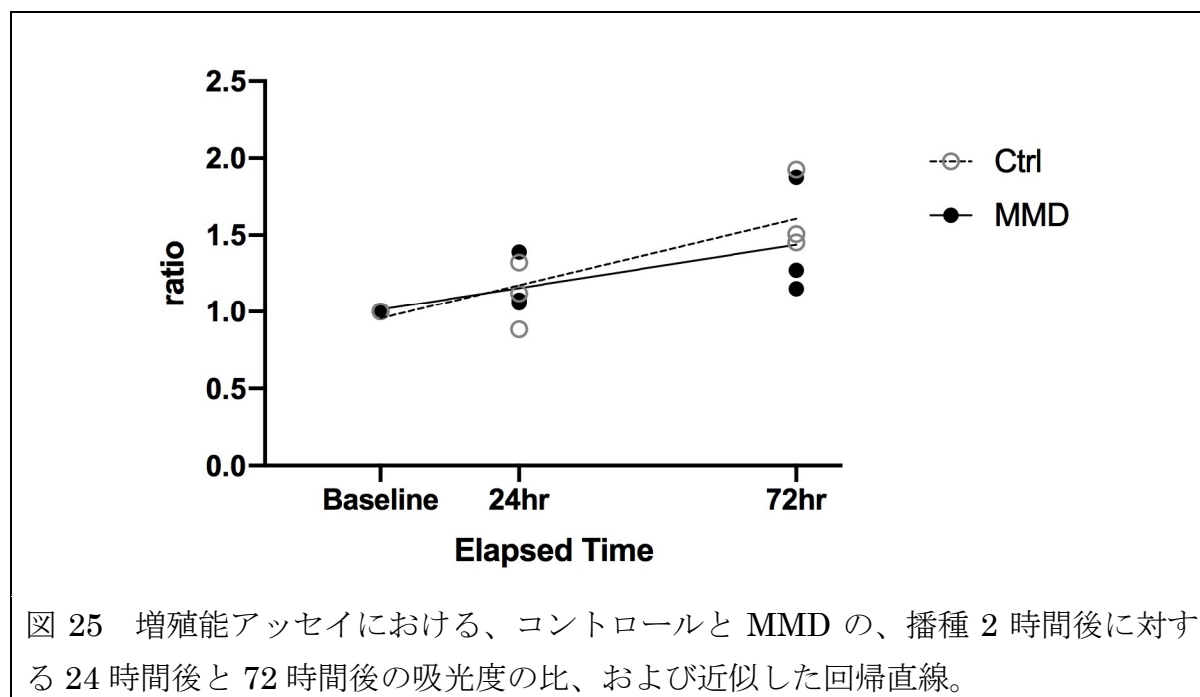
図 24 リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量的解析

【健常者ともやもや病患者の血管平滑筋細胞の機能の比較】

得られた SMC を各種評価系で評価し、もやもや病とコントロール由来の SMC に細胞生物学的な差違があるかを解析した。全ての評価には、NCSC から分化誘導した SMC の初代培養細胞を使用した。

<増殖能アッセイ>

分化誘導した SMC の増殖能を、CCK-8 生細胞数測定キットを用いて、SMC 播種の 2 時間後（基準値）、24 時間後、72 時間後のホルマザン色素の吸光度を測定した。基準値から 24 時間後および 72 時間後の相対的生細胞数の推移を回帰直線に近似し、その回帰直線の係数を算出したところ、もやもや病群とコントロール群でそれぞれ 0.0059 ± 0.0026 と 0.0090 ± 0.0021 であり、有意差はなかった ($P=0.45$)。この結果は図 25 に示した。



<遊走能アッセイ>

実際にアッセイを行う際は、まずインサートを載せる 24 ウェルプレートのウェルに培地 (DMEM/10% FBS) を 300 μ L ずつ注入し、空のインサートをウェルに載せ、膜を透過して培地がインサート内部に満ちて膜の表側が覆われた段階で、培地に懸濁した SMC を 25,000 個/ウェルとなるように注入し、やさしくピペッティングし、SMC が膜上に偏りなく均一になるようにした。位相差顕微鏡でウェル内に細胞の偏りや塊がなく均一に分布していることを確認し、24 時間培養した。培養したあと、遊走せず

に膜の表側（上面）に残った細胞を除去する際には市販の綿棒を用いた。インサートの構造上、膜の辺縁には綿棒で拭き取られていない細胞も存在し、図 26 のように遊走していない細胞が残ってしまっている状態であり、膜の中心部のみ（図 26 の赤丸の中：半径 $950\mu\text{m}$ の円）の染色された細胞の個数を計測した。全 6 サンプルで、3 回のアッセイを行った。全 6 サンプルの代表的な画像（中心部のみ拡大）を図 27 に示した。

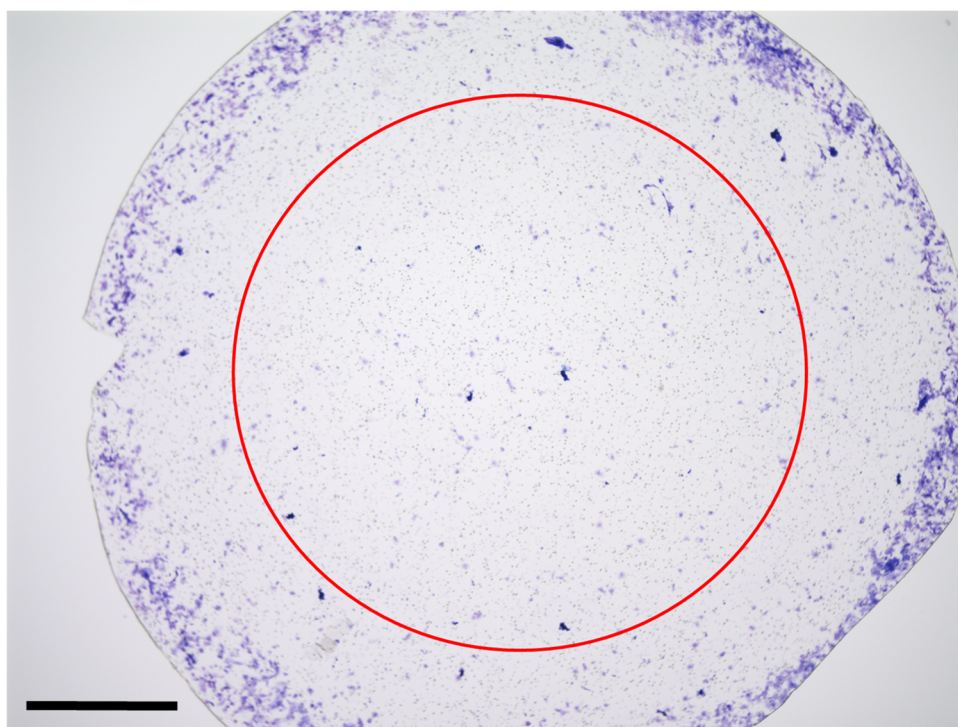


図 26 細胞を播種し 24 時間遊走させた後に、トランズウェルメンブレンの表側を綿棒で拭き、メンブレンを切り取ったものをライトギムザ染色にて染色した状態の顕微鏡写真（MMD-1）。赤丸で囲った領域（半径 $950\mu\text{m}$ の円）の内部に存在する染色された細胞のみを、遊走した細胞として計測した。Scale bar: $500\mu\text{m}$

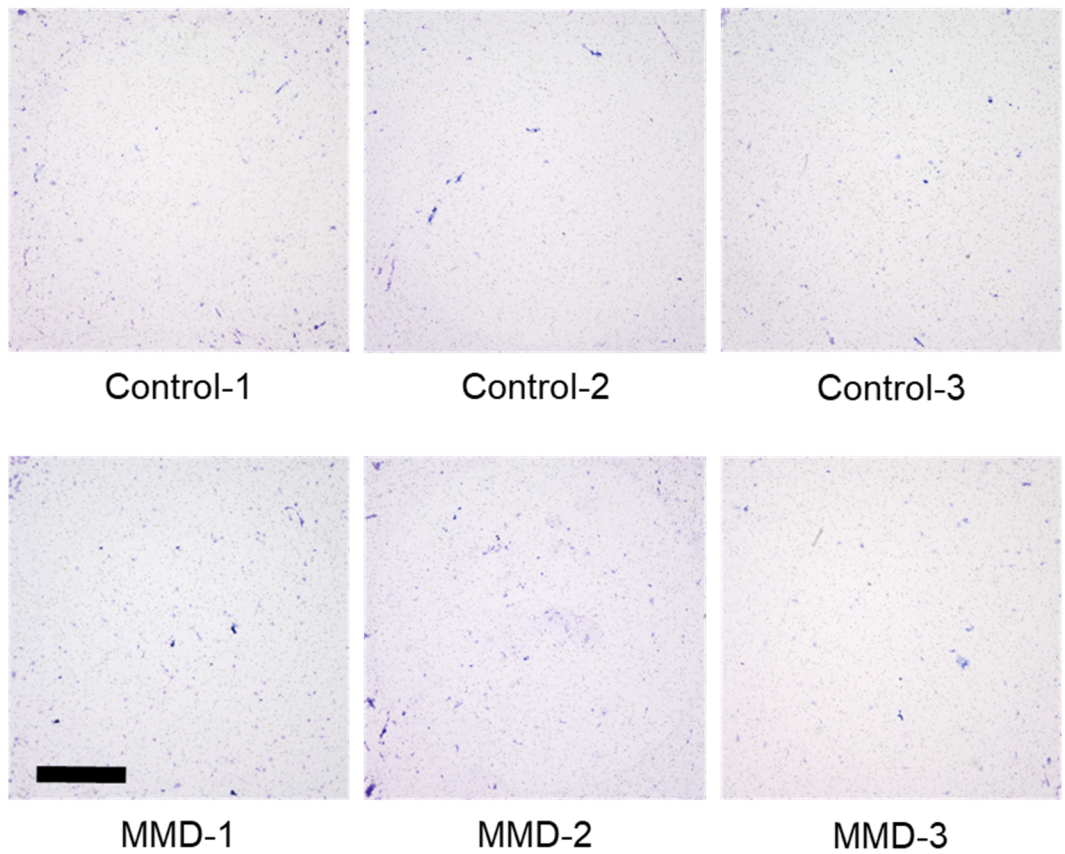


図 27 各サンプルの遊走能を評価した際のトランスウェルメンブレンのライトギムザ染色。Scale bar: 500 μ m

全 6 サンプルの遊走細胞数を計測し、コントロールと MMD の SMC で比較したところ、図 28 に示すように有意差はなかった。

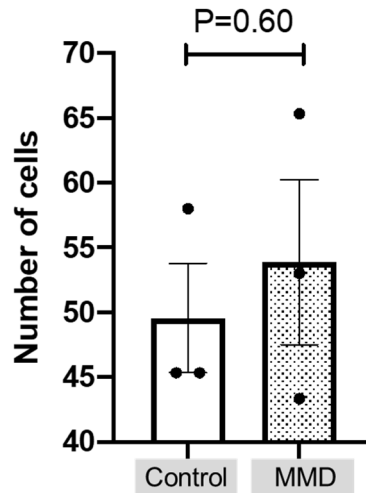


図 28 遊走能アッセイにおける、コントロール群と MMD 群の間での単位面積あたりの遊走細胞数の比較。

<収縮能アッセイ>

培地 (vehicle) を添加して 37.5 分後の細胞の面積 (基準値) と、カルバコールを添加して 37.5 分後の細胞の面積を、もやもや病とコントロールで比較を行ったところ、もやもや病では基準値 $8363 \pm 723 \mu\text{m}^2$ からカルバコール添加後 $7718 \pm 656 \mu\text{m}^2$ に、コントロールでは基準値 $9735 \pm 784 \mu\text{m}^2$ からカルバコール添加後 $9105 \pm 760 \mu\text{m}^2$ に、それぞれ面積が有意に減少しており (ともに $P < 0.0001$)、両群ともカルバコールによる収縮能力が確認できた。そのうえで、両者の面積減少率、すなわち収縮率を比較したところ、 $P = 0.18$ と有意差はなかった。これらの結果を図 29 に示した。カルバコール添加時における SMC の形態変化の代表的な画像を図 30 に示した。

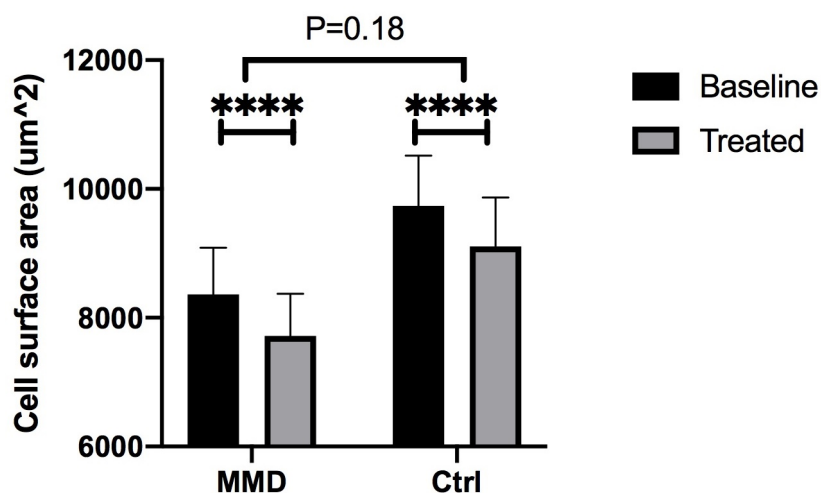


図 29 収縮能アッセイにおける、vehicle (Baseline) とカルバコール (Treated) 添加による細胞面積の変化と、コントロールと MMD の二群間での細胞面積減少率の比較 (****: $P < 0.0001$)

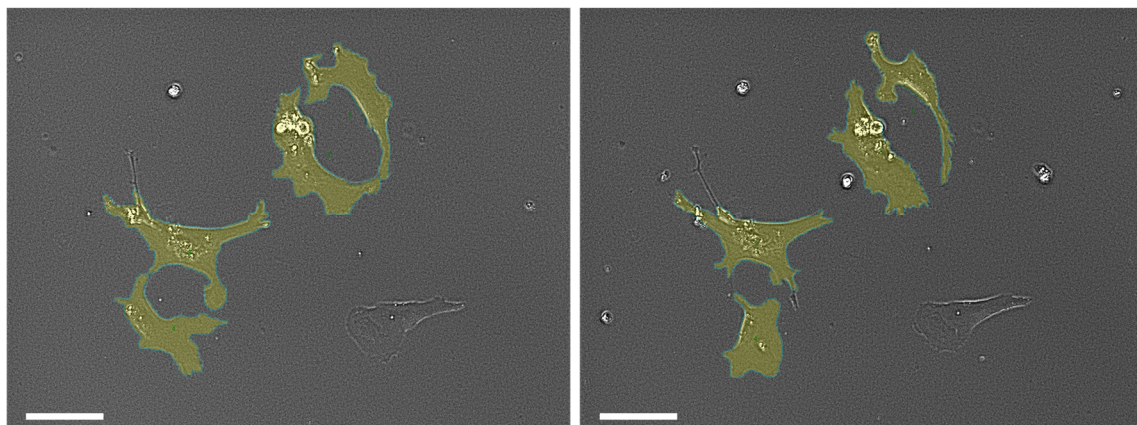


図 30 収縮能アッセイにおける細胞面積の計測 (MMD-3)。左：カルバコール添加直前、右：カルバコール添加 35 分後。Scale bar: 100 μ m

<管腔形成能アッセイ>

先行研究と同様の条件にて行ったが、同一の細胞株でも図 31 のようにチューブ長が計測可能なレベルで管腔様の形態を形成することもあれば、管腔様の形態を形成してはいるもののチューブ長の計測が困難なほど細胞が塊を形成してしまっている、管腔様の形態を呈することなく細胞が散在してしまっているなど、アッセイとして安定的に管腔様の形態を形成することが困難であった。最適な条件を探るために、播種す

る細胞数や培養時間を変えるなど試行錯誤したが、安定して管腔様の形態を形成することが難しかったため、本研究では二群比較検討にこのアッセイは適さないと判断した。

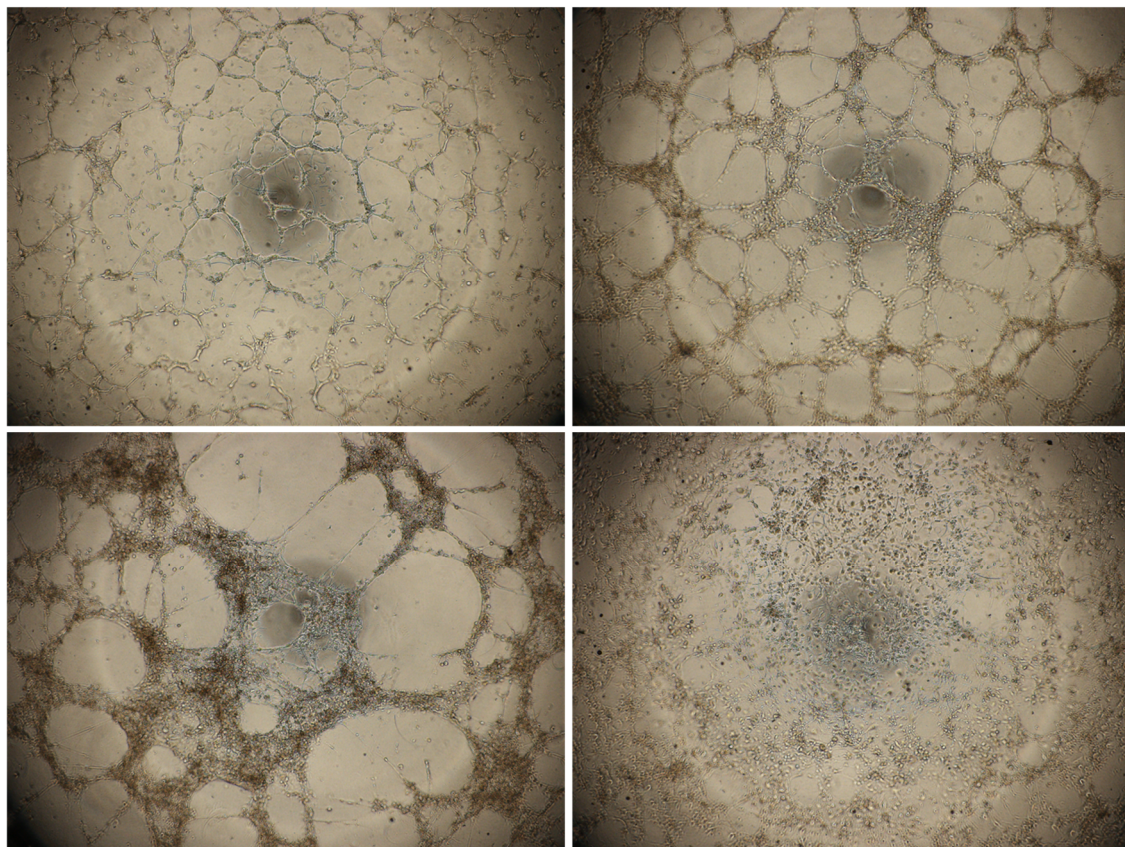


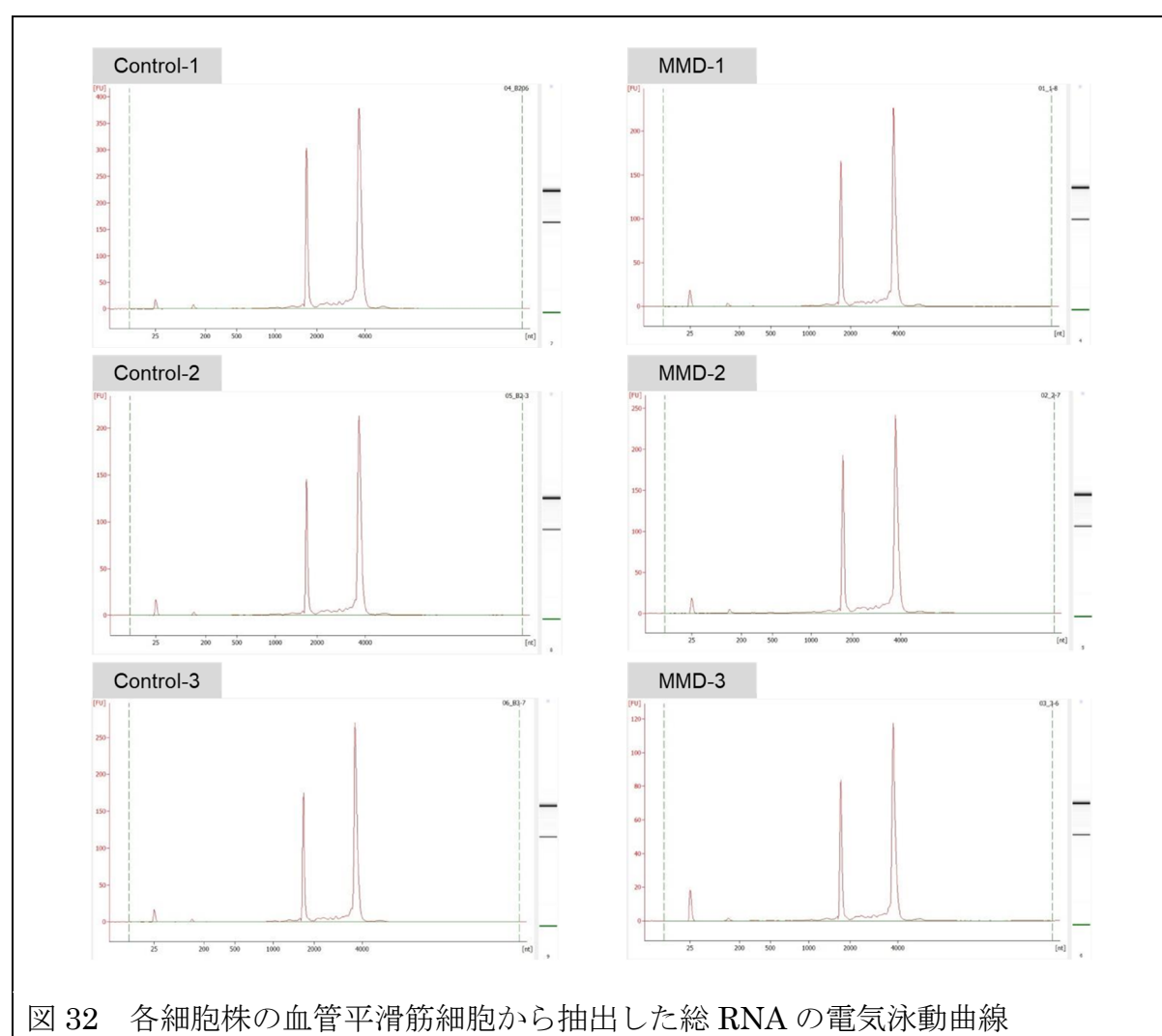
図 31 管腔形成能アッセイの位相差顕微鏡写真。左上：MMD-1、右上：Control-3、左下：MMD-2、右下：Control-1。

【血管平滑筋細胞のマイクロアレイ解析】

遺伝子発現マイクロアレイと定量的 PCR に用いる、SMC から抽出した総 RNA の濃度と純度を表 8 に、バイオアナライザーによる電気泳動曲線を図 32 にそれぞれ示したが、遺伝子発現解析を行うのに問題ない品質であった。

表 8 各細胞株の血管平滑筋細胞から抽出した総 RNA の品質

細胞株	RNA 濃度 (ng/μL)	Optical Density 260/280 値	RIN 値
Control-1	326.96	2.05	10.0
Control-2	173.78	2.03	10.0
Control-3	174.44	2.02	10.0
MMD-1	188.32	2.04	10.0
MMD-2	246.69	2.02	10.0
MMD-3	102.16	2.01	10.0



もやもや病と健常者から作製した SMC と EC の Affymetrix 50K 遺伝子発現マイクロアレイにより、SMC では 24692 遺伝子、EC では 19940 遺伝子の発現量が全 6

細胞株で検出された。各細胞株のフラッグコールの状況を表 9 に示した。

表 9 血管平滑筋細胞および血管内皮細胞から抽出した RNA のフラッグコール

細胞株	Present flag		Marginal flag		Absent flag	
	SMC	EC	SMC	EC	SMC	EC
Control-1	28622	25453	765	791	25288	28431
Control-2	29342	25084	801	754	24532	28837
Control-3	27566	26001	832	790	26277	27884
MMD-1	29534	24115	770	861	24371	29699
MMD-2	28092	23888	733	791	25850	29996
MMD-3	27821	24423	795	904	26059	29348

SMC 24692 遺伝子の網羅的遺伝子発現解析を主成分分析プロットにより実施した結果、PC1～3 の 3 次元プロットにおいて、各 6 細胞株の遺伝子発現プロファイルは一定の傾向なくばらつきを呈し、疾患（コントロールか MMD か）によっては分割されなかった（図 33 左）。図 33（右）の 2 次元プロットで示すように通り、PC4 まで落とし込むとコントロールか MMD かの疾患要因により遺伝子発現プロファイルに差が出現した。これらのデータから、もやもや病患者由来の SMC の遺伝子発現プロファイルは、健常者のものと比べてごくわずかな違いしかないことが示唆された。その一方で、EC 19940 遺伝子の遺伝子発現主成分分析プロットでは、各 6 細胞株は PC1 と PC2 で、疾患（コントロールか MMD か）により明瞭な二群に離れてプロットされ、SMC の遺伝子発現プロファイリングとは対照的であった（図 34）。すなわち、もやもや病患者由来の EC の遺伝子発現プロファイルは、健常者のものと比べ明瞭な違いがあることが示唆された。

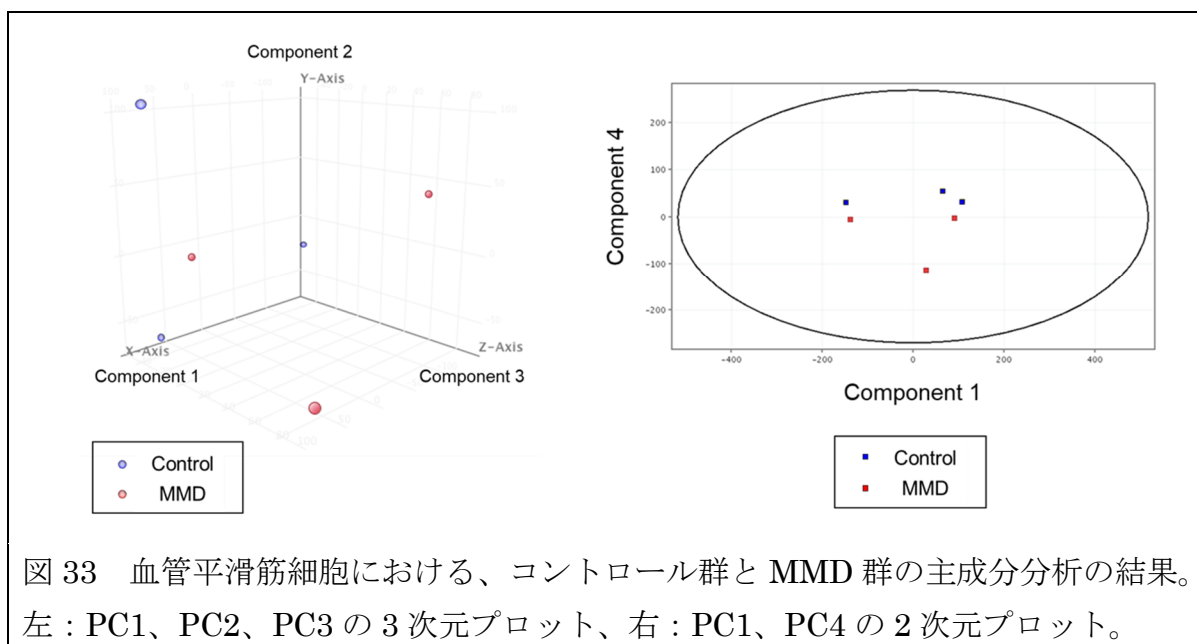


図 33 血管平滑筋細胞における、コントロール群と MMD 群の主成分分析の結果。左：PC1、PC2、PC3 の 3 次元プロット、右：PC1、PC4 の 2 次元プロット。

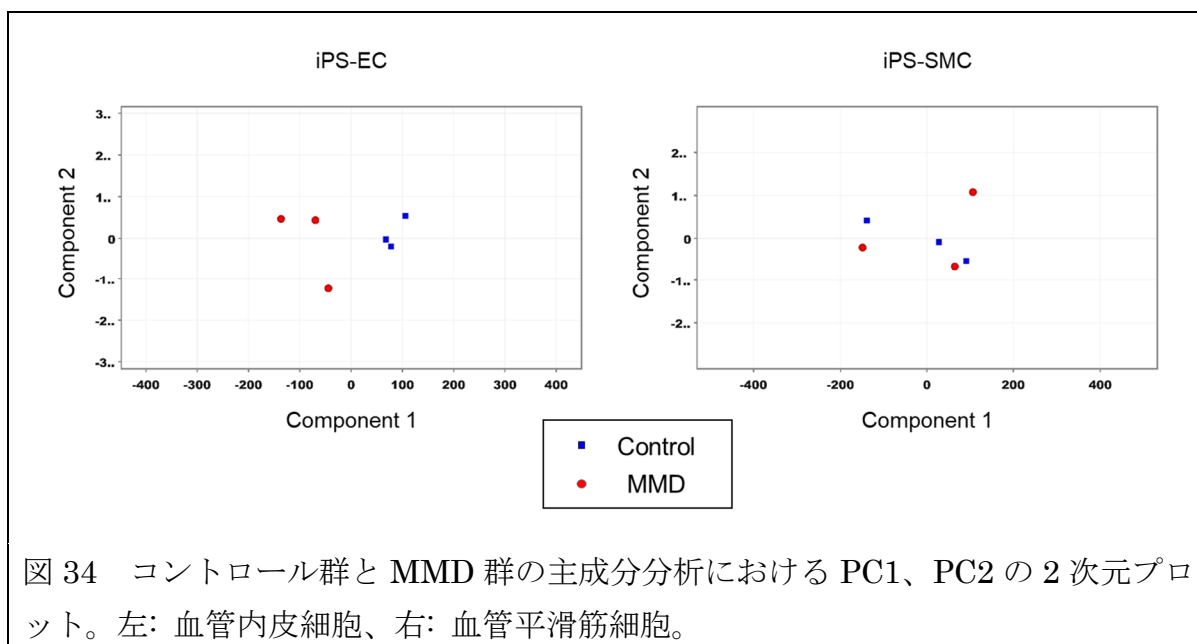


図 34 コントロール群と MMD 群の主成分分析における PC1、PC2 の 2 次元プロット。左：血管内皮細胞、右：血管平滑筋細胞。

次に、SMC、EC それぞれで遺伝子発現変動解析を行った。コントロール群と MMD 群で、3 倍以上の有意な発現変動がある遺伝子は、SMC ではわずか 6 遺伝子 (9 プローブ) にとどまった一方で、EC では 120 の発現変動遺伝子 (185 個プローブ) を認めた。教師あり階層的クラスタリング (樹状図とヒートマップ) の結果と、発現変動ボルケーノプロットを、それぞれ図 35 と図 36 に示した。

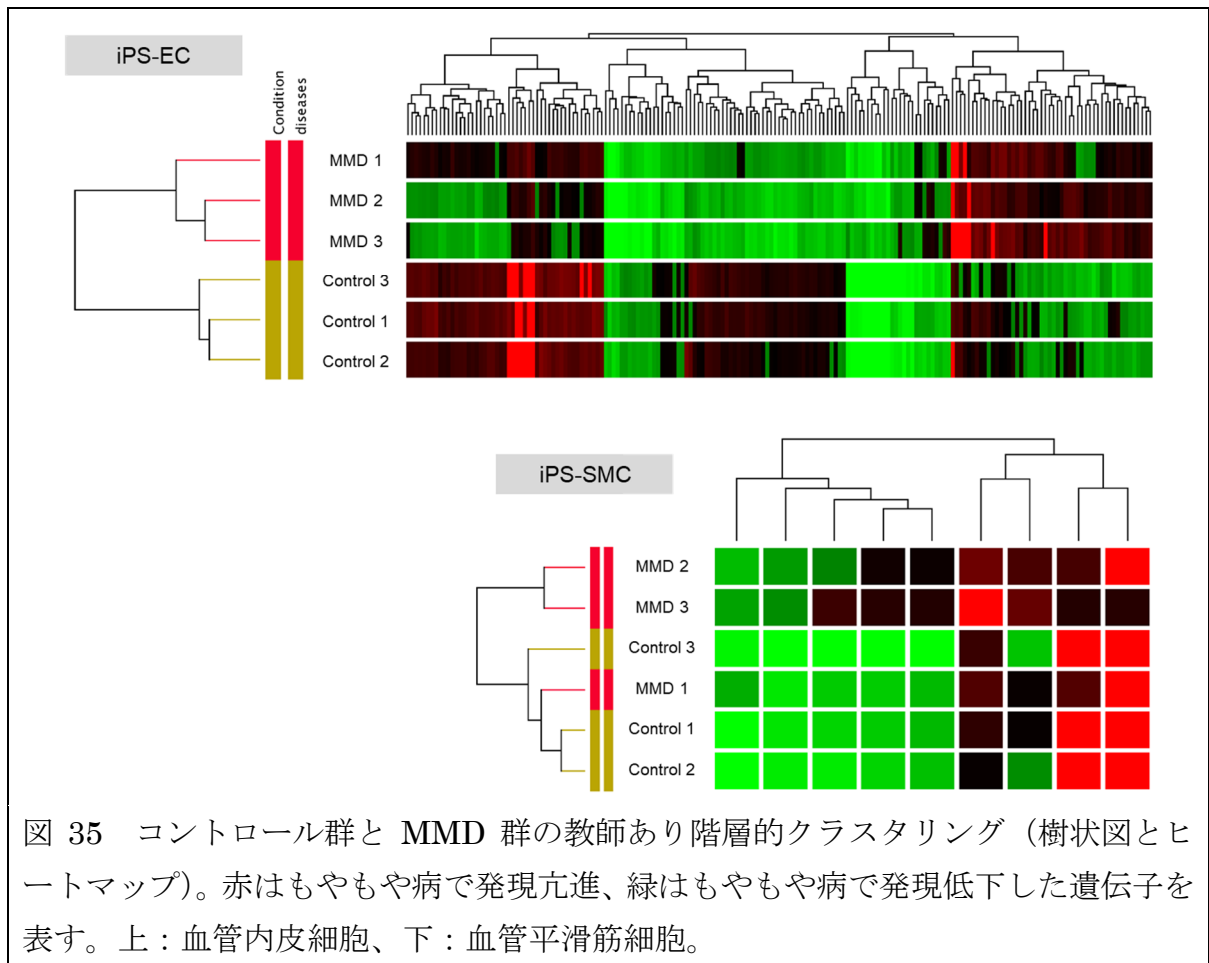


図 35 コントロール群と MMD 群の教師あり階層的クラスタリング（樹状図とヒートマップ）。赤はもやもや病で発現亢進、緑はもやもや病で発現低下した遺伝子を表す。上：血管内皮細胞、下：血管平滑筋細胞。

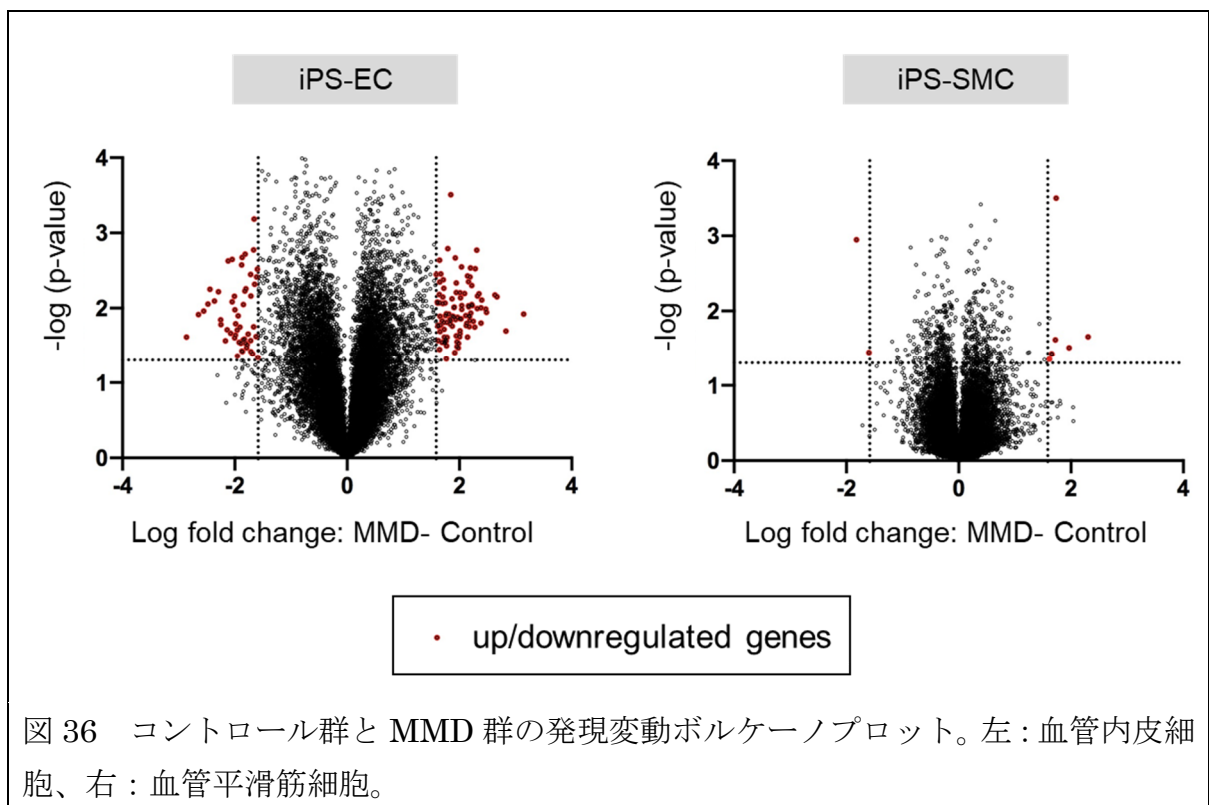


図 36 コントロール群と MMD 群の発現変動ボルケーノプロット。左：血管内皮細胞、右：血管平滑筋細胞。

SMC で発現変動していた 9 個のプローブのうち、MMD で発現上昇していた遺伝子は DCN、NDP、TIPRL、SLITRK4 の 4 つで (DCN が 4 つで重複)、発現低下していた遺伝子は PCDHB8、PCDHB13 の 2 つであった (表 10)。なお、EC では 78 個の遺伝子が MMD で発現上昇しており、42 個の遺伝子が発現低下していた。

DCN: decorin

NDP: norrie disease protein (norrin)

TIPRL: TOR signaling pathway regulator

SLITRK4: SLIT and NTRK like family member 4

PCDHB8: protocadherin beta cluster-8

PCDHB13: protocadherin beta cluster-13

※ TOR: target of rapamycin

※ SLIT: slit guidance ligand

※ NTRK: neurotrophic tyrosine kinase receptor

表 10 血管平滑筋細胞においてコントロール群と MMD 群の間で発現変動を認めたプローブの一覧。発現「亢進」は MMD 群でコントロール群よりも発現が上昇していることを示す。

プローブ ID	遺伝子名	MMD 群 対 コントロール群		
		P 値	発現	倍率変化
201893_x_at	DCN	0.0379565	亢進	3.156952
206022_at	NDP	0.0125095	亢進	3.060098
209335_at	DCN	0.0241945	亢進	3.303620
211813_x_at	DCN	0.0310907	亢進	3.909259
211896_s_at	DCN	0.0373296	亢進	3.148207
221319_at	PCDHB8	0.0011283	低下	-3.527490
228619_x_at	TIPRL	0.0003150	亢進	3.325181
232415_at	PCDHB13	0.0359204	低下	-3.028910
232636_at	SLITRK4	0.0221115	亢進	4.933434

【リアルタイム PCR による遺伝子発現定量的解析】

マイクロアレイ発現変動解析で得た、6 個の遺伝子をリアルタイム PCR で定量的遺伝子発現測定を行い、マイクロアレイの結果を検証した。表 7 で示した通り、内部標準に用いる予定の GAPDH の CT 値には、もやもや病とコントロールの二群間で統計学的な発現有意差を認めないことを確認した。

予備実験として、6 検体の cDNA を pooled cDNA サンプルとして等量混合して、10 倍から 10,000 倍までのスタンダード段階希釈系列を作製し、各関心遺伝子 Taqman assay の増幅効率を評価した（表 11）。NDP と PCDHB13 は増幅効率が悪く、本研究では定量対象から除外した。

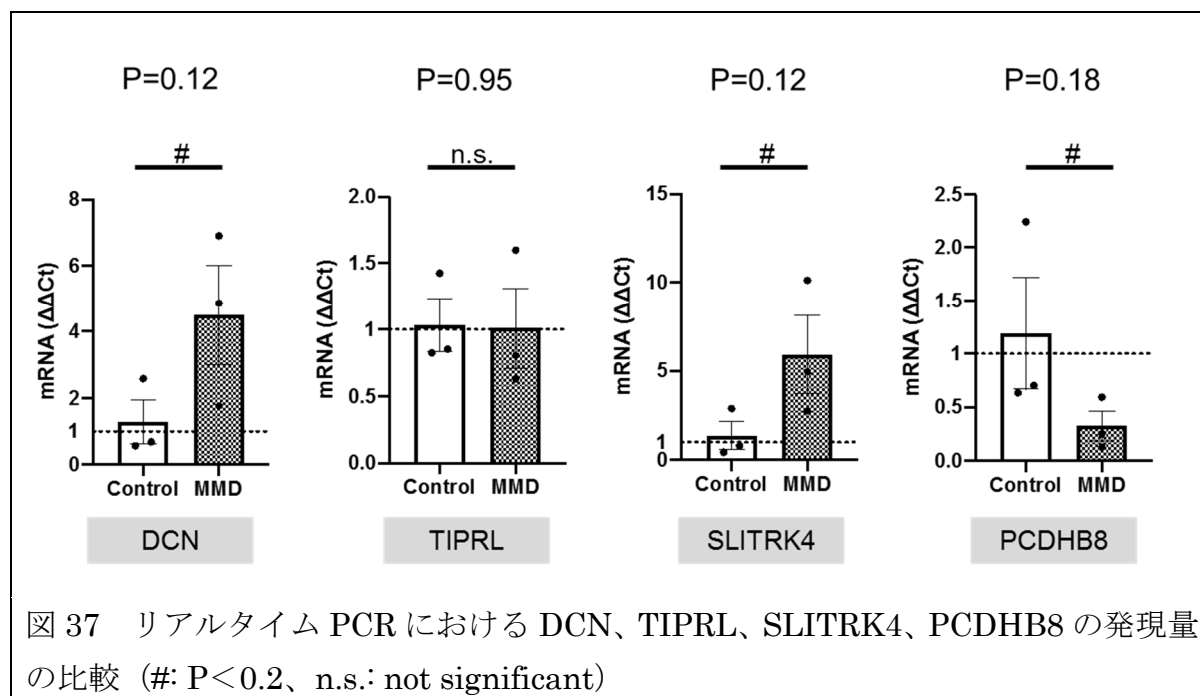
表 11 各遺伝子の希釈率毎の CT 値と増幅効率および相関係数 (N/A: not applicable)

DCN			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	26.88	27.05	-0.17
10^{-2}	30.18	29.95	0.23
10^{-3}	33.26	33.25	0.01
10^{-4}	36.41	35.85	0.56
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	106.9	117.1	112.0
相関係数	1.00	1.00	1.00
NDP			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	30.67	30.68	-0.01
10^{-2}	34.09	33.73	0.36
10^{-3}	N/A	36.97	N/A
10^{-4}	N/A	36.22	N/A
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	N/A	218.8	N/A
相関係数	1.00	0.81	0.91

TIPRL			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	24.19	24.54	-0.35
10^{-2}	27.61	27.62	-0.01
10^{-3}	31.00	30.88	0.12
10^{-4}	34.49	34.05	0.44
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	95.7	106.3	101.0
相関係数	1.00	1.00	1.00
SLITRK4			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	28.12	27.90	0.22
10^{-2}	31.29	31.12	0.17
10^{-3}	34.67	34.24	0.43
10^{-4}	37.62	37.06	0.56
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	105.9	112.2	109.1
相関係数	1.00	1.00	1.00
PCDHB8			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10^{-1}	28.22	28.91	-0.69
10^{-2}	31.53	32.35	-0.82
10^{-3}	34.90	35.63	-0.73
10^{-4}	37.60	N/A	N/A
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	99.25	98.44	98.84
相関係数	1.00	1.00	1.00

PCDHB13			
希釈濃度	複製 1	複製 2	差
10 ⁻¹	31.23	31.11	0.12
10 ⁻²	33.46	33.34	0.12
10 ⁻³	36.54	36.73	-0.19
10 ⁻⁴	N/A	N/A	N/A
	複製 1	複製 2	平均
増幅効率	N/A	N/A	N/A
相関係数	0.99	0.99	0.99

上記の予備実験の結果から、25 倍希釈 cDNA を用いてリアルタイム PCR を実施した。その結果、図 37 に示した通り、DCN、SLITRK4、PCDHB8 については、コントロール群と比較して MMD 群で、マイクロアレイの結果と一致する発現変動の傾向を認めたが、有意水準には達しなかった ($P < 0.2$)。TIPRL は二群間で差はなく、マイクロアレイの結果と一致しなかった ($P = 0.95$)。



考察

本研究では、過去に報告のある健常者（コントロール）由来の iPS 細胞だけでなく、もやもや病（MMD）患者から採取し樹立した iPS 細胞からも血管平滑筋細胞（SMC）を分化誘導することに成功した。MMD 患者由来 iPS 細胞からの SMC の分化誘導は渉猟する限り本研究が初めてである。さらに、動脈系の SMC は発生学的に複数の胚葉に由来することが知られているが、神経外胚葉由来の SMC を作り分けることができた。発生学的に神経外胚葉由来の SMC は上行大動脈および頭頸部動脈に存在するが、このことは病態が解明されていない現象の一つである「もやもや病では頭頸部動脈のみに異常が現れる」という現象に何らかの関連を持つことが示唆される。

iPS 細胞から神経外胚葉由来の SMC を分化誘導するプロトコールは限定的ではあるが過去に報告がある（Cheung et al., 2014; Jiao et al., 2016; Wang et al., 2012）。しかし、今回の研究では、これらのプロトコールに従った場合、分化誘導中に多くの細胞死が発生し、神経堤幹細胞（NCSC）と SMC を十分に得ることができなかった。そのため、過去の報告を参考にしつつ独自のプロトコールを作製する必要があり、経由した NCSC や最終的に樹立した SMC が、本当に NCSC および SMC であるかを多角的に検証する必要があった。そのため、免疫染色、フローサイトメトリー、定性的 PCR、定量的 PCR を施行したが、いずれの解析でも NCSC もしくは SMC の特徴を有すること、および他の細胞の性格を持ち合わせていないことを確認することができた。

一方、SMC には 2 つの表現型があるとされているが、今回の研究で作製した SMC は収縮型であり、合成型の SMC の作製も試みたが、作製することができなかった。過去の報告を参考に、収縮型 SMC と合成型 SMC の特徴は表 12 にまとめた（Ayoubi et al., 2017; Beamish et al., 2010; Wanjare et al., 2013）。

表 12 2つの表現型による血管平滑筋細胞の形態および機能の比較

	収縮型 SMC	合成型 SMC
細胞形態	長斜方形	紡錘形
細胞外基質の産生	少ない	多い
増殖能	低い	高い
遊走能	低い	高い
収縮能	高い	低い
免疫染色での特異的マーカー	MYH11, CNN1, TAGLN	caldesmon, vimentin

今回行った機能解析およびマイクロアレイ解析は収縮型の SMC における結果であり、合成型の SMC の樹立が可能となってそれらにおいて同じ解析を行うと MMD 群とコントロール群で何らかの差を認める可能性はある。とくに、増殖能と遊走能については収縮型よりも合成型の方が高いという報告が多い。今回の研究で、分化誘導により得られた SMC に対して維持培養を行っても、第 2 継代以降で増殖能が乏しく、それ以上に細胞増幅ができなかった現象に関しても、合成型の作製が可能になれば解決できる可能性がある。そうすれば、作製した SMC の継代により多数の SMC を得ることが可能となり、毎回の解析で SMC を iPS 細胞から都度分化誘導する手間が省ける可能性がある。ただし、もやもや病において病変となっている血管を構成する SMC がどちらの表現型の SMC かは、いまだ特定されていないという問題点もある。

もやもや病の SMC に関する過去の研究では、Aoyagi ら、Funaki ら、Yamamoto らのグループによる、浅側頭動脈由来 SMC の機能解析が挙げられる。これらの研究では、細胞源としてもやもや患者の手術時に得られた浅側頭動脈を使用し、コントロールとして頭部外傷などを契機とする健常者の頭部手術時に得られた浅側頭動脈を用いており、各々の浅側頭動脈から SMC を単離し培養したものを解析に用いている (Aoyagi et al., 1991; Aoyagi et al., 1997; Fukai et al., 1994; Yamamoto et al., 1998; Yamamoto et al., 1999)。彼らの研究では、細胞の老化の程度 (population doubling level) に関して増殖早期、中期、晩期の 3 フェーズにおいて増殖能の解析を行い、増殖早期から中期にかけては MMD 群の方がコントロール群と比較して増殖能が有意に高かったが、増殖晩期では二群間に差を認めなかった (Fukai et al., 1994)、PDGF を添加することで、MMD 群もコントロール群も細胞増殖能の促進を認めたが、コントロール群の方が有意に増殖能の促進の度合いが高くかつ PDGF 濃度依存的な細胞増殖能の促進も認めた一方、MMD 群ではそれらは認めなかった (Aoyagi et al., 1991)、

interleukin (IL) -18 または IL-6 を添加することで、MMD 群では遊走能の低下を認めたのに対して、コントロール群では逆に遊走能の促進を認めた (Yamamoto et al., 1998)、などと報告をしている。これらの過去の報告から、もやもや病患者において頭頸部領域の SMC に何らかの機能異常が存在している可能性が示唆された。しかし、これらの研究に用いられた SMC は生体から採取した組織由来の細胞を利用しており、成長因子や動脈硬化などの内的因子および血流によるシェアストレスや血圧などの外的因子の影響を長期間受け、性質の変容をきたしている可能性がある。もやもや病において髄液中や血液中で bFGF や hepatocyte growth factor などの成長因子が上昇していたという報告もある (Nanba et al., 2004; Yoshimoto et al., 1997)。すなわち、これらの内的および外的因子による結果を排除することができず、細胞が持つ本来の機能異常を解析することは困難と考えられる。

一方、本研究では幹細胞の状態から SMC を分化誘導しており、内的および外的因子の影響を受けておらず、成長因子の添加や物理的負荷、他の細胞との共培養など、さらなる病態解析を可能にする実験材料になりえるものと考えられる。

Kang らの報告では、コントロールと MMD から採取した血液から血管平滑筋前駆細胞 (SPC) を樹立し、管腔形成能の評価やマイクロアレイ解析を行っている (Kang et al., 2014)。管腔形成能アッセイでは、コントロールと比較して MMD の SPC で有意に管腔形成がまばらで構成する管腔が太いという結果で、もやもや病患者の病変となる動脈の病理所見でみられる内膜肥厚の説明となりえるとしている。マイクロアレイ解析では adhesion や cell migration、immune response に関する遺伝子が MMD 群で有意に発現低下していたことも報告している。しかし、SPC も長期間の内的および外的因子の影響を受けた末梢血から作製されたものであるという点、また SPC は頭頸部動脈に限らず全身の血管の SMC となりえるという点で、もやもや病の発症メカニズムの検討においては限界性があると考えられる。

収縮能アッセイに関しては過去に MMD の SMC で評価した研究はなく、本研究で初めてであるが、コントロールと比較し、MMD の SMC で収縮能が低下している、もしくは亢進しているということではなく、二群間で差がなかった。病態を考える上で、SMC の収縮能が MMD の血管病変 (内膜肥厚や異常血管の増勢) とは関連ないのは妥当な結果である。増殖能、遊走能においても、MMD 群とコントロール群の間に有意差はなかった。以上、今回の研究で行った iPS 細胞由来 SMC の機能的な解析では、コントロールと MMD の SMC に差はないと考えられた。ただし、今回の研究では、管腔形成能アッセイを試みたものの安定した評価系を確立できなかったため、今後の改良と評価が望まれる。

マイクロアレイ解析では、血管内皮細胞 (EC) ではコントロールと MMD で 185 個のプロープに発現変動の差があったのに対し、同一のアルゴリズムで SMC ではわずか 9 個のプロープにしか差がなく、mRNA レベルでもコントロールと MMD の SMC に差はわずかししか認められないと考えられた。なお、先行研究では同一のアレイ解析データから若干解析アルゴリズムが違うものの、205 個のプロープで二群間に発現変動の差があり、発現変動遺伝子の内容解析で細胞接着に関連するインテグリンの発現が MMD で低下しているという結果であった (Hamauchi et al., 2016)。本研究で SMC において数は少ないものの発現変動していた 9 個のプロープは 6 個の遺伝子に該当したが、そのうち SMC の細胞レベル、機能レベルで関連がある遺伝子は DCN (decorin) のみであった。decorin は「小ロイシンに富むプロテオグリカン」の一種で、SMC によって合成され、血管壁に存在するタンパクである (Johnson et al., 2007)。過去の報告でも、DCN は正常血管の恒常性だけでなく様々なタイプの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 (He et al., 2008; Nazemi et al., 2018)。さらに、先行研究から得られた EC のマイクロアレイ解析でコントロールと比べて MMD で発現変動していた遺伝子に DCN は含まれていなかったが、EC と SMC の共培養モデルを検討した過去の研究では DCN が EC の増殖や遊走を促進すると報告されており (Scott et al., 2017)、もやもや病では頭頸部動脈において神経外胚葉由来の SMC から過剰に発現される DCN の影響で隣接する EC の増殖能異常を引き起こす、といった仮説も考えられる。ただし、DCN に関して行ったリアルタイム PCR では、コントロール群と比較して MMD 群で発現変動が発現上昇している傾向はあったが、有意差ではなく ($P=0.12$)、MMD の病態に DCN が関与しているかは慎重に検討すべきと考えられた。なお、DCN のほか、SLITRK4 および PCDHB8 でも二群に有意差はないものの傾向はあり (それぞれ $P=0.12$ 、 $P=0.18$)、マイクロアレイ解析の妥当性は裏付けられた。

もやもや病の主病変である内頸動脈終末部の肥厚内膜中に存在する細胞は SMC マーカーを発現していると報告されている (Lin et al., 2012)。この内膜肥厚が、EC の異常によるものか、SMC の異常によるものかは未だに明らかにされていない。本研究および過去の iPS 細胞を用いた MMD 患者由来 EC の研究結果を考慮すると、MMD 患者においては、生来的には SMC よりも、EC において明らかな機能異常が存在していると考えられる。EC の機能異常により血管内膜肥厚が起こる機序としては、EC による SMC の増殖や遊走の制御に異常があり、内膜内において SMC の過剰な増殖を引き起こす可能性が考えられる。この仮説について検証するためには、今後、もやもや病患者および健常者の iPS 細胞から作製した EC と SMC とを共培養し、SMC の増殖能と遊走能について解析する必要があると考えられた。

本研究の限界性を述べる。第一に、今回我々が分化誘導したのは NCSC を経由した神経外胚葉由来の SMC のみで、側板中胚葉や沿軸中胚葉由来の SMC の分化誘導は行っておらず、これらの SMC の遺伝子的および機能的な解析ができていない点が挙げられる。第二に、SMC には 2 つの表現型があるとされているが、今回の研究で作製した SMC は収縮型であり、合成型の作製が達成できず、その解析は行えていない点が挙げられる。このことは、作製した SMC の継代増殖が困難であったという問題点にも関連している可能性がある。第三に、今回の研究で行った評価系は限定的な細胞培養環境で行われたものであり、脳動脈に起こり得るほかの環境因子（低酸素状態や血行力学的シェアストレス、成長因子添加）の影響の評価はなされていない点が挙げられる。これらの環境因子に暴露された際に、SMC の機能異常が明らかとなる可能性は否定できないと考えられた。

結論

① 本研究全体から得られた新知見

もやもや病（MMD）患者の末梢血より樹立した iPS 細胞から、神経堤幹細胞を経由して神経外胚葉に由来する頭頸部動脈に特異的な血管平滑筋細胞（SMC）を作製した。

健常者（コントロール）由来 iPS 細胞から分化誘導した SMC と比較して、増殖能や遊走能、収縮能といった細胞機能に関して有意な差は認めなかった。

マイクロアレイ解析では、同じ細胞株の iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞（EC）においてコントロール群と MMD 群の間で発現変動に差がある遺伝子が 120 個だったのに対して、SMC では 6 個の遺伝子にしか差を認めなかった。

② 新知見の意義

これまでは実際のもやもや病患者の手術時に得られる血管組織から単離培養した SMC や smooth muscle progenitor cell といった間接的な細胞を用いてしか病因の検討ができなかったが、もやもや病で侵される頭頸部動脈に特異的な SMC を、後天的要因を受けていない iPS 細胞から作製することができ、MMD の SMC に対して様々な因子の影響を解析、検討することが可能になると考えられた。

③ 今後どのような研究が展開されうるか

もやもや病患者由来の iPS 細胞から分化誘導した SMC に対して、成長因子などの動脈血管壁の恒常性を担う液性因子や血行力学的シェアストレス、低酸素などの頭蓋内で起こりうる環境因子を加え、SMC に生じる遺伝子発現変動や細胞機能を解析することが期待される。また、EC 単独、SMC 単独での研究だけでなく、それらを共培養するような実験系を確立することができれば、EC と SMC の相互的な恒常性や機能異常の検証が可能となり、もやもや病の動脈壁で起こっている現象を細胞レベルで模倣することが可能となり、もやもや病の発病メカニズムや病態の解明につながる可能性が期待される。

④ 今後の課題

血管平滑筋細胞の 2 つの表現型に関して、収縮型だけでなく、合成型の血管平滑筋細胞の分化誘導法を見出すことも望まれる。さらに、もやもや病の責任遺伝子の候補として RNF213 が注目されているが、一卵性双生児でも発病する者とならない者がい

るなど、エピジェネティクスの観点での病因探索も必要であり、iPS 細胞を用いた研究をどうエピジェネティクスと結び付けていくかが課題といえる。

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 寶金清博前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客員研究員、同分野濱内祝嗣元助教に深く感謝いたします。最後に、本研究にご協力いただいた長島里香実験助手、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。

なお、本研究の一部は以下の助成および寄付を受けたものである。

- ・ 日本学術振興会 科学研究費助成事業 学術研究助成基金助成金 15K10286
- ・ 日本学術振興会 科学研究費助成事業 学術研究助成基金助成金 15K15520
- ・ 日本学術振興会 科学研究費助成事業 学術研究助成基金助成金 17K16619
- ・ 日本学術振興会 科学研究費助成事業 科学研究費補助金 19H03765
- ・ サンバイオ社寄付金 PK631796

利益相反

本研究において開示すべき利益相反は以下の通り。

- ・サンバイオ社

※サンバイオ社は、実験の施行、データの収集および解析、結果の解釈を含め、本研究のいかなる部分にも関与していない。

引用文献

- Aoyagi, M., Fukai, N., Sakamoto, H., Shinkai, T., Matsushima, Y., Yamamoto, M., and Yamamoto, K. (1991). Altered cellular responses to serum mitogens, including platelet-derived growth factor, in cultured smooth muscle cells derived from arteries of patients with moyamoya disease. *J. Cell. Physiol.* *147*, 191-198.
- Aoyagi, M., Fukai, N., Yamamoto, M., Matsushima, Y., and Yamamoto, K. (1997). Development of intimal thickening in superficial temporal arteries in patients with moyamoya disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *99 Suppl 2*, S213-217.
- Ayoubi, S., Sheikh, S.P., and Eskildsen, T.V. (2017). Human induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells: differentiation and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* *113*, 1282-1293.
- Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K., and Marchant, R.E. (2010). Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue. Eng. Part B Rev.* *16*, 467-491.
- Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., et al. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* *8*, 424-429.
- Cheung, C., Bernardo, A.S., Pedersen, R.A., and Sinha, S. (2014). Directed differentiation of embryonic origin-specific vascular smooth muscle subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* *9*, 929-938.
- Cheung, C., Bernardo, A.S., Trotter, M.W., Pedersen, R.A., and Sinha, S. (2012). Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin-dependent disease susceptibility. *Nat. Biotechnol.* *30*, 165-173.
- Fukai, N., Aoyagi, M., Yamamoto, M., Sakamoto, H., Ogami, K., Matsushima, Y., and Yamamoto, K. (1994). Human arterial smooth muscle cell strains derived from patients with moyamoya disease: changes in biological characteristics and proliferative response during cellular aging in vitro. *Mech. Ageing Dev.* *75*, 21-33.
- Guey, S., Tournier-Lasserre, E., Herve, D., and Kossorotoff, M. (2015). Moyamoya disease and syndromes: from genetics to clinical management. *Appl. Clin. Genet.* *8*, 49-68.
- Hamauchi, S., Shichinohe, H., Uchino, H., Yamaguchi, S., Nakayama, N., Kazumata, K., Osanai, T., Abumiya, T., Houkin, K., and Era, T. (2016). Cellular Functions and Gene and Protein Expression Profiles in Endothelial Cells Derived

from Moyamoya Disease-Specific iPS Cells. *PloS One* *11*, e0163561.

Hayashi, K., Horie, N., Suyama, K., and Nagata, I. (2013). An epidemiological survey of moyamoya disease, unilateral moyamoya disease and quasi-moyamoya disease in Japan. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *115*, 930-933.

Hayashi, Y., Chan, T., Warashina, M., Fukuda, M., Ariizumi, T., Okabayashi, K., Takayama, N., Otsu, M., Eto, K., Furue, M.K., et al. (2010). Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PloS One* *5*, e14099.

He, F., Zhang, Q., Kuruba, R., Gao, X., Li, J., Li, Y., Gong, W., Jiang, Y., Xie, W., and Li, S. (2008). Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *372*, 746-751.

Hitomi, T., Habu, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Harada, K.H., Osafune, K., Taura, D., Sone, M., Asaka, I., Ameku, T., et al. (2013). 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.

Jiao, J., Xiong, W., Wang, L., Yang, J., Qiu, P., Hirai, H., Shao, L., Milewicz, D., Chen, Y.E., and Yang, B. (2016). Differentiation defect in neural crest-derived smooth muscle cells in patients with aortopathy associated with bicuspid aortic valves. *EBioMedicine* *10*, 282-290.

Johnson, P.Y., Potter-Perigo, S., Gooden, M.D., Vernon, R.B., and Wight, T.N. (2007). Decorin synthesized by arterial smooth muscle cells is retained in fibrin gels and modulates fibrin contraction. *J. Cell. Biochem.* *101*, 281-294.

Jung, K.H., Chu, K., Lee, S.T., Park, H.K., Kim, D.H., Kim, J.H., Bahn, J.J., Song, E.C., Kim, M., Lee, S.K., et al. (2008). Circulating endothelial progenitor cells as a pathogenetic marker of moyamoya disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab* *28*, 1795-1803.

Kamada, F., Aoki, Y., Narisawa, A., Abe, Y., Komatsuzaki, S., Kikuchi, A., Kanno, J., Niihori, T., Ono, M., Ishii, N., et al. (2011). A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J. Hum. Genet.* *56*, 34-40.

Kang, H.S., Moon, Y.J., Kim, Y.Y., Park, W.Y., Park, A.K., Wang, K.C., Kim, J.E., Phi, J.H., Lee, J.Y., and Kim, S.K. (2014). Smooth-muscle progenitor cells isolated from patients with moyamoya disease: novel experimental cell model. *J. Neurosurg.* *120*, 415-425.

Kawabori, M., Kuroda, S., Sugiyama, T., Ito, M., Shichinohe, H., Houkin, K., Kuge,

Y., and Tamaki, N. (2012). Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. *Neuropathology* *32*, 217-226.

Kinnear, C., Chang, W.Y., Khattak, S., Hinek, A., Thompson, T., de Carvalho Rodrigues, D., Kennedy, K., Mahmut, N., Pasceri, P., Stanford, W.L., et al. (2013). Modeling and rescue of the vascular phenotype of Williams-Beuren syndrome in patient induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 2-15.

Koizumi, A., Kobayashi, H., Hitomi, T., Harada, K.H., Habu, T., and Youssefian, S. (2016). A new horizon of moyamoya disease and associated health risks explored through RNF213. *Environ. Health Prev. Med.* *21*, 55-70.

Lin, R., Xie, Z., Zhang, J., Xu, H., Su, H., Tan, X., Tian, D., and Su, M. (2012). Clinical and immunopathological features of Moyamoya disease. *PLoS One* *7*, e36386.

Liu, W., Morito, D., Takashima, S., Mineharu, Y., Kobayashi, H., Hitomi, T., Hashikata, H., Matsuura, N., Yamazaki, S., Toyoda, A., et al. (2011). Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One* *6*, e22542.

Miyamoto, S., Yoshimoto, T., Hashimoto, N., Okada, Y., Tsuji, I., Tominaga, T., Nakagawara, J., Takahashi, J.C., and Investigators, J.A.M.T. (2014). Effects of extracranial-intracranial bypass for patients with hemorrhagic moyamoya disease: results of the Japan Adult Moyamoya Trial. *Stroke* *45*, 1415-1421.

Nanba, R., Kuroda, S., Ishikawa, T., Houkin, K., and Iwasaki, Y. (2004). Increased expression of hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid and intracranial artery in moyamoya disease. *Stroke* *35*, 2837-2842.

Nazemi, S., Rezapour, A., Moallem, S.M.H., Afshar, M., Elyasi, S., Mashreghi Moghadam, H.R., Dargahi Zaboli, M., and Mohammadpour, A.H. (2018). Could decorin be a biomarker of coronary artery disease? A pilot study in human beings. *Acta. Biomed.* *89*, 365-369.

Phi, J.H., Suzuki, N., Moon, Y.J., Park, A.K., Wang, K.C., Lee, J.Y., Choi, S.A., Chong, S., Shirane, R., and Kim, S.K. (2017). Chemokine Ligand 5 (CCL5) Derived from Endothelial Colony-Forming Cells (ECFCs) Mediates Recruitment of Smooth Muscle Progenitor Cells (SPCs) toward Critical Vascular Locations in Moyamoya Disease. *PloS One* *12*, e0169714.

Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis; Health Labour Sciences Research Grant for Research on

Measures for Infractable Diseases. (2012). Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis). *Neurol. Med Chir.* *52*, 245-266.

Scott, R.A., Ramaswamy, A.K., Park, K., and Panitch, A. (2017). Decorin mimic promotes endothelial cell health in endothelial monolayers and endothelial-smooth muscle co-cultures. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *11*, 1365-1376.

Sonobe, S., Fujimura, M., Niizuma, K., Nishijima, Y., Ito, A., Shimizu, H., Kikuchi, A., Arai-Ichinoi, N., Kure, S., and Tominaga, T. (2014). Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res.* *1552*, 64-71.

Steinbach, S.K., and Husain, M. (2016). Vascular smooth muscle cell differentiation from human stem/progenitor cells. *Methods* *101*, 85-92.

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

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.

Wakai, K., Tamakoshi, A., Ikezaki, K., Fukui, M., Kawamura, T., Aoki, R., Kojima, M., Lin, Y., and Ohno, Y. (1997). Epidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide survey. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *99 Suppl 2*, S1-5.

Wang, A., Tang, Z., Li, X., Jiang, Y., Tsou, D.A., and Li, S. (2012). Derivation of smooth muscle cells with neural crest origin from human induced pluripotent stem cells. *Cells Tissues Organs* *195*, 5-14.

Wanjare, M., Kuo, F., and Gerecht, S. (2013). Derivation and maturation of synthetic and contractile vascular smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Cardiovasc. Res.* *97*, 321-330.

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

Yamamoto, M., Aoyagi, M., Fukai, N., Matsushima, Y., and Yamamoto, K. (1999). 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.

Yang, L., Gao, L., Nickel, T., Yang, J., Zhou, J., Gilbertsen, A., Geng, Z., Johnson, C.,

- Young, B., Henke, C., et al. (2017). Lactate Promotes Synthetic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* *121*, 1251-1262.
- Yang, L., Geng, Z., Nickel, T., Johnson, C., Gao, L., Dutton, J., Hou, C., and Zhang, J. (2016). Differentiation of Human Induced-Pluripotent Stem Cells into Smooth-Muscle Cells: Two Novel Protocols. *PloS One* *11*, e0147155.
- Yoshimoto, T., Houkin, K., Takahashi, A., and Abe, H. (1997). Evaluation of cytokines in cerebrospinal fluid from patients with moyamoya disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *99 Suppl 2*, S218-220.