

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 22 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462222

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞を用いたもやもや病の病因病態解析と治療法の開発

研究課題名(英文)Study for pathogenesis of Moyamoya disease using induced pluripotent stem cells

研究代表者

松尾 宗明(Matsuo, Muneaki)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：20219398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病で亡くなった患者さんの病変部の血管を免疫組織化学染色を用いて詳細に検討した。その結果、もやもや病の患者さんでは、動脈の内腔を覆っている血管内皮細胞の表面の基質(マトリックス)が正常と異なっており、基質を構成するコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸が平常に比し減少していることが分かった。そのため、もやもや病では血流ストレスによる内皮細胞の損傷を受けやすく、損傷部位から血管壁内へ細胞が浸潤し、そこでヒアルロン酸が過剰に産生されることにより血管内腔の狭窄をきたすことが推察される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the autopsy specimen of moyamoya disease by using immunohistochemistry methods. The surface matrix of moyamoya disease patient contains less amount of hyaruronan and chondroitin sulfate, thus the endothelial cells of moyamoya disease are vulnerable to shear stress of blood stream. As a result, repair cells are invade into the vascular wall and produce excessive amount of hyarulonon, then cause vascular occlusion.

研究分野：小児神経学

キーワード：脳血管障害 人工多能性幹細胞 細胞外マトリックス 血流ストレス

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、頭蓋内内頸動脈終末部、前および中大脳動脈近位部に狭窄または閉塞がみられ、脳底部に異常血管網が出現する病気である。最近、関連する遺伝子 RNF213 が同定されたが、その機能や病態についてはまだ不明である。

もやもや病は病理学的には内頸動脈終末部を中心とする動脈の内膜肥厚による内腔狭窄を呈する。動脈の内膜の増殖、肥厚のメカニズムが最近明らかになってきており、そのなかで細胞外マトリックスの構成要素であるヒアルロン酸が重要な役割を担っていることがわかってきた。

2. 研究の目的

我々は、もやもや病における内膜肥厚、内腔狭窄の病態、原因遺伝子との関係を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1)もやもや病患者剖検例の病変部血管と正常対照例の標本を免疫組織化学染色似て検討した。

(2)もやもや病患者3名から多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立し、平滑筋細胞、血管内皮細胞への分化誘導を行い、正常人由来iPS細胞からの平滑筋細胞、血管内皮細胞との比較検討を行った。

患者iPS細胞(A182, A205)と正常対照人より樹立したiPS細胞(N1)を平滑筋用培地SMCMで10日間培養し分化誘導。その後、抗 α -SMA抗体陽性細胞をMACSを用いて分離し、それぞれの平滑筋細胞株を樹立した(SM182, SM205, SMN1)。

それぞれの平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素の発現について検討した。刺激は、IL-1 β と低周波超音波刺激(LIPUS)を用いた。LIPUSは血流による血管壁への物理的ストレスのモデルとして行った。

それぞれの平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素(HAS2, HAS3)のmRNAの発現について、TaqMan定量PCRにて検討した。

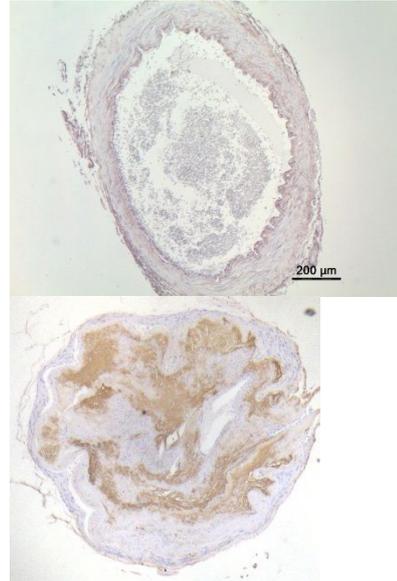
4. 研究成果

(1)もやもや病患者剖検例の免疫組織学的検討

患者血管では血管壁にHAS2を高発現した骨髄由来の血管内皮細胞前駆細胞が浸潤しており、肥厚した内膜にヒアルロン酸が蓄積している(図1)ことを発見した(未発表データ)。また、患者血管で

は内皮細胞表面のマトリックスを形成するコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の発現が低下しており、その結果、血流によるshear stressに対する脆弱性をきたしている可能性が示唆された。

図1 正常対照(上)ともやもや病患者(下)

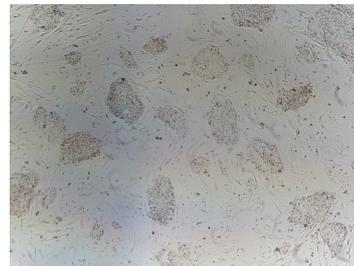


ヒアルロン酸結合蛋白染色

もやもや病では内膜、正常対照では血管内皮表面にヒアルロン酸が染まる。

(2)患者由来iPS細胞株の樹立
もやもや病患者3名から多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立した。(図2)

図2 もやもや病患者由来iPS細胞



(3)患者由来iPS細胞の平滑筋細胞への分化誘導

抗 α -SMA抗体陽性細胞をMACSを用いて分離し、それぞれの平滑筋細胞株を樹立した(SM182, SM205, SMN1)(図3A, B)。

図3A 分化誘導した平滑筋細胞

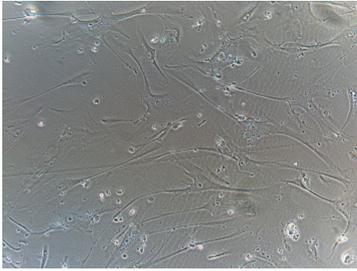
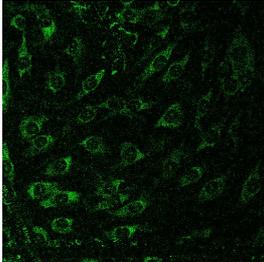
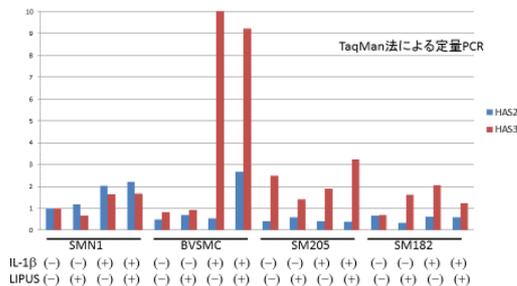


図 3B 抗 α SMA 抗体による蛍光抗体染色



(4) 平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS2, HAS3) 発現

平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS2, HAS3) 発現



正常人平滑筋細胞株 (SMN1) の無刺激状態での発現を 1 として、相対的な値で表示する。ヒト脳血管平滑筋細胞株 (BVSMC) も対照として使用した。正常細胞と患者細胞株の間で明らかな発現の違いはみられなかった。HAS3 は IL-1 β や超音波刺激で発現が亢進する傾向がみられた

(5) 患者由来細胞の血管内皮細胞への分化誘導は、研究期間内には終了せず引き続き研究を継続している。

研究当初は、もやもや病患者の血管平滑筋細胞でのヒアルロン酸合成の亢進を疑い、まず平滑筋細胞への分化誘導を行い正常との比較検討を行たが、有意な差は認めなかった。その後の患者剖検例の免疫組織学的所見の再検討により、血管内皮の細胞表面のマトリックスを形成するコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の発現が低下しており、その結果、血流による shear stress に対する脆弱性をきたしている可能性が示唆された。そのため、研究方針を修正変更し、血管

内皮への分化誘導を行い、今後細胞表面マトリックスの構成成分の違いについて正常細胞との比較検討を行っていく予定である。

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 5 件)

1. Matsuo, M., Shraishi, K, 他10名. Effects of intracerebroventricular administration of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in a patient with Niemann-Pick Type C disease. **Molecular Genetics and Metabolism Reports** (2014) 1 : 391-400. 査読あり
2. Matsuo, M. Ohno K, Ohtsuka F. Characterization of early onset neurofibromatosis type 2. **Brain Dev** (2014) 36:148-152. 査読あり
3. 松尾宗明. 神経線維腫症：小児の治療指針 **小児科診療** (2014) 77 : 849-850、査読なし
4. Matsuo, M., Maeda T, 他5名. Efficacy of dextromethorphan and cyclosporine A for acute encephalopathy. **Pediatr Neurol** (2013) 48:200-205. 査読あり
5. Matsuo, M., Togawa M, 他7名. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. **Molecular Genetics and Metabolism** (2013) 108:76-81. 査読あり

[学会発表](計 1 件)

1. 松尾宗明；もやもや病剖検例の免疫組織化学的検討 第 56 回日本小児神経学会総会、浜松市 2014.5.30.脳と発達 46 : S420

[図書](計 1 件)

1. 松尾宗明 . てんかんと発達障害 . 「小児神経学の進歩」第 44 集 . 2015. 診断と治療社

[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

松尾 宗明 (MATSUO, Muneaki)
佐賀大学医学部小児科学 教授
研究者番号：20219398