

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16677

研究課題名（和文）脳血管内皮細胞特異的AAVベクターを用いた新しい脳血管奇形モデル動物の作製

研究課題名（英文）Novel animal model of cerebrovascular malformations

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳血管奇形は中枢神経系に生じる異常血管の集簇である。これまで家族性例に生殖細胞変異として同定された遺伝子変異の導入により疾患モデル動物が作製されてきたが、これらのモデルのみでは病態を十分に説明しきれていなかった。そこで本研究では、先行研究で眼窩内海綿状血管奇形において体細胞変異として新規同定したGJA4変異を血管内皮細胞特異的に導入したマウスを作製した。LoxP-stop-LoxP-変異型Gja4を導入したマウス（floxedマウス）を作製し、これをTie2-Creマウスと交配することにより血管内皮細胞特異的Gja4ノックインマウスとした。変異型GJA4を発現したマウスは胎生致死であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はGja4変異が血管内皮細胞に対して有害であることを示唆し、GJA4変異が血管奇形の直接の原因となっている可能性を支持するものと考えられた。今後詳細な組織学的解析や分子生物学的な解析を行うことにより、血管奇形の形成に関わる詳細な病態の解明、延いては新規治療法の開発につながる知見の獲得が可能となることが期待された。

研究成果の概要（英文）：Cerebrovascular malformations are clusters of abnormal blood vessels in the central nervous system. Animal models of the disease have been generated by introducing gene mutations identified as germline mutations in familial cases, but these models alone have not fully explained the pathophysiology. In this study, mice in which the GJA4 mutation, which was newly identified as a somatic mutation in intraorbital cavernous vascular malformations in a previous study, was introduced specifically into vascular endothelial cells, were generated. Mice transgenic with LoxP-stop-LoxP-mutant Gja4 (floxed mice) were generated, and these were crossed with Tie2-Cre mice, a kind of vascular endothelial cell-specific Cre mice. It was found that mice expressing mutant Gja4 were embryonic lethal.

研究分野：脳血管疾患

キーワード：脳海綿状血管奇形

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管奇形は中枢神経系に生じる異常血管の集簇で、脳動静脈奇形 (arteriovenous malformation: AVM)、脳海綿状血管奇形 (cerebral cavernous malformation: CCM)などが代表疾患である。これらの疾患では、いずれも一部を占める家族性例の原因遺伝子異常の導入によりモデル動物が作製されてきた [1, 2]が、これらのモデルのみではヒト疾患の病態を十分に説明しきれていなかった。一方ゲノム解析技術の向上に伴い、患者の多くを占める孤発性例において病因となる体細胞遺伝子変異の同定がなされるようになった [3, 4]。孤発性例において体細胞変異として同定された遺伝子変異に基づく病態を解析することにより、血管奇形の発生機序をより詳細に解明することができる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者は先行研究において *GJA4* 遺伝子変異を血管奇形原因遺伝子変異として新規に同定した [5]。そこで本研究では、血管奇形における未知の病態の解明に繋がる、*GJA4* 遺伝子変異の導入による新たな血管奇形モデル動物を作製することを目的とした。これにより、未知の血管奇形発生機序を同定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *Gja4* c.121G>T ノックインマウスの作製

Gja4 c.121G>T の機能解析を目的とし、同変異ノックインマウスを作製した。マウスとして、遺伝子改変実験に一般的に用いられる B57BL/6 (以下 B6) マウスを使用した。LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* cDNA 配列のコンストラクトを作製した。B6 マウス受精卵に対し CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行うことで、LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* を ROSA26 へ導入した (文部科学省先端モデル動物作製支援プラットフォームの支援により作製)。これにより LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* をヘミ接合性に有するマウスを作製した。同マウスを、血管内皮細胞特異的に Cre を発現するマウスである *Tie2-Cre* マウスと交配することで、変異型 *Gja4* を血管内皮細胞特異的に発現するマウスを作製した。

(2) *Gja4* c.121G>T ノックインマウスの胎児の評価

Gja4 c.121G>T ノックインマウス胎児について、各胎齢のマウスの表現型を評価した。妊娠中のマウスの安楽死を行い、帝王切開により胎児を得た。胎児の肉眼所見を、ノックインマウスと非ノックインマウスの間で比較した。

4. 研究成果

(1) *Gja4* c.121G>T ノックインマウスの作製

まず LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* のヘミ接合体を得て、*Tie2-Cre* マウスと交配したところ、得られた産子は野生型もしくは LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* のヘミ接合体または *Tie2-Cre* のヘミ接合体のいずれかであり、LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* と *Tie2-Cre* の両方を有するマウス (*Gja4* 変異ノックインマウス) は認められなかった。このことから *Gja4* 変異ノックインマウスが胎生致死となっている可能性が考えられた。そこで妊娠中のマウスで帝王切開を行うことで胎児を得て観察した。この結果、E11.5 までの胎児では *Gja4* 変異ノックインマウスが認められたものの、E12.5 以降では *Gja4* 変異ノックインマウスで生存が確認された胎児は含まれなかった (表)。以上の結果から、*Gja4* c.121G>T のノックインマウスでは、E12.5 頃に死亡すると考えられた。

表. 胎齢毎に認められた *Gja4* c.121G>T ノックインマウスの各遺伝型の数

	WT	<i>Tie2-Cre</i>	LoxP-stop- LoxP- <i>Gja4</i> mut	KI
E9.5	2	3	2	2
E10.5	-	-	-	-
E11.5	16	15	19	8
E12.5	5	5	5	0
E13.5	7	3	7	0
E14.5	3	6	4	0

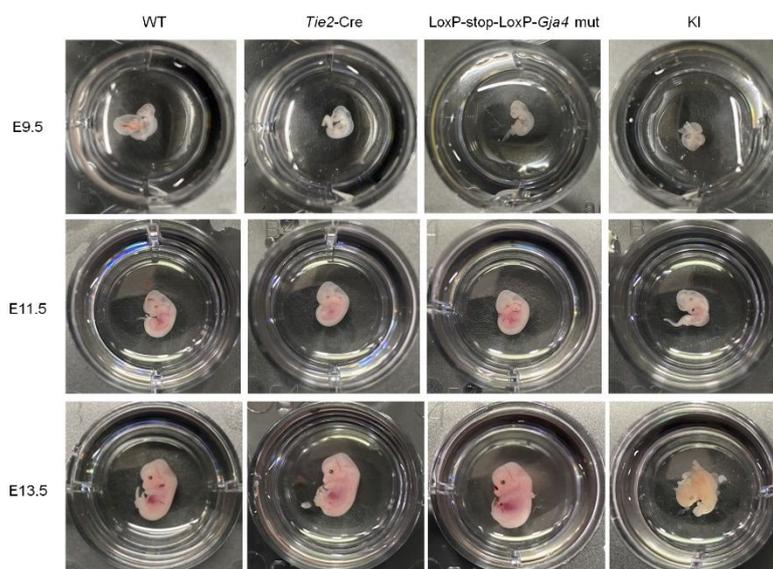
WT: 野生型、KI: ノックイン

(2) *Gja4* c.121G>T ノックインマウスの胎児の評価

まず、胎生早期のマウスとして E9.5 の胎児を観察した。この胎齢のマウスについては、*Gja4* 変異ノックインマウスは非ノックインマウスと比較し明らかな外観の差異は認められなかった (図)。いずれの遺伝型マウスについても顕微鏡観察下において帝王切開後間もなくは心拍動が観察されたことで生存していたことが確認できた。続いて、野生型、LoxP-stop-LoxP-変異型 *Gja4* のヘミ接合体または *Tie2*-Cre のヘミ接合体の数が十分な認められたにも関わらず *Gja4* 変異ノックインマウスで生存していた胎児が認められなかった E13.5 の胎児を評価した。この胎齢のマウスでは、*Gja4* 変異ノックインマウスでは死亡しており、体は既に軟化していた (図)。さらに、以上のタイミングの間で、生存したホモ接合体変異体が観察されていた E11.5 の胎児を評価した。この胎齢のマウスでは、*Gja4* 変異ノックインマウスで腹部及びその尾側有意の発育不全が認められた (図)。以上の結果から、*Gja4* c.121G>T は生体内で血管内皮細胞に発現した場合に有害であることが示された。から、*Gja4* c.121G>T は生体内で血管内皮細胞に発現した場合に有害であることが示された。

図．全身性 *Gja4* ノックインマウス胎児の外観

ホモ接合体変異体胎児は E11.5 頃に発達不全を示し死亡した。



WT: 野生型、KI: ノックイン

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, 齋藤 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
---------	---------