

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、我々はおも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、おも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 の血管内皮発現がおも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 患者および健康者由来の 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。

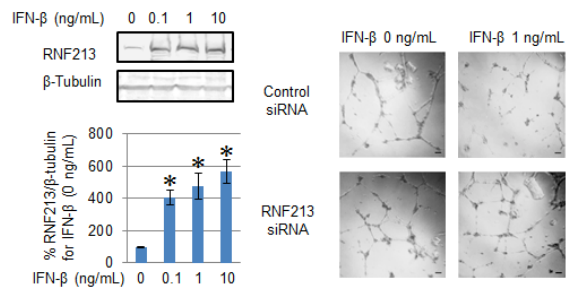


図1 HUVECsにおけるINF-βによるRNF213誘導(左)およびRNF213 siRNAによるINF-β anti-angiogenic effectのレスキュー(右)。*P<0.05 vs INF-β 0 ng/mL

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 モチーフ機能を阻害して、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。

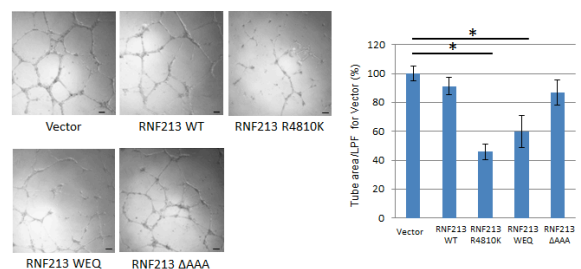


図2 RNF213変異体発現のHUVECsにおけるangiogenesisに対する影響。*P<0.05

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。

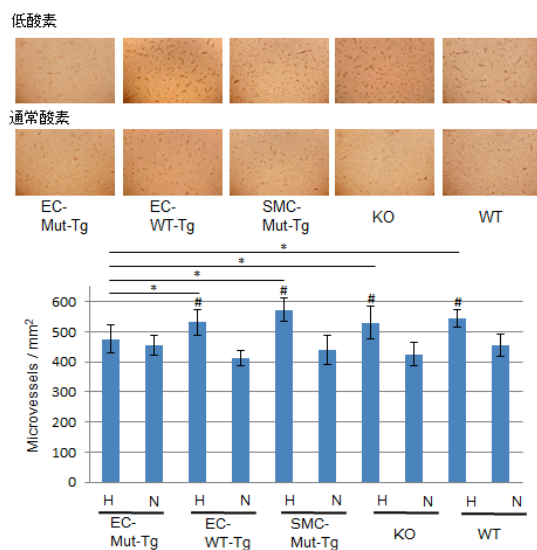


図3 組織特異的Rnf213 Tgマウスにおける低酸素による脳血管angiogenesis。大脳皮質毛細血管のGlut1免疫染色像(上)、毛細血管数の定量化(下)、H: 低酸素、N: 通常酸素、*P<0.05 vs EC-Mut-Tg低酸素、#P<0.05 vs 通常酸素

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