

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度 ～ 2010年度

課題番号：20590598

研究課題名（和文）家族性 Moyamoya 病の遺伝子発現解析による脳血管疾患の予防医療の確立

研究課題名（英文）Establishment of preventive healthcare of cerebrovascular disease by gene expression analysis in a familial moyamoya disease

研究代表者 人見 敏明 (HITOMI TOSHIAKI)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90405275

研究成果の概要（和文）：

常染色体優性家系の連鎖解析によって 17q25.3 に連鎖領域を同定し、Raptor 遺伝子上流の新規 SNP (ss161110142) のマイナーアリルが家族性 Moyamoya 病に共通することを明らかにした。Positional cloning を更に進めた結果、新規遺伝子 Mysterin を Moyamoya 病の感受性遺伝子として同定した。Mysterin 遺伝子は、591kDa の巨大タンパクをコードし、その機能は不明である。しかし、Mysterin の発現を抑制すると Zebra fish の頭蓋内動脈の異常を生じることから、Mysterin は Moyamoya 病の主たる病変部位である血管において重要な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have identified a susceptibility locus at 17q25.3 using genome-wide linkage analysis with Japanese autosomal dominant pedigrees. A novel rare variant, ss161110142, which was located within the promoter of the Raptor gene, was common to familial moyamoya disease. minor allele of ss161110142 was much more frequent in case than in controls among East Asian. However, this allele was not detected in the Caucasian case and control. Having carried out positional cloning for this region, we identified mysterin as a susceptible gene for moyamoya disease. This gene encodes a 591 kDa protein and functions unknown. Mysterin knock-down zebra fish showed the unique anomaly of angiogenesis. Aberrant function of mysterin may underlie the characteristic vascular phenotype observed in moyamoya disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：(1)予防医学 (2)Moyamoya 病 (3)遺伝子 (4)17 番染色体 (5)脳血管疾患 (6)SNP (7)東アジア (8)ヨーロッパ

1. 研究開始当初の背景

Moyamoya 病は、罹患率 10 万人・年あたり 3 名と稀な疾患ではあるが、若年性脳卒中の主要な原因のひとつである。半数以上は 10 歳以下の小児期に脳梗塞や一家性脳虚血症状で発症する。幼いうちから片麻痺や知能障害を来すため、社会的損失は大きい。成人では、30 歳代から 40 歳代に脳出血やくも膜下出血を来たしやすく、たとえ、生命の危機を脱しても高次脳機能障害が残存し、日常生活や職場への復帰を妨げられる。若年で発症することから、患者本人はもとより、患者を支える家族の負担も大きく、また、長期の治療を要するために、医療経済的にも重大な課題となっている。これらの問題を解決するために、早急な病態の解明が望まれる。

Moyamoya 病では、両側の内頸動脈終末部位が狭窄または閉塞し、それを補うように側副血行路(Moyamoya 血管)が発達する。内頸動脈の閉塞の原因としては、血管平滑筋細胞の萎縮や内膜への浸潤などの質的異常が指摘されているが(Aoyagi M. et al. Clin Neurol Neurosurg 99 (suple2): S213-S217, 1997)、その病態は不明な点が多い。Moyamoya 病患者の約 10%が家族歴を有していることから、これまでいくつかの連鎖解析が行われ、3p24、3q23、17q25 が候補領域として挙げられているが、感受性(原因)遺伝子は依然として不明である。これまでの研究は遺伝形式が不明な小家系を主な対象としていたが、我々は三代で常染色体優性遺伝形式を示す家系に焦点を絞り解析を行う戦略をとることとした(Mineharu Y, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 1025-29, 2006)。そして 15 家系の協力を得て連鎖解析を行ったところ、17 番染色体に maximum LOD score 8.07 の領域を得て、ハプロタイプ解析の結果、候補領域は 17q25.3 上の 3.5 Mb の領域(94 遺伝子を含む)に絞られた(Mineharu Y, et al. Neurology 70: 2357-2363, 2007)。さらに 2 家系を加えて解析した結果、同領域内の 2.0 Mb(40 遺伝子を含む)にまで絞り込まれた。また、この連鎖解析において、両側の Moyamoya 病のみならず、片側 Moyamoya 病や内頸動脈終末部狭窄・閉塞の患者も同一領域に連鎖し、リスクハプロタイプを共有することが示された。従って、Moyamoya 病感受性遺伝子を同定し、その病態を明らかにすることは、閉塞性脳血管疾患全体の病態解明につながると期待さ

れる。

Moyamoya 病感受性遺伝子を特定して、病態を明らかにするために、候補領域内遺伝子配列を決定して、原因となる変異の同定を進めるとともに、その病態の中心をなす血管平滑筋細胞と由来を同じくする不死化末梢リンパ球(Sata M, et al. Nat Med 8, 403-409, 2002)での RNA やタンパクレベルでの遺伝子発現解析や RNAi による発現調節の影響の観察、そして免疫染色による発現部位の特定を進めていく。

我々は、Moyamoya 病が、脳血管に特有な細胞構築と Willis 輪の形成という血行動態の特性を場として、遺伝子異常により血管構造に破綻が生じた病態と考える。Moyamoya 病感受性遺伝子の同定は、脳血管疾患に共通した脳血管特異的な機能上、構造上の分子メカニズムを明らかにし、脳血管疾患の新たな予防医療の確立、展開につながると考えられる。

2. 研究の目的

日本人に多い脳血管疾患の中で、Moyamoya 病、脳動脈瘤および脳動静脈奇形は遺伝的負荷が強い。特に Moyamoya 病は若年性脳出血の原因となるが、現在その感受性遺伝子は不明である。我々は、Moyamoya 病 17 家系での遺伝解析により 17 番染色体 75-77Mb まで領域を絞った。本研究課題では、この領域内にある遺伝子 40 について、網羅的に配列決定を行うと同時に、Moyamoya 病患者より樹立した不死化末梢リンパ球や血管標本を用いて、遺伝子の発現量の変化や細胞レベルでの機能解析を行い、感受性(原因)遺伝子を明らかにすることを目的としている。Moyamoya 病感受性遺伝子の同定は、脳血管疾患に共通した脳血管特異的な機能上、構造上の分子メカニズムの解明につながり、脳血管疾患の新たな予防医療の確立を目指す。

3. 研究の方法

我々は、本研究課題提出に先立ち、三省合同指針に基づいた研究計画書を京都大学医の倫理委員会に提出し、すでに了解を得ている。(1)遺伝解析と(2)不死化末梢リンパ球(LCLs)を用いた遺伝子発現解析という二つの異なった視点から相補的に領域を絞り込み、Moyamoya 病感受性遺伝子を特定する。

(1) 症例の拡大

日本、韓国、中国を含む東アジアとヨーロッパ諸国におけるもやもや病患者および健康集団の収集を継続して行った。

(2) 遺伝解析

3世代にわたる常染色体優性遺伝形式で伝達されている家族性 Moyamoya 病 17 家系の研究参加者の血液から DNA を抽出し、遺伝解析を行った。追加して収集した 14 家系についても同様に遺伝解析を行った。同一地域内で収集した Moyamoya 病患者と対象者の遺伝子配列の比較を行った。

Moyamoya 病の本態である血管の閉塞は、頭蓋内の内頸動脈以遠の末梢に生じやすく、本疾患の予測される病態に基づき、バイオインフォマティクス的手法を用いて、候補遺伝子のポジショナルクローニングを行った。

(3) 不死化末梢リンパ球を用いた遺伝子発現解析

Moyamoya 病の原因と推測する平滑筋細胞と末梢リンパ球は由来を同じくする。そこで、EB ウイルスにより不死化した末梢リンパ球を用いて、以下の実験を行う。不死化末梢リンパ球は、未発症者(6名)と Moyamoya 病患者(2家系、6名)の研究参加者より提供していただいた血液より作成した。

1. LCLs から mRNA を抽出し、(2)の遺伝解析より推測される遺伝子等について Real-time PCR により RNA レベルで検討した。

2. 1. で変動のあった遺伝子においてウエスタンブロット法によりタンパクレベルで検討した。

4. 研究成果

(1) 症例の拡大

現在までに東アジアにおいて家系例患者については日本 41 家系、韓国 1 家系、さらに日中韓合計で 209 名の孤発例患者および 757 名の健康者に研究に参加いただいた。EU 諸国においてはチェコの 1 家系および 7 名の孤発例患者、ドイツの 42 名の孤発例患者、384 名の健康者に参加いただいた。

(2) 遺伝解析

常染色体優性家系を用いた連鎖解析によって 17q25.3 に連鎖することを証明し、Positional cloning により Raptor 遺伝子上流に存在する新規 SNP (ss161110142) のマイナーアレルが家族性 Moyamoya 病に共通することを明らかにした(雑誌論文 1. Liu W, et al. Environ. Health Prev Med. 15(2):94-104, 2010)。日本国内において、Moyamoya 病患者における ss161110142 マイナーアレルは相関

研究により極めて高い相関が認められた(アレル頻度の検定:患者 26%、対照 1%, odds 比 51.5, $P=2.08 \times 10^{-29}$)。同様に、韓国、中国においても ss161110142 マイナーアレルの高い頻度での相関が認められた(韓国 患者 33%、対照 1%、オッズ比 84.09、 $P=9.42 \times 10^{-22}$;中国 患者 4%、対照 0%、オッズ比 NA、 $P=3.37 \times 10^{-2}$)。対してヨーロッパでは ss161110142 マイナーアレルは患者群でも対照群でも認められなかった。ss161110142 が東アジアにおける Moyamoya 病感受性遺伝子であることが示唆された。さらに欧米と比較したアジアにおける Moyamoya 病の有病率の高さに ss161110142 の分布の違いが関与する可能性が示された。

(3) Mysterin 遺伝子の同定

更に Positional cloning により解析を進めた結果、新規遺伝子 Mysterin を Moyamoya 病の感受性遺伝子として同定した(特許出願 2009-244938, 国際特許出願中、投稿査読中)。Mysterin 遺伝子は、591kDa の巨大タンパクをコードし、その機能は不明である。未発症者と Moyamoya 病患者由来の不死化末梢リンパ球での Mysterin の mRNA レベル、タンパク質レベルでの発現に有意な差は見られなかった。しかし、Mysterin の発現を抑制すると Zebra fish の頭蓋内動脈の異常を生じることから、Mysterin は Moyamoya 病の主たる病変部位である血管において重要な役割を果たすことが強く示唆された。

家系の分析では、Moyamoya 病のみならず、片側 Moyamoya 病や内頸動脈終末部狭窄・閉塞の患者もこのリスクアレルを有しており、一連の狭窄病変についても関与が推定される。さらに浸透率が低いことから、遺伝子以外の関与についても想定される。

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 2 件)

1. Liu W, Hashikata H, Inoue K, Matsuura N, Mineharu Y, Kobayashi H, Kikuta KI, Takagi Y, Hitomi T, Krischek B, Zou LP, Fang F, Herzog R, Kim JE, Kang HS, Oh CW, Tregouet DA, Hashimoto N, and Koizumi A. A rare Asian founder polymorphism of Raptor may explain the high prevalence of Moyamoya disease among East Asians and its low prevalence among Caucasians. Environ Health Prev Med, 15, 94-104, 2010. 査読有

2. Hashikata H, Liu W, Inoue K, Mineharu Y, Yamada S, Nanayakkara S, Matsuura N, Hitomi

T, Takagi Y, Hashimoto N, Miyamoto S, and Koizumi A. Confirmation of an association of SNP rs1333040 on 9p21 with familial and sporadic intracranial aneurysms in Japanese patients. Stroke, 41, 1138-1144, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 劉万洋、箸方宏州、井上佳代子、松浦範夫、小林果、人見敏明、原田浩二、峰晴陽平、小泉昭夫、Raptor のまれなアジア人の創始者多型は、もやもや病の有病率の人種間の乖離を説明する、第 81 回 日本衛生学会、2011 年 3 月 25-28 日 東京
2. 人見敏明、松浦範夫、重松陽介、岡野善行、原田浩二、小泉昭夫、新生児マススクリーニングで発見した全身性カルニチン欠損症の遺伝子解析、第 81 回 日本衛生学会、2011 年 3 月 25-28 日 東京
3. 森戸大介、劉万洋、山崎悟、人見敏明、小林果、松浦範夫、箸方宏州、原田浩二、高島成二、宮本享、橋本信夫、小泉昭夫、永田和宏、新規巨大ATP アーゼ/ ユビキチンリガーゼ Mysterin は血管新生を制御し、モヤモヤ病(ウイルス動脈輪閉塞症)に関与する、第 62 回 日本細胞生物学会大会、2010 年 5 月 19-21 日 大阪
4. 劉万洋、箸方宏州、井上佳代子、松浦範夫、小林果、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫、Raptorのpromoter多型は、家族性もやもや病において患者と非患者を完全に分離する、第 80 回 日本衛生学会、2010 年 5 月 10 日 宮城
5. 箸方宏州、劉万洋、井上佳代子、Nanayakkara Shanika、松浦範夫、人見敏明、宮本享、小泉昭夫、日本人の家族性・弧発性脳動脈瘤症例において、ch9p21 に有意な相

関を確認、第 80 回 日本衛生学会、2010 年 5 月 10 日 宮城

6. 小林果、劉万洋、箸方宏州、井上佳代子、松浦範夫、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫、もやもや病感受性遺伝子のアジア、ヨーロッパにおける患者対照研究、第 80 回 日本衛生学会、2010 年 5 月 10 日 宮城
7. 人見敏明、劉万洋、箸方宏州、松浦範夫、小林果、原田浩二、井上佳代子、小泉昭夫、Moyamoya病感受性遺伝子の日本国内における患者対照研究、第 80 回 日本衛生学会、2010 年 5 月 10 日 宮城
8. 小泉昭夫、劉万洋、箸方宏州、峰晴陽平、井上佳代子、松浦範夫、皆田睦子、井上純子、廣澤 倫、Shanika Nanayakkara、小林果、竹中勝信、原田浩二、人見敏明、常染色体優性モヤモヤ病の候補領域の詳細なマッピングとアジアやヨーロッパにおける症例拡大、日本人類遺伝学会 第 54 回大会、2009 年 9 月 23 日～26 日 東京
9. 小泉昭夫、箸方宏州、劉万洋、井上佳代子、峰晴陽平、山田茂樹、松浦範夫、井上純子、竹中勝信、人見敏明、原田浩二、家族性脳動脈家系の追跡調査および、全ゲノム連鎖解析、日本人類遺伝学会 第 54 回大会、2009 年 9 月 23 日～26 日 東京
10. 松浦範夫、人見敏明、原田浩二、重松陽介、小泉昭夫、全身性カルニチン欠損症に認められたsplicing異常、第 79 回 日本衛生学会総会、2009 年 3 月 2 日～31 日 東京
11. 劉万洋、峰晴陽平、井上佳代子、松浦範夫、井上純子、人見敏明、箸方宏州、小泉昭夫、常染色体優性もやもや病に対する候補領

域の絞り込みとアジア、ヨーロッパの症例の収集、第 79 回 日本衛生学会総会、2009 年 3 月 29 日～31 日 東京

12. 人見敏明、劉万洋、箸方宏州、峰晴陽平、松浦範夫、廣澤倫、井上純子、皆田睦子、原田浩二、井上佳代子、小泉昭夫、Moyamoya病感受性遺伝子同定のためのin vitro実験系での検討、第 79 回 日本衛生学会総会、2009 年 3 月 29 日～31 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：モヤモヤ病関連遺伝子及びその利用
発明者：小泉 昭夫、永田 和宏、森戸 大介、高島 成二、山崎 悟、橋本 信夫、松浦 範夫、人見 敏明

権利者：京都大学小泉 昭夫、永田 和宏、森戸 大介、高島 成二、山崎 悟、橋本 信夫、松浦 範夫、人見 敏明

種類：特許

番号：特願 2009-244938

出願年月日：2009 年 10 月 23 日

国内外の別：国内、国際

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://hes.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 敏明 (HITOMI TOSHIAKI)
京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90405275

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小泉 昭夫 (KOIZUMI AKIO)
京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50124574

皆田 睦子 (MINATA MUTSUKO)
京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00456857

井上 純子 (INOUE JYUNKO)
京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20378657

小林 果 (KOBAYASHI HATASU)
京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70542091