

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659486

研究課題名(和文)モヤモヤ病感受性遺伝子変異保因者の簡易検出法開発と脳血管病変検索

研究課題名(英文)Cerebral vascular abnormality in carriers of the RNF213 risk variant detected by a new genetic test

研究代表者

呉 繁夫(KURE, Shigeo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10205221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：モヤモヤ病は、内頸動脈が両側性に閉塞・狭窄し、更に多くの毛細血管が新生する疾患である。私どもは、全ゲノム相関解析により疾患感受性遺伝子RNF213を第17番染色体に同定し、孤発症例の73%に共通な遺伝子変異(c.14576G>A)を見だし、この遺伝子変異より、発症リスクが190倍に高まることを明らかにした。遺伝子検査によりMMD発症リスクを評価する目的で、c.1457G>A変異の簡便な検出法を確立を行い、その信頼性を検討した。更に、確立した遺伝子検査で変異の保因者を同定し、そのMRアンギオグラフィーを検討した結果、一部の保因者に特徴的な変化を見出した。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease (MMD) manifests progressive bilateral internal carotid artery stenosis and abnormal collateral vessels. A genome-wide association study was performed, which showed a strong association of chromosome 17q25-ter with MMD risk. A single haplotype consisting of seven SNPs at the RNF213 locus was tightly associated with MMD risk. Mutational analysis of RNF213 revealed a founder mutation, c.14576G>A, in 73% of non-familial MMD cases and 1.4% of controls; carriers of this mutation have increased risk of MMD ($P=1.2 \times 10^{-43}$, odds ratio=190.8). We developed a genetic testing method for this founder mutation. The new method enables us to detect the target mutation with immunochromatography without expertise, which would be useful for evaluation of a risk for MMD risk in bedside and clinic.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：小児神経学 保因者診断

1. 研究開始当初の背景

モヤモヤ病 (MMD) は両側内頸動脈終末部の閉塞と異常側副血管網形成による脳虚血・出血を特徴とする疾患で、約半数は小児例である。MMD は日本で疾患概念が確立し、日本に多発するため、我が国の小児疾患として重要である。病因は不明であるが、約 15% は家系例であることから、遺伝的要因の関与が示唆されていた。最近、私達は世界に先駆けて MMD 疾患感受性遺伝子と創始者変異を同定した。まず、MMD 日本人患者 72 名を対象に、SNP100 万個による全ゲノム相関解析を行い、染色体 17q25-ter 付近に強い相関を見出した。

17q25-ter 領域の SNP 384 個を用いて更に解析した結果、7 個の SNP から成る一つのハプロタイプとの強い相関 ($P=5.3 \times 10^{-10}$) を RNF213 遺伝子内に見出した。RNF213 変異解析から、同一のミスセンス変異 c.14576G>A を家系例の 95%、孤発例の 73% に見出し、創始者変異と考えられた (対照での頻度 1.4%)。この創始者変異により MMD 発症リスクは、約 190 倍 (95%CI=71-507) に高まる。

2. 研究の目的

全ゲノム関連解析で見いだした感受性遺伝子 RNF213 遺伝子内に存在する日本人高頻度遺伝子変異 c.14576G>A の有無を迅速・簡便に検出する遺伝子検査法の開発を行い、MMD 発症リスクの正確な評価を可能にすることを目的とする。また、開発した変異保因者の MR アンギオグラフィーを実施し、正常対照との違いを検討する。

3. 研究の方法

変異の検出には、申請者らが以前開発した CASSOH 法 (特願 2002-323419 「遺伝子変異検出法」) を利用する。CASSOH 法は、オリゴヌクレオチド・プローブの競合的な結合を利して、点変異の有無を検出する変異検出法である。

具体的には、PCR 法による点変異部位を含む遺伝子断片の増幅に続き、オリゴヌクレオチド・プローブのハイブリダイゼーションを実施する。プローブ DNA と標的部位が完全にハイブリダイズする場合は強固な結合が得られ、一方、変異が存在する場合は結合が弱まることを利用している。特別な装置を用いずにプローブ DNA との結合力を検出するために、本研究ではイムノクロマトグラフィー法を用いている (図 1)。

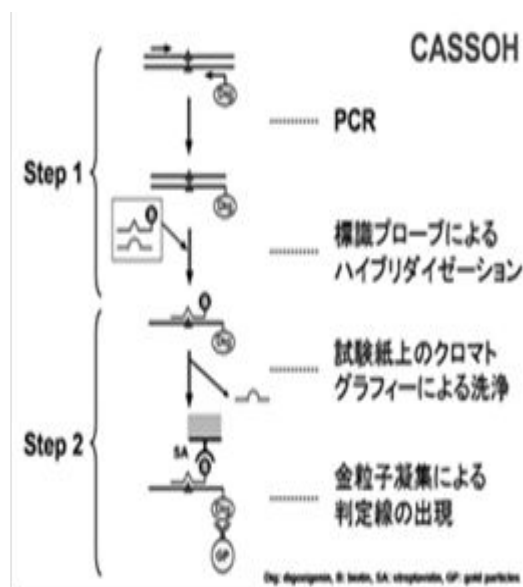


図 1 CASSOH 法の原理

実際には、変異を含む DNA 領域を PCR 反応にて増幅後、増幅産物へのビオチン標識されたオリゴヌクレオチドの結合を金粒子の標識されたアビジンにて検出する (図 2)。

患者の家族にインフォームド・コンセントを书面で取得した上で、その RNF213 遺伝子型を今回開発した方法で決定した。また、MR アンギオグラフィーを実施して、正常対照と比べ、特徴的な変化の有無を検討する。

4. 研究成果

日本人 MMD 患者の 70% 以上で共通な疾患感受性遺伝子変異 c.14576G>A を迅速・簡便に検出する遺伝子検査法を確立した。プローブ DNA が標的配列に結合しているかどうかは、遺伝子産物を固相化後、金コロイド粒子を標識とするイムノクロマトグラフィーを利用して検出した (図 2, 3 に結果の例を示す)。

検出プローブと競合配列を持つオリゴヌクレオチドとの混合比率を適切に調整することにより、特異的な遺伝子型の判定が可能になった。今回確立した遺伝子変異検出法においては、PCR 以外の検査機器を必要としない。MMD 患者の約半数は小児である。家族に MMD 患者が存在する場合、子どもの MMD 発症のリスクは高くなるため、MMD 発症の不安が大きい。今回の確立した方法は、病院の検査室のみならず、クリニックにおいて遺伝子診断の実施が可能となる。遺伝子検査により確定した保因者の MRA アンギオグラフィー検

査を実施し、特徴的な画像所見を示すことを見出した。遺伝子検査とMRAアンギオグラフィー検査とを組み合わせることで、より確度の高い発症予測が可能になることが期待される。

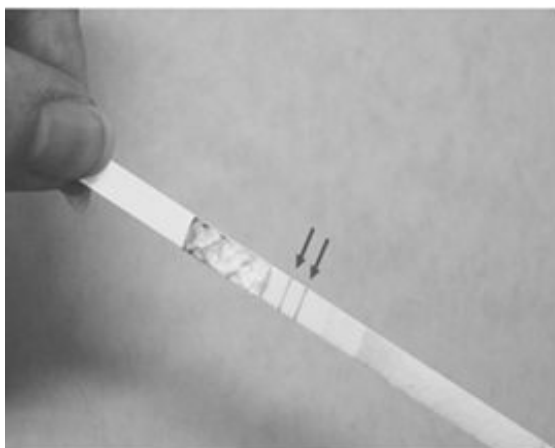


図2 イムノクロマトグラフィー後の沈降線の検出

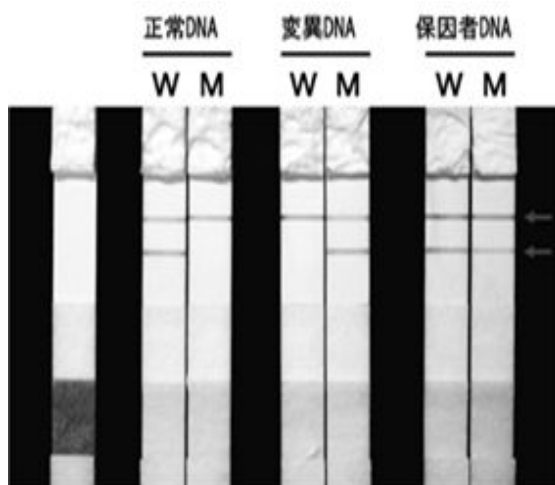


図3 CASSOH法による遺伝子検査の結果判定

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10件)

1. Fujimura M, Kimura N, Ezura M, Niizuma K, Uenohara H, Tominaga T. Development of a de novo arteriovenous malformation after bilateral revascularization surgery in a child with moyamoya disease. *J Neurosurg Pediatr*. 2014(印刷中) (査読有)

2. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Nishijima Y, Ito A, Shimizu H, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res*. 2014 Mar 13;1552:64-71. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.011. Epub 2014 Jan 17. (査読有)

3. Miyamoto S, Yoshimoto T, Hashimoto N, Okada Y, Tsuji I, Tominaga T, Nakagawara J, Takahashi JC; JAM Trial Investigators. Effects of extracranial-intracranial bypass for patients with hemorrhagic moyamoya disease: results of the Japan adult moyamoya trial. *Stroke*. 2014 May;45(5):1415-21 (査読有)

4. Yokosawa M, Hayashi T, Shirane R, Tominaga T. Efficacy of Superficial Temporal Artery-Middle Cerebral Artery Double Anastomoses in a Patient with Rapidly Progressive Moyamoya Disease: Case Report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014 Feb 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24584280. (査読有)

5. Fujimura M, Niizuma K, Inoue T, Sato K, Endo H, Shimizu H, Tominaga T. Minocycline prevents focal neurological deterioration due to cerebral hyperperfusion after extracranial-intracranial bypass for moyamoya disease. *Neurosurgery*. 2014 Feb;74(2):163-70; discussion 170. doi: 10.1227/NEU.0000000000000238. PubMed PMID: 24176958. (査読有)

6. Fujimura M, Akagi K, Uenohara H, Tominaga T. Moyamoya disease in pregnancy: a single institute experience. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(8):561-4. PubMed PMID: 23979053. (査読有)

7. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saito H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawachi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease.

Neurology. 2012 Mar 13;78(11):803-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f. Epub 2012 Feb 29. (査読有)

8. Shimoda Y, Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T. Temporal profile of de novo development of moyamoya vasculopathy in an adult: case report. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(5):339-42. PubMed PMID: 22688072. (査読有)
9. Fujimura M, Tominaga T. Lessons learned from moyamoya disease: outcome of direct/indirect revascularization surgery for 150 affected hemispheres. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(5):327-32. PubMed PMID: 22688070. (査読有)
10. Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Saito A, Mugikura S, Tominaga T. Efficacy of prophylactic blood pressure lowering according to a standardized postoperative management protocol to prevent symptomatic cerebral hyperperfusion after direct revascularization surgery for moyamoya disease. Cerebrovasc Dis. 2012;33(5):436-45. doi: 10.1159/000336765. Epub 2012 Mar 28. PubMed PMID: (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease (招待講演) Kure S in 3rd International Moyamoya disease Meeting. Sapporo, Japan, July 12-13, 2013
2. Diagnosis of Moyamoya Disease; Revisit of Suzuki's Angiographic Grading (招待講演) Tominaga T in 3rd International Moyamoya disease Meeting. Sapporo, Japan, July 12-13, 2013
3. Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease (招待講演) Kure S Genetics and Genomics of Vascular Disease Workshop II in NAVBO Workshops in Vascular Biology 2012, in Pacific Grove, CA, Monterey, USA, October 14-18, 2012
4. Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease in Japanese patients with Moyamoya disease and its clinical significance. Kure S, Kamada F, Aoki Y, Abe Y, Kikuchi A, Komatsuzaki S, Kanno J, Matsubara Y, Touho H, Miyatake S,

Matsumoto N. 54th Annual meeting of Society of Child Neurology, Sapporo, Japan, May 17-19, 2012

5. モヤモヤ病の疾患感受性遺伝子の同定、呉 繁夫、第53回日本神経学会総会、横浜、2011年5月26-28日
6. モヤモヤ病遺伝的要因の解明 - 疾患感受性遺伝子と創始者変異の同定、呉 繁夫、鎌田文顕、青木洋子、阿部裕、新堀哲也、小松崎匠子、菊池敦生、菅野潤子、土屋滋、松原洋一、第114回日本小児科学会学術集会、東京、2011年4月15-17日

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10205221

(2) 研究分担者

富永 悌二 (TOMINAGA TEIJI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00217548