

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03790

研究課題名（和文）もやもや病や脳梗塞の遺伝性リスク因子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of heritable risk factors for moyamoya disease and stroke

研究代表者

手塚 徹（Tezuka, Tohru）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：50312319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：RNF213遺伝子変異が多様な血管閉塞性疾患を引き起こすメカニズムは未解明である。本研究では、網羅的な解析手法も用いて、RNF213が制御する細胞内シグナルを新たに同定し、RNF213変異によるその異常を見出すことにより、疾患メカニズムを明らかにすることを目指した。我々は、RNF213欠損細胞株の使用などにより種々のシグナル系を解析し、脂質応答においては、RNF213が細胞死や炎症シグナルなど、様々な細胞内シグナル経路を制御することを見出した。RNF213変異体を用いて、RNF213の各ドメインの役割やRNF213遺伝子の患者変異の影響を調べ、RNF213の作用機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、RNF213が細胞内シグナル伝達に果たす役割の理解が深まることで、もやもや病・脳梗塞・冠動脈疾患など、多様な血管閉塞性疾患のメカニズムが解明されること、また、疾患メカニズムに基づく予防・治療法の創出への貢献が期待できることに、本研究の学術的・社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：The mechanism by which RNF213 mutations cause a variety of vascular occlusive diseases is not yet well understood. We aimed to elucidate the disease mechanism by identifying new intracellular signaling pathways regulated by RNF213 and finding abnormalities caused by RNF213 mutations, using omics studies. In particular, we found various pathways regulated by RNF213 such as those for cell death and inflammation in response to lipid stress. We also elucidated how RNF213 regulates these pathways by analyzing the role of each domain of RNF213 and the effect of RNF213 mutations found in patients.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：もやもや病 シグナル伝達 RNF213 血管閉塞性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

もやもや病(ウイルス動脈輪近傍動脈)は、日本人に多発する進行性脳血管閉塞症であり、内頸動脈終末部の狭窄・閉塞とその周囲に代償的な異常血管網が認められる。*RNF213* 遺伝子は2011年に、もやもや病の感受性遺伝子として同定され、さらに、その遺伝子変異が脳梗塞や肺高血圧症、冠動脈疾患など、多様な血管閉塞性疾患に関与することも明らかになっていた。*RNF213* は5207アミノ酸残基から成る巨大タンパク質であり、ATPase 活性を持つAAA+ドメインと、ユビキチンリガーゼ活性ドメインの1つであるRINGドメインが同定されていた。また、国内外の研究グループにより、*RNF213* は脂質応答や細胞周期制御、Wnt シグナルなどへの関与が報告されていた。しかし、*RNF213* 遺伝子変異が血管閉塞性疾患の要因となる詳細なメカニズムは不明であった。その理由の1つには、浸透率の問題が挙げられる。つまり、本邦の殆どのもやもや病患者が *RNF213* R4810K 多型を有するものの、この多型は、日本人の一般人口の1-2%程度に保因しており、多型保有者の約150分の1しかもやもや病を発症しない。従って、もやもや病は、上記の *RNF213* 遺伝子多型(変異)に加え、環境要因など何らかの二次的な要因が関わる多因子疾患と考えられ、発症機構の解明を難しくしている。しかしながら、より大きな理由は、*RNF213* が細胞機能に果たす役割と、その分子メカニズム、血管閉塞との関連がほとんど未解明なことにあった。それ故に、*RNF213* が制御する細胞内シグナル経路、および、それにより発現する細胞機能を解明し、もやもや病患者に同定された *RNF213* 遺伝子変異が上記シグナル経路・細胞機能にどう影響するかを明らかにすることが、重要な課題であった。波及効果としては、*RNF213* の機能やその破綻による血管閉塞のメカニズムが理解されることで、多様な血管閉塞性疾患に対する予防・治療技術の構築につながることが期待されていた。

2. 研究の目的

世界的には、*RNF213* R4810K 多型以外にも、多様な *RNF213* 遺伝子変異がもやもや病患者に同定されていた。代表者らは、もやもや病患者が持つ *RNF213* 変異の中に、NFkappaB 経路と細胞死を亢進させる変異を多く発見し、患者変異が *RNF213* による細胞内シグナルを異常にする可能性を見出していた。そこで、本研究では、(1) *RNF213* が制御する細胞内シグナル経路、とその構成因子の同定、および、*RNF213* 遺伝子変異による上記経路の異常、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *RNF213* 欠損細胞の作製

CRISPR/Cas9 法を用いて、*RNF213* 欠損 HeLa 細胞を作製した。具体的には、pX459v2 ベクター (Puromycin 耐性遺伝子発現ユニットを持つ CRISPR/Cas9 用ベクター: Addgene より入手した) に、ヒト *RNF213* 遺伝子のコーディング領域に対するガイド RNA (gRNA) 標的配列を組み込んだプラスミドを作製した。gRNA 標的配列としては、互いに重ならない2種類の配列を使用した。HeLa 細胞に対して、リポフェクション法により、これら2つのプラスミドを個別に導入し、一過性の Puromycin 選択の後、クローンの単離・選択を行った。ウェスタンブロット法により、それぞれのクローンにおける *RNF213* タンパク質の発現を確認し、上記2種類の gRNA 標的配列それぞれに由来する *RNF213* 欠損 HeLa 細胞株を複数取得した。

(2) *RNF213* 発現プラスミドの作製と培養細胞への導入

RNF213 変異体の発現プラスミドは、3xFLAG タグがアミノ末端側に付加された野生型 *RNF213* 発現プラスミド(引用文献)を基に作製した。Q5 PCR polymerase(NEB 社)を用いて、導入したい変異部位を含む *RNF213* cDNA 断片を増幅し、野生型 *RNF213* 発現プラスミドの当該領域と置き換えた。PCR で増幅した領域の塩基配列は、京都大学医学研究科医学研究支援センターでのシーケンス解析により、確認した。HEK293T 細胞への *RNF213* 発現プラスミドの一過性導入は、Viofectin(Viogene 社)を用いたリポフェクション法により行った。

(3) RNA-seq 解析

脂質応答における *RNF213* の役割を詳細に解析するために、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析(RNA-seq 解析)を行った。具体的には、脂質として、飽和脂肪酸であるパルミチン酸を選択し、HeLa 細胞の親株と *RNF213* 欠損株(1クローン)に対し、0.5mM のパルミチン酸ナトリウム刺激を0, 1, 3, 6, 12, 18時間行った。RNA-seq 解析は、Eurofin 社に各サンプルより調製した全 RNA を送付し、受託解析により行った。得られたシーケンス解析データのバイオフィオマティクス解析は、京都大学医学研究科医学研究支援センターの支援を得て、実施した。

(4) 細胞応答解析

タンパク質レベルの解析においては、無刺激の、あるいは、パルミチン酸刺激を行った HeLa 細胞や遺伝子導入を行った HEK293T 細胞を可溶化し、得られた細胞可溶化物をウェスタンブロット法により解析した。また、mRNA レベルの解析においては、HeLa 細胞より全 RNA を調製し、real-time PCR 法により解析した。具体的には、全 RNA より ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO 社) で逆転写を行い、得られた cDNA、および、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) を用いて、real-time PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子発現解析も利用した、RNF213 の機能・作用機序の解析

脂質への応答において、RNF213 が小胞体ストレス経路の活性化や細胞死、また、脂肪滴の形成などに重要であることが示されていた。我々は、脂質応答における RNF213 の役割をより深く解析し、未解明のシグナル経路や作用機序を見出すことを目指した。そこで、飽和脂肪酸の 1 つであるパルミチン酸で HeLa 細胞 (親株と RNF213 欠損細胞株) を刺激し、刺激後の遺伝子発現の変動を、経時的・網羅的に比較解析した。この RNA-seq 解析の結果、過去の報告の通り (引用文献) 親株と比べ、RNF213 欠損株において、小胞体ストレス経路の活性化などが減弱していることが明らかになった。RNA-Seq より得られた結果については、当該解析に供した RNF213 欠損株に加え、複数の RNF213 欠損株で、real-time PCR 法やウェスタンブロット法により確認している。我々は、RNF213 による NFkappaB 経路と細胞死の活性化に興味を持ってきたが、NFkappaB には様々な活性化経路が知られている。我々の RNA-seq データのバイオインフォマティクス解析により、RNF213 の標的 NFkappaB 経路の候補が見出されたので、その構成因子について、発現抑制・遺伝子欠損細胞を作製・解析することで、候補経路の重要性を検討している。また、一連の解析により、パルミチン酸への応答において、RNF213 が炎症性サイトカインの 1 つである IL6 の発現誘導などにも関わっていることが見出され、RNF213 が脂質応答において制御する新しい経路が複数同定された。他方、我々は、もやもや病患者に同定された RING ドメイン内の遺伝子変異 (1 アミノ酸置換変異) の多くが、HEK293T 細胞に強制発現させた時の、RNF213 の細胞死誘導活性を亢進させることを見出していたが、当該 RING ドメイン変異体に、近年同定された RNF213 の新しいユビキチンリガーゼドメイン (RZ-finger : 引用文献) の不活性型変異を導入したところ、この細胞死誘導活性が失われることが判明した。細胞死の指標の 1 つとして、細胞死実行プロテアーゼである Caspase-3 の切断をウェスタンブロット法により検出した。細胞死誘導活性が亢進する RING ドメイン変異体は半減期が短くなり、不安定化することが分かっていたが、上記 RZ-finger 変異の導入により、この不安定性も消失した。これらの結果から、RNF213 の細胞死誘導活性には、RZ-finger ドメインによる標的タンパク質のユビキチン化が重要であることが示唆された。

(2) 考察、今後の展望

本研究において、脂質応答において RNF213 が果たす役割の理解が深まり、今後、更に解析して行く。実施中のレスキュー実験 (RNF213 欠損細胞に野生型・変異体 RNF213 を導入した細胞株の解析) により、AAA+ドメイン・RING ドメイン・RZ-finger ドメインの役割や、もやもや病患者に同定された RNF213 遺伝子変異の影響を包括的に解析している。遺伝子変異の影響については、分担研究者と、立体構造モデリングによる考察を進めている。特に、RNF213 には RING ドメインと RZ-finger の 2 つのユビキチンリガーゼ (E3) ドメインが存在するので、個々の E3 ドメインの役割 (標的基質や、付加するポリユビキチン鎖の構造) や両者の相互作用は興味深い。他方、我々は作製した RNF213 欠損細胞株を用いて、RNF213 が受容体型チロシンキナーゼの活性化を正に制御することを発見し、解析を進めている。また、もやもや病患者由来の iPS 細胞 (RNF213 R4810K 多型を有する) とその野生型修復 iPS 細胞から分化誘導して得られた血管内皮細胞について、網羅的遺伝子発現解析などにより、両者の差異を見出し、更に、比較解析を進めている。これらの研究により、RNF213 遺伝子変異が血管閉塞性疾患を引き起こすメカニズムをより解明したい。

引用文献

小林ら、"Biochemical and Functional Characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a Susceptibility Mutation of Moyamoya Disease, in Angiogenesis In Vitro and In Vivo", J Am Heart Assoc., 4 巻、2015、e002146

Piccolis ら、"Probing the Global Cellular Responses to Lipotoxicity Caused by Saturated Fatty Acids", Mol Cell., 74 巻、2019、32-44

Otten ら、"Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection", Nature, 594 巻、2021、111-116

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 Takeda Midori, Tezuka Tohru, Kim Minsoo, Choi Jungmi, Oichi Yuki, Kobayashi Hatasu, Harada Kouji H., Mizushima Tsunehiro, Taketani Shigeru, Koizumi Akio, Youssefian Shohab	4. 巻 525
2. 論文標題 Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NF B activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 668 ~ 674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.024	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 崔 廷米、手塚 徹、小林 果、原田 浩二、小泉 昭夫、Youssefian Shohab
2. 発表標題 もやもや病感受性遺伝子産物RNF213における結合蛋白質の制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾市 雄輝、峰晴 陽平、吉岡 美樹、手塚 徹、Kuan-Chun Lan、藤淵 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 もやもや病の疾患モデルiPS細胞に対する遺伝子修復の効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第81回学術総会
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、Lan Kuan-Chun、藤淵 航、香川 晴信、松本 智子、Woltjen Knut、小泉 昭夫、宮本 享、山下 潤、Youssefian Shohab
2. 発表標題 2. 発表標題 同定したRNF213が制御する細胞内シグナル系について、当該シグナル系のシグナル伝達分子・制御分子の動態についても検討し、RNF213の作用機序を明らかにする。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 STROKE 2022（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ahmed Sharif, 小林 果, 土生 敏行, 原田 浩二, 手塚 徹, Youssefian Shohab, 及川 伸二, 村田 真理子, 小泉 昭夫
2. 発表標題 Effect of RNF213 suppression on endoplasmic reticulum stress
3. 学会等名 第92回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	S Youssefian (Youssefian Shohab) (00210576)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	Kim Minsoo (Kim Minsoo) (50466835)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	水島 恒裕 (Mizushima Tsunehiro) (90362269)	兵庫県立大学・理学研究科・教授 (24506)	

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
---------	---------