

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670470

研究課題名(和文)モヤモヤ病の発症リスクと予後の予測を可能にする遺伝診断法の開発

研究課題名(英文)Genetic testing for risk evaluation of Moyamoya disease

研究代表者

呉 繁夫(Kure, Shigeo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10205221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：モヤモヤ病は両側ウイリス動脈輪の閉塞による脳虚血と異常側副血管新生による出血とを特徴とし、小児脳卒中の主因をなす。申請者らは、日本人MMD患者の全ゲノム相関解析により疾患感受性遺伝子RNF213を特定し、MMD患者の72%に共通なミスセンス変異を同定した。本研究では、まず、アレル特異的オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションと免疫クロマトグラフィー法を組合わせた方法で、高頻度ミスセンス変異を迅速に検出する簡易遺伝子検査法を確立した。さらに簡易遺伝子検査と頭部MRアンギオグラフィー(MRA)をもやもや病家系で検索することで、MMDの発症リスク予測を検討した。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease is characterized by progressive bilateral internal carotid artery stenosis/occlusion and development of abnormal collateral vessels. A genome-wide association study was performed, which resulted in a strong association of RNF213 gene region with risk for Moyamoya disease. Mutational analysis identified a founder mutation c.14576G>A in 73% cases with Moyamoya disease and 1.4% of control individuals, suggesting that the mutation carriers have increased risk for Moyamoya disease, odds ratio, 190.9 ( $P=1.2 \times 10^{-43}$ ). We developed a genetic testing for this founder mutation by combination of immunochromatography and allele specific oligonucleotide hybridization. We performed this genetic test and MRI angiography in Moyamoya disease patients and their families for development of presymptomatic diagnosis of Moyamoya disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：内科系臨床医学 小児神経学 遺伝子診断 MRアンギオグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

モヤモヤ病 (MMD) は両側ウイリス動脈輪の閉塞と異常側副血管新生による脳虚血・出血を特徴とする疾患で、脳出血発症後の予後は悪い。最近、浅側頭動脈と中大脳動脈とのバイパス手術による早期介入で予後が改善する事が示されている。実際に脳ドックで見出された症例の予後は良い。発症リスクの高い個体を見出し、早期バイパス手術による介入を可能にするスクリーニング法の開発が予後改善に有用と考えられる。

申請者らは全ゲノム関連研究を行い、MMD 感受性領域を同定した。その中で 17 番染色体領域から、MMD 感受性遺伝子 RNF213 を同定し、その遺伝子内に MMD 患者の 73% が持つ創始者変異 (c.14576G.A) を見出した (J Hum Genet, 2011)。この変異により MMD 発症リスクが 190 倍に上昇するため、MMD リスク診断が可能となり、特許出願した (特許第 5585976 号「遺伝子検出によるモヤモヤ病発症リスク診断又は診断法」)。

その後、多数の RNF213 遺伝子変異を解析した結果、この高頻度創始者変異 c.14576G>A のホモ接合体はヘテロ接合体に比べ、4 歳未満の早期発症者が多く、一過性脳虚血発作よりも重篤である梗塞で発症する症例が多く、予後に関連することを示した (Neurology, 2012)。

## 2. 研究の目的

～次の 2 つを目的として研究を実施する

### (1) 迅速遺伝子検査法の開発

MMD 患者の全ゲノム関連研究で見いだした疾患感受性遺伝子 RNF213 内に存在する日本人高頻度遺伝子変異 c.14576G.A の有無を迅速・簡便に検出する遺伝子検査法の開発を行い、MMD 発症リスクの正確な評価を外来やベッドサイドで可能にすることを目的にする。

### (2) MR アンギオグラフィー所見の解析

MMD 患者家系でこの遺伝子検査を実施し変異保有者を同定する。同定された変異保有者に対し、MR アンギオグラフィー検査を実施することで、発症前診断に利用可能な MR アンギオグラフィー上の所見を見いだす。

## 3. 研究の方法

### (1) 検出方法

変異の検出には、申請者らが以前開発した CASSOH (competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization) 法を利用する。

CASSOH 法は、10-15 塩基の短いオリゴヌクレオチド・プローブの競合的な結合を利用して、点変異の有無を検出する変異検出法である。

実際の手技は、図 1 に示すような大変簡単な手技で実施可能である。まず、PCR 反応にて変異部位を増幅し、その後反応液をイムノクロマトグラフィーストリップ上に添加し、展開液に浸すことにより、競合的ハイブリダイゼーションが実施され、その結果をストリップ上に現れた紫色のバンドとして検出するだけであるため、非常に簡便・迅速な検出が可能になる。

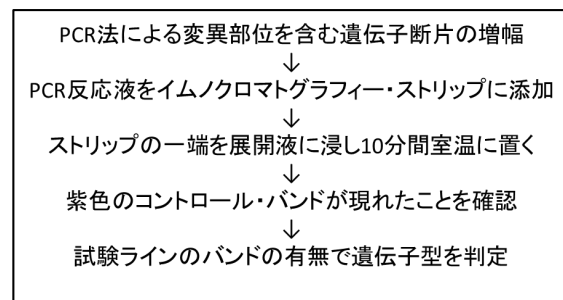


図 1 CASSOH 法の手順

### (2) 実際の検出原理

PCR 反応にて増幅された変異を含む DNA 断片とビオチン標識されたオリゴヌクレオチドの結合を金粒子の標識されたアビジンにて検出する。この際、遺伝変異がありミスマッチが存在すると、オリゴヌクレオチドの結合が弱まる事を 1 塩基置換検出の基本原則としている。野生型遺伝子配列と相補的な変異型遺伝子配列と相補的な遺伝子配列を持つオリゴヌクレオチド・プローブをそれぞれ合成し、5'末端をビオチン標識する。

この標識されたオリゴヌクレオチドを競合させる非標識のオリゴヌクレオチドを競合体として反応系に添加することで、点変異検出の特性性を向上させる。この競合体として用いるのは、10-15 塩基対という比較的短いオリゴヌクレオチドで、この短い競合体オリゴヌクレオチドの配列を工夫することで、非特異的結合を押さえながらシグナル強度を保つことができる。

### (3) 倫理的配慮

遺伝子検査および MRA 検査の施行に当たっては、インフォームド・コンセントを書面で取得する。モヤモヤ病患者の遺伝子解析による疾患感受性遺伝子の同定に関する研究は、東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている (承認番号 2010-424、平成 22 年 12 月 27 日承認)。

#### 4 . 研究成果

検出プローブと競合配列を持つオリゴヌクレオチドを混合することにより、特異的な遺伝子型の判定が可能になった。この遺伝子検出法には、PCR 以外の検査機器を必要としない。MMD 患者の約半数は小児である。家族に MMD 患者が存在する場合、子どもの MMD 発症のリスクは高くなるため、MMD 発症の不安が大きい。今回の研究では、病院の検査室のみならず、クリニックにおいて遺伝子診断変を実施し、その保因者の MRA アンギオグラフィ検査を実施することで、より確度の高い発症予測が可能になることが期待できる。

遺伝子検出に用いる二つの PCR 反応液には、増幅プライマーのみならず、検出プローブや競合オリゴヌクレオチドを加えた状態で PCR サイクルを実施するため、予め増幅・検出に必要な全ての試薬が含まれたプレミックスを準備することが可能である。検出プローブや競合オリゴヌクレオチドは長さが短いため、55~94 といった PCR 反応の温度条件では、常に非結合状態となるため、一緒に PCR 反応を行っても増幅反応が阻害される恐れがないことが、このプレミックスの作成を可能にしている。

今後は、症例数を増やすと共に、MR アンギオグラフィだけでなく、MRI 検査における基底核 flow void や脳表の ivy sign を含む軽微な画像変化、等を注視し、未発症保因者の持つ MRI 所見を検討していく予定である。

#### 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 19 件)

1. Nakayama T, Sato Y, Uematsu M, Takagi M, Hasegawa S, Kumada S, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Sasahara Y, Haginoya K, Kure S. Myoclonic axial jerks for diagnosing atypical evolution of ataxia telangiectasia. *Brain Dev.* 2015;37:362-5. doi: 10.1016/j.braindev.2014.06.001. (査読有)
2. Kimura M, Kikuchi A, Ichinoi N, Kure S. Novel TBX5 duplication in a Japanese family with Holt-Oram syndrome. *Pediatr Cardiol.* 2015;36:244-7. doi: 10.1007/s00246-014-1028-x. (査読有)
3. Ito A, Fujimura M, Niizuma K, Kanoke A, Sakata H, Morita-Fujimura Y, Kikuchi A, Kure S, Tominaga T. Enhanced

post-ischemic angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res.* 2015;1594:310-20. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.014. (査読有)

4. Numata Y, Uematsu M, Suzuki S, Miyabayashi T, Oyama T, Kubota S, Itoh T, Hino-Fukuyo N, Takahashi T, Kure S. Aquaporin-4 autoimmunity in a child without optic neuritis and myelitis. *Brain Dev.* 2015;37:149-52. doi: 10.1016/j.braindev.2014.03.015. (査読有)
5. Inui T, Kobayashi T, Kobayashi S, Sato R, Endo W, Kikuchi A, Nakayama T, Uematsu M, Takayanagi M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Kure S, Haginoya K. Efficacy of long term weekly ACTH therapy for intractable epilepsy. *Brain Dev.* 2015;37:449-54. doi: 10.1016/j.braindev.2014.07.004. (査読有)
6. Moriya K, Kaneko MK, Liu X, Hosaka M, Fujishima F, Sakuma J, Ogasawara S, Watanabe M, Sasahara Y, Kure S, Kato Y. IDH2 and TP53 mutations are correlated with gliomagenesis in a patient with Maffucci syndrome. *Cancer Sci.* 2014 Mar;105:359-62. doi: 10.1111/cas.12337. (査読有)
7. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Nishijima Y, Ito A, Shimizu H, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res.* 2014 Mar 13;1552:64-71. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.011. (査読有)
8. Kaga A, Ohwada T, Uematsu M, Takano T, Kure S. Late vitamin K deficiency bleeding in an infant born at a maternity hospital. *Pediatr Int.* 2014 Feb;56:127-8. doi: 10.1111/ped.12265. (査読有)
9. Moriya K, Kakisaka Y, Onuma M, Sasahara Y, Kure S. Unilateral phrenic nerve palsy: a rare manifestation of vincristine neurotoxicity: correspondence. *Indian J Pediatr.* 2014 Dec;81:1429. doi: 10.1007/s12098-014-1394-7. (査読有)

10. Munakata M, Togashi N, Sakamoto O, Haginoya K, Kobayashi Y, Onuma A, Iinuma K, Kure S. Reduction in glutamine/glutamate levels in the cerebral cortex after adrenocorticotrophic hormone therapy in patients with west syndrome. *Tohoku J Exp Med*. 2014;232:277-83. ( 査読有 )
11. Wakusawa K, Sugiura M, Sassa Y, Jeong H, Yomogida Y, Horie K, Sato S, Yokoyama H, Kure S, Takei N, Mori N, Kawashima R. Adaptive ability to cope with atypical or novel situations involving tool use: an fMRI approach. *Neurosci Res*. 2015;72-82. doi:10.1016/j.neures.2014.03.008. ( 査読有 )
12. Kanamori M, Kikuchi A, Watanabe M, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Kumabe T, Kure S, Tominaga T. Rapid and sensitive intraoperative detection of mutations in the isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes during surgery for glioma. *J Neurosurg*. 2014 Jun;120:1288-97. doi: 10.3171/2014.3.JNS131505. ( 査読有 )
13. Fujimura M, Sonobe S, Nishijima Y, Niizuma K, Sakata H, Kure S, Tominaga T. Genetics and Biomarkers of Moyamoya Disease: Significance of RNF213 as a Susceptibility Gene. *J Stroke*. 2014 May;16:65-72. doi: 10.5853/jos.2014.16.2.65. ( 査読有 )
14. Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet*. 2014;23:6553-66. doi: 10.1093/hmg/ddu376. ( 査読有 )
15. Abe Y, Kikuchi A, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Kunishima S, Kure S, Haginoya K. Xq26.1-26.2 gain identified on array comparative genomic hybridization in bilateral periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. *Dev Med Child Neurol*. 2014;56:1221-4. doi:10.1111/dmcn.12553. ( 査読有 )
16. Zhang ZH, Yang ZG, Chen FP, Kikuchi A, Liu ZH, Kuang LZ, Li WM, Song YZ, Kure S, Saheki T. Screening for five prevalent mutations of SLC25A13 gene in Guangdong, China: a molecular epidemiologic survey of citrin deficiency. *Tohoku J Exp Med*. 2014;233:275-81. ( 査読有 )
17. Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord*. 2014;24:1068-72. doi: 10.1016/j.nmd.2014.07.008. ( 査読有 )
18. Moriya K, Katayama S, Onuma M, Rikiishi T, Hosaka M, Watanabe M, Hasegawa T, Sasahara Y, Kure S. Mesenchymal chondrosarcoma diagnosed on FISH for HEY1-NCOA2 fusion gene. *Pediatr Int*. 2014;56:e55-7. doi: 10.1111/ped.12407. ( 査読有 )
19. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Furudate S, Nishijima Y, Kure S, Tominaga T. Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213: moyamoya disease susceptibility gene. *Neuroreport*. 2014;25:1442-6. doi:10.1097/WNR.0000000000000289. ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 1 件)

呉 繁夫「小児難病の gene hunting」第4回広島小児神経懇話会 2015年1月25日 つくば国会議場、つくば市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10205221

##### (2) 研究分担者

富永 悌二 (TOMINAGA TEIJI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00217548