

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08967

研究課題名(和文) パスウェイ異常の同定によるもやもや病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of moyamoya disease by identifying pathway abnormalities

研究代表者

荒木 芳生 (Araki, Yoshio)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80467290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病および非もやもや病患者の脳表の微小動脈検体から total RNA を抽出、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行うプロトコルを確立した。もやもや病11例と非もやもや病9例の比較では88個の発現変動遺伝子が、パスウェイ単位では炎症や免疫応答、遺伝子修復や酸化リン酸化反応に関わる遺伝子群の変動が認められた。発現変動遺伝子に対しては定量PCRを行うことでマイクロアレイの結果の再現性を確認した。今回得られた知見はもやもや病の病態生理を解明する上で、今後の更なる研究のための重要な足掛かりになると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

もやもや病患者の病変部検体に対する網羅的な遺伝子発現解析はこれまで報告が無く、この点において、本研究は高い新規性を有するものと考えられる。また今回の実験で抽出された発現変動遺伝子の中には炎症に関わるものも多く、もやもや病の機序として炎症反応が関係しているとされる、これまでの報告を支持している。本研究の結果だけでは、これらの変化がもやもや病の原因なのか、それとも結果を反映しているかは不明であり、遺伝子の機能解析をはじめ今後更なる研究が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：We extracted total RNA from microarterial samples on the brain surface of patients with moyamoya disease and non-moyamoya disease, and established a protocol for comprehensive gene expression analysis using microarrays. A comparison of 11 cases of moyamoya disease and 9 cases of non-moyamoya disease revealed that 88 expression-variable genes were observed, and in pathway units, changes in genes involved in inflammation, immune response, gene repair, and oxidative phosphorylation were observed. The reproducibility of the microarray results was confirmed by performing quantitative PCR on the expression-variable genes. We believe that the findings obtained this time will be an important stepping stone for further research in the future in elucidating the pathophysiology of moyamoya disease.

研究分野：脳血管障害

キーワード：もやもや病 遺伝子発現解析 マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は内頸動脈終末部の狭窄が慢性的に進行し、側副路として脳底部に発達・形成される異常血管網(もやもや血管)を特徴とする難病である。2011年、genome wide association studyにより RNF213 遺伝子がもやもや病感受性遺伝子であることが明らかとなった。日本人患者の約90%に RNF213 p.Arg4810Lys の SNP が認められ疾患発症と極めて強い関連があると考えられるが、RNF213 の機能は不明な点が多く発症に至るメカニズムは未だ明らかにされていない。また、もやもや病病変部血管に対する網羅的な遺伝子発現解析については、今まで報告がみられない。

2. 研究の目的

本研究では、もやもや病患者の病変部血管に対し網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、もやもや病の発症メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

対象は名古屋大学病院にてバイパス術を行ったもやもや病患者と、対照としてバイパス術をおこなった脳動脈瘤患者から切り取った脳表の動脈壁を、およびてんかんにて脳葉切除術を行った患者の切除標本から脳表の動脈を検体として採取した。採取した血管壁検体は RNAlater (Qiagen 社)内に保存し、実験まで-80℃にて保存を行った。

(2) total RNA の抽出、増幅 cDNA の作成とマイクロアレイ

得られた検体から RNeasy Micro Kit (Qiagen 社)を用いて total RNA の抽出を行った。得られた RNA は Ovation PicoSL WTA System V2 (Nugen 社)を用いて増幅 cDNA を作成し、Sure Tag DNA Labeling kit (Agilent 社)を用いてラベル化を行った後、ヒトオリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Agilent 社)にハイブリダイズを行った。

(3) 網羅的遺伝子発現解析

得られたアレイデータの内、蛋白をコードする遺伝子に対して発現変動遺伝子解析を行った。マンホイットニー検定 $p < 0.001$ かつ平均値にて 2 倍を超える発現差を有する遺伝子を発現変動遺伝子とした。さらに Gene Set Enrichment Analysis によるパスウェイ単位での発現解析を行った。false-discovery rate < 0.25 をカットオフ値とした。また得られた発現変動遺伝子に対しては Gene Ontology 解析を行った。

(4) 定量 PCR

発現変動遺伝子の内、マイクロアレイにおける信号値の平均がハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) に近く、もやもや病の病態生理への関連が疑われたものについて、定量 PCR (SYBR Green 法)による再現性の確認を行った。GAPDH を内部標準遺伝子とした。

4. 研究成果

(1) 結果

もやもや病患者 11 例と対照として非もやもや病患者 9 例(脳動脈瘤患者 6 例、てんかん患者 3 例)との比較を行った。その結果、もやもや病群では非もやもや病群と比較して、62 遺伝子が高発現、26 遺伝子が低発現となった。発現変動遺伝子に対する Gene Ontology 解析では細胞形態形成、タンパク質チロシンキナーゼ活性、ユビキチン-タンパク質トランスフェラーゼ活性骨髄細胞分化、および白血球増殖の調節等が有意差のある項目となった。Gene Set Enrichment Analysis ではサイトカイン、樹状細胞、インターロイキン 12、抗原提示のパスウェイがもやもや病群で亢進を示し、酸化リン酸化反応と DNA 修復に関わるパスウェイがもやもや病群で低下を示した(図 1)。

定量 PCR では Tetraspanin 2 (TSPAN2)、ras homolog family member Q (RHOQ)、HECT, UBA, and WWE domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (HUWE1)、homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)、RAS protein activator-like 3 (RASAL3)の 5 種類の発現変動遺伝子を選択した。いずれもマイクロアレイと同様の結果であり、再現性が確認された(図 2)。

(2) 考察

これまでに、もやもや病血液検体に対する網羅的な遺伝子発現解析では炎症反応、サイトカインに関わるパスウェイの亢進を示したもののや、もやもや病病理検体で閉塞部血管壁に炎症細胞浸潤がみられたとする報告があるが、もやもや病病変部において、遺伝子発現のレベルでも同様の結果を得られたことは意義深いと考える。また近年、もやもや病患者内皮細胞において、ミトコンドリアの形態・機能異常を示したとの報告があり、もやもや病病変部血管における酸化リン酸化反応の抑制について、これらのミトコンドリアの機能異常との関連が示唆される。また発現変動遺伝子ではもやもや病群にて低下がみられた TSPAN2 と RHOQ はもやもや病病変部血管における平滑筋増殖と異常血管の形成にそれぞれ関連が疑われる。

(3) 結語

本研究はもやもや病病変部における網羅的な遺伝子発現解析を行った初の報告となる。今回得られた知見はもやもや病の病態生理を解明する上で、今後の更なる研究のための重要な足掛かりになると考える。

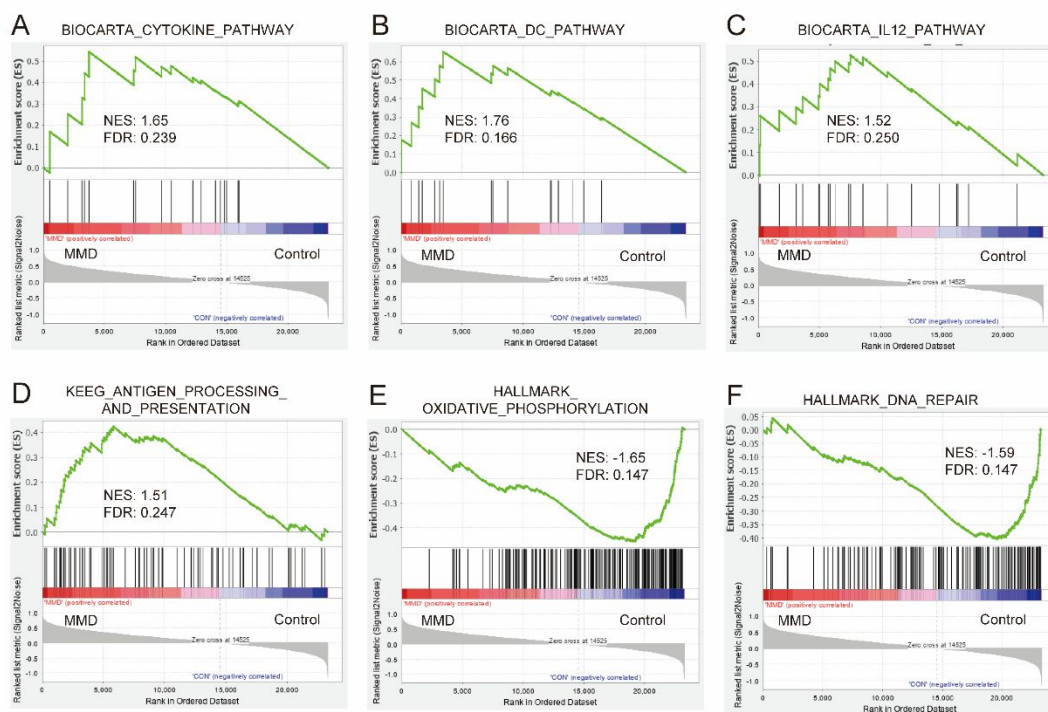


図 1 : Gene Set Enrichment Analysis

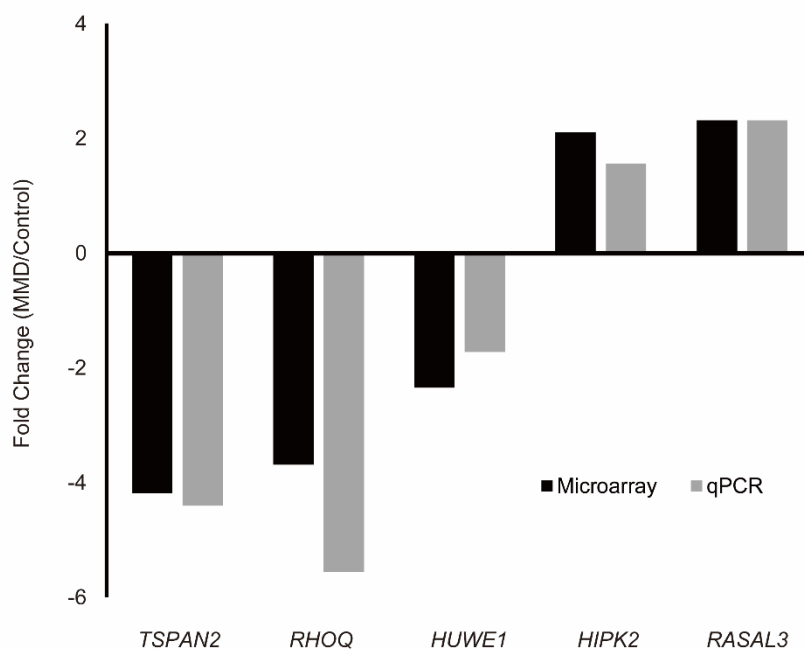


図 2 : 定量 PCR

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 | 青木 友浩 (Aoki Tomohiro) (40633144) | 国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404) | |

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 |
|---------|---------|
| | |