

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19961

研究課題名(和文)もやもや病におけるエピジェネティクス解析-発症メカニズム解明にむけて-

研究課題名(英文)Epigenetic analysis of moyamoya disease

研究代表者

荒木 芳生 (ARAKI, Yoshio)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：80467290

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)：本研究では、もやもや病患者の頭蓋内・外の血管から抽出した RNA サンプルを用いて (1) マイクロアレイによる網羅的発現解析を実施、(2) RNF213 や PENK143-183 との関連を検証。さらに (3) エピジェネティクス解析による転写調節機構とパスウェイ解析をもとに、もやもや病発症に関与する特異的遺伝子を同定。最終的に (4) もやもや病の動物モデルを作成することを目的とした。血管の微小検体からの RNA 抽出の方法論の確立を目指したが困難であった。一方、我々は脳脊髄液中に含まれる RNA を対象としてマイクロアレイを用いた発現解析を行ったが最終的には有意な結果が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have tried (1) to perform comprehensive expression analysis using microarray with RNA samples extracted from intracranial and extracranial vessels of Moyamoya disease patients, (2) to verify the relationship with RNF 213 and PENK 143-183, which was identified by cerebrospinal fluid exhaustive analysis using SELDI-TOF-MS, (3) to identify specific genes involved in the development of Moyamoya disease based on transcriptional regulatory mechanism and pathway analysis by epigenetics analysis, finally (4) to create an animal model of Moyamoya disease. It was difficult to establish a methodology for RNA extraction from microscopic specimens of intracranial and extracranial blood vessels while maintaining sufficient quality. On the other hand, we performed expression analysis using microarray for RNA contained in cerebrospinal fluid of the patients with Moyamoya disease and the others, but eventually no significant results were obtained.

研究分野：脳神経外科

キーワード：もやもや病 エピジェネティクス マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

家族発症するもやもや病(以下 MMD)患者の SNP 解析より *RNF213* R4810K が MMD 感受性遺伝子であることが報告された (Kamada F. J Hum Genet 2011, Liu W. PLoS One 2011)。その後、同遺伝子変異を導入した iPS 細胞から分化させた血管内皮細胞の観察における Securin 発現の up/down regulation による血管新生の変化をみた研究 (Hitomi T. BBRC 2013)や腫瘍細胞に同遺伝子を導入すると mitosis が生じやすい(Hitomi T. BBRC 2013)とされる in vivo 研究が進められた。一方 in vivo では *RNF213* 欠損マウスの作成により MMD 発症の有無の確認が行われたが、生後 64 日における MRA では MMD の特徴的所見である内頸動脈終末部の狭窄性変化は確認されなかった。しかし同マウスの総頸動脈を結紮したところ、病理学的特徴である中膜の菲薄化を認め、wild type と比較して血管リモデリングに差が認められたという(Sonobe S. Brain Res 2014)。また報告によれば一部の健常人でも *RNF213* における R4810K 変異を有するが発病していない。以上より、MMD においては *RNF213* 遺伝子変異が感受性遺伝子ではあるが、単一の原因遺伝子ではないと考えられている。研究代表者は MMD の脳脊髄液を用いた網羅的蛋白解析において 4000-5000Da のペプチドが有意に高発現していることを報告した (Araki Y. BMC Neurol 2010)。また脳脊髄液中の同ペプチドは小児 MMD 患者において顕著に高発現していることから小児患者に特有の高い脳血管新生能力と関連があることを明らかにした (Maruwaka M. J Stroke Cerebrovasc Dis 2014)。さらに研究代表者は液体クロマトグラフィー質量分析法

(LC-MS/MS)により同ペプチドの精製および断片化前のタンパク同定に成功した。MMD 患者における *RNF213* R4810K 変異と脳脊髄液中に有意に発現が増加しているペプチドとの関連については明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これまでの学術的背景より、MMD は *RNF213* を中心とした遺伝子異常の背景をもとにした全身性疾患であり、エピジェネティクスや他の環境因子などが加わることにより発症すると考えられる。そこで本研究では、もやもや病患者の頭蓋内・外の血管から抽出した RNA サンプルを用いて(1)マイクロアレイによる網羅的発現解析を実施、(2)*RNF213* 変異や申請者が同定した、もやもや病脳脊髄液中に有意に高発現するペプチドとの関連を検証。さらに germ line 変異を確認し、(3)エピジェネティクス解析による転写調節機構と pathway 解析をもとに、もやもや病発症に關与する特異的遺伝子を同定。最終的に(4)もやもや病の動物モデルを作成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 患者血液から DNA を採取し、Sanger sequence により *RNF213* の SNP を同定する。
- (2) 浅側頭動脈・中大脳動脈より RNA を抽出しマイクロアレイを用いて網羅的な発現解析および long non coding RNA の解析を行う。
- (3) 得られたデータより MMD 患者において発現が有意に亢進もしくは抑制されている遺伝子および pathway を同定する。

- (4) Infinium methylation assay および miRNA array を用いてメチル化および miRNA 解析を行う。これらのデータから MMD 患者において発現が強く亢進/抑制されている遺伝子および pathway とそれらを制御する epigenetics なメカニズムおよび関連を明らかにする。
- (5) 網羅的解析によって得られたデータを用いて細胞レベルでの機能解析を行うことにより血管新生にかかわる異常メカニズムを解明する。
- (6) これらの網羅的な解析により MMD 発症における遺伝子異常を明らかにしマウスモデルの構築を行う。

#### 4. 研究成果

- (1) 患者血液からキットを用いて DNA を採取し、RNF213 領域を PCR で複製した。続いてダイレクトシーケンスにより変異の有無を確認した。遺伝子の解析については、名古屋大学東山キャンパス遺伝子実験室での反応・解析サービスを利用した。提供情報については、連結可能匿名化を行い個人が特定されないように配慮した。現在、MMD 患者に対して MMD 以外の頭蓋内および頸部動脈狭窄・閉塞患者を対照として変異陽性率に関する検証を行い、環境因子による発症との関連について検討した。現在論文作成中である。
- (2) 浅側頭動脈・中大脳動脈より RNA を抽出し microarray を用いて網羅的な発現解析を施行するためには、質的・量的評価により解析に耐えうる RNA のクオリティが求められる。しかし、MMD におけ

る脳血管再建術時に得られる動脈サンプルのサイズは 0.5mm 以下の極小であり、RNA 抽出が極めて困難であった。サンプルは採取された直後に RNA later へ保存し分解を防ぎ、tRNA を TRIZOL および proteinase K により抽出した。さらにマウスの血管を用いた検証や、各種 RNA 抽出キットや試薬による実験を繰り返して検証したが、最終的にマイクロアレイ解析を行えるだけのクオリティの RNA は得ることができなかった。一方、MMD 患者脳脊髄液の網羅的タンパク解析により得られた m/z 4473 および m/z 4473 のペプチドのトリプシン断片は、すべて proenkephalin 143-148(PENK 143-148)に由来した (Fig. 1A)。両ペプチドの差異は N 末端のアスパラギン酸の有無だけであった (Fig.1 B)。さらに sandwich ELISA を用いて MMD 患者と非 MMD 患者の脳脊髄液中の同ペプチド濃度を定量化したところ、MMD 群(中央値 8270pmol/L) と 非 MMD 群 ( 同 3760pmol/L)において有意に MMD 群に高値であった (Fig. 2)。

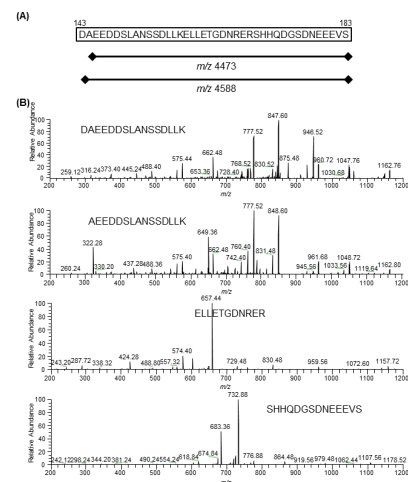


Fig.1 Identification of the m/z 4473 and m/z 4473

4588 peptides. (A) Relationship between the proenkephalin (PENK) 143e183 amino acid sequence and the m/z 4473 and m/z 4588 peptides. The m/z 4588 peptide was identified as PENK 143-183, and the only difference with m/z 4473 was the presence of an aspartic acid residue (D, molecular weight 115) on the N-terminus. (B) Amino acid sequences corresponding to the tandem mass spectrometry spectra of the m/z 4473 and m/z 4588 peptides after trypsin digestion. Four peptide fragments cleaved C-terminally to lysine (K) and arginine (R) are produced, all of which are peptides that constitute PENK 143-183.

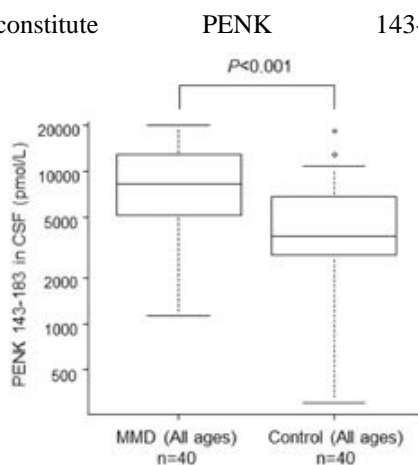


Fig.2 Comparison of patients with MMD and control patients in each age range;  $P < 0.001$ .

- (3) 本研究では極小の動脈検体からの RNA 抽出が困難であったため、マイクロアレイによる発現解析は困難であった。RNA 抽出については今後の研究における重要な課題と考えられた。また(2)にて得られた PENK 143-148 の断片化されたペプチドと脳脊髄液中に含まれる RNA との

関連についても今後の研究課題であるがまずは、MMD 患者と非 MMD 患者の脳脊髄液中に含まれる RNA を対象としてマイクロアレイによる発現解析を行い、MMD 患者において発現が有意に亢進もしくは抑制されている遺伝子および pathway を同定することも必要である。さらに、その後 Infinium methylation assay および miRNA array を用いてメチル化および miRNA 解析を行い MMD 患者において発現が強く亢進/抑制されている遺伝子および pathway とそれらを制御する epigenetics なメカニズムおよび関連を明らかにすることも今後の課題である。最終的には MMD の病態における内頸動脈終末部の血管壁における変化および血管新生の機構の解明につなげたい。一方、MMD 患者脳脊髄液中で特に小児患者で有意に増加している PENK 143-148 断片ペプチドについてその生理活性の究明を行う予定である。PENK 143-183 は前駆体である proenkephalin A のプロセッシングの過程で生じる断片ペプチドである。4 コピーの methionine-enkephalin (Met-ENK)、1 コピーの leucine-enkephalin (Leu-ENK) とそのほかの enkephalin ペプチドを生じる (Fig. 3)。PENK 143-183 は髄液中・血清中でも安定して存在し、これらの enkephalin ペプチドの濃度を反映している。我々はこの 3 つの断片ペプチドにおける生理活性と MMD の病態との関連についての仮説を立てており、今後はその検証も課題と考えている。

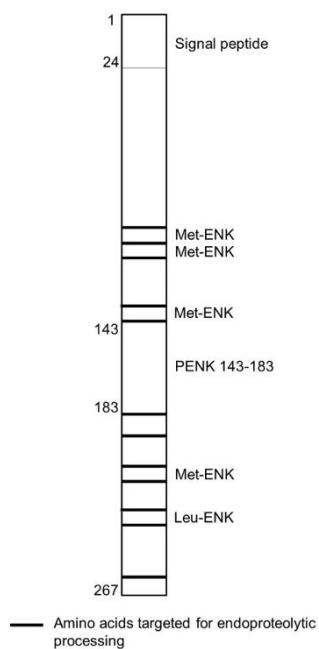


Fig. 3 Structure of human proenkephalin A.

During physiological processing, proenkephalin A produce 4 copies of methionine-enkephalin (Met-ENK), 1 copy of leucine-enkephalin (Leu-ENK), and 1 copy of proenkephalin (PENK) 143-183.

## 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 1 件 )

Yokoyama K, Maruwaka M, Yoshikawa K, Araki Y, Okamoto S, Sumitomo M, Matsuda A, Sakamoto Y, Shimizu K, Izumi T, Wakabayashi T. Elevation of PENK 143-183 in Cerebrospinal Fluid in Moyamoya Disease. World Neurosurg 109: e446-e459, 2017, 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

荒木芳生, 宇田憲司, 太田慎次, 村岡真輔,

岡本 奨, 若林俊彦, 当院における類もやもや患者の RNF213 遺伝子変異, 第 47 回日本脳卒中の外科学会学術集会, 2018 年 3 月 16 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

荒木 芳生 ( ARAKI, Yoshio )

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号 : 80467290

### (2)研究分担者

なし