

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10286

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた、もやもや病における脳出血発症メカニズムの解析と予防薬の研究

研究課題名(英文) Investigation of barrier function of endothelial cells derived from moyamoya disease-specific iPS cells

研究代表者

数又 研 (KAZUMATA, Ken)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60634144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞より血管内皮細胞を分化誘導した。マイクロアレイを行った結果、もやもや病血管内皮細胞において、tight junction関連遺伝子であるCLDN1, Focal adhesions and hemidesmosomes関連遺伝子であるDST, NEXN, ITGB3が低下していた。RT-PCRでは、ITGB3はもやもや病血管内皮細胞において発現が低下していたが、DST, NEXNは有意な差はなく、CLDN1は明らかなバンドが確認できなかった。血管透過性アッセイにおいてY-27632を添加した際に、健常群では透過性が低下したのに対し、もやもや病においては亢進した。

研究成果の概要(英文)：We differentiated vascular endothelial cells from iPS cells derived from healthy persons and moyamoya disease patients. The expression of cell junction related genes were analysed with microarray and the result showed that CLDN1, DST, NEXN and ITGB3 were down-regulated in moyamoya disease. RT-PCR showed that ITGB3 was significantly downregulated in moyamoya disease, however, there were no significant difference in the expression of DST and NEXN. We could not observe the band intensity of CLDN1 in neither RT-PCR and western blotting. In permeability assay, permeability was increased in endothelial cells of moyamoya disease when Y-27632 was added to medium, whereas permeability decreased in normal control.

研究分野：脳血管障害

キーワード：もやもや病 iPS細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は両側内頸動脈終末部の進行性狭窄を呈する原因不明の疾患である。小児では一過性脳虚血発作や脳梗塞で発症することがほとんどだが、成人の半数は頭蓋内出血で発症する。

もやもや病において頭蓋内出血は患者のADLを悪化させる最大の原因となっており、再発率は2~20年間の観察中で30~65%と報告されており、有効な予防法が切に望まれている。血行再建術により出血率が抑制されることが報告されたが、それでもなお5年間で11.9%は再出血のリスクがあり、長期予後改善のためにはさらなる発生の抑制が望まれる。もやもや病における脳出血は大脳基底核に多発し、同部位を貫くもやもや血管の脆弱性がその発生に関与していると考えられている。その脆弱性が何に起因するのかこれまで調べられていない。

我々はもやもや血管において内皮細胞により制御される血管のバリア機能の低下があるために脆く破綻しやすくなっているのではないかと考えた。そして、その脆弱性を患者由来iPS細胞から作成した血管内皮を用いてin-vitroで再現できれば、そのメカニズムの解明と、治療薬の検討を行えると考えた。

2. 研究の目的

本研究はもやもや病における脳出血発症のメカニズムの特殊性を、もやもや病患者由来iPS細胞から作成した血管内皮細胞によってin-vitroで解析し、さらにその予防薬について検討するものである。

もやもや病における脳出血の発症はもやもや血管の脆弱性が関与していると考えられている。我々は血管内皮細胞間のtight junction機能が低下しているのではないかと考えた。

本研究ではiPS細胞由来の血管内皮細胞を用い、もやもや病において内皮細胞層のバリア機能の低下がないかをさまざまな条件下で検討し、さらにその分子機構について解析を行う。さらに既知の内皮機能改善薬の効果を検証する。

3. 研究の方法

本研究では健常者およびもやもや病患者由来のiPS細胞を用いて血管内皮細胞を分化誘導し解析に用いる。Tight junction関連遺伝子の発現の差異をmicroarray, PCRとwestern blotで確認する。In Vitro Vascular Permeability Kitを使用し、もやもや病における血管内皮のバリア機能を健常群と比較する。次いで、既知の内皮機能改善薬を培地に添加し、バリア機能の変化を健常群ともやもや病群とで比較する。

4. 研究成果

1) 分化誘導した血管内皮細胞からRNAを抽出し、マイクロアレイにて解析を行った。Gene ontology termとしてtight junctionを含む遺伝子は1482個あり、もやもや病血管内皮細胞で有意に発現が低下(発現量1/3かつ $p < 0.05$)している遺伝子は13個であった。Tight junctionに関わる遺伝子はClaudin1のみであった。Focal adhesions and hemidesmosomesに関わる遺伝子はDystonin, Nexillin, ITGB3であった。

2) RT-PCRにてITB3はもやもや病血管内皮細胞にて発現が低下していた。Caludin-1はRT-PCRおよびwestern blottingにおいて明らかなバンドが確認できず、内皮細胞において発現量の低い遺伝子である可能性が考えられた。Dystonin, Nexillinは、RT-PCTにおいて、もやもや病と健常群の間で明らかな発現の差は認められなかった。

3) Permeability assayにおいて、Y-27632を添加した際に、健常人iPS細胞由来血管内皮細胞では血管透過性が抑制されたのに対し、もやもや病血管内皮細胞では血管透過性が亢進した。

4) 特定の薬剤に対する血管透過性の変化の違いが、RNF213の変異に関連しているのか、クローンの特性に由来するものなのか今後検証する必要がある。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Kazumata K, Uchino H, Tokairin K, et al.:
Cerebral Hyperperfusion Syndrome After
Revascularization Surgery in Moyamoya
Disease: Region-Symptom Mapping and
Estimating a Critical Threshold., World
Neurosurg., doi: 10.1016/j.wneu., Epub
ahead of print, 2018、査読有

Kazumata K, Tha KK, Uchino H, et al.:
Topographic changes in cerebral blood flow
and reduced white matter integrity in the first
2 weeks following revascularization surgery
in adult moyamoya disease., J Neurosurg.,
Vol. 127, No. 2, pp. 260-269, 2017、査読
有

Kazumata K, Tha KK, Uchino H, et al.:
Mapping altered brain connectivity and its
clinical associations in adult moyamoya
disease: A resting-state functional MRI
study., PLoS One, Vol. 12, No. 8, e0182759,
2017、査読有

Kazumata K, Kamiyama H, Saito H, et al.:
Direct Anastomosis Using Occipital Artery
for Additional Revascularization in
Moyamoya Disease After Combined
Superficial Temporal Artery-Middle
Cerebral Artery and Indirect Bypass., Oper
Neurosurg., Vol. 13, No. 2, pp. 213-223,
2017、査読有

Kazumata K, Ito M, Uchino H, et al.:
Proposal for a Prospective Registry for
Moyamoya Disease in Japan., Neurol Med
Chir., Vol. 57, No. 2, pp. 66-72, 2017、
査読有

Kazumata K, Tha KK, Narita H, et al.:
Investigating Brain Network Characteristics
Interrupted by Covert White Matter Injury in
Patients with Moyamoya Disease: Insights
from Graph Theoretical Analysis., World
Neurosurg., Vol. 89, pp. 654-665, 2016、
査読有

Kazumata K, Tha KK, Narita H, et al.:
Chronic ischemia alters brain microstructural
integrity and cognitive performance in adult
moyamoya disease., Stroke, Vol. 46, No. 2,
pp. 354-60, 2015、査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

数又 研、もやもや病における脳微小構造
変化と認知機能障害の神経基盤の探索、
第 76 回 日本脳神経外科学会学術総会、
2017/10/13、名古屋国際会議場(愛知県名
古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

数又 研 (KAZUMATA, Ken)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：60634144

(2)研究分担者

中山 若樹 (NAKAYAMA, Naoki)
北海道大学・医学研究院・講師
研究者番号：40421961

鏡谷 武雄 (ABUMIYA, Takeo)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：80270726

七戸 秀夫 (SHICHINOHE, Hideo)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号：80374479

寶金 清博 (HOUKIN, Kiyohiro)
北海道大学・大学病院・教授
研究者番号：90229146