

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10608

研究課題名（和文）もやもや病感受性遺伝子RNF213が炎症下で血管にあたえる影響の解明

研究課題名（英文）Effect of RNF213, a moyamoya disease susceptibility gene, on blood vessels under inflammation

研究代表者

小林 果（Kobayashi, Hatasu）

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70542091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：もやもや病の感受性遺伝子RNF213は疾患発症リスクを顕著に上昇させるが、一方で浸透率は低く、RNF213変異を有することに加え何らかの環境要因がトリガーになり発症に至ると考えられている。本研究では炎症下において発生する小胞体ストレスとRNF213の関係を検討し、RNF213抑制がミスフォールディングタンパク質の分解を担うSEL1Lの増加を通じて小胞体ストレスを軽減することを明らかにした。本研究から、RNF213が小胞体ストレス制御に重要な役割を果たすことが示され、炎症等により発生する小胞体ストレスがもやもや病の発症に関与する可能性が提示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究で、RNF213はもやもや病に限らず多くの血管狭窄性疾患の日本人における遺伝的リスクファクターであることが知られており、RNF213変異による血管狭窄疾患の発症に関与する環境要因を特定することは予防法の開発に大きく貢献すると考えられる。本研究は、RNF213が小胞体ストレス制御に関与することを証明し、炎症等の小胞体ストレスが発生する状況が環境要因である可能性を示す社会的にも意義深いものである。

研究成果の概要（英文）：RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease, markedly increases the risk of disease onset. However, the penetrance is lower than 1%, suggesting a synergistic relationship with additional environmental and genetic risk factors. In this study, we examined the relationship between RNF213 and endoplasmic reticulum stress occurring under inflammatory conditions and found that RNF213 suppression reduces endoplasmic reticulum stress through an increase in SEL1L, which is responsible for degradation of misfolded proteins. This study indicates that RNF213 plays an important role in the regulation of endoplasmic reticulum stress and suggests that endoplasmic reticulum stress caused by inflammation may be involved in the pathogenesis of moyamoya disease.

研究分野：衛生学、予防医学、遺伝学

キーワード：RNF213 もやもや病 血管狭窄 炎症 小胞体ストレス SEL1L

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、頭蓋内内頸動脈終端部の狭窄と「もやもや血管」とよばれる代償的な異常血管網形成によって特徴づけられる脳血管疾患であり、日本をはじめ世界中で若年性脳卒中の主たる原因として知られている。我々は、2011年にもやもや病の感受性遺伝子として *RNF213* 遺伝子を同定した。当初 *RNF213* に関する研究はほぼ皆無であったが、我々の研究グループも含めた国内外の研究により血管内皮細胞機能への影響をはじめとしたいくつかの細胞/生体機能やシグナル経路への関与を示す報告が相次いでいる。しかしながら、生理的およびもやもや病に果たす役割については大部分が未解明である。

我々が取り組んだ遺伝疫学研究から、*RNF213* p.R4810K 多型は、東アジアのもやもや病患者においてきわめて高頻度に見いだされ（日本では約 90%）、発症リスクを 100 倍以上に増加させることが明らかになっている。しかし、一方で p.R4810K は一般人口でも約 2%に見いだされ、もやもや病の有病率から推計すると浸透率が非常に低いことも示されている（保因者のうち 200 人に 1 人が発症）。したがって、もやもや病発症に至るには、*RNF213* p.R4810K 多型を有することに加えてトリガーとなる環境要因が必要であることが強く示唆されている。

誘因となる環境要因は現在も特定されていないが、我々はインターフェロンによって血管内皮細胞で *RNF213* が顕著に発現誘導されること、*RNF213* がインターフェロンによる内皮機能低下のメディエーターであることを証明し、感染症、自己免疫疾患などによる炎症が *RNF213* p.R4810K 保因者にもやもや病を発症させる環境要因である可能性を提唱している。

2. 研究の目的

もやもや病の本態である血管狭窄における *RNF213* 遺伝子と炎症の役割を解明することを研究目的とする。炎症が *Rnf213* 遺伝子改変マウスの脳をはじめとした血管に与える影響、血管機能関連分子群の変化を検討する。

3. 研究の方法

野生型マウス、*Rnf213* ノックアウト (KO) マウス、*Rnf213* p.R4810K 相当変異ノックイン (KI) マウスに炎症関連物質を投与した後、脳および肺について病理組織学的検討を行い血管における変化を検索する。さらに、採取した大動脈を用いて、もやもや病や血管機能に関連する分子群の発現を定量 PCR および western blotting 法で解析する。

また炎症関連物質で処理した細胞モデルでの検証に用いるため、*Rnf213* KO および KI マウスからマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を樹立する。

炎症関連物質投与した *Rnf213* KO および KI マウスにおいて脳血管や血管機能に変化を認めない場合は、炎症下で発生する小胞体ストレスや酸化ストレスに焦点を移し、*RNF213* との関係を検討する。

4. 研究成果

ウイルス感染に関わる炎症物質が *RNF213* 発現を誘導することが報告されているため、予備実験として野生型マウスにインターフェロンおよび Poly(I:C)を投与し *Rnf213* 発現を検討した。その結果、両者とも脳において有意に *Rnf213* を増加させたが、Poly(I:C)がより強力に発現誘導することが示された。そこで野生型マウス、*Rnf213* KO マウス、*Rnf213* KI マウスに隔日で 1 週間 Poly(I:C)を投与したのち脳、肺および大動脈を採取し、血管の形態・組織学な変化およびもやもや病や血管機能に関連する分子群の発現変化がないか検討を行った。しかしながら Poly(I:C)投与の有無にかかわらず、脳および肺において狭窄様変化をはじめとした血管変化は認めず、マウス genotyping 間で比較しても明らかな違いを認めなかった。同様にターゲットにした分子群でも有意な変化を見いだせなかった。

そこで、我々は炎症下で発生し血管疾患への関与が知られている小胞体ストレスに注目した。我々は以前に、*Rnf213* KO が小胞体ストレスにより糖尿病が引き起こされるマウスモデル (Akita マウス) の高血糖を改善することを証明しており (Kobayashi, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.015.)、*RNF213* が小胞体ストレス負荷下で何らかの役割を果たす可能性が考えられることから着想を得た。

RNF213 KO が小胞体ストレスに与える影響を検討するため、*Rnf213* KO マウス由来の MEF を小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンで処理して実験を行った。その結果、ツニカマイシンによる小胞体ストレスマーカー CHOP の発現誘導が抑制されることが明らかとなり、*RNF213* 欠損が小胞体ストレスを軽減することが示された (図 1A)。

小胞体ストレスへの応答反応の一つとしてミスフォールディングタンパク質を分解し小胞体ストレスを軽減する小胞体関連分解がある。小胞体関連分解に関与する分子について検討したところ、*Rnf213* KO MEF において小胞体関連分解に中核的な役割を果たす SEL1L が増加していることが明らかとなった (図 1B)。

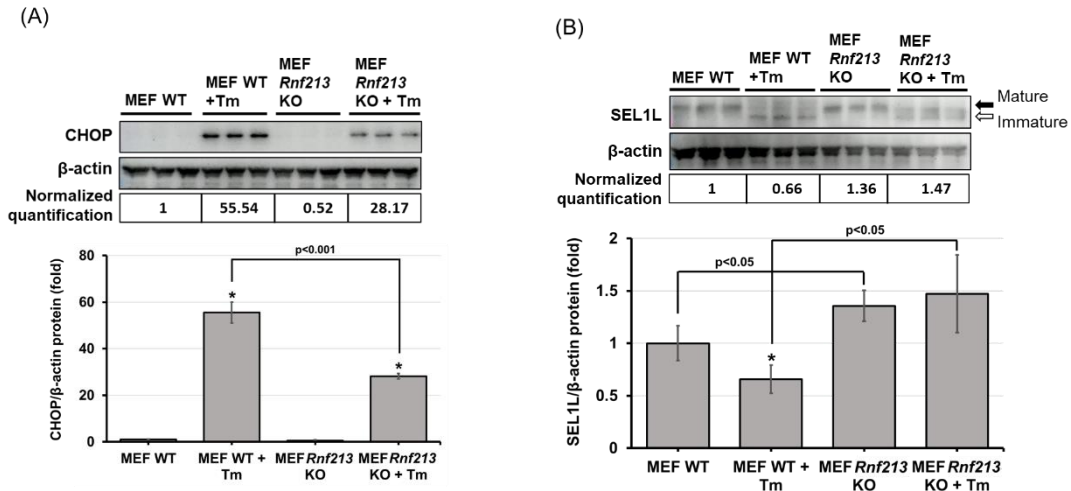


図1. Rnf213 KO MEFにおける小胞体ストレス軽減およびSEL1L増加. ツニカマイシン(Tm)処理したWTおよびRnf213 KOマウス由来MEFにおける (A) CHOPおよび(B) SEL1Lタンパク質の発現量

見いだされた小胞体ストレスの軽減と SEL1L の増加は HeLa 細胞における siRNA による *RNF213* ノックダウンによっても再現された (図 2)。さらに *RNF213* ノックダウンによる小胞体ストレス軽減が SEL1L 抑制によってキャンセルされたことから、小胞体ストレス軽減が SEL1L の増加を介して起こっていることも証明された (図 2A)。

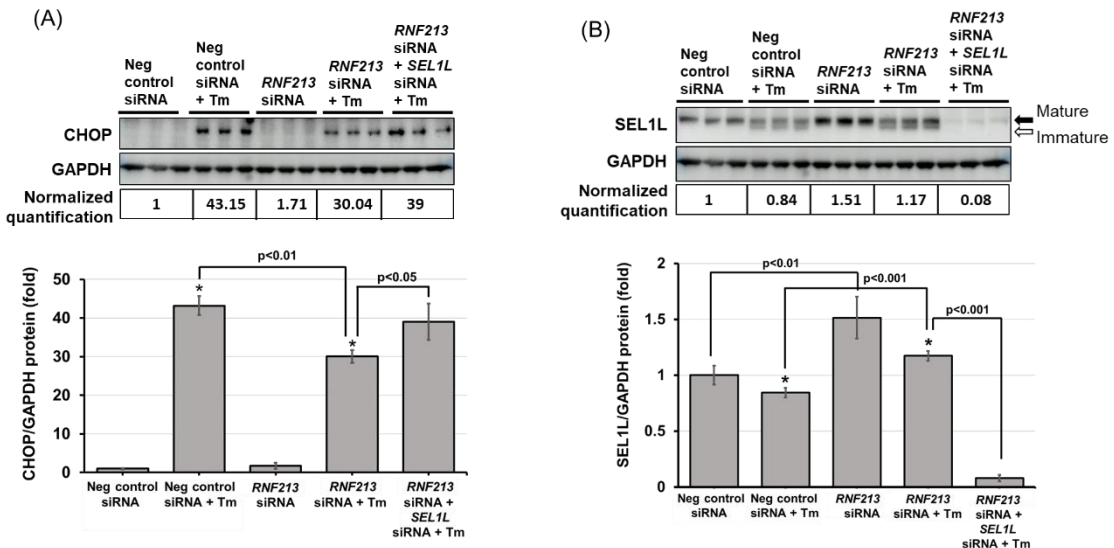


図2. Rnf213 抑制によるSEL1L増加を介した小胞体ストレス軽減. siRNAによりRNF213およびSEL1Lをノックダウンした後、ツニカマイシン(Tm)処理したHeLa細胞における (A) CHOPおよび(B) SEL1Lタンパク質の発現量

さらに小胞体ストレスが発生する Akita マウスの膵島においても、*Rnf213* KO により SEL1L が増加することを示した (図 3)。

以上より、*RNF213* の抑制により SEL1L が増加し小胞体分解を促進することで小胞体ストレスを軽減することが示唆され、*RNF213* が小胞体ストレス制御に重要な役割を果たす可能性が示された。本研究成果は責任著者として論文発表している (論文 4)。

RNF213 p.R4810K は gain of function のメカニズムでもやもや病を引き起こすと想定されており、p.R4810K 変異体は *RNF213* 抑制とは逆に小胞体ストレスへの脆弱性につながる可能性がある。今後は p.R4810K が小胞体ストレス制御に果たす役割を検討し、*Rnf213* KI マウスへの小胞体ストレス誘導試薬の投与による脳血管狭窄モデルの作成を試みていく。

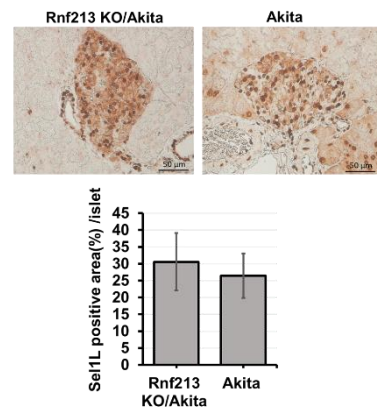


図3. Akitaマウス膵島におけるRnf213 KOによるSEL1L増加. Rnf213 KO/AkitaおよびAkitaマウス膵島のSEL1L染色像および定量化

また、本研究課題期間中には、*RNF213* p.R4810K と脳血管狭窄の関係を検討した臨床遺伝疫学研究（論文1および5）、*RNF213* 変異がアポトーシスに与える影響に関する研究（論文2）にも参画し、もやもや病と *RNF213* に関する総説も発表している（論文3および6）

論文（6件）

1. Kamimura T, Okazaki S, Morimoto T, Kobayashi H, Harada K, Tomita T, Higashiyama A, Yoshimoto T, Takahashi JC, Nakagawara J, Koga M, Toyoda K, Maruyama H, Koizumi A, Ihara M. Prevalence of RNF213 p.R4810K Variant in Early-Onset Stroke With Intracranial Arterial Stenosis. *Stroke*. 50(6):1561-1563.2019
2. Takeda M, Tezuka T, Kim M, Choi J, Oichi Y, Kobayashi H, Harada KH, Mizushima T, Taketani S, Koizumi A, Youssefian S. Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NFκB activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 525(3):668-674. 2020
3. Kobayashi H, Harada HK, Habu T, Nakamura Y, Kim J, Koizumi A. RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease has Multifunctional Roles in Biological Processes. *Moyamoya Disease: Current Knowledge and Future Perspectives* (eds. Kuroda S). 47-60. 2021
4. Ahmed S, Habu T, Kim J, Okuda H, Oikawa S, Murata M, Koizumi A, Kobayashi H. Suppression of RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease, inhibits endoplasmic reticulum stress through SEL1L upregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 18:609:62-68. 2022
5. Oichi Y, Mineharu Y, Agawa Y, Morimoto T, Funaki T, Hitomi T, Kobayashi H, Todo K, Tani S, Imamura H, Yoshida K, Kataoka H, Koizumi A, Sakai N, Miyamoto S. Characterization of Moyamoya and Middle Cerebral Artery Diseases by Carotid Canal Diameter and RNF213 p.R4810K Genotype. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 31(6):106481. 2022
6. Ihara M, Yamamoto Y, Hattori Y, Liu W, Kobayashi H, Ishiyama H, Yoshimoto T, Miyawaki S, Clausen T, Bang OY, Steinberg GK, Tournier-Lasserre E, Koizumi A. Moyamoya disease: diagnosis and interventions. *Lancet Neurol*. 21(8):747-758. 2022

学会発表（9件）

1. 小林果、木下秀之、加畑理咲子、森本貴昭、尾野亘、奥田裕子、原田浩二、木村剛、Shohab Youssefian、小泉昭夫 RNF213 遺伝子の肺高血圧症における遺伝的・機能的役割の検討 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術総会 2019年
2. Hatasu Kobayashi, Takaaki Morimoto, Kouji Harada, Hiroko Okuda, Shohab Youssefian, Shinji Oikawa, Mariko Murata, Akio Koizumi. RNF213 dysregulation aggravate cerebral hypoperfusion in carotid artery stenosis mouse model 9th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan, 2019
3. 小林果、森本貴昭、原田浩二、奥田裕子、Shohab Youssefian、及川伸二、村田真理子、小泉昭夫 RNF213 調節不全は両側総頸動脈狭窄マウスモデルの脳低灌流を悪化させる 第90回日本衛生学会学術総会 2019年
4. 崔廷米、武田美都里、小林果、手塚徹、原田浩二、小泉昭夫、Shohab Youssefian もやもや病感受性遺伝産物 RNF213 の結合蛋白質の同定 第90回日本衛生学会学術総会 2019年
5. Sharif Ahmed、小林果、奥田裕子、原田浩二、土生敏行、Shohab Youssefian、及川伸二、村田真理子、小泉昭夫 Rnf213 抑制はオス Akita マウスと異なりメス Akita マウスの糖尿病を改善しない 第91回日本衛生学会学術総会 2021年
6. 崔廷米、手塚徹、小林果、原田浩二、小泉昭夫、Shohab Youssefian もやもや病感受性遺伝子産物 RNF213 における結合蛋白質の制御機構の解明 第91回日本衛生学会学術総会 2021年
7. Sharif Ahmed、小林果、土生敏行、原田浩二、手塚徹、Shohab Youssefian、及川伸二、村田真理子、小泉昭夫 Effect of RNF213 suppression on endoplasmic reticulum stress 第92回日本衛生学会学術総会 2022年
8. Sharif Ahmed、土生敏行、Jiyeong Kim、奥田裕子、及川伸二、村田真理子、小泉昭夫、小林果 Endoplasmic reticulum stress is inhibited by RNF213 suppression, a susceptibility gene for moyamoya disease 第22回分子予防環境医学研究会 2023年
9. 小林果、Sharif Ahmed、土生敏行、及川伸二、小泉昭夫、村田真理子 もやもや病感受性遺伝子 RNF213 が小胞体ストレスに与える影響 第93回日本衛生学会学術総会 2023年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ihara Masafumi, Yamamoto Yumi, Hattori Yorito, Liu Wanyang, Kobayashi Hatasu, Ishiyama Hiroyuki, Yoshimoto Takeshi, Miyawaki Satoru, Clausen Tim, Bang Oh Young, Steinberg Gary K, Tournier-Lasserre Elisabeth, Koizumi Akio	4. 巻 21
2. 論文標題 Moyamoya disease: diagnosis and interventions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Lancet Neurology	6. 最初と最後の頁 747 ~ 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1474-4422(22)00165-X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oichi Yuki, Mineharu Yohei, Agawa Yuji, Morimoto Takaaki, Funaki Takeshi, Hitomi Toshiaki, Kobayashi Hatasu, Todo Kenichi, Tani Shoichi, Imamura Hiroto, Yoshida Kazumichi, Kataoka Hiroharu, Koizumi Akio, Sakai Nobuyuki, Miyamoto Susumu	4. 巻 31
2. 論文標題 Characterization of Moyamoya and Middle Cerebral Artery Diseases by Carotid Canal Diameter and RNF213 p.R4810K Genotype	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 106481 ~ 106481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ahmed Sharif, Habu Toshiyuki, Kim Jiyeong, Okuda Hiroko, Oikawa Shinji, Murata Mariko, Koizumi Akio, Kobayashi Hatasu	4. 巻 609
2. 論文標題 Suppression of RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease, inhibits endoplasmic reticulum stress through SEL1L upregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 62 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatasu Kobayashi, Kouji H. Harada, Toshiyuki Habu, Yasuhisa Nakamura, Jiyeong Kim, Akio Koizumi	4. 巻 -
2. 論文標題 RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease has Multifunctional Roles in Biological Processes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kuroda S. (eds) Moyamoya Disease: Current Knowledge and Future Perspectives.	6. 最初と最後の頁 47-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-33-6404-2_4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Midori Takeda, Tohru Tezuka, Minsoo Kim, Jungmi Choi, Yuki Oichi, Hatasu Kobayashi, Kouji H Harada, Tsunehiro Mizushima, Shigeru Taketani, Akio Koizumi, Shohab Youssefian.	4. 巻 525(3)
2. 論文標題 Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NF B activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 668-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamimura Teppei, Okazaki Shuhei, Morimoto Takaaki, Kobayashi Hatasu, Harada Kouji, Tomita Tsutomu, Higashiyama Aya, Yoshimoto Takeshi, Takahashi Jun C., Nakagawara Jyoji, Koga Masatoshi, Toyoda Kazunori, Maruyama Hirofumi, Koizumi Akio, Ihara Masafumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Prevalence of RNF213 p.R4810K Variant in Early-Onset Stroke With Intracranial Arterial Stenosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1561 ~ 1563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.118.024712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林果、Sharif Ahmed、土生敏行、及川伸二、小泉昭夫、村田真理子
2. 発表標題 もやもや病感受性遺伝子RNF213が小胞体ストレスに与える影響
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sharif Ahmed、土生敏行、Jiyeong Kim、奥田裕子、及川伸二、村田真理子、小泉昭夫、小林果
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum stress is inhibited by RNF213 suppression, a susceptibility gene for moyamoya disease
3. 学会等名 第22回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sharif Ahmed, 小林 果, 土生 敏行, 原田 浩二, 手塚 徹, Shohab Youssefian, 及川 伸二, 村田 真理子, 小泉 昭夫
2. 発表標題 Effect of RNF213 suppression on endoplasmic reticulum stress.
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sharif Ahmed, 小林 果, 奥田 裕子, 原田 浩二, 土生 敏行, Shohab Youssefian, 及川 伸二, 村田 真理子, 小泉 昭夫
2. 発表標題 Rnf213抑制はオスAkitaマウスと異なりメスAkitaマウスの糖尿病を改善しない
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林果、森本貴昭、原田浩二、奥田裕子、Shohab Youssefian、及川伸二、村田真理子、小泉昭夫
2. 発表標題 RNF213調節不全は両側総頸動脈狭窄マウスモデルの脳低灌流を悪化させる
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 崔廷米、武田美都里、小林果、手塚徹、原田浩二、小泉昭夫、Youssefian Shohab
2. 発表標題 もやもや病感受性遺伝産物 RNF213 の結合蛋白質の同定
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 崔 廷米, 手塚 徹, 小林 果, 原田 浩二, 小泉 昭夫, Youssefian Shohab
2. 発表標題 もやもや病感受性遺伝子産物 RNF213 における結合 蛋白質の制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林果、木下秀之、加畑理咲子、森本貴昭、尾野亘、奥田裕子、原田浩二、木村剛、Shohab Youssefian、小泉昭夫
2. 発表標題 RNF213遺伝子の肺高血圧症における 遺伝的・機能的役割の検討
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatasu Kobayashi, Takaaki Morimoto, Kouji Harada, Hiroko Okuda, Shohab Youssefian, Shinji Oikawa, Mariko Murata, Akio Koizumi
2. 発表標題 RNF213 dysregulation aggravate cerebral hypoperfusion in carotid artery stenosis mouse model
3. 学会等名 9th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	小泉 昭夫 (Koizumi Akio) (50124574)	京都大学・医学研究科・名誉教授 (14301)	

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
---------	---------