

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20985

研究課題名(和文)患者由来異種移植モデルを用いた脳海綿状血管奇形の病態解明と個別化治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenesis of cerebral cavernous malformations using patient-derived xenografts

研究代表者

本郷 博貴 (Hongo, Hiroki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80908682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：眼窩内海綿状血管奇形の遺伝子変異解析を行い、GJA4遺伝子の体細胞点変異 GJA4 c.121G>T (p.Gly41Cys) が高頻度(25/26例[96.2%])に認められることを新規に同定した。アフリカツメガエル卵母細胞やヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた機能解析を行い、同変異がGJA4ヘミチャネルの活性を亢進させる機能獲得型変異で、これにより血管内皮細胞機能障害を引き起こすことを明らかにした。これらの結果を論文として発表した。さらにモデル動物実験として同Gja4変異ノックインマウス作製を進め、今後個体化・繁殖しより詳細な病態解明を行うための基盤を整えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿状血管奇形において新規の関連遺伝子変異を同定したことから学術的意義が大きいと考えられる。遺伝子変異の機能の一部まで明らかにしたことは、より発展的な研究にもつながる成果である。海綿状血管奇形には既存の治療方法では難治になる場合もあり新規治療法が求められていることから、本研究成果の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：By sequencing several vascular malformations, including orbital cavernous venous malformations (OCVMs), we identified that a somatic missense mutation, c.121G > T (p. Gly41Cys) in GJA4 is frequently present in OCVMs. Functional analysis revealed the mutation to be a gain-of-function mutation that induces a hyperactive hemichannel, which subsequently induces the loss of normal function of endothelial cells. In addition, we generated genetically engineered mice in which the Gja4 mutation is knocked-in.

研究分野：脳血管疾患

キーワード：脳海綿状血管奇形 遺伝子変異 動物モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳海綿状血管奇形は中枢神経系に生じる血管奇形である。出血性脳卒中の主要な原因の一つであり、神経損傷に伴う重篤な身体後遺機能障害をもたらす。治療として外科的摘出や血管内治療が行われるものの根治が困難な症例も多く、原因・病態の解明とそれに基づいた根治的な薬物療法の開発が求められている。

家族性例において *CCM1*, *CCM2*, *CCM3* における遺伝子変異が同定されたことから、これらの遺伝子のノックアウトマウスを主な対象として分子基盤解明や分子標的薬開発が進められてきた。しかし近年、孤発性例において *PIK3CA* や *MAP3K3* に体細胞変異が報告された。このように現在も新たな遺伝子変異の同定が続いており、血管奇形形成にいたる病態は従来想定された以上に複雑と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、脳海綿状血管奇形臨床検体を含む血管奇形を対象とした遺伝子変異解析を行うことで、血管奇形の発症に関わる遺伝子変異を同定することを目指した。さらに、細胞実験や動物実験を行うことにより、同定された遺伝子変異により血管奇形にいたる詳細な病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 臨床検体を対象とした遺伝子変異解析

第一に、discovery 解析として、脳海綿状血管奇形 12 例、眼窩内海綿状血管奇形 3 例、椎体血管腫 1 例の計 16 例を対象に、次世代シーケンサーを用いたターゲットディープシーケンスによる体細胞変異解析を行った。続いて、validation 解析として追加の眼窩内海綿状血管奇形 23 例に対し droplet digital PCR (ddPCR) による変異解析を行った。さらに、変異細胞種の同定を目的に、Magnetic-activated cell sorting を用い、血管奇形組織を血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞、陰性細胞に sorting した上で ddPCR 解析を行った。

2. ツメガエル卵母細胞を用いた変異機能解析

ツメガエル卵母細胞を用いた whole cell voltage clamp によりチャネル機能の解析を行った。卵母細胞へ野生型、変異型タンパク質を発現させた上でヘミチャネル、ギャップ結合電流を測定した。

3. ヒト血管内皮細胞株を用いた変異機能解析

ヒト血管内皮細胞株として human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) を用い、in vitro 実験を行った。レトロウイルスベクターを用い野生型および変異型タンパク質を過剰発現させ、HUVEC の細胞機能を評価した。

4. 動物実験による病態解明

海綿状血管奇形病変中の血管内皮細胞を免疫不全マウス皮下へ注射することによる patient-derived xenograft model 作製を目指し、外科的摘出により得られた海綿状血管奇形検体に対し magnetic-activated cell sorting を行い CD31 陽性細胞と陰性細胞を分離した。これに加え、遺伝子改変によるモデルマウス作製を進めた。マウスには遺伝子改変実験に一般的に用いられる C57BL/6J マウスを使用した。マウス受精卵に対し CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により遺伝子変異ノックインを行った。

4. 研究成果

1. 臨床検体を対象とした遺伝子変異解析

discovery 解析の結果、眼窩内海綿状血管奇形の 3 例に *GJA4* c. 121G>T (p. Gly41Cys) が共通して認められた。同変異はその他の血管奇形には認められなかった。脳海綿状血管奇形と椎体血管腫には特徴的な変異は認められなかった (図 1)。同 *GJA4* 変異が新規の海綿状血管奇形関連遺伝子変異の候補と考えられたため、追加の眼窩内海綿状血管奇形検体を収集し Validation 解析を行った。この結果、追加検体 23 例中、22 例に同変異が認められた (合計 25/26 例 (96.2%))。変異アレル頻度は 4.6~16.4% だった (図 2)。同 *GJA4* 変異は眼窩内海綿状血管奇形組織の中でも一部の細胞種のみが有すると考えられたことから、血管奇形組織を CD31 陽性細胞、陰性細胞に sorting した上で ddPCR 解析を行った。この結果、CD31 陽性細胞において変異アレル頻度が高くなり、同 *GJA4* 変異は眼窩内海綿状血管奇形病変の中でも血管内皮細胞がもつことが示唆された。

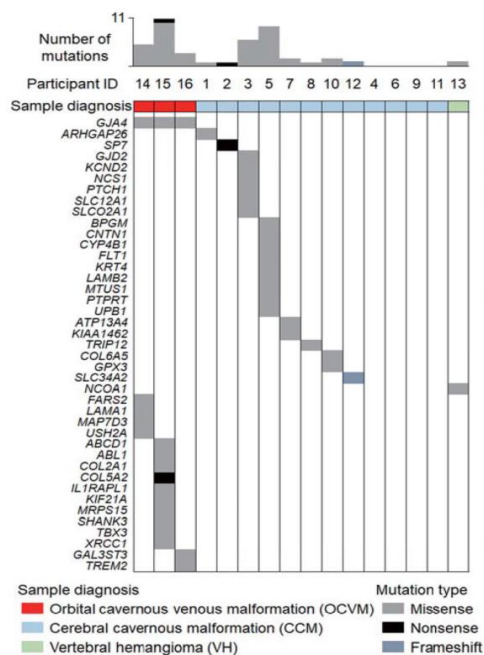


図 1. Discovery 解析の結果 (Hongo et al. *Angiogenesis*. 26:37-52, 2023 (CC BY 4.0)より改変)

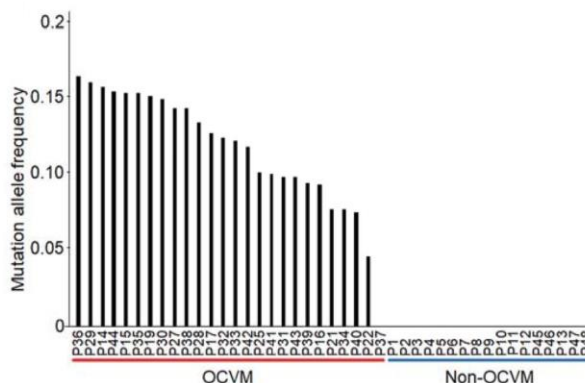


図 2. Validation 解析の結果 (Hongo et al. *Angiogenesis*. 26:37-52, 2023 (CC BY 4.0)より改変)

2. ツメガエル卵母細胞を用いた変異機能解析

GJA4 は Cx37 と呼ばれる膜タンパク質で、ヒトで 21 種あるコネクシンファミリーの一つである。コネクシンは 6 量体となることでヘミチャネルを形成し、細胞内外のイオン・情報伝達物質の交換に働く。さらに、隣接する細胞のヘミチャネル同士が結合することでギャップ結合を形成し、隣接細胞間の情報伝達を担う。GJA4 はコネクシンの中でも血管組織（内皮細胞や平滑筋細胞）に高発現なアイソフォームで、血管構築や血管機能の維持に働くことが知られている。そこで、変異がチャネル機能に影響する可能性を考え、ツメガエル卵母細胞を用いた whole-cell voltage clamp によるチャネル機能解析を行った。この結果、変異型では、野生型と比較し、ヘミチャネル活性が有意に高かった。これはコネクシン阻害剤の一種であるカルベノキソロンにより阻害された。一方、ギャップ結合チャネル活性には有意差は認められなかった (図 3)。

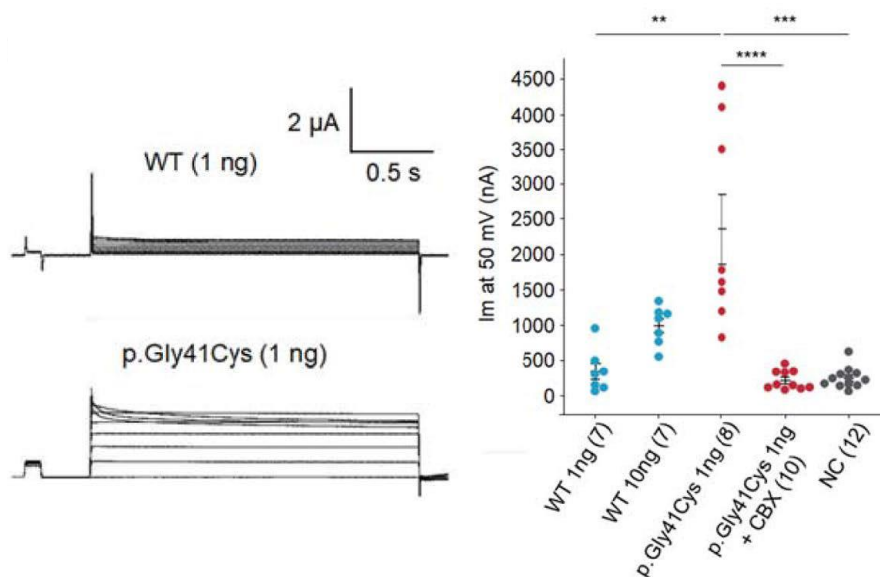


図 3. whole-cell voltage clamp によるヘミチャネル活性測定の結果 (Hongo et al. *Angiogenesis*. 26:37-52, 2023 (CC BY 4.0)より改変)

3. ヒト血管内皮細胞株を用いた変異機能解析

HUVEC を用いた実験を行い、同変異の血管内皮細胞における機能を評価した。この結果、変異型 HUVEC では野生型 HUVEC と比較し、通常の敷石状の細胞形態の喪失、細胞生存能や tube formation の低下が認められた。これらの異常もカルベノキソロンにより rescue された(図 4)。

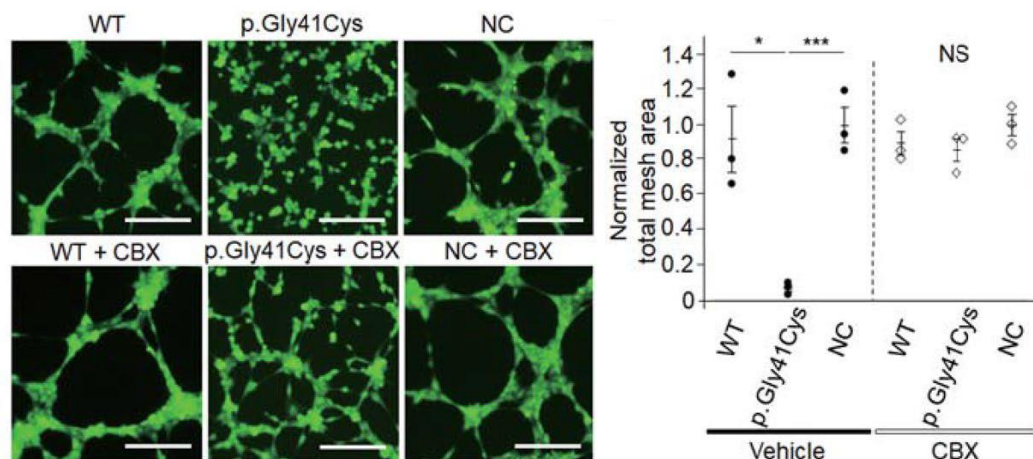


図 4. HUVEC を用いた機能解析の結果 (Hongo et al. *Angiogenesis*. 26:37-52, 2023 (CC BY 4.0)より改変)

4. 動物実験による病態解明

眼窩内海綿状血管奇形と同様の手法により、脳海綿状血管奇形についても外科的摘出された検体に対し CD31 抗原を標識とする Magnetic-activated cell sorting を行うことで血管内皮細胞を分離する手法を確立した。今後、これにより得られた細胞を培養し免疫不全マウス皮下へ注射し、異常血管塊の形成を評価していく。また、遺伝子改変マウスとして *Gja4* c.121G>T (p. Gly41Cys) ノックインマウスの作製を進めた。C57BL/6J マウス受精卵に対する CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行い、仮親に移植し産子を得た。これを野生型マウスと交配して得た産子についてジェノタイピングを行い、*Gja4* c.121G>T (p. Gly41Cys) を持つマウスを同定した。このマウスと野生型マウスとの交配により *Gja4* c.121G>T (p. Gly41Cys) をヘテロ接合性にもつマウスの凍結胚を作製した。今後個体化、繁殖し異常血管の形成などについて評価する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hongo Hiroki, Miyawaki Satoru, Teranishi Yu, Mitsui Jun, Katoh Hiroto, Komura Daisuke, Tsubota Kinya, Matsukawa Takashi, Watanabe Masakatsu, Kurita Masakazu, Yoshimura Jun, Dofuku Shogo, Ohara Kenta, Ishigami Daiichiro, Okano Atsushi, Kato Motoi, Hakuno Fumihiko, Takahashi Ayaka, Kunita Akiko, Ishiura Hiroyuki, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Somatic GJA4 gain-of-function mutation in orbital cavernous venous malformations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angiogenesis	6. 最初と最後の頁 37～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10456-022-09846-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hongo Hiroki, Miyawaki Satoru, Teranishi Yu, Ishigami Daiichiro, Ohara Kenta, Sakai Yu, Shimada Daisuke, Umekawa Motoyuki, Koizumi Satoshi, Ono Hideaki, Nakatomi Hirofumi, Saito Nobuhito	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetics of brain arteriovenous malformations and cerebral cavernous malformations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 157～167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-022-01063-8	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 ISHIGAMI Daiichiro, KOIZUMI Satoshi, MIYAWAKI Satoru, HONGO Hiroki, TERANISHI Yu, MITSUI Jun, SAITO Nobuhito	4. 巻 9
2. 論文標題 Symptomatic and Stenotic Developmental Venous Anomaly with Pontine Capillary Telangiectasia: A Case Report with Genetic Considerations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 139～144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/jns-nmc.2022-0022	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本郷 博貴, 宮脇 哲, 栗田 昌和, 加藤 基, 寺西 裕, 堂福 翔吾, 小原 健太, 石神 大一郎, 岡野 淳, 三井 純, 加藤 洋人, 渡邊 正勝, 辛 正廣, 中富 浩文, 後藤 浩, 石川 俊平, 岡崎 睦, 齊藤 延人
2. 発表標題 眼窩内海綿状血管奇形関連遺伝子変異の同定
3. 学会等名 第18回日本血管腫血管奇形学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本郷 博貴, 宮脇 哲, 寺西 裕, 堂福 翔吾, 小原 健太, 石神 大一郎, 岡野 淳, 三井 純, 加藤 洋人, 栗田 昌和, 渡邊 正勝, 辛 正廣, 中富 浩文, 後藤 浩, 石川 俊平, 齊藤 延人
2. 発表標題 眼窩内海綿状血管奇形における新規関連遺伝子変異の同定
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第81回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Hongo, Satoru Miyawaki, Nobuhito Saito
2. 発表標題 Epidemiology/etiology of cerebral cavernous malformations
3. 学会等名 10th European-Japanese Cerebrovascular Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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