

令和 5 年 2 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08953

研究課題名(和文) 脳動脈瘤における血管疾患感受性遺伝子RNF213のレアバリエント関連解析

研究課題名(英文) Analysis of rare variants in RNF213 in patients of cerebral aneurysm

研究代表者

糟谷 英俊 (Kasuya, Hidetoshi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50169455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNF213遺伝子は、もやもや病をはじめとした種々の血管疾患と関連していることが報告されてきた。近年、この遺伝子のレアバリエントは脳動脈瘤とも関連していることが報告された。我々は、165の家族性脳動脈瘤患者のRNF213遺伝子のすべての68のexonのシーケンスをIon Torrent sequencingを用いて行ったところ、35のrare variantを見出した。一方、199のコントロールでは、20のvariantを見るのみであった(p=0.003)。以上から、RNF213の機能喪失型変異は脳動脈瘤感受性遺伝子の可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNF213遺伝子はもやもや病の感受性遺伝子として特定されている。コードされる分子は、未だその機能が不明な点が多いながらも、蛋白のユビキチン化機能とATP分解機能を有する珍しい型の蛋白であり、血管形成に大きく関与することが報告されている。これを受け、収縮機高血圧や冠動脈疾患、動脈硬化性脳血管狭窄においても研究され、そのいずれにおいても有意な関連が報告されている。そして、最近、このRNF213遺伝子との関連が明らかにされたのが脳動脈瘤であった。我々は、もやもや病とは異なるRNF213の機能喪失型変異が脳動脈瘤感受性遺伝子であることを明らかとした。脳血管障害研究に新たな道を開くものと考え。

研究成果の概要(英文)：The Japanese population has higher intracranial aneurysm (IA) and subarachnoid hemorrhage (SAH) incidence rates as well as moyamoya disease (MMD), we are interested in RNF213 as a susceptibility gene for IA and SAH. We sequenced all 68 exons of RNF213 gene by Ion Torrent sequencing in 165 familial IA patients and found 35 rare variants, whereas 20 variants were observed in 199 control individuals (p=0.003). The former included truncating variants of one nonsense, and two frameshifts shared in sib-pairs, which were not detected in 199 controls and 103 MMD patients, suggesting that loss of function variants in RNF213 might confer susceptibility to IAs.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳動脈瘤 遺伝子 遺伝解析 RNF213

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は頭蓋内の主幹動脈の分岐部に生じる囊状の血管の病的な膨らみで、その破裂によりくも膜下出血を生じる。くも膜下出血を来した患者の転機は重篤で、その半数以上が死亡または重大な後遺症を残す。近年、画像診断技術の向上と普及により未破裂脳動脈瘤が診断されるケースが増えていることもあり、易破裂性も含めた疾患リスクの評価、さらには瘤の増大や破裂を防止する新たな治療への社会的要請は高い。脳動脈瘤の成因としては、高血圧症、喫煙、血行力学的要因などの環境要因と、家族集積性脳動脈瘤を合併しやすい遺伝性疾患の存在から遺伝要因が想定され、これらの複合作用により発生する多因子疾患と考えられている。このような遺伝的背景の存在から、我々は成因の解明を目的に遺伝要因の解析を行ってきた。今や多因子疾患の遺伝解析手法としては標準的なものとなった、多施設国際共同によるゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study、GWAS) にも参画し、いくつかの感受性遺伝子を報告している (Nat Genet.40:1472-7,2008; Nat Genet. 42:420-5,2010; PNAS.108:19707-12,2011)。その一方で我々は独自に、GWAS では捉えられない遺伝要因 (いわゆる missing heritability) の探索にも取り組んできた。GWAS で特定された感受性遺伝子座の効果サイズはいずれも小さく、集団での頻度が高いリスクアレルの生物学的効果も軽微なため、脳動脈瘤発生の分子基盤理解や臨床応用に直結しづらいという問題があったからである。そこで、本学で既に稼働の実績があった次世代型シーケンサーを駆使して頻度が低く効果サイズの高いレアバリエーションの解析を行ってきた。その結果、常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎症の原因遺伝子 PKD1/PKD2 の非同義レアバリエーションが脳動脈瘤と有意に関連することを見出し、報告した。また、家族性脳動脈瘤の網羅的ゲノム解析法によって、分類不能型免疫不全症の原因遺伝子 TNFRSF13B など、他の遺伝子の非同義・機能喪失型レアバリエーションとの関連も見出してきた。最近、フランス系カナダ人において、もやもや病を代表とする、種々の血管性疾患の感受性遺伝子として報告されている RNF213 遺伝子の非同義レアバリエーションが脳動脈瘤とも関連しているとの報告がなされた。本研究ではこの知見を検証すると同時に、現在までに我々がレアバリエーションとの関連を見出してきた他の感受性遺伝子との交絡も検証する。

2. 研究の目的

本研究では、新たな脳動脈瘤感受性遺伝子として報告のあった RNF213 遺伝子に注目して、次世代シーケンサーである Ion PGM (Thermo Fisher Scientific) を用いたターゲットリシーケンスを行う。検出されたレアバリエーションによる患者・対照関連解析を行ない、脳動脈瘤との関連の有無を精査する。さらに、既に我々の先行研究でレアバリエーションとの関連が検出されている PKD1、PKD2 や TNFRSF13B といった遺伝子との交絡を検討する。具体的には、それぞれの遺伝子のレアバリエーションが患者では相互排他的に検出されて、新たな疾患分類が可能となるのか、あるいは、組み合わせることで保有することにより疾患リスクが上昇するのか、等をも膜下出血の有無などの臨床情報も組み合わせることで詳細に解析する。現在、レアバリエーションが関連する感受性遺伝子を複数特定しているのは我々の研究グループのみであり、レアバリエーションを用いた複数の感受性遺伝子の交絡を検討した例は他に報告がない。我々は、既に 619 例の脳動脈瘤患者と 502 例の対照からゲノム DNA サンプルを調整済みであり、現在もサンプル収集は継続している。これらのサンプルについて、血管性疾患感受性遺伝子 RNF213 の全てのコーディング・エクソン 68 個を Ion PGM シーケンサー (Thermo Fisher Scientific) によりディープ・シーケンスして、コーディング領域のレアバリエーションを明らかにする。検出されたレアバリエーションについて、遺伝子機能に影響を及ぼすものであるか否かを、バイオインフォマティクス的手法により評価し、患者群と対照群で関連解析を行なう。同時に、既にこれらのサンプルで関連が検出されている PKD1、PKD2 や TNFRSF13B 等との交絡の有無を明らかにし、脳動脈瘤の遺伝学的リスクをより正確に評価するための知見を得る。

3. 研究の方法

最終的には、家族性脳動脈瘤患者 165 人と 199 人のコントロールを用いた。すべて日本人である。家族性脳動脈瘤患者はこれまでの sib-pair analysis 研究に用いた 79 人と新たな 86 人である。すべての脳動脈瘤は、脳血管撮影、3DCTA、または MRA で確認されている。また、遺伝性疾患で脳動脈瘤を合併する PKD などは除いた。コントロールとしては、in-house データベースから脳動脈瘤がない健康な日本人 95 人と 1000 人ゲノムプロジェクトの public database から 104 人の日本人を用いた。本研究は東京女子医科大学の倫理委員会の承認 (#342) を得て行った。また、すべての患者さんあるいはその家族から同意書も得た。Genomic DNA (gDNA) はスタンダードな方法で抽出した。Ion Torrent sequencing 法は、RNF213

遺伝子のすべての 68 exon に対して custom にデザインした Ion AmpliSeq primer pool (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて、165 人の家族性脳動脈瘤患者に対して行った。95 人のコントロールには、RNF213 の過去の研究に用いた primer pair を使用して行った。Ion Torrent sequencing で見出したバリエーションについては同様な方法で再度確認した。また、これらの有害性に関しては以下のサイトで検討した: Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>)、Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、Combined Annotation Dependent Depletion (CADD, <http://cadd.gs.washington.edu/>)、dbNSFP (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>) 得られたバリエーションの脳動脈瘤との関連については 2 つの gene-based variant burden test を用いて統計処理を行った。ひとつは two-tailed Fisher's exact test を用いて case と control を解析した。もう一つは もやもや病の RNF213 研究で使用した modified variable threshold (VT) test using CADD である。解析を行ったバリエーションは一般人口と我々のコントロールでのアレール頻度が 1% 以下のレアバリエーションとした。P 値は 0.05 をもって有意と判断した。

4. 研究成果

Ion PGM では MAF<1% の 27 個の coding 領域のレアバリエーションを検出し、sanger resequencing でも確認した。35 個のレアバリエーションが 165 人の脳動脈瘤患者から、20 個のレアバリエーションが 199 人のコントロールから検出された。これらには有意な差があった ($P=0.003$; odds ratio 2.4)。35 個のうち、SIFT で有害 Deleterious とされるのは 6 個であったが、コントロールの 20 個のうちでは 1 個のみであった。脳動脈瘤患者の中には、きわめて有害である (high CADD score)、ひとつの nonsense (p.W4985X) バリエーションと 2 つの frameshifts (p.G2867Afs*25 and p.K4160Hfs*2) バリエーションが含まれていた。後者は兄弟発症例でともに存在していた。p.G2867Afs*25 バリエーションは sbSNP database に登録されておらず、exon 29 において c.8596_8599 GACG deletion となる。また、p.K4160Hfs*2 バリエーションは dbSNP (rs753924460) に登録されてはいるが、きわめてレアで exon 47 において c.12474_12477 AAAG deletion となる。これらは、この遺伝子産物ができないか、機能しないことを意味していた。以上から、RNF213 の機能喪失型変異は脳動脈瘤感受性遺伝子の可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura S, Akagawa H, Kasuya H, et al.	4. 巻 127
2. 論文標題 Rare and low-frequency variants in RNF213 confer susceptibility to moyamoya syndrome associated with hyperthyroidism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e460-e466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 赤川 浩之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 自然科学社	5. 総ページ数 8
3. 書名 医学と薬学 75巻11号2018年11月【特集：日常診療でよく目にする脳神経外科疾患(II)】脳神経外科領域の遺伝子診断	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	広田 健吾 (Hirota Kengo) (10532690)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	
研究分担者	恩田 英明 (Onda Hideaki) (60185692)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	
研究分担者	赤川 浩之 (Akagawa Hiroyuki) (60398807)	東京女子医科大学・医学部・准教授 (32653)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	米山 琢 (Yoneyama Taku) (90318105)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	
研究分担者	青木 友浩 (Aoki Tomohiro) (40633144)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関