

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03770

研究課題名(和文) RNF213関連閉塞性血管障害の分子機序解明と新規治療開発

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms of RNF213-related occlusive cerebrovascular diseases and development of new treatment strategies

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)：本研究では、もやもや病に関わる複数の分子と環境因子を明らかにした。具体的には、(1)疾患特異的iPS細胞から、RNF213遺伝子のp.R4810K変異陽性を修復した細胞株を樹立し、ホモ接合体を野生型に戻したときのみ、内皮細胞のtube formationが低下することを示し、その関連分子を特定した。(2)変異陽性の発症者と保因者の比較により、発症を促進する分子を突き止めた。(3)血管狭窄を促進する環境要因としてアルコールを特定したほか、ウイルス等の外因との関連を明らかにした。(4)変異が脳血管の血行動態に及ぼす影響を明らかにした。これらの知見は、疾患モデル作成と病態解明に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNF213 p.R4810K変異は東アジアのもやもや病患者で最も多く認められる変異にも関わらず、その詳細な機能は不明であった。本研究で樹立したiPS細胞の遺伝子修復株はその詳細な機能解明に貢献できると考えられる。実際に、内皮細胞における変異の影響が本研究で明らかになり、今後は疾患モデル樹立により、病態解明の他、治療法開発にも繋がると期待される。p.R4810K変異は、もやもや病以外にも数多くの頭蓋内外の血管障害に関与しており、その機能解明は、非動脈硬化性血管障害の病態解明と治療開発にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：(1) We compared the characteristics of endothelial cells differentiated from patient-derived mutant iPS cells and their genetically repaired cell lines, and identified molecules that are responsible for differential tube formation capacity. (2) We compared gene expression in blood from patients and carriers with the RNF213 p.R4810K mutation and identified molecules that facilitate the progression of moyamoya disease. (3) We identified daily alcohol drinking as a risk factor for contralateral progression of unilateral moyamoya disease and clarified the association of several environmental factors including viral infection. (4) We clarified the effect of p.R4810K mutation on the morphology and hemodynamics of intracranial arteries in patients with moyamoya disease. These findings will facilitate the development of disease models, which is critical to understand the pathogenesis of the disease.

研究分野：Neurosurgery

キーワード：moyamoya genetics iPS cells cerebrovascular disease atherosclerosis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は、日本人の死因の3位、寝たきりの1位であり、健康寿命を延ばす上で対処すべき重要な疾患である。もやもや病は比較的稀な脳血管障害の一つであり、2011年に我々のグループがRNF213遺伝子変異(p.R4810K変異)を主因として起こることを明らかにした。その後の研究で、同遺伝子変異はもやもや病のみならず、中大脳動脈閉塞、冠動脈疾患、肺高血圧症など幅広い閉塞性血管障害の病態に関連していることを示した。もやもや病においては、脂質や泡沫細胞の集積など動脈硬化に特徴的な所見が認められず、動脈硬化とは病態が異なるものと考えられる。RNF213 R4810K変異は動脈硬化とは異なる全身の血管狭窄に関連する重要な因子である。しかし、動脈硬化以外の主幹動脈狭窄のメカニズムは未解明な点が多い。この病態を解明し、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と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、RNF213とそれ以外の遺伝学的要因と環境要因を明らかにし、もやもや病に至る仕組みを明らかにすることである。そのために、次の目標を設定した:(1) RNF213 p.R4810K変異の血管に及ぼす影響を明らかにすること、(2) RNF213以外の感受性因子を特定すること、(3) 環境因子を特定すること、(4) 遺伝因子と環境因子の相互作用を明らかにすること、(5) 動物モデルを創出することの5つである。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS細胞を用いた血管モデル構築とp.R4810K変異の作用機構解明

p.R4810K変異陽性患者から作成したiPS細胞をCRISPR-CAS9システムを用いて野生型に遺伝子修復した。ホモ接合体2人とヘテロ接合体1人のiPS細胞を野生型に戻した株を3株ずつ作成し、いずれも内皮細胞に分化させ、その発育、遊走能、細胞死、tube formationなどを比較する。

#### (2) RNF213以外の第2の感受性要因の特定

RNF213変異陰性の患者について、全ゲノムシーケンスにより別の感受性因子を特定する。RNF213変異陽性の家系で、発症者と非発症者(保因者)を比較し、発症を促進または抑制する分子を特定する。

#### (3) もやもや病の環境要因の特定

片側もやもや病の両側進展に着目し、進展のリスクとなる因子を特定する。ウイルス感染など、もやもや病との関連が疑われる環境因子について、ケースコントロール研究により、疾患との関連性を検証する。

#### (4) 遺伝子変異と血行動態の関連の解明

もやもや病患者の内頸動脈の走行、血管径、血流動態について、p.R4810K変異との関連や狭窄進行との関連を分析する。Computational fluid dynamics(CFD)解析によって血行動態を解析する。

#### (5) 動物モデルの創出

RNF213以外の発症関連因子を特定し、その因子の遺伝子改変マウスをRNF213のノックアウトマウスと交配させることで、もやもや病モデルを作成する。

### 4. 研究成果

患者由来iPS細胞やヒト血液サンプル等を用いて、もやもや病に関連する分子ネットワークや環境要因を複数同定した。

#### (1) iPS細胞を用いた血管モデル構築とp.R4810K変異の作用機構解明

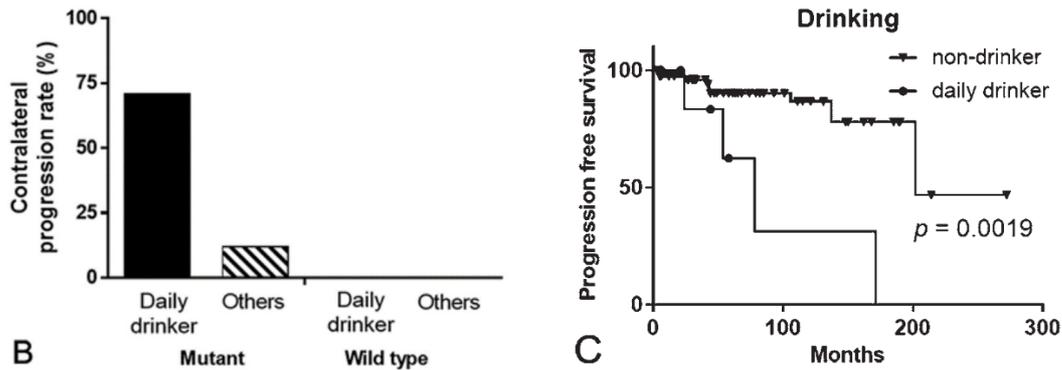
p.R4810K変異陽性患者から作成したiPS細胞をCRISPR-CAS9システムを用いて野生型に遺伝子修復し、変異の純粋な機能を分析した。ホモ接合体2人とヘテロ接合体1人のiPS細胞を野生型に戻した株を3株ずつ内皮細胞に分化させ、変異型と比較したところ、ホモ接合体のみにおいて、変異型が野生型よりもtube formationの亢進が認められることを明らかにした。それに関連する分子を複数同定した。

#### (2) RNF213以外の第2の感受性要因の特定

RNF213遺伝子に変異を持たない患者において、全ゲノムシーケンスを行い、複数の感受性遺伝子とその変異を特定した(論文執筆中)。p.R4810K変異陽性の家族性もやもや病において、発症者と保因者を比較して、発症促進に関わると考えられる分子ネットワークを特定した。

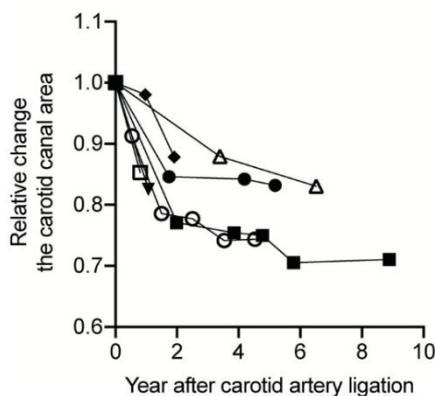
### (3) もやもや病の環境要因の特定

片側もやもや病の対側進行のリスクについては、十分に解明されておらず、p.R4810K 変異を含めて、多施設共同研究でそのリスクを評価した。その結果、p.R4810K が対側進行のリスクを高めることが確認され、その他にも、若年、男性、毎日のアルコール摂取が対側進行のリスクであることを明らかにした (Mineharu et al. J Neurosurg 2021)。ウイルスはもやもや病発症と関連があるとされてきたが、包括的に関連を報告したものはなかった。また、p.R4810K を考慮した研究はされていなかった。そこで、p.R4810K 変異をもつ患者と対照者を集め、11 種類の血管症関連ウイルスの血中抗体価を患者対照間で比較した。その結果、いずれのウイルスの抗体価陽性についても、もやもや病と関連しないことを示した (Nakamura et al. JSCV. 2022, in press)。ウイルス感染以外の環境因子について解明を進めている。



### (4) 遺伝子変異と血行動態の関連の解明:

骨性頸動脈管は内頸動脈が通過する骨製の構造で、成人後は形状が変化しないと考えられていた。もやもや病では頸動脈管が細いことから、幼少期に狭窄が完成しているとする仮説が提唱されたが、本研究では、頸動脈管に可塑性があり、成人後でも狭小化しうることを明らかにした (Oichi et al. PLoS One 2021)。p.R4810K と頸動脈管径狭小化はもやもや病の特徴であるが、もやもや病以外の中大脳動脈閉塞等でも認められる。一方、2 つの特徴を組み合わせることで、よりもやもや病を特徴づけられることを明らかにした (Oichi et al. JSCV 2022)。CFD 解析では、p.R4810K 変異が ICA 終末部の血流パターンに影響する可能性があることを突き止めた。狭窄の進行とともに shear stress は上昇するが、狭窄の進行を予測するパラメーターの特定には至らなかった (論文執筆中)。



### (5) 動物モデルの創出

複数の動物モデルを検証してきたが、脳血管狭窄は認められず、現在は、項目 2、3 で得られた遺伝因子や環境因子を加味して、特定した分子の遺伝子改変マウスと RNF213 変異マウスを交配して、環境負荷を加える新たなモデル作出に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mineharu Yohei, Takagi Yasushi, Koizumi Akio, Morimoto Takaaki, Funaki Takeshi, Hishikawa Tomohito, Araki Yoshio, Hasegawa Hitoshi, Takahashi Jun C., Kuroda Satoshi, Houkin Kiyohiro, Miyamoto Susumu	4. 巻 136
2. 論文標題 Genetic and nongenetic factors for contralateral progression of unilateral moyamoya disease: the first report from the SUPRA Japan Study Group	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2021.3.JNS203913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyakoshi A., Funaki T., Fushimi Y., Nakae T., Okawa M., Kikuchi T., Kataoka H., Yoshida K., Mineharu Y., Matsushashi M., Nakatani E., Miyamoto S.	4. 巻 41
2. 論文標題 Cortical Distribution of Fragile Periventricular Anastomatic Collateral Vessels in Moyamoya Disease: An Exploratory Cross-Sectional Study of Japanese Patients with Moyamoya Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Neuroradiology	6. 最初と最後の頁 2243 ~ 2249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3174/ajnr.A6861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamao Yukihiko, Takahashi Jun C., Funaki Takeshi, Mineharu Yohei, Kikuchi Takyuki, Okada Tomohisa, Togashi Kaori, Miyamoto Susumu	4. 巻 133
2. 論文標題 Revascularization Surgery in Childhood Associated with a Low Incidence of Microbleeds in Adult Patients with Moyamoya	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e716 ~ e721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.09.144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 舟木健史、峰晴陽平、宮本享	4. 巻 71
2. 論文標題 もやもや病	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生命の科学	6. 最初と最後の頁 484-485
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mineharu Yohei, Miyamoto Susumu	4. 巻 12
2. 論文標題 RNF213 and GUCY1A3 in Moyamoya Disease: Key Regulators of Metabolism, Inflammation, and Vascular Stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 687088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2021.687088	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 -

1. 著者名 Oichi Yuki, Mineharu Yohei, Agawa Yuji, Morimoto Takaaki, Funaki Takeshi, Fushimi Yasutaka, Yoshida Kazumichi, Kataoka Hiroharu, Miyamoto Susumu	4. 巻 16
2. 論文標題 Plasticity of the bony carotid canal and its clinical use for assessing negative remodeling of the internal carotid artery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0261235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0261235	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 -

1. 著者名 Oichi Yuki, Mineharu Yohei, Agawa Yuji, Morimoto Takaaki, Funaki Takeshi, Hitomi Toshiaki, Kobayashi Hatasu, Todo Kenichi, Tani Shoichi, Imamura Hirotooshi, Yoshida Kazumichi, Kataoka Hiroharu, Koizumi Akio, Sakai Nobuyuki, Miyamoto Susumu	4. 巻 31
2. 論文標題 Characterization of Moyamoya and Middle Cerebral Artery Diseases by Carotid Canal Diameter and RNF213 p.R4810K Genotype	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 106481 ~ 106481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Y, Mineharu Y, Kamata T, Funaki T, Miyamoto S, Koizumi A, Harada HK.	4. 巻 -
2. 論文標題 of association between seropositivity of vasculopathy-related viruses and moyamoya disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 峰晴陽平、舟木健史、片岡大治、吉田和道、菊池隆幸、大川将和、山尾幸広、高橋 淳、高木康志、宮本享
2. 発表標題 もやもや病治療のこれから：メカニズム解明に基づいた診断と治療の発展
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mineharu, Y.
2. 発表標題 Future medical application of single cell analysis.
3. 学会等名 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mineharu Y, Oichi Y, Kamata T, Matsui Y, Morimoto T, Tanji M, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Koizumi A, Arakawa Y and Miyamoto S.
2. 発表標題 Significance of RNF213 in tumorigenicity of medulloblastoma.
3. 学会等名 International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峰晴 陽平、高木 康志、小泉 昭夫、森本 貴昭、舟木 健史、菱川 朋人、荒木 芳生、長谷川 仁、高橋 淳、黒田 敏、寶金 清博、宮本 享 .
2. 発表標題 片側もやもや病の遺伝的要因を含めた対側進行のリスク評価 .
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峰晴陽平、三橋将人、坂井信幸、宮本享
2. 発表標題 もやもや病の末梢血バイオマーカーの開発：IL-1 誘導性プロスタグランジンE合成酵素のmRNA精密定量計測
3. 学会等名 日本脳卒中学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峰晴陽平、高木康志、小泉昭夫、森本貴昭、舟木健史、菱川朋人、荒木芳生、長谷川仁、高橋淳、黒田敏、寶金清博、宮本享
2. 発表標題 片側もやもや病のPCA狭窄とRNF213遺伝子変異および転帰との関連
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾市 雄輝、峰晴 陽平、阿河 祐二、森本 貴昭、舟木 健史、伏見 育崇、吉田 和道、片岡 大治、宮本享
2. 発表標題 頸動脈管の可塑性と内頸動脈リモデリング評価への臨床応用
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰晴陽平、高木康志、小泉昭夫、森本貴昭、舟木健史、菱川朋人、荒木芳生、長谷川仁、高橋淳、黒田敏、寶金清博、宮本享
2. 発表標題 片側もやもや病のPCA狭窄とRNF213遺伝子変異および転帰との関連
3. 学会等名 日本脳卒中学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾市 雄輝、峰晴 陽平、吉岡 美樹、手塚 徹、Kuan-Chun Lan、藤渕 航、香川 晴信、松本 智子、Knut Woltjen、小泉 昭夫、宮本 享、山下 潤、Shohab Youssefian
2. 発表標題 もやもや病患者のiPS細胞由来内皮細胞におけるRNF213変異の影響
3. 学会等名 日本脳卒中学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mineharu Y, Miyamoto S	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 341
3. 書名 Moyamoya Disease: Current Knowledge and Future Perspectives	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>教育研究活動データベース  <a href="https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/qZ6mH">https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/qZ6mH</a></p>
--

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	高橋 淳  (Takahashi Jun)  (10270779)	京都大学・iPS細胞研究所・教授    (14301)	

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	片岡 大治  (Kataoka Hiroharu)  (40359815)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長    (84404)	
研究分担者	山下 潤  (Yamashita Jun)  (50335288)	京都大学・iPS細胞研究所・教授    (14301)	
研究分担者	峰晴 陽平  (Mineharu Yohei)  (50716602)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	
研究分担者	小泉 昭夫  (Koizumi Akio)  (50124574)	京都大学・医学研究科・名誉教授    (14301)	

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