

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15385

研究課題名(和文) もやもや病関連疾患のリスク診断を可能にする簡便なRNF213遺伝子検査の開発

研究課題名(英文) Development of a simple genetic test of RNF213 to evaluate risk for moyamoya disease

研究代表者

呉 繁夫 (Kure, Shigeo)

東北大学・医学系研究科・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)：もやもや病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。脳動脈再建術による早期介入を可能にするには、発症リスクの高い個体を見出す方法の開発が望まれる。申請者らは日本人もやもや病患者の全ゲノム相関解析を行い、発症リスクを190倍に高めるRNF213創始者変異c.14576G>Aを同定した(J Hum Genet, 2011)。

本研究では、RNF213遺伝子c.14576G>A変異の簡単・迅速な検査法の確立した。この遺伝子検査と血中MMP9濃度測定を組合わせてもリスク予想を改善しなかったことから、今後新たなバイオマーカーの探索が必要なことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease is characterized by stenosis of occlusion of terminal portion of bilateral carotid artery and development of fine capillary vessel network. Development of a test for risk evaluation for moyamoya disease would be desired for improvement of prognosis by the bypass operation. We have identified the founder variant of c.14576G>A in RNF213 gene, which increases risk for moyamoya disease by 190 fold (J Hum Genet, 2011). In this study we developed a simple and rapid genetic test for detection of c.14576G>A in RNF213 gene. We also evaluated the efficiency of combination test of the c.14576G>A genotyping and the blood MMP9 level. This combo did not increased the efficiency of risk evaluation compared with the genotyping alone. A new biomarker would be necessary for better prediction of moyamoya disease.

研究分野：小児科学

キーワード：もやもや病 遺伝子検査 リスク診断 RNF213 創始者変異

## 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、一過性脳虚血発作 (TIA) で発症する場合に比べ、脳出血で発症する症例の予後は悪い。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。実際に脳ドックにより無症状で診断され、早期に介入された症例の予後は良い。MMD の予後を改善するには、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早期介入が望まれる。

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 70% 以上の症例が持つ創始者変異 (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 の発症リスクの高い個体の同定が可能となり、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、予後の予測にもこの遺伝子変異の検出は有効であることが判明した (Neurology, 2012)。

最近、申請者らは Rnf213 ノックアウト (KO) マウスの解析により、MMP9 遺伝子発現が野生型マウスに比べ高いことを見出した (Neuroreport, 2014)。更に MMD 患者の血中 MMP9 濃度は高値を示すことを報告している (Surg. Neurol, 2009)。以上の知見から、本研究では RNF213 変異の検査法の確立し、血中 MMP9 濃度測定を組み合わせることにより、発症リスク診断法の確立を目的とする。

## 2. 研究の目的

MMD の発症リスク診断を効率的に実施する方法を開発することを目的にしている。実際には、次の 2 つを行う。

### (1) 迅速遺伝子検査法の開発

MMD 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う。

### (2) 血中 MMP9 濃度測定による診断効率向上

血中 MMP9 濃度測定を RNF213 遺伝子検査に加えることにより、リスク診断効率の向上が可能であるかどうかを検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子変異の検出方法

変異の検出には、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。実際には、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する。このストリップの下端を展開液に浸すことにより、展開液に沿って検出用プローブと競合的プローブとの間で、競合的ハイブリダイゼーションが起こる。この競合を勝ち抜き、ハイブリダイズしたプローブは、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。プローブとして用いる合成オリゴ DNA は、配列の異なるものを数種類作成し、シグナルとノイズ比の最も大きい配列を採用した。

### (2) 血中 MMP9 濃度の測定

MMD 患者とその家族から血液検体を採取し、血漿を分離する。直ちに -80 度 C に保存し、測定時まで保存する。血漿中の MMP9 濃度の測定には、ELISA キットを使用し、既報の方法で測定した (Fujimura M, Tominaga T, et al., Increased expression of serum Matrix Metalloproteinase-9 in patients with moyamoya disease. Surg Neurol. 2009;72:476-80)。

### (3) 倫理的配慮

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。本研究は、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

MMD 患者の 70% 以上が共通に持つ日本人高頻度変異 c.14576G>A を PCR 後、イムノクロマト法で簡便に検出する方法を確立した。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ことに加え、手技の熟練を必要としないため、クリニック、ベッドサイド、脳ドックなどでの利用が可能になる。この方法では、ヘテロ接合体とホモ接合体の区別が可能になる。ホモ接合体はヘテロ接合体に比べ、発症が早く、症状が重篤であることが判明しているため、遺伝子型の検出はリスク予測に寄与する。

血中 MMP9 濃度が対照者と比べて高値であることから、RNF213 遺伝子検査と血中 MMP9 濃度を組合せてリスク診断効率の向上を試みた、しかしながら、遺伝子検査単独と両者を

組合わせた場合で診断率の向上は得られなかった。従って、診断効率の向上のためには別のバイオマーカーの検索が必要であることが明らかになった。

#### 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 30 件)

1. Suzuki T, Sasahara Y, Kikuchi A, Kakuta H, Kashiwabara T, Ishige T, Nakayama Y, Tanaka M, Hoshino A, Kanegane H, Abukawa D, Kure S. Targeted Sequencing and Immunological Analysis Reveal the Involvement of Primary Immunodeficiency Genes in Pediatric IBD: a Japanese Multicenter Study. *J Clin Immunol.* 2017;37(1):67-79. doi: 10.1007/s10875-016-0339-5. (査読有)
2. Ishiguro A, Sasaki H, Yahagi N, Kato H, Kure S, Mori R. Needs assessment for collaborative network in pediatric clinical research and education. *Pediatr Int.* 2017;59(1):74-79. doi: 10.1111/ped.13050. (査読有)
3. Otsuka H, Sasai H, Abdelkreem E, Kawamoto N, Kawamoto M, Kamiya T, Tanimoto Y, Kikuchi A, Kure S, Numakura C, Hayasaka K, Fukao T. Effectiveness of Medium-Chain Triglyceride Oil Therapy in Two Japanese Citrin-Deficient Siblings: Evaluation Using Oral Glucose Tolerance Tests. *Tohoku J Exp Med.* 2016;240(4):323-328. doi: 10.1620/tjem.240.323. (査読有)
4. Uchida N, Kumagai N, Nozu K, Fu XJ, Iijima K, Kondo Y, Kure S. Early RAAS Blockade Exerts Renoprotective Effects in Autosomal Recessive Alport Syndrome. *Tohoku J Exp Med.* 2016;240(3):251-257. (査読有)
5. Kimura M, Yaoita H, Adachi O, Kure S. Right atrial ball thrombus after an intraatrial repair in a 3-year-old girl. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25(6):522-524. doi: 10.1016/j.carpath.2016.09.006. (査読有)
6. Shima H, Yatsuga S, Nakamura A, Sano S, Sasaki T, Katsumata N, Suzuki E, Hata K, Nakabayashi K, Momozawa Y, Kubo M, Okamura K, Kure S, Matsubara Y, Ogata T, Narumi S, Fukami M. NR0B1 Frameshift Mutation in a Boy with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Sex Dev.* 2016;10(4):205-209. (査読有)
7. Anzai M, Arai-Ichinoi N, Takezawa Y, Endo W, Inui T, Sato R, Kikuchi A, Uematsu M, Kure S, Haginoya K. Patchy white matter hyperintensity in ring chromosome 18 syndrome. *Pediatr Int.* 2016;58(9):919-22. doi: 10.1111/ped.13043. (査読有)
8. Koshihara S, Motoike I, Kojima K, Hasegawa T, Shiota M, Saito T, Saigusa D, Danjoh I, Katsuoka F, Ogishima S, Kawai Y, Yamaguchi-Kabata Y, Sakurai M, Hirano S, Nakata J, Motohashi H, Hozawa A, Kuriyama S, Minegishi N, Nagasaki M, Takai-Igarashi T, Fuse N, Kiyomoto H, Sugawara J, Suzuki Y, Kure S, Yaegashi N, Tanabe O, Kinoshita K, Yasuda J, Yamamoto M. The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Sci Rep.* 2016;6:31463. doi: 10.1038/srep31463. (査読有)
9. Wada R, Arai H, Kure S, Peng WX, Naito Z. "Wild type" GIST: Clinicopathological features and clinical practice. *Pathol Int.* 2016;66(8):431-7. doi: 10.1111/pin.12431. (査読有)
10. Kuriyama S, Yaegashi N, Nagami F, Arai T, Kawaguchi Y, Osumi N, Sakaida M, Suzuki Y, Nakayama K, Hashizume H, Tamiya G, Kawame H, Suzuki K, Hozawa A, Nakaya N, Kikuya M, Metoki H, Tsuji I, Fuse N, Kiyomoto H, Sugawara J, Tsuboi A, Egawa S, Ito K, Chida K, Ishii T, Tomita H, Taki Y, Minegishi N, Ishii N, Yasuda J, Igarashi K, Shimizu R, Nagasaki M, Koshihara S, Kinoshita K, Ogishima S, Takai-Igarashi T, Tominaga T, Tanabe O, Ohuchi N, Shimosegawa T, Kure S, Tanaka H, Ito S, Hitomi J, Tanno K, Nakamura M, Ogasawara K, Kobayashi S, Sakata K, Satoh M, Shimizu A, Sasaki M, Endo R, Sobue K, Tohoku Medical Megabank Project Study Group T, Yamamoto M. The Tohoku Medical Megabank Project: Design and Mission. *J Epidemiol.* 2016;26(9):493-511. doi: 10.2188/jea.JE20150268. (査読有)
11. Yaoita H, Kimura M, Kure S. An asymptomatic case of a single coronary artery in a 7-year-old girl. *Cardiol Young.* 2016 Oct;26(7):1428-9. doi: 10.1017/S1047951116000834. (査読有)
12. Moriya K, Niizuma H, Rikiishi T, Yamaguchi H, Sasahara Y, Kure S. Novel Compound Heterozygous RTEL1 Gene Mutations in a Patient With Hoyerall-Hreidarsson Syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(9):1683-4. (査読有)

13. Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Ishii K, Shiihara T, Kato M, Kamei A, Kure S. Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection with neurological sequelae: A retrospective study using umbilical cord. *Brain Dev.* 2016;38(9):819-26. doi: 10.1016/j.braindev.2016.03.006. (査読有)
14. Yokomichi H, Zheng W, Matsubara H, Ishikuro M, Kikuya M, Isojima T, Yokoya S, Tanaka T, Kato N, Chida S, Ono A, Hosoya M, Tanaka S, Kuriyama S, Kure S, Yamagata Z. Impact of the great east Japan earthquake on the body mass index of preschool children: a nationwide nursery school survey. *BMJ Open.* 2016;6(4):e010978. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010978. (査読有)
15. Shima H, Tanaka T, Kamimaki T, Dateki S, Muroya K, Horikawa R, Kanno J, Adachi M, Naiki Y, Tanaka H, Mabe H, Yagasaki H, Kure S, Matsubara Y, Tajima T, Kashimada K, Ishii T, Asakura Y, Fujiwara I, Soneda S, Nagasaki K, Hamajima T, Kanzaki S, Jinno T, Ogata T, Fukami M; Japanese SHOX study group.. Systematic molecular analyses of SHOX in Japanese patients with idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet.* 2016;61(7):585-91. doi: 10.1038/jhg.2016.18. (査読有)
16. Kanoke A, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Kakizaki A, Ito A, Sakata H, Sato-Maeda M, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of magnetic resonance angiography and decreased ratio of regulatory T cells after immunological adjuvant administration to mice lacking RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res.* 2016;1642:1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2016.03.009. (査読有)
17. Haginoya K, Kaneta T, Togashi N, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Uematsu M, Kitamura T, Inui T, Okubo Y, Takezawa Y, Anzai M, Endo W, Miyake N, Saito H, Matsumoto N, Kure S. FDG-PET study of patients with Leigh syndrome. *J Neurol Sci.* 2016;362:309-13. doi: 10.1016/j.jns.2016.02.008. (査読有)
18. Koderu H, Ohba C, Kato M, Maeda T, Araki K, Tajima D, Matsuo M, Hino-Fukuyo N, Kohashi K, Ishiyama A, Takeshita S, Motoi H, Kitamura T, Kikuchi A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Sasaki M, Kure S, Haginoya K, Saito H, Matsumoto N. De novo GABRA1 mutations in Ohtahara and West syndromes. *Epilepsia.* 2016;57(4):566-73. doi: 10.1111/epi.13344. (査読有)
19. Sato Y, Numata-Uematsu Y, Uematsu M, Kikuchi A, Nakayama T, Kakisaka Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Suzuki H, Takahashi Y, Saito Y, Tanuma N, Hayashi M, Iwasaki M, Haginoya K, Kure S. Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures: Pathological findings and a new therapeutic approach using tacrolimus. *Brain Dev.* 2016;38(8):772-6. doi: 10.1016/j.braindev.2016.02.006. (査読有)
20. Ota C, Ishizawa K, Yamada M, Tando Y, He M, Takahashi T, Yamaya M, Yamamoto Y, Yamamoto H, Kure S, Kubo H. Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury. *Respir Investig.* 2016;54(2):98-108. doi: 10.1016/j.resinv.2015.08.009. (査読有)
21. Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Ohashi K, Negishi Y, Kudo T, Ito R, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Saitoh S. Molecular Genetic Dissection and Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis Using Targeted Next-Generation Sequencing. *J Pediatr.* 2016;171:171-7.e1-4. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.01.006. (査読有)
22. Ota C, Kimura M, Kure S. ABCA3 mutations led to pulmonary fibrosis and emphysema with pulmonary hypertension in an 8-year-old girl. *Pediatr Pulmonol.* 2016;51(6):E21-3. doi: 10.1002/ppul.23379. (査読有)
23. Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Hum Genet.* 2016;135(2):209-22. doi: 10.1007/s00439-015-1627-5. (査読有)
24. Inui T, Kobayashi S, Ashikari Y, Sato R, Endo W, Uematsu M, Oba H, Saito H, Matsumoto N, Kure S, Haginoya K. Two cases of early-onset myoclonic seizures with continuous parietal delta activity caused by EEF1A2 mutations. *Brain Dev.* 2016;38(5):520-4. doi: 10.1016/j.braindev.2015.11.003. (査読有)

25. Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Hashizume O, Nagatoishi S, Matsuo A, Sato T, Kudo T, Matsuhashi T, Murayama K, Ohba Y, Watanabe S, Kanno S, Minaki D, Saigusa D, Shinbo H, Mori N, Yuri A, Yokoro M, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Ichimura T, Anzai J, Kohzuki M, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Toyomizu M, Tsumoto K, Nakada K, Bonventre JV, Ito S, Osaka H, Hayashi K, Abe T. Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):1925-32. doi: 10.1681/ASN.2015060623. (査読有)
26. Higashi K, Ogawa T, Onuma M, Usubuchi H, Imai Y, Takata I, Hidaka H, Watanabe M, Sasahara Y, Koyama S, Kure S, Katori Y. Clinicopathological features of melanotic neuroectodermal tumor of infancy: Report of two cases. *Auris Nasus Larynx.* 2016;43(4):451-4. doi: 10.1016/j.anl.2015.10.010. (査読有)
27. Arai-Ichinoi N, Uematsu M, Sato R, Suzuki T, Kudo H, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Matsumoto M, Igarashi K, Haginoya K, Kure S. Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy. *Hum Genet.* 2016;135(1):89-98. doi: 10.1007/s00439-015-1617-7. (査読有)
28. Watanabe Y, Shido K, Niihori T, Niizuma H, Katata Y, Iizuka C, Oba D, Moriya K, Saito-Nanjo Y, Onuma M, Rikiishi T, Sasahara Y, Watanabe M, Aiba S, Saito R, Sonoda Y, Tominaga T, Aoki Y, Kure S. Somatic BRAF c.1799T>A p.V600E Mosaicism syndrome characterized by a linear syringocystadenoma papilliferum, anaplastic astrocytoma, and ocular abnormalities. *Am J Med Genet A.* 2016;170A(1):189-94. doi: 10.1002/ajmg.a.37376. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

Phenytoin-responsive epileptic encephalopathy with an intragenic tandem duplication involving FGF12 . Kikuchi A, Shi RM, Kobayashi T, Sato R, Uematsu M, An K, Kure S. 米国人類遺伝学会、2016年10月18-20日、バンクーバー、カナダ

〔図書〕(計 1 件)

Kure S. “Future clinical perspectives on RNF213 in Moyamoya disease” in “Moyamoya Disease explored through RNF213”(eds, Koizumi A, Nagata K, Houkin K, Tominaga T, Miyamoto S, Kure S, Tounier-Lasserre E) Springer, Tokyo, pp.179-185, 2017

〔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〕  
なし

## 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