

二（国立循環器病研究センター）、菊田健一郎（福井大学）、黒田 敏（富山大学）である。画像判定委員会での判定は、省力化を目的にオンラインでの作業法を導入した。

平成 24 年 1 月以降、参加施設で新たに確定診断がなされた無症候性もやもや病を、インフォームド・コンセントを得た上で悉皆的に登録する。4 年間にわたって 200 例の症例を目標に登録を行ない、5 年間の経過観察を行なう予定である。各症例の臨床データ、神経放射線学的データ(DSA, MRI/MRA, PET/SPECT)を電子データとして中央委員会に集積する。12 ヶ月ごとに参加施設において脳血管イベントの有無、MRI/MRA による画像評価を繰り返す。

本研究における主要評価項目は「全ての脳梗塞および頭蓋内出血の 5 年間の発生割合」である。

副次的評価項目としては、

- 1) 以下の項目の 5 年間の発生割合
 - ① TIA
 - ② 無症候性脳梗塞の出現
 - ③ 病期の進行
 - ④ 無症候性出血病変の出現
 - ⑤ 全死亡
- 2) 追跡期間中の、全ての脳梗塞および頭蓋内出血および上記①～⑤のさらなる発生割合

参加施設は、北海道大学、中村記念病院、岩手医科大学、東北大学、東京女子医科大学、慶応義塾大学、東京歯科大学市川総合大学、東京医科歯科大学、千葉県循環器病センター、北里大学、名古屋市立大学、福井大学、京都大学、国立循環器病研究センター、大阪大学、長崎大学、東京大学、岡山大学、富山大学の計 20 施設であったが、今年度、九州大学脳神経外科（飯原弘二教授）を新たな参加施設として迎えた。また、当該症例の登録終了を平成 26 年 12 月 31 日から平成 27 年 12 月 31 日まで一年間延長

することが了承された。

C. 研究結果

平成 24 年 1 月 1 日～平成 27 年 3 月 24 日の約 3 年間に、全国の参加施設から計 81 例の登録がなされた。これまでに 2 例が一過性脳虚血発作を経験しているほか、1 例が頭蓋内出血をきたして死亡している。

本研究の進捗状況を参加施設に周知するとともに症例登録を促進する目的で、今年度は日本脳神経外科学会の機関誌「Neurol Med Chir (Tokyo)」に本研究の背景、目的、方法、研究デザインなどを報告した[4]。また、昨年度に引き続いて、定期的に『AMORE NEWS』を発行して参加施設に配信した。これまでに平成 24 年 8 月・10 月、平成 25 年 2 月・7 月・11 月、平成 26 年 3 月・10 月の計 7 回にわたって発行した。また、本研究の周知を目的に、富山大学脳神経外科のホームページ、および、Facebook ページにも本研究の概要を掲載した。

D. 考察

本研究によって無症候性もやもや病の自然経過が明らかになることが期待される。

また、今後は「無症候性」もやもや病の用語についても検討が必要である。もし、本当に「無症候性」もやもや病に年間 3%以上もの脳卒中発症リスクが存在するとすれば、それは年間 1%未満の破裂リスクを有するとされる「未破裂」脳動脈瘤よりも明らかに発症リスクが高い疾患である。患者さんへの説明に用いる際は、「無症候性」もやもや病というよりも「未発症型」もやもや病と呼称すべきなのかもしれない。今後、広く議論すべき問題であろう。

E. 結論

無症候性もやもや病を対象とした多施設共同研究(AMORE)について本年度の活動を中心

に報告した。

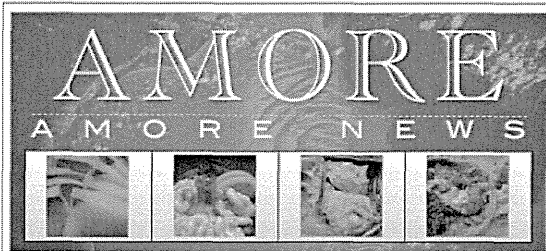
F. 文献

1. Kuroda S, Hashimoto N, Yoshimoto T, Iwasaki Y: Radiological findings, clinical course and outcome in asymptomatic moyamoya disease: Results of multi-center survey in Japan. Stroke 38:1430-1435, 2007
2. 川合かがり、黒田 敏、川堀真人、中山若樹、寺坂俊介、岩崎喜信：病期が進行した無症候性成人もやもや病に対する脳血行再建術—2例報告。脳外 38:825-830, 2010
3. AMORE Study Group：無症候性もやもや病の予後と治療法の確立をめざした多施設共同研究-AMORE研究について。脳卒中の外科41:235-239, 2013
4. Kuroda S, AMORE Study Group: Asymptomatic moyamoya disease – literature review and ongoing AMORE study. Neurol Med Chir (Tokyo) 55:194-198, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2013年2月25日



AMORE NEWS VOL.3をお届けします！

AMORE研究の症例登録が13例となりました！今後とも先生方のご協力をよろしくお願いたします！

AMORE研究では先生方に大変お世話になっております。あらためて感謝申し上げます。昨年1月にAMORE研究が本格的に開始となってから1年が過ぎました。昨年5月に第一期が正式に登録されたのも、先生方のおかげでほぼ毎月のペースで症例が登録されております。昨年10月に「AMORE NEWS Vol.2」を発刊したのも、東京大学神経内科（伊藤義典先生、岡崎昌一先生、鈴木明彦先生）、東京大学脳神経外科（菅田 賢先生、今井英明先生、藤藤英人先生）から1例ずつ、中村記念病院（本庄肇先生、大田俊明先生）から2例が正式登録されました（n=11）。今月に入ってから、北里大学脳神経外科（佐藤公俊先生）、京都大学脳神経外科（吉田和雄先生、宮本 卓先生）から1例ずつ症例登録がなされました（n=13）。日替のお忙しい診療・研究の中、ご協力いただき本当にありがとうございます！

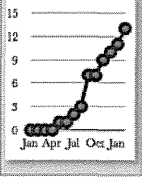
先生方からお送りいただいた症例時のデータは、症例判定委員会（小笠原邦彦先生、飯沼弘二先生、栗田第一郎先生、栗田 毅）にお送りして、File Makerを使用したオンライン科定作業を開始しております。われわれ事務局も、ようやく徐々に慣れてきたのが現状であります。

先生方におかれましては、日々の診療や研究でご多忙とは存じますが、該当する患者さんがいらっしゃった際には、本研究へのご登録を切にお願います。次第です。また、対応表、ご登録し上げていますように、先生方の関連病院にもこのAMORE研究についてご周知いただき、症例登録の促進をお願いできれば幸いです。

来たる3月21日[木] 13:30~14:00、サ・プリンスさくらタワー東京2階「N1-N5」にて、AMORE研究の連絡会議を開催させていただきますので、万障お繰り合わせの上、ご出席のほど、よろしくお願いたします。

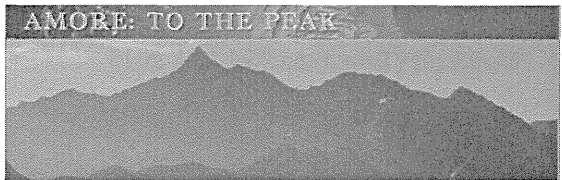


富山県は「愛宕の生け簀」です。例に倣いになると書ブリ、ソドグロ、紅ズワイガニなど、山の果った魚介類が至る所の海を漂わせてくれます（上図）。自分にも題が乗ってしまいます。—栗田 毅



AMORE NEWS • AMORE STUDY GROUP 2012-2018

2013年2月25日

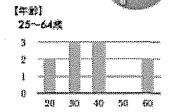


AMORE Case Study

本年1月までに登録していた10例の臨床データを簡単にまとめてみました。ご参考になれば幸いです。

【性別】
男性2例、女性6例

【年齢】
25~64歳



- 【確定診断のきっかけ】
- 家族内発症のスクリーニング 1
 - 顔面外傷 1
 - 必死いぼ 2
 - 頭痛 5
 - 脳ドッグ 1
 - その他 2

【わやもや病の家族歴】
あり 2
なし 8
【日常生活自立度】
mRS 0 10



Recent Article To Be Read...

- Kim JM et al. High-resolution MR techniques can distinguish moyamoya disease from atherosclerotic occlusion. *Neurology* 80: 775-776, 2013.
- Goell R et al. Arterial spin labeling MRI for assessment of cerebral perfusion in children with moyamoya disease: Comparison with dynamic susceptibility contrast MRI. *Neuroradiology* 2013 Feb 13.
- Kono M et al. Moyamoya syndrome associated with neurofibromatosis type 1: perioperative and long-term outcomes after surgical revascularization. *J Neurosurg Pediatr* 2013 Feb 1.
- Hwang W et al. Predictive factors of symptomatic cerebral hyperperfusion after superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in adult patients with moyamoya disease. *Br J Anaesth* 2012 Dec 20.

- AMORE研究参加施設（登録症例数）
- 北里大学脳神経外科 (n=1)
 - 平村記念病院脳神経外科 (n=2)
 - 金澤医科大学脳神経外科
 - 東京女子医科大学脳神経外科
 - 東京医科歯科大学脳神経外科
 - 慶応義塾大学脳神経内科 (n=1)
 - 東京大学脳神経外科 (n=1)
 - 千葉医科歯科大学脳神経外科
 - 北里大学脳神経外科 (n=1)
 - 名古屋国立大学脳神経外科
 - 富山大学脳神経外科
 - 横浜国立大学脳神経外科 (n=2)
 - 京都大学脳神経外科 (n=1)
 - 天祐大学神経内科
 - 国立循環器病研究センター脳神経外科 (n=2)
 - 岡山大学脳神経外科
 - 長崎大学脳神経外科 (n=1)

19施設、本誌数 11例、登録数 2例 (2013.02.25 現在)

AMORE NEWS • AMORE STUDY GROUP 2012-2018

60 歳以上の高齢発症もやもや病に関する多施設共同調査： MODEST (multicenter survey of moyamoya disease over the age of sixty)

東北大学 大学院 神経外科学分野
富永悌二 藤村幹

研究要旨

もやもや病患者に対する血行再建術は有効であり、年齢を問わず本患者群への血行再建は推奨されている。一方、高齢者に対しても若年者と同等に血行再建術が有効であるかは不明である。これまで多施設における 60 歳以上もやもや病患者に対する血行再建術の治療成績を後方視的に検証し、60 歳未満の患者と周術期合併症を含めた治療成績について比較した。今回は単一施設の最新の結果を報告するとともにさらに前向視的な研究のデザインについて報告する。

A. 研究目的

もやもや病は内頸動脈終末部とその周囲の血管が進行性に狭窄し、周囲に異常血管網を認める原因不明の疾患である。発症年齢は小児と若年成人の二峰性を呈することが古くから知られてきたが、近年における画像診断の進歩により 60 歳以上で初めてもやもや病と診断される患者も稀ならず認められる。脳虚血症状を有するもやもや病患者に対する血行再建術の有効性は確立しており、患者年齢に関係なく本患者群への血行再建はガイドラインにおいて推奨されているが、高齢もやもや病患者に対しても若年成人同様にバイパス手術が有効な否かは不明である。また、高齢もやもや病患者の自然歴、予後が不明な点も手術適応決定を困難にしているのが現状である。手術時の患者年齢が高いほどバイパス術後の症候性過灌流のリスクが高いことが報告されているため、小児例や若年成人例同様の血再建術の benefit が期待できない可能性も推測される。本報告では単一施設

における最新の検討結果を報告し、これまでの検討結果を踏まえて、多施設における 60 歳以上の高齢もやもや病患者について、前方視的に検討すべく登録研究デザインを構築した。

B. 研究方法

対象は 2004 年 3 月以降に、東北大学病院、広南病院、ならびに仙台医療センターにて 252 半球側に対して直接血行再建術を施行したもやもや病連続症例（2~73 歳）の内、手術時の患者年齢が 60 歳以上であった 13 例（14 側手術）である。発症形式は 5 例で脳梗塞、8 例で一過性脳虚血発作(TIA)であり、TIA 発症の 3 例では頭蓋内出血を伴っていた。全例で術前の日常生活は自立しており（Modified Rankin Scale; mRS=0-2、平均 1.3）、術前 SPECT により症候側の脳循環不全が証明された。全例に対して STA-MCA 吻合術と間接血行再建術（EDMS）の複合手術を施行した。周術期の脳梗塞、過灌流症候群を含めた合併症の有無と、

術後3ヶ月の日常生活自立度(mRS)を検討した。

C. 研究結果

手術時の患者年齢は平均64.5歳(61~73歳)であった。術直後に新たな神経脱落症状を呈したものはなく、術後に日常生活自立度(ADL)が低下した症例も認めなかった。術直後のMRIで新たな脳梗塞を生じた症例はなく、MRAにて全症例においてSTA-MCA bypassの開存が確認された。周術期合併症については3例3側手術(23.1%)において過灌流症候群を認めた。また2例2側において術後急性期遅発性の頭蓋内出血を認めたが2例とも過灌流症候群を呈した症例であった。周術期の脳梗塞は1例1側(7.7%)で認めたが、過灌流症候群に対する降圧療法の経過中に遠隔部に脳梗塞を呈したものであった。過灌流症候群や脳梗塞を呈した3例を含めて術後慢性期のADLが低下した症例はなく、13例における術後慢性期(約3ヶ月)のmRSは平均0.46(0=2)であり、13例中11例(84.6%)で術前と比較してmRSは改善していた。

D. 前向視的な多施設登録研究デザイン

これまでの後方視的検討結果を踏まえて、60歳以上の高齢もやもや病の疫学・病態・予後を明らかとすることを目的に、多施設共同前向き観察研究(multi-center prospective observation study)を予定している。昨年度に報告した後方視的他施設調査結果を踏まえて、目標登録症例数は50症例、3年間の登録期間と5年間の観察期間を予定した。

本研究の対象は、60歳以上で新たに神経放射線学的に両側あるいは片側ウィリス動脈輪閉塞症(もやもや病)とはじめて確定診断された患者である。類もやもや病である患者、体内の金属などによりMRIの実施が困難である患者は除外される。観察期間中は年一度のMRI/MRAによる十分な注意深い観察を行な

うが、観察期間中の頭蓋外内バイパス術の施行ならびに抗血小板剤の使用は研究責任医師あるいは研究分担医師の方針に委ねる。評価項目は以下の通りである。

主要評価項目

全ての脳梗塞および頭蓋内出血の5年間の発生割合

副次的評価項目

1) 以下の項目の5年間の発生割合

- ① TIA
- ② 無症候性脳梗塞
- ③ 病期進行
- ④ 無症候性出血病変の出現
- ⑤ 全死亡

2) 以下の周術期合併症の発生割合

- ① 手術側の新規脳梗塞
- ② 過灌流症候群(過灌流による局所神経症状、症候性頭蓋内出血)
- ③ 周術期合併症によるADL低下

E. 考察

もやもや病に対する血行再建術の有効性は確立されており、長期的な脳卒中予防効果が期待できる。一方、高齢もやもや病患者に対しても若年成人例と同等に血行再建術が有効であるかは不明な点も多い。本研究では、最終的予後については高齢群においても術後、ADLの低下を来した症例はなく、術後慢性期の日常生活自立度も平均mRS=0.46と良好であった。一方、60歳以上の高齢もやもや病患者においては周術期過灌流による症候性出血の頻度が23.1%と比較的高頻度であり、周術期合併症には十分な留意が必要と考えられた。

昨年度報告した多施設における20例23半球側手術の後方視的な検討結果からも、高齢もやもや病患者に対する血行再建術の治療成績は概ね良好であったが、本患者群では術後過灌流、頭蓋内出血のリスクが高い可能性も示唆されたため、血行再建術に当たっては慎重な手術

適応の決定・厳格な周術期管理が必要と考えられた。今後の多施設前向き登録研究により、高齢もやもや病患者の周術期病態、血行再建術の治療効果をより明らかにできることが期待される。

F. 結論

60歳以上の高齢もやもや病患者に対する血行再建術の治療成績はおおむね良好であり、術後慢性期にADLの低下をきたした症例はなかった。一方、高齢患者においては血行再建術後の過灌流症候群、頭蓋内出血の頻度は若年者と比較して高い可能性もあり、より慎重な手術適応の決定・厳格な周術期管理が必要なものと考えられた。今後の前向き登録研究により高齢もやもや病患者の疫学・病態・予後が明らかとなるものと考えられる。

G. 文献

2014年度発表論文

- (1) Ogawa Y, Fujimura M, Tominaga T. Moyamoya syndrome associated with basal meningioma successfully treated by the modified transsphenoidal approach: Case report. *J Neurol Surg Rep* 75: e77-80, 2014
- (2) Fujimura M, Kimura N, Ezura M, Niizuma K, Uenohara H, Tominaga T. Development of de novo arteriovenous malformation after bilateral revascularization surgery in a child with moyamoya disease -Case report-. *J Neurosurg Pediatr* 13: 647-649, 2014
- (3) Fujimura M, Sonobe S, Nishijima Y, Niizuma K, Sakata H, Kure S, Tominaga T. Genetics and Biomarkers of Moyamoya Disease: Significance of RNF213 as a susceptibility gene. *J Stroke* 16: 65-72, 2014
- (4) Akamatsu Y, Fujimura M, Uenohara H, Shimizu H, Tominaga T. Development of Moyamoya Disease in Pregnancy and Puerperium -Case Report-. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 54: 824-826, 2014
- (5) Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Furudate S, Nishijima Y, Kure S, Tominaga T. Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213; moyamoya disease susceptibility gene. *Neuroreport* 25: 1442-1446, 2014
- (6) Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Sato K, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T. Quantitative analysis of early postoperative cerebral blood flow contributes to the prediction and diagnosis of cerebral hyperperfusion syndrome after revascularization surgery for moyamoya disease. *Neurol Res* 37: 131-138, 2015
- (7) Ito A, Fujimura M, Niizuma K, Kanoke A, Sakata H, Morita-Fujimura Y, Kikuchi A, Kure S, Tominaga T. Enhanced post-ischemic angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 1594: 310-320, 2015
- (8) Fujimura M, Tominaga T. Diagnosis of Moyamoya Disease: International Standard and Regional Differences. *Neurol Med Chir (Tokyo)* (in press)
- (9) Sakata H, Fujimura M, Mugikura S, Sato K, Tominaga T. Local vasogenic edema without cerebral hyperperfusion after direct revascularization surgery for moyamoya disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis* (in press)
- (10) 藤村幹. もやもや病に対する血行再建術の合併症とその発生メカニズム. *脳神経外科速報* 24: 538-545, 2014
- (11) 坂田洋之、藤村幹、佐藤健一、清水宏明、富永悌二. 周術期管理に苦慮した動脈硬化を合併した成人類もやもや病の1例. *脳神経外科* 42: 737-743, 2014
- (12) 藤村幹、富永悌二. もやもや病：診断と治療. *日本臨床* 72: 548-552, 2014
- (13) 藤村幹、新妻邦泰、遠藤英徳、佐藤健一、

井上敬、富永悌二. もやもや病に対する血行再建術後・過灌流に対するミノサイクリンを用いた周術期管理の現状と問題点. 脳卒中の外科 (出版中)

- (14)赤松洋祐 藤村幹 坂田洋之 遠藤英徳 板橋亮 富永悌二. 1 型糖尿病に合併した成人・類もやもや病の 1 手術例. 脳神経外科 43:227-233, 2015

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

家族性モヤモヤ病の遺伝解析

京都大学大学院医学研究科・環境衛生学分野
小泉 昭夫

研究要旨

近年、我々はもやもや病の感受性多型として *RNF213* 遺伝子の p.R4810K を同定した。本年度は、1) *RNF213* は INF- β による angiogenesis 抑制の重要な mediator であること、2) *RNF213* R4810K による angiogenesis 抑制 に ATPase 機能、特に多量体形成が重要な役割を果たすこと、3) 組織特異的 *RNF213* トランスジェニックマウスを作成し、*RNF213* 変異体の血管内皮での発現が低酸素による angiogenesis を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

近年、もやもや病の感受性多型として *RNF213* 遺伝子の p.R4810K が同定された。*RNF213* R4810K の過剰発現は血管内皮細胞の angiogenesis を低下させることが示されており、*RNF213* R4810K の血管内皮発現がもやもや病の病態に果たす役割の解明はきわめて重要である。

そこで本年度は、1) *RNF213* が既存の angiogenic pathway の mediator であるか検討する目的で、既知の angiogenic factor および anti-angiogenic factor が *RNF213* 遺伝子発現に与える影響の評価、2) *RNF213* の多量体形成と機能の関係を明らかにする目的で、多量体形成に重要な役割を果たす AAA+ドメイン（ATPase 機能を担う）への機能喪失変異導入による angiogenesis への影響の評価、3) *RNF213* R4810K による angiogenesis 低下を *in vivo* で検討する目的で、血管内皮および平滑筋特異的 *RNF213* R4810K 相当変異体トランスジェニック (Tg) マウスの作成と低酸素曝露による脳血管 angiogenesis の評価を行った。

B. 研究方法

1) angiogenic factor および anti-angiogenic

factor が *RNF213* 遺伝子発現に与える影響の評価

ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVECs) を用い、TGF- β 、IL-1 β 、VEGF および PDGF-BB の 4 つの angiogenic factor と IFN- α 、IFN- β および IFN- γ の 3 つの anti-angiogenic factor による *RNF213* 遺伝子発現への影響を評価した。また、HUVECs および iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞 (iPSEC、家族性 MMD 患者および健常者由来) を用いて angiogenesis を Tube formation assay および Migration assay で検討した。

2) *RNF213* AAA+ドメイン変異体による angiogenesis への影響の評価

RNF213 WT、*RNF213* R4810K、*RNF213* WEQ (AAA+ドメインの Walker B モチーフの変異、ATPase の加水分解を阻害し *RNF213* が単量体になるのを妨げる)、*RNF213* Δ AAA (AAA+ドメインを欠失) を HUVECs に強制発現し、Tube formation assay および Migration assay を行った。また、HEK293 細胞に同様に強制発現を行った後、*RNF213* を免疫沈降し、ATPase 活性の評価を行った。

3) 血管内皮および平滑筋特異的 *RNF213* R4757K Tg マウスにおける低酸素曝露による

脳血管 angiogenesis の評価

野生型あるいは p.R4757K (ヒト p.R4810K に相当) を有するマウス Rnf213 と CAG プロモーター配列の間に loxP で挟まれた停止配列が存在するベクターを用いて Tg マウスを作成した後、組織特異的 Cre 発現マウスと交配を行い、血管内皮あるいは平滑筋特異的 RNF213 Tg マウスを作成した。RNF213 R4757K または RNF213 WT を血管内皮特異的に発現する Tg マウス (①EC-Mut-Tg および②EC-WT-Tg)、RNF213 R4757K を血管平滑筋特異的に発現する Tg マウス (③SMC-Mut-Tg)、RNF213 KO マウス (④KO) および野生型マウス (⑤WT) の 5 群のマウスを 3 週齢より 2 週間 8%酸素下で飼育した後、小動物用 MRI による脳血管画像解析を行った。さらに Glut1 免疫組織化学により大脳皮質の脳毛細血管数を計測し、angiogenesis を評価した。

C. 研究結果

1) INF-β による血管内皮細胞における RNF213 遺伝子発現誘導

検討した 7 因子のうち INF-β (図 1 左) および γ が HUVECs で RNF213 の発現を誘導した。より強い発現誘導を示した INF-β でさらに検討を行ったところ、INF-β は RNF213 遺伝子プロモーター上の STAT1 結合部位を介して RNF213 発現誘導を行うことが明らかとなった。さらに、Tube formation (図 1 右) および Migration assay により、INF-β による anti-angiogenic effect は siRNA による RNF213 抑制によってレスキューされることが示された。また、INF-β は MMD 患者および健常者由来の iPSECs においても RNF213 発現を増加し、angiogenesis を減少させた。上記の結果から、RNF213 は INF-β による angiogenesis 抑制の重要な mediator であることが証明され、感染症および自己免疫疾患がもやもや病発症に関与する可能性が示唆された。

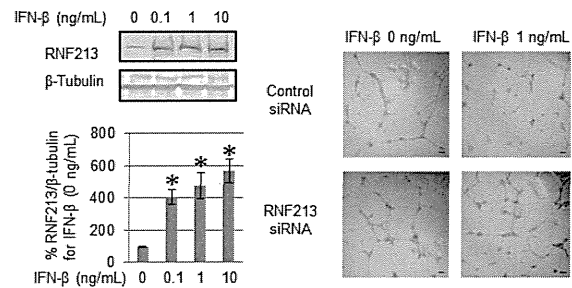


図1 HUVECsにおけるINF-βによるRNF213誘導(左)およびRNF213 siRNAによるINF-β anti-angiogenic effectのレスキュー(右)。*P<0.05 vs INF-β 0 ng/mL

2) RNF213 R4810K および RNF213 WEQ による血管形成能の低下

RNF213 R4810K および RNF213 WEQ を過剰発現させた HUVECs では Tube formation assay において angiogenesis の低下を認めたが、RNF213 ΔAAA は影響を与えなかった (図 2)。Migration assay も同様の結果を示した。また RNF213 R4810K は、報告されている WEQ の結果と類似した、RNF213 の ATPase 活性低下を引き起こした。RNF213 WEQ と RNF213 ΔAAA はともに ATPase 活性を低下させるが、WEQ は RNF213 を多量体の状態にとどめるのに対し、ΔAAA は多量体を形成しないと考えられる。したがって、RNF213 R4810K は、RNF213 WEQ と同様に、AAA+ドメインの Walker B モチーフ機能を障害して、RNF213 の多量体形成を促進することで angiogenesis を抑制することが示唆された。

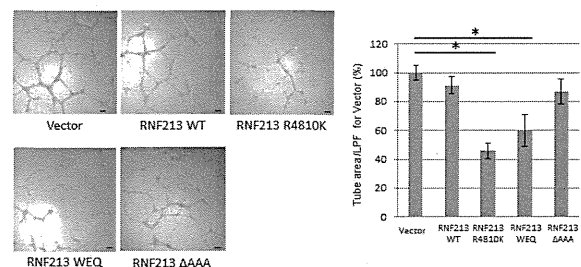


図2 RNF213変異体発現のHUVECsにおけるangiogenesisに対する影響。*P<0.05

3) 血管内皮特異的 RNF213 R4757K 発現による低酸素下の代償性マウス脳血管 angiogenesis の低下

MRA イメージングの結果、EC-Mut-Tg、EC-WT-Tg、SMC-Mut-Tg、KO、WT のいずれ

においても低酸素曝露による脳血管狭窄、もやもや血管の形成などの異常は認めなかった。低酸素曝露による脳毛細血管数の変化を評価した結果、EC-Mut-Tg 以外のすべてのマウスで低酸素曝露により脳毛細血管が増加したのに対し、EC-Mut-Tg では変化がなかった (図 3)。この結果は、マウスモデルにおいて、*in vitro* での結果と同様に、RNF213 変異体の血管内皮発現が低酸素による angiogenesis を抑制することを示している。

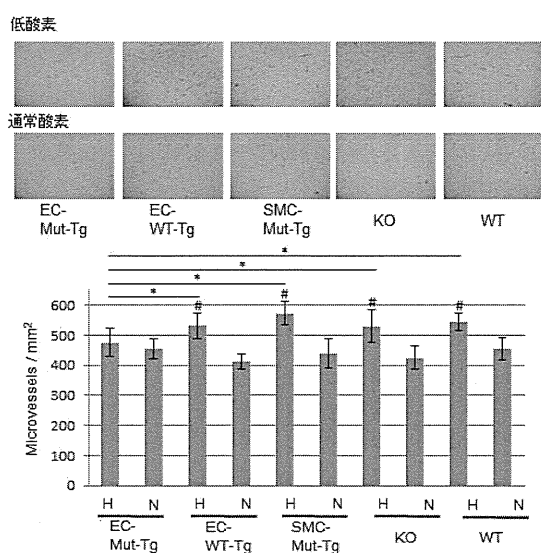


図3 組織特異的Rnf213 Tgマウスにおける低酸素による脳血管angiogenesis、大脳皮質毛細血管のGlut1免疫染色像(上)、毛細血管数の定量化(下)、H: 低酸素、N: 通常酸素、*P<0.05 vs EC-Mut-Tg低酸素、#P<0.05 vs 通常酸素

D. 結論

本研究により、RNF213 R4810K 保有者は angiogenesis の低下を示すこと、さらに脳低酸素に対して感受性が高い可能性が示された。また、IFN がもやもや病発症に関与する環境因子であることも示唆された。さらに、RNF213 R4810K による angiogenesis 抑制に AAA+ドメインの機能、特に多量体形成が重要な役割を果たすことが示され、多量体形成を阻害する AAA+ドメインの Walker A モチーフの ATP 結合の特異的な抑制剤が有望な治療薬の候補になる可能性が考えられる。

E. 文献

- Chong PF, Ogata R, Kobayashi H, Koizumi A, Kira R., Early onset of moyamoya syndrome in a Down syndrome patient with the genetic variant RNF213 p.R4810K, *Brain Dev.*, Available online 26 December 2014
- 小林果、人見敏明、小泉昭夫., もやもや病と RNF213 遺伝子、*分子脳血管病*, 13 巻 2 号:54-56, 2014 年
- Yan J, Hitomi T, Takenaka K, Kato M, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Koizumi A., Genetic study of intracranial aneurysms, *Stroke*, 46(3):620-626, 2015
- Hitomi T, Matsuura N, Shigematsu Y, Okano Y, Shinozaki E, Kawai M, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A., Importance of molecular diagnosis in the accurate diagnosis of systemic carnitine deficiency, *J Genet.*, in press

研究班構成員名簿

| ①研究者名 | ②分担する研究項目 | ③最終卒業校・卒業年次・学位及び専攻科目 | ④所属研究機関及び現在の専門(研究実施場所) | ⑤所属研究機関における職名 |
|-------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------|
| 寶金清博 | 総括 | 北海道大学医学部、昭和54年卒、医学博士、脳神経外科学 | 北海道大学病院脳神経外科 | 教授 |
| 富永悌二 | もやもや病ガイドラインの出版と更新、合併症治療の確立 | 東北大学医学部、昭和57年卒、医学博士、脳神経外科学 | 東北大学大学院医学系研究科神経外科学神経科学 | 教授 |
| 宮本 享 | 小児もやもや病に対する急性期治療およびおよびもやもや病の妊娠出産管理 | 京都大学医学部、昭和57年卒、医学博士、脳神経外科学 | 京都大学医学研究科脳神経外科 | 教授 |
| 鈴木則宏 | もやもや病疫学画像データベース作成と更新 | 慶応義塾大学医学部、昭和52年卒、医学博士、神経内科 | 慶応義塾大学医学部神経内科学 | 教授 |
| 黒田 敏 | 無症候性もやもや病 | 北海道医学部、昭和61年卒、医学博士、脳神経外科 | 富山大学医学研究科脳神経外科 | 教授 |
| 小泉昭夫 | 臨床遺伝学 | 東北大学医学部、昭和53年卒、医学博士、公衆衛生学 | 京都大学医学研究科社会医学系環境衛生学分野臨床遺伝学 | 教授 |
| 高橋 淳 | もやもや病における画像診断 | 京都大学医学部、平成3年卒、医学博士、脳神経外科学 | 国立循環器病研究センター脳神経外科 | 部長 |
| 佐藤典宏 | 新規患者レジストリシステムの構築、データベースの管理 | 北海道大学医学部、昭和60年卒、医学博士、血液内科学 | 北海道大学病院臨床研究開発センター臨床試験支援 | 教授 |
| 数又 研 | 新規患者レジストリシステムの構築 | 北海道大学医学部、平成3年卒、医学博士、脳神経外科 | 北海道大学病院脳神経外科 | 講師 |

- (1) Ogawa Y, Fujimura M, Tominaga T. Moyamoya syndrome associated with basal meningioma successfully treated by the modified transsphenoidal approach: Case report. *J Neurol Surg Rep* 75: e77-80, 2014
- (2) Fujimura M, Kimura N, Ezura M, Niizuma K, Uenohara H, Tominaga T. Development of de novo arteriovenous malformation after bilateral revascularization surgery in a child with moyamoya disease -Case report-. *J Neurosurg Pediatr* 13: 647-649, 2014
- (3) Fujimura M, Sonobe S, Nishijima Y, Niizuma K, Sakata H, Kure S, Tominaga T. Genetics and Biomarkers of Moyamoya Disease: Significance of RNF213 as a susceptibility gene. *J Stroke* 16: 65-72, 2014
- (4) Akamatsu Y, Fujimura M, Uenohara H, Shimizu H, Tominaga T. Development of Moyamoya Disease in Pregnancy and Puerperium -Case Report-. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 54: 824-826, 2014
- (5) Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Furudate S, Nishijima Y, Kure S, Tominaga T. Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213; moyamoya disease susceptibility gene. *Neuroreport* 25: 1442-1446, 2014
- (6) Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Sato K, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T. Quantitative analysis of early postoperative cerebral blood flow contributes to the prediction and diagnosis of cerebral hyperperfusion syndrome after revascularization surgery for moyamoya disease. *Neurol Res* 37: 131-138, 2015
- (7) Ito A, Fujimura M, Niizuma K, Kanoke A, Sakata H, Morita-Fujimura Y, Kikuchi A, Kure S, Tominaga T. Enhanced post-ischemic angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 1594: 310-320, 2015
- (8) Fujimura M, Tominaga T. Diagnosis of Moyamoya Disease: International Standard and Regional Differences. *Neurol Med Chir (Tokyo)* (in press)
- (9) Sakata H, Fujimura M, Mugikura S, Sato K, Tominaga T. Local vasogenic edema without cerebral hyperperfusion after direct revascularization surgery for moyamoya disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis* (in press)
- (10) 藤村幹. もやもや病に対する血行再建術の合併症とその発生メカニズム. *脳神経外科速報* 24: 538-545, 2014
- (11) 坂田洋之、藤村幹、佐藤健一、清水宏明、富永悌二. 周術期管理に苦慮した動脈硬化を合併した成人類もやもや病の1例. *脳神経外科* 42: 737-743, 2014
- (12) 藤村幹、富永悌二. もやもや病：診断と治療. *日本臨床* 72: 548-552, 2014
- (13) 藤村幹、新妻邦泰、遠藤英徳、佐藤健一、井上敬、富永悌二. もやもや病に対する血行再建術後・過灌流に対するミノサイクリンを用いた周術期管理の現状と問題点. *脳卒中の外科* (出

版中)

- (14) 赤松洋祐 藤村幹 坂田洋之 遠藤英徳 板橋亮 富永悌二. 1型糖尿病に合併した成人・類もやもや病の1手術例. 脳神経外科 43:227-233, 2015
- (15) Takagi Y, Miyamoto S; COSMO-Japan Study Group. Cognitive Dysfunction Survey of the Japanese Patients with Moyamoya Disease (COSMO-JAPAN Study): Study Protocol. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015 Mar 15;55(3):199-203
- (16) Funaki T, Fushimi Y, Takahashi JC, Takagi Y, Araki Y, Yoshida K, Kikuchi T, Miyamoto S. Visualization of Periventricular Collaterals in Moyamoya Disease with Flow-sensitive Black-blood Magnetic Resonance Angiography: Preliminary Experience. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015 Mar 15;55(3):204-9
- (17) Funaki T, Takahashi JC, Takagi Y, Kikuchi T, Yoshida K, Mitsuhara T, Kataoka H, Okada T, Fushimi Y, Miyamoto S. Unstable moyamoya disease: clinical features and impact on perioperative ischemic complications. *J Neurosurg*. 2015 Feb;122(2):400-7
- (18) Araki Y, Takagi Y, Ueda K, Ubukata S, Ishida J, Funaki T, Kikuchi T, Takahashi JC, Murai T, Miyamoto S. Cognitive function of patients with adult moyamoya disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014 Aug;23(7):1789-94
- (19) Funaki T, Takahashi JC, Takagi Y, Yoshida K, Araki Y, Kikuchi T, Kataoka H, Iihara K, Sano N, Miyamoto S. Incidence of late cerebrovascular events after direct bypass among children with moyamoya disease: a descriptive longitudinal study at a single center. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014 Mar;156(3):551-9
- (20) Funaki T, Takahashi JC, Takagi Y, Yoshida K, Araki Y, Kikuchi T, Kataoka H, Iihara K, Miyamoto S. Impact of posterior cerebral artery involvement on long-term clinical and social outcome of pediatric moyamoya disease. *J Neurosurg Pediatr*. 2013 Dec;12(6):626-32
- (21) Mineharu Y, Takagi Y, Takahashi JC, Hashikata H, Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Koizumi A, Miyamoto S. Rapid progression of unilateral moyamoya disease in a patient with a family history and an RNF213 risk variant. *Cerebrovasc Dis*. 2013;36(2):155-7
- (22) Kuroda S, Kashiwazaki D, Hirata K, Shiga T, Houkin K, Tamaki N: Effects of surgical revascularization on cerebral oxygen metabolism in patients with moyamoya disease – An ¹⁵O-gas PET study. *Stroke* 45:2717-2721, 2014
- (23) Vuignier S, Akioka N, Hamada H, Kashiwazaki D, Kuroda S: Headache attack followed by rapid disease progression in pediatric moyamoya disease – How should we manage it? *Child's Nerv Syst* 30:1733-1736, 2014

- (24) Shibata T, Musha T, Kubo M, Horie Y, Asahi T, Kuwayama N, Kuroda S, Hayashi K, Kobayashi Y, Tanaka M, Matsuzaki H, Asada T: Neuronal activity topography parameters as a marker for differentiating vascular cognitive impairment in carotid stenosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23:2384-2390, 2014
- (25) Hori S, Kashiwazaki D, Akioka N, Hayashi T, Hori E, Umemura K, Horie Y, Kuroda S: Surgical anatomy and preservation of middle meningeal artery during bypass surgery for moyamoya disease. *Acta Neurochir (Wien)* 157:29-36, 2015
- (26) Kuroda S, AMORE Study Group: Asymptomatic moyamoya disease – literature review and ongoing AMORE study. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 55:194-198, 2015
- (27) 黒田 敏：もやもや病。豊田一則（編）「脳梗塞読本」2014、中外医学社、pp345-357
- (28) 黒田 敏：AMORE。 *Clinical Neuroscience* 32:454-455, 2014
- (29) 堀 聡、柏崎大奈、秋岡直樹、浜田秀雄、桑山直也、黒田 敏：間接バイパス術後30年を経て出血発症したもやもや病の成人例一追加的脳血行再建術の手技と有用性について。 *脳外* 42:347-353, 2014
- (30) 黒田 敏：もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）。鈴木則宏（編）「脳血管障害の治療最前線」2014、中山書店、pp216-224
- (31) 黒田 敏：Case 5 前頭部痛、右片麻痺の発作を繰り返す女兒。鈴木則宏（編）「脳血管障害の治療最前線」2014、中山書店、pp395-399
- (32) 林 智秀、柏崎大奈、秋岡直樹、桑山直也、黒田 敏：術後過灌流が再燃して症候化したと考えられる成人もやもや病の一例。 *脳外*42:621-627, 2014
- (33) 黒田 敏：もやもや病に対する脳血行再建術。 *Journal of Clinical Rehabilitation* 23:760-768, 2014
- (34) 黒田 敏：無症候性もやもや病。橋本信夫ら（編）「臨床医のための最新脳神経外科」先端医療技術研究所、pp199-202、2014
- (35) 柏崎大奈、黒田 敏：もやもや病に対する直接バイパス術。 *小児の脳神経* 38:395-402, 2014
- (36) 黒田 敏：もやもや病のバイパス術。森田明夫（編）「バイパス術のすべて一次世代への技術の継承」メジカルビュー社、pp58-69, 2015
- (37) 黒田 敏、AMORE Study Group：AMORE (asymptomatic Moyamoya Registry)研究。 *日本臨床* 72:Suppl 7, 659-663, 2014
- (38) Chong PF, Ogata R, Kobayashi H, Koizumi A, Kira R., Early onset of moyamoya syndrome in a Down syndrome patient with the genetic variant RNF213 p.R4810K, *Brain Dev.*, Available online 26 December 2014
- (39) 小林果、人見敏明、小泉昭夫., もやもや病と RNF213 遺伝子、 *分子脳血管病*, 13 巻 2 号:54-56, 2014 年
- (40) Yan J, Hitomi T, Takenaka K, Kato M, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Koizumi A., Genetic study of intracranial aneurysms, *Stroke*, 46(3):620-626, 2015
- (41) Hitomi T, Matsuura N, Shigematsu Y, Okano Y, Shinozaki E, Kawai M, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A., Importance of molecular diagnosis in the accurate diagnosis of systemic carnitine deficiency, *J Genet.*, in press

- (42) 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
- (43) Kazumata K, Ito M, Tokairin K, Ito Y, Houkin K, Nakayama N, et al. The frequency of postoperative stroke in moyamoya disease following combined revascularization: A single-university series and systematic review. *Journal of neurosurgery*. 2014;121:432-440
- (44) Kazumata K, Shinbo D, Ito M, Shichinohe H, Kuroda S, Nakayama N, et al. Spatial relationship between cerebral microbleeds, moyamoya vessels, and hematoma in moyamoya disease. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2014;23:1421-1428
- (45) Kazumata K, Tha KK, Narita H, Kusumi I, Shichinohe H, Ito M, et al. Chronic ischemia alters brain microstructural integrity and cognitive performance in adult moyamoya disease. *Stroke: a journal of cerebral circulation*. 2015;46:354-360
- (46) Uchino H, Kazumata K, Ito M, Nakayama N, Kuroda S, Houkin K. Intraoperative assessment of cortical perfusion by indocyanine green videoangiography in surgical revascularization for moyamoya disease. *Acta neurochirurgica*. 2014;156:1753-1760



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Enhanced post-ischemic angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease



Akira Ito^a, Miki Fujimura^{a,*}, Kuniyasu Niizuma^a, Atsushi Kanoke^a,
Hiroyuki Sakata^a, Yuiko Morita-Fujimura^b, Atsuo Kikuchi^c, Shigeo Kure^c,
Teiji Tominaga^a

^aDepartment of Neurosurgery, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

^bDepartment of Molecular Biology, Tohoku University Institute of Aging and Cancer, Sendai, Japan

^cDepartment of Pediatrics, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 7 November 2014

Available online 13 November 2014

Keywords:

Moyamoya disease

RNF213

Target disruption

Angiogenesis

Ischemia

ABSTRACT

Moyamoya disease (MMD) is a chronic occlusive cerebrovascular disease with unknown etiology that is characterized by the development of abnormal vascular networks at the base of the brain. Recent genome-wide studies identified RNF213 as an important MMD susceptibility gene. However, the exact mechanism by which the RNF213 abnormality leads to MMD remains unknown. Thus, we sought to clarify the role of RNF213 in angiogenesis under ischemic conditions using conventional RNF213 knockout mice. We assessed the infarction volume, cerebral edema, and vascular density in the ischemic brain after transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). To further evaluate systemic angiogenesis following chronic ischemia, we investigated blood flow recovery using laser speckle flowmetry, the severity of ambulatory impairments, and vascular density in the hind-limb after permanent femoral artery ligation. Results were compared between homozygous RNF213 knockout mice (RNF213 ^{-/-}) and wild-type littermates (Wt). No significant differences were observed in infarction volume or the formation of edema following tMCAO, or in vascular density 28 days after tMCAO between RNF213 ^{-/-} and Wt. Blood flow recovery was significantly improved in RNF213 ^{-/-} from 3 to 28 days after femoral artery ligation, and angiogenesis as shown by vascular density in the hind-limb was significantly enhanced in RNF213 ^{-/-} at 28 days. The amelioration of ambulatory impairments was also evident in RNF213 ^{-/-}. Angiogenesis was enhanced in mice lacking RNF213 after chronic hind-limb ischemia, which suggested the potential role of the RNF213 abnormality in the development of pathological vascular networks in chronic ischemia.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel.: +81 22 717 7230; fax: +81 22 717 7233.

E-mail address: fujimur@nsg.med.tohoku.ac.jp (M. Fujimura).

1. Introduction

Moyamoya disease (MMD) is a progressive occlusive cerebrovascular disease that is characterized by bilateral stenocclusive changes at the terminal portion of the internal carotid artery (ICA) and an abnormal vascular network at base of the brain (Suzuki and Takaku, 1969). This abnormal vascular network is expressed as ‘moyamoya’, a Japanese expression for something hazy such as a drifting puff of cigarette smoke. This abnormal angiogenesis may be specific to MMD because non-MMD patients exhibiting stenocclusive changes in the intracranial major arteries rarely have collateral vessels similar to moyamoya vessels (Yoshihara et al., 2008; Achrol et al., 2009). Indirect revascularization such as encephalo-duro-arterio-synangiosis is commonly used in symptomatic MMD patients to achieve successful angiogenesis and collateral growth in both adults and children (Endo et al., 1989; Matsushima et al., 1989, 1992). Few studies have demonstrated the efficacy of indirect revascularization to enhance collateral angiogenesis in cases of symptomatic, non-MMD intracranial atherosclerotic arterial stenosis. Komotar and colleagues reported that this procedure did not promote adequate pial collateral artery development in patients with atherosclerotic occlusive cerebrovascular diseases (2009).

Although the etiology of MMD remains unknown, recent findings suggest the importance of genetic factors (Ikeda et al., 1999; Inoue et al., 2000; Yamauchi et al., 2000; Sakurai et al., 2004). A more recent genome-wide association study identified the RNF213 gene (*RNF213*) in the 17q25-ter region as a susceptibility gene for MMD (Kamada et al., 2011; Liu et al., 2011; Wu et al., 2012). We previously reported that a single-nucleotide polymorphism (SNP) of c.14576 G>A in *RNF213* was detected in 95% of familial MMDs and 79% of sporadic cases in Japan (Kamada et al., 2011). However, the mechanism by which the SNP in *RNF213* leads to MMD remains

unknown. We hypothesized that SNP in *RNF213* may be related to abnormal angiogenesis under ischemic conditions. More recently, SNP of c.14576 G>A in *RNF213* was also found in the non-MMD intracranial major artery stenosis/occlusion (Miyawaki et al., 2013). Therefore, we investigated angiogenic responses following transient focal cerebral ischemia in the chronic stage in homozygous knockouts of *RNF213* (*RNF213*^{-/-}) and wild-type littermates (Wt). To further evaluate systemic angiogenesis after chronic ischemia, we examined angiogenesis after permanent hind-limb ischemia at the chronic stage in *RNF213*^{-/-} and Wt.

2. Results

2.1. No significant difference in infarct volume after tMCAO

Due to the absence of a favorable animal model for chronic cerebral ischemia that reproducibly leads to angiogenesis at the base of the brain, we employed transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO), which is generally accepted as an acute stroke model.

The infarct volume was quantified in triphenyltetrazolium chloride (TTC)-stained slices, and was 92.9 mm³ in *RNF213*^{-/-} and 97.7 mm³ in Wt. No significant difference was observed in the infarct volume 48 h after 90 min MCAO between Wt and *RNF213*^{-/-} ($p=0.62$) (Fig. 1A).

2.2. No significant difference in edema formation after tMCAO

Cerebral edema was quantified by water content in the brain, and was 81.6% in *RNF213*^{-/-} and 82.5% in Wt. No significant difference was observed in brain water content 24 h after 90 min MCAO between Wt and *RNF213*^{-/-} ($p=0.93$) (Fig. 1B).

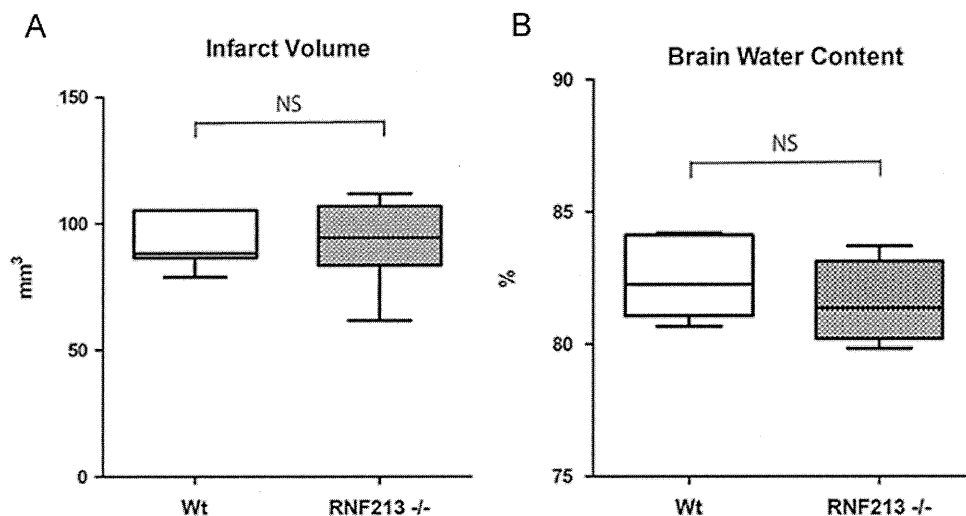


Fig. 1 – The infarction volume and extent of cerebral edema after tMCAO. (A) Infarct volume was quantified in TTC-stained slices. No significant difference was observed in the infarction volume between Wt and *RNF213*^{-/-}. (B) Brain water content was examined to assess the extent of cerebral edema. No significant difference was observed in the brain water content between Wt and *RNF213*^{-/-}. (tMCAO, transient middle cerebral artery occlusion; TTC, 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride; Wt, wild-type littermates; *RNF213*^{-/-}, homozygous *RNF213* knockout mice; NS, not significant.).

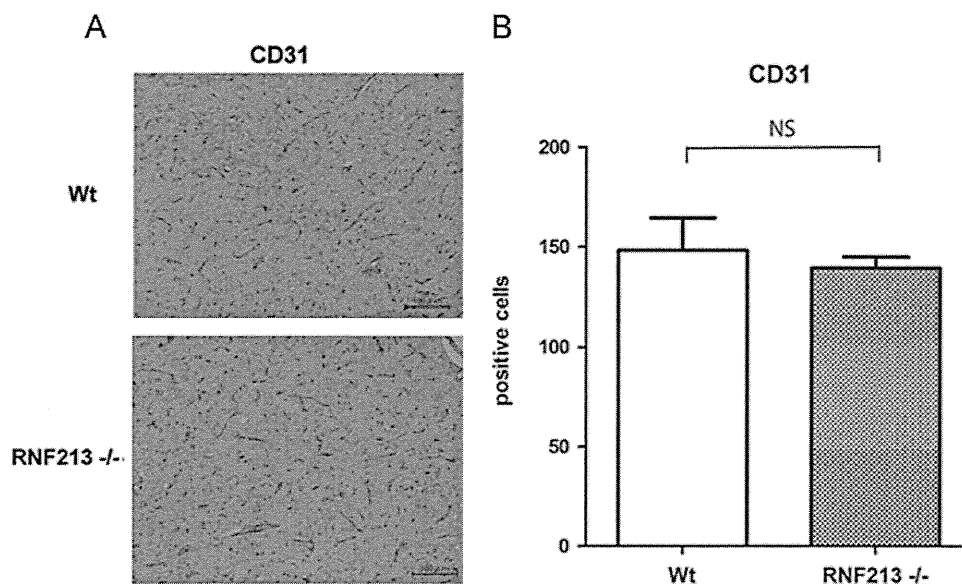


Fig. 2 – Vascular density in the cerebral parenchyma 28 days after tMCAO. (A) Representative micrographs of the boundary area of infarct in Wt and RNF213^{-/-}. Vascular endothelial cells were positively stained by the anti-CD31 antibody. (B) No significant difference was observed in cerebral parenchymal vascular density between Wt and RNF213^{-/-}.

2.3. No significant difference in angiogenesis after tMCAO

To evaluate angiogenesis in the chronic state after tMCAO, vascular density in the cerebral parenchyma was evaluated by immunohistochemistry with an anti-CD31 antibody 28 days after 90 min MCAO (Zhang et al., 2000). Three out of six mice in both Wt and RNF213^{-/-} survived 28 days after tMCAO. The mortality rate in each group was 50%, respectively. Parenchymal vascular density as indicated by CD31-positive cells was 81.56 in RNF213^{-/-} and 82.5 in Wt. No significant difference was observed in cerebral parenchymal vascular density between Wt and RNF213^{-/-} ($p=0.39$) (Fig. 2A–B).

2.4. No significant difference in the expression of pro-MMP-9 and MMP-9 after tMCAO

Gelatin zymography was performed on samples from ischemic hemispheres to evaluate the level of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-9 24 h after 90 min MCAO. pro-MMP-9 expression in the ischemic hemisphere was elevated after tMCAO in both groups (Fig. 3A). The active form of MMP-9 was detected in the ischemic hemisphere, but not in the non-ischemic hemisphere (Fig. 3A). No significant difference was observed in the level of pro-MMP-9 ($p=0.84$) or MMP-9 ($p=0.74$) between Wt and RNF213^{-/-} (Fig. 3A–B).

2.5. Blood flow recovered better in RNF213^{-/-} after femoral artery ligation

No significant differences were observed in the responses to transient cerebral ischemia between Wt and RNF213^{-/-}, as described above. There was no chronic cerebral ischemia model that was suitable for investigating angiogenic responses in mice. One of the ideal animal models to mimic human ischemic disease and evaluate angiogenesis in a

reproducible manner is a hind-limb ischemia model (Limbourg et al., 2009). Therefore, we adopted this model to investigate angiogenesis after a chronic ischemic insult. We measured serial blood flow in the hind-limbs of the same animals using the LSF system over a period of 28 days. The average perfusion in each foot was calculated. To correct variables, including ambient light and temperature, calculated perfusion was expressed as a ratio of the ischemic to non-ischemic limb. Blood flow in the ischemic limb gradually recovered with time in both Wt and RNF213^{-/-} (Fig. 4A–B). However, the recovery of blood flow was significantly better in RNF213^{-/-} than in Wt. from 3 to 28 days after ligation (Fig. 4A–B).

2.6. Ambulatory impairments were milder in RNF213^{-/-} after femoral artery ligation

We also assessed motor function in the ischemic hind-limb by scoring ambulatory impairments. Motor functions declined after femoral artery ligation, and improved with time in Wt and RNF213^{-/-} (Fig. 5B). The ambulatory impairment score was significantly better in RNF213^{-/-} (score 0.43) than in Wt. (score 1.86) three days after ligation ($p<0.001$). It was also significantly better in RNF213^{-/-} (score 0.14) than in Wt. (score 1.00) seven days after ligation ($p<0.01$) (Fig. 5B).

2.7. Angiogenesis was enhanced in RNF213^{-/-} after femoral artery ligation

Angiogenesis after hind-limb ischemia was evaluated by immunohistochemistry in the GC muscle with the anti-CD31 antibody 28 days after the induction of ischemia (Limbourg et al., 2009; Lu et al., 2012; Tashiro et al., 2012). The density of CD31-positive cells was significantly higher in RNF213^{-/-} (170.8 cells) than in Wt. (117.0 cells) ($p<0.05$), which indicated that angiogenesis in the GC muscle was

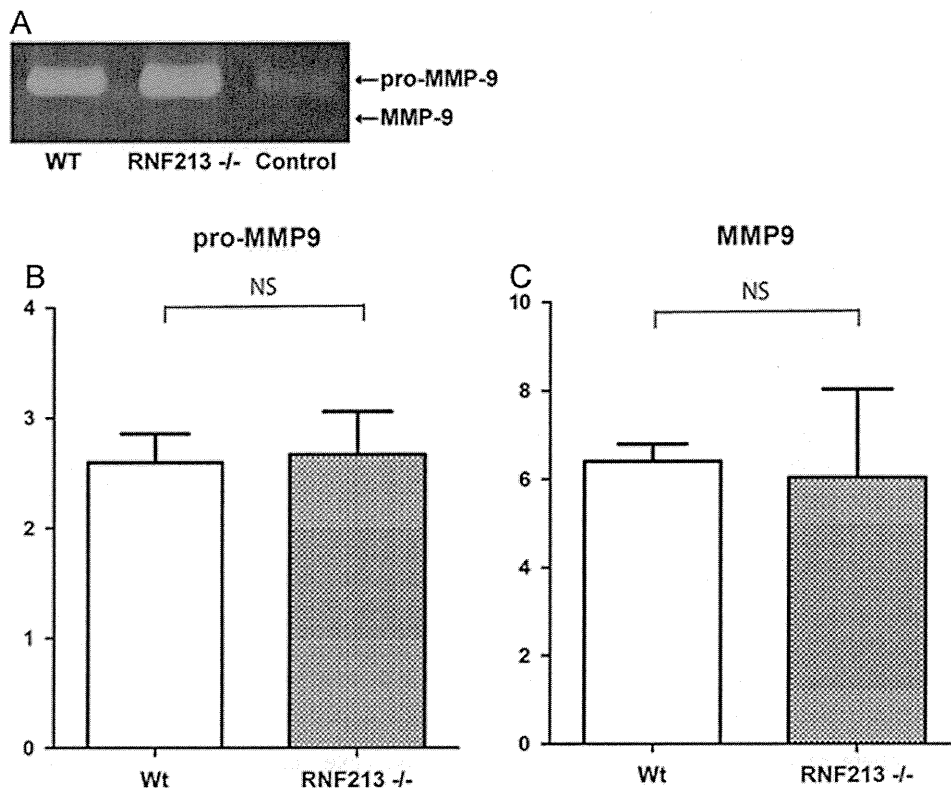


Fig. 3 – The expression of pro-MMP-9 and MMP-9 in the brain 24 h after tMCAO. (A) Representative photographs of gelatin zymography in Wt, RNF213^{-/-}, and control specimens from the non-ischemic hemisphere in Wt. pro-MMP-9 and MMP-9 were detected as 105 and 97 kDa, respectively. (B) Semi-quantitative analysis of pro-MMP-9 expression. No significant difference was observed between Wt and RNF213^{-/-}. (C) Semi-quantitative analysis of MMP-9 expression. No significant difference was observed between Wt and RNF213^{-/-}. (MMP, matrix metalloproteinase; NS, not significant).

enhanced more in RNF213^{-/-} than in Wt. after chronic hind-limb ischemia (Fig. 6A–B). We also performed immunohistochemistry with an anti-CD34 antibody and anti-CD133 antibody to evaluate the angiogenesis as well as stem cell expression (Fig. 6C), and the results were completely in accordance with that of CD31.

2.8. No significant difference in pro-MMP-9 expression after femoral artery ligation

The expression of pro-MMP-9 three days after femoral artery ligation was assessed by zymography. It increased after hind-limb ischemia in both groups, while the active form of MMP-9 was not detected even after ischemia induction (Fig. 7A). No significant difference was observed in the level of pro-MMP-9 between Wt and RNF213^{-/-} ($p=0.275$) (Fig. 7A–B).

3. Discussion

In the present study, we showed that angiogenesis under chronic ischemic conditions was significantly better in mice lacking the RNF213 gene than in Wt in the hind-limb ischemia model. Previous studies attempted to examine the role of RNF213 in angiogenesis by using an *in vitro* model of MMD (Hitomi et al., 2013); however, our study is the first to examine the contribution of the RNF213 abnormality to angiogenic

responses *in vivo*. Based on our results, it is conceivable that the SNP of c.14576 G>A in RNF213 in patients may lead to the loss of RNF213 function, and could thereby enhance the development of abnormal vascular networks after chronic ischemia.

In our previous study, we showed that RNF213^{-/-} grew normally until 64 weeks after birth, and did not develop the pathological characteristics of MMD including stenocclusive changes in the ICA and an abnormal vascular network at the base of the brain under normal physiological conditions (Sonobe et al., 2014). We also demonstrated that both the intima and medial layers of the CCA were significantly thinner in RNF213^{-/-} than in Wt 14 days after CCA ligation, which suggested that the RNF213 abnormality may affect vascular wall remodeling in the carotid arteries under ischemic conditions, thereby leading to the characteristic features of MMD (Sonobe et al., 2014). Medial layer thinness, as found in this study, is known to be one of the intrinsic histopathological characteristics of MMD (Oka et al., 1981; Takagi et al., 2007b; Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis, 2012), and the thinness of the entire vascular wall structure may even be considered to reflect the early morphological changes of MMD, based on the most recent constrictive remodeling theory of MMD as described by Kaku et al., 2012. However, the mechanism by which the RNF213 abnormality affects the development of abnormal

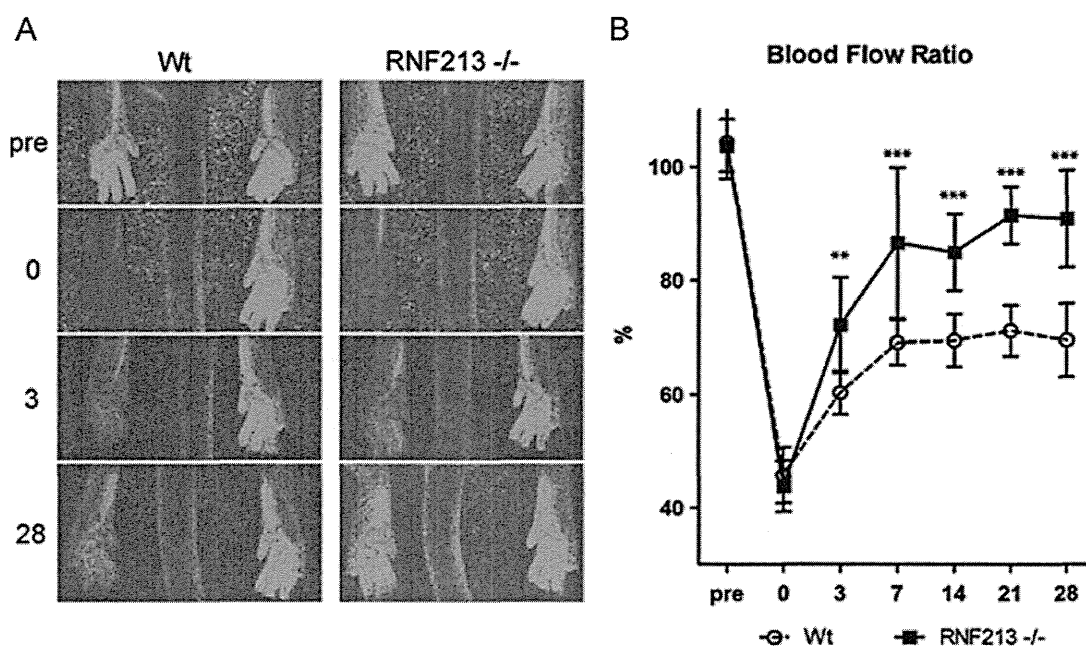


Fig. 4 – LSF perfusion measurements after femoral artery ligation. (A) Representative serial color-coded perfusion images before surgery (pre), immediately after ligation (0), and three days (3) and 28 days (28) after surgery in Wt and RNF213^{-/-}. (B) Blood flow gradually recovered in the ischemic limb with time in both Wt and RNF213^{-/-}. The recovery of blood flow was significantly better in RNF213^{-/-} than in Wt from 3 to 28 days after ligation. (LSF, laser speckle flowmetry; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

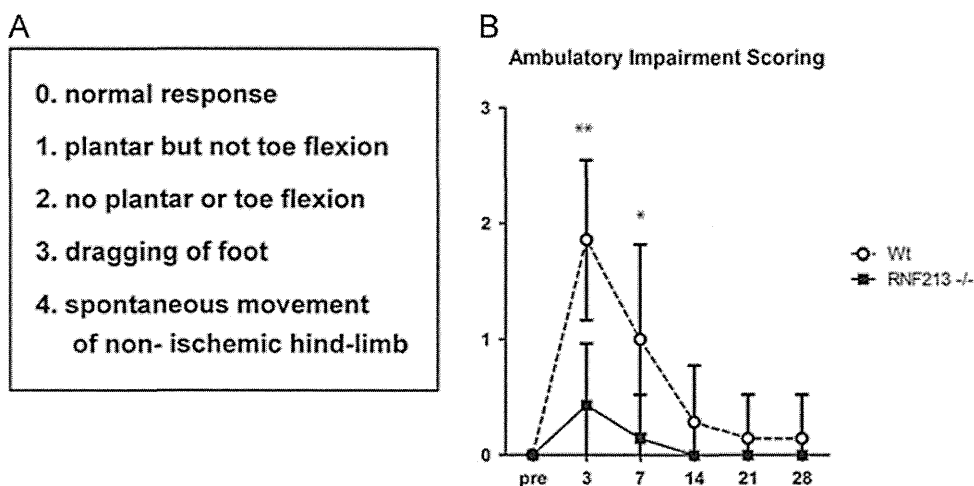


Fig. 5 – Severity of ambulatory impairments after femoral artery ligation. (A) The severity of ambulatory impairments was evaluated by the following scoring: 0, normal response (plantar/toe flexion in response to tail traction); 1, plantar, but not toe flexion; 2, no plantar or toe flexion; 3, dragging of the foot; 4, spontaneous movement of the non-ischemic hind-limb. (B) Motor functions declined after femoral artery ligation, and improved with time in both Wt and RNF213^{-/-}. Deficits were significantly milder in RNF213^{-/-} than in Wt three and seven days after ligation. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

vascular networks, the so-called ‘moyamoya vessels’, in MMD has not yet been determined.

The development of moyamoya vessels is generally considered to be an abnormal angiogenic response to chronic ischemia due to bilateral ICA steno-occlusive changes in MMD (Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis, 2012). Thus, we compared angiogenic responses to ischemic insults between RNF213^{-/-} and Wt in the present study. We have

previously attempted to establish chronic brain hypoperfusion model by bilateral ICA occlusion, but it was the case of CD1 strain mice instead of C57BL/6 (Murakami et al., 1998). Regarding C57 BL/6 background mice used in this study, we failed to establish favorable chronic brain hypoperfusion model. In fact, it was reported that C57 BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral carotid artery occlusion, and showed extremely high mortality rate (Yang et al., 1997). Due to the absence of a favorable mice