

令和元年6月21日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16H05437
 研究課題名(和文)血管狭窄因子RNF213の修飾因子特定とそれに基づく疾患モデルと新規治療法の確立

 研究課題名(英文) Identification of modifiers of moyamoya disease causing gene RNF213 and development of in vitro and in vivo models of the disease

 研究代表者
 宮本 享 (Miyamoto, Susumu)

 京都大学・医学研究科・教授

 研究者番号：70239440
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、もやもや病の原因遺伝子として同定したRNF213に着目し、RNF213と関連するゲノムおよびエピゲノム因子の特定、iPS細胞を用いた疾患の再現、動物モデルの確立を目指した。RNF213のR4810K変異を持たない患者で全ゲノムシーケンシングを行い、候補遺伝子を同定した。また、表現型不一致の家族の全ゲノムメチル化解析を行い、疾患と関連するエピゲノム変化を特定した。iPSを用いた内皮、平滑筋への分化の系を確立し、現在は薬剤スクリーニングに適したモデルの完成を目指している。R4810Kのノックインマウスを作成した。エピゲノム要因等を加味して、もやもや病モデル完成を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管疾患は要介護の原因の約3割を占め、超高齢化社会を迎える我が国において重要な疾患である。脳血管疾患の半分は脳梗塞であり、動脈硬化によって生じるアテローム血栓性脳梗塞に関しては研究が進んでいるが、動脈硬化以外に原因でおこる脳血管狭窄については、分子メカニズムに不明な点が多く、新規治療開発の妨げとなってきた。本研究は我が国における代表的な非動脈硬化性脳血管狭窄であるもやもや病の感受性遺伝子として同定されたRNF213の生体内での役割を明らかにし、RNF213以外の遺伝子や環境因子を解明する端緒となる研究で、同疾患の成因の解明や新規治療法の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify genetic and epigenetic factors for moyamoya disease other than RNF213. We also tried to establish in vitro and in vivo models of moyamoya disease using iPS cells and R4810K knock-in mice. Whole genome sequencing in patients with moyamoya disease without the R4810K mutation identified several candidate genes, and whole genome methylation analysis of familial moyamoya disease with discordant phenotypes identified disease associated epigenetic changes. Both endothelial cells and vascular smooth muscle cells were differentiated from patient-derived iPS cells. These cells will be used to make an in vitro model of moyamoya disease for drug screening. We created both knock-out and knock-in (R4810K) mice, which will be used to develop an animal model of moyamoya disease.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳血管障害 もやもや病 RNF213

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は、厚生労働省の介護給付費実態調査によると、要介護の原因となった疾患の内約3割が脳血管疾患であり、特に男性においてはその割合は4割以上と報告されている。閉塞性脳血管障害は、脳卒中の主な原因の一つで、半数以上を占める。閉塞性脳血管障害の病因と病態を解明し、予防法を確立することは、国民の健康増進に大きく寄与する。脳血管疾患の半分以上を占める脳梗塞の主な原因の一つにアテローム血栓性脳梗塞があり、頭蓋内血管の狭窄も重要な一因である。しかし、頸動脈疾患や冠血管の動脈硬化による狭窄と比較して、その分子メカニズムに不明な点が多く、新規治療開発の妨げとなっている。

もやもや病との合併が報告されている肺高血圧症においては、原因となる遺伝子変異 BMPR2 変異に加え、TGF 1 の一塩基多型 (SNP) がその浸透率に影響することが報告されている (Genet Med. 2008;10(5):359-365)。これまでの家系の解析からは、RNF213 遺伝子についても、環境因子以上に一塩基多型 (SNP) が浸透率に及ぼす影響が強いことが推察される。RNF213 遺伝子変異を修飾する因子の特定をすることで、はじめて病態の全容解明が可能となる。

RNF213 単独ではもやもや病の病態を説明できない部分が残されており、RNF213 以外の遺伝要因や環境要因を特定することがもやもや病についてはその他の閉塞性脳血管障害の病態解明にもつながると考えられる。

もやもや病の主たる治療方法は手術であり、小児に多く認められる疾患であることから、非侵襲的な治療方法の開発も求められている。疾患背景を明らかにするとともに、動物モデル作成、in vitro のモデル作成と薬剤スクリーニングにより、新規治療の開発が進められると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、閉塞性脳血管障害の感受性遺伝子のひとつである RNF213 に着目し、その作用を修飾するヒト遺伝子の特定、ヒト凍結血管標本を用いたエピジェネティックメカニズム解明、iPS 細胞による治療候補薬剤スクリーニング、動物モデルの作成を行い、もやもや病および類縁する閉塞性脳血管障害の原因解明、新規治療の開発に繋げることを目標とした。

3. 研究の方法

下記の から の方法を用いて、非動脈硬化性閉塞性脳血管障害の病態解明および治療法の開発を目指した。

遺伝研究：RNF213 R4810K 変異陽性でもやもや病非発症の集団と R4810K 変異陰性でもやもや病を発症している集団を用いた extreme case control analysis を行った。全ゲノムシークエンスを行い、R4810K 変異陰性の集団で共通する変異を特定するとともに、RNF213 の浸透率に影響する遺伝子多型の特定を行った。また、頭蓋外での R4810K 変異の影響をみるため、冠動脈疾患についてケースコントロール解析を行った。

エピゲノム研究：一覽性双生児を含め、同胞、親子で表現型不一致の症例を用いて、全ゲノムメチル化解析を行い (全症例が RNF213 R4810K 変異陽性)、発症者のみに認められるメチル化パターンの解析を行った。

iPS 研究：疾患 iPS 細胞を内皮細胞、血管平滑筋細胞に分化させ、疾患特異的な表現型を検討した。

動物モデル作成：RNF213 ノックアウトマウス以外に、血管内皮特異的 RNF213-R4810K 変異トランスジェニックマウスを作成し、血行力学的ストレスを加えることで起こる変化について検討した。

臨床研究：頭蓋内、頭蓋外の血管狭窄の患者データを用いて、RNF213 と臨床所見の相関を検討し、環境因子との相互作用を明らかにした。

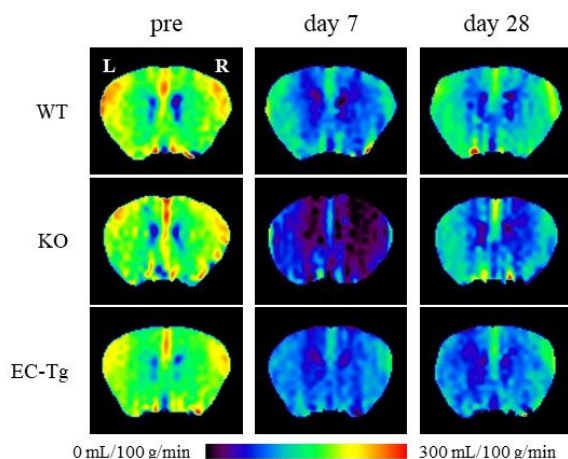
4. 研究成果

RNF213 以外の遺伝因子については、R4810K 変異を持たない患者の一部が共有する遺伝子変異 Y を特定した。現在、同遺伝子変異と疾患との関連について解析を進めている。R4810K の浸透率に影響する遺伝子多型については、候補の絞り込みが困難であったことから、家系を用いた解析を追加して、候補を絞り込む予定である。

エピゲノム解析については、家系内での発症者、非発症者でことなるメチル化のパターンを示す遺伝因子を複数同定した。また、一卵性双生児で表現型が異なるペアについて、全ゲノムでメチル化解析を完了させ、有力な候補遺伝子を同定した。現在、メチル化と発現の関連について確認する実験を進めている。また、疾患の進行に影響するエピゲノム変化についても分析を行っており、今後、ゲノム解析とエピゲノム解析を通じて特定した遺伝因子について、RNF213 との関係を含めて、その機能を詳細に解析することで、もやもや病の全容解明につなげることができると期待される。

iPS 研究については、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞への分化の系を確立した。血管内皮細胞については既に tube formation の障害などの表現型が特定されている。今後は、血管平滑筋細胞において、患者特異的な表現型を特定するとともに、簡便な系を確立して、治療薬スクリーニングを行う予定としている。

動物モデルについては、血管内皮特異的 RNF213-R4810K 変異トランスジェニックマウスにおいて、内頸動脈損傷に対する血管新生が阻害され、虚血耐性が低く、脳梗塞が有意に高確率で発症することを明らかにし、一つのモデルとして確立した (Morimoto et al. Sci Rep, 2018)。



図：野生型 (WT) と比べて、ノックアウト (KO) や内皮細胞特異的なトランスジェニックマウス (EC-Tg) において脳虚血が進行しやすい。

また、RNF213 R4810K 変異と冠動脈疾患との相関解析を行い、オッズ比が 2.9 で有意な相関があることを示した (Morimoto et al. PLoS One 2017) 。RNF213 は頭蓋内のみならず、頭蓋外の血管にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

Variables	Total			Men			Women		
	OR	95%CI	P value	OR	95%CI	P value	OR	95%CI	P value
<i>RNF213</i> dominant model	2.9	1.32-6.35	0.005	4.36	1.47-12.92	0.003	1.39	0.35-5.51	0.643
Age	1.09	1.07-1.16	<0.001	1.07	1.06-1.09	<0.001	1.14	1.11-1.17	<0.001
Sex	1.43	1.04-1.96	0.026	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Obesity	1.49	0.97-2.29	0.064	1.8	1.04-3.12	0.033	1.03	0.49-2.18	0.941
Hypertension	2.15	1.63-2.84	<0.001	2.29	1.6-2.84	<0.001	1.82	1.15-2.88	0.01
Diabetes mellitus	1.81	1.37-2.38	<0.001	1.69	3.27-2.38	0.003	1.84	1.14-2.97	0.011
Dyslipidemia	8.24	5.61-12.11	<0.001	7.56	4.62-12.39	<0.001	10.68	5.62-20.27	<0.001
Smoking	4.12	2.98-5.70	<0.001	3.07	2.18-4.36	<0.001	25.91	8.63-77.8	<0.001

Table：冠動脈疾患と RNF213 R4810K 変異との関連 (多変量解析)

片側もやもや病の進行例の解析により、飲酒が病勢の進行に関連する可能性を示した。今後はこれらの遺伝因子と環境因子を総合的に分析し、in vitro および in vivo の疾患モデルを完成させるべく研究を進めている。モデルを用いて薬剤スクリーニングおよび治療効果の検証を行う予定である。

以上、本研究により、RNF213 以外の候補遺伝子と環境要因を特定することができた。また、iPS を用いた in vitro モデルと遺伝子改変マウス (現在、ノックインマウスが作成できたことから、これらを用いる実験も進めている) の実験系を確立した。今後、候補因子をモデルに反映させることで、よりの確な疾患モデルを作成でき、創薬につながれると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Morimoto, T. et al. Dysregulation of RNF213 promotes cerebral hypoperfusion. *Sci Rep* 8, (2018).
2. Morimoto, T. et al. Significant association of RNF213 p.R4810K, a moyamoya susceptibility variant, with coronary artery disease. *PLoS One* 12, e0175649 (2017).
3. Mineharu, Y., Takagi, Y. & Miyamoto, S. in *Moyamoya Disease Explored Through RNF213* 137-150 (2017).
4. Araki, Y. et al. Rapid contralateral progression of focal cerebral arteriopathy distinguished from RNF213-related moyamoya disease and fibromuscular dysplasia. *Childs Nerv Syst* (2017). doi:10.1007/s00381-017-3451-9
5. Matsuda, Y. et al. RNF213 p.R4810K Variant and Intracranial Arterial Stenosis or Occlusion in Relatives of Patients with Moyamoya Disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26, 1841-1847 (2017).
6. 峰晴陽平、宮本享. 小児もやもや病における RNF213 遺伝子型の特徴. *Mt. Fuji Workshop on CVD* 36:20-22, 2018.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Morimoto T, Mineharu Y, Kobayashi H, Harada KH, Funaki T, Takagi Y, Sakai N, Miyamoto S, Koizumi A., International Stroke Conference 2017, Significant association of the RNF213 p.R4810K polymorphism with quasi-moyamoya disease, 2017/2/23, George R. Brown Convention Center
2. Mineharu Y, Matsuda Y, Takagi Y, Funaki T, Kobayashi H, Hitomi T, Harada K, Morimoto T, Agawa Y, Yoshida K, Koizumi A, Miyamoto S. Significance of RNF213 for the diagnosis of moyamoya disease and related disorders. *脳神経外科学会総会*. 2017.10.12. 名古屋
3. 峰晴陽平、峰晴陽平、高木康志、舟木健史、小林果、人見敏明、原田浩二、森本貴昭、阿河祐二、吉田和道、宮本享、小泉昭夫. 小児もやもや病における RNF213 遺伝子型の特徴. *Mt. Fuji Workshop on CVD*. 2017.8.26. 大阪
4. 峰晴陽平. 脳動脈瘤の遺伝子解析は血管障害の臨床と研究に如何に貢献するか. 第 49 回日本動脈硬化学会学術集会. 2017.7.6. グランドプリンスホテル広島
5. Yohei Mineharu. From moyamoya disease to coronary artery disease, *Kyoto University Thoracic Surgery Conference, Kyoto*, 2017.3.10.
6. 森本貴昭, 峰晴陽平, 尾野亘, 中枋昌弘, 市原佐保子, 加畑理咲子, 高木康志, 小林果, 原田浩二, 竹中勝信, 舟木健史, 木村剛, 小泉昭夫, 宮本享, 第 43 回日本脳卒中学会総会, もやもや病感受性遺伝子 RNF213 と冠動脈疾患との関連, 2018/3/15, 福岡国際会議場
7. 森本貴昭, 峰晴陽平, 尾野亘, 中枋昌弘, 市原佐保子, 加畑理咲子, 高木康志, 小林果, 原田浩二, 竹中勝信, 舟木健史, 木村剛, 小泉昭夫, 宮本享, 第 76 回日本脳神経外科学会学術総会, もやもや病感受性遺伝子 RNF213 と冠動脈疾患との関連, 2017/10/13, 名古屋国際会議場
8. 阿河祐二, 峰晴陽平, 森本貴昭, 舟木健史, 高木康志, 原田浩二, 人見敏明, 小林果, 小泉昭夫, 坂井信幸, 宮本享: 頸動脈管径と RNF213 遺伝子多型によるもやもや病と中大脳動脈閉塞の鑑別. 第 76 回日本脳神経外科学会学術総会, 名古屋, 2017.10.13

〔図書〕(計 1 件)

Moyamoya Disease Explored Through RNF213: Genetics, Molecular Pathology, and Clinical Sciences. Springer 2017, Chapter 11, p137-150. "Significance of RNF213 in Clinical Management in Japan." Mineharu Y, Takagi Y and Miyamoto S.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 小泉昭夫

ローマ字氏名: (KOIZUMI, Akio)

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 大学院医学研究科 環境衛生学分野

職名: 名誉教授

研究者番号(8桁): 50124574

研究分担者氏名: 高橋淳

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, jun)

所属研究機関名：京都大学

部局名：iPS 研究所

職名：教授

研究者番号(8桁): 10270779

研究分担者氏名：高木康志

ローマ字氏名：(TAKAGI, yasushi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：脳神経外科学

職名：教授

研究者番号(8桁): 40312227

研究分担者氏名：峰晴陽平

ローマ字氏名：(MINEHARU, yohei)

所属研究機関名：京都大学

部局名：脳神経外科学

職名：助教

研究者番号(8桁): 50716602

(2)研究協力者

研究協力者氏名：片岡大治

ローマ字氏名：(KATAOKA, hiroharu)

研究協力者氏名：舟木健史

ローマ字氏名：(FUNAKI, takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。