

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390267

研究課題名(和文)全ゲノム関連解析により見出したモヤモヤ病感受性遺伝子RNF213の機能探査

研究課題名(英文)Functional analysis of RNF213 gene identified by genome-wide association study

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) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：モヤモヤ病は、小児期および成人期に内頸動脈終末部の狭窄と無数の毛細血管の新生を認める難病であり、その病因は不明であった。私たちは、全ゲノム関連解析という手法を用いてモヤモヤ病の発症に関連する遺伝子RNF213を同定した。この研究では、この遺伝子のノックアウト・マウスを作成し、遺伝子の機能を探索した。その結果、ノックアウト・マウスでは、内頸動脈を結紮した際の内皮細胞の増殖反応に違いを認め、RNF213遺伝子は血管内皮の増殖に関わっている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease (MMD) manifests progressive bilateral internal carotid artery stenosis and abnormal collateral vessels. A genome-wide association study was performed, which showed a strong association of RNF213 locus in chromosome 17q25-ter with MMD risk. Mutational analysis of RNF213 revealed a founder mutation in 73% of non-familial MMD cases and 1.4% of controls; carriers of this mutation have increased risk of MMD. We developed a genetic testing method for this founder mutation. To understand the function of RNF213 gene, we generated a knockout mice by gene targeting. Homozygous mice were born and grew normally and no abnormality was found in cerebral vascular development. The we ligated the internal carotid artery and observed reactive hypertrophy of vascular wall. The homozygous mice lacked the reactive hyperplasia of intima cells, which was constantly observed in wild-type mice, suggesting that Rnf213 gene plays a role in proliferation of intima cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学系臨床医学

キーワード：小児神経学 モヤモヤ病 疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

モヤモヤ病 (MMD) は両側内頸動脈終末部の閉塞と異常側副血管網形成による脳虚血・出血を特徴とする疾患で、約半数は小児例である。MMD は日本で疾患概念が確立し、日本に多発するため、我が国の小児疾患として重要である。病因は不明であるが、約 15% は家系例であることから、遺伝的要因の関与が示唆されていた。最近、私達は世界に先駆けて MMD 疾患感受性遺伝子と創始者変異を同定した。まず、MMD 日本人患者 72 名を対象に、SNP100 万個による全ゲノム相関解析を行い、染色体 17q25-ter 付近に強い相関を見出した。

17q25-ter 領域の SNP 384 個を用いて更に解析した結果、7 個の SNP から成る一つのハプロタイプとの強い相関 ($P=5.3 \times 10^{-10}$) を RNF213 遺伝子内に見出した。RNF213 変異解析から、同一のミスセンス変異 c.14576G>A を家系例の 95%、孤発例の 73% に見出し、創始者変異と考えられた (対照での頻度 1.4%)。この創始者変異により MMD 発症リスクは、約 190 倍 (95%CI=71-507) に高まる。この他にミスセンス変異を 3 種類同定した。未解決の最も大きな問題は、同定された RNF213 遺伝子の機能は未解明で、この RNF213 遺伝子変異がどのように MMD 発症に結び付くのか分からない点である。

2. 研究の目的

本研究は、最初の MMD 感受性遺伝子である RNF213 の機能及び生理的役割を、

- 1) 多数のモヤモヤ病患者の病歴と RNF213 遺伝子型との関係を調査、
- 2) ノックアウト・マウスを作成・解析、する事により理解し、MMD における脳血管の狭窄と側副血管の異常新生の発生メカニズムを解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 多数のモヤモヤ病患者を用いた臨床症状と遺伝型との関係を病歴のまとめと遺伝子検査により明らかにする。

(2) RNF213 遺伝子のノックアウト・マウスの解析

変異ホモ接合体マウスが、胎生致死の場合を考え、Cre-loxP 系を用いたコンディショナル・ノックアウト・マウスを作成した。ノックアウト・マウスの作成に用いたターゲティング・ベクターの構成を図 1 に示す。相同組み換えによる F1 マウスが誕生したら、ヘテロ接合体マウス同士との交配により、ホモ接合体マウスを作製し、その表現型を確認する。ホモマウスが生存した場合は、血管走行や血管壁の病理的解析を実施する。もし、胎生致

死である婆には、血管壁に特異的に発現するプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼの遺伝子を結合した遺伝子断片を導入したトランスジェニック・マウスを用いて表現型の観察を実施する。

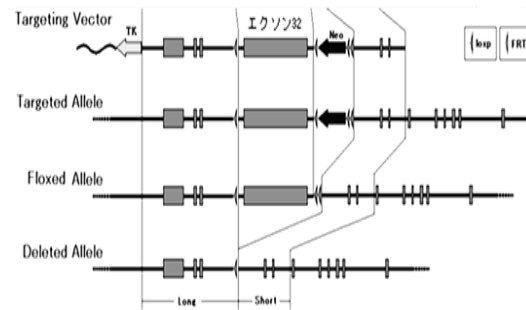


図 1 コンディショナル・ノックアウト・マウスの遺伝子改変ベクターの構造

4. 研究成果

(1) モヤモヤ病患者の遺伝子型と症状との関係

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有意に多く認められた (図 2)。また、初発症状を検討してみると、一過性脳虚血発作 (TIA) で発症する症例よりも、より重篤である梗塞で発症する症例が有意に多く (図 2)、発症リスクと予後予測に有用なマーカーであることが明らかになった。

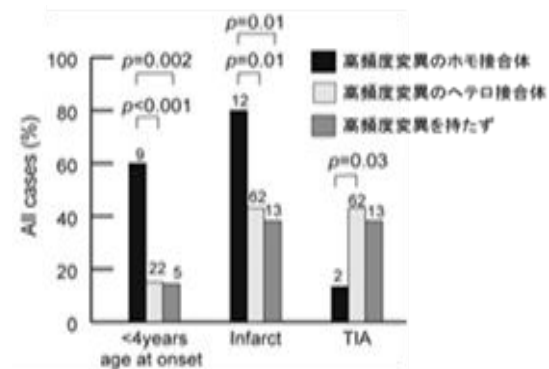


図 2 RNF213 遺伝子型と発症時期・重症度の関係

(2) ノックアウト・マウスを用いた検索

方法の項目で RNF213 遺伝子変異による MMD 発症機序を探るために、Rnf213 ノックアウト (KO) マウスを作成した。変異ホモ接合体マウスは、野生型マウスと同様に誕生し、成長した。これらのホモ接合体マウスを用いて表現

型の観察を行なった。

何ら負荷を与えない状態では、脳内血管走行や脳組織所見に野生型マウスとの違いを認めなかった。ところが、内頸動脈結紮後の反応に違いを認めた。内頸動脈を結紮し狭窄させると野生型マウスでは、結紮2週間後に血管中内膜が反応性に増殖・肥厚する(図3左上段C)。一方、ノックアウト・マウスではこの内膜・中膜の肥厚反応が有意に弱かった。

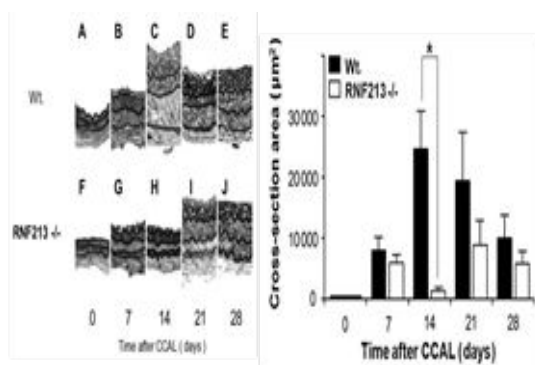


図3 内頸動脈結紮時の野生型とノックアウト。マウスの血管内皮増殖反応

以上の実験結果から、RNF213 遺伝子は刺激存在下における内頸動脈の中内膜細胞の増殖制御に関わっていることが示唆された。

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10件)

1. Fujimura M, Kimura N, Ezura M, Niizuma K, Uenohara H, Tominaga T. Development of a de novo arteriovenous malformation after bilateral revascularization surgery in a child with moyamoya disease. *J Neurosurg Pediatr*. 2014(印刷中) (査読有)
2. 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. Epub 2014 Jan 17. (査読有)
3. Miyamoto S, Yoshimoto T, Hashimoto N, Okada Y, Tsuji I, Tominaga T, Nakagawara J, Takahashi JC; JAM Trial Investigators. Effects of extracranial-intracranial bypass for patients with hemorrhagic moyamoya disease: results of the Japan adult moyamoya trial. *Stroke*. 2014 May;45(5):1415-21 (査読有)
4. Yokosawa M, Hayashi T, Shirane R, Tominaga T. Efficacy of Superficial Temporal Artery-Middle Cerebral Artery Double Anastomoses in a Patient with Rapidly Progressive Moyamoya Disease: Case Report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014 Feb 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24584280.
5. Fujimura M, Niizuma K, Inoue T, Sato K, Endo H, Shimizu H, Tominaga T. Minocycline prevents focal neurological deterioration due to cerebral hyperperfusion after extracranial-intracranial bypass for moyamoya disease. *Neurosurgery*. 2014 Feb;74(2):163-70; discussion 170. doi: 10.1227/NEU.0000000000000238. PubMed PMID: 24176958. (査読有)
6. Fujimura M, Akagi K, Uenohara H, Tominaga T. Moyamoya disease in pregnancy: a single institute experience. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(8):561-4. PubMed PMID: 23979053. (査読有)
7. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saito H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*. 2012 Mar 13;78(11):803-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f. Epub 2012 Feb 29. (査読有)
8. Shimoda Y, Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T. Temporal profile of de novo development of moyamoya vasculopathy in an adult: case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(5):339-42. PubMed PMID: 22688072. (査読有)
9. Fujimura M, Tominaga T. Lessons learned from moyamoya disease: outcome

of direct/indirect revascularization surgery for 150 affected hemispheres. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(5):327-32. PubMed PMID: 22688070. (査読有)

10. Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Saito A, Mugikura S, Tominaga T. Efficacy of prophylactic blood pressure lowering according to a standardized postoperative management protocol to prevent symptomatic cerebral hyperperfusion after direct revascularization surgery for moyamoya disease. *Cerebrovasc Dis*. 2012;33(5):436-45. doi: 10.1159/000336765. Epub 2012 Mar 28. PubMed PMID: (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease”(招待講演) Kure S in 3rd International Moyamoya disease Meeting. Sapporo, Japan, July 12-13, 2013
2. Diagnosis of Moyamoya Disease; Revisit of Suzuki's Angiographic Grading”(招待講演) Tominaga T in 3rd International Moyamoya disease Meeting. Sapporo, Japan, July 12-13, 2013
3. Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease (招待講演) Kure S Genetics and Genomics of Vascular Disease Workshop II in NAVBO Workshops in Vascular Biology 2012, in Pacific Grove, CA, Monterey, October 14-18, 2012
4. Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease in Japanese patients with Moyamoya disease and its clinical significance. Kure S, Kamada F, Aoki Y, Abe Y, Kikuchi A, Komatsuzaki S, Kanno J, Matsubara Y, Touho H, Miyatake S, Matsumoto N. 54th Annual meeting of Society of Child Neurology, Sapporo, Japan, May 17-19, 2012
5. モヤモヤ病の疾患感受性遺伝子の同定、呉 繁夫、第 53 回日本神経学会総会、横浜、2011 年 5 月 26-28 日
6. モヤモヤ病遺伝的要因の解明 - 疾患感受性遺伝子と創始者変異の同定、呉 繁夫、鎌田文顕、青木洋子、阿部裕、新堀哲也、小松崎匠子、菊池敦生、菅野潤子、土屋滋、松原洋一、第 114 回日本小児科学会学術集会、東京、2011 年 4 月 15 - 17 日

〔図書〕(計 1 件)

1. Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis; Tominaga T. Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Infractable Diseases. Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis). *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(5):245-66. PubMed PMID: 22870528.

〔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：
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 (SHIGEO KURE)

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 (TEIJI TOMINGA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00217548

(3) 連携研究者

()

研究者番号：