

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590741

研究課題名(和文) 家族性Moyamoya病の分子発症機構の解明と脳血管疾患の予防医療の確立

研究課題名(英文) Clarification of the molecular pathogenesis of familial moyamoya disease and the establishment of preventive medicine for cerebrovascular disease

研究代表者

人見 敏明 (Hitomi, Toshiaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90405275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はMoyamoya病感受性遺伝子としてmysterinを同定し、東アジアに共通する創始者多型p.R4810Kを見いだした。Moyamoya病患者の協力によりMoyamoya病疾患iPS細胞を樹立し、分化誘導した血管内皮細胞において、健常者と比較しp.R4810K保因者は血管形成能の低下やSecurinを含むM期関連遺伝子群の発現が低下していることが分かった。またmysterin p.R4810K過剰発現によりMAD2機能阻害、M期の延長と有糸分裂異常およびゲノム不安定性の増加が見られた。mysterin p.R4810Kは、血管内皮細胞障害を引き起こし、脳血管の狭窄につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mysterin was recently identified as the susceptibility gene for moyamoya disease and its coding variant, p.R4810K, was identified as a common founder variant in East Asian countries. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) were established from unaffected fibroblast donors with wild-type mysterin alleles and carriers/patients with one or two mysterin p.R4810K alleles. Angiogenic activities of iPSC-derived vascular endothelial cells (iPSECs) from patients and carriers were lower than those from wild-type subjects. Furthermore, their gene expression profiles revealed that mitotic phase-associated genes, including Securin, were down-regulated in carriers and patients. Overexpression of mysterin p.R4810K induced MAD2 functional inhibition, delay of mitotic progression, mitotic abnormalities, and an increased risk of genomic instability. Thus, mysterin p.R4810K causes endothelial cell dysfunction and is considered to lead to stenosis of cerebral blood vessels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学 Moyamoya病 脳血管疾患 iPSC細胞 Mysterin (RNF213) Securin MAD2 M期関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

Moyamoya 病は、若年性脳卒中の主要な原因のひとつであり、東アジア地域、特に日本で多発し、わが国では特定疾患に指定されている。若年で発症することから、患者本人はもとより、患者を支える家族の負担も大きく、長期の治療を要するために、医療経済的にも重大な課題となっている。これらの問題を解決するために、早急な病態の解明が望まれる。

Moyamoya 病は、両側の内頸動脈終末部位が狭窄または閉塞し、それを補うように Moyamoya 血管を含めた側副血行路が発達する。内頸動脈の閉塞の原因としては、血管平滑筋細胞の萎縮や内膜への浸潤などの質的異常が指摘されているが(Aoyagi M. et al. Clin Neurol Neurosurg 99 (suple2): S213-S217, 1997)、その病態は不明な点が多い。我々は、三世代で常染色体優性遺伝形式を示す家系を用いて連鎖解析を行い、最終的に 17q25.3 に連鎖領域を同定した (Mineharu Y, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 1025-29, 2006, Mineharu Y, et al. Neurology 70: 2357-2363, 2007, Liu W. et al. Environ Health Prev Med, 15: 94-104, 2010)。この領域についてさらに詳細に解析を進めた結果、RNF213(mysterin)を Moyamoya 病の感受性遺伝子および p.R4810K を東アジアに共通する創始者多型として同定した(雑誌論文 8. Liu W. et al. PLoS ONE, 6(7): e22542, 2011)。

Mysterin 遺伝子は、591kDa の巨大タンパクをコードし、その機能は不明である。しかし、Mysterin の発現を抑制すると Zebra fish の頭蓋内動脈の異常を生じることから(雑誌論文 8. Liu W. et al. PLoS ONE, 6(7): e22542, 2011) mysterin は Moyamoya 病の主たる病変部位である血管において重要な役割を果たすことが強く示唆された。そこで、本研究では、Moyamoya 病患者由来の iPS 細胞を樹立、Moyamoya 病の病態の中心である血管内皮細胞への分化、得られた細胞を用いた細胞生物学的観察と mysterin の発現解析、Moyamoya 病感受性遺伝子 mysterin との Cross-talk 分子の同定を行う。

連鎖解析において、両側の Moyamoya 病のみならず、片側 Moyamoya 病や内頸動脈終末部狭窄・閉塞の患者も同一領域に連鎖し、一連の疾患としてとらえることが妥当である。また、我々は、Moyamoya 病が、脳血管に特有な細胞構築と Willis 輪の形成という血行動態の特性を場として、遺伝子異常により血管構造に破綻が生じた病態と考える。従って、Mysterin の機能を同定し、その病態を明らかにすることは、Moyamoya 病の病態だけでなく、脳血管疾患に共通した脳血管特異的な機能上、構造上の分子メカニズムを明らかにし、脳血管疾患の新たな予防医療の確立、展開につながると考えられる。

2. 研究の目的

日本人に多い脳血管疾患の中で、Moyamoya 病、脳動脈瘤および脳動静脈奇形は遺伝的負荷が強い。特に Moyamoya 病は若年性脳梗塞の原因となるが、その感受性遺伝子は不明であった。我々は、常染色体優性遺伝形式を示す 3 世代家系での Positional Cloning を行い、遺伝子座 17q25.3 に Moyamoya 病感受性遺伝子として新規タンパクをコードする mysterin を特定した。本研究では、Moyamoya 病患者より iPS 細胞の樹立と血管内皮細胞への分化 細胞生物学的観察と Mysterin の発現解析、mysterin と他分子との cross talk について検討することにより、脳血管疾患に共通した脳血管特異的な機能上、構造上の分子メカニズムを解明し、脳血管疾患の新たな予防医療の確立を目指す。

3. 研究の方法

我々は、本研究を遂行するに先立ち、Moyamoya 病患者由来の iPS 細胞作製において「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」および本研究の三省合同指針に基づいた研究計画書を京都大学医学部医の倫理委員会に提出し、すでに承認を得ている。Moyamoya 病患者より樹立した疾患 iPS 細胞を血管内皮細胞に分化し、細胞機能および遺伝子発現プロファイルの解析を行う。更に得られた結果より、mysterin p.R4810K の過剰発現に起因する細胞機能および細胞周期での表現型を同定し、そのメカニズムを特定する。

(1) iPS 細胞の樹立と血管内皮細胞への分化

三世代にわたる家族性 Moyamoya 病家系の研究参加者由来の繊維芽細胞へ山中 4 因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。得られた iPS 細胞から Moyamoya 病の罹患細胞種である血管内皮細胞へと分化した。

(2) Moyamoya 病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞を用いた血管内皮機能および遺伝子発現解析

Tube formation assay により血管形成能を解析した。DNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルを解析した。細胞増殖能、FACS および Live image による細胞周期 M 期および細胞分裂異常について評価した。

(3) Mysterin 野生型、p.R4810K 過剰発現および siRNA による発現抑制のヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト子宮頸がん細胞(HeLa)を用いた検討

細胞増殖能、細胞周期 M 期、細胞分裂異常および Tube formation assay を検討した。

(2) で発現低下していた細胞周期 M 期キ一因子である Securin 発現を検討した。細胞周期 M 期制御に主要な役割を果たす MAD2 (Mitotic arrest deficiency2)について、免

疫染色による M 期の局在および免疫沈降による複合体形成を解析した。

(4) Moyamoya 病患者由来の線維芽細胞を用いた mysterin p.R4810K の ex vivo での影響評価

ノコダゾール処理による M 期停止を誘導後、MAD2 局在およびギムザ染色によるゲノム不安定の検討を行った。

4. 研究成果

(1) Moyamoya 病特異的 iPS 細胞の樹立と血管内皮細胞への分化

Mysterin p.R4810K を有さない健常者 2 名、mysterin p.R4810K をヘテロあるいはホモで有する Moyamoya 病患者 3 名および遺伝子キャリアー 1 名から iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞に分化した。

(2) Moyamoya 病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞における血管形成能の低下

Moyamoya 病患者および遺伝子キャリアー由来の血管内皮細胞では健常者と比較して血管形成能の低下、および遺伝子発現プロファイルの顕著な違い、特に細胞分裂に關与する多数の遺伝子群の低下を認めた(雑誌論文 4. Hitomi T. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 438(1): 13-19, 2013.)。Mysterin R4810K を強制発現した HUVEC では野生型 mysterin 強制発現に比べ血管形成能が低下し、また細胞増殖が抑制されることが示された。血管内皮細胞で低下していた細胞分裂関連遺伝子群のうち、細胞の遊走機能に關与し血管形成に重要な役割を果たす Securin に着目した。Mysterin R4810K 強制発現 HUVEC において Securin が低下していることが明らかになった。また Securin 抑制によって HUVEC および血管内皮細胞において細胞増殖には影響を与えないが、血管形成を低下させることが示された。

(3) Moyamoya 病感受性変異体は有糸分裂異常によりゲノム不安定性を誘導

Mysterin R4810K を過剰発現させた HeLa 細胞では、細胞増殖が大きく低下し、細胞周期の M 期は約 4 倍に延長し、mitotic failure の頻度が上昇していた(雑誌論文 1. Hitomi T. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 439(4): 419-426, 2013.)。しかし、こうした形質は siRNA による mysterin 抑制では認めなかった。Mysterin 野生型発現細胞では M 期前中期において、MAD2 が染色体の動原体に存在するという正常な局在を示したのに対し、mysterin R4810K 発現細胞では MAD2 は動原体には存在せず、mysterin R4810K と共局在を示した。また、免疫沈降法により mysterin は MAD2 と複合体を形成すること、さらに、mysterin R4810K は野生型と比較してより強い複合体形成を示すことが明らかになり、mysterin R4810K が MAD2 への吸着により正常な局在を

阻害することが示唆された。また、ノコダゾール処理した Moyamoya 病患者由来線維芽細胞においては、健常者由来細胞と比較して、MAD2 の異常な局在および染色体異常性が有意に増加していることが明らかになった。さらに Moyamoya 病患者由来血管内皮細胞では M 期の延長および mitotic failure の増加が観察され、Moyamoya 病患者血管内皮細胞における有糸分裂異常が示された。本研究により、mysterin R4810K は MAD2 機能の阻害を通じて有糸分裂異常を引き起こし、ゲノム不安定性を誘導することが示された。

Moyamoya 病感受性遺伝子 mysterin の創始者変異 R4810K は Securin の発現低下を通じて血管内皮細胞の血管形成能を低下させることで、Moyamoya 病の病態に關与することが示唆された。また Mysterin R4810K は Moyamoya 病において有糸分裂異常、およびその結果生じる細胞死によって血管内皮細胞障害を引き起こし、脳血管の狭窄につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Koizumi A. et al. (20 名、1、3、20 番目)

The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K induces genomic instability by mitotic abnormality. *Biochem Biophys Res Commun.* 439(4): 419-426, 2013. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.067

Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Koizumi A. et al. (11 名、3、4、11 番目)

Genome-wide association study identifies no major founder variant in Caucasian moyamoya disease. *J Genet.* 92(3): 605-609, 2013. 査読有り DOI: 10.1007/s12041-013-0304-5

Mineharu Y, Hitomi T, Kobayashi H Koizumi A. et al. (9 名、6、7、8 番目)

Rapid Progression of Unilateral Moyamoya Disease in a Patient with a Family History and an RNF213 Risk Variant. *Cerebrovasc Dis.* 36(2): 155-7, 2013. 査読有り DOI: 10.1159/000352065

Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Koizumi A. et al. (20 名、1、3、20 番目)

Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya

patients. Biochem Biophys Res Commun. 438(1): 13-19, 2013. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.004

Kobayashi H, Hitomi T, Koizumi A. et al. (11名、1、8、11番目)
Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse Biochem Biophys Res Commun. 432(3):519-525, 2013. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.015

Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T. et al. (12名、1、2、8番目)
P.R4810K, a polymorphism of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease, is associated with blood pressure. Environ. Health Prev. Med. 18(2):121-129, 2013. 査読有り DOI: 10.1007/s12199-012-0299-1

Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Koizumi A. et al. (5名、2、3、5番目)
Distribution of Moyamoya Disease Susceptibility Polymorphism p.R4810K in RNF213 in East and Southeast Asian Populations Neurol. Med. Chir. 52(5): 299-303, 2012. 査読有り <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688066>

Liu W, Kobayashi H, Hitomi T, Koizumi A. et al. (23名、5、6、23番目)
Identification of RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease and Its Possible Role in Vascular Development. PLoS ONE. 6(7): e22542, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022542

〔学会発表〕(計 9 件)

人見 敏明、Mysterin ともやもや病、第 21 回日本血管生物医学学会学術集会、代謝異常と心血管病、2013 年 9 月 26 日 9 月 28 日、千里阪急ホテル。

小泉 昭夫、Moyamoya 病のミニレビューと今後の研究の方向、第 13 回分子予防環境医学研究会、シンポジウム 環境要因制御へ向けての分子医学的アプローチ (Part)。2014 年 1 月 31-2 月 1 日 和歌山県民文化会館

小林 果、Mysterin 遺伝子の R4810K 多型はもやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞において Securin の発現抑制を介して血管形成能を低下させる、第 13 回分子予防環境医学研究会。2014 年 1 月 31-2 月 1 日 和歌山県民文化会館

人見 敏明、もやもや病感受性変異体

Mysterin R4810K は有糸分裂異常によりゲノム不安定性を誘導する、第 13 回分子予防環境医学研究会。2014 年 1 月 31-2 月 1 日 和歌山県民文化会館

人見敏明、もやもや病特異的 iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導、第 83 回日本衛生学会総会。2013 年 3 月 24-26 日；金沢大学

小林 果、ゼブラフィッシュモデルによるもやもや病感受性遺伝子 mysterin の機能解析、第 82 回日本衛生学会総会。2012 年 3 月 24-26 日；京都大学

人見 敏明、もやもや病感受性遺伝子である ATPase/コピキチンリガーゼ Mysterin の生化学的検討、第 82 回日本衛生学会総会。2012 年 3 月 24-26 日；京都大学

人見敏明、「もやもや病」特異的 iPS 細胞の樹立と血管内皮細胞への分化誘導、第 82 回日本衛生学会総会。2012 年 3 月 24-26 日；京都大学

人見敏明、もやもや病感受性遺伝子 mysterin の同定と血管発生への関与、第 11 回分子予防環境医学研究会。2012 年 1 月 28 日；川崎医科大学

〔図書〕(計 3 件)

小林 果、人見 敏明、小泉 昭夫、中外医学社、Clinical Neuroscience、2013、1456-1457。

小林 果、人見 敏明、小泉 昭夫、北隆館、BioClinica、2013、87-91。

小泉 昭夫、小林 果、人見 敏明、医学書院、脳神経外科、2012、105-118。

〔産業財産権〕

取得状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hes.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 敏明 (HITOMI TOSHIAKI)
京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90405275

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

小泉 昭夫 (KOIZUMI AKIO)
京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50124574

小林 果 (KOBAYASHI HATASU)
京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70542091