

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19243

研究課題名(和文) Rnf213変異体トランスジェニックマウスによるもやもや病モデル開発

研究課題名(英文) Moyamoya disease mouse model establishment using Rnf213 mutant transgenic mouse

研究代表者

小林 果 (KOBAYASHI, Hatasu)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：70542091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血管内皮特異的Rnf213変異体Tgマウス、Rnf213 KOマウスを用いて1)低酸素下飼育による脳低酸素モデルおよび2)両側総頸動脈狭窄(BCAS)法による脳低灌流モデルを作成し脳血管の評価を行った。その結果血管内皮特異的Rnf213変異体TgマウスではangiogenesisがRnf213 KOマウスではarteriogenesisが障害されることが示唆された。以上より脳低酸素/低灌流モデルがもやもや病のマウスモデル確立に有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a vascular endothelial-specific Rnf213 mutant Tg mouse and Rnf213 KO mice to create 1) cerebral hypoxia models using hypoxic chamber and 2) cerebral hypoperfusion model by bilateral common carotid artery stenosis (BCAS) method and evaluated cerebral blood vessels. As a result, it was suggested that angiogenesis was impaired in the vascular endothelial-specific Rnf213 mutant Tg mouse, while arteriogenesis was impaired in Rnf213 KO mice. These results indicate that the cerebral hypoxia/hypoperfusion model may be useful for establishing a mouse model of Moyamoya disease.

研究分野：予防医学

キーワード：もやもや病 RNF213 ノックアウトマウス トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、頭蓋内内頸動脈終端部の狭窄を本態とする脳血管疾患である。我々はもやもや病の感受性遺伝子として RNF213 遺伝子を同定し、p.R4810K 多型は日中韓のもやもや病患者において非常に強く相関するが (オッズ比 100 倍以上) 浸透率が低い (遺伝子キャリアーの 300 人に 1 人が発症) ことを明らかにし、RNF213 p.R4810K の遺伝素因になんらかのストレス負荷/環境因子が加わることが発症のトリガーになると考えられる

2. 研究の目的

(1) RNF213 R4810K の過剰発現が血管内皮細胞の angiogenesis を低下させることが示されている点から、RNF213 R4810K による angiogenesis 低下を *in vivo* で検討する目的で、血管内皮および平滑筋特異的 RNF213 R4810K 相当変異体トランスジェニック (Tg) マウスの作成と低酸素曝露による脳血管 angiogenesis の評価を行った。

(2) 現在まで *in vivo* 実験により、Rnf213 変異体 (ヒト p.R4810K に相当) 血管内皮特異的トランスジェニック (EC-Mut-Tg) マウスにおける脳低酸素下での angiogenesis 低下、Rnf213 ノックアウト (KO) における総頸動脈結紮下での血管リモデリング変化の抑制が報告されている。本研究では、angiogenesis および血管リモデリングが脳虚血への代償機構として機能する点に着目し、遺伝子改変マウスで脳低灌流モデルを作製して脳血流および脳血管変化を解析することで、RNF213 が脳低灌流応答に果たす役割の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 野生型あるいは p.R4757K (ヒト p.R4810K に相当) を有するマウス Rnf213 と CAG プロモーター配列の間に loxP で挟まれた停止配列が存在するベクターを用いて Tg マウスを作成した後、組織特異的 Cre 発現マウスと交配を行い、血管内皮あるいは平滑筋特異的 RNF213 Tg マウスを作成した。RNF213 R4757K または RNF213 WT を血管内皮特異的に発現する Tg マウス (EC-Mut-Tg および EC-WT-Tg)、RNF213 R4757K を血管平滑筋特異的に発現する Tg マウス (SMC-Mut-Tg)、RNF213 KO マウス (KO) および野生型マウス (WT) の 5 群のマウスを 3 週齢より 2 週間 8% 酸素下で飼育した後、小動物用 MRI による脳血管画像解析を行った。さらに Glut1 免疫組織化学により大脳皮質の脳毛細血管数を計測し、angiogenesis を評価した。

(2) EC-Mut-Tg、KO および WT の 3 群について 8-10 週齢のマウスを実験に用いた。脳低灌流モデルは 0.18 mm コイルを用いた両側総頸動脈狭窄 (BCAS) 法により作成し、術後

28 日間の観察を行った。脳血流測定は術前、7 日後、28 日後の時点で arterial spin-labelling MR イメージングで行い、また T2 強調画像、拡散強調画像、MRA 画像の撮影も行った。イメージング後には屠殺して脳組織標本を作製し、Glut1 免疫染色による脳毛細血管数の評価を行った。統計的検定は、Kaplan-Meier 法による生存解析においてはログランク検定で、その他の項目については one-way ANOVA 後に Tukey 法による post hoc test で行った。

4. 研究成果

(1) MRA イメージングの結果、EC-Mut-Tg、EC-WT-Tg、SMC-Mut-Tg、KO、WT のいずれにおいても低酸素曝露による脳血管狭窄、もやもや血管の形成などの異常は認めなかった。低酸素曝露による脳毛細血管数の変化を評価した結果、EC-Mut-Tg 以外のすべてのマウスで低酸素曝露により脳毛細血管が増加したのに対し、EC-Mut-Tg では変化がなかった (図 1)。この結果は、マウスモデルにおいて、*in vitro* での結果と同様に、RNF213 変異体の血管内皮発現が低酸素による angiogenesis を抑制することを示している。

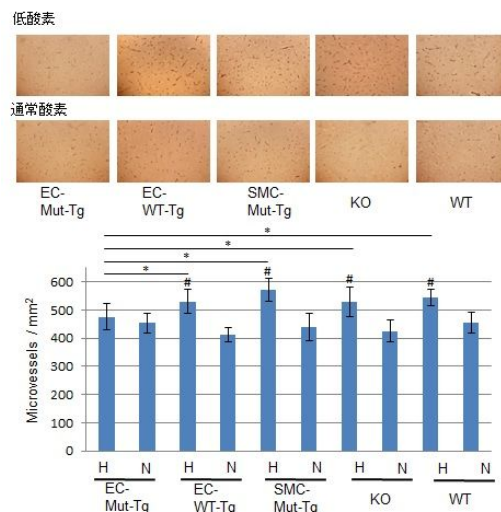


図1 組織特異的Rnf213 Tgマウスにおける低酸素による脳血管angiogenesis。大脳皮質毛細血管のGlut1免疫染色像(上)、毛細血管数の定量化(下)、H:低酸素、N:通常酸素、*P<0.05 vs EC-Mut-Tg低酸素、#P<0.05 vs 通常酸素

(2) BCAS 術後に EC-Mut-Tg (8 匹) および WT (15 匹) マウスではすべてのマウスが観察期間中生存したのに対し、KO マウスでは 8 匹中 3 匹がそれぞれ術後 1、8、11 日に死亡し、Kaplan-Meier 解析により KO と WT マウスの間に有意な差が示された (p=0.033)。さらに術後 11 日で死亡した KO マウスについては術後 7 日で行われた MR イメージングにより脳梗塞が認められた。

BCAS 術前の脳血流量は KO、EC-Mut-Tg、WT マウスの間で差がなかったのに対し、術後 7 日では KO マウスの脳血流量が顕著に減少し、WT マウスおよび EC-Mut-Tg マウスに比べて有意な低下を示した (図 2)。さらに術後 28 日

では WT マウスと比較して KO および EC-Mut-Tg の血流量の回復が十分でなく、有意差が認められた (図2)。MRA による検討では、術後7日の前方循環でのシグナル低下と28日の部分的なシグナル強度の回復を認めましたが、KO、EC-Mut-Tg、WT マウス間での差はなかった。また明確な脳血管狭窄やもやもや血管の形成は観察されなかった。Glut1 免疫染色による脳毛細血管の評価を行った結果、術後28日時点でKOおよびEC-Mut-Tgマウスの脳毛細血管数はWTマウスより有意に低く、angiogenesis の抑制が示された。

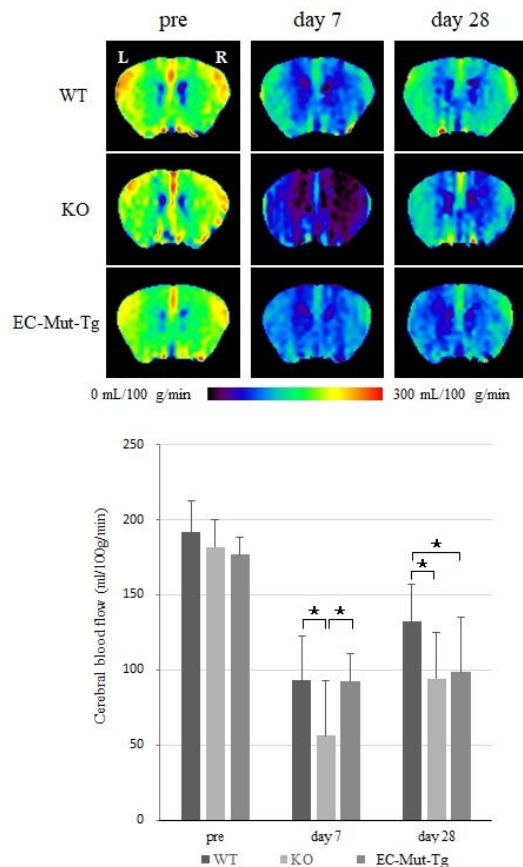


図2: BCAS術後マウスの脳血流量経時変化
(上) KO、EC-Mut-TgおよびWTマウスの代表的な冠状面血流量イメージング画像 (arterial spin-labelling 法)
(下) 大脳皮質領域での血流量定量化データ
* $p < 0.05$ one-way ANOVA with Tukey's post hoc test

本研究により、KO マウスが脳低還流後早期に高度な脳血流低下を示すことが証明され、脳梗塞発生・生存率低下につながると推測される。それに対し、脳低還流後の後期では KO のみならず EC-Mut-Tg マウスにおいても脳血流量の回復が阻害され、これには angiogenesis 抑制が関与すると考えられる。以上より、RNF213 が脳血流の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。脳虚血への代償的応答として、早期には arteriogenesis (側副血管の拡張とリモデリング) が、後期には angiogenesis が主たる役割を果たすことが知られている。したがって、RNF213 欠損は arteriogenesis と angiogenesis に、

RNF213 変異体発現は angiogenesis に影響する可能性がある。

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 9 件)すべて査読あり
Dysregulation of RNF213 promotes cerebral hypoperfusion. Morimoto T, Enmi J, Hattori Y, Iguchi S, Saito S, Harada K, Okuda H, Mineharu Y, Takagi Y, Youssefian S, Iida H, Miyamoto S, Ihara M, Kobayashi H (corresponding author), Koizumi A. *Sci Rep.* 8:3607, 2018 doi: 10.1038/s41598-018-22064-8

RNF213 p.R4810K Variant and Intracranial Arterial Stenosis or Occlusion in Relatives of Patients with Moyamoya Disease. Matsuda Y, Mineharu Y, Kimura M, Takagi Y, Kobayashi H, Hitomi T, Harada KH, Uchihashi Y, Funaki T, Miyamoto S, Koizumi A. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 26(8):1841-1847, 2017. doi: 10.1371/j.jstrokecerebrovasdis.2017.04.019

Significant association of RNF213 p.R4810K, a moyamoya susceptibility variant, with coronary artery disease. Morimoto T, Mineharu Y, Ono K, Nakatochi M, Ichihara S, Kabata R, Takagi Y, Cao Y, Zhao L, Kobayashi H, Harada KH, Takenaka K, Funaki T, Yokota M, Matsubara T, Yamamoto K, Izawa H, Kimura T, Miyamoto S, Koizumi A. *PLOS One.* 12(4):e0175649, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0175649

RNF213 is associated with Intracranial Aneurysms in the French-Canadian population. Sirui Zhou, Amirthagowri Ambalavanan, Daniel Rochefort, Pingxing Xie, Cynthia V. Bourassa, Pascale Hince, Alexandre Dionne-Laporte, Dan Spiegelman, Ziv Gan-Or, Cathy Mirarchi, Vessela Zaharieva, Nicolas Dupre, Hatasu Kobayashi, Toshiaki Hitomi, Kouji Harada, Akio Koizumi, Lan Xiong, Patrick A. Dion, Guy A. Rouleau. *Am J Hum Genet.* 99(5):1072-1085, 2016 doi: 10.1016/j.ajhg.2016.09.001

Significant association of the RNF213 p.R4810K polymorphism with quasi-moyamoya disease. Takaaki

Morimoto, Yohei Mineharu, Hatasu Kobayashi (equally corresponding author), Kouji H. Harada, Takeshi Funaki, Yasushi Takagi, Nobuyuki Sakai, Susumu Miyamoto, Akio Koizumi. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 25(11): 2632-2636, 2016. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.004

RNF213 rare variants in Slovakian and Czech moyamoya disease patients. Hatasu Kobayashi, Miroslav Brozman, Katerina Kyselova, Dasa Vyszlayova, Takaaki Morimoto, Martin Roubec, David Skoloudik, Andrea Petrovicova, Dominik Juskanic, Jozef Strauss, Marian Halaj, Peter Kurray, Marian Hranai, Kouji H Harada, Sumiko Inoue, Yukako Yoshida, Toshiyuki Habu, Roman Herzig, Shohab Youssefian, Akio Koizumi *PLoS ONE.* 11(10): e0164759, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0164759

Frequency of RNF213 p.R4810K, a susceptibility variant for moyamoya disease, and health characteristics of carriers in the Japanese population. Yang Cao, Hatasu Kobayashi, Takaaki Morimoto, Risako Kabata, Kouji H. Harada, Akio Koizumi. *Environ Health Prev Med.* 21(5): 387-390, 2016 doi: 10.1007/s12199-016-0549-8

A new horizon of Moyamoya disease and associated health risks explored through RNF213. Akio Koizumi, Hatasu Kobayashi, Toshiaki Hitomi, Kouji H Harada, Toshiyuki Habu, Shohab Youssefian. *Environ Health Prev Med.* 21(2): 55-70, 2016 doi: 10.1007/s12199-015-0498-7

Biochemical and Functional Characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a Susceptibility Mutation of Moyamoya Disease, in Angiogenesis In Vitro and In Vivo. Hatasu Kobayashi, Yoshiko Matsuda, Toshiaki Hitomi, Hiroko Okuda, Hiroto Shioi, Tetsuya Matsuda, Hirohiko Imai, Masakatsu Sone, Daisuke Taura, Kouji H Harada, Toshiyuki Habu, Yasushi Takagi, Susumu Miyamoto, Akio Koizumi. *J Am Heart Assoc.* 4(7): e002146, 2015 doi: 10.1161/JAHA.115.002146

〔学会発表〕(計 5 件)

mysterin 遺伝子の肺高血圧症患者遺伝子スクリーニングおよびマウスモデルによる解析. 小林果、加畑理咲子、木下秀之、森本貴昭、武田美都里、崔廷米、奥田裕子、原田浩二、Youssefian Shohab、小泉昭夫. 第 88 回日本衛生学会学術総会、2018 年

肺高血圧症患者におけるもやもや病感受性遺伝子 RNF213 の遺伝的スクリーニングおよび機能解析. 小林果. 第 22 回大阪膠原病と肺循環を考えるフォーラム、2018 年

もやもや病感受性遺伝子 RNF213 rare variant の肺高血圧症患者におけるスクリーニングおよびマウスモデルによる機能解析. 小林果、加畑理咲子、木下秀之、森本貴昭、武田美都里、崔廷米、奥田裕子、原田浩二、Shohab Youssefian、小泉昭夫. 分子予防環境医学研究会第 17 回研究大会、2018 年

チェコスロバキアもやもや病患者における mysterin 遺伝子変異の検討. 小林果、森本貴昭、原田浩二、小泉昭夫. 第 87 回日本衛生学会学術総会、2017 年

もやもや病感受性遺伝子 mysterin の ATPase 機能喪失変異が angiogenesis に与える影響. 小林果、人見敏明、奥田裕子、塩井大智、原田浩二、小泉昭夫. 第 86 回日本衛生学会学術総会、2016 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 果 (KOBAYASHI, Hatasu)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：70542091