

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390343

研究課題名(和文) 頭蓋内主幹動脈閉塞性疾患における分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of major intracranial arterial stenosis

研究代表者

宮本 享 (Miyamoto, Susumu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70239440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：1. 家族性もやもや病におきてRNF213遺伝子に変異が認められた家系の患者の皮膚より、繊維芽細胞を採取し、iPS細胞を作成した。計3系統のiPS細胞が樹立され、筋肉や内皮細胞へ分化に異常が認められた。2. もやもや病患者から中大脳動脈片を採取し、病理学的に解析した。小児例、成人例ともに中大脳動脈内皮と中膜に異常が認められ、この病変において頭蓋内血管も障害されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：1. iPS cell was established from fibroblast obtained from the patients with familial moyamoya disease. Abnormal smooth muscle and endothelial cells were induced from these cells. 2. The tiny tips of middle cerebral arteries were obtained during surgical procedures. They were analyzed immunohistochemically. Abnormality in media and intima was recognized. This observation indicated that moyamoya disease affected the peripheral intracranial arteries.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳神経外科学 脳卒中

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は厚生労働省の人口動態統計における国民年間死亡原因の第3位を長年占めている。しかも、厚生労働省の介護給付費実態調査によると要介護の原因となった疾患の内約3割が脳血管疾患であり、特に男性においてはその割合は4割以上と報告されている。脳血管疾患の半分以上を占める脳梗塞の主な原因の一つにアテローム血栓性脳梗塞があり、頭蓋内血管の狭窄も重要な一因である。しかし、頸動脈疾患や冠血管の動脈硬化による狭窄と比較して、その分子メカニズムに不明な点が多い。

2. 研究の目的

頭蓋内血管の狭窄は脳卒中の主な原因の一つである。しかし、頸動脈疾患や冠血管の動脈硬化による狭窄と比較して、その分子メカニズムに不明な点が多い、そこで今回の研究ではターゲットを頭蓋内主幹動脈とし、狭窄のメカニズムを明らかとし、予防法を開発する。

3. 研究の方法

- ① 京都大学 iPS 細胞研究センターで樹立した iPS 細胞を用いて、平滑筋細胞および内皮細胞への分化を誘導する。通常の分化した細胞を用いて、epigenetic な解析を行う。正常なヒト細胞から樹立した iPS 細胞と比較して内皮細胞、血管平滑筋細胞の分化割合、増殖能を評価する
- ② 動脈硬化性動脈狭窄患者の中大脳動脈切片を用い RNF213 タンパクの発現を免疫組織学的アプローチ、および in situ hybridization にて解析する
- ③ 動脈硬化性動脈狭窄患者からの血液に RNF213 遺伝子の異常が認められるかを、SNP 解析により検討する。
- ④ もやもや病患者および動脈硬化性病変患者の中大脳動脈、髄液、硬膜などの生

体試料を採取し保存する。生体試料（もやもや病および動脈硬化性病変）について epigenetic な状態の評価を行い、iPS 由来の細胞と比較検討する。手術時に、安全な範囲で採取できる生体試料を集める。採取した組織は、すぐに液体窒素にて冷凍し、厳重に管理された deep freezer にて管理を行う。これらの組織において免疫組織学的アプローチ、および in situ hybridization と laser capture microdissection にて DNA、タンパク解析を行う。

- ⑤ 内皮細胞あるいは平滑筋細胞の由来の細胞系列を用いて、明瞭な疾患特異的指標を探索する。
- ⑥ 以上の実験で得られた異常遺伝子、異常 microRNA を、欠損させたマウスを作成し形質を検討する
- ⑦ RNF213 タンパク欠損マウスを作成し、そのマウスにおける頭蓋内血管病変の有無と特徴を解析する。またこのマウスより得られた血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を培養し、その特徴について解析する。

4. 研究成果

京都大学 iPS 細胞研究センターで樹立した iPS 細胞を用いて、平滑筋細胞および内皮細胞への分化を誘導した。正常なヒト細胞より樹立された iPS 細胞と比較して内皮細胞、血管平滑筋細胞の分化割合、増殖能を評価し、もやもや病由来の内皮細胞は管腔形成能が低下していることが確認された。また RNF213 タンパクを欠損させたマウスでは表現型に異常を認めなかった。成人および小児もやもや病患者とコントロール患者から採取した中大脳動脈血管壁を病理学的に検討した。もやもや病患者においては成人症例から採取した血管壁で小児症例より内皮の肥厚が著明であることが示された。RNF213 を in vitro で siRNA にて deletion を行うと

- Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 4;439(4):419-26.
7. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Aug 16;438(1):13-9.
 8. Fukuda M, Aoki T, Manabe T, Maekawa A, Shirakawa T, Kataoka H, Takagi Y, Miyamoto S, Narumiya S. Exacerbation of intracranial aneurysm and aortic dissection in hypertensive rat treated with the prostaglandin F-receptor antagonist AS604872. *J Pharmacol Sci*. 2014;126(3):230-42
 9. Kobayashi H, Matsuda Y, Hitomi T, Okuda H, Shioi H, Matsuda T, Imai H, Sone M, Taura D, Harada KH, Habu T, Takagi Y, Miyamoto S, Koizumi A. 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*. 2015 Jun 30;4(7).
 10. Funaki, T, Fushimi, Y, Takahashi, J.C, Takagi, Y, Araki, Y, Yoshida, K, Kikuchi, T, Miyamoto, S. Visualization of periventricular collaterals in moyamoya disease with flow-sensitive black-blood magnetic resonance angiography: Preliminary experience. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015;55:3(20):204-209.
 11. Takagi Y, Miyamoto S. Cognitive Dysfunction Survey of the Japanese Patients with Moyamoya Disease (COSMO-JAPAN Study): study protocol. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015;55:3:199-203. 25739435.
 12. 宮本 享, 高橋 淳, 舟木 健史 日本における大規模臨床試験 Japan Adult Moyamoya (JAM) Trial (解説/特集) 日本臨床 (0047-1852) 72 巻増刊 7 最新臨床脳卒中学(下)
 13. 舟木 健史, 高橋 淳, 宮本 享 もやもや病出血予防のための手術療法(解説/特集) 診断と治療 (0370-999X) 103 巻 1 号 Page95-99
- [学会発表] (計 1 件)
1. Cognitive dysfunction survey of Moyamoya disease (COSMO-JAPAN study) 高木康志. 第 44 回日本脳卒中の外科学会学術集会 2015 シンポジウム.
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

高木 康志 (TAKAGI, Yasushi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40312227

高橋 淳 (TAKAHASHI, Jun)

国立循環器病研究センター・部長

研究者番号：90551408