

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16613

研究課題名（和文）RNF213遺伝子変異に着目した頭蓋内アテローム動脈硬化症モデルの確立

研究課題名（英文）Model establishment of intracranial atherosclerosis based on genetic variants of RNF213

研究代表者

高口 素史（Kouguchi, Motofumi）

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20794324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：虚血性脳卒中（脳梗塞）の主要な原因の一つである頭蓋内主幹動脈狭窄は、アジア人種に発症が多く、遺伝的な要因が関与すると報告されている。近年、もやもや病の疾患感受性遺伝子として ring finger protein 213（RNF213）上の単一のミスセンス変異が、もやもや病のみならず、様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄に関連することが明らかになってきた。この遺伝子変異を有する動物モデルを用いて生活習慣病が及ぼす影響、その他遺伝子変異を有するダブルノックアウトの作成、既存の免疫に関するノックアウトを用いて、脳血管障害の新たな切り口での検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

もやもや病の感受性遺伝子として報告されたRNF213の遺伝子変異は日本人の正常例でも2%と比較的高頻度に存在する。一方で、欧米人の正常例ではRNF213遺伝子多型はほとんどみられない。また、Miyawakiらの報告では、もやもや病群では82.8%、頭蓋内動脈狭窄群では23.2%のRNF213遺伝子変異がみられた。これらの事実から、RNF213遺伝子変異の存在に高血圧、糖尿病、脂質異常症、メタボリックシンドロームが加わると、表現型として頭蓋内アテローム性動脈硬化症を発症するのではないかと考え研究を推進している。また、原因を追求するため、ダブルノックアウトの作成や、免疫系にも検討を加えている。

研究成果の概要（英文）：Ischemic brain attack was caused by various factors, including intracranial major vessel stenosis / occlusion. It is well known RNF213 gene was involved in not only Moyamoya disease but also various intracranial major vessel stenosis / occlusion. Then, I used RNF213 knockout mouse and investigated as follows, 1) Effects of lifestyle-related diseases, 2) Genetic influence using RNF213 & X gene double-knockout mouse, 3) Effects of immunity using IL27 knockout mouse.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳血管障害 脳梗塞 RNF213

1. 研究開始当初の背景

頭蓋内主幹動脈狭窄症は、脳梗塞の代表的な原因の一つである。基礎疾患として高血圧、糖尿病、脂質異常症、メタボリックシンドロームなどを有し、アテローム性動脈硬化症と診断される例が多い。高度狭窄を呈する頭蓋内アテローム性動脈硬化症は、特に脳梗塞再発のリスクが高いことが知られている。二次予防として血管内治療が期待されており、ランダム化比較試験が行われた。しかし、発症後 30 日以内の TIA または脳卒中患者において、積極的内科治療への経皮的血管形成術 + ステント (PTAS) 併用による二次予防効果を積極的内科治療のみと比較した SAMMPRIS 試験は、2011 年に中間解析で 30 日後の脳卒中/死亡リスクが PTAS 群で積極的内科治療群にくらべ有意に高かったため早期に登録が中止された。積極的内科治療の内容はアスピリン 325mg およびクロピドグレル 75mg 投与、降圧治療(目標収縮期血圧 < 140mmHg(糖尿病は < 130mmHg)、脂質低下治療(目標 LDL コレステロール < 70mg/dl)、糖尿病治療、禁煙、運動といった、従来の研究と比較してかなり厳格なものであった。それにも関わらず脳梗塞の再発が 15% (平均観察期間 32 か月) と高率であり、いまだに臨床上大きな問題である。したがって頭蓋内アテローム性動脈硬化症のさらなる病態の解明と新規治療法の開発が望まれる。

頭蓋内アテローム性動脈硬化は、アジア人種に発症が多く、遺伝的な要因の関与が報告されている。近年、もやもや病の疾患感受性遺伝子として ring finger protein 213 (RNF213) が報告された。さらに、患者血液を解析したところ RNF213 上の単一のミスセンス変異が、もやもや病のみならず、頭蓋内アテローム性動脈硬化にも関連することが明らかになってきた。

アテローム性動脈硬化の好発部位である頸動脈や大動脈におけるアテローム性動脈硬化症は、アポリポ蛋白 E 欠損マウス等の確立された動物モデルがあるが、頭蓋内動脈狭窄症モデルは確立されていない。頭蓋内アテローム性動脈硬化症は高い脳梗塞再発率を有している。これを解決するためには、さらなる病態の解明が必須である。頭蓋内アテローム性動脈硬化症の動物モデルの確立は大変意義深いと考えられる。

頸動脈においては、LDL コレステロールが蓄積し、LDL コレステロールを貪食したマクロファージが泡沫化しプラークが形成される。しかし、頭蓋内アテローム性動脈硬化症のプラークは LDL コレステロールの蓄積やマクロファージは少なく、プラークには線維性成分が多いといわれている。また、頸動脈狭窄症と頭蓋内動脈狭窄症の原因となる疾患は、高血圧、糖尿病、脂質異常症、メタボリックシンドロームであり、共通しているにも関わらずそれぞれプラークの特徴が異なっている。したがって、同じアテローム性動脈硬化症に分類されているものの、頸動脈と頭蓋内動脈では大きく病態が異なっている可能性がある。

前述のとおり近年、もやもや病の疾患感受性遺伝子として RNF213 が報告され、RNF213 欠損マウスも作成されている。Sonobe らは RNF213 欠損モデルを用いて、もやもや病疾患モデルの確立を試みたが、胎児や発達過程は正常で、もやもや病を発症しなかった。一方、血管壁肥厚を誘導するモデルである総頸動脈結紮を用いて、血管壁における病理組織学的変化について評価したところ、RNF213 欠損モデル群において、頸動

脈の動脈硬化性変化は軽減していた。RNF213 遺伝子変異は、頭蓋内アテローム性動脈硬化症との関連も報告されている。我々は、感受性遺伝子である、RNF213 遺伝子変異の存在に高血圧、糖尿病、脂質異常症、メタボリックシンドロームが加わると、表現型として頭蓋内アテローム性動脈硬化症を発症するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

RNF213 欠損マウスに高血圧、糖尿病、脂質異常症、メタボリックシンドロームを発症させ頭蓋内動脈狭窄症を生じるかを調べる。また、頭蓋内アテローム性動脈硬化の発生・進行に関連すると報告されている血中高感度 CRP (hs-CRP)、Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、IL-6、アディポネクチンも評価する。一方、RNF213 欠損マウスでの頸動脈硬化に対する軽減作用も示唆されているものの、動脈硬化の基礎疾患モデルでこれを検討した報告はない。したがって、頸動脈も摘出し RNF213 遺伝子変異が頸動脈プラーク形成におよぼす影響についても明らかにする。

3. 研究の方法

RNF213 ノックアウトマウスを用いた頭蓋内主幹動脈狭窄モデルの作成

本研究では RNF213 ノックアウトマウスに、アテローム性動脈硬化症を来す基礎疾患である、A.高血圧、B.糖尿病、C.脂質異常症、D.メタボリックシンドロームを発症させ頭蓋内主幹動脈狭窄を生じるかを調べる。我々の研究室では基礎の研究室の協力を得、RNF213 ノックアウトマウスを作成した。

A. 高血圧

高血圧モデルとしては、Hobo ら (J Clin Invest 2000) の方法を用いる。8 週齢のマウスに処置を行う。全身麻酔下に右腎を摘出し、7 日後に再度全身麻酔下に左腎の 2/3 を焼灼する。

B. 糖尿病

8 週齢のマウスに 3 週間の高脂肪食管理とする。高脂肪食開始から 14 日でストレプトゾトシン (35mg/kg) を腹腔内投与する。ストレプトゾトシンは膵細胞への選択的毒性を有することから本法は比較的簡便に糖尿病モデルを作成することができ広く用いられている。

C. 脂質異常症

マウスの血中コレステロールは HDL コレステロールが大部分を占めるため、食事による脂質異常症の発症誘導は困難である。したがってノックアウトマウスを用いる。RNF213 欠損マウスとアポリポ蛋白 E 欠損モデルを交配して 2 重欠損モデルを作成する。アポリポ蛋白 E は、血中からの LDL コレステロール除去に寄与するアポリポ蛋白質である。アポリポ蛋白 E 欠損マウスは 10 週間で冠動脈、大動脈、頸動脈にアテローム性動脈硬化を発症することが知られており、動脈硬化研究に頻用されているため、これを使用する。

D. メタボリックシンドローム

実臨床において複数の動脈硬化危険因子をもつ例も多い。そのためメタボリックシンドロームモデルでの検討も必要と考えられる。6 週齢 C57BL/6 マウスに 6 週間の高脂肪食を与えることでメタボリックシンドロームを発症することが知られており、この方法を用いる。

上記 A.B.D では野生型マウスおよび RNF213 ノックアウトマウスにおいて処置終了後 4、8、12 週間後に、C.ではアポリポ蛋白 E 単独欠損マウスと RNF213 との 2 重欠損マウスを 8、12 週間後にマウスを麻酔薬大量投与によって安楽死させる。心腔内注射により 50 ml の生理食塩水で血管内を灌流したのちに脳主幹動脈および両側頸動脈を摘出する。摘出した動脈を Hematoxylin-Eosin 染色および Elastica-Masson 染色にて評価し動脈硬化性変化を生じているか調べる。

RNF213 ダブルノックアウトマウスの作成

RNF213 ノックアウトマウスに加え、ある遺伝子をノックアウトしたマウスを作成した。このマウスを掛け合わせ、ダブルノックアウトマウスを作成した。このノックアウトマウスにおける脳梗塞モデルの作成

免疫に關与する IL27 ノックアウトマウスでの脳梗塞モデルの作成

IL27 ノックアウトマウスで脳梗塞モデルを作成し、この遺伝子での効果を検証する。

4 . 研究成果

RNF213 ノックアウトマウスを用いて環境要因が及ぼす影響について検証した。これらのモデルにおいて、いくつかの環境要因が脳梗塞を悪化させることが分かった。現在得られた標本を中心に、組織学的に検討している。今後、これらの成果を発表する予定である。

RNF213 ダブルノックアウトマウスを作成した。このマウスでは行動異常が見られることが分かり、現在詳細な検討を行っている。

IL27 ノックアウトマウスでの脳梗塞モデル

IL27 ノックアウトマウスに脳梗塞超急性期では、脳梗塞巣が縮小することがわかり、論文作成を行った。今後、論文を投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masuoka Jun, Yoshioka Fumitaka, Furukawa Takashi, Koguchi Motofumi, Ito Hiroshi, Inoue Kohei, Ogata Atsushi, Nakahara Yukiko, Abe Tatsuya	4. 巻 17
2. 論文標題 Microsurgical Approach for True Posterior Communicating Artery Aneurysms: Literature Review and Illustrative Case	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 156 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0042-1750840	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 Ogata A, Ebashi R, Koguchi M, Suzuyama K, Liu X, Tanaka T, Masuoka J, Yakushiji Y, Hara H, Abe T.	4. 巻 146
2. 論文標題 Influence of Microcatheter Position on First-pass Success of Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Neurosurg .	6. 最初と最後の頁 e708-e713.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.10.173.	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
---------	---------