

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17979

研究課題名(和文)ノックアウトラット脳動脈瘤モデルを用いた候補遺伝子Xの解析

研究課題名(英文)Analysis of susceptibility gene X using knock out rat aneurysm model

研究代表者

新井 直幸 (Arai, Naoyuki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70868736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：目的は有望な脳動脈瘤感受性遺伝子Xについて、そのノックアウトラットモデルを作成し実際に脳動脈瘤形成が促進されるかを調べることである。F1ヘテロ遺伝子変異同士の体外受精にて受精卵の凍結胚192個を得た。これらを個体復帰させ、脳動脈瘤モデルを作成し、候補遺伝子Xの関与を検討した。14日目に、4か所のWillis輪前半の分岐部(ACA-OAとICA-MCA)の脳動脈瘤発生率を比較したところ、遺伝子Xのホモとヘテロの個体は野生型に比べ、1.75倍高かった( $p<0.01$ )。血圧に差はなかった。一方、脳動脈瘤の大きさには差はなかった。以上、候補遺伝子Xは脳動脈瘤感受性遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代型シーケンサーを駆使した、頻度が低く効果サイズの高いレアバリエーションの解析で特定された有望な脳動脈瘤感受性遺伝子Xについて、そのノックアウトラットモデルを用いて機能解析を行った。脳動脈瘤の発生率は、遺伝子欠損ラットで有意に高く、有望な候補遺伝子であることが明らかとなった。臨床で得られた候補遺伝子をin vivoの実験系で解析した研究は極めてまれであり、学術的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：To clarify the contribution of susceptibility gene-X mediated cascade to the incidence or the enlargement of IAs, we subjected rats deficient in gene X or their littermates to the model of IAs previously established. IA formation at 4 bifurcation sites in the anterior circulation of the circle of Willis was examined using specimens harvested on the 14th day of IA induction. We found that the incidence of IAs was significantly exacerbated in heterozygous rats or ones deficient in gene X (1.75 times higher each,  $p<0.01$ ) compared with that in wild type animals without influencing systemic blood pressure. Our study demonstrated for the first time that a loss of function variants in gene X might confer susceptibility to IAs.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳動脈瘤 遺伝子 ラット ノックアウト

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は頭蓋内の主幹動脈の分岐部に生じる嚢状の血管の病的な膨らみで、その破裂によりクモ膜下出血を生じる。クモ膜下出血の転機は重篤で、その患者の半数以上が死亡または重大な後遺症を遺す。近年、画像診断技術の向上と普及により未破裂脳動脈瘤が診断されるケースが増えていることもあり、易破裂性も含めた疾患リスクの評価、さらには瘤の増大や破裂を防止する新たな治療への社会的要請は高い。脳動脈瘤の成因としては、高血圧症、喫煙、血行力学的要因などの環境要因と、家族集積性・脳動脈瘤を合併しやすい遺伝性疾患の存在から遺伝要因が想定され、これらの複合作用により発生する多因子疾患と考えられている。このような遺伝的背景の存在から、応募者が所属する東京女子医科大学東医療センター脳神経外科では成因の解明を目的に遺伝要因の解析を行ってきた。しかし、GWAS で特定された感受性遺伝子座の効果サイズはいずれも小さく、集団での頻度が高いリスクアレルの生物学的効果も軽微なため、脳動脈瘤発生の分子基盤理解や臨床応用に直結しづらいという問題があった(いわゆる missing heritability)。そこで当科では独自に、GWAS では捉えられない遺伝要因の探索にも取り組み、本学で既に稼働の実績があった次世代型シーケンサーを駆使して頻度が低く効果サイズの高いレアバリエーションの解析を行ってきた。一方、世界の脳動脈瘤の遺伝解析研究に目を向けると、シーケンス技術の発展に伴い、今までに脳動脈瘤家系症例を対象に全エクソームシーケンスを行った 5 件の報告があり、複数の感受性遺伝子が特定された。これらの遺伝子に対し当科で所有する家族歴を有する(主に罹患同胞対)脳動脈瘤症例を用いて replication study を行ったところ、罹患同胞対で共有する遺伝子 X の複数のナンセンス変異を認めため、人種間を超えて障害度の高いレアバリエーションが再現されたことになり、有望な脳動脈瘤感受性遺伝子と判断した。但しこの遺伝子 X の機能の詳細は不明で、脳動脈瘤形成にどのように関与しているか明らかでないため、ノックアウトラットを用いて実際に脳動脈瘤が形成されるか検討する実験を思い立った。すなわち、ヒト脳動脈瘤患者の遺伝解析から特定された有望な感受性遺伝子 X が、実際に動物モデルで脳動脈瘤形成に寄与するかを評価することが、本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代型シーケンサーを駆使した頻度が低く効果サイズの高いレアバリエーションの解析で特定された有望な脳動脈瘤感受性遺伝子 X について、そのノックアウトラットモデルを作成し実際に脳動脈瘤形成が促進されるかを調べ、機能的にも脳動脈瘤原因遺伝子と判断できるかを検証することである。現在、シーケンス技術の発展に伴いヒト脳動脈瘤患者サンプルを用いた遺伝解析は盛んに行われ、数多くの感受性遺伝子座・変異の報告があるが疾患に対するその効果サイズは小さく、脳動脈瘤発生の分子基盤理解や臨床応用に繋がり難い傾向にある。今回の研究課題では、有望な脳動脈瘤感受性遺伝子 X について、その機能を低下またはなくした遺伝子改変ラットを作成し、直接モデル動物の脳動脈瘤発生率・増大率・破裂率などを検討する。脳動脈瘤ラットモデルは、京都大学の橋本らが確立したものがゴールドスタンダードで、塩化ナトリウム食と一側腎摘出または腎動脈結紮による高血圧負荷と頸動脈結紮による血行力学的負荷に、エラスチンやコラーゲンなどの架橋形成を阻害する  $\alpha$ -aminopropionitrile(BAPN) 投与による動脈壁の脆弱性負荷により脳動脈瘤が形成される。脳動脈瘤感受性遺伝子 X のノックアウトラットと正常ラットで、それぞれこの脳動脈瘤ラットモデルを作成し、脳動脈瘤の発生率・増大率・破裂率を比較し遺伝子 X が脳動脈瘤発生に関与しているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子 X ノックアウトラットの作成

株式会社特殊免疫研究所に依頼をして、候補遺伝子 X の遺伝子変異ラットを作成した。CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて遺伝子 X プロモーター領域から exon30 までの約 75kb を欠損した遺伝子変異ラット、ファウンダー(PCR スクリーニングおよびシーケンス解析で同定)を交配適期まで育成。このラットを野生型 SD ラットとの自然交配により 6 頭の産仔を得た。この 6 頭に対し PCR スクリーニングにより候補遺伝子 X F1 変異体候補個体の選別を行った結果、1 頭の F1 ヘテロ遺伝子変異ラットを同定した(ホモ変異体受精卵作成用種オス)。さらに、雌性ヘテロ変異体個体を得るため、候補遺伝子 X 変異ラット(ファウンダー)と野生型 SD 系ラットとの自然交配により 43 頭の産仔を得た。これらに PCR スクリーニングを行い、若齢のホモ変異体受精卵作製用ヘテロ雌性個体を 9 頭準備できた。さらに、F1 ヘテロ遺伝子変異同士の体外受精にて受精卵の凍結胚 192 個を得た。これらを個体復帰させ、脳動脈瘤モデルを作成し、候補遺伝子 X の関与を検討した。

### (2) 脳動脈瘤モデルラットの作成

前述のように橋本らが作成した脳動脈瘤ラットモデルは、高血圧負荷、血行力学的負荷、動脈壁の脆弱性負荷を加えると高率に脳動脈瘤が形成される。遺伝子 X 改変ラット野生型、ヘテロ、ホモ各群 20 個体を目安に以下のような処置を行う。

- ・ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下に、左総頸動脈の結紮（血行力学的負荷）と左腎動脈後枝の結紮（高血圧負荷）
  - ・手術後から 8%塩化ナトリウム含有食の投与（高血圧負荷）
  - ・テールカフ法による血圧測定
- (3)脳動脈瘤の発生率・増大率・破裂率の評価
- ・発生率：14 日目の時点で麻酔薬過量投与にて安楽死させ、4 % paraformaldehyde solution で経心臓から固定した。摘出した脳を 10%脳底部主幹動脈を実態顕微鏡下で脳より剥離、Elastica van Gieson 染色を行い、前大脳動脈・後大脳動脈分岐部（ACA-OA）と内頸動脈・中大脳動脈分岐部（ICA-MCA）で内弾性板の断裂を脳動脈瘤発生と定義し、各群の脳動脈瘤の発生率を比較する。
  - ・増大率：脳動脈瘤の大きさを cellSens Standard software で測定し、各群で発生した脳動脈瘤の大きさに違いがあるか検討した。
- (4)統計処理
- データは mean ± SEM で示す。脳動脈瘤の発生率の各群での比較は post-hoc Scheffe test か Fisher's Exact Test を行ったのちに Kruskal-Wallis test を BellCurve for Excel を用いて行った。p value は 0.05 をもって有意と判断した。

#### 4 . 研究成果

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて遺伝子 X プロモーター領域から exon30 までの約 75kb を欠損した遺伝子変異ラットを作成した。F1 ヘテロ遺伝子変異同士の体外受精にて受精卵の凍結胚 192 個を得た。個体復帰させたのち、PCR スクリーニングを行った 7 週のオスの野生型 20、ヘテロ 32、ホモ 20 匹を用いて実験を行った。

4 か所の Willis 輪前半の分岐部（ACA-OA と ICA-MCA）の脳動脈瘤発生率を比較したところ、遺伝子 X のホモとヘテロの個体は野生型に比べ、1.75 倍高かった ( $p < 0.01$ )。血圧に差はなかった。最も血行力学的なストレスのかかる右 ACA-OA では、ホモとヘテロの個体は 100%脳動脈瘤が発生するのに比べ、野生型は 80%であった。両側の ICA-MCA では、脳動脈瘤の発生率は、野生型 7/20、ヘテロ 26/32、ホモ 17/20 であった。一方、脳動脈瘤の大きさには差はなかった。

以上、候補遺伝子 X は脳動脈瘤感受性遺伝子である可能性が示唆された。

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

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