

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460801

研究課題名(和文) IFNによるもやもや病感受性遺伝子の発現機構解析と脳血管疾患の予防医療の確立

研究課題名(英文) Mechanisms of moyamoya-susceptible gene expression by interferon and the establishment of preventive medicine for cerebrovascular disease

研究代表者

人見 敏明 (Hitomi, Toshiaki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90405275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はもやもや病感受性遺伝子mysterin(RNF213)と東アジアに共通する創始者変異R4810Kを同定した。インターフェロン(IFN)- γ は、ヒト臍静脈内皮細胞でmysterin発現を増加し、IFN- γ によるanti-angiogenic effectはmysterin抑制によってレスキューされた。また、IFN- γ はもやもや病患者および健康者のiPS細胞由来血管内皮細胞においてもmysterin発現を増加し、血管形成能を減少させた。MysterinはIFN- γ によるangiogenesis抑制の重要なmediatorであり、感染症がもやもや病発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mysterin (RNF213) is a susceptibility gene for moyamoya disease (MMD) and its coding variant, p.R4810K, is a common founder variant in East Asian countries. Several angiogenic and anti-angiogenic factors [including interferons (IFNs), IFN- α and IFN- γ] induced transcriptional expression of mysterin in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). In HUVECs, upregulation of mysterin by IFN- γ is mediated by a STAT1-binding site on the mysterin gene promoter. The anti-angiogenic activities of IFN- γ are partially rescued by siRNA for STAT1, and completely rescued by siRNA for mysterin. Treatment with IFN- γ induced mysterin mRNA and decreased angiogenesis in induced pluripotent stem cells-derived vascular endothelial cells (iPSECs) derived from control subjects and patients with MMD. Our data suggest that mysterin mediates the IFN- γ anti-angiogenic signaling pathway; MMD may impair angiogenesis in patients with infectious or autoimmune disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：予防医学 感染症 もやもや病 mysterin (RNF213) インターフェロン 脳血管疾患 血管内皮細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、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、我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、患者を支えている家族の負担も大きく、また長期の治療を要するため、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。

近年、我々はもやもや病感受性遺伝子として *mysterin*(RNF213)を同定し、東アジアに共通する創始者変異 R4810K を見いだした (Liu W, *et al.* PLoS ONE,6(7): e22542, 2011)。もやもや病患者の協力によりもやもや病疾患 iPS 細胞を樹立し、分化誘導した罹患細胞種である血管内皮細胞 (iPSECs) において、健常者と比較し R4810K 保因者は tube formation 形成異常や 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 (Hitomi T. *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 438(1): 13-19, 2013)。また *mysterin* R4810K 過剰発現により M 期の延長と mitotic failure およびアポトーシスの増加が見られた (Hitomi T. *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 439(4): 419-26, 2013)。

これまでに得られた知見から、*mysterin* は細胞分裂やアポトーシスに関与しており、もやもや病においては *mysterin* R4810K が血管内皮細胞の機能異常や脱落を通じて脳血管病変を引き起こすと考えられる。しかしながら、R4810K 保因者のうちもやもや病を発症するのは 300 人に 1 人であることから、発症には環境要因が必須であると考えられる。我々は感染症に関連するインターフェロン(IFN)が *mysterin* タンパクを強く発現誘導するという結果から、感染症が発症の引き金になると想定し、以下のような仮説を持った。血管壁では、内皮細胞の障害や脱落が起こると、残存した周囲の血管内皮細胞や血液中の血管内皮前駆細胞が分裂・分化して補充が行われる。R4810K 保因者においては、感染症による高 IFN 状態が *mysterin* 変異体を過剰発現させることにより血管内皮の機能低下、M 期異常、アポトーシスが引き起こされることで、内皮細胞の修復が遅れ、その結果、血管平滑筋細胞の増殖を引き起こし、血管の閉塞性変化となり、もやもや病を発症すると考えられる。本研究では、上記の仮説を検証するために IFN による *mysterin* 誘導、R4810K を有するもやもや病患者由来 iPSEC での IFN 処理による影響、R4810K による他分子との相互作用について検討する。

我々は、もやもや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 *mysterin* R4810K により血管構造に破綻が生じた病態と考える。従って、IFN

による *mysterin* 遺伝子の発現機構を解析し、その病態を明らかにすることは、もやもや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

我々は東アジアに共通するもやもや病感受性遺伝子 *mysterin* および創始者変異 R4810K を同定した。疾患 iPS 細胞から得られた結果から、R4810K は血管内皮で細胞分裂異常やアポトーシスを起こすことが示唆されたが、日中韓で 1,500 万人以上保因者が存在することから R4810K がもやもや病を引き起こすためには、環境要因の関与が必要である。

本研究では感染症がもやもや病の環境要因であるという仮説を、*mysterin* 発現活性化因子のスクリーニングおよび IFN による *mysterin* 遺伝子発現解析、IFN 処理したもやもや病患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞を用いた *mysterin* R4810K 過剰発現による細胞分裂異常およびアポトーシスの検討、R4810K による他分子との cross talk について検討することで証明し、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、もやもや病をはじめとした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、もやもや病患者由来の 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。*Mysterin* 活性化因子のスクリーニング、IFN による *mysterin* 遺伝子発現解析、血管内皮細胞を用いた IFN によるもやもや病感受性遺伝子 *mysterin* 変異体 R4810K の分子メカニズムの解明と内皮機能障害を検討する。

(1) *Mysterin* 発現活性化因子のスクリーニング

ヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞およびヒト臍静脈内皮細胞 HUVECs を用い、感染症に関連する Transforming growth factor (TGF)- β 、Interleukin (IL)-1 β 、Vascular endothelial growth factor (VEGF) および Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB の 4 つの angiogenic factor と IFN- α 、IFN- β および IFN- γ の 3 つの anti-angiogenic factor による *mysterin* 遺伝子発現への影響をウエスタンブロット法および

Realtime-qPCR 法により評価した。

(2) IFN-β による *mysterin* 遺伝子プロモーターへの影響

Mysterin 遺伝子の転写開始点より上流 -513 ~ -505 の STATx (TF search, score 86.5) を含む *mysterin* 遺伝子プロモーターおよび STATx に変異をいれたコンストラクトを使用し、IFN-β による *mysterin* 遺伝子プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイにより評価した。また、STAT1 siRNA により、IFN-β による *mysterin* 発現への影響をウエスタンブロット法により評価した。

(3) IFN-β による *mysterin* 野生型および R4810K の血管内皮機能への影響

HUVECs および iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞 (iPSEC、家族性もやもや病患者 (R4810K) および健常者由来) を用いて、IFN-β による angiogenesis を tube formation assay および migration assay で検討した。*Mysterin* siRNA による発現抑制下においても同様に検討を行った。

4. 研究成果

(1) *Mysterin* 発現活性化因子のスクリーニング

検討した因子のうち、HeLa 細胞では IFN-β のみ *mysterin* の発現を増加し、HUVECs では IFN-β および IFN-γ が *mysterin* の発現を誘導し、IFN-β は血管内皮細胞において IFN-γ より低濃度で *mysterin* の発現をより強く誘導した (図 1) (雑誌論文 5. Kobayashi H. *et al.* J Am Heart Assoc. 4: e002146, 2015.)。

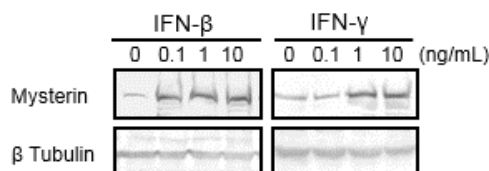


図 1 HUVECs における IFN による *mysterin* 誘導

(2) IFN-β による *mysterin* 遺伝子プロモーターへの影響

HUVECs において、IFN-β は *mysterin* 遺伝子プロモーター上の STAT1 結合部位を介して *mysterin* 発現誘導を行うことが明らかとなった。

(3) IFN-β による *mysterin* 野生型および R4810K の血管内皮機能への影響

HUVECs において、Tube formation assay (図 2A) および Migration assay (図 2B) により、IFN-β による anti-angiogenic effect は siRNA による *mysterin* 抑制により、血管内皮機能をレスキューされることが示された。

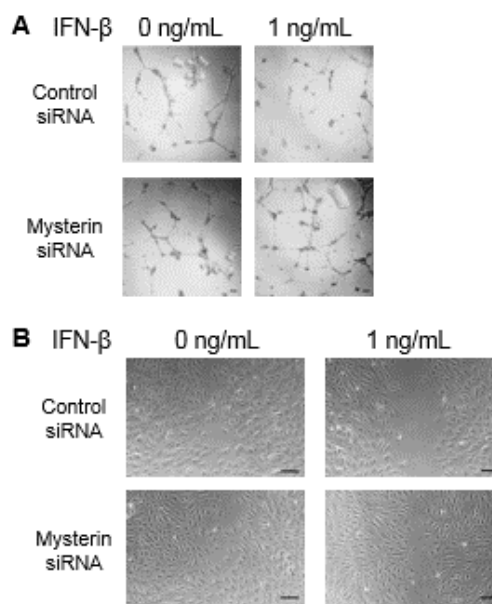


図 2 HUVECs における IFN-β anti-angiogenic effect のレスキュー

A. Tube formation assay. B. Migration assay. スケールバー: 100 μm。

また、IFN-β はもやもや病患者および健常者由来の iPSEC においても *mysterin* 発現を増加し、angiogenesis を減少させた。

もやもや病感受性遺伝子 *mysterin* は IFN-β による angiogenesis 抑制の重要な mediator であることが証明され、感染症がもやもや病発症に關与する可能性が示唆された。

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 7 件)

Zhou S, Kobayashi H, Hitomi T, Koizumi A, *et al.* (19 名、13、14、16 番目) RNF213 is associated with Intracranial Aneurysms in the French-Canadian population. Am J Hum Genet. 99(5):1072-1085, 2016. 査読有り DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.09.001.

Banh RS, Hitomi T, Koizumi A, *et al.* (25 名、15、18 番目) PTP1B controls non-mitochondrial oxygen consumption by regulating RNF213 to promote tumour survival during hypoxia. Nat Cell Biol. 18: 803-13, 2016. 査読有り DOI: 10.1038/ncb3376.

Okuda H, Kobayashi H, Hitomi T, Koizumi A, *et al.* (19 名、3、13、19 番目) Infantile Pain Episodes Associated with

Novel Nav1.9 Mutations in Familial Episodic Pain Syndrome in Japanese Families. PLOS ONE. 11, e0154827, 2016. 査読有り DOI: 10.1371/journal.pone.0154827.

Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T. et al. (6名、1、2、3番目) A new horizon of Moyamoya disease and associated health risks explored by RNF213. Environ Health Prev Med. 21(2): 55-70, 2016. 査読有り DOI: 10.1007/s12199-015-0498-7.

Kobayashi H*, Hitomi T*, Koizumi A. et al. (13名、1、3、13番目) 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. 4: e002146, 2015. 査読有り DOI: 10.1161/JAHA.115.002146. *, These authors contributed equally to this work.

Yan J*, Hitomi T*, Kobayashi H, Koizumi A. et al. (8名、2、5、8番目) Genetic Study of Intracranial Aneurysms. Stroke 46(3): 620-626, 2015. 査読有り DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.007286. *, These authors contributed equally to this work.

Hitomi T, Kobayashi H, Koizumi A. et al. (9名、1、7、9番目) The importance of molecular diagnosis in the accurate diagnosis of systemic carnitine deficiency. J Genet. 94(1): 147-150, 2015. 査読有り DOI: 10.1007/s12041-015-0486-0.

〔学会発表〕(計 10 件)

小林果、人見敏明、小泉昭夫 他(6名、1、2、6番目)、もやもや病感受性遺伝子 *mysterin* の ATPase 機能喪失変異が angiogenesis に与える影響、第 86 回 日本衛生学会総会。2016 年 5 月 11 日-5 月 13 日、旭川市民文化会館。

森本貴昭、人見敏明、小林果、小泉昭夫 他(13名、5、6、12番目) 内頸動脈管径と RNF213 遺伝子多型によるもやもや病の診断、第 27 回日本脳循環代謝学会総会。2015 年 10 月 30 日-10 月 31 日、富山国際会議場。

松田佳子、小林果、人見敏明、小泉昭夫 他(10名、2、3、10番目) もやもや病感受性多型 RNF213 遺伝子 p.R4810K による angiogenesis 抑制の in vitro および in vivo での検討、第 27 回日本脳循環代謝学会総会。2015 年 10 月 30 日-10 月 31 日、富山国際会

議場。

Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T. et al. (14名、1、2、4番目) In vitro and in vivo evidence on inhibition of angiogenesis by the Moyamoya susceptible gene and its mutation, RNF213 R4810K. 4th International Moyamoya Meeting Berlin, July 2-4, 2015, Kaiserin-Friedrich-Haus, Germany.

Banh RS, Hitomi T, Koizumi A. et al. (25名、15、18番目) PTP1B regulates the Moyamoya disease-associated E3 ligase, RNF213 and cellular dioxygenase activity to allow breast tumor survival in hypoxia. AACR 106th Annual Meeting 2015, April 18-22, 2015, Philadelphia Convention Center, USA.

小林果、人見敏明、小泉昭夫 他(7名、1、5、7番目) 血管平滑筋特異的 *mysterin* 変異体 Tg マウスにおける低酸素誘導性肺 arteriogenesis の抑制、第 85 回 日本衛生学会総会。2015 年 3 月 26 日-3 月 28 日、アパローム紀の国。

小林果、人見敏明、小泉昭夫 他(7名、1、5、7番目) 血管内皮特異的 *mysterin* 変異体 Tg マウスにおける低酸素による脳 angiogenesis 誘導の低下、第 85 回 日本衛生学会総会。2015 年 3 月 26 日-3 月 28 日、アパローム紀の国。

人見敏明、小林果、小泉昭夫 他(8名、1、2、8番目) *Mysterin* は IFN β による抗血管形成シグナル経路のメディエーターとして働く、第 85 回 日本衛生学会総会。2015 年 3 月 26 日-3 月 28 日、アパローム紀の国。

小林果、人見敏明、小泉昭夫 他(5名、1、2、5番目) もやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞における血管形成能の低下、第 84 回 日本衛生学会総会。2014 年 5 月 25 日-5 月 27 日、岡山コンベンションセンター。

人見敏明、小林果、小泉昭夫 他(5名、1、2、5番目) もやもや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する、第 84 回 日本衛生学会総会。2014 年 5 月 25 日-5 月 27 日、岡山コンベンションセンター。

〔図書〕(計 1 件)

小林果、人見敏明、小泉昭夫、先端医学社、分子脳血管病、2014、54-56。

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://gyoseki.marianna-u.ac.jp/smuhp/KgApp?kyoinId=ymdsyoydgggy>

6．研究組織

(1)研究代表者

人見 敏明 (HITOMI, TOSHIAKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90405275

(2)研究分担者

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・特定講師
研究者番号：70542091