

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16629

研究課題名(和文) 遺伝子変異型の複合的解析による激症型もやもや病発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of fulminant Moyamoya disease by multiple analysis of gene mutations.

研究代表者

武川 麻紀(MUKAWA, MAKI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90463918

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)：小児もやもや病患者72例を対象としてp.R4810K多型の遺伝子型を同定した。もやもや病患者全体ではヘテロ接合体(AG型)が多いが、予後不良の劇症型もやもや病では野生型(GG型)が多かった。さらに、劇症型もやもや病患者6例に対して、全エクソーム解析を行った結果、病的意義の高い新規変異p.H4058Pを1例で検出した。複数の劇症型もやもや病に共通する新規変異は今のところ検出されていないが、全エクソーム解析によって得られた遺伝子情報は莫大で、情報処理に多くの時間を要するため、今後も継続してデータ解析を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、劇症型もやもや病の発病にp.R4810K多型以外の要因が関与している可能性や、全エクソームに解析範囲を広げることで新規の病的変異が検出される可能性が示された。そのため、もやもや病の病因研究において、本多型に限った遺伝学的検討では不十分であると考えられ、解析範囲を広げた新規候補遺伝子や候補変異の探索が不可欠であると言える。また、社会的には、本多型をもやもや病のスクリーニング検査に安易に用いることの危険性が懸念される。

研究成果の概要(英文)：p.R4810K genotypes was identified on 72 patients of pediatric Moyamoya disease. Although most cases of general Moyamoya disease were heterozygote (AG) of p.R4810K, fulminant cases were statistically related to wild type (GG). Whole-exome sequencing was conducted for the 6 fulminant cases. As the result, an unreported functional polymorphism, p.H4058P, was detected in one case. Otherwise, any new polymorphism was not yet found common to multiple fulminant cases. Whole-exome sequencing yielded enormous gene information. As it needs a long time to process the huge information, the genetic analysis should be continued furthermore.

研究分野：脳神経外科

キーワード：劇症型もやもや病 RNF213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、脳ウィリス動脈輪の進行性狭窄とそれに伴う異常血管網増生により、小児や若年成人において脳梗塞や脳内出血を引き起こす難病である。

病因はいまだ不明であるが、2011年に疾患感受性遺伝子として RNF213 遺伝子が同定され、同遺伝子の p.R4810K 多型が東アジア人患者の大多数で検出されることが明らかとなった。一方で、本多型陰性のもやもや病患者も 8-20%存在することが明らかとなり、複数の要因が発病に関与していると考えられている。

臨床においては、小児重症例の治療が大きな課題として残っている。小児もやもや病は、適切な外科的治療を行うことで、8割程度は良好な社会生活を送ることができるが、乳幼児期に脳梗塞で発症して急速に病状が悪化する劇症例が一部に存在する。このような劇症例は、内科的治療や外科的治療を駆使しても知能発達障害を残すことが多く、小児もやもや病治療の大きな問題点となっている。

我々の施設では、750人以上のもやもや病患者に対して診療経験があるが、そのなかで p.R4810K 多型陰性患者に劇症例が多い印象を持った。このことから、p.R4810K 多型以外の要因が劇症型もやもや病の発生に寄与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

そこで我々は、劇症型もやもや病の遺伝学的特徴を明らかにすることで、遺伝子検査による劇症型もやもや病を早期に予見する手法の構築を目指した。

本研究では、劇症型もやもや病患者に対し、p.R4810K 多型の解析に留まらず、既知の候補変異に対するターゲットリシーケンスや、より解析範囲を広げた全エクソーム解析を行うことで、p.R4810K 多型以外の劇症型もやもや病に特有の遺伝子変異を探索した。

3. 研究の方法

(1) 試料採取

研究対象は東京医科歯科大学に蓄積された750人を超える膨大なもやもや病患者データベースに登録されているもやもや病患者、および共同研究施設である東京女子医科大学で診療にあたっているもやもや病患者とした。末梢血5~7mlあるいは口腔粘膜擦過試料を採取し、抽出したゲノムDNAサンプルを収集した。試料採取およびDNA抽出は、原則申請者施設および東京女子医科大学で行った。遠方に在住する患者に対しては、我々が出向いて採血を行った。

(2) 臨床情報の収集

臨床情報(発症時年齢、発症形式、後方循環病変、知能発達障害、脳卒中再発の有無)は、診療録から収集した。申請者の施設では、すでに750人以上の患者が登録されたデータベースが設立されており、臨床経過や病態に関するデータは多く蓄積されている。これに最新の患者情報を補足した。

(3) RNF213 遺伝子 R4810K 多型の genotyping と、臨床像との関連解析

Direct sequence 法を用いて PCR および DNA 解析をおこなって R4810K 多型の genotyping を行った。DNA 解析は本学難治疾患研究所ゲノム解析室に依頼した。得られた R4810K 遺伝子型と臨床像の関連を統計学的に解析した。

(4) 劇症型もやもや病特有の遺伝子変異の探索

劇症型もやもや病患者に対して、全エクソーム解析を行った。また、先行研究により、R4810K 以外にもやもや病発病と関連する可能性が示された新規候補変異5つ(R3020L, T3316I, R4062Q, R4927Q, E4750K)、候補遺伝子変異1つ(CCER2 遺伝子)に関しても、ターゲットリシーケンスを行ない、激症型患者に特有の遺伝子型を探索した。

4. 研究成果

(1) p.R4810K 遺伝子型と劇症型もやもや病との関連解析

遺伝子解析の同意が得られた日本人もやもや病患者114例のうち、動脈硬化性病変との鑑別がしばしば困難となる成人例42例を除き、18歳以下発症の小児例72例を本研究の対象として、p.R4810K 多型の genotyping を行った。

《劇症型もやもや病6例》

Case	性別	発症時年齢	症状	家族発症	知能発達障害	p.R4810K 遺伝子型
1	男	0	梗塞	-	+	GG
2	男	0	梗塞	-	+	GG
3	男	1	梗塞	-	+	GG
4	男	1	梗塞	+	+	AG
5	女	2	梗塞	-	+	GG
6	男	3	梗塞	+	+	AG

72 例の p.R4810K 遺伝子型は、GG 型は 13 例 (18.1%)、AG 型は 53 例 (73.6%)、AA 型は 6 例 (8.3%) であった (表参照)。このうち、4 歳未満で梗塞発症し、知能発達障害を残した劇症例は、全体 72 例中 6 例 (8.3%) で、GG 型 13 例中 4 例 (30.8%)、AG 型 53 例中 2 例 (3.8%)、AA 型 6 例中 0 例 (0%) であった。統計学的にも、劇症型もやもや病で GG 型が多いことが示された。

(2) 成人もやもや病の遺伝学的特徴

成人例 42 例においては、p.R4810K 遺伝子型は、GG 型は 7 例、AG 型は 35 例、AA 型は 0 例であった。類もやもや病と片側もやもや病を除く真性もやもや病 27 例は全例 AG 型であった。これは、小児例では GG 型真性もやもや病も 11 例と多く存在し、p.R4810K 多型以外の発病要因が考えられるのに対し、成人例では p.R4810K 多型の影響が大きい可能性が考えられた。また他には、GG 型は重症例が多いため成人に達する前に発症している一方で、AG 型には成人期まで発症しない軽症例が多く含まれている可能性も考えられた。

(3) 劇症型もやもや病特有の遺伝子変異の探索

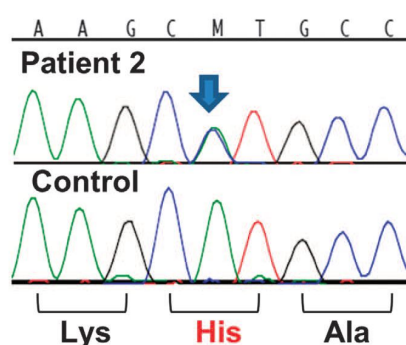
前途の劇症型もやもや病患者 6 例に対しては、全エクソーム解析を行って共通する有望な遺伝子変異を探索した。

病的意義の高い変異で、劇症型もやもや病に共通するものは今のところ検出されていないが、Case 3 で新規の病的遺伝子変異を検出した。

Case 3 は典型的な乳幼児重症例で、既知の p.R4810K 多型は陰性の GG 型であったが、RNF213 遺伝子内の p.H4058P 変異をヘテロ接合型で有していた (右図)。p.H4058P 変異は、複数の評価法によってタンパク構造変化における障害度が高いと判定され、もやもや病の発病に關与する可能性が示唆された。この結果に関しては、Human Genome Variation にて報告した。

また、もやもや病発病に關与する可能性のある RNF213 遺伝子内の他の候補変異および候補遺伝子 CCER2 に関しても、ターゲットリシーケンスを順次行っているが、劇症型もやもや病患者で多く発現がみられる変異は現時点では確認できていない。

《p.H4058P 変異》



(4) 今後の展望

本研究によって、劇症型もやもや病の発病には p.R4810K 多型以外の要因が關与している可能性が示されたが、変異および遺伝子の特定には至っていない。全エクソーム解析によって得られた遺伝子情報は莫大であり、情報処理に多くの時間を要するため、今後も継続してデータ解析を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

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 Neurosurgery, 査読有、2019 年

DOI : 10.1016/j.wneu.2019.03.172

Akagawa Hiroyuki, Mukawa Maki, Nariai Tadashi, Nomura Shunsuke, Aihara Yasuo, Onda Hideaki, Yoneyama Taku, Kudo Takumi, Sumita Kazutaka, Maehara Taketoshi, Kawamata Takakazu, Kasuya Hidetoshi. Novel and recurrent RNF213 variants in Japanese pediatric patients with moyamoya disease. Human Genome Variation, 査読有、2018 年 5 巻 17060 ~ 17060

DOI : 10.1038/hgv.2017.60

〔学会発表〕(計 2 件)

成相 直, 武川 麻紀, 玉田 なつみ, 前原 健寿, 糟谷 英俊, 赤川 浩之, 小児期および成人期発症もやもや病の RNF213 p.R4810K 変異と病態との関連性の検討、2018 年第 77 回日本脳神経外科学会学術総会 シンポジウム もやもや病の病態と治療

武川麻紀, 成相直, 玉田なつみ, 工藤琢巳, 稲次基希, 田中洋次, 小林大輔, 赤川浩之, 糟谷英俊, 前原健寿, 小児もやもや病における遺伝子型による臨床像と脳血管病理像の検討、第 36 回 The Mt. Fuji Workshop on CVD

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：成相 直
ローマ字氏名：NARIAI, Tadashi
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：00228090

(2)研究協力者

研究協力者氏名：赤川 浩之
ローマ字氏名：AKAGAWA, Hiroyuki

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。