

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04835

研究課題名（和文）血流と内皮細胞の相互作用から迫るもやもや病の発症機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of moyamoya disease pathophysiology through an interaction of hemodynamics and endothelial cells

研究代表者

富永 悌二（Tominaga, Teiji）

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：00217548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,500,000円

研究成果の概要（和文）：もやもや病は、本邦で発見された、両側内頸動脈終末部が進行性に狭窄・閉塞し、付近に異常血管網の発達を認める原因不明の疾患である。本研究の目的は、未だ不明であるもやもや病発症・進行のメカニズムを、血流と血管内皮の相互作用の観点から解明し、新規治療法の開発への足掛かりとすることである。数値流体力学的解析、流体培養を用いた解析、免疫学的解析、バイオマーカー探索、RNF213機能に関する解析の要素研究を展開した。結果として、RNF213遺伝子は血流によるShear stress依存的に変化し、白血球接着・遊走などから炎症に関与することが示され、血流と血管内皮の相互作用が病態に関与す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

未だ原因が不明、かつ若年者の脳卒中に関連するもやもや病の病態に、血流と血管壁の細胞の間の相互作用がかかわることを本研究で示しました。その結果として、様々な遺伝子産物や白血球の反応が変化することも示されました。また、血液中のデスモシンという物質が、もやもや病の進行に関係することなども示されました。本研究結果をさらに発展することで、もやもや病の新規治療薬の開発などにつながる可能性が示唆されました。

研究成果の概要（英文）：Moyamoya disease, discovered in Japan, is an idiopathic condition characterized by progressive stenosis and occlusion of the bilateral internal carotid arteries, along with the development of abnormal vascular networks. The aim of this study is to elucidate the mechanisms of onset and progression of moyamoya disease, which remain unknown, from the perspective of interactions between blood flow and vascular endothelium. We conducted elemental studies including computational fluid dynamics analysis, fluid culture analysis, immunological analysis, biomarker exploration, and analysis of RNF213 function. As a result, it was shown that the RNF213 gene changes in a shear stress-dependent manner due to blood flow, implicating it in inflammation through leukocyte adhesion and migration, suggesting that interactions between blood flow and vascular endothelium contribute to the pathology.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：もやもや病 RNF213 血流 内皮細胞 数値流体力学

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、本邦で発見された、両側内頸動脈終末部が進行性に狭窄・閉塞し、付近に異常血管網の発達を認める原因不明の疾患である。小児、若年成人における脳梗塞および脳出血をきたす原因となり、厚生労働省の指定難病である。疾患概念の確立から約半世紀が経過するが、その病態の詳細は未だ不明である。治療法としては浅側頭動脈・中大脳動脈吻合術(直接血行再建術)や、側頭筋や硬膜からの血管新生を期待した間接血行再建術などのバイパス手術の有効性は確立している。しかしながら、直接血行再建術に関してはドナー血管がすでに廃絶している再手術症例では施行できず、さらに予後不良群である重症脳梗塞発症小児例に対しては現行の術式では外科的治療介入そのものも困難なのが実情であり、病態解明と新規治療開発が求められている。

もやもや病は、本邦をはじめ東アジアに患者が集積しており、10-15%程度の患者が家族歴を有することから遺伝学的要因を中心に研究が展開されてきた。我々は、もやもや病患者の全ゲノム解析により、2011年に第17番染色体長腕に存在する ring finger protein (*RNF213*) 遺伝子を疾患感受性遺伝子として同定し、遺伝子多型 *RNF213* p.R4810K が東アジア患者に共通する創始者変異であることを明らかにした。ほぼ同時に Liu、森戸らも同一の遺伝子多型(それぞれ c.14576G>A, p.R4810K と記載しているが、同一の多型を表しているため、以後は *RNF213* 遺伝子多型と記載する)をもやもや病の疾患感受性遺伝子として報告した。東アジア人もやもや病患者の70-90%が *RNF213* 遺伝子多型を有しており、*RNF213* 遺伝子多型がオッズ比190.6ともやもや病と強く関連し、特にホモ型のもやもや病患者は早期発症で重症型が多いことが報告されていることから、もやもや病の病態を解明するうえで、*RNF213* 遺伝子の機能、特に *RNF213* 遺伝子多型の生理的意義を明らかにすることが不可欠と考えられる。我々は、*Rnf213* 遺伝子ノックアウトマウス (*Rnf213*-KO マウス) およびヒト p.R4810K のオースログ p.R4757K を強制発現したノックインマウス (*Rnf213*-KI マウス) を作製し、その詳細を解析している。

もやもや病の病態形成には複合的な要因の関与が疑われる。もやもや病の病態には *RNF213* 遺伝子多型をはじめとする遺伝学的要因の他に、血管発生的な異常の関与 (Interv Neuroradiol, 2003)、血管内皮細胞の障害 (J Cereb Blood Flow Metab, 2008)、血管内皮増殖因子や matrix metalloproteinase-9 等の液性因子 (J Neurol Neurosurg, 2010; J Cereb Blood Flow Metab, 2018) の関与が指摘されているが、い

ずれも単独因子ではもやもや病の病態を再現できず、*RNF213* 遺伝子多型をはじめとする遺伝学的異常を基盤として、二次的要因が加わることによりもやもや病を発症するという仮説 “two hit theory” が提唱されている (J Stroke, 2014; Neurol Med Chir (Tokyo), 2012; Neurosurg Focus, 2009) (図1)。しかしながら、もやもや病発症に関する決定的な知見は未だ得られていない。

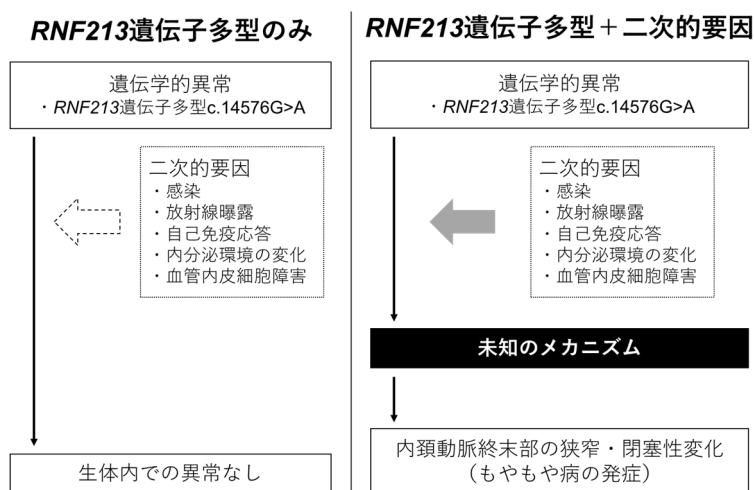


図1: もやもや病発症に関する two hit theory

頸動脈などの大血管狭窄では、数値流体力学 (CFD) を用いた解析から、血流の乱れが狭窄を進行させることが知られているが、もやもや病では血管形状が複雑であることから CFD 解析が難しいとされていた。最近我々は、もやもや病の複雑な血管をモデル化した CFD 解析を確立し、partial blood hammer 現象により、もやもや病の初期から血流不全が生じることを報告した (Sci Rep, 2020)。また、天体現象など大きなレベルで観察される「逆エネルギーカスケード」が血管狭窄部の直近でミクロのレベルで生じていることも発見し、狭窄部近傍の内皮細胞が、流れによ

りダイレクトにエネルギーを受け取っていることが分かった (Sci Rep, 2020)。力学(血流)と分子生物学(内皮細胞)とのクロストークとなる貴重な発見であり、流体下で血管内皮細胞を解析する重要性を示している。

そこで、ポンプを用いて血流を模した形の流体の中で血管内皮細胞を培養し、流れから生じる「ずり応力」と遺伝子発現の関連性を検証したところ、ずり応力の強さに依存してもやもや病関連遺伝子である *RNF213* の発現が変化することが明らかになった (J Cereb Blood Flow Metab, 2022)。

もやもや病の病変が内頸動脈終末部を中心に生じる原因は不明であるが、異常 *RNF213* による内皮機能・内膜の形態異常、抗原提示システムの攪乱、白血球接着能の異常、などの点から、「血流および血流から運ばれる免疫細胞」と内皮細胞との相互作用における *RNF213* の重要性が示唆される。病変の部位特異性を説明できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だ不明であるもやもや病発症・進行のメカニズムを、血流と血管内皮の相互作用の観点から解明し、新規治療法の開発への足掛かりとすることである。

3. 研究の方法

もやもや病の病態に關する事象を下記 ~ の5つの要素に分けて、研究を進行した。

(1) 数値流体力学的解析(CFD 解析)

もやもや病患者においてどのように血液が流れ、血管壁にはどのような力がかかるかを流体力学的手法を用いて解析した。具体的には、もやもや病患者から主要血管形状を抽出し、CFD 解析により得られた血管壁への圧力やずり応力等のパラメータと臨床所見、画像所見とを対比して血流が病態に及ぼす影響の検証を試みた。

(2) 流体培養を用いた解析

「流れ」の違いに応じた血管内皮細胞や平滑筋細胞の遺伝子やタンパク発現などについて検証した。

(3) 免疫学的解析

RNF213 遺伝子変異の有無による抗原処理機構の変化、白血球の血管内皮への接着能や、T細胞と血管内皮細胞の相互作用など、免疫学的な検証を行った。

(4) 臨床応用につながるバイオマーカー探索

研究成果を患者の治療に橋渡すため、内皮細胞の状態を反映したり、もやもや病の診断や病状進行を判断したりするためのバイオマーカーを探索した。

(5) *RNF213* に関する解析

RNF213 変異体の病態機能・細胞毒性についての検証などから *RNF213* に関する解析を行った。

4. 研究成果

(1) 数値流体力学的解析

もやもや病患者の流体学的解析を行い、個々の症例においては血流不全などを示せるものの(図2)、個体差も大きく、流体力学的手法の結果を汎化することは難しいと考えられた。

(2) 流体培養を用いた解析

流体培養の系で、壁せん断応力依存的に *RNF213* 遺伝子の発現が変化することを見出した (Zhang et al., J Cereb Blood Flow Metab, 2022) (図3)。また、壁せん断応力は、内皮細胞において血管新生を促すことも知られており (J Cell Physiol, 2020)。もやもや病の血管新生の病態につながっている可能性も示唆された。

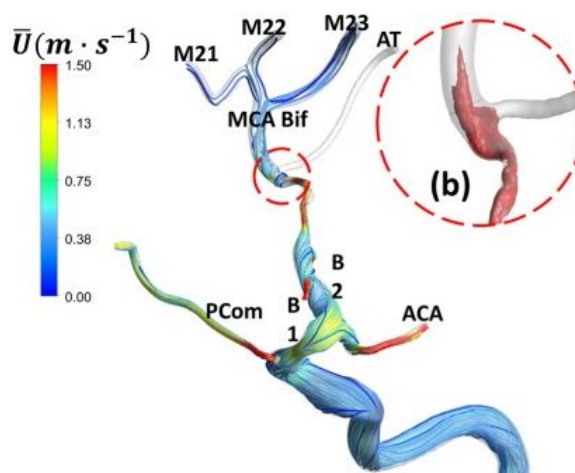


図2: もやもや病に対する CFD 解析

血管狭窄が進行する前から partial blood hammer 現象により血流不全が生じることが示された。Rashad et al., Sci Rep 10:3700, 2020 より転載

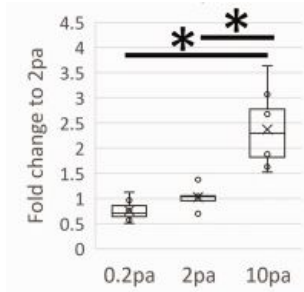


図 3: 流体培養下の *RNF213* 遺伝子発現
 ヒト血管内皮細胞を流体培養し PCR 法で *RNF213* 遺伝子発現を確認した。ずり応力増大とともに *RNF213* 遺伝子発現が上昇した。Zhang et al., J Cereb Blood Flow Metab 42:2107-2122, 2022 より転載

(3) 免疫学的解析

RNF213 遺伝子を siRNA を用いて knock down (KD) した血管内皮細胞 (HUVEC) と Mock の HUVEC を比較すると、*RNF213* 遺伝子の KD において、Selectin-E と VCAM 1 の発現が増加し、Selectin-P と ICAM-1 の発現が低下することが示された。また、白血球の trans migration assay では *RNF213* KD において白血球の遊走が低下することが示された。これらより、*RNF213* 遺伝子は、炎症の制御に関係することが示された (図 4)。

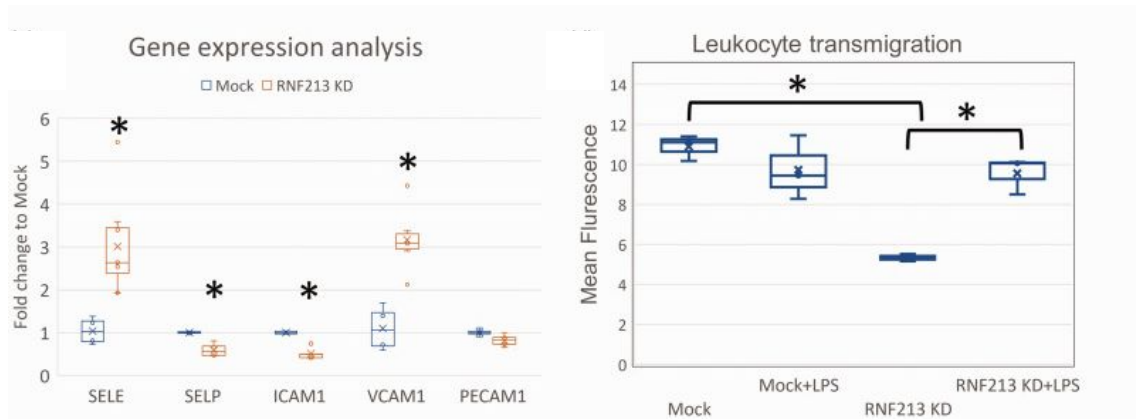


図 4: *RNF213* 遺伝子は白血球接着や遊走に関与する

左: *RNF213* 遺伝子を knock down した HUVEC 細胞と Mock の遺伝子発現を quantitative PCR で解析した。右: Leukocyte transmigration assay では、*RNF213* knock down で白血球遊走が低下することが示された。Zhang et al., J Cereb Blood Flow Metab 42:2107-2122, 2022 より転載

(4) 臨床につながるバイオマーカー探索

もやもや病患者の血清を用いてデスモシン類の発現を検証すると、狭窄性病変が進行した症例においてデスモシン類の発現が上昇していることが示された。デスモシン類がもやもや病の進行を示すバイオマーカーとなる可能性が示唆された (図 5)。

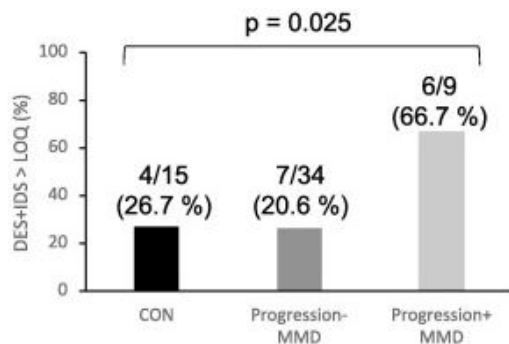


図 5: デスモシン類ともやもや病進行の関連性
 対照群や病変が進行しなかったもやもや病患者と比較して、病変の進行を認めたもやもや病患者において血漿のデスモシン類が増加していることが示された。Tashiro et al., Bioorg Med Chem 100:117602, 2024 より転載

(5) *RNF213* に関する解析

RNF213 遺伝子を HUVEC 細胞において knock down して Mock と比較することで *RNF213* の機能不全が血管内皮に与える影響を検証した。RNA シークエンス解析のクラスター解析の結果から、KD において細胞分裂・増殖に関連したシグナルが減少することが示された。また、オルガネラの組織化と細胞運動に関連する遺伝子の変動することも示された (図 6)。

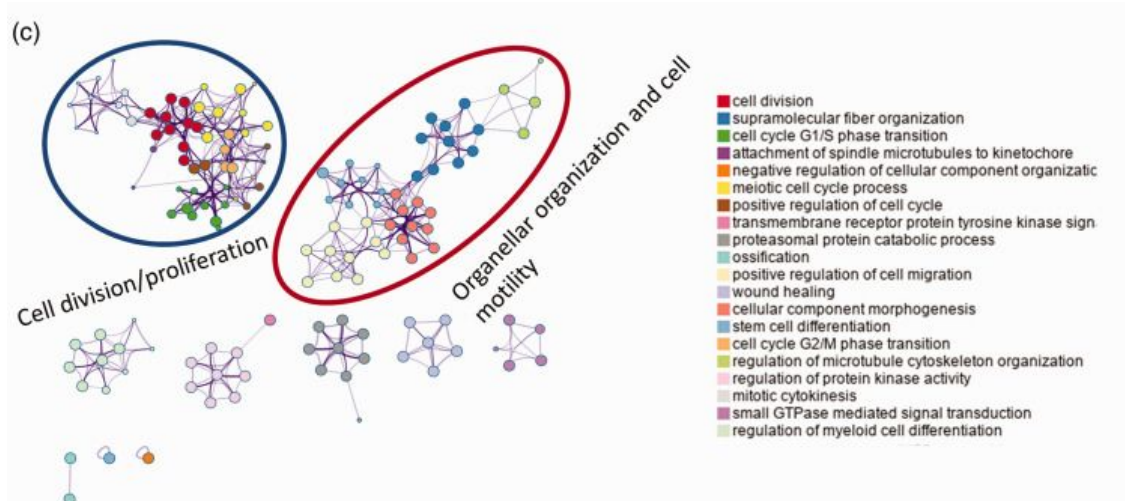


図 6: 血管内皮細胞における *RNF213* knock down が与える影響 (クラスター解析)
 HUVEC 細胞において *RNF213* 遺伝子を knock down し、RNA シークエンスを用いて遺伝子発現の変化を解析した。上記はクラスター解析から変化が観察されたシグナリング経路を示している。

また、*RNF213* 遺伝子の homozygote の変異がもやもや病と肺動脈狭窄の合併に関連することを見出し、学術誌に報告した (Ozaki et al., *Cerebrovasc Dis* 51:282-287, 2022)

これらより、様々な実験系から血流と内皮細胞、*RNF213* 遺伝子が相互に作用しながらもやもや病の病態を形成する可能性が示された。更なる検証から、これらを基礎とした新規の治療法開発につながることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ozaki Dan, Endo Hidenori, Tashiro Ryosuke, Sugimura Koichiro, Tatebe Shunsuke, Yasuda Satoshi, Tomata Yasutake, Endo Toshiki, Tominaga Keita, Niizuma Kuniyasu, Fujimura Miki, Tominaga Teiji	4. 巻 51
2. 論文標題 Association between RNF213 c.14576G>A Variant (rs112735431) and Peripheral Pulmonary Artery Stenosis in Moyamoya Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 282 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519717	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 Zhang Liyin, Rashad Sherif, Zhou Yuan, Niizuma Kuniyasu, Tominaga Teiji	4. 巻 42
2. 論文標題 RNF213 loss of function reshapes vascular transcriptome and spliceosome leading to disrupted angiogenesis and aggravated vascular inflammatory responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 2107 ~ 2122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X221110679	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 Tashiro Ryosuke, Anzawa Riki, Inoue Tomoo, Mikagi Ayame, Ozaki Dan, Tominaga Keita, Inoue Takashi, Ishida Tomohisa, Fujimura Miki, Usuki Toyonobu, Endo Hidenori, Niizuma Kuniyasu, Tominaga Teiji	4. 巻 100
2. 論文標題 The prognostic values of plasma desmosines, crosslinking molecules of elastic fibers, in the disease progression of Moyamoya disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117602 ~ 117602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2024.117602	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 Mikagi Ayame, Tashiro Ryosuke, Inoue Tomoo, Anzawa Riki, Imura Akiho, Tanigawa Takahiro, Ishida Tomohisa, Inoue Takashi, Niizuma Kuniyasu, Tominaga Teiji, Usuki Toyonobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Isotope-dilution LC-MS/MS analysis of the elastin crosslinkers desmosine and isodesmosine in acute cerebral stroke patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 31769 ~ 31777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ra06009d	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sherif Rashad, Liyin Zhang, Kuniyasu Niizuma, Teiji Tominaga
2. 発表標題 RNF213 loss of function reshapes vascular transcriptome and spliceosome
3. 学会等名 Brain Japan 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代亮介、新妻邦泰、笠松純、奥山祐子、Sherif Rashad、菊池敦生、藤村幹、呉繁夫、石井直人、富永悌二
2. 発表標題 Rnf213遺伝子変異による抗原提示能低下は抗原特異的T細胞応答の低下に寄与する
3. 学会等名 Stroke 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryosuke Tashiro, Hidenori Endo, Dan Ozaki, Taketo Nishizawa, Keita Tominaga, Yasutake Tomata, Kuniyasu Niizuma, Miki Fujimura, Teiji Tominaga
2. 発表標題 The clinical utility of the RNF213 founder variant (rs112735431) in the management of patients with moyamoya disease
3. 学会等名 WINC MOYAMOYA 2022 (国際学会)
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	藤村 幹 (Fujimura Miki) (00361098)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

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	Rashad Sherif (Rashad Sherif) (00824088)	東北大学・医工学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	新妻 邦泰 (Niizuma Kuniyasu) (10643330)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	森戸 大介 (Morito Daisuke) (20514251)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	
研究分担者	下田 由輝 (Shimoda Yoshiteru) (30815444)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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