

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591502

研究課題名(和文) 血管内皮前駆細胞を用いたモヤモヤ病の病態解析ならびに遺伝的因子の解明

研究課題名(英文) The pathophysiological and genetic analysis of Moyamoya disease using the patients-derived endothelial colony forming cells.

研究代表者

石崎 義人 (Yoshito, Ishizaki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20572944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病患者および健常対照者の末梢血から血管内皮前駆細胞を分離した。もやもや病関連遺伝子として報告されたRNF213遺伝子の機能について、分子生物学的手法を用いて解析し、生体内で様々な刺激により惹起される炎症刺激と血管内皮細胞および平滑筋細胞の増殖という現象をつなぐ重要な遺伝子であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We separated the endothelial colony forming cells from 6 patients with Moyamoya disease and control subjects. Then we analyzed the functions of RNF213 gene, that was reported as the first susceptibility gene of Moyamoya disease. We found that RNF213 contributed to the pathogenesis of Moyamoya disease in the process of inflammatory responses and the proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児神経学

キーワード：もやもや病 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

もやもや病(ウイルス動脈輪閉塞症)は、日本人に多発する原因不明の進行性脳血管閉塞症であり、両側の内頸動脈終末部の狭窄ないしは閉塞とその周囲の異常血管網(もやもや血管)を認める。病態は不明な点が多いが、もやもや症候群として合併することが知られている疾患(神経線維腫症、ヌーナン症候群など)の原因遺伝子(NF1, PTPN11, SOS1, RAF1)とその特徴から、血管内皮細胞が増殖刺激に対して過剰に反応する結果、血管閉塞を生ずると考えられる。

末梢血中の血管内皮前駆細胞は、血管新生及び血管内皮の恒常性維持において重要な作用を果たしており、脳梗塞、心筋梗塞患者などでは血管内皮前駆細胞の機能が低下していることが報告されている。もやもや病に関しても、血管内皮前駆細胞に関する研究が散見される(JCBM. 2008, Stroke 2009)が、その機能に関して一定の見解が得られていない。近年同定された内皮性コロニー形成細胞(Endothelial colony-forming cells: ECFCs)は、高い増殖活性と自己複製能をもつ血管内皮前駆細胞であり(Blood 2005)、もやもや病の病態解析に適した細胞であると考えられる。

またもやもや病の原因遺伝子についても、連鎖解析から 17q25.3 が候補領域とされ(Neurology 2008)、Raptor 遺伝子のハプロタイプがもやもや病発症と関連することが報告された(Environ Health Prev Med. 2009)が、家族例での検討である。孤発例としては、分担研究者の吉良は、もやもや病の遺伝的因子として病態から候補遺伝子と考えられた TGF 遺伝子の関与が日本人集団では否定的であることを報告した(Ueno, J Neurosurg. 2000)。もやもや病の関連解析としては他にインスリン様増殖因子(IGF2R)(No To Hattatsu 2005)と、マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター(TIMP)(Neurosurgery 2006)が報告されているが、感受性遺伝子の同定には至っていない。

2. 研究の目的

1) ECFCs を用いた病態関連分子の網羅的解析

もやもや病患者から得られた ECFCs を用いて、各種刺激に対するメッセンジャーRNA(mRNA)発現の変化を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、健常対照と比較して疾患に特異性の高い遺伝子を同定する。

2) 関連解析による疾患感受性遺伝子の同定

1) で病態に特異的な遺伝子があれば候補遺

伝子として関連解析を行う。

3. 研究の方法

研究計画 1; 血管内皮前駆細胞の遺伝子発現の網羅的解析

1) 血管内皮前駆細胞の分離、培養(担当: 石崎、鳥巢、大久保)

九州大学病院に通院中のもやもや病患者で、文書による同意が得られたものから全血を採取し、末梢血単核球を LSM(ICN 社)を用いて分離する。ラット 1 型コラーゲンコート 6 ウェルディッシュプレート(BD Biosciences)を用いて 10%胎児ウシ血清と抗生剤を添加した EBM-2 メディウム(Cambrex)で培養する。14 から 21 日目には単層または敷石状に増殖した血管内皮前駆細胞のコロニーが形成される。

細胞表面の抗原(CD31, CD105, CD34)をフローサイトメーター(BECKMAN COULTER)を用いて検出し、血管内皮前駆細胞 ECFCs と同定する。以後の実験にはこの培養細胞を用いる。健常成人及び臍帯血を用いた培養系は確立しており、予備実験においてももやもや病患者由来 ECFCs を得ている。もやもや病患者 10 例、健常対照 10 例で解析予定である。

2) 増殖因子に対する増殖比較(担当: 石崎、大久保)

1) で得られた培養細胞 3×10^4 を用いて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)を培養液(EBM-2 または MEM)に添加する。16 時間後に細胞数をカウントし、もやもや病患者と健常対照間で比較する。

3) 分離細胞からの mRNA の抽出と増幅(担当: 石崎、大久保)

刺激下で培養を行ったそれぞれの細胞より RNA 抽出キット(Isogen)のプロトコールによる mRNA の抽出と RNA リニア増幅キット(AminoAllyl Message Amp aRNA Kit)を用いた RNA 増幅を行う。患者対照間だけではなく、刺激の前後、増殖因子間の比較も行う。

4) DNA マイクロアレイ解析(担当: 石崎、吉良、大久保)

蛍光ラベルした後、もやもや病患者および健常人由来の mRNA を AceGene Human Oligo 30K Microarray (Hitachisoft)にハイブリダイゼーションし、DNA マイクロアレイ解析装置 FLA-8000 (現有設備)を用いたスキャニングと解析ソフトウェア Array Vision (現有設

備)によるデータ処理を行う。さらにマイクロアレイ用統計解析ソフト(Gene Spring)を用いて有意な遺伝子の選定、クラスター解析などを行う。

4. 研究成果

1) 遺伝的解析

研究費採択後、RNF213 遺伝子の p.R4810K 変異がもやもや病の感受性遺伝子であることが報告された。現有サンプルである日本人もやもや病患者 79 人(孤発例 62 人、家族例 17 人)、類もやもや病 5 人および健常対照 127 人。末梢血単核球より分離した DNA を用いて、RNF213 遺伝子の intron 32 に存在し感受性変異の近傍にある SNP (rs7224239) について TaqMan SNP Genotyping Assay を用いて遺伝子型を決定した。統計解析はカイ二乗検定または Fisher 正確確率検定を用いた。マイナーアレルである A アレルを有する割合が、もやもや病患者(孤発例、家族例)および類もやもや病患者で有意に高かった(2.0×10^{-16} , 4.3×10^{-8} , 0.02)。また、rs7224239 の A アレルが p.R4810K 変異と関連していた。

サブ解析として、もやもや病を合併することが報告されている症例(NF1 合併 2 例、Hirschsprung 病合併 1 例、水痘後 1 例、血管炎症候群疑い 1 例)における解析では、3 例で疾患感受性アレルを有しており、この頻度は健常対照と比較して有意に高く、もやもや病の患者集団と有意差がなかった。従来もやもや病とは別の疾患と考えられ、「類もやもや」とカテゴライズされていた疾患においても、もやもや病と共通の遺伝的因子が存在していることが確認できた。このことはもやもや病発症には疾患感受性アレルに加えて、修飾因子として遺伝的因子または環境因子(感染症など)が必要であることを示唆している。

2) 病態解析

もやもや病患者 28 名から同意を得られ、末梢血単核球を分離培養したところ、6 名で ECFC の培養が確認され、表面抗原(CD31, CD105, CD34)についてフローサイトメーター(BECKMAN COULTER)を用いて検出した。樹立できた ECFC から抽出した mRNA を用いて DNA マイクロアレイをおこなった。マイクロアレイ用統計解析ソフト(Gene Spring)を用いた pathway 解析(Co-regulation 解析)では、RNF213 の新たな機能として viral infection や inflammatory response が推定される結果が得られた。

その後の培養血管内皮細胞および患者由来線維芽細胞を用いた実験で、RNF213 は炎症性サイトカイン刺激で発現が誘導されることを見出した。感染などの際に血液中に増加するサイトカインが血管内皮または血管平滑筋に作用することで RNF213 の発現がコントロールされることになり、疾患感受性アレルを有している際には過剰反応を来す可能性が考えられる。RNF213 遺伝子シグナルの下流におけるイベントであり、もやもや病の病態の基礎となる、Matrigel assay を用いた血管新生に関する影響および細胞増実験についても有意な結果が得られている。

これらの結果から、感染後に発症する報告もあるもやもや病の病態において、RNF213 は炎症を契機に産生されるサイトカインと血管生理学的応答とを橋渡しし、血管狭窄機序および「もやもや血管」の新生という病態機序の中心的な役割を果たしていることが示唆された。疾患感受性アレルの血管生理学的な反応への影響については現在解析中であり、遺伝子解析の結果と合わせて、英文誌(査読あり)への投稿準備中である。

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 1 件)

石崎義人, 鳥巢浩幸, 酒井康成, 實藤雅文, 山口結, 原寿郎, もやもや病感受性遺伝子 RNF213 の検討, 日本小児神経学会雑誌, 査読なし, 44 巻 Suppl. PageS279

〔学会発表〕(計 1 件)

石崎義人, 鳥巢浩幸, 酒井康成, 實藤雅文, 山口結, 原寿郎, もやもや病感受性遺伝子 RNF213 の検討, 日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学医学部小児科 HP

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/pediatr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎義人 (ISHIZAKI YOSHITO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20572944

(2)研究分担者

鳥巢浩幸 (TORISU HIROYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：10398076