

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 濱内 祝嗣

学位論文題名

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

【背景と目的】もやもや病は頭蓋内内頸動脈に進行性の狭窄を呈する疾患であり、小児では脳梗塞などの脳虚血症状、成人では脳虚血症状もしくは脳出血を発症する。もやもや病には現時点ではモデル動物が存在せず、疾患徳的細胞を得る手段も患者由来の検体のみであり、病態解析研究を行う上で困難があった。近年、もやもや病の感受性遺伝子として RNF213 が同定された。RNF213 の一塩基多型(p.R4810K, c.14429G>A, rs112735431)が、家族性もやもや病の 95%、孤発性もやもや病の 73%に認められることが明らかとなった。感受性遺伝子の発見は、もやもや病の病態解析に新たな手法をもたらした。RNF213 knockout mice などのモデル動物や、iPS 細胞を用いた病態解析の報告がなされている。もやもや病患者の皮膚線維芽細胞から樹立した、もやもや病特異的 iPS 細胞から血管内皮細胞の分化誘導させた研究では、もやもや病血管内皮では *in vitro* での血管新生能が低下していることが報告されている。この結果から、iPS 細胞から作製した血管内皮細胞が *in vitro* においてもやもや病特異的な異常を再現しうることもやもや病の病態解析研究において iPS 細胞が有用な手段となりうることを示された。本研究において我々は、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 細胞を作成し、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。

【対象と方法】本研究では 3 人のもやもや病患者から新規に iPS 細胞を樹立した。過去に樹立された 3 人の健常者由来 iPS 細胞を control として用いた。十分な informed consent の後、RNF213R4810K を有するもやもや病患者 3 名から採血を行った。末梢血単核球を分離し、抗 CD3 抗体にて刺激した後に、山中 4 因子を搭載したセンダイウイルスを感染させた。感染後の細胞を mouse embryonic fibroblast 上で培養した。iPS 細胞のコロニーが確認できるようになったら、コロニーを物理的に pick up し、十分な細胞量とした後に、免疫染色、RT-PCR にて未分化マーカーの発現を確認した。また、SCID マウス精巣に iPS 細胞を注入し奇形種の作成を行った。また、G-band にて染色体異常がないか確認した。iPS 細胞の樹立後に、血管内皮細胞への分化誘導方法を検証した。Matrigel 上に iPS 細胞を播種し、BMP4+bFGF で 24 時間、VEGF+bFGF で 2 日間、bFGF+VEGF+SB431542 で 3 日間 treatment を行った。Day6 にて FACS にて CD144⁺CD31⁺細胞を sorting し、培養した後に内皮細胞のマーカーの発現の確認を行った。また、細胞の増殖能、血管新生能の評価を行った。これらの機能解析の際、VEGF, bFGF, TGF- β , BMP4 に対する反応性の評価も行った。また、内皮細胞より RNA とタンパク質を抽出し、マイクロアレイ、プロテオミクスを行った。

【結果】内皮細胞の増殖能に関し、control 群ともやもや病群とで有意な差は認められなかった。また、両群間で VEGF, bFGF, TGF- β , BMP4 に対する反応性の違いも認められなかった。一方、血管新生能に関しては、VEGF, bFGF, TGF- β , もしくは BMP4 を加えた場合と、加えなかった場合のいずれの条件においてももやもや病群において有意な低下が認められた。マイクロアレイでは、unsupervised clustering を行った結果、健常群ともやもや病

群間で明らかな遺伝子発現の差が認められた。もやもや病で有意に発現が低下している probe が 88、もやもや病で有意に発現が上昇している probe が 117 認められた。これらの probe に対して、pathway analysis を行ったところ、もやもや病で有意に発現が低下している遺伝子群の中には、extracellular matrix receptor 関連遺伝子が有意に enrich されていることが示された。また、もやもや病で有意に発現が上昇している遺伝子群の中には oocyte meiosis, progesterone-mediated oocyte maturation 関連の遺伝子が有意に enrich されていた。抽出された extracellular matrix receptor 関連の遺伝子の中には血管新生に重要な役割をもつ integrin $\beta 3$ が含まれていた。RT-PCR にて integrin $\beta 3$ の RNA レベルの発現を検証したところ、もやもや病において有意に発現が低下していた。さらに、western blot を行い、integrin $\beta 3$ の発現をタンパク質レベルで検証したところ、もやもや病において有意な発現の低下が確認された。次いでプロテオミクスを行った。抽出したタンパク質を二次元電気泳動したゲルを解析し、健常群ともやもや病群とで発現の差が 1.5 倍以上あり、p-value<0.05 以下である spot を抽出した。もやもや病で有意に発現が低下している spot は 6、もやもや病で有意に発現が亢進している spot は 12 認められた。これらの spot からタンパク質を抽出し質量分析計にてタンパク質の同定を行った。もやもや病で有意に発現が亢進しているタンパク質の中には、hnRNP タンパク質や U2AF1 などの splicing regulator が多く含まれていた。

【考察】本研究では皮膚線維芽細胞ではなく、末梢血単核球から iPS 細胞の樹立を行った。本方法は検体の採取方法が低侵襲であるため、患者にとっては受け入れやすい手法と考えられる。細胞の機能解析として増殖能、血管新生能を in vitro で評価した。増殖能に関してはもやもや病特異的な差異は認めなかった。一方、tube formation assay ではもやもや病血管内皮細胞にて血管新生能が有意に低下していた。この結果は Hitomi らが行った、もやもや病患者の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞由来血管内皮細胞を用いた tube formation assay の結果と一致する。この結果から、末梢血単核球から作製した iPS 細胞も、今後もやもや病の病態解析の手段となりうると思われる。本研究では、VEGF, bFGF, TGF- β , BMP4 に対する反応性を、proliferation assay, tube formation assay にて評価した。過去に Aoyagi ら、Yamamoto らより、もやもや病患者の頭皮の血管から採取した平滑筋細胞では IL-6, IL- β 1, PDGF-AA, PDGF-BB に対する反応性が異なっているという報告がなされている。本研究では、angiogenic factor に対する、もやもや病内皮細胞に特異的な反応は検出されなかった。今回検証した angiogenic factor の種類が少なかったため、今後さらに factor の数を増やすことで異常を検出できる可能性もあると考えられた。マイクロアレイでは unsupervised clustering の結果、control 群ともやもや病群とで明らかな遺伝子発現の違いが見いだされた。また、もやもや病血管内皮細胞において integrin $\beta 3$ などの extracellular matrix receptor 関連遺伝子の発現が低下していることが示された。Extracellular matrix receptor は血管新生において重要な役割を担っているが、これまでもやもや病で解析をされたことはない。今後、もやもや病の病態解析における新たな target となる可能性があると思われる。また、プロテオミクスではもやもや病血管内皮細胞において多数の splicing regulator の発現亢進が認められた。Alternative splicing はタンパク質に多様性を与える上で重要な機構であり、細胞種、もしくは疾患特異的な splicing pattern の存在が知られている。もやもや病においてこれまで splicing pattern の解析がなされたことはなく、今後の研究が期待されると考えられる。

【結語】もやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞では in vitro での血管新生能が低下しており、extracellular matrix receptor 関連の遺伝子発現が低下していた。また、プロテオミクスでは多数の splicing regulator 関連遺伝子の発現亢進が認められた。