

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

特発性基底核石灰化症における
バイオマーカーの探索と病態モデル構築
に関する研究

關根 信一郎

目次

序論.....	1
第1章 家族性 IBGC における変異 <i>PDGFB</i> の検索及び機能解析.....	6
第1節 緒言.....	6
第2節 実験材料及び実験方法.....	9
第3節 実験結果.....	15
第4節 考察.....	30
第2章 家族性 IBGC における変異 <i>SLC20A2</i> の機能解析.....	32
第1節 緒言.....	32
第2節 実験材料及び実験方法.....	35
第3節 実験結果.....	43
第4節 考察.....	52
第3章 IBGC 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と病態モデルの構築.....	54
第1節 緒言.....	54
第2節 実験材料及び実験方法.....	57
第3節 実験結果.....	65
第4節 考察.....	75
第4章 総括及び結論.....	78
謝辞.....	80
引用文献.....	81
略字一覧.....	88

序論

異所性石灰化とは本来、骨が形成されない臓器や部位へのリン、カルシウムの非生理的な沈着である。脳内にも石灰化がみられることがあり、感染症、外傷、加齢など他の原因に伴って見られることが多い。他にも、副甲状腺機能低下症のような代謝性疾患やミトコンドリア症やダウン症などの神経疾患においても副次的に脳内石灰化を来す疾患が多数知られる。

1930年、ドイツの病理学者である Theodor Fahr (1877-1945) は脳内における原因不明な両側性石灰化を来す剖検症例を報告した¹。近年まで、原因不明の脳内石灰化症に対しては、報告者の名前をとって Fahr 病という疾患名が慣例的に用いられてきたが、疾患概念の曖昧さから脳内石灰化症を指す病名が多数存在している²。

二次的に脳内に石灰化をきたす疾患の存在や、疾患概念の曖昧さを回避するためにも、本邦においては特発性基底核石灰化症 (Idiopathic Basal Ganglia Calcification: IBGC) の名称で統一し、2017年に日本神経学会において診断基準が設けられた (Table 1)。また、欧米では家族性の脳内石灰症を Primary Familial Brain Calcification (PFBC) と呼ぶことが多い。しかしながら、PFBC は家族性の脳内石灰化症だけを指すため、脳内石灰化症における家族例の有無を区別しない IBGC との疾患概念に相違がある³。

IBGC の発症に男女差はなく、あらゆる年齢層で発症するとされる。しかしながら、石灰化が見つかることは思春期が多く、青年期以降で進行性の神経精神症状と運動症状がみられることが典型例である⁴。ほとんどが孤発例であり、家族例は IBGC 全体の数%程度である。脳における石灰化部位は、大脳基底核をはじめとして、小脳歯状核、海馬歯状回、大脳白質などにも及ぶことがあるが、個人差が非常に大きい⁵。臨床症状についても、パーキンソニズム、嚥下障害、構音障害、てんかん、知能発達遅延、精神症状、認知症症状、慢性的な頭痛など極めて多様性がある。一方で、病的な石灰化を認めるものの無症候の場合もみられる。また、これらの脳内石灰化の部位や大きさと、患者で見られる臨床症状やその程度に

相関はないとされる³。厚生労働省の研究班によると、本邦において登録されている IBGC 症例数はおおよそ 300 例である。しかしながら、IBGC の希少難病としての特徴から、IBGC と気づかずに日常生活を過ごしている患者もいると予想され、実際は現在の登録症例数よりも多いと考えられている。

約 80 年前に Fahr 病として報告されてから、IBGC に対して病態の理解は進まなかった。しかしながら、2012 年に中国のグループより原因遺伝子が初めて報告された⁶。その後も世界中のグループより相次いで報告され、これまでに原因遺伝子は *SLC20A2*⁶、*PDGFRB*⁷、*PDGFB*⁸、*XPR1*⁹、*MYORG*¹⁰ の 5 つが報告されている (Table 2)。当研究室からも本邦における新規の変異 *SLC20A2* を報告している¹¹。

IBGC の治療に関しては、現在のところ根本的な治療はなく、対症療法が中心である。不随意運動や精神症状を呈する患者には quetiapine などの抗精神病薬が用いられる。また、病理学的にパーキンソン病を合併する症例には抗パーキンソン病薬、発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (Paroxysmal Kinesigenic Choreoathetosis : PKC) に対しては carbamazepine が用いられる。しかしながら、効果は暫定的であり、真に効果のある治療薬の開発が切望されている。しかしながら、石灰化部位や沈着物の大きさと臨床症状やその重症度に相関がないこと、IBGC に特異的な検査評価項目やバイオマーカーが無いことから、病態解明や治療方法の開発が困難となっている。

2006 年、人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells, iPS 細胞) がマウス線維芽細胞から樹立され¹²、2007 年にはヒト iPS 細胞が報告された¹³。この iPS 細胞のもつ利点・特徴として、① ほぼ無限の増殖能をもつ、② 我々の身体を構成する全ての細胞・組織に分化する多分化能を有する、③ 大部分の個人の体細胞から樹立可能であるという点が挙げられる。これにより患者の体細胞から iPS 細胞を樹立し、目的の標的細胞へと分化させることで病態解明や創薬に役立てることが可能となった。

IBGC において、脳内石灰化や神経症状の責任細胞となる血管周囲の細胞や神経細胞、

グリア細胞を患者から得ることは困難である。そこで、疾患特異的 iPS 細胞を用いることで IBGC 病態の忠実な再現や治療薬開発を進めることが可能であると考えた (Fig. 1)。

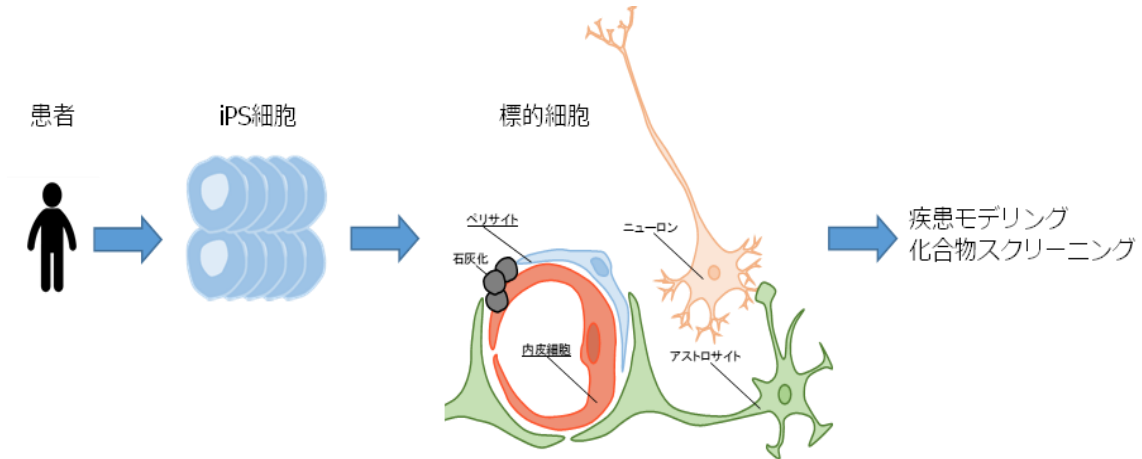


Fig. 1 iPS cells technology contributes to IBGC disease modeling, drug screening

そこで、本研究では、IBGC の病態解明のため、バイオマーカーを探索、及び *in vitro* 実験系における病態モデルの作製を目的とした。第 1 章では、本邦における新規 *PDGFB* 変異を見出し、変異によっておこるスプライシング異常を見出した。さらに、*PDGFB* 変異患者における血清中の PDGF-BB の低下を発見した。第 2 章では、*SLC20A2* 変異を有する患者における脳脊髄液中の Pi 濃度を測定し、脳内における *SLC20A2* の局在と変異タンパク質の機能異常を発見した。第 3 章では、*SLC20A2* 変異もしくは *PDGFB* 変異を有する患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。さらに、それぞれの疾患特異的 iPS 細胞を血管内皮細胞に分化誘導することで、第 1 章、第 2 章において見出した PDGF-BB の分泌異常、Pi 輸送活性の低下を、*in vitro* 実験系で確認した。

Table 1 特発性基底核石灰化症 (IBGC) の診断基準

〈診断基準〉

1. 頭部CT上、両側基底核を含む病的な石灰化を認める。
脳以外には病的な石灰化を認めないのが特徴である。病的とする定義は、大きさとして斑状（長径で10mm以上のものを斑状、10mm未満は点状）以上のものか、あるいは点状の両側基底核石灰化に加えて小脳歯状核、視床、大脳皮質脳回谷部、大脳白質深部などに石灰化を認めるものと定義する。
2. 下記に示すような脳内石灰化を二次的に来す疾患を除外できる。
主なものとして副甲状腺疾患（血清カルシウム (Ca)、無機リン、インタクト副甲状腺ホルモンが異常値、偽性副甲状腺機能低下症（血清Ca低値）、偽性偽性副甲状腺機能低下症（Albright骨異常養症）、コケイン症候群、ミトコンドリア病、エカルディグティエール症候群、ダウン症候群、膠原病、血管炎、感染（HIV脳症など、EBウイルス感染症など）、中毒、外傷、放射線治療などを除外する。
3. 下記に示すような緩徐進行性の精神・神経症状を呈する。
頭痛、精神症状（脱抑制症状、アルコール依存症など）、てんかん、精神発達遅延、認知症、パーキンソニズム、不随意運動など、小脳症状などの精神・神経症状などがある。
4. 遺伝子診断
これまでに報告されているIBGCの原因遺伝子は *SLC20A2*、*PDGFRB*、*PDGFB*、*XPR1*、*MYORG* などがあり、これらに変異を認めるもの。
5. 病理学的に脳内に病的な石灰化を認め、小坂・柴山病を含む、他の変性疾患、外傷、感染症、ミトコンドリア病などの代謝性疾患などが除外できるもの。

〈診断〉

Definite

1, 2, 3, 4を満たすもの。

1, 2, 3, 5を満たすもの。

Probable

1, 2, 3を満たすもの。

Possible

1, 2を満たすもの。

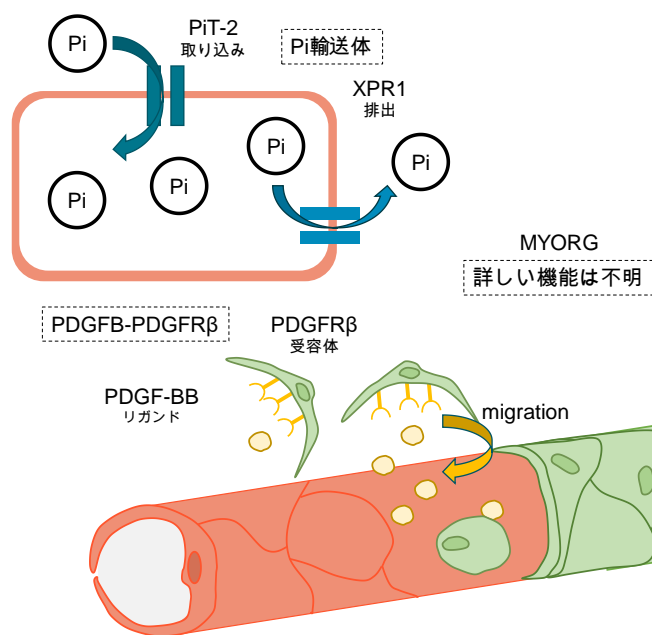
Table 2 List of causative gene associated with IBGC

Locas Name	Gene Symble	Chromocal Lucus	Protein Name	Reference
IBGC1	<i>SLC20A2</i>	8p11.21	Sodium dependent phosphate transporter 2	Wang et al. 2012
IBGC2	<i>PDGFRB</i>	5q32	Platlet-derived growth factor receptor beta	Nicolas et al. 2013
IBGC3	<i>PDGFB</i>	22q13.1	Platlet-derived growth factor subunit B	Keller et al. 2013
IBGC4	<i>XPRI</i>	1q25.3	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	Legato et al. 2015
IBGC5	<i>MYORG</i>	9q.13.3	Myogenesis regulating glycosidase	Yao et al. 2018

第1章 家族性 IBGC における変異 *PDGFB* の検索及び機能解析

第1節 緒言

IBGC 原因遺伝子は、機能的に大きく3つのグループに分類できる。1つ目としては無機リン酸 (inorganic phosphate ion: Pi) 輸送体として細胞内外の Pi 恒常性維持に関わる遺伝子 (*SLC20A2*, *XPR1*)、2つ目は血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor: PDGF) の受容体 (*PDGFRB*) とそのリガンド



(*PDGFB*)、3つ目は *MYORG* であるが、**Fig. 2 Causative gene associated with IBGC.** 詳細な機能に関する報告はない (Fig. 2)。これら IBGC 原因遺伝子のうち、*MYORG* は唯一、常染色体劣性遺伝形式をとるのに対して、*SLC20A2*、*PDGFRB*、*PDGFB*、*XPR1* は常染色体優性遺伝である。

当研究室においても岐阜大学との共同研究により、本邦における新規 *SLC20A2* 変異を見出している¹¹。一方で、2013年にはセルビア、ブラジル、フランス、ドイツ、フィンランド、スウェーデンの家族性 IBGC 家系において *PDGFB* が新規原因遺伝子として報告された⁸。その後も *PDGFB* について、新規変異の報告が続いている¹⁴⁻¹⁶が、本邦からの報告は未だない。

PDGF は、間葉系細胞の増殖や遊走に関わる重要な因子である¹⁷。PDGF 受容体はチロシンキナーゼ型受容体で α 及び β の2種類のサブタイプが存在する。PDGF 受容体 β はモノマーで存在し、2つの受容体が発配を介して架橋構造のリガンド-受容体複合体を形成

する。そして、受容体の細胞内ユニットに存在する複数のチロシンキナーゼドメインが相互に自己リン酸化することで、下流シグナル分子をリクルートメントし、シグナルが伝達される¹⁸。リガンドであるPDGFはA、B、C、Dの4種類のサブユニットが存在し、ホモダイマー (AA、BB、CC、DD)もしくはヘテロダイマー (AB)を形成して受容体に作用する (Fig. 3)。これらはPDGF受容体との親和性が異なる。リガンドAとCは受容体 α との親和性を持ち、リガンドDは受容体 β との親和性を持つ。また、リガンドBは受容体 α 、 β の両方に対する親和性を持ち、最も親和性が高い^{18,19} (Fig. 3)。

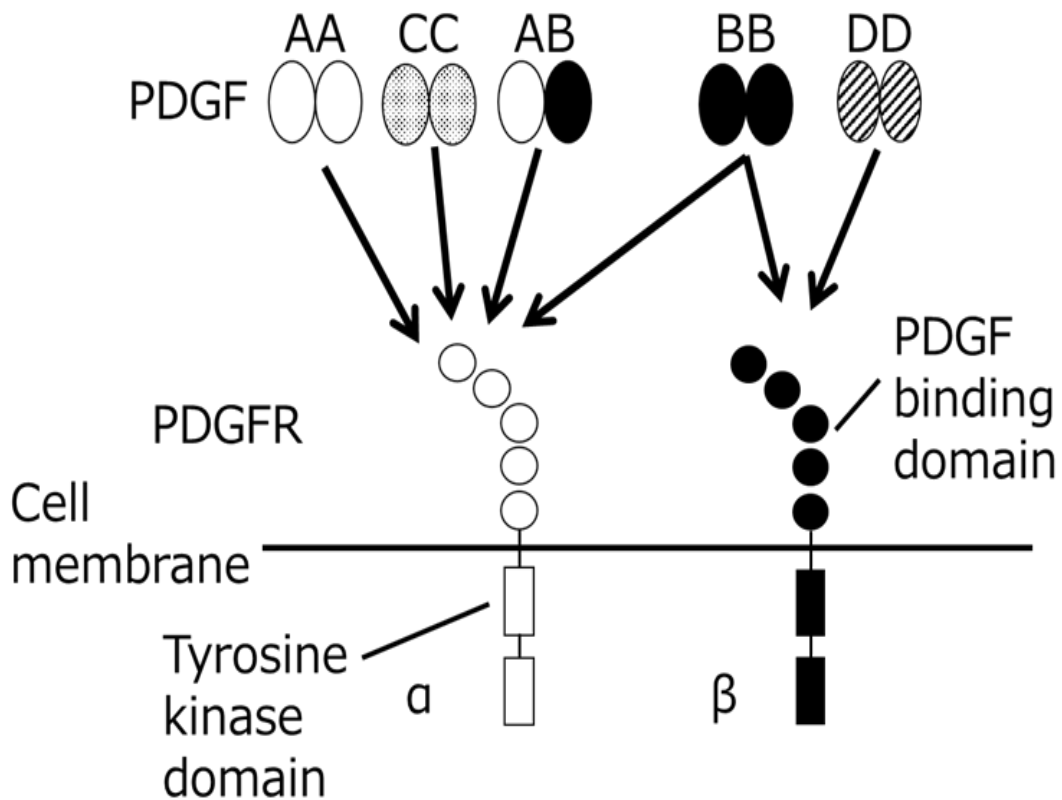


Fig. 3 PDGF and PDGFR signal transduction

Interaction between PDGF families and PDGFR. Arrows indicate the affinity PDGF to PDGFR. B: PDGF-BB/PDGFR- β signal transductions of neuron and central nervous system vessels.

前述のように本邦の IBGC 患者での *PDGFB* 変異の保有状況は今のところ不明のままである。そこで、本研究では *PDGFB* 変異と IBGC の発症との関連及び発症機序の解明の為、

本邦での IBGC 患者における *PDGFB* 遺伝子検索を行い、見出された変異におけるスプライシング異常について検討した。さらに、得られた結果から PDGF-BB の発現低下が考えられたため、*PDGFB* 変異患者の血清中における PDGF-BB 量の検討を行った。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 倫理

本研究で用いた血液及び末梢血単核球等のヒト由来検体はすべて岐阜薬科大学、岐阜大学、並びに京都大学倫理委員会の承認の下、全国と IBGC 患者からインフォームドコンセントによる文書での同意を得たうえで提供された。また、診断は特発性基底核石灰化症診断基準 (Table 1) に基づいて行われた。

第2項 検索対象

PDGFB 遺伝子検索数は孤発例の 70 症例と家族例 16 家系 86 例 (非発症者を含む) であった。

第3項 試薬

本研究に用いた試薬は以下の通りである。

Dna Quick II (Genomic DNA Separation Kit) は DS Pharma Biomedical、Tris-EDTA (TE、pH=8.0)、酢酸 (Acetic acid)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt Dihydrate: EDTA) は Wako Pure Chemical Industries、滅菌水 (Water deionized & sterilized)、グリセリン (Glycerol)、トリス [Tris (hydroxymethyl) aminomethane]、アガロース (Agarose)、100 bp Ladder One は NACALAI TESQUE, INC.、各 PCR プライマー (M13 プライマーは Eurofins Genomics K.K.)、AmpliTaq Gold® Fast PCR Master Mix、Tempus™ Spin RNA Isolation Kit、SuperScript®III First-

standard Synthesis Kit は Life technologies、illustra ExoProStar は GE Healthcare、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase [5 × PrimeSTAR Buffer (5 mM Mg²⁺ plus)、2.5 mM dNTP Mixture 付属] は Takara Bio Inc.、臭化エチジウム (ethidium bromide: EtBr) は Bio-Rad Laboratories、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System は Promega Corporation、Human PDGF-BB Quantikine ELISA kit は R&D Systems よりそれぞれ購入した。

第4項 DNA抽出

DNA サンプルは患者から提供された血液より Dna Quick II (Genomic DNA Separation Kit) を用い、添付のプロトコールに従って抽出した。得られた DNA は TE (pH=8.0) で溶解し 10 ng/μL になるよう調製した。

第5項 PCR

PDGFB の各エクソンとその近傍のイントロン領域について、Variant SEQr primer による PCR を行った。Variant SEQr primer とはタンパク情報をコードするエクソンとその近傍のイントロンを含む領域を増幅するよう設計されたプライマーにユニバーサルプライマー (M13 forward/reverse) 配列を付加したプライマーである (Fig. 4)。無償公開されている Applied Biosystems により設計されたプライマー配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より取得した (Table 3)。1 サンプル当たり 10 μM PCR プライマーを Forward、Reverse それぞれ 1.2 μL ずつ、50 % (v/v) グリセリンを 3.2 μL、AmpliTaq Gold Fast PCR master mix を 10 μL、20 ng サンプル DNA を混合し滅菌水で 20 μL にメスアップしたのち、Veriti サーマルサイクラー (Life technologies) で反応を行った。詳細な反応条件は別表に示す (Table 4)。

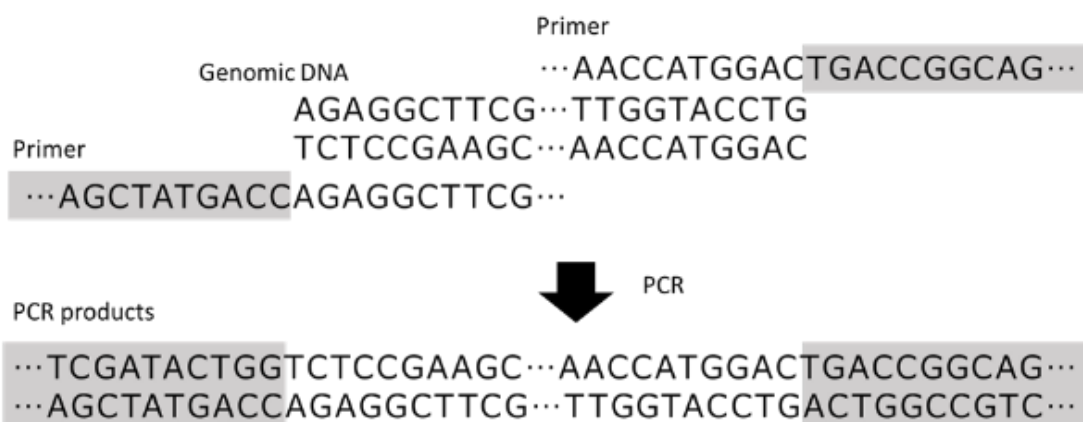


Fig. 4 Variant SEQr primer

PCR was used Variant SEQr primer. Gray background sequences can bind M13 primer.

Table 3 PCR (Variant SEQr) primers for *PDGFB* DNA sequence analysis

Name	Sequense (5'>3')	Product size (bp)	T _m (°C)
Exon 1-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTGCCTTCCCTTAGAGCCTGTCACC	835	74
Exon 1-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGGTGCTCGAGCTGCCGTTG		73
Exon 2-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGGTACCAACCCGCCTGCT	507	75
Exon 2-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAGAGGCTTCGGCAGGTCCAG		72
Exon 3-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTAGTTCGCTCAGTCCTGAATGTGG	440	71
Exon 3-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTGCTTGGAGGGTCCCTGCTC		72
Exon 4-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTGCCTCTCTGGACAGAGCCCA	628	74
Exon 4-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCTGGTTCTTGGGTGTAGATCTCATGG		70
Exon 5-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTGGGCCTGATCCCATTTCATT	584	72
Exon 5-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGCGCTCCGGGAATGAGGATA		72
Exon 6-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTGTCTCCAAAGCCCACCACC	435	74
Exon 6-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCCATGGCAGGCCTTGGTCAGT		73

Table 4 PCR conditions

Step	Pre-thermal denaturation	Thermal denaturation	Annealing and elongation	Additional elongation
Cycles	1	40		1
Exon 1	95 °C 10 minutes	98 °C 5 second	68 °C 13 second	72 °C 10 second
Exon 2	95 °C 10 minutes	96 °C 3 second	68 °C 13 second	72 °C 11 second
Exon 3, 5, 6	95 °C 10 minutes	96 °C 3 second	72 °C 13 second	72 °C 12 second
Exon 4	95 °C 10 minutes	96 °C 3 second	64 °C 13 second	72 °C 13 second

第6項 PCR産物の精製

PCR産物 5 µL に illustra ExoProStar Exonuclease I、illustra ExoProStar Alkaline Phosphatase をそれぞれ 1 µL ずつ混合し、2720 サーマルサイクラー (Life technologies) で酵素反応 (37°C、15分)、酵素失活処理 (80°C、15分)を行った。

第7項 シーケンス解析

シーケンスプライマーとして M13 プライマー (Table 5)を用いたシーケンスは岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野に委託した。返却されたシーケンスデータを novoSNP (<http://www.molgen.ua.ac.be/bioinfo/novosnp/>) で NCBI より取得した PDGFB FASTA 配列データ (NG_012111.1) を元に解析した。見出した変異は既出の SNP であるか NCBI の dbSNP で検索し確認した。

Table 5 Sequence primers for DNA sequence analysis

Name	Sequence (5'>3')
M13-Forward	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

第8項 RNA 抽出

患者から提供された血液から Tempus™ Spin RNA Isolation Kit を用い、添付のプロトコールに従って Total RNA を抽出した。

第9項 RT-PCR

抽出した Total RNA を SuperScript®III First-standard Synthesis Kit を用い、添付のプロトコールに従って、2720 サーマルサイクラーで逆転写反応を行い cDNA を得た。プライマーは変異を含むイントロン近傍のエキソン領域を増幅するよう設計した (Table 6)。1 サンプル当たり、5 × PrimeSTAR Buffer を 4 µL、10 µM プライマーを Forward、Reverse それぞれ 0.4 µL ずつ、2.5 mM dNTP mixture を 1.6 µL、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を 0.2 µL、cDNA を 1 ng 混合し、滅菌水で 20 µL にメスアップした後、Verti サーマルサイクラーで反応を行った。反応条件は初期熱変性 (94°C、10 秒)の後、熱変性 (98°C、10 秒)、アニーリング (55°C、5 秒)、伸長反応 (72°C、変異 162+2T>A 由来 cDNA は 30 秒、変異 c.457-1G>T 由来 cDNA は 2 分)を 35 サイクル繰り返し、最後に追加伸長反応 (72°C、2 分) を行った。得られた PCR 産物を Mupid-exU (Takara Bio)にセットした 2%アガロースゲルにアプライし、100 V、30 分間電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルを EtBr/TAE 溶液 (0.5 µg/mL)に 10 分間浸透させたのち、Benchtop 2 UV Transilluminators (UVP, LLC,

Upland, CA, USA)上で 365 nm UV を照射し、ゲル撮影装置 (Funakoshi) で撮影した。撮影後、ゲルから変異 mRNA 由来のバンドを切り出し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System で DNA 断片を回収した。得られた DNA 断片について PCR プライマー (Table 6) を用いたシーケンスを岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野に委託し、返却されたシーケンスデータを ApE(<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ap/>) で解析した。

Table 6 PCR primers for mRNA expression analysis

Name	Sequense (5'>3')	Product size (bp)	Tm (°C)
Exon 2>3-Forward	CTGAGTGACCACTCGATCCG	153	60
Exon 2>3-Reverse	CAGGCTCCTTCTTCCACGAG		60
Exon 4>5-Forward	CCTCATAGACCGCACCAACG	307	60
Exon 4>5-Reverse	CCGAATGGTCACCCGAGTTT		57

第3節 実験結果

第1項 本邦における *PDGFB* 遺伝子の新規変異検索

本邦の IBGC 患者における *PDGFB* 変異を検索するため、全国の IBGC 患者から DNA 検体を収集し、DNA シーケンスによる *PDGFB* 遺伝子検索を行った。遺伝子検索の結果、3 例の *PDGFB* 変異を見出した (Fig. 5A)。また、それぞれの発端者の臨床症状を以下に示した (Table 7)。c.160+2T>A は 2 番目のエキソンの直後、c.457-1G>T は 5 番目のエキソンの直前に塩基の置換があった (Fig. 5B, C)。c.33_34delCT は 1 番目のエキソン内で 2 塩基が欠損し、DNA の塩基配列がコードする遺伝暗号の読み枠が変動するフレームシフト変異を伴っていた (Fig. 5C)。

Table 7 Clinical features of the three individuals (probands) with *PDGFB* variants.

Mutation	c.33_34delCT	c.160+2T>A	c.457-1G>T
	p.Cys12LeufsX19	p.Glu54GlyfsX94	p.Val153ProfsX8
Zygoty	hetero	hetero	hetero
Exon	1	2	5
Proband's information			
Age at detection of calcification	71	57	14
Age at onset	70	57	10
Onset symptom	dizziness	anxiety depression	headache
Neurological findings			
Cognitive impairment (MMSE)	23	28	NE
Pyramidal sign	-	-	-
Extrapyramidal sign	+	-	-
Cerebellar sign	-	+	-
Family's information (except the proband)			
Number of other individuals with calcification	NE	1	2
Number of other individuals with confirmed mutations	-	1	1
Number of other symptomatic individuals	-	1	1
Other symptoms (number) in the family	-	panic disorder (1)	MR (1)

NE: not examined, MMSE: mini-mental state examination, MR: mental retardation

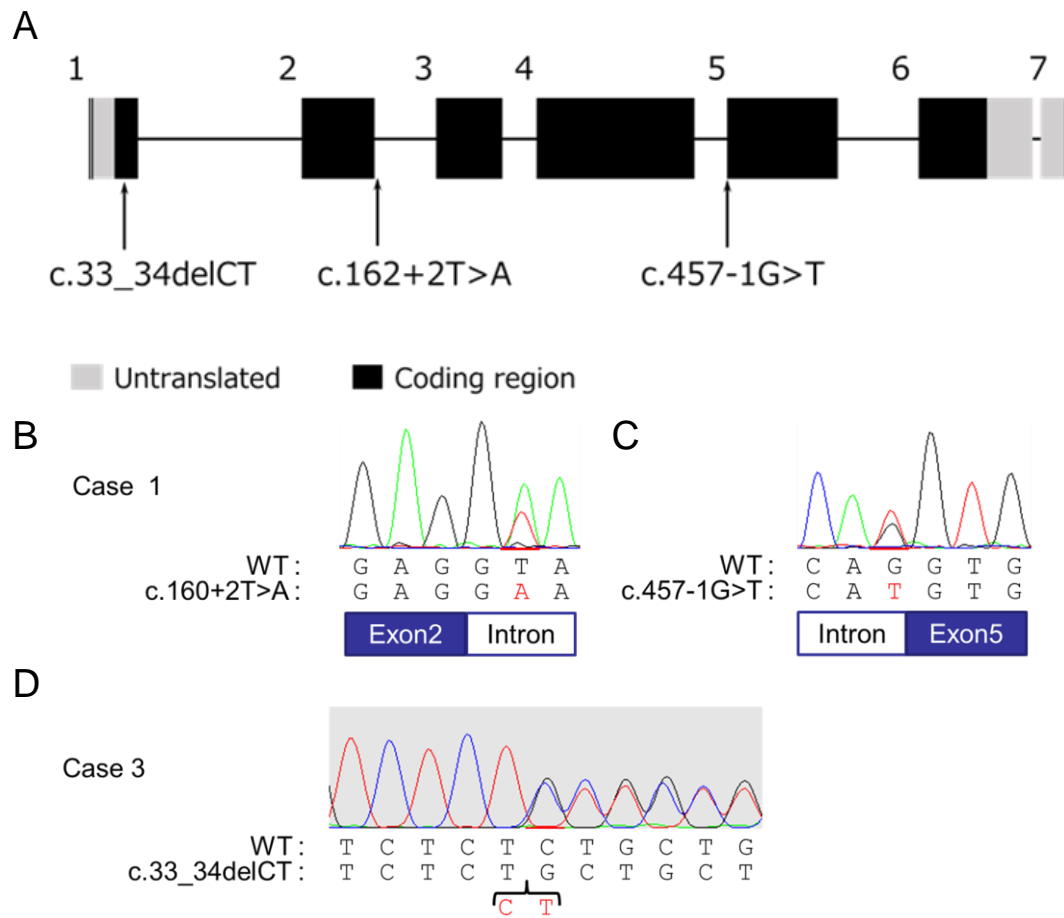


Fig. 5 DNA sequence electropherograms showing different heterozygous variants in *PDGFB* identified in IBGC patients.

(A) Arrows indicated mutations found in this research. (B-D) Sequence electropherogram of the novel heterozygous mutation in IBGC patients. Letters in red indicated variant sequences.

第2項 Case1 (c.160+2 T>A)

発端者は57歳の男性であり、3年間、うつ、軽度認知症状で通院していた (Fig. 6B、II-2)。神経学的検査では軽度の小脳運動障害を示し、CT所見では両側性の淡蒼球、尾状核、視床核、齒状核での顕著な石灰化を認めた (Fig. 6B)。彼の死亡した父親 (I-1)は認知症を発症しており、さらに発端者に類似する石灰化を認めた (Fig. 6C)。彼の息子 (III-1)は10代からパニック障害と診断されているが、石灰化は認められなかった。

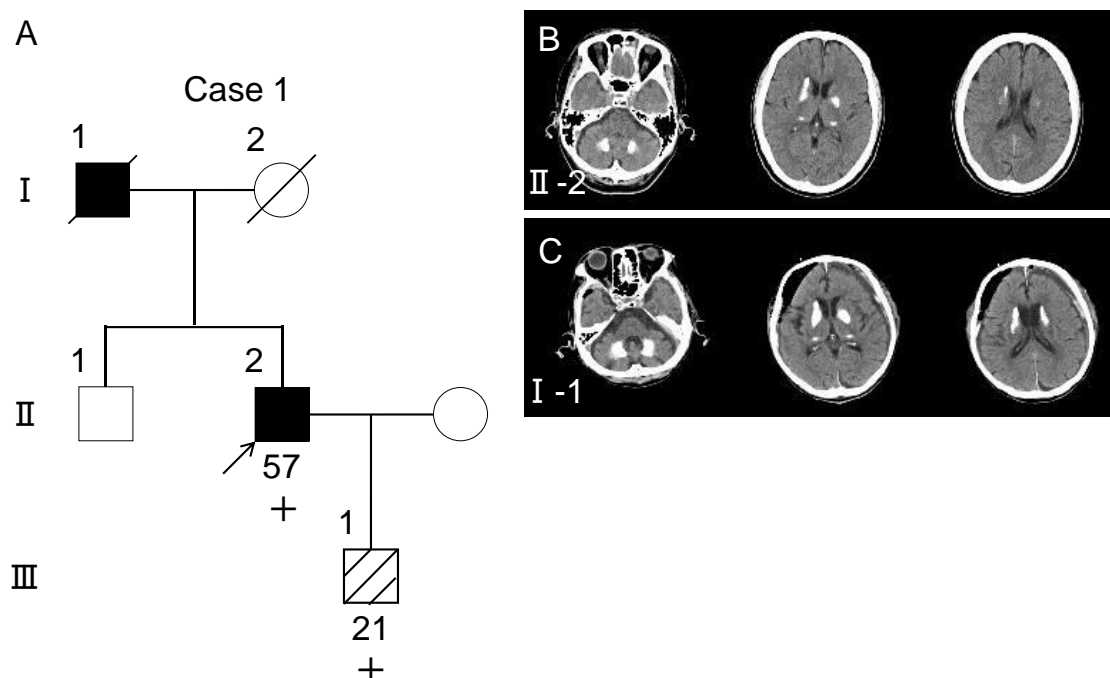


Fig. 6 Familial IBGC (Case 1 in family I).

(A) Pedigree of *family I*. The arrow indicates the index subject. Filled symbols represent patients with brain calcification. Participants' ages are shown under the symbols in the pedigree of those whose data were available. The symbols + and - indicate variant carriers and noncarriers, respectively, as determined via genetic analysis. The striped symbol represents a variant carrier, although the CT image was not available for the study. (B) CT images of the proband (II-2). (C) CT images of the proband's father with variant (I-1). Subdural hematoma was also identified on CT scan.

第3項 Case 2 (c.457-1 G>T)

発端者(II-2) (Fig. 7A)は16歳女性で、片頭痛があり、また10歳の頃から不登校であった。神経学的検査では異常は認められなかった。CT所見は斑状の石灰化が淡蒼球、尾状核に認められ、軽度の石灰化が視床、白質、歯状核に認められた (Fig. 7B)。発端者の母親 (I-2)は発端者と同様の遺伝子変異を持ち、片頭痛と淡蒼球、尾状核、視床、歯状核、白質に石灰化が認められた (Fig. 7C)。発端者の8歳の弟 (II-5)に臨床症状は認められないが、淡蒼球に軽微な石灰化が認められた (Fig. 7D)。彼の年齢を考慮すると、病的な石灰化であると考えられ、遺伝子解析の結果、姉と同様の遺伝子変異が認められた。また、14歳の弟 (II-3)では遺伝子変異が認められず、脳内の石灰化は認められなかった。また、発端者の12歳の妹 (II-4)については遺伝子変異を認めたが、精神遅滞のために看護機関におり、詳細な臨床情報は得られなかった。

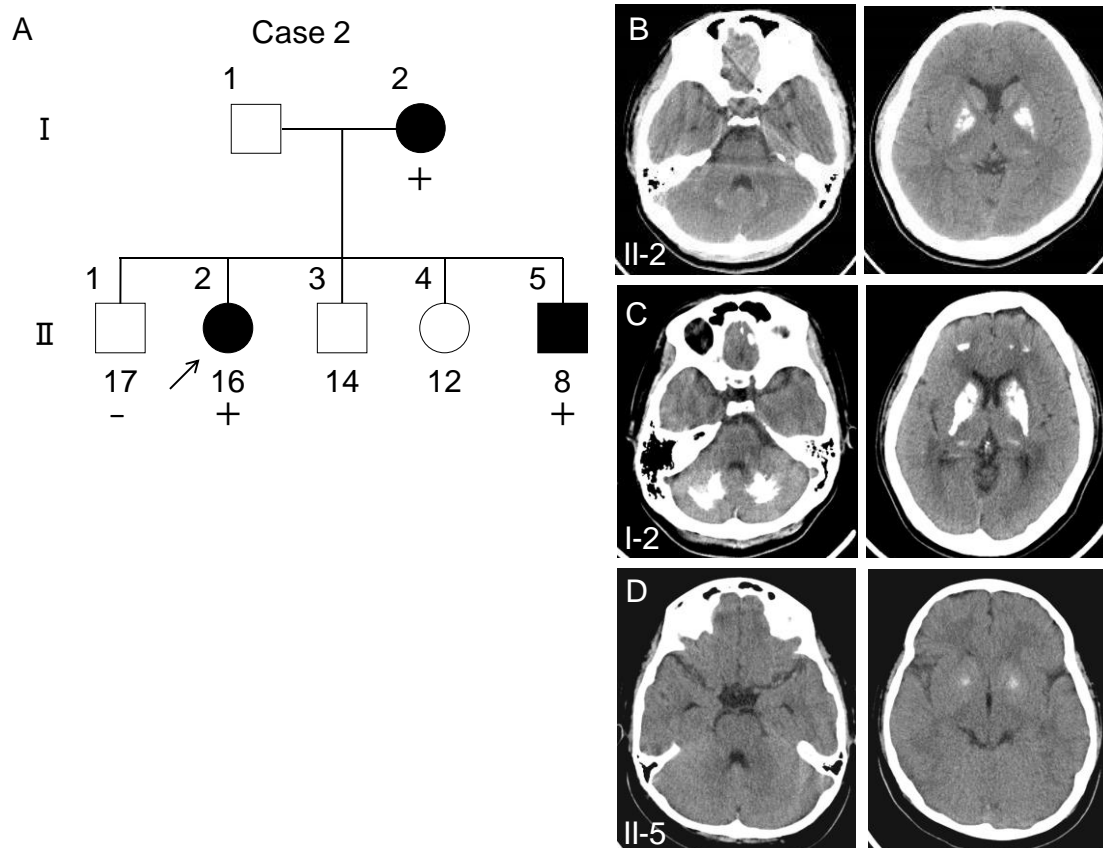


Fig. 7 FIBGC (Case 2 in family 2).

(A) Pedigree of family 2. The arrow indicates the index subject. Filled symbols represent patients with brain calcification. Participants' ages are shown under the symbols in the pedigree. The symbols + and - indicate variant carriers and noncarriers, respectively. CT images of the proband (II-2) (B). Computed tomography (CT) image of her mother (I-2) with the variation (C). CT image of her younger brother (II-5) with the variation. The calcification of II-5 was mild (D). The calcification on CT images of the proband's mother (I-2, C) was prominent compared to that of her children (II-2, B) and (II-5, D).

第4項 Case3 (c.33_34 del CT)

71 歳男性、70 歳時にめまいを訴え受診した。神経学的検査では軽度の認知障害 (mini-mental state examination [MMSE] score: 23)と動作緩慢が指摘された。CT 所見では両側の淡蒼球、尾状核、視床核、齒状核、皮質と脳室に石灰化が認められた (Fig. 8)。

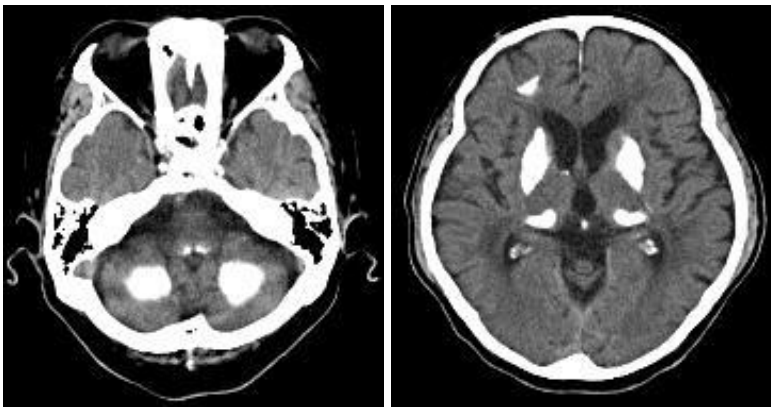


Fig. 8 Case 3 CT images.

Computed tomography (CT) images of Case 3 with *PDGFB* deletion variant (c.33_34del CT). Calcifications were observed in both cerebellar hemispheres, basal ganglia, and cerebral ventricle.

第5項 IBGC患者及び健常者における血清中PDGF-BBの比較

*PDGFB*に変異が見出されたため、血清中のPDGF-BB量を測定した。測定にはPDGFB変異が見出された患者（3人）、また、本研究室で報告している*SLC20A2*変異を伴うIBGC患者（5人）、健常者（3人）から血液を採取し、ELISAにて血中PDGF-BBの測定を行った。ELISAによる血清中PDGF-BB定量の結果、今回見出した変異を持つ患者すべてでPDGF-BB値の減少が見られた（Table 8）（Fig. 9）。健常者での血清中PDGF-BB測定値は3000から6000 pg/mLの範囲であったのに対して、変異保有者の血清中PDGF-BB値はすべて2000 pg/mLを下回っており、健常者の2分の1から3分の1程度の低い値となった。また、*SLC20A2*変異保有のIBGC患者では血清中PDGF-BB値の低下は見られなかった。以上の結果より、*PDGFB*変異保有IBGC患者での血清中PDGF-BB値の低下はIBGCの症状に伴うものではなく、遺伝子変異が原因であることが示唆された。

Table 8 ELISA of PDGF-BB in serum

Patient	PDGF-BB (pg/mL)	Mutation	Gender	Age
<i>PDGFB</i>				
	1730	c.33_34delCT	male	71
	1900	c.160+2T>A	male	57
	1340	c.457-1G>T	female	16
<i>SLC20A2</i>				
	3370	c.344C>T	female	69
	4370	c.1399C>T	male	24
	5550	c.1848G>A	male	28
	5720	c.1909A>C	male	25
	4720	c.1909A>C	female	64
Controls				
	5030	-	male	24
	3890	-	male	29
	5690	-	female	33

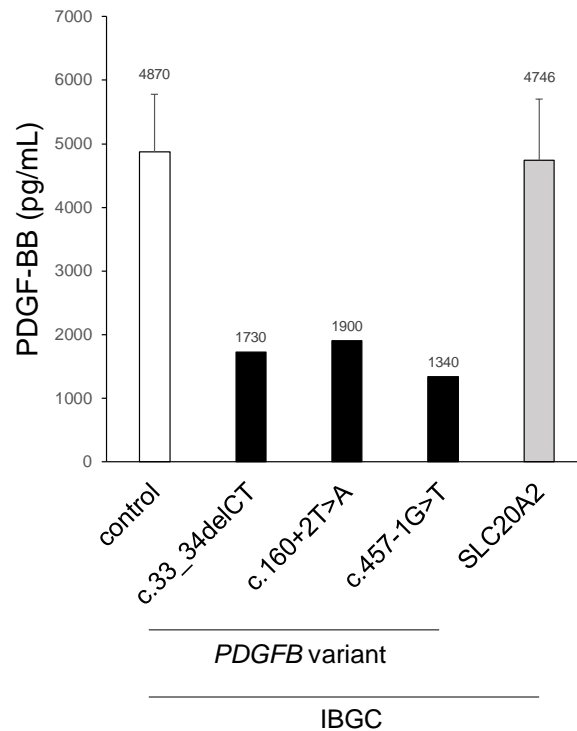


Fig. 9 Serum PDGF-BB levels from ELISA.

Black bars were *PDGFB* variant carriers, gray bar was *SLC20A2* variant carriers and white bar was controls. Control and *SLC20A2* showed the average of PDGF-BB levels (Data shown as mean \pm SD) and *PDGFB* variants showed individuals.

第6項 変異保有家族 (Case 2)内での血清中 PDGF-BB の検討

PDGFB 遺伝子変異による血清中 PDGF-BB の減少と IBGC の発症との因果関係をより詳細に調べる為、c.457-1G>T 保有の患者家族 (Case 2)について頭部 CT 画像での病的石灰化の確認、DNA シーケンスによる遺伝子検索、ELISA による血清中 PDGF-BB 定量を実施し、これらの関連性を検討した。本検討はすべてのデータが得られた患者の両親、兄、弟 5 名に対して行った。頭部 CT 画像での確認で患者の母及び弟 1 名で両側性の病的石灰化が確認された (Fig. 7C、D)。この石灰化が見られた 2 名の遺伝子検索で c.457-1G>T の保有を確認した。また、血清中 PDGF-BB 値の低下も確認された (Table 9) (Fig. 10)。一方で、患者の父、兄については脳内の病的石灰化は無く、c.457-1G>T の保有ならびに血清中 PDGF-BB 値の低下も見られなかった。

Table 9 Serum PDGF-BB ELISA in Case2 (c.457-1G>T) family

Number	PDGF-BB (pg/mL)	Calcification	Mutation	Gender	Age
I-1	2660	-	-	male	unknown
I-2	938	+	+	female	unknown
II-1	5440	-	-	male	17
II-2	1340	+	+	female	16
II-3	NE	-	NE	male	14
II-4	NE	unknown	NE	female	12
II-5	532	+	+	male	8

NE: not examined

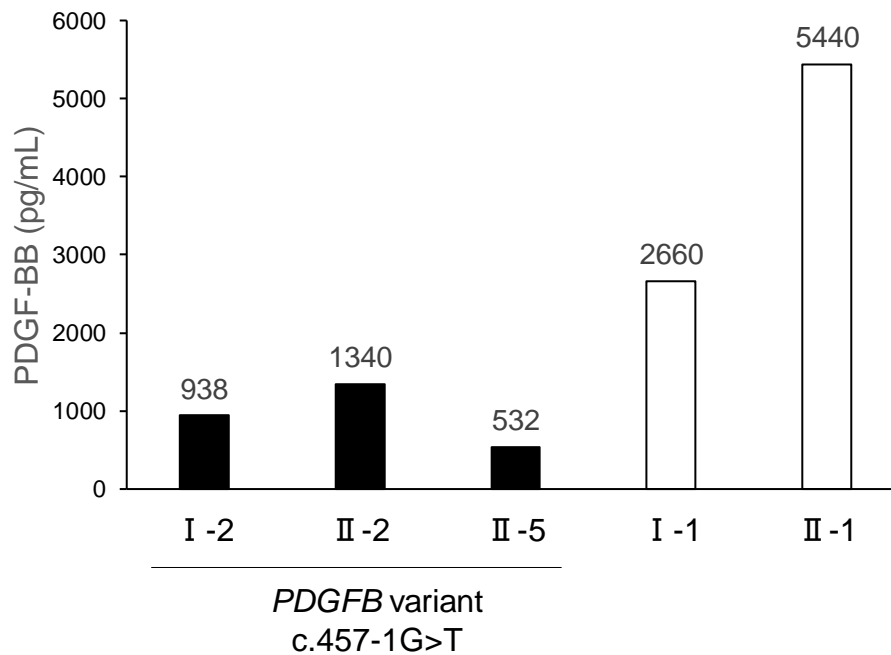


Fig. 10 Analyzing serum PDGF-BB levels in c.457-1G>T family

PDGF-BB levels in Case 2 (c.457-1G>T) family. Black bars were mutation carriers and white bars were no mutation carriers.

第7項 見出した *PDGFB* 変異におけるスプライシング解析

第1項での DNA シーケンスの結果から本邦における3つの新規 *PDGFB* 変異を見出した。c.160+2T>A、c.457-1G>T が位置するイントロン両端の2塩基は mRNA の転写から翻訳までの過程で mRNA スプライシングにおいて、エキソンとイントロンの境界認識に重要な役割を担っている²⁰。このことから、c.160+2T>A、c.457-1G>T は mRNA スプライシングの異常を引き起こし、成熟 mRNA において塩基配列の挿入や欠損、フレームシフトが起こることが予想された。そこで、患者の血液中で実際に発現している RNA がどのようなスプライシングを受けているか解析を行った。

血液から抽出した RNA について RT-PCR 法を用いて変異周辺領域の mRNA 発現を調べた結果、c.160+2T>A では100から200塩基程度伸長した mRNA のスプライシングバリエーションが見られた (Fig. 11B)。一方で、c.457-1G>T では150塩基程度短縮した mRNA の発現が見られた (Fig. 12B)。また、両方の変異で正常な長さの mRNA の減少の傾向が見られた。さらに詳細にスプライシングバリエーションを調べる為、異常が見られたバンドの DNA 断片についてシーケンス解析を行った。シーケンスの結果、c.162+2T>A では2番目のエキソン直後の変異を含んだイントロンの一部 (172塩基) の挿入が見られた (Fig. 11C, D)。また、c.457-1G>T では変異直後の5番目のエキソン (145塩基) の欠失が確認された (Fig. 12C, D)。以上の結果と c.33_34delCT の DNA シーケンスの結果から、フレームシフトに伴う mRNA の終止コドンの変動と異常 mRNA の翻訳領域について予想した。c.33_34delCT では開始コドンより88から90番目の塩基で終止コドンが出現し、翻訳領域はシグナルペプチド領域の途中でミスセンスとなり、成熟 PDGF-B ペプチド領域は全く含まれていないことが予想される (Fig. 13)。c.160+2T>A ではイントロンの挿入に伴い挿入配列を含めて開始コドンより439番目から441番目の塩基で終止コドンが現れた。翻訳領域はイントロンの挿入により N 末端側プロペプチド領域の途中でミスセンスとなり、c.33_34delCT と同

様に成熟 PDGF-B ペプチド領域は含まれていないことが予想される。c.457-1G>T は 5 番目のエクソンの欠損の為、開始コドンより 478 番目から 480 番目の塩基で終止コドンが現れた。c.457-1G>T は他の 2 つの変異と異なり翻訳領域に成熟 PDGF-B ペプチド領域が含まれていた。

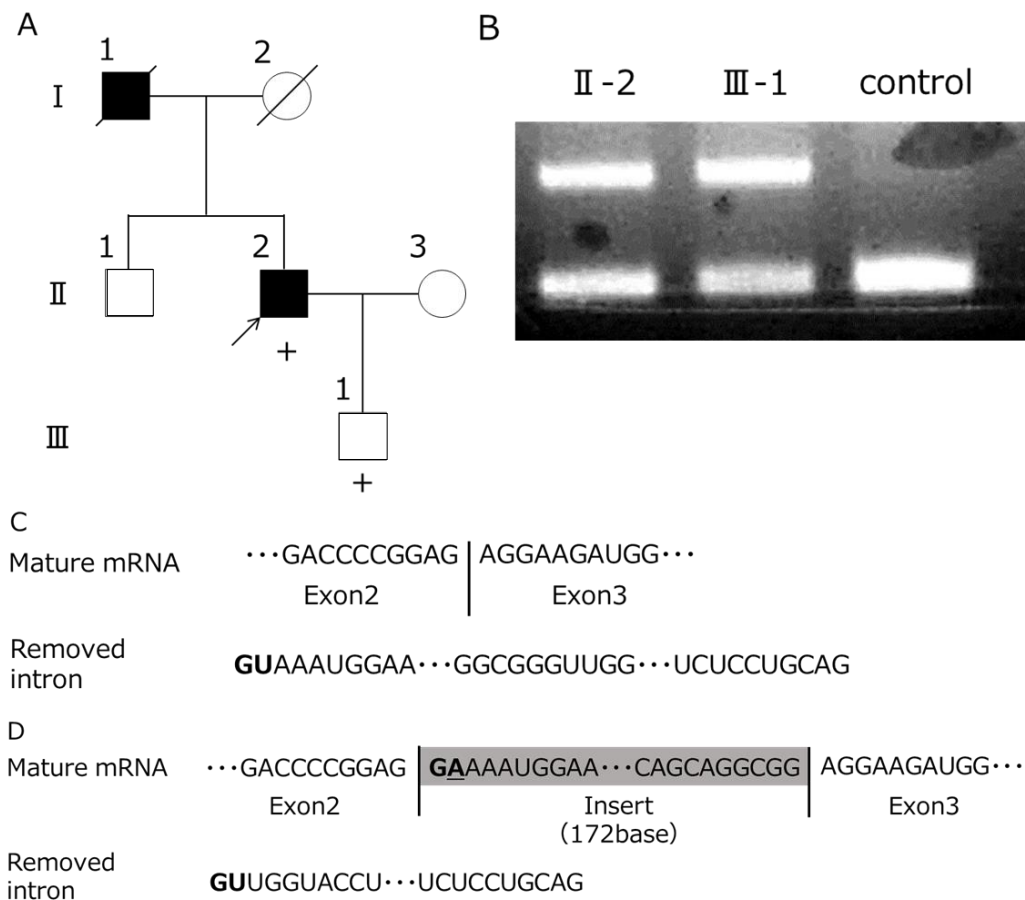


Fig. 11 mRNA analysis c.160+2T>A

(A) The c.162+2T>A patients' pedigree. The shape of mark indicates gender: square is male, and circle is female. Color indicates calcification: black is calcification, white is not calcification. Arrow indicates the proband. (B) The agarose electrophoresis of PCR products from c.160+2T>A patients' cDNA. Lower bands are normal, in the other hand upper bands are mutant inserted intron. Normal (C) and mutant (D) mRNA sequences after splicing. Boldfaces indicate 5' splice site, and under bar indicate the mutation c.160+2T>A.

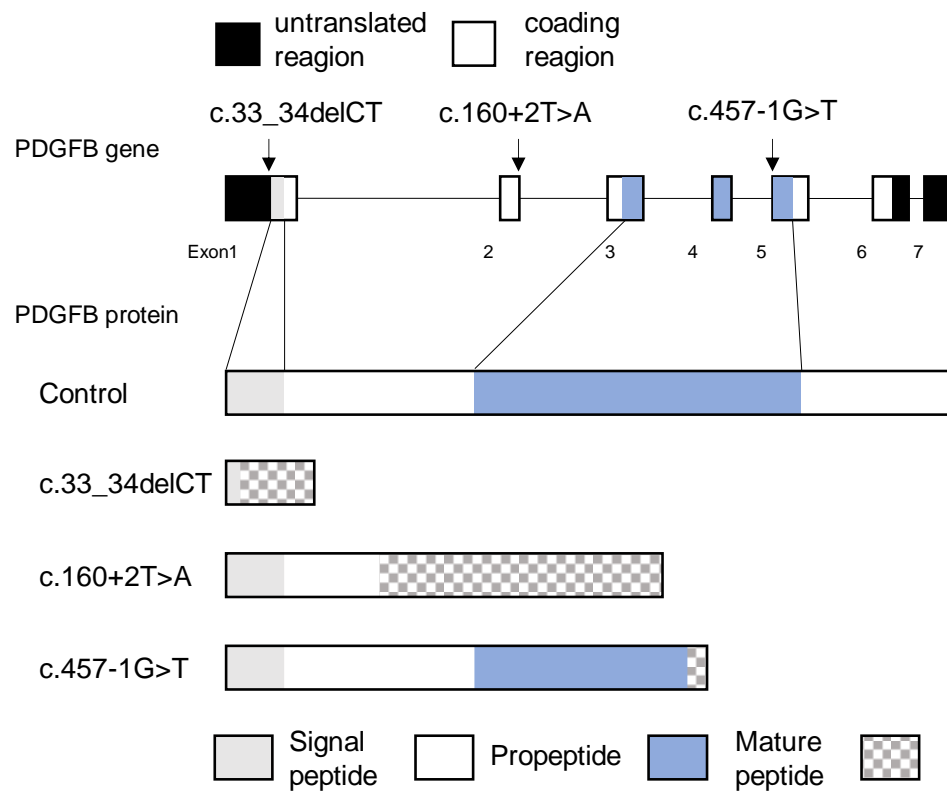


Fig. 13 Predicted PDGF-B protein coding region changing for variant.

Arrow indicate variants found in this research. Schematic structure of PDGF-B protein with variant.

第4節 考察

今回の遺伝子検索で本邦における IBGC 患者において *PDGFB* 遺伝子内に新たに 3 つの変異パターンが見出された。3 つの変異のうち、1 つはエキソン内で 2 塩基が欠損している為、3 塩基ずつで遺伝暗号がコードされているコドン読み枠のずれ、すなわちフレームシフトが引き起こされる。一方で、他の 2 つの変異は 1 塩基の置換である為、通常の変異であればフレームシフトは起こらない。しかしながら、これらの変異はエキソンに隣接するイントロン末端 2 塩基の部分に存在する。このイントロン末端の 2 塩基はスプライス部位と呼ばれ、DNA から転写直後の mRNA 前駆体から成熟 mRNA を作り出す mRNA スプライシングにおいて、除去されるイントロンを示す目印の役割を果たしている²⁰。イントロン 5' 末端の GT (RNA では GU)、3' 末端の AG はイントロン配列の中で最も高度に保存されている配列である²⁰。核内でスプライシングを触媒するスプライソソームは分子内にこれらのスプライス部位を認識する RNA を含んでおり、スプライシングの目印としている²⁰。

c.162+2T>A では 5' 末端のスプライス部位の変異により本来の位置からスプライシングが開始されず、173 塩基下流の GU が新たに 5' スプライス部位と認識されてスプライシングが開始された結果、変異近傍領域で mRNA が 172 塩基伸長したと考えられる。また c.457-1G>T では 3' 末端のスプライス部位の変異によりスプライシングの終端が認識されなくなり、5 番目のエキソンが前後のイントロンと区別されずに 1 つのイントロンとしてスプライシングで除去されたことで、本来より 145 塩基短い mRNA が生成されたと考えられる。またこれらの変異に伴って挿入または欠失する塩基配列の塩基数は共にコドンの塩基単位である 3 の倍数ではないので、これらの変異はフレームシフトを伴う変異である。したがって、今回見出された *PDGFB* 変異はすべてフレームシフトを伴い、mRNA の終止コドン位置の変動により PDGF-B ペプチドコード領域の大きな欠失が予想された。ペプチドコード領域を欠失した mRNA では PDGF-B ペプチドが全く合成されない、あるいはプロ

ペプチドの欠損により合成後に分解されやすくなると考えられる。また、変異 mRNA は塩基配列の遺伝暗号の読み枠が変動するフレームシフトに伴い、終止コドンが本来の位置より上流で出現する為、mRNA スプライシングでエラーが生じた mRNA を排除する mRNA サーベイランス (nonsense mediated mRNA decay) により分解される事が予想される^{20,21}。この mRNA 分解の経路では変異 mRNA の翻訳でタンパク質を合成するリボソーム複合体が変異に由来する終止コドンに到達する事が引き金となる為、微量ながら変異遺伝子に由来するタンパク質は合成される。しかしながら、細胞内でほとんどが分解される為、細胞外への分泌はされないと考えられる。以上のことから、*PDGFB* 変異保有者では変異に伴って PDGF-BB の合成ならびに分泌が減少し、血清中 PDGF-BB 値の低下が引き起こされていると考えられた。

また、*PDGFB* 変異を持つ家族内において、脳内の病的石灰化の有無、*PDGFB* 変異の有無、血清中 PDGF-BB 値減少の有無が一致した。このことから、*PDGFB* 変異による血清中 PDGF-BB 発現の減少が IBGC の発症に関与している可能性が示唆された。

一方で、*PDGFB*-PDGF 受容体 β シグナルは PiT-1 の機能を制御することが知られている²²。PDGF-BB の処置により PiT-1 を介して Pi 取り込み量が増加することから、PDGF-BB の減少は細胞内への Pi 流入量の減少を引きおこし、Pi 恒常性の異常を引き起こすと考えられる。*SLC20A2* ノックアウトマウスで IBGC 様脳内石灰化を示すことから、細胞内への Pi の流入量の低下が脳内の石灰化を引き起こすことが考えられる。以上の理由から、PDGF-BB の低下も Pi 恒常性異常を介して、最終的に *SLC20A2* 変異と同様の経路で IBGC 様脳内石灰化を来す可能性が考えられる。

以上、本章では本邦における *PDGFB* 変異を見出し、これらの変異の一部において、スプライシング異常を引き起こすことを発見した。さらに、患者の PDGF-BB を測定し、*PDGFB* 変異患者において PDGF-BB が低下していることを見出した。

第2章 家族性 IBGC における変異 *SLC20A2* の機能解析

第1節 緒言

SLC20A2 は IBGC の原因遺伝子として初めて報告され、翌年の 2013 年には *SLC20A2* ノックアウトマウスが報告された²³。このマウスでは脳内に石灰化がみられ、*SLC20A2* がコードする PiT-2 の発現低下のみで脳内石灰化を引き起こすことが示された。

PiT-2 は III 型 Na 依存性 Pi 輸送体である。ユビキタスに発現し、細胞膜において 2 量体を形成して存在し、細胞外のナトリウムイオン (Na) 分子と Pi 分子を 2:1 で細胞内に共輸送する。PiT-2 タンパク質は構造的にまだまだ不明な部分が多いが、12 の膜貫通領域を持ち、アミノ末端とカルボキシ末端にそれぞれ存在する PD1131 ドメインが Pi 輸送に重要な役割を果たすと考えられている^{24,25} (Fig. 14)。*SLC20A2* ノックアウトマウスに、神経症状や運動症状に関する報告はない。しかしながら、2017 年に *SLC20A2* ヘテロノックアウトもしくはホモノックアウトマウスの脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) において Pi 濃度が上昇していることが報告された²⁶。

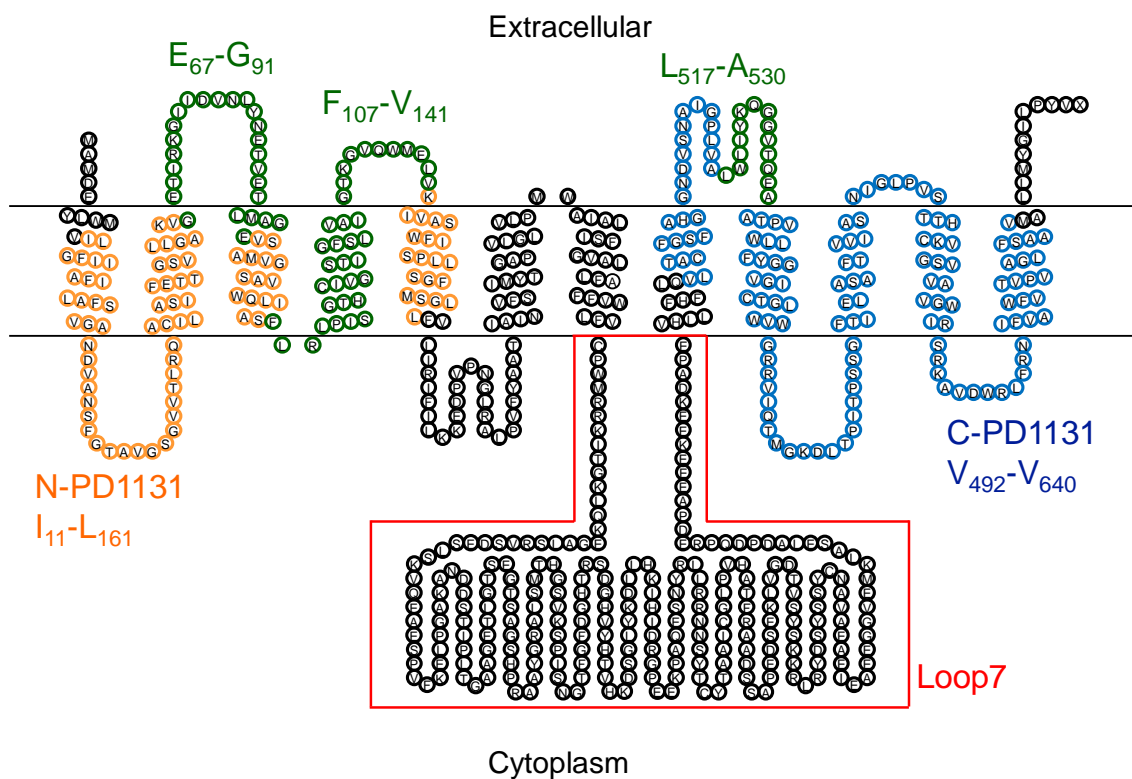


Fig. 14 Topology of PiT-2 (type III sodium-dependent phosphate transporter)

The model was drawn with the aid of TOPO2 software. PD1131 homology domain are labelled N-PD1131 and C-PD1131 for the amino-terminal and carboxy-terminal PD001131 copies, respectively. These domains are important for the Pi transport activity.

IBGC において、特徴的なバイオマーカーは確立されていない。CSF 中の Pi 濃度が上昇しているという報告は、モデルマウスではあるものの、IBGC 病態において非常に有用な所見である。モデルマウスで見られたような CSF 中の Pi 濃度の上昇が IBGC 患者でも確認することができれば、IBGC におけるバイオマーカーとなり得る可能性がある。これまで IBGC 患者における CSF 中の Pi 濃度を測定した報告はないことから、本研究では IBGC 患者におけるバイオマーカーになり得る CSF 中の Pi 濃度について検討した。

また、*SLC20A2* ノックアウトマウスが IBGC 様病態を示すことから²³、IBGC における *SLC20A2* 変異は loss of function であることが予想される。人体に発現するリン酸輸送体は

大きく分類して3つのタイプが存在する (Table 10)。その中でも *SLC20A2* はIII型の Pi 輸送体に分類され、ユビキタスに発現する²⁷。I型とII型の Pi 輸送体は主に腎臓や腸管などに高発現していることが知られる²⁸⁻³⁰。

Table 10 Sodium dependent phosphate co-transporter

	Gene	Molecule	Expression tissue
Type I	SLC17A1	Npt I	Kidney, Liver
	SLC34A1	NaPi- II a	Kidney, Lung
Type II	SLC34A2	NaPi- II b	Small intestine, Lung, Kidney
	SLC34A3	NaPi- II c	Small intestine, Lung, Kidney
Type III	SLC20A1	PiT-1	ubiquitous
	SLC20A2	PiT-2	ubiquitous

脳内において、*SLC20A2*以外の Pi 輸送体が発現すると仮定すると、Pi 恒常性は他の Pi 輸送体によって補完されると考えられた。しかしながら、脳内で発現している Pi 輸送体について検討した報告は未だない。そこで、脳内における *SLC20A2* の Pi 恒常性に対する寄与度を評価するため、脳内における *SLC20A2* の発現を検討した。

さらに、本研究室にて本邦における *SLC20A2* 変異を7つ報告している¹¹。また *SLC20A2* 変異の loss of function という仮説²³を検証するため、本研究室で報告した変異 *SLC20A2* が Pi 輸送活性に与える影響について検討を行った。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 倫理

本研究で用いた血液及び末梢血単核球等のヒト由来検体はすべて岐阜薬科大学、岐阜大学、並びに京都大学倫理委員会の承認の下、全国と IBGC 患者からインフォームドコンセントによる文書での同意を得たうえで提供された。また、診断は特発性基底核石灰化症診断基準 (Table 1) に基づいて行われた。

第2項 検索対象

CSF の Pi 濃度測定は、健常者が 13 例、*SLC20A2* 変異が 6 例、PDGFB が 3 例、それ以外の IBGC 患者が 20 例であった。

第3項 試薬

本研究に用いた試薬は以下のとおりである。

10x Ex Taq Buffer、2.5 mM dNTPs、5 units/ μ L TaKaRa Ex Taq HS、PrimeSTAR[®] MAX DNA Polymerase、PrimeSTAR[®] Mutagenesis Basal Kit、pAcGFP1 vector は TAKARA BIO INC.、アガロース (agarose)、メタノール (methanol)、エタノール (ethanol)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、塩化ナトリウム (NaCl)、スキムミルク (skim milk)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン [tris (hydroxymethyl) aminomethane: tris]、リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate dodecahydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4)、

塩酸 (hydrochloric acid: HCl)、LB 寒天培地 (LB Agar, Lennox)、LB 液体培地 (LB Broth, Lennox)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (polyoxyethylene sorbitan monolaurate: Tween)、ポリオキシエチレン (9) オクチルフェニルエーテル (polyoxyethylene (9) octylphenyl ether, nonidet®P-40, nuclease tested: NP-40)、1 kbp DNA Ladder one、100 bp DNA Ladder one、アンピシリン (ampicillin)、2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)、ブロモフェノールブルー (bromophenol blue)、フッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF) Ultra pure DNase/RNase-Free Distilled Water(DW) は NACALAI TESQUE, INC、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物 (ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid disodium salt, dehydrate: EDTA)、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、アセテート (acetate)、テトラメチレンジアミン (N,N,N',N'- (tetramethylethylenediamine: TEMED)、水酸化ナトリウム (sodium hydroxide: NaOH)、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、トリス-EDTA 緩衝液 (Tris-EDTA buffer: TE)、ハイグロマイシン B (Hygromycin® B)、グリセロール (glycerol)、ペルオキシ二硫酸アンモニウム (ammonium peroxodisulphate: APS)、アクリルアミド (acrylamide)、グリシン (glycine)、Ham's F12 medium は Wako Pure Chemical Industries、Big Dye Terminator v 3.1、5x Sequence Buffer、Lipofectamine 2000、Opti-MEM、pcDNA5/FRT vector、pOG44 vector、Hi-Di™ Formamide は Life Technologies、制限酵素 Nhe I、HindIII、および EcoR I、10x Fast Digest Buffer、BCA protein Assay Kit、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)、PiT-2 cDNA は Thermo Fisher Scientific、p3xFLAG-CMV-14 vector、アプロチニン (aprotinin)、ロイペプチン (leupeptin)、は Sigma-Aldrich、ビューアブルステイン KANTO (ViewaBlue stain KANTO) は KANTO CHEMICAL、臭化エチジウム (ethidium bromide: EtBr)、precision plus protein dual color standards は Bio-Rad Laboratories、E.Coli は NIPPON GENE、プライマーは Operon Biotechnologies、Ligation high Ver. 2 は TOYOBO、ECL

prime western blotting detection system は GE Healthcar よりそれぞれ購入した。

第4項 CSF 中のイオン測定

Pi、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩化物イオン (Cl)、カルシウム (Ca) の測定には患者から提供された CSF を比色法及び電位差測定法を用いて測定した。

第5項 RT-PCR

第1章と同様の方法で行った。使用したプライマーは Table 11 に記す。

Table 11 Primer pairs used for reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Name	Forward (5'>3')	Reverse (5'>3')
<i>slc17a1_m</i>	TCCTGCTTGTGAGTGGCTTC	TGGTGAAGAGTTTCCGGACG
<i>slc17a3_m</i>	CTGCAGCCTTCTCTGGTCA	GCCGATGAATGTGCCAATCC
<i>slc34a1_m</i>	ATGTCCAGGGTAGAGGCCAT	TACCACAGTAGGATGCCCGA
<i>slc34a2_m</i>	ACTGGCTCTCTGTGTTCTGTG	GCACAGAACCCAACAGCTTG
<i>slc34a3_m</i>	AGCTCAGCATCTCCAGAGGA	TAACATGTCTGCAGGGCTGG
<i>slc20a1_m</i>	CTGCTTTGGGTCATTTGCC	TTACACTTCCTTCCCACGGC
<i>slc20a2_m</i>	CGCTTTCCAGAGCAGACTCA	ATCCACTGCACTCCTTTCGG
<i>b-actin_m</i>	CGTTGACATCCGTAAAGACC	GCTAGGAGCCAGAGCAGTAA
<i>SLC17A1_h</i>	GGCTGTGCCGTATGTCTTCT	CACTCCACCCAAGCAAAAGC
<i>SLC17A3_h</i>	CATGGTCAACAGCACAAAGCC	CAGAGAAGGCAGCAGACACA
<i>SLC34A1_h</i>	TAACGCCATCCTGTCCAACC	ACAGAGCTGTCTTCCATGGC
<i>SLC34A2_h</i>	GCATGGTTGACTGGCTACCT	TGGAGTTTCTTCGGCAGGAC
<i>SLC34A3_h</i>	ATCTGCTCTCTGGACGTCCT	AGTCCAAGTGCACGATGAGG
<i>SLC20A1_h</i>	CCCAGACAACAGATGCCCAT	AAAACGAAGCCACGAGTTGC
<i>SLC20A2_h</i>	GCTCCATCCCACACTGTTCA	ACTGGCCAATGATTCCCCTG
<i>18 rRNA_h</i>	ATTCGTATTGCGCCGCTAGA	TCAATCTCGGGTGGCTGAAC

第6項 免疫染色

マウスはネンブタールを腹腔内投与した後、深麻酔下で開胸し、左心耳より経心的に灌流固定を速やかに行った。まず 10 mM PBS を 120 mL、引き続き 4% PFA を含む 100 mM PB を 35 0mL 灌流した。灌流後、脳を速やかに摘出し、同様の組成の固定液にて 2 日間、後固定を行った。その後、15% ショ糖を含む 100 mM PBS にて脱水し、クライオスタットを用いて 20 μ m の厚みで凍結切片を作製した。切片は 0.3 % Triton-X を含む 100 mM PBS で洗浄した後、使用まで 4 °C で保存した。

免疫組織化学染色は、フリーフローティング法で行った。組織切片を内因性ペルオキシダーゼの不活化のため 0.3 % 過酸化水素を含む PBS-T 中にて 15 分間処置した後、1 次抗体で 4 °C で 2 日間処置した。2 次抗体は室温で 2 時間反応させた。マウス脳切片は、1 次抗体には Rabbit anti-PiT-1 (1:500 ; GeneTex)、Rabbit anti-PiT-2 (1:200 ; Santa Cruz)、anti-Tuj-1 (1:1,000)、anti-NeuN (1:1,000 ; Chemicon)、anti-GFAP (1:500 ; Chemicon)、ヒト脳切片には、Rabbit anti-PiT-1 (1:200 ; GeneTex)、goat anti-PiT-2 (1:50 ; Santa Cruz)、goat anti-PECAM1 (1:500 ; Santa Cruz)、2 次抗体には anti-Rabbit conjugated Alexa Fluor 488、anti-Mouse Alexa Fluor 546 (1:200: Thermo Fisher Scientific)、核染色には Topro3 (Invitrogen) を用いた。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss Jena) で行った。

第7項 プラスミドベクターの作成

Human SLC20A2 cDNA (NM_006749) は Thermo Fisher Scientific から購入した。PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit を用い作成した。primeSTAR® MAX DNA Polymerase 25 μ L、Forward プライマー 10 pmol、Reverse プライマー 10 pmol、鋳型 DNA として pcDNA5/FRT-PiT-2-3xFLAG ベクタープラスミド 1 μ L、および milliQ 水 22 μ L を混和し PCR をおこなった。それぞれの変異に対して用いたプライマーは Table 12 に示した。反応

条件は 98°C、10 秒で初期熱変性後、熱変性 (98°C、10 秒)、アニーリング (55°C、10 秒)、および伸長反応 (72°C、40 秒) を 30 サイクル行い、最終的な伸長反応 (72°C、7 分) を行った。

その後、ライゲーション、形質転換、ベクタープラスミドの精製を上記に示した通り行い、変異型 pcDNA5/FRT-PiT-2-3xFLAG ベクタープラスミドをそれぞれ得た。

Table 12 Primer pairs used for polymerase chain reaction.

Name	Sequense (5'>3')
PiT-2-flag (Forward)	GTTAAGCTTATGGCCATGGATGAGTATTTG
PiT-2-flag (Reverse)	GCAGAATTCGCCACATATGGAAGGATCCCATA
pcDNA5/FRT-PiT-2-flag (Forward)	GTTAAGCTTATGGCCATGGATGAGTATTTG
pcDNA5/FRT-PiT-2-flag (Reverse)	GCAGCGGCCGCGGATGCCACCCGGGATCACTA
T115M (Forward)	TCAGGAATGCACTGCATTGTGGGTTT
T115M (Reverse)	GCAGTGCATTCCTGAGATTGGAAGCC
R467X (Forward)	GGATCCCGGGCTGACTACAAAGAC
R467X (Reverse)	CGGCTGGTCAGGGTCGGCCAGCTC
W616X (Forward)	GGATCCCGGGCTGACTACAAAGAC
W616X (Reverse)	GTCCACAGCCTTGCGGGAGCGGAT
S637R (Forward)	GCTGTTCCGCGCTGCTGTCATGGCTC
S637R (Reverse)	GCAGCGCGGAACAGCCCAGCCACAGG

第 8 項 細胞培養

Flp-In™ Chinese Hamster Ovary 細胞(CHO 細胞、Life Technologies) は 10 % (v/v) FBS を添加した Ham's F-12 培地を用い 37 °C 、5 % CO₂ で培養した。5-6 日毎に 0.5 % trypsin/EDTA にて細胞を回収し継代を行った。

第9項 トランスフェクション

6 cm dish に Flp-In™ CHO 細胞を 4.0×10^5 cells で播種した。翌日、Opti-MEM 300 μ L に Lipofectamine 2000 6 μ L またはベクタープラスミド（野生型及び変異型 pcDNA5/FRT-PiT-2-3xFLAG) 1 μ g および pOG44 ベクター（FRT リコンビナーゼ）3 μ g を混和し室温で 5 分間静置した。Opti-MEM/ベクタープラスミド溶液を Opti-MEM/Lipofectamine 2000 溶液に 1 滴ずつ全量を混和し室温で 20 分間静置した。Dish 中の Ham's F-12 培地を Opti-MEM 3.4 mL に置換し、Opti-MEM/Lipofectamine-ベクタープラスミド溶液を 1 滴ずつ滴下し 3 時間、37°C、5% CO₂ で培養した。その後、培地を Ham's F-12 (FBS+) 培地に置換した。トランスフェクトより 48 時間後に 600 μ g/mL Hygromycine® B を添加し、プラスミドベクターが Flp-In により安定発現した細胞のみを得た。

第10項 ウェスタンブロット

6cm dish にコンフルエントとなった Flp-In™ CHO 細胞を RIPABuffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、0.1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、10 μ g/mL aprotinin、10 μ g/mL Leupeptin、1 mM PMSF] 150 μ L で回収し 15,000 rpm で 30 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液は Bradford 法にて定量した。タンパク質抽出液と 5x sample buffer [0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.1 mg/mL SDS、0.3 mL/mL 2-ME、0.2 mL/mL glycerol、0.1 mg/mL bromophenol blue] をよく混和し、4 °C で一晩静置したものをサンプルとした。1 well あたり分子量マーカーは 3 μ L、各サンプルは 15 μ g アプライした。SDS-PAGE で分離した後に、poly vinylidene difluoride (PVDF) 転写膜 (Merck KGaA, Norbert Moeren, Deutsche) 上に転写した。転写後、5% skim milk/Tris-buffered saline Tween [TBS-T (137 mM NaCl、2.7

mM、tris base 25 mM、0.3% Tween20)]で室温、1時間ブロッキングを行った。その後、5% skim milk /TBS-T で希釈した1次抗体に PVDF 転写膜を浸漬し、4°Cで一晩静置した。TBS-T で7分間、3回洗浄後、3% skim milk /TBS-T で希釈した2次抗体に PVDF 転写膜を浸漬し、30分間、室温で振とうした。その後 TBS-T で7分間、3回洗浄し、ECL prime に1分間浸漬した。その後、LAS-3000 mini (Fujifilm)、Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いて検出した。

一次抗体には monoclonal anti-FLAG[®] M2 antibody (1:2,000 dilution ; Sigma-Aldrich)、monoclonal anti- β -actin antibody (1:1,000 dilution ; Santa Cruz Biotechnology)、を用いた。二次抗体には goat anti-mouse IgG-HRP (1:2,000 ; Santa Cruz Biotechnology)、および goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

第11項 Pi 輸送活性の測定

24 well plate でコンフルエントになった Flp-In[™] CHO 細胞株を用いた。Wash buffer [135 mM NaCl、100 mM Mannitol、10 mM HEPES · KOH (pH7.4)] で2回洗浄した。余剰な wash buffer を除去し Pi free の Pi uptake buffer [135 mM NaCl、5.4 mM KCl、5.4 mM CaCl₂、1.2 mM MgCl₂、10 mM HEPES · KOH (pH 7.4)] を 200 μ L/well 加えた。³²P (日本アイソトープ協会)を含む 2x Pi uptake buffer (0.1-2 mM K₂HPO₄ ³²P orthophosphoric acid、2 μ Ci/mL)を添加し3分間反応させた。その後、ice-cold stop buffer [135 mM NaCl、100 mM Mannitol、10 mM HEPES · KOH (pH 7.4)、40 mM K₂HPO₄] を加えて反応を停止させた。Stop buffer で3回洗浄した。0.2 M NaOH で細胞を溶解し回収後、液体シンチレーションカウンターにて測定を行った。Na⁺非存在下での Pi トランスポート活性測定には NaCl を KCl に置換し、測定を行った。

第 1 2 項 統計処理

患者 CSF における解析は Pearson 相関係数を用いて行った。IBM SPSS を用いて、患者群と健常群の比較は Student's t-test、Tukey's honestly significant difference (HSD) test を用いた。実験成績は平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、StatView を用いて、二群間については Student's t-test、他群間については分散分析後、Bonferroni/Dunn test により行った。危険率が 5 %未満を有意差ありとした。

第3節 実験結果

第1項 IBGC患者の脳脊髄液中におけるPi濃度測定

*SLC20A2*ノックアウトマウスでCSF中のPi濃度が上昇することが報告されている²⁶。そこで、IBGC患者においてもCSF中のPi濃度を検討した。IBGC患者におけるCSF中のPi濃度を比較するために、健常者13人、*SLC20A2*変異患者6人、*PDGFB*変異患者3人、*SLC20A2*、*PDGFB*、*PDGFRB*、*XPR1*変異を持たないIBGC患者20人からCSFを採取した。なお、健常者は器質的な神経疾患と脳CTにおける石灰化を認めない。IBGC患者の平均年齢は42.9 ± 18.6 (mean ± standard deviation)、健常者は42.9 ± 19.6 (mean ± standard deviation)であった。

CSF中のPi濃度は健常者と比較して、IBGC患者全体において有意に上昇していた(Table 13) (Fig. 15)。また、*SLC20A2*変異を有する患者のCSF中のPi濃度は、*PDGFB*変異を持つ患者や遺伝子変異を持たない患者と比較しても有意な高い値を示した。また、同様にCSFのNa、K、Cl、Caについて検討したが有意な差は見られなかった (Table 13)。

Table 13 Levels of Na, K, Cl, Ca and Pi in CSF of three groups of IBGC patients and controls.

	Total	Control	IBGC			
			Total	SLC20A2	PDGFB	Others
No.	42	13	29	6	3	20
Male : Female	23 : 19	7 : 6	4 : 2	1 : 2	1 : 2	11 : 9
Age	42.9 (18.7)	42.9 (19.6)	42.9 (18.6)	44.8 (20.6)	37.0 (20.5)	43.2 (18.6)
Na, mg/dL	144.2 (8.3)	140.1 (12.3)	146.1 (5.0)	144.2 (7.1)	148.3 (1.2)	146.3 (4.6)
K, mg/dL	2.9 (0.2)	2.8 (0.2)	3.0 (0.2)	2.9 (0.1)	3.2 (0.4)	3.0 (0.1)
Cl, mg/dL	122.3 (7.2)	118.4 (1.5)	124.0 (3.8)	124.5 (2.9)	125.0 (2.0)	123.7 (0.7)
Pi, mg/dL	1.6 (0.4)	1.3 (0.2)	1.7 (0.4)	2.2 (0.4)	1.6 (0.2)	1.6 (0.3)

Mean (SD)

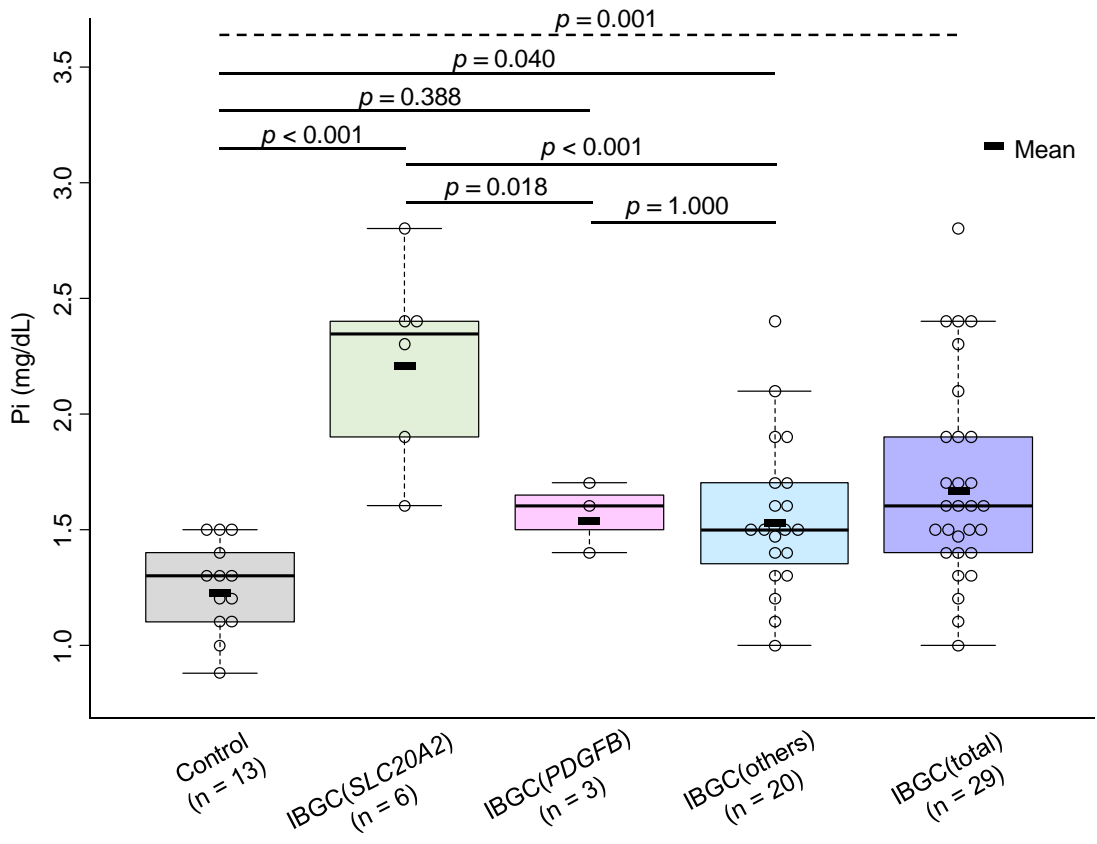


Fig. 15 Levels of Pi in CSF of three groups of IBGC patients and controls.

The levels of Pi in CSF of all patients with IBGC were higher than those of controls ($p=0.001$ in Student's t-test is shown above the dotted line). The values showing significant differences according to Tukey's HSD test are shown above the solid line.

第2項 マウス及びヒト脳内における Pi 輸送体の mRNA 発現

SLC20A2 の脳内における Pi 恒常性への寄与度を検討するため、他の I 型や II 型のリン酸輸送体が発現しているかどうかを検討した。マウス及びヒトの脳皮質と小脳及ヒトの線条体について検討したが、どちらも *SLC20* ファミリーの発現が確認された (Fig. 16)。一方で、他の I 型 (*Slc17*, *SLC17* ファミリー)、II 型 (*Slc34*, *SLC34* ファミリー) の Pi 輸送体の発現は確認されなかった。以上より、脳内における Pi 恒常性維持は、III 型 Pi 輸送体が重要な役割を果たしており、他の Pi 輸送体では補完できないと考えられる。

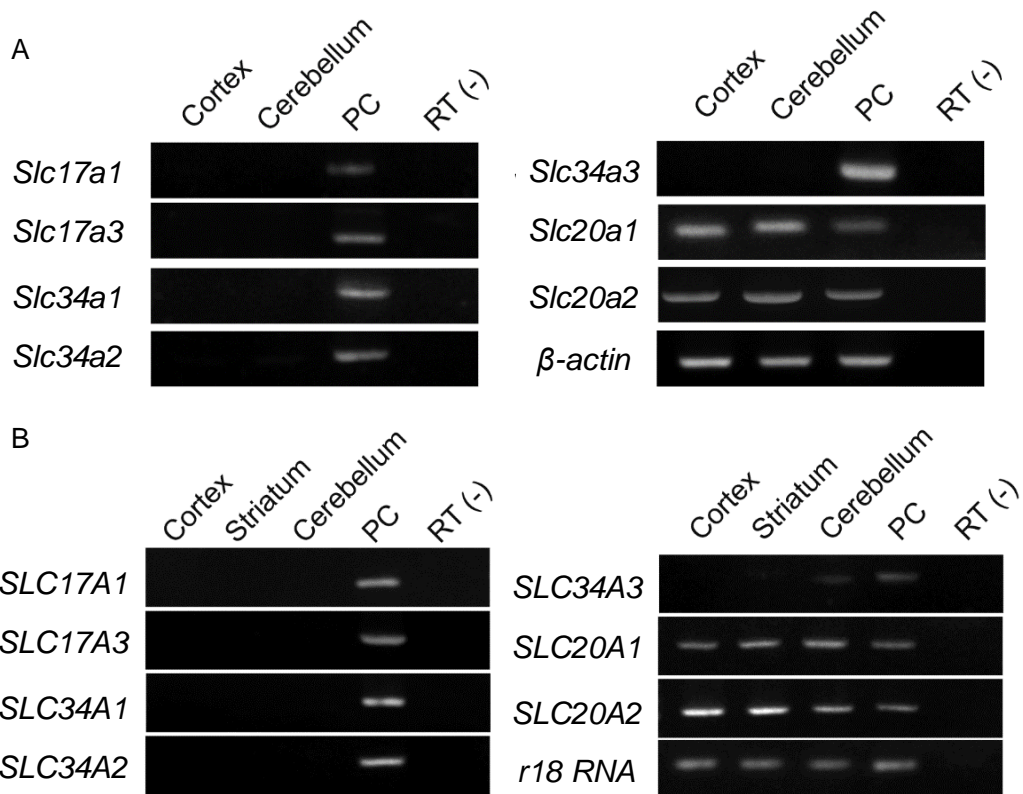


Fig. 16 mRNAs expression of Na dependent Pi transporter in the mice and human brains.

(A, B) Expression of NaPiT mRNAs in the cortex, striatum and cerebellum of mouse and human brain. For each amplification reaction, positive control reactions (PC) were performed using cDNA templates from the kidney (except for *SLC34A2*) or lung (for *SLC34A2*). Negative control reactions lacking RT reactions (RT-) were also performed to exclude the possibility of genomic DNA contaminations, respectively, (A) mice and (B) human.

第3項 マウス脳内における PiT-2 の局在

前項において、マウスの小脳において、Pi 輸送体では SLC20 ファミリーのみが発現が示された。そこで、SLC20A2 タンパク質である PiT-2 の発現細胞を蛍光免疫染色にて検討した。マウス脳内における神経細胞 (NeuN 陽性細胞) (Fig. 17A)、アストロサイト (GFAP 陽性細胞) (Fig. 17B)、血管内皮細胞 (PECAM-1 陽性細胞) (Fig. 17)においてそれぞれの細胞種のマーカータンパク質と PiT-2 が共局在しており、それぞれの細胞で PiT-2 が発現していることが示された。

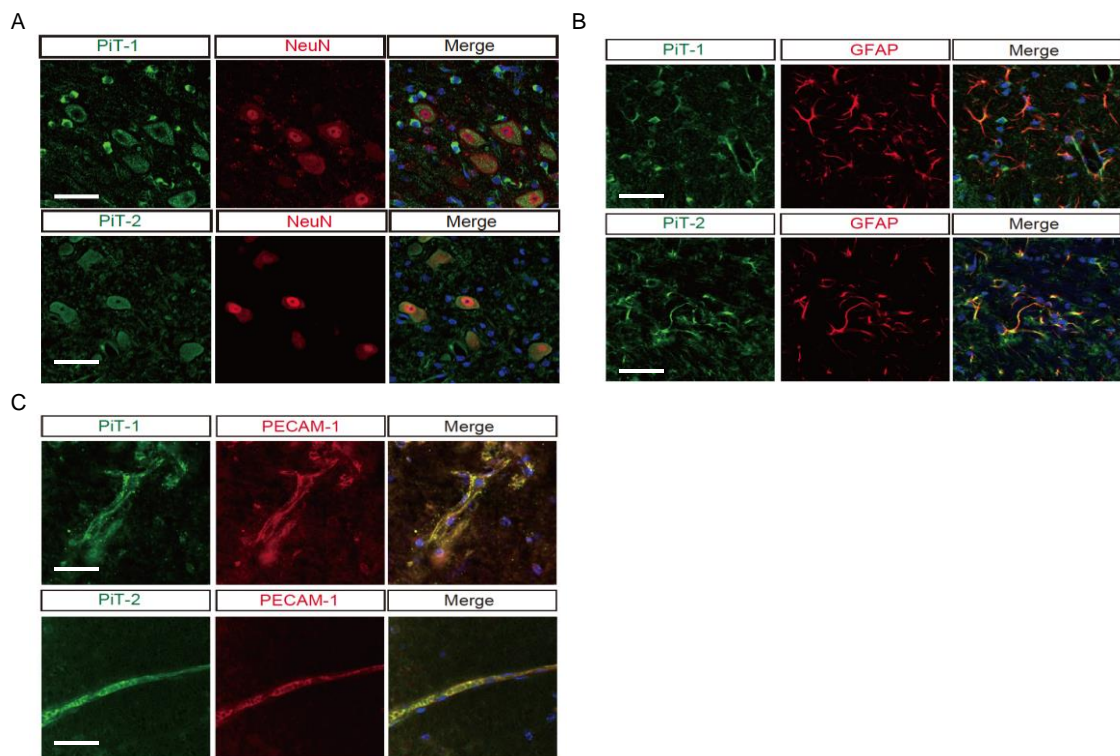


Fig. 17 Double-immunofluorescence analyses on the neuron in the mouse brain.

Mouse brain slices of the cerebellum were coincubated with Abs against PiT-1 or PiT-2 (green) and NeuN (A) or GFAP (B) or PECAM-1 (C) (red). For nuclear staining, Topro3 was used (blue in merge). Scale bars, 20 μm.

第4項 ヒト剖検脳における PiT-2 の局在

マウスと同様に、ヒトの小脳における PiT-2 の発現細胞を蛍光免疫染色にて検討した。ヒト脳内における神経細胞 (Tuj1 陽性細胞) (Fig. 18A)、アストロサイト (GFAP 陽性細胞) (Fig. 18B)、血管内皮細胞 (PECAM-1 陽性細胞) (Fig. 18C) と PiT-2 が共局在しており、それぞれの細胞で PiT-2 が発現していることが示された。

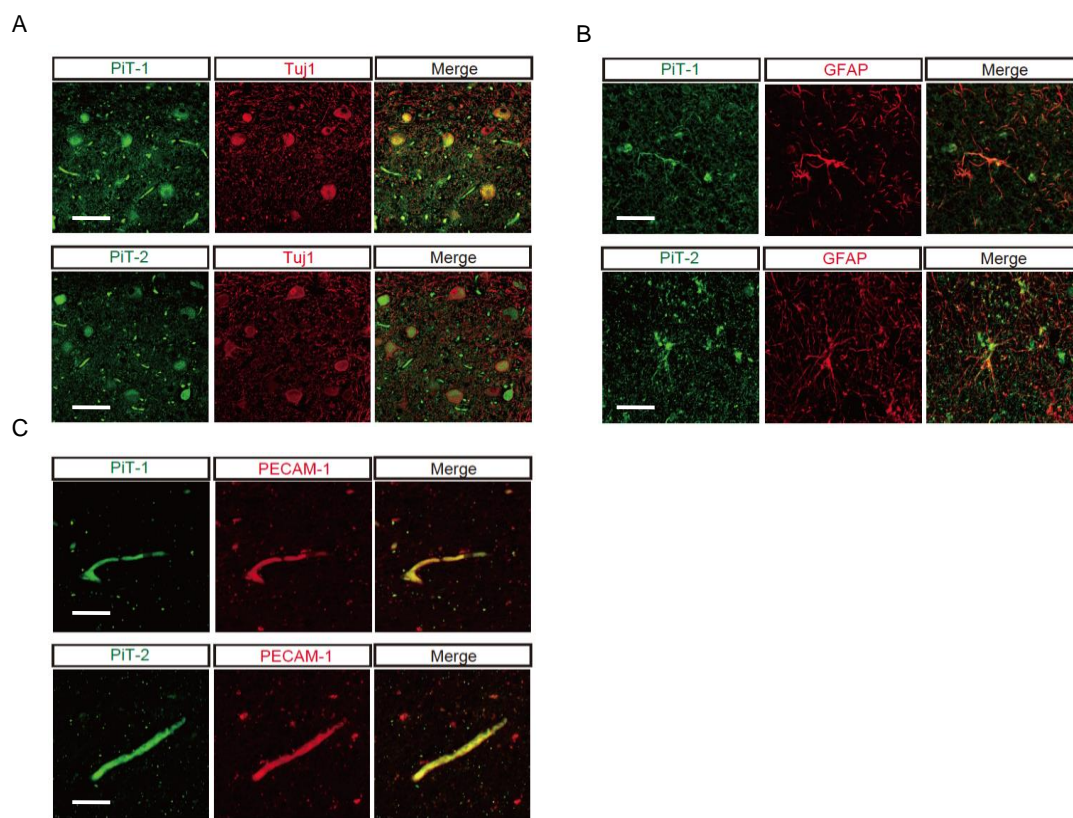


Fig. 18 Double-immunofluorescence analyses on the neuron in the human brain.

Human brain slices of the cerebellum were coincubated with Abs against PiT-1 or PiT-2 (green) and Tuj1 (A) or GFAP (B) or PECAM-1 (C) (red). For nuclear staining, Topro3 was used (blue in merge). Scale bars, 20 μm.

第5項 変異 *SLC20A2* が Pi 輸送活性に与える影響

本研究室にて本邦における7パターンの *SLC20A2* 変異を報告しているが¹¹、これらの変異が PiT-2 の Pi 輸送機能に与える影響は、未だ不明である。そこで、各患者から見出された *SLC20A2* 変異が、Pi 輸送活性にどの程度影響を与えるか検討した。

本研究室で見出している4つの *SLC20A2* 変異 (Fig. 19A) と野生型 *SLC20A2* を Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に Flp-In システムを用いて遺伝子導入し、安定発現株を得た。Flp-In システムは、標的遺伝子をシングルコピーだけ発現する細胞を得ることができるシステムである。得られた安定発現株における PiT-2 の発現は、PiT-2 に付加した FLAG に対する抗体を用いてウエスタンブロット法によって確認した (Fig. 19B)。ウエスタンブロット法によってミスセンス変異は野生型と同様のバンド位置を示し、ナンセンス変異は野生型と異なるバンドパターンを示した。

得られた CHO 細胞に対して放射性同位体 ³²P を含む培地で一定時間培養することで Pi 輸送活性を測定した (Fig. 19C)。野生型 PiT-2 を導入した細胞における Pi 取り込み量は Mock として GFP を導入した CHO 細胞と比較して有意に高値を示した。一方で、変異 PiT-2 を導入した CHO 細胞は Mock と同程度の Pi 輸送活性であった。以上の結果から、これらの変異はすべて Pi 輸送活性を失っていると考えられる。

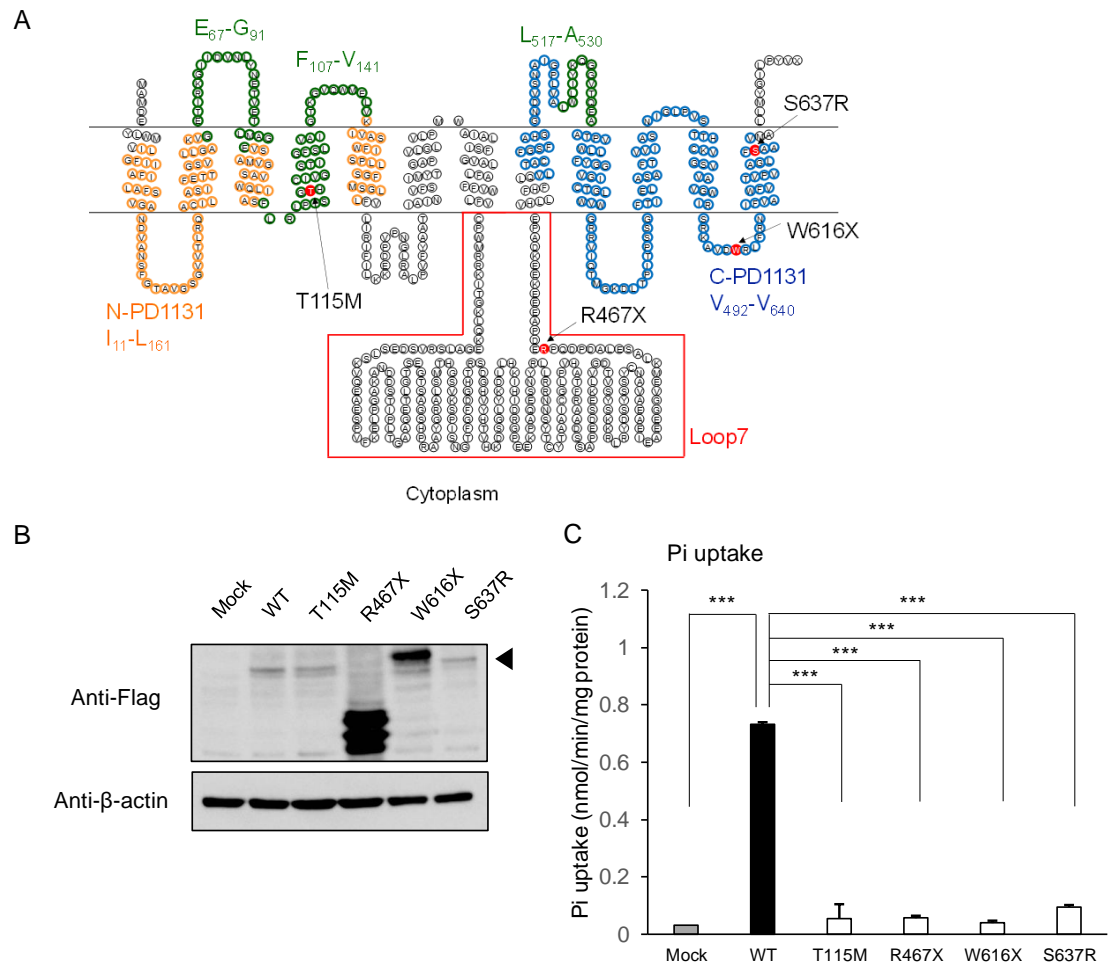


Fig. 19 Pi transport assay in Flp-In CHO cells of variant PiT-2.

(A) Schematic structure of PiT-2 with the mutations. (B) Immunoblot analysis of 3x FLAG-tagged PiT-2 (WT, T115M, R467X, W616X, S637R) and β -actin. The arrowhead indicates the size corresponding to PiT-2 3x FLAG tag. (C) Sodium-dependent Pi uptake levels in PiT-2 including WT, T115M, R467X, T616X, and S637R (mean \pm SEM; n = 8). The significance of any difference was determined using ANOVA followed by the Bonferroni/Dunn post-hoc test (**p < 0.01).

第6項 変異 PiT-2 の膜移行に関する検討

PiT-2 は細胞膜においてホモダイマーを形成し、細胞外から Pi を取り込む^{25,32}。そこで、変異 Pi 輸送活性の低下は、膜移行率の低下が原因だと考えた。PiT-2 は、当初はレトロウイルス受容体として発見されている³³。ウイルスが感染するためには、ウイルス受容体が細胞膜表面上にいる必要があることを利用し、PiT-2 の膜移行率をウイルス感染効率の測定をすることで検討した²⁵。第5項で用いた CHO 細胞安定発現株に GFP を発現させるレトロウイルスを感染させ (Fig. 20A)、その 72 時間後にフローサイトメトリーにてレトロウイルスの感染効率を測定した (Fig. 20B)。PiT-2 を導入していない Naïve の細胞と比較して野生型 PiT-2 を導入したウイルスの感染効率は著しく上昇したが、変異型 PiT-2 を導入した CHO 細胞の感染効率は変異によって差異があった。

また、PiT-2 の膜移行率を測定するために HiBiT システムを用いた。HiBiT は検出試薬である LgBiT が結合することによって基質と反応し発光する。また、LgBiT は細胞膜非透過性を持つため、細胞表面のタンパク質のみ検出することができる。そこで、本研究では、野生型及び変異型 PiT-2 に HiBiT タグを付加し、これを CHO 細胞において一過性に発現させた。その後、LgBiT と基質を培地中に加えて発光を検出し、細胞表面に発現する PiT-2 のみを観測した。その後、全タンパク質量で補正することで PiT-2 の膜移行率を検討した (Fig. 20C)。HiBiT システムによる膜移行率は T115M が野生型 PiT-2 よりも高く、S637R は野生型と比較して低かった。一方で、R467X と W616X は野生型と膜移行率に有意な差は見られなかった。上記の結果から IBGC 発症原因となる *SLC20A2* 変異における Pi 輸送活性低下は膜移行率には依存しないと考えられる。

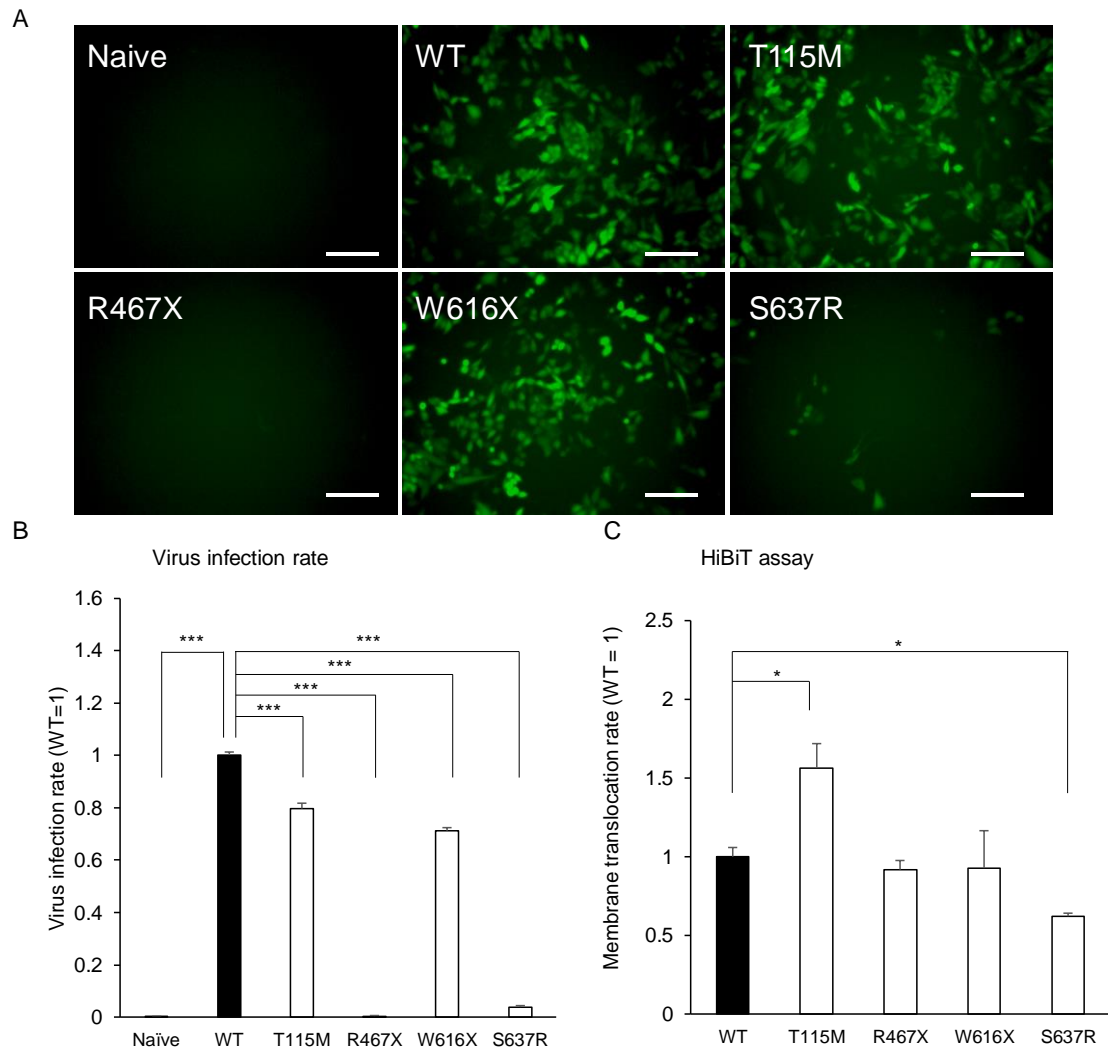


Fig. 20 Membran translocational rate assay in CHO cells with variant PiT-2.

(A) GFP fluorescence imaging show that CHO cells stably expressing WT/ MT PiT-2 were infected by GFP expressing viral vector after 72 hr. Scale bars, 100 μ m. (B) The result of flow cytometry on CHO cells stably expressing WT/MT PiT-2 infected by viral vector (mean \pm SEM; n = 3). (C) Quantification of PiT-2 membrane translocation rate using the HiBiT system in CHO to test WT, T115M, R467X, W616X, and S637R. (mean \pm SEM; n = 3). The significance of any difference was determined using ANOVA followed by the Bonferroni/Dunn post-hoc test (*p < 0.05, ***p < 0.001).

第4節 考察

本章では IBGC の原因遺伝子の 1 つである *SLC20A2* に着目して検討を行った。*SLC20A2* ノックアウトマウスにおいて示された CSF 中の Pi 濃度の上昇を IBGC 患者でも確認することができた。さらに、*PDGFB* 変異患者においてもわずかに Pi 濃度が上昇していた。今回検討した *PDGFB* 変異患者が少ないため、さらなる症例数を重ねた検討は必要であるものの、これまで生化学的な異常所見がないとされる疾患だった IBGC において、CSF 中の Pi が IBGC のバイオマーカーとなり、臨床における診断で重要な評価項目となる可能性が示された。

SLC20 ファミリーはユビキタスに発現して細胞の Pi 恒常性を維持している。PiT-2 に遺伝子変異による Pi 輸送活性の機能低下があっても、細胞に他の Pi 輸送体が発現していれば、変異 PiT-2 による Pi 輸送低下を補完できると考えられる。しかし、Pi 輸送体の発現検討の結果、脳内においては、*SLC20* ファミリーが脳内における主要な Pi 輸送体であることが明らかになった。したがって、脳内では *SLC20* ファミリーが主要な Pi 輸送体であるため、上記の様な代償機構が働かず CSF 中の Pi 濃度上昇が引き起こされると考えられる。

さらに、Flp-In をシステム利用して *SLC20A2* 変異を安定的に発現する CHO 細胞を作製し、これを用いて Pi 輸送活性に与える影響を検討した。その結果、全ての変異タンパク質において Pi 輸送活性が失活していた。また、この Pi 輸送機能は輸送体の膜移行に非依存的である可能性が示された。今回、膜移行を検討するために 2 種類の方法を用いた。1 つ目の方法は PiT-2 タンパク質がウイルス受容体であることを利用した方法である。また、2 つ目は HiBiT と呼ばれる 11 アミノ酸のペプチドタグを利用する方法である。これらの結果に相違が起こったのは、ウイルスが結合すると考えられる部位³⁴⁻³⁶の直接的な変異 (T115M) や変異による構造変化によってウイルスが結合する部位が細胞外に露出していないことが原因として考えられる。また、こうした構造変化は Pi 輸送活性に対しても影響を与える可

能性がある。いずれにせよ、*SLC20A2*変異によって Pi 輸送機能は著しく低下しており、患者脳内の細胞においては、細胞内の Pi が不足している、もしくは細胞外の Pi が増加している状態であることが考えられた。また、CSF を産生するのは脳室に存在する脈絡叢であることが知られており、脈絡叢において Pi 輸送を担っているのは PiT-2 であることが報告されている³⁷。したがって、PiT-2 の loss of function は CSF における Pi 恒常性維持において、大きな影響を与えると考えられる。血清中の Pi 濃度上昇は動脈硬化などの血管石灰化の原因となることが報告されているため³⁸、CSF 中の Pi 濃度上昇も脳内石灰化に関連すると考えられる。CSF の Pi 濃度上昇が脳内石灰化の治療標的となる可能性が示された。

本章では、IBGC 患者における CSF 中の Pi 濃度上昇を見出した。この結果は今まで生化学的異常が無い IBGC においてバイオマーカーとして、診断や治療に有用である可能性がある。また、*SLC20A2*変異患者における CSF 中の Pi 上昇が IBGC の治療標的になりえることを示し、これらを利用することで創薬研究の基盤を構築できると考える。

第3章 IBGC 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と病態モデルの構築

第1節 緒言

IBGC においては、脳内の血管周囲に石灰化が見られることが疾患共通の所見である。しかしながら、臨床症状が非常に多様であることに加え、石灰化の程度と臨床症状の程度が相関しない。こうした複雑な病態であるため、それぞれの石灰化と神経症状の疾患メカニズムを解析するために、脳内の血管周囲に存在する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、神経細胞やグリア細胞などを解析に用いる必要がある。

脳や脊髄などの中枢神経は、一般に再生が困難であり、生検材料を患者から得ることが極めて難しい。そのため、剖検サンプル以外で中枢神経の患者自身の細胞を得ることが困難であった。しかしながら、iPS 細胞技術の開発によって、患者の遺伝的背景を有した標的細胞を得ることができるようになった。これまでも神経疾患において、アルツハイマー病³⁹や筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)⁴⁰など多数の神経変性疾患において疾患特異的 iPS 細胞が樹立され、その疾患特異的な表現型を *in vitro* 培養系において再現できることが報告されてきた⁴¹。そこで IBGC においても第1章で示した PDGF-BB の分泌異常や、Pi 輸送異常に関して、疾患特異的 iPS 細胞で再現できれば、病態の解明や治療薬スクリーニングが可能になると考えた。

最初に報告された iPS 細胞の樹立方法は、レトロウイルスベクターを遺伝子導入ベクターとして4つの転写因子 (Oct3/4、c-Myc、Klf4、Sox2) を導入する方法であった¹²。この方法は、細胞のゲノムにランダムな遺伝子の挿入が起こることから、遺伝子変異を介して腫瘍形成などの原因となることが問題となっていた。これを解決するために、これまでアデノウイルスベクターやセンダイウイルス、トランスポゾン、タンパク質や合成 RNA を用いた遺伝子導入方法が開発されてきた⁴²。しかしながら、これらの因子導入方法は樹立効率の低

さや技術的な扱いにくさが問題であった。そこで、エピソーマルベクターを用いた iPS 細胞の樹立方法が現在は広く用いられている⁴³。本研究では京都大学 iPS 細胞研究所 (Center of iPS Cell Research and Application: CiRA) で構築されたエピソーマルベクター (https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/material_1.html) を用いることにより、ゲノムへの外来遺伝子の挿入なしに高効率での *SLC20A2* 変異及び *PDGFB* 変異の有する疾患特異的 iPS 細胞の樹立を試みた。

また、IBGC において主に石灰化が見られるのは血管周囲である。これまでの剖検所見によると、毛細血管周囲、小動脈の中膜平滑筋に石灰化が認められる。また、一部では神経細胞にも石灰化顆粒がみられることがある⁴⁴。電子顕微鏡による観察では、微小血管の血管内皮細胞周囲に電子密度の高い顆粒が多数観察される^{44,45}。

PDGF は血小板や血管内皮細胞から分泌され、特に血管内皮細胞から分泌された PDGF-BB は血管内皮細胞の細胞外マトリックスに蓄積し、PDGF 受容体を発現する血管平滑筋細胞や周皮細胞をリクルートする⁴⁶。特に脳内において、周皮細胞は脳血管内皮細胞上に発現する輸送体やタイトジャンクション関連タンパク質の発現を亢進させ、血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) の機能維持に関わることが知られる。脳周皮細胞の *PDGFB* や *PDGFRB* ノックアウトマウスは BBB 形成不全を引き起こし^{47,48}、中枢神経疾患の発症や進行との関連が知られる。ALS やパーキンソン病、アルツハイマー病などでも BBB の機能異常が疾患に影響することが報告されている⁴⁹⁻⁵²。また、PDGF-BB の受容体である PDGF 受容体βも IBGC の原因遺伝子として報告されている⁷。以上のことから、運動障害や精神・神経症状をきたす IBGC においても、BBB の破綻が病態に関連することが示唆されている⁵³。

また、これまで iPS 細胞は、ES 細胞での知見の蓄積もあり、多数の細胞への分化誘導方法が確立されている。その中でも血管内皮細胞はすでに分化誘導方法が複数報告されている⁵⁴⁻⁵⁹。

以上、①石灰化部位が血管周囲であること、②PDGF-BB の産生細胞が血管内皮細胞であること、③PDGF が BBB 機能を制御しており、BBB 破綻が中枢神経疾患に関連があること、以上3つの理由から、樹立した疾患特異的 iPS 細胞を血管内皮細胞へと分化誘導し、第1章で示した PDGF-BB の産生低下と、第2章で示した Pi 恒常性の異常をそれぞれ *in vitro* 実験系で検討し、病態モデルとしての可能性を評価した。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 倫理

本研究で用いた血液及び末梢血単核球等のヒト由来検体はすべて岐阜薬科大学、岐阜大学、並びに京都大学倫理委員会の承認の下、全国と IBGC 患者からインフォームドコンセントによる文書での同意を得たうえで提供された。また、診断は特発性基底核石灰化症診断基準 (Table 1) に基づいて行われた。

第2項 実験材料

本研究に用いた薬物および試薬は以下の通りである。

StemSpan-ACF は STEMCELL Technologies、iMatrix-511 は Nippi、StemFit/AK03 は Ajinomoto、Lipidure は Nichiyu、10x Ex Taq Buffer、2.5 mM dNTPs、5 units/ μ L TaKaRa Ex Taq HS、PrimeSTAR[®] MAX DNA Polymerase、PrimeSTAR[®] Mutagenesis Basal Kit、pAcGFP1 vector は TAKARA BIO、アガロース (agarose)、メタノール (methanol)、エタノール (ethanol)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、塩化ナトリウム (NaCl)、スキムミルク (skim milk)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン [tris (hydroxymethyl) aminomethane: tris]、リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate dodecahydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4)、塩酸 (hydrochloric acid: HCl)、LB 寒天培地 (LB Agar, Lennox)、LB 液体培地 (LB Broth, Lennox)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (polyoxyethylene sorbitan monolaurate: Tween)、ポリオキシエチレン (9) オクチルフェニルエーテル (polyoxyethylene (9) octylphenyl ether ,nonidet[®]P-40, nuclease

tested: NP-40)、1 kbp DNA Ladder one、100 bp DNA Ladder one、アンピシリン (amicillin)、2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)、ブロモフェノールブルー (bromophenol blue)、フッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethanesulfonyl fluoride: PMSF) Ultra pure DNase/RNase-Free Distilled Water (DW) は NACALAI TESQUE、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物 (ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid disodium salt, dehydrate: EDTA)、水酸化ナトリウム (sodium hydroxide: NaOH)、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、トリス-EDTA 緩衝液 (Tris-EDTA buffer: TE)、グリセロール (glycerol)、IL-6、SCF、TPO、Flt-3L、IL-3、G-CSF、Y-27632 は Wako Pure Chemical Industries、Big Dye Terminator v 3.1、5x Sequence Buffer は Life Technologies、BCA protein Assay Kit、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)、TrypLE Select、TrypLE Express、knockout serum replacement (KSR)、は Thermo Fisher Scientific Inc.、ビューアブルステイン KANTO (ViewaBlue stain KANTO) は KANTO CHEMICAL、臭化エチジウム (ethidium bromide: EtBr)、precision plus protein dual color standards は Bio-Rad Laboratories, Inc.、E.Coli は NIPPON GENE、プライマー (primer) は Operon Biotechnologies、Ligation high Ver. 2 は TOYOBO よりそれぞれ購入した。エピソードマーカー(https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/material_1.html) は 井上研から供与されたものを使用した。

第3項 単核球細胞の培養

末梢単核球には StemSpan-ACF を用いて 37 °C、5 %CO₂ 環境の下で培養した。iPS 細胞は StemFit を用いて培養した。培養器材は、iMatrix-511 を最終濃度 10 μM となるように PBS(-)に溶解したもので表面を 60 分以上コーティングしたものを使用した。細胞は 37 °C、5 % CO₂ 環境で培養し、6-7 日ごと TrypLE Select の処置により継代を行った。

第4項 プレーートのコーティング

6 well plate に PBS (-) を 1.5mL/well 加え、Laminin-511 E808 (コート量 : 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を 4.8 $\mu\text{g}/\text{well}$ 加えすぐによく混ぜた。37 °C、5 %CO₂ 条件下で 60 分以上反応させる。その後、StemSpan-ACF 培地を 0.75 mL/well ずつ加え良くなじませ上清を除去した。最後に単核球培養培地を加えインキュベーターに入れておいた。

第5項 遺伝子導入

7 日間培養した単核球を、各エピソーマルベクター (CiRA、井上研究室から供与されたもの)、pCE-hOCT3/4 (1.05 μg)、pCE-mp53DD (1.05 μg)、pCE-hSK (1.05 μg)、pCE-hUL (1.05 μg)、pCXB-EBNA1 (0.8 μg) と supplement1 を含む P3 Primary cell solution に懸濁し Nucleofector 4D (Lonza) にて遺伝子導入した。遺伝子導入後 3、5、7 日目に各 well に 1 mL の StemFit を加えた。遺伝子導入後 9 日目に各 well あたり 2mL の StemFit で培地交換を行い、以降、2 日おきに培地交換を行い、iPS 細胞のコロニーが 1mm を超える程度まで培養をつづけた。

第6項 コロニーピッキングアップ

1 mm を超えたコロニーはピッキングアップし 96 well plate に入れた。その後、10 μ L の TrypLE Select を加え、インキュベーター (37 °C、CO₂ 5 %) 内で 10 分間反応させた。インキュベーターから取り出し、それぞれの well に 180 μ L の StemFit 溶液 (最終濃度 10 μ M Y-27632 添加) し、ラミニンコーティングしていた 12 well plate に播種した。その後、インキュベーターに入れて培養した。

第7項 iPS 細胞の培養

健康人由来 iPS 細胞は理研・細胞材料開発室から提供を受けた。iPS 細胞は StemFit/AK03 を用いて、iMatrix で処置した 24 well plate 上で 37°C、5 %CO₂ 条件下で培養した。1-2 日毎に培地交換を行い、5-7 日毎に TrypLE Select で剥離し、継代培養を行った。

第8項 プラスミドインテグレーションの確認

10x TaKaRa Ex Taq 10 μ L に 10 mg/mL Proteinase K 1.5 μ L と滅菌水 88.5 μ L からなる Lysis 溶液で細胞を溶解し、55 °C で 4 時間インキュベートした。その後、10 μ L の滅菌水を加え、95 °C、3 分間処置し、Proteinase K を失活させた。そのうちの 1 μ L をテンプレートとして、10x ExTaq を用いて添付のプロトコール通りに PCR を行った。反応条件は 94 °C、2 分で初期熱変性を行い、熱変性 (94 °C、20 秒)、アニーリング (20 秒)、および伸長反応 (72°C、40 秒) を 30 サイクル行い、最後に 72 °C で 3 分間行った。反応終了後、1 %アガロースゲルで電気泳動を行い、バンドを確認した。

プライマーは pEP4-Forward '5-TTCCACGAGGGTAGTGAACC-3'及び pEP4-Reverse 5'-TCGGGGGTGTTAGAGACAAC-3'を用いた。

第9項 *In vitro* 三胚葉分化

iPS細胞を TrypLE express で回収し、20% knockout serum replacement (KSR)、10 μ M Y-27632 を含む DMEM/F12/Glutamax にて 37°C、5% CO₂ 環境で培養した。7日間培養した。また、培養器材は、表面を Lipidure にて最終濃度 0.5% となるように Ethanol で溶解し、120分以上コーティングしたものを使用した。

第10項 蛍光免疫染色

未分化 iPS 細胞、三胚葉分化した細胞を 1x PBS で洗浄した後、4% PFA を用いて、室温で 15 分間固定した。その後、1x PBS で希釈した 0.2% TritonX-100 を用いて、室温で 10 分間膜透過処理を行った。その後、1x PBS で希釈した 2% normal goat serum で室温で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、2% normal goat serum で 1 次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させた。翌日、1x PBS で洗浄後、1x PBS で 2 次抗体を希釈し、室温で 1 時間反応させた。再度 1x PBS で洗浄し、核染色を室温で 15 分間行った後、1x PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE) で観察、撮影した。1 次抗体には Rabbit anti-NANOG (1:500; Cosmo Bio)、Mouse anti-SSEA-4 (SSEA4: stage specific embryonic antigen 4) (1:1,000; Millipore)、Mouse anti- β III-tubulin (1:500; Millipore)、Mouse anti- α SMA (α SMA : alpha smooth muscle actin) (1:100; DAKO)、Goat anti-SOX17 (1:300; R&D)、2 次抗体には Donkey anti-Goat IgG Alexa Fluor 488、Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488、Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 546 (1:1000; Thermo Fisher Scientific)を用いた。

第 1 1 項 フローサイトメトリー

細胞を Accumax で回収し、2%FBS と抗体を含む PBS(-)で 4°C、30 分間、インキュベートした。その後、FACS Aria II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)にて 647nm の蛍光波長を測定した。抗体は SSEA-4 APC conjugated monoclonal antibody (BD Biosciences)を用いた。

第 1 2 項 核型解析

核型解析は株式会社 LSI メディエンスに受託することで行った。

第 1 3 項 DNA シーケンス

DNA サンプルは細胞を Dna Quick II (Genomic DNA Separation Kit)を用い、添付のプロトコールに従って抽出した。得られた DNA は TE (pH=8.0)溶解し、10 ng/mL になるように調製した。それぞれの変異領域に対して KOD-plus-Neo (TOYOBO)を用いて増幅し、得られたテンプレートを 3700 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)でサンガー法にてダイレクトシーケンスを行った。得られたシーケンスデータを ApE (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) で解析した。

第 1 4 項 血管内皮細胞への分化誘導

血管内皮細胞への分化誘導は継代数が 20-30 までの iPS 細胞を用いた。未分化 iPS 細胞の占める割合が約 70-80 %になった状態で開始した。1 % L-glutamine、150 µg/mL Transferrin、50 µg/mL Ascorbic acid、3 µL/ml monothioglycerol (MTG)を含む StemPro 34

を基本培地として、day 0 で 10 μ M Rock inhibitor、2 ng/mL BMP4、0.5 % Matrigel を含む基本培地で 24 時間培養して、胚葉体 (Emryonic body: EB) を形成した。day 1 で 30ng/mL BMP4、10ng/mL bFGF、10ng/mL、Activin A を含む基本培地を day 0 と等量添加することで中胚葉細胞へと分化させた。Day 4 にて EB を回収し、IMDM 培地で 2 回、洗浄した。その後に 50 μ g/mL VEGF を含む基本培地にて low attachment 6 well plate に EB を播種し、培養した。day8 に EB を回収し、50ng/mL VEGF、5ng/mL bFGF を含む基本培地で Matrigel コートした 6 well plate に播種した。その後、2 日毎に培地交換を行い、day15 まで培養した。その後、CD31 陽性の細胞を血管内皮細胞と定義し、抗 CD31 抗体にて血管内皮細胞を標識した。抗体に結合した磁気ビーズがカラムに吸着することを利用して血管内皮細胞のみを分取した (Fig. 21)。

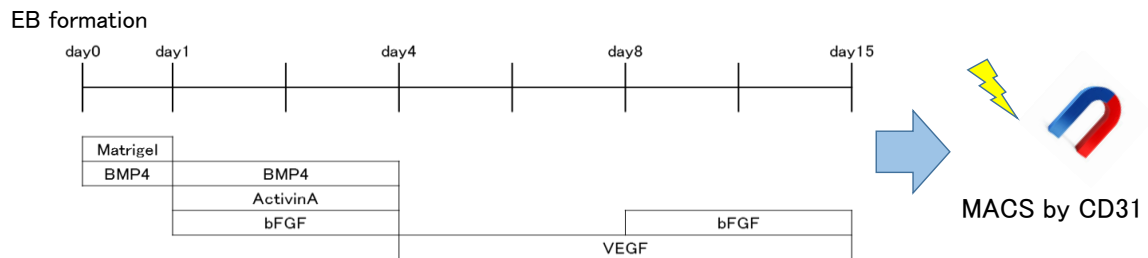


Fig. 21 Scheme of *in vitro* differentiation of human iPSCs to endothelial cells.

iPSCs differentiation toward endothelial cell was performed according to the scheme depicted above. On day 15, CD31+ populations were isolated by anti-CD31 antibody-coupled magnetic beads.

第 1 5 項 Pi 輸送活性の測定

Pi 輸送活性については第 2 章と同様に行った。

第 1 6 項 ELISA

24 well plate にコンフルエントになるように播種した細胞を 5 日間培養し、その培養上清を回収したものをサンプルとした。Human PDGF-BB DuoSet ELISA (R&D)を用いて、添付のプロトコールに従い、PDGF-BB を測定した。測定は 2104 EnVision (PerkinElmer)にて 450nm の吸光度を測定した。

第 1 7 項 統計処理

実験成績は平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、StatView を用いて、二群間については Student's t-test、他群間については分散分析後、Bonferroni/Dunn test により行った。危険率が 5 %未満を有意差ありとした。

第3節 実験結果

第1項 単核球への遺伝子導入、未分化マーカーの確認

第1章で本邦における新規の *PDGFB* 変異を3つ見出した。また、これまでに、本研究室にて本邦における *SLC20A2* 変異を7つ報告している¹¹。これらの変異を有する患者の一部から末梢血を採取し、この中に含まれる単核球を得た。患者の一覧を Table 14 に示す。これらの細胞にそれぞれ、初期化因子 (SOX2、KLF4、OCT4、L-MYC、LIN28 and reprogramming、p53 carboxy-terminal dominant-negative fragment) をエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。その後、それぞれシングルコロニーからコロニーをピックアップして単一クローンを得た。得た細胞を培養し、導入したベクターが残存していないか確認を行った (Fig. 22A)。得られた細胞を回収し、Lysis Buffer で細胞を溶解した後に得られたサンプルを PCR の template とした。導入したエピソードベクターに存在する OriP 配列に対する PCR を行った。アガロースゲル電気泳動にて、バンドが目視で確認されたものは導入したエピソードベクターが残存しているものとして除外した。バンドが確認されなかった細胞を導入遺伝子が残存していない細胞として、これ以降の実験に用いた。それぞれ蛍光免疫染色にて未分化マーカーである NANOG、SSEA-4 の発現確認を行った (Fig. 22B)。

また、*SLC20A2* 変異を有する iPS 細胞に関してはフローサイトメトリー法により SSEA-4 の発現量の定量を行ったところ、87.6 % の細胞が SSEA-4 陽性細胞であった (Fig. 22C)。

Table 14 Summary of iPSC cell lines generated.

	<i>SLC20A2</i>	<i>PDGFB</i>	<i>PDGFB</i>	<i>PDGFB</i>
gene variant	c.1848G>A	c.160+2T>A	c.457-1G>T	c.33_34delCT
	hetero	hetero	hetero	hetero
sex	M	M	F	M
sampling age	28	57	16	71
symptom	PKC	depression anxiety cognitive impairment	headache	dizziness cognitive impairment
PKC :Paroxysmal Kinesigenic Choreoathetosis				

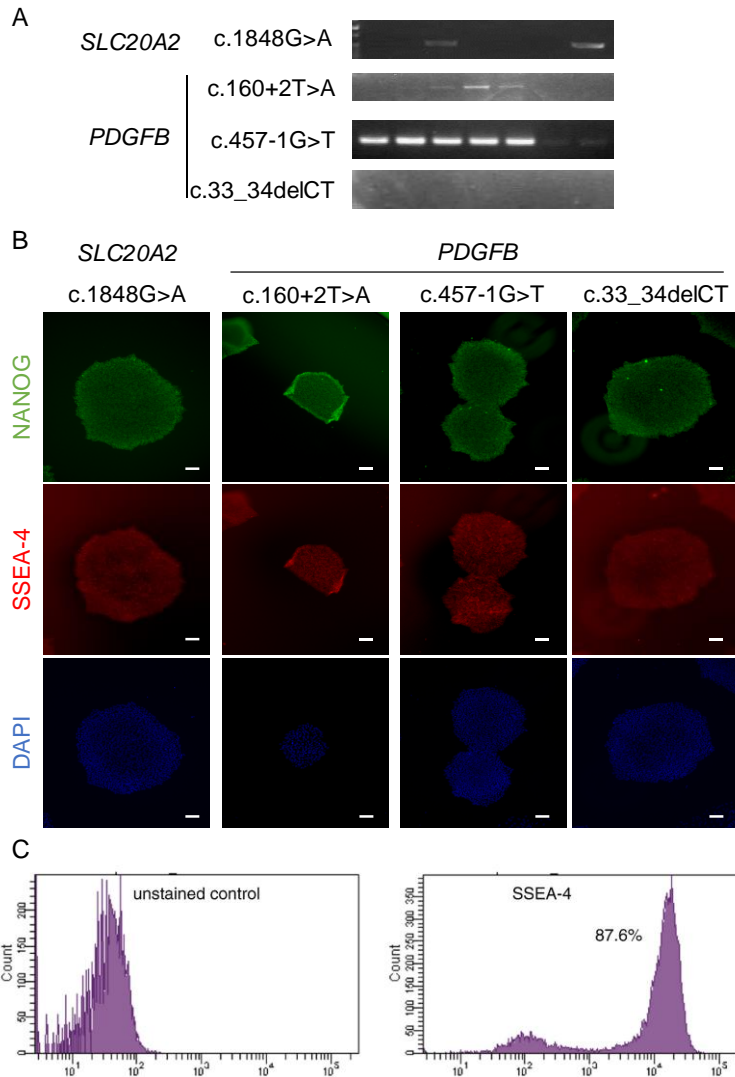


Fig. 22 Established IBGC-iPSCs showed positive staining of pluripotency markers.

(A) RT-PCR analysis of integration in isolated iPSCs clones. (B) Established iPSC cells expressed pluripotent markers NANOG (green), SSEA-4 (red). Scale bars, 200µm. (C) Flowcytometry analysis in iPSCs with *SLC20A2*.

第2項 *In vitro* における三胚葉分化能の確認

第1項で未分化性が確認された細胞において多能性を示すために、*in vitro* での三胚葉分化能力を検討した。未分化な細胞を回収し、U底 96 well plate に播種し、胚葉体 (Embryonic Body: EB) を形成させた。得られた EB を Matrigel コートした 24 well plate 上に播種し、蛍光免疫染色法にて検討した。全ての細胞において三胚葉のマーカー (SOX17: 内胚葉、 α SMA: 中胚葉、 β III-Tubulin: 外胚葉) の発現が認められた (Fig. 23)。上記の結果から第1項で確認した未分化性と併せて、本項でそれぞれの細胞における多能性が確認できたため、遺伝子導入によって得られた細胞は iPS 細胞であることを確認した。

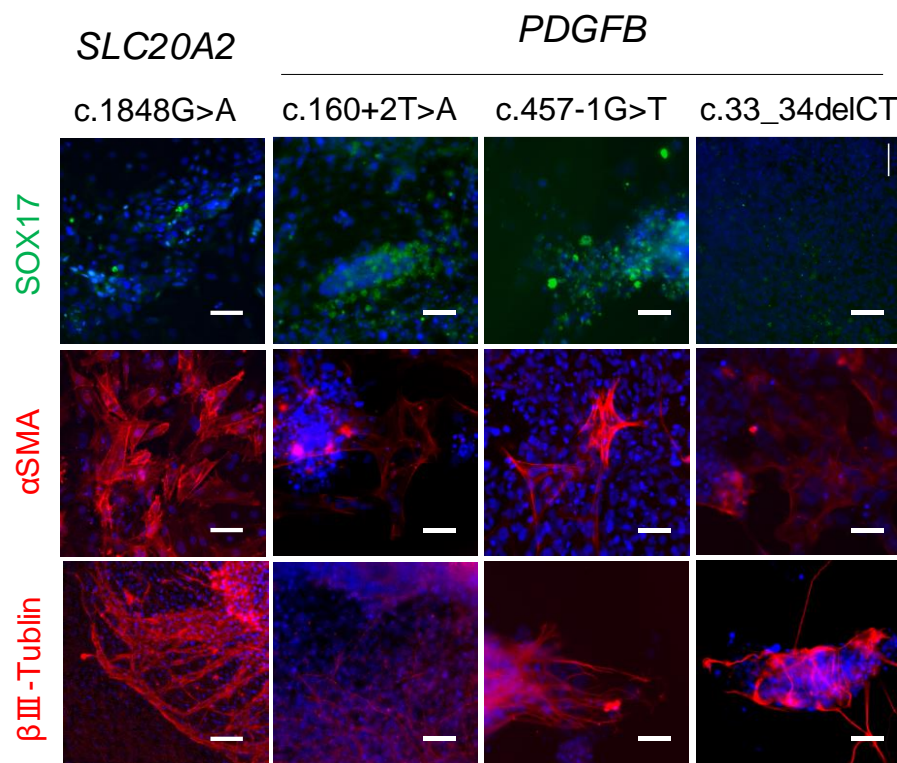


Fig. 23 Three germlayer differentiation capacity.

Three germlayer differentiation capacity was showed in the *in vitro* differentiation from iPSCs followed by immunocytochemistry staining of mesodermal marker (alpha smooth muscle actin: α SMA), the endodermal marker (SOX17), and the ectodermal marker (β III-tubulin). Scale bars, 200 μ m.

第3項 リプログラミング後の細胞における変異遺伝子の残存確認、核型解析による染色体異常の有無の確認

得られた iPS 細胞において、初期化因子の導入後も患者において確認された変異を保持しているか確認したところ、同様の変異が確認された (Fig. 24A)。また、リプログラミングによって、iPS 細胞に染色体の異常が起こっていないかを確認するために核型解析を G バンド法にて行ったが、リプログラミングによる染色体異常は見られなかった (Fig. 24B)。

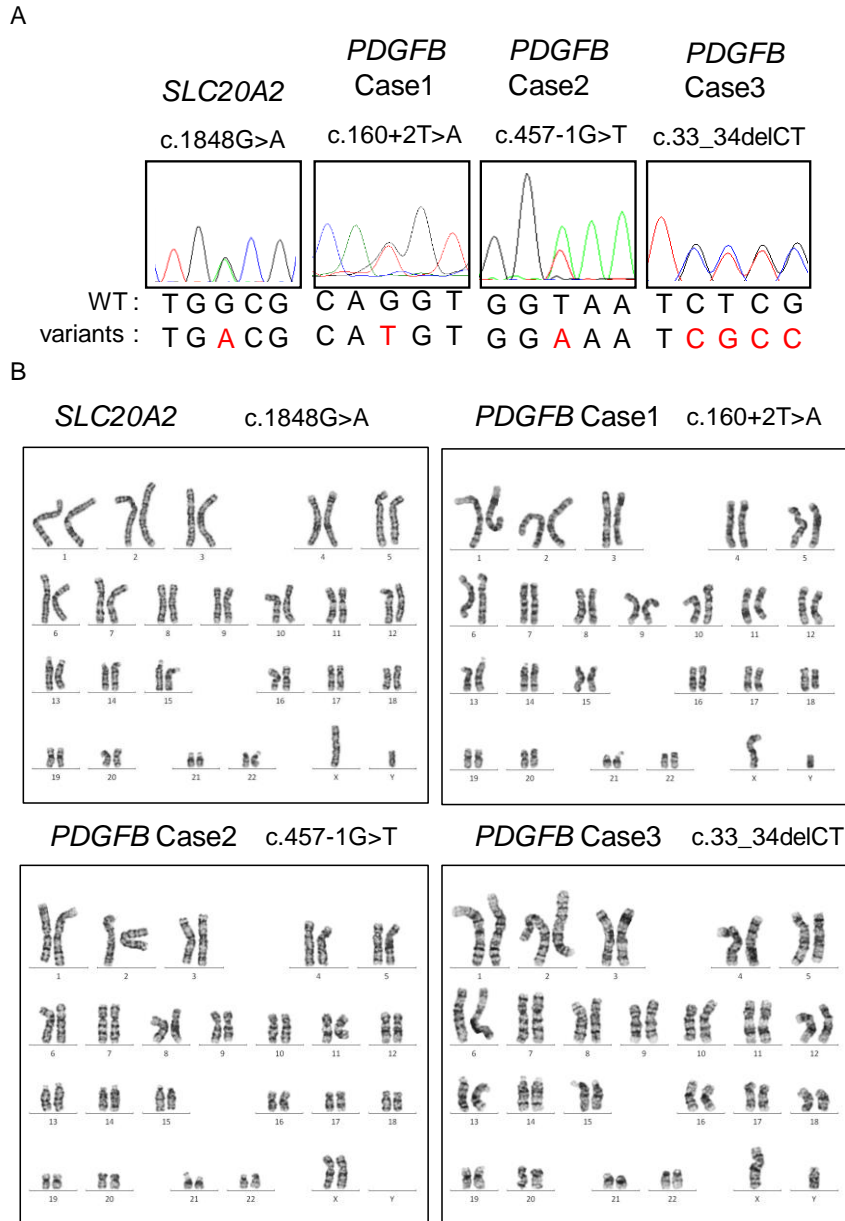


Fig. 24 Established IBGC-iPSCs also maintained gene variant or normal karyotype after reprogramming process.

(A) Sanger sequence of the *SLC20A2* or *PDGFB* gene in iPSCs showed a heterozygous variant. (B) Karyotype analysis of patient iPSCs showed a normal karyotype of 46 XY (*SLC20A2* c.1848G>A, *PDGFB* Case1 c.160+2T>A, *PDGFB* Case3 c.33_34delCT) and 46XX (*PDGFB* Case2 c.457-1G>T)

第4項 *SLC20A2*変異 iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導

IBGC における石灰化は脳の小動脈から非常に細い微小血管周囲でも見られる。そこで第2章で樹立した *SLC20A2*変異を有する iPS 細胞と理研細胞バンクから供与された健常 iPS 細胞を、既報の方法を一部改変するプロトコールで血管内皮細胞へ分化誘導した。CD31 陽性の細胞を血管内皮細胞と定義し、day15 に抗 CD31 抗体結合磁気ビーズを細胞に処置し、結合させた。その後、磁気カラムを通過させることで CD31 陽性の細胞を分取した。得られた細胞は血管内皮細胞のマーカーとして知られる CD31、eNOS、KDR、CD34、VE-cadherin の mRNA 発現が未分化な iPS 細胞と比較して著しく上昇していた。また、健常者 (control) と患者 iPS 細胞 (IBGC) から分化誘導して得られた CD31 陽性の細胞はこれらの血管内皮細胞マーカーに発現の差は見られなかった (Fig. 25A-E)。蛍光免疫染色にて CD31 の発現が確認した (Fig. 25F)。また、血管内皮細胞は細胞外マトリックス上で管腔を形成することが知られている。そこで得られた CD31 陽性細胞をそれぞれ細胞外マトリックスに播種したところ、12-16 時間後に管腔形成を示した (Fig. 25G)。これらの結果から得られた細胞が血管内皮細胞と同等の細胞であることを確認した。

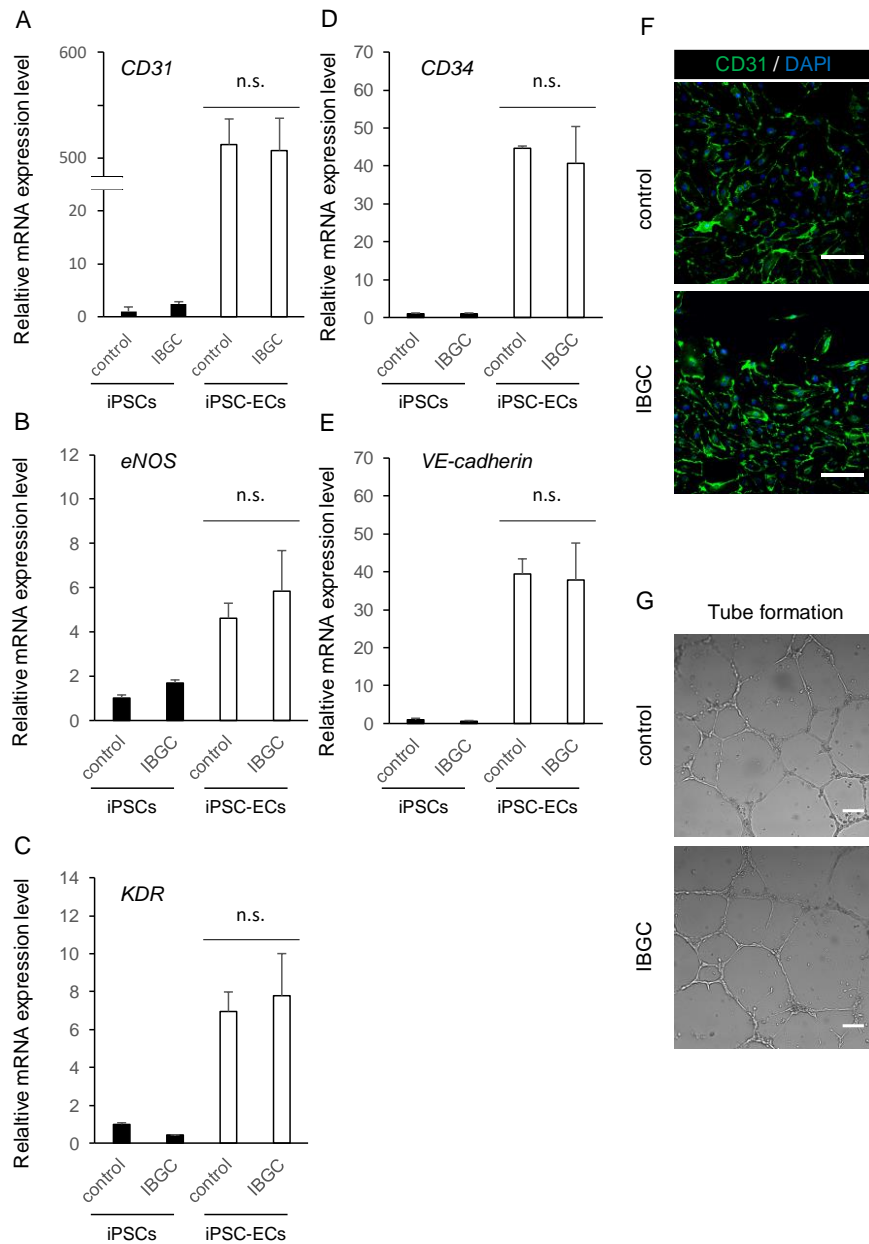


Fig. 25 Characterization of iPSC-derived endothelial cells grown in culture.

(A-E) The mRNA expressions of endothelial cell markers were similar for CD31+ cells derived from control and IBGC patient with *SLC20A2* variant, CD31 (A), eNOS (B), KDR (C), CD34 (D), VE-cadherin (E). The expression level of undifferentiated cells of control cell was set at 1. (mean ± SEM; n = 3). (F) ECs generated from iPSCs the expressed endothelial marker, CD31. Scale bar: 200 μm (G) Tube formation assay of CD31+ cells on Matrigel. Scale bar: 200 μm

第5項 *SLC20A2*変異 iPS 細胞由来血管内皮細胞におけるリン酸輸送体発現

第2章の第5項において *SLC20A2*変異はPi輸送活性を著しく低下させることを示した。そこで、第4項で分化誘導して得られた *SLC20A2*変異を有する iPS 細胞由来の血管内皮細胞を用いて CHO 細胞と同様に Pi 輸送活性を比較したところ、健常者と比較して約 50%まで Pi 輸送活性が低下していた (Fig. 26A)。ここで、誘導した血管内皮細胞における *SLC20A2* と、Pi 輸送体のサブタイプである *SLC20A1* の mRNA 発現について検討を行ったところ、健常者と IBGC において mRNA 発現量自体に差が見られなかった (Fig. 26B, C)。

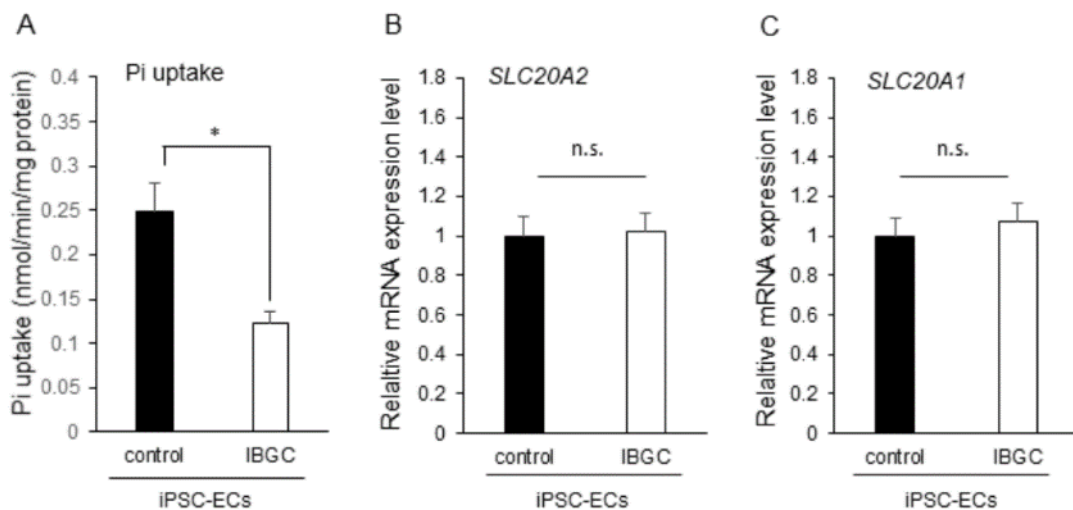


Fig. 26 Pi homeostasis change in iPSC-ECs derived from an IBGC patient carrying a *SLC20A2* variant.

(A) The decrease in Pi uptake is shown in IBGC with *SLC20A2* variant endothelial cells. (mean \pm SEM; $n = 3$). Relative mRNA expression levels for sodium dependent Pi transporters, *SLC20A2* (B) and *SLC20A1* (C) were not changed. (mean \pm SEM; calculated from triplicate reactions). Significance of any difference was determined using ANOVA followed by the Bonferroni/Dunn post-hoc test (* $p < 0.05$, n.s.: not significant).

第6項 *PDGFB* 変異を有する iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導と血管内皮細胞における PDGF-BB 産生

第1章で示したが、*PDGFB* 変異患者の血清中の PDGF-BB は低下している。そこで、*PDGFB* 変異を有する iPS 細胞を PDGF-BB 産生細胞である血管内皮細胞へと分化誘導し、内皮細胞から分泌された培養上清中の PDGF-BB を測定することで、患者由来の細胞における PDGF-BB 減少を確認した。健常者由来の細胞は理研細胞バンクから取得した、別の3人からそれぞれ樹立された iPS 細胞 (ctrl1、2、3) を用いた。

SLC20A2 変異を有する iPS 細胞の分化誘導と同様にして、day15 における CD31 陽性の細胞を分取した。これらの細胞は血管内皮細胞マーカーである CD31 と vWF の発現を蛍光免疫染色で確認した。また、血管内皮細胞の管腔形成を確認した (Fig. 27A)。これらの結果から、血管内皮細胞に分化誘導したことを確認できた。

得られた細胞を 24 well plate に播種し、5日間培養した後の細胞培養液中に含まれる PDGF-BB 量を ELISA にて定量した。その結果、健常コントロールと比較して *PDGFB* 変異を持つ IBGC 患者由来の血管内皮細胞において細胞培養液中の PDGF-BB 量の半減が確認された (Fig. 27B)。このことから、見出した3つの *PDGFB* 変異を持つ細胞における PDGF-BB の産生低下を確認することができた。

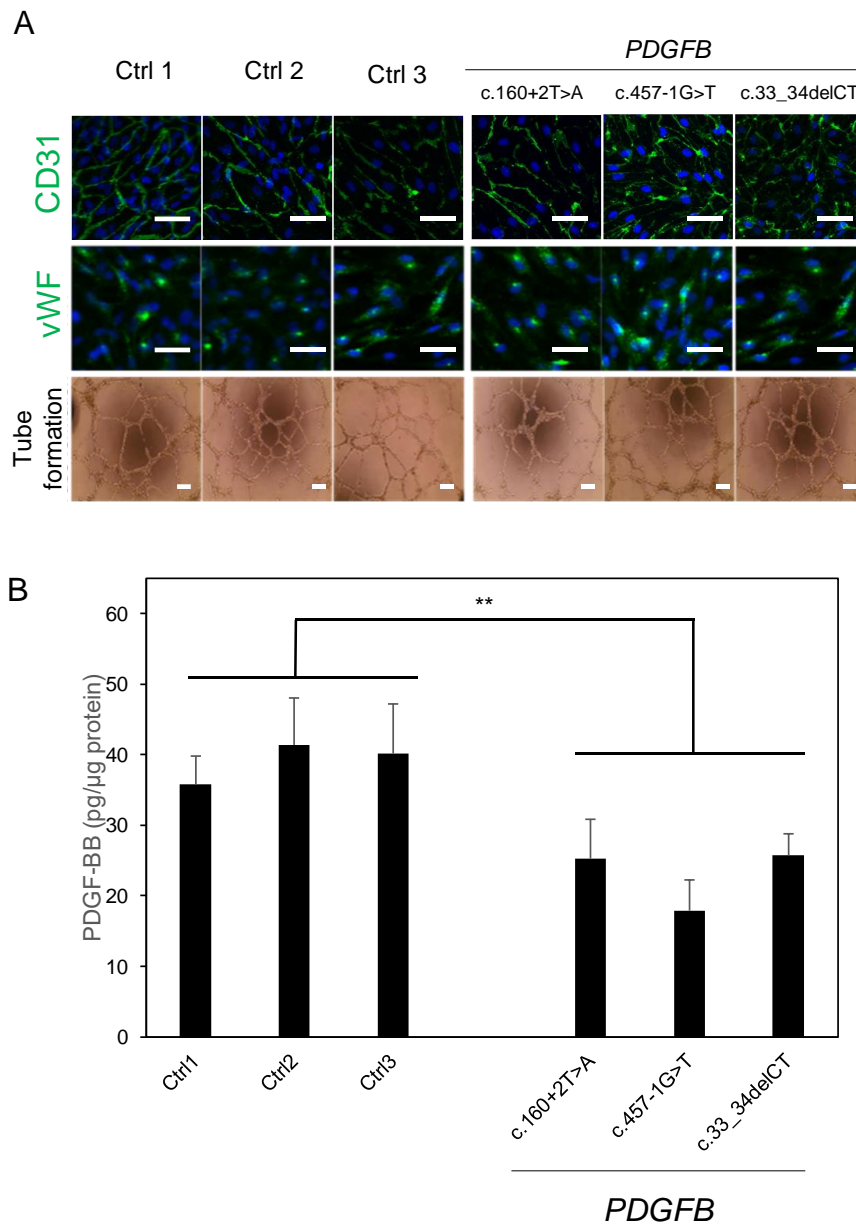


Fig. 27 Measurement of PDGF-BB released in the supernatant of iPSC-derived endothelial cells using ELISA

(A) Endothelial cell differentiation from iPSCs. Immunocytochemical study of endothelial marker CD31 and von Willebrand factor (vWF). Capillary tube formation on Matrigel for iPSC-ECs. Scale bar: 100μm. (B) iPSC-derived ECs were plated on 96-well plates and cultured for 5days. PDGF-BB in supernatant from iPSC-derived endothelial cells were measured using ELISA. Data were presented as means \pm SD. Statistical significance was determined using Student's t-test compared with control cells and *PDGFB* variants cells (** p < 0.01).

第4節 考察

これまで、IBGCの実験モデルとして報告されているのは全てマウスにおけるノックアウトモデルである^{8,23}。しかしながら、IBGCモデルマウスにおける石灰化部位はヒト剖検例と異なる²³ことから、従来の動物モデルではIBGC病態を十分に反映できているとは考えにくい。今後、*SLC20A2*変異や*PDGFB*変異の詳細な病態の解明や新規治療薬開発のための薬効評価を行う際には、病態を忠実に再現する別のモデルが必要不可欠である。以上のことから、本章では疾患特異的iPS細胞の樹立を行った。

今回、エピソーマルベクターにて誘導したiPS細胞は未分化性のマーカーであるNANOG、SSEA-4を発現し、さらに外胚葉(β -III Tublin)、中胚葉(α SMA)、内胚葉(SOX17)の三胚葉すべてに分化する多分化能を示した。未分化性と多能性を示したことから、iPS細胞として必要な能力を有する。また、エピソーマルベクターを使用することで、ゲノムへの外来性の遺伝子挿入を回避した細胞を得た。さらに、樹立後においても患者で見られた遺伝子変異を保持していた。

これまでのiPS細胞を用いた先行研究では、大きく3つの利用法が考えられる。1つ目はiPS細胞を用いた再生医療への応用、2つ目は疾患特異的iPS細胞を用いた病態モデル作製、3つ目は疾患特異的iPS細胞による病態モデルを用いた創薬スクリーニングである。現在、再生医療を目指した臨床研究は、既に加齢黄斑変性やパーキンソン病、心不全、再生不良性貧血、脊髄損傷で現在進行中、もしくは実施予定である。また、疾患特異的iPS細胞を用いた疾患研究は、盛んにおこなわれており、神経変性疾患を例に挙げると、アルツハイマー病^{39,60}、ALS⁴⁰、Frontotemporal lobar degeneration (FTLD)⁶¹、Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P)⁶²、アレキサンダー病⁶³などがあり、これまで病理所見で見られる表現型を*in vitro*で再現してきた。さらに、疾患特異的iPS細胞モデルを用いた化合物スクリーニングにより、有効な治療薬候補が同定され、臨床

研究が進められている。ALS においては ropinirole⁶⁴、Fibrodysplasia ossificans progressive (FOP)における rapamycin⁶⁵などで臨床研究が進んでいるが、これらはドラッグリポジショニングによって既存薬を応用しており、迅速な臨床研究、応用が可能になる。

IBGC 患者では神経症状や血管石灰化が確認されていることから、神経細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など様々な細胞において IBGC の表現型を確認する必要がある。そのいずれの細胞も作製することができる iPS 細胞は有用である。

本研究では、世界で初めて *SLC20A2* 変異及び *PDGFB* 変異を有する IBGC の疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。その後、血管内皮細胞へと分化誘導することで健常者由来 iPS 細胞との Pi 取り込み機能や PDGF-BB 産生能をそれぞれ比較した。

SLC20A2 変異患者の細胞における Pi 取り込みは約 50%程度にまで低下していた。これは患者の血管においても Pi の取り込みが低下しており、細胞内の Pi が不足している、もしくは細胞外の Pi が増加している状態を示唆する。細胞外の Pi 濃度の上昇は血管石灰化を引き起こすことが知られている⁶⁹⁻⁷¹。こうした Pi の恒常性の破綻が IBGC でみられる精神・神経症状や血管石灰化を引き起こすことが予想される。一方で、神経細胞の Pi 飢餓状態は、ミトコンドリアの機能異常を引き起こし、酸化ストレスを誘導することが報告されている⁶⁶。PiT-2 は Pi 輸送以外にも他の機能を持つことが最近の研究で明らかになってきた。PiT-2 は Pi 輸送活性とは非依存的に神経細胞において PiT-2 は軸索伸長に関わり⁶⁷、また、PiT-1 と共に細胞外の Pi センサーとして働くことが示唆されている⁶⁸。これらの PiT-2 の機能が神経症状に影響を与える可能性があり、Pi 輸送活性以外の PiT-2 機能の評価にも疾患特異的 iPS 細胞は有用であると考えられる。

一方で、*PDGFB*変異患者由来の iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞における PDGF-BB 分泌量を健常者由来の細胞と比較した。疾患群の PDGF-BB 分泌量は半減しており、第 1 章で示した血清中の PDGF-BB 量と相関性を示した。前述のように、PDGF-BB は BBB の機能維持において重要な役割を担っていることから、IBGC の神経症状の原因となる可能

性が示唆される。また、PDGFB-PDGF 受容体 β シグナルは PiT-1 の機能を制御することが知られている²²。PDGF-BB は PiT-1 を介して Pi 取り込み量を上昇させることから、PDGF-BB の減少は細胞内への Pi 流入量の減少を引き起こし、Pi 恒常性の異常を引き起こすことが示されている。従って、PDGF-BB の低下も最終的には Pi 恒常性異常を介して、IBGC 病態を来す可能性が考えられる。

第4章 総括及び結論

脳内に原因不明の石灰化を来し、進行性の神経症状を伴う IBGC は、患者にとって「治らない不気味な病気」という精神的にも負担が大きい疾患である。1930年に報告され、2015年には国の指定難病に追加されたが、未だに疾患の理解は進んでいない。原因遺伝子が同定され、診断基準が策定された今でも、有効な治療法はなく、1日も早い病態の理解と治療薬の探索が望まれる。IBGCではこれまでに5つの原因遺伝子が報告されているが、患者におけるバイオマーカーの探索や、それぞれの変異タンパク質の解析の報告はほとんどない。唯一、*SLC20A2*ノックアウトマウスにおいてCSF中Pi濃度の上昇が報告されたものの、実際の患者における検討は行われてこなかった。また、これまで本邦にて行われたIBGCの遺伝子検索は、*SLC20A2*だけである。そこで、本検討においては、本邦における*PDGFB*の変異の探索を行い、患者におけるバイオマーカーの探索、遺伝子変異による機能への影響を検討した。また、報告されている動物モデルについては神経症状の報告はなく、IBGCの病態解析を行うためには、新たなモデルが必要である。そこで、これまで他の疾患での実績がある疾患特異的iPS細胞を樹立した。このiPS細胞を用いてIBGCの標的細胞と考えられる血管内皮細胞へ分化させ、Pi輸送活性やPDGF-BBの産生低下を*in vitro*実験系での再現を試みた。

第1章では、これまで不明だった本邦におけるIBGC患者の*PDGFB*変異の保有状況を調べるため、*PDGFB*遺伝子変異検索を行った。その結果、新たに*PDGFB*変異を3つ見出すことができた。また、今回見出した*PDGFB*変異患者における血清中のPDGF-BB量の低下を示した。さらに今回見出した*PDGFB*変異がmRNAのスプライシング異常を引き起こすことを示した。

第2章では、これまで *SLC20A2* ノックアウトマウスで確認されていた CSF 中の Pi 濃度上昇について、IBGC 患者の CSF でも確認した。また、*SLC20A2* がマウス及びヒト脳内における主要な Pi 輸送体であることを示した。さらに、これまで本邦で報告した *SLC20A2* 変異が loss of function であり、これは膜移行とは非依存的であることを見出した。

第3章では、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を試みた。樹立の際には外来遺伝子の残存を避けるためエピソーマルベクターを用いた。疾患特異的 iPS 細胞を得た。さらに、今回樹立した iPS 細胞を血管内皮細胞に分化誘導し、第1章と第2章で示した IBGC の特徴的な表現型を再現した。以上の結果から、本章にて樹立した iPS 細胞は病態モデルとして有用であると考える。

以上、CSF 中の Pi 濃度上昇や血清中の PDGF-BB 産生低下はバイオマーカーとして IBGC の診断の補助となること可能性がある。IBGC における治療法は未だに存在しないが、機能低下した Pi 取り込みを回復させる化合物、もしくは外因性の PDGF-BB の補充、もしくは内因性の PDGF-BB の分泌増加を促す化合物が IBGC の治療戦略の候補となりうる。また、IBGC の疾患特異的 iPS 細胞を世界で初めて樹立した。この疾患特異的 iPS 細胞を用いて、Pi 恒常性異常と PDGF-BB 産生低下を *in vitro* 実験系で再現した。これは IBGC の *in vitro* 実験系の病態モデルとして利用できる。これらは、今後の IBGC の臨床現場と病態及び創薬研究に有用な知見である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、検体を提供していただいた患者、ならびにご家族の皆様、および主治医の先生方、医療従事者の皆様に深謝申し上げます。

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を賜り、また終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室 教授 保住功先生に深甚なる謝意を表します。実験に際して終始御懇切なる御助言を賜りました薬物治療学研究室准教授 位田雅俊先生、講師 栗田尚佳先生並びに薬物治療学研究室諸氏に深謝致します。また岐阜薬科大学在任中より終始熱心な御指導を賜りました広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 分子細胞情報学 准教授 金子雅幸先生に心から感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座 分子生物学研究室教授 福光 秀文 先生、医療薬剤学大講座 薬物動態学研究室教授 北市 清幸 先生、並びに生命薬学大講座 衛生学研究室 中西 剛 先生に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門教授 井上 治久 先生、特定拠点助教 近藤 孝之 先生並びに井上研究室諸氏に厚く感謝申し上げます。

平成 29 年度日本薬学会長井記念薬学研究奨励金により援助していただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、研究に専念できるよう、経済的・精神的協力を惜しまなかった父・哲、母・喜美を始め家族に深く感謝いたします。

引用文献

1. Fahr, T. Idiopathische Verkalkung der Hirngefäße. *Cent. fur Allg. Pathogische Anat.* **50**, 129–133 (1930).
2. Manyam, B. V. What is and what is not ‘Fahr’s disease’. *Park. Relat. Disord.* **11**, 73–80 (2005).
3. Ramos, E. M. *et al.* Primary brain calcification: an international study reporting novel variants and associated phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* **1** (2018). doi:10.1038/s41431-018-0185-4
4. Saleem, S. *et al.* Fahr’s syndrome: literature review of current evidence. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 156 (2013).
5. Wider, C., Dickson, D. W., Schweitzer, K. J., Broderick, D. F. & Wszolek, Z. K. Familial idiopathic basal ganglia calcification: A challenging clinical-pathological correlation. *J. Neurol.* **256**, 839–842 (2009).
6. Wang, C. *et al.* Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat. Genet.* **44**, 254–6 (2012).
7. Nicolas, G. *et al.* Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology* **80**, 181–7 (2013).
8. Keller, A. *et al.* Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat. Genet.* **45**, 1077–82 (2013).
9. Anheim, M. *et al.* XPR1 mutations are a rare cause of primary familial brain calcification. *J. Neurol.* **263**, 1559–1564 (2016).
10. Yao, X.-P. *et al.* Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification. *Neuron* **98**, 1116–1123.e5 (2018).
11. Yamada, M. *et al.* Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia

- calcification in Japan. *Neurology* **82**, 705–712 (2014).
12. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76 (2006).
 13. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72 (2007).
 14. Nicolas, G. *et al.* A de novo nonsense PDGFB mutation causing idiopathic basal ganglia calcification with laryngeal dystonia. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 1236–8 (2014).
 15. Nicolas, G. *et al.* PDGFB partial deletion: a new, rare mechanism causing brain calcification with leukoencephalopathy. *J. Mol. Neurosci.* **53**, 171–5 (2014).
 16. Hayashi, T., Legati, A., Nishikawa, T. & Coppola, G. First Japanese family with primary familial brain calcification due to a mutation in the PDGFB gene: an exome analysis study. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **69**, 77–83 (2015).
 17. Hammacher, A. *et al.* A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J. Biol. Chem.* **263**, 16493–8 (1988).
 18. Shim, A. H.-R. *et al.* Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11307–12 (2010).
 19. Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **22**, 1276–1312 (2008).
 20. Watson, J. D. *et al.* ワトソン遺伝子の分子生物学 第5版. (東京電機大学出版局, 2006).
 21. Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 89–99 (2004).
 22. Villa-Bellosta, R., Levi, M. & Sorribas, V. Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF- α , and Pi. *Pflügers*

- Arch. - Eur. J. Physiol.* **458**, 1151–1161 (2009).
23. Jensen, N. *et al.* Loss of function of Slc20a2 associated with familial idiopathic basal ganglia calcification in humans causes brain calcifications in mice. *J. Mol. Neurosci.* **51**, 994–999 (2013).
 24. Collins, J. F., Bai, L. & Ghishan, F. K. The SLC20 family of proteins: Dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **447**, 647–652 (2004).
 25. Böttger, P. & Pedersen, L. Mapping of the minimal inorganic phosphate transporting unit of human PiT2 suggests a structure universal to PiT-related proteins from all kingdoms of life. *BMC Biochem.* **12**, 21 (2011).
 26. Wallingford, M. C. *et al.* SLC20A2 deficiency in mice leads to elevated phosphate levels in cerebrospinal fluid and glymphatic pathway-associated arteriolar calcification, and recapitulates human idiopathic basal ganglia calcification. *Brain Pathol.* **27**, 64–76 (2017).
 27. Takeda, E. *et al.* Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 191–200 (2004).
 28. Murer, H., Forster, I. & Biber, J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **447**, 763–767 (2004).
 29. Wagner, C. A., Hernando, N., Forster, I. C. & Biber, J. The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **466**, 139–53 (2014).
 30. Murer, H., Hernando, N., Forster, I. & Biber, J. Proximal Tubular Phosphate Reabsorption: Molecular Mechanisms. *Physiol. Rev.* **80**, 1373–1409 (2000).
 31. Michigami, T. Extracellular phosphate as a signaling molecule. *Contrib. Nephrol.* **180**, 14–24 (2013).

32. Forster, I. C., Hernando, N., Biber, J. & Murer, H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol. Aspects Med.* **34**, 386–95 (2013).
33. Miller, D. G., Edwards, R. H. & Miller, A. D. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 78–82 (1994).
34. Lundorf, M. D., Pedersen, F. S., O’Hara, B. & Pedersen, L. Amphotropic murine leukemia virus entry is determined by specific combinations of residues from receptor loops 2 and 4. *J. Virol.* **73**, 3169–75 (1999).
35. Leverett, B. D., Farrell, K. B., Eiden, M. V & Wilson, C. A. Entry of amphotropic murine leukemia virus is influenced by residues in the putative second extracellular domain of its receptor, Pit2. *J. Virol.* **72**, 4956–61 (1998).
36. Feldman, S. A., Farrell, K. B., Murthy, R. K., Russ, J. L. & Eiden, M. V. Identification of an extracellular domain within the human PiT2 receptor that is required for amphotropic murine leukemia virus binding. *J. Virol.* **78**, 595–602 (2004).
37. Guerreiro, P. M., Bataille, A. M., Parker, S. L. & Renfro, J. L. Active removal of inorganic phosphate from cerebrospinal fluid by the choroid plexus. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **306**, F1275-84 (2014).
38. Reiss, A. B. *et al.* CKD, arterial calcification, atherosclerosis and bone health: Inter-relationships and controversies. *Atherosclerosis* **278**, 49–59 (2018).
39. Kondo, T. *et al.* Modeling Alzheimer’s disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**, 487–96 (2013).
40. Imamura, K. *et al.* The Src / c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaaf3962 (2017).

41. Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H. & Yamanaka, S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J.* **33**, 409–17 (2014).
42. Mochiduki, Y. & Okita, K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol. J.* **7**, 789–797 (2012).
43. Okita, K. *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **8**, 409–412 (2011).
44. Kobayashi, S., Yamadori, I., Miki, H. & Ohmori, M. Idiopathic nonarteriosclerotic cerebral calcification (Fahr's disease): an electron microscopic study. *Acta Neuropathol.* **73**, 62–66 (1987).
45. Tsuchiya, Y. *et al.* A case of idiopathic basal ganglia calcification associated with membranoproliferative glomerulonephritis. *Intern. Med.* **50**, 2351–6 (2011).
46. Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **22**, 1276–1312 (2008).
47. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B–Deficient Mice. *Science (80-.).* **277**, (1997).
48. Soriano, P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* **8**, 1888–96 (1994).
49. Sweeney, M. D., Sagare, A. P. & Zlokovic, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology* (2018). doi:10.1038/nrneurol.2017.188
50. Kisler, K., Nelson, A. R., Montagne, A. & Zlokovic, B. V. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* (2017). doi:10.1038/nrn.2017.48
51. Sweeney, M. D., Ayyadurai, S. & Zlokovic, B. V. Pericytes of the neurovascular unit: key

- functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* **19**, 771–783 (2016).
52. Garbuzova-Davis, S. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: A neurovascular disease. *Brain Res.* **1398**, 113–125 (2011).
 53. Taglia, I., Bonifati, V., Mignarri, A., Dotti, M. T. & Federico, A. Primary familial brain calcification: update on molecular genetics. *Neurol. Sci.* (2015). doi:10.1007/s10072-015-2110-8
 54. White, M. P. *et al.* Limited gene expression variation in human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells* **31**, 92–103 (2013).
 55. Li, Y. *et al.* A novel method to isolate retinal and brain microvessels from individual rats: Microscopic and molecular biological characterization and application in hyperglycemic animals. *Vascul. Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/J.VPH.2018.07.001
 56. Adams, W. J. *et al.* Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports* **1**, 105–13 (2013).
 57. Rufaihah, A. J. *et al.* Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity. *Am. J. Transl. Res.* **5**, 21–35 (2013).
 58. Levenberg, S., Ferreira, L. S., Chen-Konak, L., Kraehenbuehl, T. P. & Langer, R. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* **5**, 1115–26 (2010).
 59. Yang, L. *et al.* Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **453**, 524–8 (2008).
 60. Kondo, T. *et al.* iPSC-Based Compound Screening and In Vitro Trials Identify a Synergistic Anti-amyloid β Combination for Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* **21**, 2304–2312 (2017).
 61. Imamura, K. *et al.* Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD

- patient iPSC-derived neurons. *Sci. Rep.* **6**, 34904 (2016).
62. Murakami, N. *et al.* Proteasome impairment in neural cells derived from HMSN-P patient iPSCs. *Mol. Brain* **10**, 7 (2017).
 63. Kondo, T. *et al.* Modeling Alexander disease with patient iPSCs reveals cellular and molecular pathology of astrocytes. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 69 (2016).
 64. Fujimori, K. *et al.* Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat. Med.* **24**, 1579–1589 (2018).
 65. Hino, K. *et al.* Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J. Clin. Invest.* **127**, 3339–3352 (2017).
 66. Takase, N. *et al.* Neuroprotective effect of 5-aminolevulinic acid against low inorganic phosphate in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Sci. Rep.* **7**, 5768 (2017).
 67. Ma, X.-X. *et al.* PiT2 regulates neuronal outgrowth through interaction with microtubule-associated protein 1B. *Sci. Rep.* **7**, 17850 (2017).
 68. Bon, N. *et al.* Phosphate (Pi)-regulated heterodimerization of the high-affinity sodium-dependent Pitransporters PiT1/Slc20a1 and PiT2/Slc20a2 underlies extracellular Pisensing independently of Piuptake. *J. Biol. Chem.* **293**, 2102–2114 (2018).
 69. Giachelli, C. M. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* **75**, 890–7 (2009).
 70. Lau, W. L., Festing, M. H. & Giachelli, C. M. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb. Haemost.* **104**, 464–70 (2010).
 71. Lanzer, P. *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur. Heart J.* **35**, 1515–25 (2014).

略字一覽

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
CSF	Cerebrospinal fluid
CT	Computed Tomography
DMEM	Eagle's minimal essential medium
ELISA	Enzyme-Linked immuno sorbent assay
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FOP	Fibrodysplasia ossificans progressiva
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration
GFP	Green fluorescent protein
HMSN-P	Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement
iPS細胞	induced pluripotent stem 細胞
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
KSR	Knockout serum replacement
MTG	Monothioglycerol
MYORG	Myogenesis regulating glycosidase
PDGFB	Platelet derived growth factor subunit B
PDGFRB	Platelet derived growth factor receptor beta
Pi	inorganic phosphate
ROS	Reactive oxygen species
SLC20A1	Solute carrier family 20 member 1
SLC20A2	Solute carrier family 20 member 2
SSEA-4	Stage-specific embryonic antigen 4
VE-cadher	Vascular endothelial cadherin
vWF	von Willebrand factor
XPR1	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1
α SMA	alpha Smooth muscle actin