

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08931

研究課題名(和文) iPSを用いた難病Moyamoya病に対する慢性炎症の関与に関する基礎研究

研究課題名(英文) Relationship between Chronic inflammation and progression of Moyamoya disease

研究代表者

穂刈 正昭 (Hokari, Masaaki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：30622807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間内にモヤモヤ病に対する慢性炎症関与に関して大きく分けて3つの検討を行った。モヤモヤ病におけるピロリ菌感染の有無について、浅側頭動脈の分子生物学的特性評価、バイパス手術後の間接血行再建の発達具合に対する評価。は残念ながらモヤモヤ病患者においてはピロリ菌および分泌炎症物質CagAは有意に多く分泌されているという事は無かったが、浅側頭動脈においては弾性版と膠原繊維がモヤモヤ病患者において障害されていることが分かった。また遺伝子変異の有無によってバイパス血管の発達が違うという新規的な発見も得られた。総合的にモヤモヤ病に対するより深い病態解明を進めることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間内にモヤモヤ病に対する慢性炎症関与に関して大きく分けて3つの検討を行った。モヤモヤ病におけるピロリ菌感染の有無について、浅側頭動脈の分子生物学的特性評価、バイパス手術後の間接血行再建の発達具合に対する評価。は残念ながらモヤモヤ病患者においてはピロリ菌および分泌炎症物質CagAは有意に多く分泌されているという事は無かったが、浅側頭動脈においては弾性版と膠原繊維がモヤモヤ病患者において障害されていることが分かった。また遺伝子変異の有無によってバイパス血管の発達が違うという新規的な発見も得られた。総合的にモヤモヤ病に対するより深い病態解明を進めることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study period, we examined three different types of experiment. First, the relationship between moyamoya disease and pylori infection, which did not prove to be involved in the pathogenesis. Second, the pathological changes of superficial temporal artery of Moyamoya patient and normal volunteer, which resulted that elastic membrane and collagen were decreased and damaged in the Moyamoya patients. Third, angiogenesis after bypass surgery were examined with different genetic background, which RNF213 is strongly correlated with in-direct bypass. Taken together, we were able to elucidate the novel pathological mechanisms of Moyamoya disease.

研究分野：脳血管障害

キーワード：モヤモヤ病 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Moyamoya 病患者においては感受性遺伝子 RNF213 R4810K の変異が高頻度に生じているという報告がなされているが、本遺伝子変異は人口の 2-3%に存在し、遺伝子異常のみが発症原因ではないことは明白であり、何らかの因子が関与 (2nd hit) していると考えられているが、現在のところその原因は不明である。

2. 研究の目的

本研究では 3 つの目的をもって研究を進めた。

(1) 近年明らかとなった、ヘリコバクターピロリ菌感染によって全身に分泌される Exosome とそれによって運ばれる炎症促進因子である CagA が Moyamoya 病発症の 2nd hit となり得るかどうかを、北海道大学生体試料バンクに保管されている Moyamoya 病患者血液検体を用いて検証する。また Moyamoya 病患者より取得した細胞より作成した iPS 細胞を用いて、CagA を投与することによる血管内皮細胞の障害機序を調べることで、Moyamoya 病の発症および進展におけるピロリ菌感染および Exosome による CagA 分泌の関与を明らかにすることを目的とする。

(2) 手術で得られた浅側頭動脈の組織学的検討を行い、RNF213 R4810K の変異との関係を調べることで、内頸動脈以外の血管においても血管形成に何らかの異常を生じているかどうかを検討する。

(3) バイパス手術を行った患者群において、バイパス血管の発達具合と RNF213 R4810K の変異との関係を調べることで、遺伝子変異は病態形成のみならず、血管新生にも影響を及ぼしているかどうかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) モヤモヤ病小児患者からの血液サンプル取得：モヤモヤ病小児患者 35 名から同意の元、血液サンプルを取得している。サンプルの白血球と血漿を分離後保存し北大病院 Biobank にて保管している。これらを以降の実験に使用している。ピロリ抗体、CagA 抗体の検討：ELISA 法 (ピロリ：E プレート “栄検” H.ピロリ抗体 II、CagA：Human helicobacter pyloricytotoxin-associated gene A protein IgG キット) で上記 35 名の感染既往を評価する。遺伝子型の確認：上記 35 名および追加の 2 名において RNF213 の遺伝子多型を確認するために DNA 抽出、サンガー法による Genotyping を行った。

(2) 研究期間中に手術治療を行った患者においては浅側頭動脈の採取を行い、(A) エラスチカマッソン染色 (弾性板と膠原線維の染色)、(B) コラーゲン I およびコラーゲン IV、(C) EGFR (平滑筋の異常を染色)、(D) VEGF (平滑筋由来のサイトカイン)、(E) vWF (内皮および内皮下コラーゲンの損傷評価)、(F) catenin (細胞間接着因子でカドヘリンと複合体形成、炎症性反応性変化)、(H) CD31 (内皮細胞)、(I) Tie-2 (血管新生促進因子)、(J) VCAM/Cadherin (細胞接着因子)、(K) α -SMA (平滑筋) の発現具合を免疫染色法で検討した。

(3) (1) で RNF213 R4810K の遺伝子変異の有無を確認している小児患者で術後一年目の MRI・MRA 画像が取得されている患者 28 例 (遺伝子多型 RNF213 を有する患者 21 例と有さない患者 7 例) を用いて術後のバイパス血管の発達を検討した。MRA の source image を用いて術直前と術後 6-12 ヶ月後の浅側頭動脈 (STA)、深側頭動脈 (DTA)、中硬膜動脈 (MMA)、脳底動脈 (BA) の直径を測定し血管径拡大率 (Caliber change ratios; CCR) を計算した。

4. 研究成果

(1) 35 名中 1 名のみがピロリ抗体陽性で、他は陰性であった。ただこの患者は CagA 抗体陰性であった。また 1 名ピロリ抗体陰性であったが CagA 抗体陽性となった。遺伝子検索では、RNF213 正常 GG が 13 名、変異型 AG が 23 名、変異型 AA は 1 名のみであった。これらの結果からモヤモヤ病発症にピロリ菌感染およびピロリ菌による CagA 産生が強く関わっているという仮説は否定されると考えられた。よって iPS を用いた検討には進まない方針とした。

(2) 遺伝子多型と浅側頭動脈の構造変異について検討し、正常対象 1 例、モヤモヤ病 (RNF ホモ GG5 例、ヘテロ AG5 例) で以下の染色結果を得ている。

(A) エラスチカマッソン染色 (弾性板と膠原線維の染色): AG > GG >> non モヤで硬化性内膜肥厚がある (粥種ではなく、圧負荷による脆弱性が考えられる)。

(B) コラーゲン I およびコラーゲン IV: GG = AG < non モヤで、モヤモヤ病患者で発現が低下している。

(C) EGFR (平滑筋の異常を染色): どの群も変わりなし。

(D) VEGF (平滑筋由来のサイトカイン): GG = AG < non モヤで、モヤモヤ病患者で発現が低下。

- (E) vWF(内皮および内皮下コラーゲンの損傷評価): どの群でも変わりなし。
(F) catenin(細胞間接着因子でカドヘリンと複合体形成、炎症性反応性変化): どの群でも発現していない。
(H) CD31(内皮細胞): ほとんどのモヤモヤ病患者で剥がれている。
(I) Tie-2(血管新生促進因子): GG = AG > non モヤでモヤモヤ病患者で発現が亢進。
(J) VCAM/Cadherin(細胞接着因子): (I)で内皮がほぼ剥がれていてデータとしては使えない。
(K) -SMA(平滑筋): どの群も変わりなし。

結論としてエラスチカマッソン染色においてモヤモヤ病と健常成人に大きな変化を認めた。浅側頭動脈と遺伝子異常については今までに知られておらず、全く新たな発見となり得ると考えられた。

(3) RNF213の遺伝子多型をサンガー法にて検出し変異有群(AA/AG)と変異無群(GG)に分けて関係を検討した。28例47側(AA:2例3側、AG:19例32側、GG:7例12側)を検討したところ、DTAは変異有群(2.5 + 0.1)が変異無群(2.0 + 0.2)に比較し有意に拡大し(p=0.03)、一方でSTAは変異無群(1.6 + 0.1)が変異有群(1.3 + 0.6)に比較し有意に拡大していた(p=0.02)。MMAとBAは両群で変化を認めなかった。遺伝子多型RNF213は病態の発生や進行に関与している事が知られていたが、バイパス術後の血行発達にも影響を与えている事が示された。その機序として変異有群において間接血行がより発達したことで、代償的に直接血行は少なくなっている可能性が考えられた。

以上より今まで明らかとなっていなかった遺伝子変異と血管形成の異常がこの度明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川堀 真人 (Kawabori Masahito) (50399870)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	
研究分担者	数又 研 (Kazumata Ken) (60634144)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	賣金 清博 (Houkin Kiyohiro) (90229146)	北海道大学・保健科学研究院・特任教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関