

令和 2 年 2 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10740

研究課題名(和文) RNF213遺伝子変異陰性もやもや病患者における新規感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel susceptibility genes associated with moyamoya disease without pathogenic variants in RNF213

研究代表者

赤川 浩之 (Akagawa, Hiroyuki)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60398807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本人もやもや病患者の大多数の感受性遺伝子であるRNF213が特定されて以降、この遺伝子と病態との関わりについて多くの研究報告がなされてきたが、未だそのメカニズムは解明されていない。一方で、このRNF213遺伝子に感受性バリエーションを持たない患者においても家族性発症が認められたり、幼児期発症で重篤な経過をたどる例が観察され、他の感受性遺伝子が存在することは明らかである。そこで本課題では、RNF213遺伝子変異陰性の患者に特に注目し、新規感受性遺伝子の探索を行った。その結果、有望な感受性遺伝子CCER2などの特定に至り、今後、病態の解明や新たな治療法開発への応用も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

もやもや病は世界的にみても本邦に最も患者が多い。有病率は人口10万人に対して3～10人の比較的稀な疾患ではあるが、近年の研究では一見して生活習慣病による脳血管狭窄であっても遺伝学的な要因が共通なものも存在することが明らかになってきた。このような遺伝学的要因は複数存在するが、これらを特定できれば新たな診断法や治療法の開発に応用することができ、近年社会的な注目度が高まっている脳卒中の医療において大きな貢献となることが期待される。本課題ではその一端を特定するに至った。

研究成果の概要(英文)：The etiology of Moyamoya disease (MMD) is still largely unclear, despite identification of RNF213 as the most significant susceptibility gene in Japanese patients. Following up our previous study confirming genetic heterogeneity in Japanese patients with MMD, we extensively surveyed novel candidate genes for a new perspective on the etiology of this disease. Next-generation sequencing and following rare-variant association analysis identified CCER2 as a novel susceptibility gene to MMD. Although CCER2 molecular function is not well characterized, it is a secretory protein expressed in the brain; therefore, it constitutes a potential biomarker of MMD.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：もやもや病 感受性遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は両側内頸動脈の進行性狭窄とそれに伴う異常血管増生により、脳梗塞・脳出血やてんかんを引き起こす難治性疾患である。世界的に見ると東アジア人に多く、本邦での罹患率は人口 10 万人当たり 3.16-10.5 人と報告されている。家族歴陽性例が 10~15%にみられ、同胞に罹患者がいると疾患発生頻度が通常より約 40 倍高くなる。このような高い遺伝的背景を受け、近年、染色体 17q25.3 に感受性遺伝子 *RNF213* が同定された(Liu W, et al. *PLoS One*. 6(7);2011, Kamada F, et al. *J Hum Genet*. 56(1);2011)。特に日本人患者では、創始者変異 p.R4810K (c.14429G>A, rs112735431)が 7 割以上で陽性となる。我々の先行研究(患者 104 例、対照 95 例)と本邦の他施設研究とのメタ解析では、オッズ比 217.0 ($P=2.71 \times 10^{-104}$)と、非常に高い効果サイズで強固な関連を示す。さらに、*RNF213* 遺伝子全体で詳細に検討を行った結果、p.R4810K とは別の機能的レアバリエーションもまた疾患と有意に関連していた(permutation $P_{min}=0.045$)。一方で、*RNF213* バリエーションでは疾患感受性が説明できない日本人患者がおよそ 2 割存在することも明らかにした[Moteki Y, et al. *JAHA*. 4(5);2015]。これらの中にも家族性発症例があり、新規感受性遺伝子の存在(座位異質性)を示唆した。感受性遺伝子 *RNF213* 特定以降、病態理解が進み新たな治療法開発への応用も期待されたが、*RNF213* 遺伝子の機能自体が未だ解明されておらず、病態理解のための新たな視点、すなわち新規感受性遺伝子の特定が必要な状況となっていた。

2. 研究の目的

RNF213 遺伝子変異陰性の患者、その中でも特に家族性患者に注目し、*RNF213* 遺伝子とは別の新規感受性遺伝子の特定を目的とする。

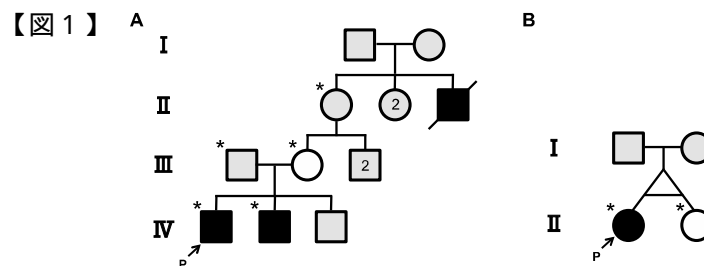
3. 研究の方法

もやもや病、さらにはその近縁疾患患者に対し、次世代シーケンサーによる *RNF213* 遺伝子のターゲット・リシーケンシングを行い、*RNF213* 遺伝子変異陰性の患者を抽出する。抽出された *RNF213* 遺伝子変異陰性の患者に対し、全エクソーム・シーケンシングによる網羅的な遺伝子変異の抽出を行い、これをもとに新規感受性遺伝子を特定する。

4. 研究成果

(1) 新規感受性遺伝子 *CCER2* の同定

先行研究[Moteki Y, et al. *JAHA*. 4(5);2015]にて実施した *RNF213* 遺伝子のターゲット・リシーケンシングにより、同遺伝子に感受性バリエーションを有しないもやもや病患者が 25 例特定された。そのうち発症年齢が 6 歳以下の小児例が 3 例あり、うち 2 例が特徴的な家族歴を呈し家系サンプルも採取できた。一方の家系は家系内に明らかな罹患者を 3 例有し(家系 A、図 1A)、もう一方は一卵性双生児のうち一方のみもやもや病を発症した家系である(家系 B、図 1B)。



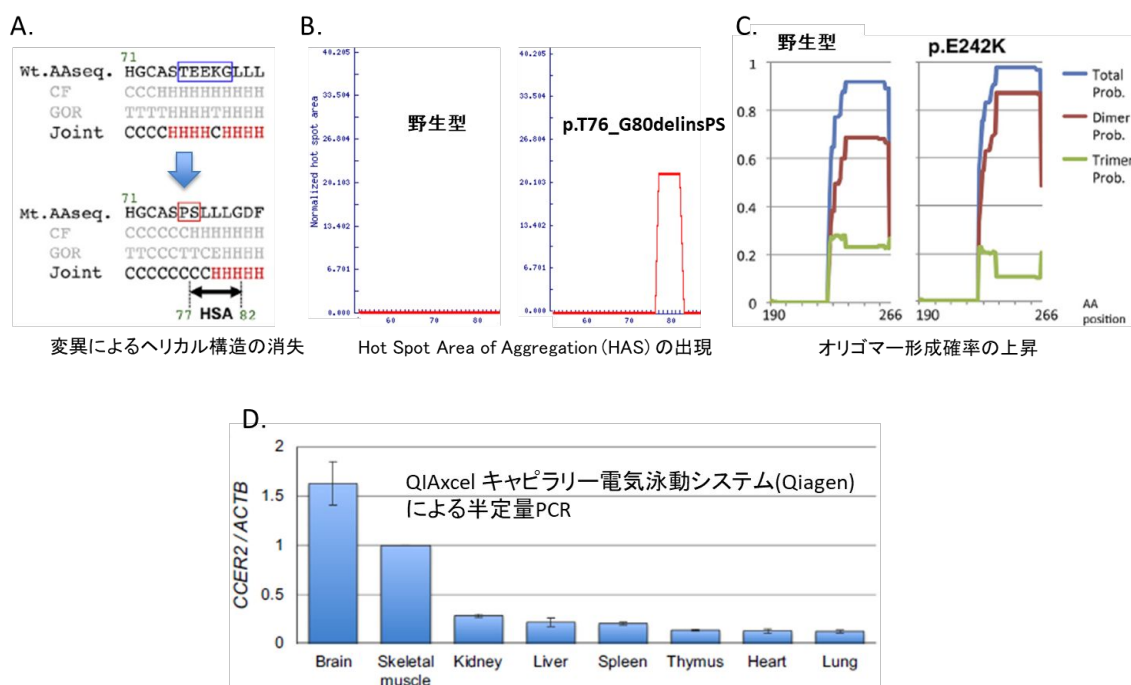
この 2 家系を対象に新規感受性遺伝子を特定すべく、*のついた家系メンバー計 7 例について全エクソーム・シーケンシングを実施した。特に家系 B については、本来同一であるはずの双生児ゲノムに不一致の変異があれば、疾患変異として相当に有望と考えられるため、留意してデータ解析を行った。しかし、残念ながら罹患双生児特有の変異は検出されなかった。家系 A の家系図からもわかるように、もやもや病家系ではしばしば不完全浸透が観察され、本邦の先行疫学研究においても、もやもや病に関して表現系不一致の一卵性双生児の存在が報告されている。もやもや病が多因子疾患であることを支持する結果であると考えられ、非罹患双生児にも変異が検出されうることを許容して以降の解析を行った。

家系 A では -1 と -2 を不完全浸透の保因者、-1 を家系内対照として検出変異のフィルタリングを行った。罹患者および保因者で共有され、一般人口におけるマイナーアレル頻度が 1%未満の変異は 49 個あった。このうち、変異の機能障害度予測ツールである CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/>) の障害度スコアが 10 点以上かつ PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) の判定が“病的”となったものは、*CCER2* 遺伝子 p.T76_G80del insPS 変異および *PER1* 遺伝子 p.H422Q 変異の 2 個であった。このうち前者の *CCER2* 遺伝子では家系 B 双生児からも同様の基準で病的とされる p.E242K 変異が検出され、有望な候補遺伝子と考えられた。

この *CCER2* 遺伝子によりコードされる coiled-coil glutamate-rich protein 2 は、アミノ酸配列解析によれば N 末端にシグナルペプチドを持つ分泌蛋白であり、C 末端のコイルドコイル

ドメインを介してオリゴマーを形成する。家系 A の p.T76_G80del insPS 変異は、この部位のヘリックス構造を消失させ (Chou-Fasman 法・Garnier-Osguthorpe-Robson 法、図 2A)、タンパクの異常凝集スポットを形成する (AGGRESCAN、<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>、図 2B)。一方、双生児家系 B の p.E242K 変異は C 末端のコイルドコイルドメインを介したオリゴマー形成確率を上昇させ (Multicoil、<http://cb.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>、図 2C)、ひいては家系 A の変異と同様、タンパク凝集の促進に働くことが想定される。ヒト胎児の多組織 cDNA パネル (クロンテック社) を用いて *CCER2* 遺伝子の臓器発現をみたところ、この遺伝子は胎児脳に最も高発現していることがわかった (図 2D)。以上のことから、脳脊髄液中に分泌された *CCER2* 分子が変異により異常凝集し、もやもや病の病態主座位である脳槽内ウイルス輸血管に作用することにより進行性の狭窄を惹起するという、従来想定されていなかった新たな病態機序の存在が示唆された。

【図 2】



CCER2 遺伝子の関連をさら検証するため、135 例のもやもや病患者および 199 例の非もやもや病対照において *CCER2* 遺伝子の全コーディング領域のリシーケンシングを追加した。その結果、さらに患者 3 例から機能障害性変異が検出された。もう 1 例の p.T76_G80del insPS 変異と、新たな p.H218_H220del 変異および p.E229del 変異である。非もやもや病対照からはこのような病的変異 (CADD>10 かつ PROVEAN で病的) は検出されず統計学的に有意な関連を示した (患者 5/137 vs. 対照 0/199, Fisher exact P=0.011)。

もやもや病の主たる病態は内頸動脈終末部の進行性狭窄であるため、これまで血管内腔の増殖性変化に関わる分子機序が最も注目されて研究の対象となってきた。しかし、本課題で得られた知見により脳槽側からの刺激も病態に寄与する可能性が示唆された。近年、脳動脈瘤や腹部大動脈瘤の発生において血管外膜側での炎症性変化も重要な役割を果たしていることが明らかにされていることから (Aoki T, et al. Sci Signal. 2017 など)、今回見出された *CCER2* 分子についても病態解明や治療のための有望な新規脳脊髄液バイオマーカーとなる可能性が期待される。

(2)新規 *RNF213* 感受性バリエーションのカタログ化

本課題の期間にわたり、*RNF213* 遺伝子変異が陰性の患者を特定するために、*RNF213* 遺伝子のターゲット・リシーケンシングを継続して行ってきた。課題初期にはダイレクトシーケンス法にて行っていたが、より精度と効率の高い小型次世代シーケンサー IonPGM (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社) を用いる方法に切り替えて実施してきた。日本人患者ではおよそ 8 割の大多数が創始者バリエーション p.R4810K を有するが、本課題での *RNF213* 遺伝子のターゲット・リシーケンシングにより、この創始者変異とは別の新しい病的バリエーションをいくつか発見することができ論文報告した (p.E996K、p.S3986N、p.H4058P、p.R4062Q など)。このうち、p.R4062Q については、これまでの我々のサンプルの解析で 3 例の日本人患者および 1 例のヨーロッパ人患者から検出されており、p.R4810K に次いで多い病的バリエーションである。また、p.S3986N のように p.R4810K と複合ヘテロ接合を呈する希少な遺伝子型も存在した。このように 1 個体が 2 種類のバリエーションを有する場合、複合ヘテロなのか同一のアレルに存在しているのか相を決定するためには通常、両親の DNA サンプルが必要となる。しかし、それがかなわな

い場合には、ロングレンジ PCR 産物をクローニングする方法と周辺の SNP 遺伝子型を利用したハプロタイプ・インピュテーション法を組み合わせることにより、高精度に相の決定をおこなうことが可能である。

(3)他の候補遺伝子の探索

CCER2 遺伝子の特定後も、RNF213 遺伝子および CCER2 遺伝子のターゲット・リシーケンシングは継続して実施した。その結果、RNF213 遺伝子変異が陰性であるからといって CCER 遺伝子異常が高頻度に見つかるわけではなく、RNF213 遺伝子変異陰性の患者では高度の座位異質性が存在することが明らかになった。そこで、RNF213 遺伝子の寄与が少ないとされるヨーロッパ人サンプルにも対象を広げ、全エクソーム・シーケンシングによるさらに新たな感受性遺伝子の探索も継続した。遺伝的背景がより高いと想定される小児例に注目して解析例を積み重ねていったところ、第2のもやもや病遺伝子座として知られる ACTA2 遺伝子から既報の変異陽性例が1例検出された (ACTA2: c.536G>A; p.R179H)。ACTA2 遺伝子は、血管平滑筋のアクチンをコードする遺伝子であり、もやもや病のほか胸部大動脈瘤や解離も呈する家系において疾患遺伝子として特定された遺伝子である。家族性胸部大動脈瘤の疾患遺伝子として、これまで ACTA2 遺伝子の他、代表的な FBN1 遺伝子などいくつかが同定されているが、これらの遺伝子に異常をもつ RNF213 遺伝子変異陰性のもやもや病患者が複数例検出されている。有望な候補遺伝子群と考えられ、さらなる検討を継続しているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Nomura S, Aihara Y, **Akagawa H**, Chiba K, Yamaguchi K, Kawashima A, Okada Y, Kawamata T. Can Moyamoya Disease Susceptibility Gene Affect Extracranial Systemic Artery Stenosis? J Stroke Cerebrovasc Dis. 2020 Feb;29(2):104532. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104532.
2. Nomura Shunsuke, Yamaguchi Koji, **Akagawa Hiroyuki**, Kawashima Akitsugu, Moteki Yosuke, Ishikawa Tatsuya, Aihara Yasuo, Saito Taiichi, Okada Yoshikazu, Kawamata Takakazu. Genotype-Phenotype Correlation in Long-Term Cohort of Japanese Patients with Moyamoya Disease. Cerebrovasc Dis. 2019 Apr 4:1-7. doi: 10.1159/000499699.
3. Nomura Shunsuke, **Akagawa Hiroyuki**, Yamaguchi Koji, Ishikawa Tatsuya, Kawashima Akitsugu, **Kasuya Hidetoshi**, Mukawa Maki, Nariai Tadashi, Maehara Taketoshi, Okada Yoshikazu, Kawamata Takakazu. Rare and low-frequency variants in RNF213 confer susceptibility to moyamoya syndrome associated with hyperthyroidism. World Neurosurg. 2019 Mar 25. doi: 10.1016/j.wneu.2019.03.172.
4. Nomura Shunsuke, Kawashima Akitsugu, **Akagawa Hiroyuki**, Kawamata Takakazu. Letter to the Editor. Influence of rare RNF213 variants other than p.R4810K on the clinical outcomes of moyamoya disease. J Neurosurg. 2018 Aug;129(2):563-565. doi: 10.3171/2018.1.JNS173211.
5. **Akagawa H**, Mukawa M, Nariai T, Nomura S, Aihara Y, Kawamata T, **Onda H**, **Yoneyama T**, Kudo T, Sumita K, Maehara T, Kawamata T, **Kasuya H**. Novel and recurrent RNF213 variants in Japanese pediatric patients with moyamoya disease. Hum Genome Var. 2018 Jan 25;5:17060. doi: 10.1038/hgv.2017.60.
6. Mukawa M, Nariai T, Onda H, Yoneyama T, Aihara H, Hirota K, Kubo T, Sumita K, Maehara T, Kawamata T, Kawamata T, **Kasuya H**, **Akagawa H**. Exome sequencing identified CCER2 as a novel candidate gene for Moyamoya disease. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2017 Jan;26(1):150-161. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.003.

[学会発表](計 5 件)

1. **赤川浩之**, 野村俊介, Boris Kirschek, 武川麻紀, 前原健寿, 成相直, **糟谷英俊**, 川俣貴一: もやもや病・もやもや症候群の遺伝子解析. Stroke2019 第 44 回日本脳卒中学会学術総会 (シンポジウム、2019 年 3 月、横浜)
2. **赤川浩之**, 野村俊介, Boris Kirschek, 武川麻紀, 前原健寿, 成相直, **糟谷英俊**, 川俣貴一: もやもや病の病態と治療: 感受性遺伝子解析の観点から. 第 77 回日本脳神経外科学会学術総会 (シンポジウム、2018 年 10 月、仙台)
3. **Hiroyuki Akagawa**: Exome sequencing identified CCER2 as a novel candidate gene for Moyamoya disease. 5th International Moyamoya Meeting (IMM2018) (シンポジウム、2018 年 7 月、ソウル)
4. **Hiroyuki Akagawa**: Genetics of Moyamoya disease. Vth International Neurosurgical Conference on Moyamoya Disease (招待講演、2017 年 9 月、中国・煙台市)
5. **赤川浩之**, **恩田英明**, **米山琢**, 藍原康雄, Boris Kirschek, 武川麻紀, 成相直, 前原健寿, 川俣貴一, **糟谷英俊**: もやもや病の病態に迫る: 新規感受性遺伝子の探索. Stroke2016 第 41 回日本脳卒中学会学術総会 (シンポジウム、2016 年 4 月、札幌)

〔図書〕(計 1 件)

赤川浩之:【日常診療でよく目にする脳外科疾患(II)】脳神経外科領域の遺伝子診断. 医学と薬学. (株)自然科学社. 2018年. ISSN: 0389-3898

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 糟谷 英俊

ローマ字氏名: Hidetoshi Kasuya

所属研究機関名: 東京女子医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50169455

研究分担者氏名: 恩田 英明

ローマ字氏名: Hideaki Onda

所属研究機関名: 東京女子医科大学

部局名: 医学部

職名: 非常勤講師

研究者番号(8桁): 60185692

研究分担者氏名: 米山 琢

ローマ字氏名: Taku Yoneyama

所属研究機関名: 東京女子医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 90318105

(2)研究協力者

研究分担者氏名: 成相 直

ローマ字氏名: Tadashi Nariai

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。