

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390336

研究課題名(和文)もやもや病における血管内皮前駆細胞の病態解析

研究課題名(英文)Analysis for circulating endothelial progenitor cells in moyamoya disease

研究代表者

寶金 清博(HOUKIN, Kiyohiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：90229146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：1) 患者血中EPCのFACS解析：患者33名、健康対照14名から採血を行った。術前では小児患者、成人患者ともにEPCの有意な細胞数低下が示された。また、術後は有意なCD34+/CD133+細胞の低下がみられた。これら所見は、病変部でのEPC消費亢進を示唆していると考えられた。

2) もやもや病患者由来iPS細胞の樹立：患者3名、正常対照3名からiPS細胞を作成した。血管内皮細胞への分化誘導を行い検討したところ、患者細胞では管腔形成能の低下がみられた。マイクロアレイとプロテオミクス解析では、患者で発現が低下している遺伝子/タンパク質に血管新生に関与するものが見出され、病因との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1) Consumption of circulating EPC in MMD patients: Thirty-three patients with MMD and 14 healthy volunteers were registered to obtain mononuclear cells and plasma. In the patients, the circulating EPC was lower than control, and the circulating CD133+/CD34+ cells decreased after the operation, significantly. The level of bFGF was significantly lower in adult patients. The results suggested that EPCs would be consumed aggressively at the lesion. The pathological significance of bFGF in adult patients is still unclear.

2) Analysis of iPS cells from MMD patients: The iPS cell lines were established from PBMCs of 3 MMD patients and 3 healthy persons. The endothelial differentiation was conducted on matrigel layer. The endothelial cells from MMD were impaired for the angiogenesis in vitro, significantly. In microarray analysis, it was found that KEGG pathway analysis of genes downregulated in MMD, that is, extracellular matrix receptor-related genes were significantly downregulated in MMD.

研究分野：脳血管障害

キーワード：もやもや病 血管内皮前駆細胞 iPS細胞 サイトカイン

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に進行性の狭窄が出現する原因不明の疾患で、小児・成人両者に発生する、わが国をはじめとする東アジアに好発する、約 20%で家系内発症がみられるなどの特徴を有している。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。研究代表者、分担者らは、これまで約 20 年にわたって本疾患の診断・外科治療・予後解析・原因究明に努めてきた。

これまで、本疾患の原因には感染症、遺伝子異常などが示唆されていたが、2011 年に本疾患の感受性遺伝子 (RNF213) が報告されるなど、本疾患は病因論、治療法の面において大きな変革点を迎えている。しかしながら、その原因遺伝子がどのようなメカニズムを介して疾患の発症に関与しているのかは、課題として残されている。

近年の研究によって血中に存在する内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) が、本疾患の成因に関与している可能性が示唆されている。Yoshihara ら (2008) の報告以来、患者血液から採取した EPC にはさまざまな機能異常や数的異常が存在すると報告されているが、その意義や解釈にも不明の部分が多い。

また、本疾患には現時点で有効な動物実験モデルや、*in vitro* 実験モデルが存在せず、このことが原因究明や、外科的血管再建術以外の有効な治療法の開発を阻んでいる。近年、パーキンソン病、家族性自律神経障害、ALS など様々な中枢神経疾患において患者由来 iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) 株が樹立し、病態解明研究に用いられている。もやもや病患者由来 iPS 細胞作成の報告は、本研究開始時点ではみられなかった。

2. 研究の目的

われわれは、もやもや病患者における血中

EPC の病態を明らかにすることで、血中 EPC がもやもや病の発生と進展にどのように関わっているのかを解明する。さらにもやもや病患者の体細胞から iPS 細胞を作成し、その細胞株の血管内皮細胞への分化能、分化させた内皮細胞の機能解析などを通じ、もやもや病の原因究明や、治療法開発の基盤研究を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 患者末梢血中 EPC の FACS 解析

新規に発生した患者から末梢血中の単核球文庫を分離した。CD34、CD133、VEGFR2 といった EPC の表面抗原に対してフローサイトメトリー (FACS) を実施し、各患者における血中 EPC 数を測定した。対照群との比較や、血管再建術前後での変化を検討して、本疾患における血中 EPC と病因の関係について明らかにすることを試みた。また保存した患者血漿を用いて ELISA を行い、血漿中の VEGF、SDF-1 α 、bFGF、HGF 濃度を測定した。

(2) もやもや病患者由来 iPS 細胞の樹立

患者から血液を採取し、単核球を分離する。センダイウイルスを用いて山中 4 因子 (c-Myc、Oct3/4、Sox2、Klf4) を導入する。ウイルス感染約 30 日後に形成された iPS 細胞コロニーを単離する。十分な細胞量になるよう培養を行い、分化万能性・自己複製能を検討後、研究に用いる。

4. 研究成果

(1) 患者末梢血中 EPC の FACS 解析

患者 33 名 (小児 14 名、成人 19 名)、健康対照 14 名 (小児 5 名、成人 9 名) から採血を行った。術前採血では小児患者、成人患者ともに EPC の有意な細胞数低下が示された。また、術後採血が行われた症例では、術後に有意な CD34+/CD133+細胞の低下がみられた。また ELISA では、小児患者の術後で VEGF が増加傾向を示していた。EPC 数の患者群での低

下所見は、病変部でのEPC消費亢進を示唆する所見と考えられた。一方、小児患者術後でのVEGF増加傾向は、関節血行再建による良好な側副血行と関連することが示唆された。本結果は、国際学術誌に投稿準備中である。

(2) もやもや病患者由来iPS細胞の樹立

患者3名、正常対照3名から、iPS細胞を作成した。樹立した細胞株から血管内皮細胞への分化誘導を行った。培養後約2週間で免疫染色を行い、CD31、VE-cadherinの発現を確認した。得られた患者由来と正常対照由来の内皮細胞を用いて比較検討したところ、患者由来内皮細胞では管腔形成能の低下がみられた。これは、サイトカイン刺激によっても変化が生じなかった。次に得られた内皮細胞に対して、マイクロアレイ解析とプロテオミクス解析により網羅的な探索を行った。もやもや病で発現が低下している遺伝子/タンパク質の中に血管新生に関与するものが見出され、病因との関連が示唆された。本結果は、国際学術誌に投稿準備中である。

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 11 件)

1: Kazumata K, Tha KK, Narita H, Kusumi I, Shichinohe H, Ito M, Nakayama N, Houkin K. Chronic ischemia alters brain microstructural integrity and cognitive performance in adult moyamoya disease. *Stroke*. 2015 Feb;46(2):354-60. 査読有

2: Kuroda S, Kashiwazaki D, Hirata K, Shiga T, Houkin K, Tamaki N. Effects of surgical revascularization on cerebral oxygen metabolism in patients with Moyamoya disease: an 150-gas positron emission tomographic study. *Stroke*. 2014 Sep;45(9):2717-21. 査読有

3: Uchino H, Kazumata K, Ito M, Nakayama N, Kuroda S, Houkin K. Intraoperative assessment of cortical perfusion by indocyanine green videoangiography in surgical revascularization for moyamoya disease. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014 Sep;156(9):1753-60. 査読有

4: Kazumata K, Ito M, Tokairin K, Ito Y, Houkin K, Nakayama N, Kuroda S, Ishikawa T, Kamiyama H. The frequency of postoperative stroke in moyamoya disease following combined revascularization: a single-university series and systematic review. *J Neurosurg*. 2014 Aug;121(2):432-40. 査読有

5: Kazumata K, Shinbo D, Ito M, Shichinohe H, Kuroda S, Nakayama N, Houkin K. Spatial relationship between cerebral microbleeds, moyamoya vessels, and hematoma in moyamoya disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014 Jul;23(6):1421-8. 査読有

6: Vuignier S, Ito M, Kurisu K, Kazumata K, Nakayama N, Shichinohe H, Shiga T, Kiss JZ, Tamaki N, Houkin K. Ivy sign, misery perfusion, and asymptomatic moyamoya disease: FLAIR imaging and (15)O-gas positron emission tomography. *Acta Neurochir (Wien)*. 2013 Nov;155(11):2097-104. 査読有

7: Kawabori M, Kuroda S, Nakayama N, Hirata K, Shiga T, Houkin K, Tamaki N. Effective surgical revascularization improves cerebral hemodynamics and resolves headache in pediatric Moyamoya disease. *World Neurosurg*. 2013 Nov;80(5):612-9. 査読有

8: Kuroda S, Kashiwazaki D, Ishikawa T, Nakayama N, Houkin K. Incidence,

locations, and longitudinal course of silent microbleeds in moyamoya disease: a prospective T2*-weighted MRI study. Stroke. 2013 Feb;44(2):516-8. 査読有

9: Uchino H, Kuroda S, Hirata K, Shiga T, Houkin K, Tamaki N. Predictors and clinical features of postoperative hyperperfusion after surgical revascularization for moyamoya disease: a serial single photon emission CT/positron emission tomography study. Stroke. 2012 Oct;43(10):2610-6. 査読有

10: Kuroda S, Houkin K. Bypass surgery for moyamoya disease: concept and essence of surgical techniques. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(5):287-94. 査読有

11: Houkin K, Ito M, Sugiyama T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Kuroda S. Review of past research and current concepts on the etiology of moyamoya disease. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(5):267-77. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1: Hamauchi S, Shichinohe H, Houkin K et al. Analysis for the role of angiogenic factors on endothelial cells derived from moyamoya disease-iPSCs. 4th International Moyamoya Meeting. 7/2/2015, Kaiserin-Friedrich-Haus (Berlin, Germany)

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、寶金清博。もやもや病 iPSC 細胞由来血管内皮細胞における angiogenic factor への反応性の解析。第 14 回日本再生医療学会総会，3/19/2015，パシフィコ横浜（横浜市）

3: Shichinohe H, Kuroda S, Houkin K. Consumption of circulating endothelial progenitor cells in patients with moyamoya disease. 3rd International Moyamoya

Meeting. 7/12/2013, Hokkaido University Graduate School of Medicine (Sapporo, Japan)

[その他]

北海道大学病院もやもや病センターHP

<http://moyamoya.neurosurgery-hokudai.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寶金 清博 (HOUKIN Kiyohiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：90229146

(2) 研究分担者

黒田 敏 (KURODA Satoshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：10301904

七戸 秀夫 (SHICHINOHE Hideo)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80374479