

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590586
 研究課題名（和文）脳血管疾患予防医療確立のための家族性脳動静脈奇形の遺伝子解析
 研究課題名（英文） Genetic analyses of familial arteriovenous malformation to establish preventive medical care against cerebrovascular disease
 研究代表者
 井上 純子（INOUE SUMIKO）
 鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
 研究者番号：20378657

研究成果の概要：家族性 AVM は例数が少数の上、小家系が多く、通常の positional cloning の方法による遺伝子同定が困難なため、家系内の連鎖解析に加えて、同地域の AVM 孤発例について mapping array を用いて SNP の症例対照比較による相関解析を行った。しかし両解析で共通の遺伝子座領域はほとんどなかった。さらに一卵性双生児二組で、mapping array を用いて差異について検証したが、有力な原因遺伝子座は認められなかった。AVM の家系は 6 家系以上に増加できなかったため、関連疾患 Osler-Rendu-Weber 病及び海綿状血管腫の遺伝子解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：脳血管疾患、脳動静脈奇形、遺伝疾患、遺伝子変異、疾病予防、連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、予防医学の新しい展開として、発症予防可能な疾患の感受性遺伝子を同定し、high-risk strategy を推進すべくフィールド予防医学を進展している。特に脳血管疾患においては、若年期に発症すれば突然死の危険があり、助かっても長期間にわたる障害を余儀なくされる。すでに脳血管疾患での実績として、家族性脳動脈瘤の遺伝子解析においては、発症者が 3 人以上の大家系 29 家系の協力を得て、ゲノムワイド解析により 17 番染色体、19 番染色体、X 染色体に候補領域を同定し、またこの領域内

の 17 番染色体セントロメアに感受性遺伝子を同定した。

(2) 脳動静脈奇形(AVM)は、先天性脳血管疾患の一つであり、頭蓋内出血の原因の 2% を占め、日本で特に多いことが報告されている。家系による遺伝子探索およびそれによる家系内 high-risk strategy が発症予防に重要かつ有効であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 日本人に多い先天性脳血管疾患の一つである脳動静脈奇形 (AVM) は幼少期・若年期の

比較的若い時期に脳出血などを起こす例が多く、生命の危険性および後遺症の恐れがあるため、AVM の遺伝要因を明らかにして発症の予防に役立てることが目的である。(2)我々は、中部地方の一地域で本疾患に高い地域集積性、家族性が認められることを確認し、ひとりの祖先からの遺伝的変異がその地理的状況のために受け継がれてきた可能性を考えた(IBD (Identical by descent)同祖性)。我々は遺伝子クラスターの存在する地域でリジン尿性蛋白不耐症の遺伝子変異の地域特異性を生かしてマスキリングを伴う予防医学を展開した経験を持ち、また同様に IBD を基礎とした疾患として Hartnup 病の原因遺伝子を同定した。これらの経験を生かして AVM の感受性遺伝子を同定することは可能であり、疾患予防につながるものと考えた。またチームで研究中の他の脳血管疾患との関連の探索にも有用と予測された。

3. 研究の方法

(1)脳 AVM は、大家系は少なく、ほとんどが親子あるいは兄弟例であり、また家族例も少数であるため、家系内のゲノムワイドの連鎖解析から得られる情報は限られる。そのため、連鎖解析とポジショナルクローニングによる通常の疾患遺伝子検索は困難である。そこで同祖性を仮定できる地域での家系内の連鎖解析に加えて、同地域で参加協力を得た AVM 孤発例 26 人、コントロール 30 人を対象にハプロタイプと single SNPs の各々の相関解析を GeneChip Mapping array を用いて行い、家族例での連鎖領域との突合せによる原因遺伝子候補領域の絞り出しを図った。この研究には医の倫理委員会の審査を経て承認を得ている。

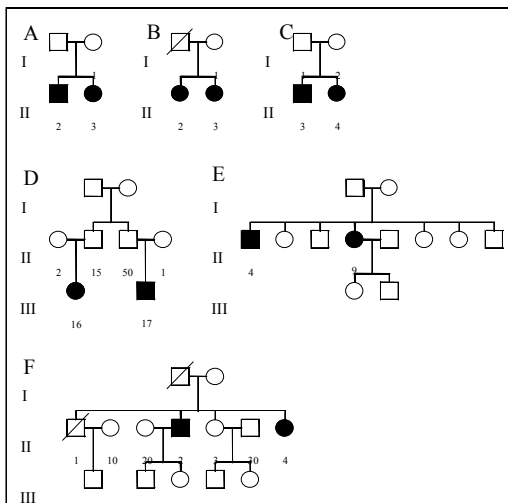


図 1 AVM 家系図

①家族性 AVM の 6 家系について、マイクロサテライトマーカーを用いて全ゲノムワイドでタイプ

分けし Genehunter で連鎖解析を行った。②連鎖解析で $p < 0.05$ の領域についてファインマッピングを行った。③AVM のクラスターがあり同祖性を仮定できる地域において AVM26 人、コントロール 30 人を対象に GeneChip Mapping 10K array により全ゲノムワイド 10240 SNPs のタイプ分けを行い解析ソフト GeneSpring GT を用いてハプロタイプと Single SNP の相関解析を行い Bonferroni 補正で $p < 0.0001$ から有意とした。④領域内の候補遺伝子についてシーケンシングにより遺伝子変異検索を行った。⑤AVM のクラスター地域において一人発症一人未発症の一卵性双生児二組を発見し、この 4 名について GeneChip Mapping 50K array により 58960SNPs における差あるいは microdeletion の有無について検証した。対象者にはそれぞれインフォームドコンセントを行い血液提供を受けた。

(2)同祖性を予想した地域では AVM 家系が増えなかったため、他地域の 1AVM 家系について一部の AVM との関連が報告されている ENG(9q34)、ALK1(12q11)のシーケンシングを行った。

(3)我々は以前東北地方で Osler-Rendu-Weber 病(ORW)と診断された患者家系について ENG 遺伝子の変異解析を行った。狭い地域にもかかわらず多数の変異が検出された。ORW の患者には AVM が認められることもあるため、今回 AVM との関連で別の地域の ORW 家系について ENG 遺伝子の変異解析を行った。この患者は多発性肺 AVM が認められたが、脳 AVM は認められなかった。

(4)疾病予防のための脳血管奇形の遺伝子解析として今年には AVM と同様に瘻管や脳出血の危険性のある海綿状血管腫(脳静脈奇形、CCM)と診断された 1 家系について連鎖解析および遺伝子変異解析を行った。

4. 研究成果

(1)家族例の連鎖解析では 3q27、4q34、6q25、7p25、13q32-33、16p13-12、20q11-13 に有意な領域が検出されたが、孤発例での相関解析結果で有意であった場所は 3p12、11q22、18q22、Xp21 であり、家族例と一致する領域はなかった。そこで家族例における連鎖領域で AVM と関連が疑われた EPHB3(3qter)、EFNB2(13q32-33)、POFUT1 (20q11)の coding 部分とその前後および EFNB2 promoter 部のシーケンシングを行ったが疾患と関連する変異は検出されなかった。また同地域で、形質が一致しない一卵性双生児二組について GeneChip Mapping 50K array を用いて microdeletion と copy number variation の有無について検証したところ、いずれも認められなかった。これらの結

果は対象が少数であるための検出力不足か、あるいは脳 AVM が遺伝性疾患でない可能性を示唆すると考え、これを論文発表した (S Inoue et al. Stroke, 38, 1368-1370 (2007))。

(2)他地域の 1AVM 家系について一部の AVM との関連が報告されている ENG(9q34)、ALK1(12q11)のシーケンシングを行ったが、疾患に関与する変異は検出されなかった。

(3)別の地域の ORW 家系について ALK 遺伝子に変異はなかったが、ENG 遺伝子の変異解析ではおそらく de novo の新しい変異が認められた。exon7 の片方のアレルで (7bp)insertion、(26bp)deletion が起こり、フレームシフトにより exon8(全 14exons)に終止コドンを生じる。このタンパク短縮(おそらく loss of function)が発症の原因と考えられた。endoglin 蛋白は膜蛋白で、TGF-ベータのアクセサリ蛋白であるとされている。内皮細胞に存在し血管新生に重要な働きをしていると考えられる。しかし、われわれの行った AVM 家族例の連鎖解析で有意であった領域とは ENG 遺伝子(9q34.1)の場所は一致していなかった。

(4)脳静脈奇形(CCM)家系の遺伝子解析で、CCM には CCM1, CCM2, CCM3 の 3 種類の遺伝子座に連鎖する型が報告されているため、各遺伝子座(7q21-q22, 7p13, 3q26.1)で連鎖解析を行った。CCM1 の遺伝子座に連鎖を認めたため、領域に存在し CCM 原因遺伝子の一つとされる KRIT1 について全 coding region と周辺のシーケンシングによる変異検索を行った。その結果、exon 16 に 1 塩基(A)の挿入変異を検出し、これによってチロシン(TAT)がストップコドン(TAA)に変化して、タンパクはここで終止することが明らかになった(Y635X)。変異は同家系の患者 3 人に共通していた。変異の位置は種間でよく保存されている主要ドメインにあり、KRIT1 と他のタンパクとの作用に重要であると考えられるため、変異による loss of function が疾患の原因と示唆された。KRIT1 タンパクの機能は未解明だが、細胞接着や細胞移動に役割を持ち、血管形成に関与していると推測されるため、脳 AVM とも関連する可能性がある。

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5件)

- ① Y. Mineharu, W. Liu, K. Inoue, N. Matsuura, S. Inoue, K. Takenaka, H. Ikeda, K. Houkin, Y. Takagi, K. Kikuta, K. Nozaki, N. Hashimoto, A. Koizumi. Autosomal dominant moyamoya disease maps to

chromosome 17q25.3. *Neurology*, 70, 2357-2363 (2008), 査読あり

- ② Y Mineharu, K Inoue, S Inoue, S Yamada, K Nozaki, N Hashimoto, A Koizumi. Model-based linkage analyses confirm chromosome 19q13.3 as a susceptibility locus for intracranial aneurysm. *Stroke*, 38, 1174-1178 (2007), 査読あり

- ③ M Toyoshima, A Asakawa, M Fujimiya, K Inoue, S Inoue, M Kinboshi, A Koizumi. Dimorphic gene expression patterns of anorexigenic and orexigenic peptides in hypothalamus account male and female hyperphagia in Akita type diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 703-708 (2007), 査読あり

- ④ Y Mineharu, K Inoue, S Inoue, K Kikuchi, H Ohishi, K Nozaki, N Hashimoto, A Koizumi. Association analyses confirming a susceptibility locus for intracranial aneurysm at chromosome 14q23. *J Hum Genet.* 53, 325-332 (2008), 査読あり

- ⑤ S Inoue, W Liu, K Inoue, Y Mineharu, K Takenaka, H Yamakawa, M Abe, J J Jafar, R Herzig, A Koizumi. Combination of linkage and association studies for brain arteriovenous malformation. *Stroke*, 38, 1368-1370 (2007), 査読あり

[学会発表](計2件)

- ① 井上純子、Osler-Rendu-Weber 病患者における endoglin 遺伝子の新しい変異、第 78 回日本衛生学会総会、2008 年 3 月 31 日、熊本市市民会館
- ② 井上純子、海綿状血管腫の遺伝子解析、第 79 回日本衛生学会総会、2009 年 3 月 31 日、北里大学白金キャンパス

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 純子 (INOUE SUMIKO)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：20378657

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者