

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17961

研究課題名（和文）もやもや病の病変部血管の遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Gene expression analysis of affected blood vessels in moyamoya disease

研究代表者

横山 欣也（Yokoyama, Kinya）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90867904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究期間を通しもやもや病患者21名、対照群として動脈瘤6名、難治性てんかん5名から、脳表の動脈血管壁を採取、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。もやもや病患者11名、対照群として動脈瘤6名、難治性てんかん患者3名を用いたメッセンジャーRNAに対する網羅的遺伝子発現解析の結果を論文化し公表した。またもやもや病21名と非もやもや病11名の頭蓋内動脈血管壁におけるlong non-coding RNA発現についての網羅的解析を行い、結果を論文化し公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

もやもや病の網羅的遺伝子発現解析については、これまで循環血中やiPS細胞については行われてきたが、病変部血管に対するものとしては我々の研究が初となった。これまでの研究では炎症や免疫応答の関与が推察されてきたが、今研究により、もやもや病の病変部である、脳動脈血管壁においても、同様の変化が生じていることが示された。

研究成果の概要（英文）：During the study period, 21 patients with Moyamoya disease, 6 patients with aneurysms and 5 patients with intractable epilepsy were sampled from the brain surface arteries and subjected to comprehensive gene expression analysis using microarrays. Comprehensive gene expression analysis for messenger RNA was performed on 11 moyamoya disease patients, 6 aneurysms as a control group, and 3 intractable epilepsy patients. In addition, we comprehensively analyzed long non-coding RNA expression in the intracranial artery walls of 21 patients with moyamoya disease and 11 patients with non-moyamoya disease, and published the results in a paper.

研究分野：脳神経外科分野

キーワード：moyamoya disease transcriptome Microarray messenger RNA long non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は脳を栄養する動脈である内頸動脈の終末部に進行性の狭窄・閉塞病変と頭蓋底部をはじめとした側副血行路(もやもや血管)の発達を特徴とする疾患である。診断は画像所見と除外診断によってなされ、その病因は不明とされてきた。疫学上は日本を含む東アジアにおいて発症頻度が高く、10-15%程度に家族性発症を認めるため遺伝子異常を背景とすると考えられてきた。2011年、家族性もやもや病患者に対する genome wide association study により RNF213 遺伝子が感受性遺伝子として報告された。日本人患者では約 90%に RNF213 R4810K の SNP が認められ、疾患発症と強い関連があると考えられた。しかしながら、動物実験では RNF213 のノックアウト・マウスや高頻度遺伝子変異を導入したノックイン・マウスが作製されたものの、両者ともに通常の発育では野生型と比較しても頭蓋内血管に異常は見られなかった。また、もやもや病以外の動脈硬化性頭蓋内血管狭窄症においても一定の頻度で RNF213 変異は認められることが報告されており、もやもや病だけに特異的な遺伝子変異ではないと考えられる。in vitro では最近、白人のもやもや病患者に見られる RNF 213 変異(ユビキチンリガーゼ変異)を導入した細胞株において、脂肪滴の消失と RNF213 蛋白の凝集を認め、RNF213 蛋白が細胞内の脂肪代謝に関与しているとの報告がなされたが、遺伝子異常を標的としたこれまでの研究では、もやもや病の発症に至るメカニズムは依然として不明である。もやもや病患者血管の病理像は内膜の肥厚と中膜の菲薄化とされる。主たる狭窄部は内頸動脈終末部であるが、バイパス術の recipient となる脳表の動脈にも同様の病理性な変化が生じているとされる。しかしながら手術中に入手可能な病変部の検体量が限られており、得られる total RNA 量が極めて少量であることから、今までにマイクロアレイをはじめとした病変部の遺伝子発現解析は殆ど行われてこなかった。

2. 研究の目的

マイクロアレイを用いて、もやもや病患者の病変部の網羅的な遺伝子発現解析を行い、非もやもや病患者検体との比較により、もやもや病患者の病変部に特異的な発現遺伝子・パスウェイの特定を行うことである。

3. 研究の方法

名古屋大学医学部附属病院にて浅側頭動脈-中大脳動脈血管吻合術を施したもやもや病患者を疾患群、当初は巨大未破裂脳動脈瘤手術にて浅側頭動脈-中大脳動脈血管吻合術を併用した動脈瘤トラッピング術を受けた患者のみを対象群としたが、疾患群と対照群の年齢分布の不一致から、さらに難治性てんかんの診断で焦点切除術を受けた患者についても対照群とした。術中に脳表の動脈壁検体を採取、total RNA 分解を阻止するため、採取された血管は直ちに RNAlater 内に保存し 4 で一晩保管の後、実験まで -80 にて保管を行った。total RNA 抽出は RNeasy Micro Kit (Agilent 社)を使用した。total RNA 抽出後はただちに Ovation Pico SL WTA system V2(Tecan 社)を用いて増幅 cDNA を作成した。非特異的な増幅がなされていないかの確認のため、ハウスキープ遺伝子を標的とした real time PCR を行い、発現量の小さい検体は以後のアッセイから外すことで増幅 cDNA の品質を担保することとした。SureTag DNA Labeling Kit(Agilent 社)を用いて増幅 cDNA を Cyanine3 標識した後、マイクロアレイスライドへのハイブリダイズを行った。アレイスライドは SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K Ver. 2.0(Agilent 社)を用いて 1 色法にて行った。65、24 時間のハイブリダイズの後、アレイスライドの洗浄とマイクロアレイスキャナーでのデータ収集を行った。得られたアレイデータは標準化ののち、Mann-Whitney U-test による二群比較を行った。メッセンジャー RNA については変化が起きているパスウェイを同定するため、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行った。Long non-coding RNA についてはゲノム上で隣接する遺伝子を標的遺伝子とし、抽出した遺伝子群に対して Gene Ontology 解析を行った。再現性の確認のため、マイクロアレイの発現変動遺伝子を標的に、増幅 cDNA にたいして定量 PCR を行った。

4. 研究成果

研究期間を通して、もやもや病患者 21 名、対照群として動脈瘤 6 名、難治性てんかん 5 名から、脳表の動脈血管壁を検体として採取、total RNA の抽出、ライブラリ作成を行い、Agilent 社製のマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。2019 年から 2021 年にかけて、もやもや病患者 11 名、対照群として動脈瘤 6 名、難治性てんかん患者 3 名を用いたメッセンジャー RNA に対する網羅的遺伝子発現解析では 88 の発現変動遺伝子と、データベース解析では炎症や免疫応答のパスウェイに関わる遺伝子群がもやもや病で高発現、酸化的リン酸化と DNA 修復のパスウェイの遺伝子群が低発現であった。発現変動遺伝子から 10 遺伝子を抽出し、定量 PCR による再現性の確認を行った。これらの結果を論文にまとめて投稿し、JNS Focus 誌に採択され出版された(図 1)。2021 年から 2022 年にかけて、もやもや病検体および、対照として難治性てんかん患者検体の集積とマイクロアレイによるデータの集積を行った。もやもや病群における

サブ解析として感受性遺伝子として報告されている RNF213 の一塩基多型である p.R4810K の有無による比較を行い、第 80 回日本脳神経外科学会学術総会シンポジウムにて発表を行った。また、もやもや病 21 名と非もやもや病 11 名の頭蓋内動脈血管壁における long non-coding RNA 発現についての網羅的解析を行った。308 種類の long non-coding RNA が発現変動しており、ゲノム上で隣接する遺伝子を標的遺伝子として抽出した。それらに対する Gene Ontology 解析では antibacterial humoral response や T-cell receptor signaling pathway という GO term が有意であった。これらの結果を論文にまとめて投稿し、Journal of Neurosurgery 誌に採択され出版された(図 2)。

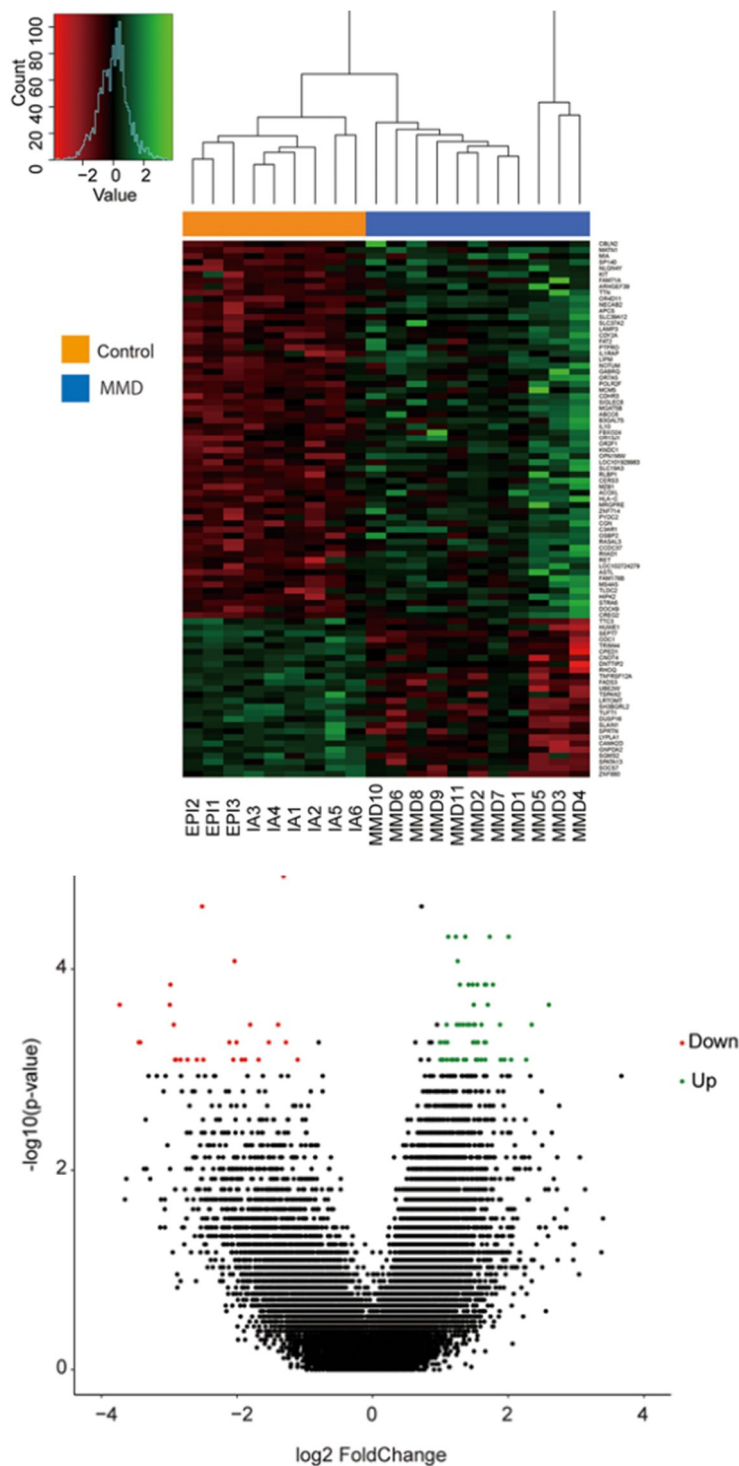


図 1. メッセンジャーRNA に対する網羅的発現解析(Neurosurg Focus 51 (3):E3, 2021)

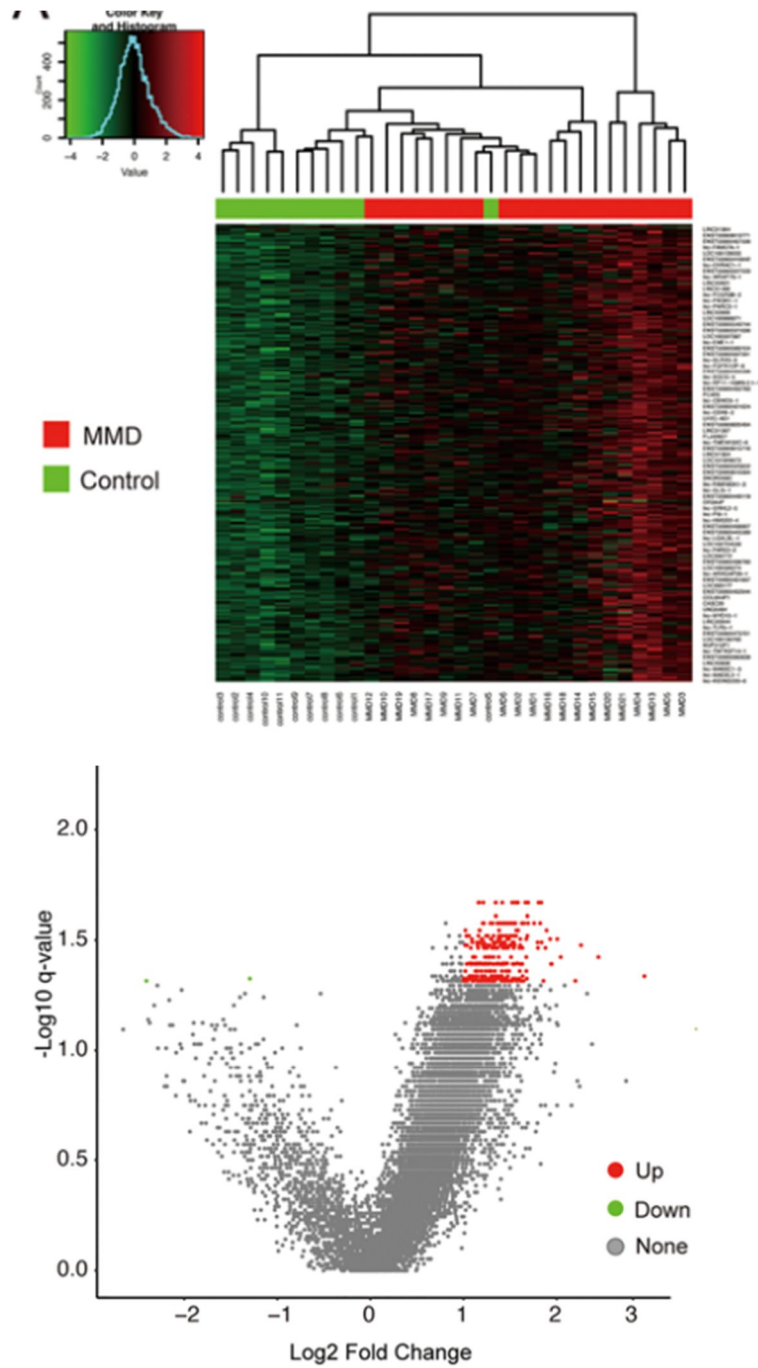


図2. Lon non-coding RNA に対する網羅的発現解析(J Neurosurg 138:709-716,2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Fumiaki Kanamori, Kinya Yokoyama, Akinobu Ota, Kazuhiro Yoshikawa, Sivasundaran Karnan, Mikio Maruwaka, Kenzo Shimizu, Shinji Ota, Kenji Uda, Yoshio Araki, Sho Okamoto, Satoshi Maesawa, Toshihiko Wakabayashi, Atsushi Natsume	4. 巻 51(3)
2. 論文標題 Transcriptome-wide analysis of intracranial artery in patients with moyamoya disease showing upregulation of immune response, and downregulation of oxidative phosphorylation and DNA repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosurgical Focus	6. 最初と最後の頁 E3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2021.6.FOCUS20870	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 Mamiya Takashi, Kanamori Fumiaki, Yokoyama Kinya, Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Uda Kenji, Araki Yoshio, Maesawa Satoshi, Yoshikawa Kazuhiro, Saito Ryuta	4. 巻 138
2. 論文標題 Long noncoding RNA profile of the intracranial artery in patients with moyamoya disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 709 ~ 716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2022.5.JNS22579	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山 欣也
2. 発表標題 もやもや病患者脳動脈におけるトランスクリプトーム解析-RNF213 p.R4810K variantによる影響の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金森 史哲, 横山 欣也
2. 発表標題 もやもや病頭蓋内動脈の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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