

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19949

研究課題名(和文) 脳梗塞発症に関わる遺伝的バイオマーカー探索研究

研究課題名(英文) Research for the identification of the genetic factor for ischemic stroke

## 研究代表者

宮脇 哲 (Miyawaki, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70407914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋内主幹動脈狭窄による脳梗塞の発症予測の予防的治療確立を目指して、基盤的遺伝子解析研究を行った。1200名を超える様々な脳血管疾患患者からなるDNAサンプルと臨床情報を兼ね備えた、コホートを構築した。RNF213 c.14576G>Aを有する頭蓋内主幹動脈狭窄の特徴を報告した。発症に関わる新たな遺伝子同定に向けて、基盤となる網羅的な遺伝子解析を行なった。今後のさらなる研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have conducted a basic research aiming at the establishment of preventive medicine for ischemic stroke caused by intracranial major artery stenosis. We have collected DNA samples and clinical information from over 1200 patients with various cerebrovascular diseases. We have reported several clinical characteristics of the intracranial major artery stenosis with RNF213 c.14576G>A variant. We have performed comprehensive genetic analysis aiming at the identification of the novel genetic variant causative for the onset of ischemic stroke.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 頭蓋内主幹動脈狭窄 RNF213 動脈硬化 negative remodeling 全エクソン解析

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性脳卒中(脳梗塞)の主要な原因の1つに頭蓋内主幹動脈狭窄が挙げられる。頭蓋内主幹動脈は、内頸動脈から前大脳動脈、中大脳動脈といった頭蓋内の主要な動脈の近位部の位置の血管を指す。頭蓋内主幹動脈狭窄は発症のアジア人種に多い発症が知られており、頸部頸動脈や冠動脈などの動脈硬化とは異なる危険因子や遺伝的背景が存在することが示唆されており、我々はこれまで様々な疫学データを報告してきた(Miyawaki et al *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2014, *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014)。さらに我々は遺伝的背景に着目し、日本人において頭蓋内主幹動脈狭窄に強い関連を持つ遺伝子変異を同定した(Miyawaki et al *Stroke* 2012)。それは頭蓋内主幹動脈の進行性狭窄を主たる病態とする特異性疾患である「もやもや病」の関連遺伝子と同定された *RNF213* という遺伝子のミスセンス変異(c.14576G>A, p. R4859K, rs112735431)であった。

我々は先行研究において脳卒中患者の大規模な疫学調査および *RNF213* の遺伝子変異の関連解析を行った。様々な脳血管疾患の患者 519 例において遺伝子変異 *RNF213* c.14576G>A の有無を検証した。結果としてこの変異は特異性疾患であるもやもや病だけでなく、一般の動脈硬化性の頭蓋内主幹動脈狭窄に関連が強いことが明らかとした(29/125 23.2%に変異が存在。Miyawaki et al, *Stroke* 2013)。

*RNF213* 変異(c.14576G>A)は、日本人全体の2%と比較的高頻度に認められる、いわゆる一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)であり、主幹脳動脈狭窄の発症には *RNF213* c.14576G>A に加えて別の遺伝子変異が存在することが示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究においては、*RNF213* 変異(c.14576G>A)に加えて、脳梗塞の発症や重症度に関わる別の新たな遺伝子変異を同定することを目指す。こうして *RNF213* およびその関連遺伝子の解析を通じて、脳梗塞の遺伝子型に基づく発症リスク評価法の確立することを本研究の目的とする。具体的な目標は以下の通りである。

- (1) 正確な臨床情報・画像診断に基づくサンプル収集
- (2) 疾患に関連する *RNF213* 変異の網羅的な探索
- (3) *RNF213* c.14576G>A に加えて発症に関わる遺伝子変異を明らかにする
- (4) 組織切片における網羅的な分子動態解析の手法確立のための基礎研究

## 3. 研究の方法

- (1) 正確な臨床情報・画像診断に基づくサンプル収集  
本研究において鍵となるのは正確な臨床情

報および画像診断に基づくサンプル収集である。患者さん説明同意を得た後に末梢血採血を行い、リンパ球より遺伝子解析用の genomic DNA を抽出する。我々は先行研究から継続してこうした正確なサンプル収集を継続しており、すでに 1200 例のサンプル収集を終えている(図4)。また、関連病院と連携してサンプル収集を継続しており、最終的には 1000 例程度のデータベース構築を目指している。

- (2) 疾患に関連する *RNF213* 変異の網羅的な探索

*RNF213* は 17 番染色体に存在し、exon の数が 68 もある大きな遺伝子である。Genomic DNA としては 137kb、mRNA としては 21kb の大きさであり(NCBI Reference Sequence: NM\_001256071.1)、アミノ酸の数は 5226 もある大きな遺伝子である。c.14576G>A 以外の *RNF213* の変異の同定を目指す。次世代シーケンサーを用いて target resequencing を行い、変異解析を行う。

- (3) *RNF213* c.14576G>A に加えて発症に関わる遺伝子変異を明らかにする

*RNF213* c.14576G>A に加えて別の遺伝子変異を保有する場合は脳梗塞発症の可能性が高くなり、保有しない場合は健常の可能性が高くなるような遺伝子変異の同定を目指す。

まず収集したサンプルすべてにおいて、*RNF213* c.14576G>A の変異の有無を解析する。PCR にて *RNF213* c.14576G>A の周辺領域を増幅した後に、ダイレクトシーケンシングにて変異の有無を評価する。

続いて、網羅的な遺伝解析(候補となる遺伝子の数を絞った target resequencing と whole exome sequencing を計画)を行い、c.14576G>A の有無にて層別化した上で case-control study を行い、c.14576G>A に加えて発症に関わる遺伝的要因を明らかにする。

- (4) 組織切片における網羅的な分子動態解析の手法確立のための基礎研究

上記まで germline のゲノム解析にて疾患発症に関わりのある遺伝子変異の同定を目指すわけだが、実際の血管組織における遺伝子発現変化、あるいは蛋白質あるいはリン脂質レベルでの変化を解析することにより、疾患発症の key molecule 同定を試みるという方向性の解析を今後おこなっていく必要がある。血管組織などの組織切片上で網羅的な分子動態を解析する手法として imaging mass spectrometry という手法がありその最適化のための基礎的な研究をおこなった。

## 4. 研究成果

- (1) 正確な臨床情報・画像診断に基づくサンプル収集

複数の共同研究施設からサンプル収集を継続的に行い、**1242名**のサンプル収集を行うことができた。うち脳血管狭窄の症例は 560 例、動脈硬化性の頭蓋内主幹動脈狭窄は **381例**あった。

これらの症例に関して、RNF213 c.14576G>A の変異解析を行うと同時に、様々な臨床的な解析を行った。

「類もやもや病」と呼ばれる先天異常や自己免疫疾患などを基礎疾患にもつ血管狭窄疾患群に対して RNF213 c.14576G>A の変異解析を行ったところ、9 名の類もやもや病においては RNF213 c.14576G>A を認めず、この成果を論文発表した (Miyawaki et al, *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015)。

また RNF213 c.14576G>A の結果の外径に与える影響を臨床的な画像解析から行い、RNF213 c.14576G>A を有する血管狭窄は血管外径が縮小しており、negative remodeling に関わっていることを示唆する結果を得た (図 1) (Hongo et al, *Surg Neurol Int* 2017)。

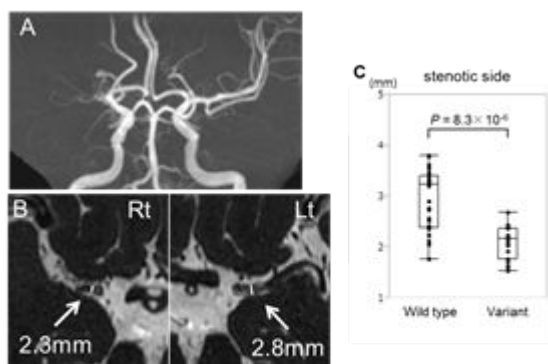


図 1. RNF213 変異と血管外壁の解析

また RNF213 c.14576G>A が頭蓋内主幹動脈狭窄のうちで、前方循環 (内頸動脈、中大脳動脈、前大脳動脈) により特異的に有意に関連している事を明らかにした (論文投稿中 under revision)。

(2) 疾患に関連する RNF213 変異の網羅的な探索

動脈硬化性の頭蓋内主幹動脈狭窄 168 例、control 141 例の解析の結果、RNF213 の exon 上に認められたのは 66 の変異で missense 変異 39、silent 変異 27 で、silent や nonsense、frameshift 変異は認められなかった。

関連解析の結果、統計学的有意差を認めた変異は c.14576G>A (p.R4859K) 以外には p.A3517V が同定された。p.A3517V は control 群の頻度の方が高く (動脈硬化性頭蓋内主幹動脈狭窄 2/166, Control 9/132) p.R4859K のみが ICAS に有意に関連するという結果となった (ICAS 42/126, Control 2/139 :  $p=6.07 \times 10^{-9}$ )。

また頻度の低い rare variant に関しては 18 種同定され、うち c.14576G>A (p.R4859K) 陰性例において 10 種認められた。RNF213 はもともと、ICAS と同じく頭蓋内主幹動脈狭窄を特徴とするもやもや病の関連遺伝子として同定された遺伝子であるが、この 10 種の rare variant の中に先行文献においてもやもや病関連変異として報告されたものを 1 種類 (p.L2405F) 認めた。

RNF213 全体の遺伝子解析の結果からは

c.14576G>A (p.R4859K) 以外に統計学的に有意な疾患関連遺伝子変異を認めず、RNF213 c.14576G>A の重要性が再確認される結果となった。rare variant の中では、RNF213 p.L2405F が頭蓋内動脈狭窄関連変異である可能性が示唆された。(論文投稿準備中)

(3) RNF213 c.14576G>A に加えて発症に関わる遺伝子変異を明らかにする

発症に関わるための遺伝子変異の同定のために、まず候補となる遺伝子を 100 種類程度に絞り込み、target resequencing を行った。その上で c.14576G>A の有無で層別化した関連解析を行った。結果としては、RNF213 c.14576G>A を有しない血管狭窄において、発症と関連が示唆される遺伝子変異 X を同定した。遺伝子変異 X は冠動脈などの動脈硬化疾患においてもその関連を認められており、さらには治療薬により発症のリスクを減らすことが示唆されており、重要な変異と考えられる。現在、別コホートにおいて validation study を行っている。

また同時に全ゲノム領域から発症に関わる修飾因子探索のための解析を開始している。RNF213 c.1576G>A を有する血管狭窄群 130 例の全エクソンシーケンスを行った。Control としては東京大学ゲノム医学センターのデータベース上の RNF213 c.14576G>A 変異を有する群を利用することとしている。関連解析へ向けた基盤を整えた。さらに症例を蓄積して関連解析を行い、発症に関連をもつ遺伝子変異の同定を目指している。

(4) 組織切片における網羅的な分子動態解析の手法確立のための基礎研究

組織切片上で網羅的な分子動態を解析する手法として imaging mass spectrometry という手法がありその最適化のための基礎的な研究をおこなった。ラット海馬の虚血急性期の分子変化を visualize することができ、血管壁の解析等に応用できるものと考えられた (図 2) (Miyawaki et al, *Neuroscience* 2016)。

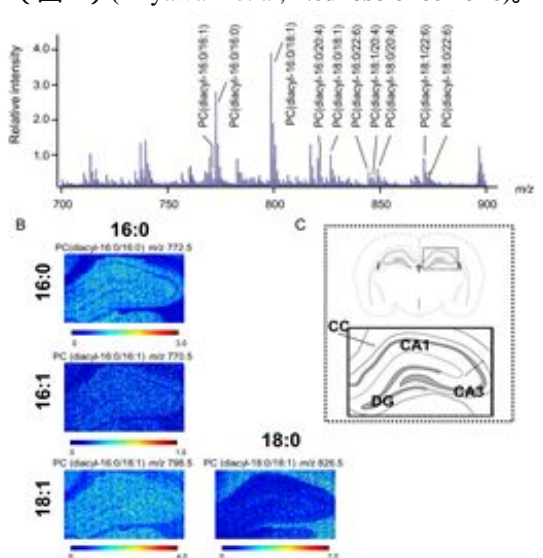


図 2. Imaging mass spectrometry による海馬の解析結果

## 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 9 件)

1. Hongo H, Miyawaki S., Imai H, Shinya Y, Hideaki O, Mori H, Nakatomi H, Kunimatsu A, Saito N. Smaller Outer Diameter of Atherosclerotic Middle Cerebral Artery Associated with RNF213 c.14576G>A Variant (rs112735431). **Surg Neurol Int** 2017 (in press) (査読有)
2. Imai H., Ishii K., Chikuda H., Ohya J., Nakagawa D., Kondo T., Nomura S., Yoshino M., Miyawaki S., Kin T., Nakatomi H., Saito N. Successful surgical strategy for a cervical hemangioblastoma: Case report. **Surg Neurol Int** 7(Suppl 25):S660-s663, 2016(査読有)
3. Miyawaki S., Imai H., Hayasaka T., Masaki N., Ono H., Ochi T., Ito A., Nakatomi H., Setou M., Saito N. Imaging mass spectrometry detects dynamic changes of phosphatidylcholine in rat hippocampal CA1 after transient global ischemia. **Neuroscience** 322:66-77, 2016(査読有)
4. Nakatomi H., Miyawaki S., Kin T., Saito N. Hearing Restoration with Auditory Brainstem Implant. **Neurol Med Chir (Tokyo)** 56(10):597-604, 2016(査読有)
5. Ono H., Imai H., Miyawaki S., Nakatomi H., Saito N. Rat white matter injury model induced by endothelin-1 injection: technical modification and pathological evaluation. **Acta Neurobiol Exp (Wars)** 76(3):212-224, 2016(査読有)
6. Fukushima Y., Miyawaki S., Inoue T., Shimizu S., Yoshikawa G., Imai H., Saito N., Tsutsumi K. Repeated de novo aneurysm formation after anastomotic surgery: Potential risk of genetic variant RNF213 c.14576G>A. **Surg Neurol Int** 6:41, (査読有)2015
7. Imai H., Miyawaki S., Ono H., Nakatomi H., Yoshimoto Y., Saito N. The importance of encephalo-myo-synangiosis in surgical revascularization strategies for moyamoya disease in children and adults. **World Neurosurg** 83(5):691-699, 2015(査読有)
8. Miyawaki S., Imai H., Shimizu M., Yagi S., Ono H., Nakatomi H., Shimizu T., Saito N. Genetic Analysis of RNF213 c.14576G>A Variant in Nonatherosclerotic Quasi-Moyamoya Disease. **J Stroke Cerebrovasc Dis** 24(5):1075-1079, 2015(査読有)
9. Shinya Y., Miyawaki S., Nakatomi H., Okano A., Imai H., Shin M., Sato K., Tsuchida T., Hayashi T., Terao Y., Numakura S., Morikawa T., Shibahara J., Kikuta S., Kondo K., Tatsuno K., Mori H., Kunimatsu A., Tsuji S., Saito N. Recurrent cerebral aneurysm formation and rupture within a short period due to invasive aspergillosis of the nasal sinus; pathological analysis of the catastrophic clinical course. **Int J Clin Exp Pathol** 8(10):13510-13522, 2015(査読有)

[学会発表](計 13 件)

1. Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Masahiro Shimizu, Shinichi Yagi, Hideaki Ono, Akitake Mukasa1, Hirofumi Nakatomi1, Tsuneo Shimizu, Nobuhito Saito. Analysis of Moyamoya disease associated genetic variant RNF213 c.14576G>A in various cerebrovascular diseases 国際人類遺伝学会 2016.4.13 国立京都国際会館(京都府京都市)
2. 宮脇 哲, 今井英明, 清水暢裕, 八木伸一, 小野秀明, 武笠晃文, 中富浩文, 清水庸夫, 斉藤延人. 脳卒中先制医療における頭蓋内主幹動脈狭窄関連遺伝子 RNF213 変異の遺伝子診断の重要性(シンポジウム) 第 41 回脳卒中学会 2016.4.16 ロイトン札幌他 2 会場(北海道札幌市)
3. 宮脇哲, 今井英明, 清水暢裕, 八木伸一, 小野秀明, 武笠晃文, 中富浩文, 清水庸夫, 斉藤延人. 65 歳以上高齢者の頭蓋内主幹動脈狭窄におけるもやもや病関連遺伝子 RNF213 変異の遺伝子診断の意義(シンポジウム) 第 29 回老年脳神経外科学会 2016.4.23 奈良ホテル(奈良県奈良市)
4. 宮脇哲, 今井英明, 清水暢裕, 八木伸一, 小野秀明, 武笠晃文, 中富浩文, 清水庸夫, 斉藤延人. RNF213 に関連する脳血管疾患は どこまで解明されたか(シンポジウム) 第 57 回日本神経学会 神戸コンベンションセンタ (兵庫県神戸市)
5. 宮脇哲. RNF213 and Moyamoya syndrome 第 10 回 Niche Neuro-Angiology Conference 2016.6.4 大阪科学技術センター(大阪府大阪市)
6. Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Masahiro Shimizu, Shinnichi Yagi, Akitake Mukasa, Hirofumi Nakatomi, Tsuneno Shimizu, Nobuhito Saito . 1st National moyamoya meeting 2016.10.21 (shanghai, CHAINA)
7. Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Nobuhito Saito. The 4th Shuguang International Conference on neurosurgery / The 12th Asian Congress of Neurosurgical Surgeons (ACNS) educational course 2016.10.23 (shanghai, CHAINA)
8. Satoru Miyawaki Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, The University of Tokyo Genetics aspects of

intracranial atherosclerosis (シンポジウム) 13th International Symposium on Thrombolysis, Thrombectomy and Acute Stroke Therapy 2016.10.30 Kobe Convention center (兵庫県神戸市)

9. 宮脇 哲, 今井英明, 早坂孝宏, 正木紀隆, 小野秀明, 越智崇, 中富浩文, 瀬藤光利, 齊藤延人. 虚血性神経細胞死の imaging mass spectrometry による分子動態解析 (虚血急性期と慢性炎症期の解析) 第59回脳循環代謝学会 2016.11.12 あわぎんホール (徳島県徳島市)
10. 宮脇 哲, 今井 英明, 清水暢裕, 八木伸一, 小野 秀明, 武笠 晃丈, 中富 浩文, 清水 庸夫, 齊藤 延人. もやもや病の遺伝子解析研究における新たな発見 (シンポジウム) 第74回日本脳神経外科会学術総会 2015.10.14 ロイトン札幌他2会場 (北海道札幌市)
11. Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Takahiro Hayasaka, Hideaki Ono, Takashi Ochi, Hirofumi Nakatomi, Mitsutoshi Setou, Nobuhito Saito. A Novel Molecular Imaging Method, Imaging Mass Spectrometry, Enables Analysis of Spatio-temporal Molecular Changes in Hippocampus CA1 After Transient Global Ischemia Brain 2015 2015.6.28 (Vancouver CANADA)
12. Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Masahiro Shimizu, Shinichi Yagi, Hideaki Ono, Akitake Mukasa, Hirofumi Nakatomi, Tsuneo Shimizu, Nobuhito Saito. Genetic analysis of RNF213 variant in Moyamoya disease, Quasi-moyamoya disease and various cerebrovascular diseases The 4th International Moyamoya Meeting 2015.7.4 (Berlin, Germany)
13. Satoru Miyawaki, Hideaki Imai, Masahiro Shimizu, Shinichi Yagi, Hideaki Ono, Akitake Mukasa, Hirofumi Nakatomi, Tsuneo Shimizu, Nobuhito Saito. Genetic variant RNF213 c.14576G>A in Moyamoya disease and various cerebrovascular diseases The 15th WFNS Intermin Meeting 2015.9.11 (Rome, ITALY)

〔図書〕(計 1 件)

1. Miyawaki S, Imai H, Saito N. Vascular Diseases Attributable to RNF213 Other Than Moyamoya Disease. (ed. Koizumi A, Nagata K, Houkin K, Tominaga T, Miyamoto S, Kure S, Tournier-Lasserre E.) Moyamoya Disease Explored Through RNF213, Japan; Springer, pp169-176, 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮脇 哲 (MIYAWAKI, SATORU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 70407914