

## 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

*RNF213* 遺伝子はもやもや病感受性遺伝子として同定されたが、遺伝子機能は大部分が未解明である。本年度は、*RNF213* が脳虚血応答に果たす役割を検討する目的で、*Rnf213* ノックアウト（KO）および *Rnf213* 変異体血管内皮特異的トランスジェニック（EC-Tg）マウスを用いて、両側総頸動脈狭窄（BCAS）による脳低灌流モデルを作製した。BCAS 術後 28 日の観察期間中に、KO マウスは 37.5%（3/8 匹）が死亡したのに対し、EC-Tg および野生型（WT）マウスに死亡は認めなかった。脳イメージングによる血流量測定により、術後 7 日後には KO マウス、術後 28 日後では KO および EC-Tg マウスにおいて脳血流量が WT マウスと比較して有意に低かった。さらに、病理組織学的検討により 28 日後時点の KO および EC-Tg マウス脳で angiogenesis が抑制されていることが明らかとなった。以上より、*RNF213* が脳血流の維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

### A. 研究目的

*RNF213* 遺伝子はもやもや病の感受性遺伝子として同定され、p.R4810K 多型が東アジアにおいて疾患と非常に強い相関を示すことが証明されているが、遺伝子機能の大部分は未解明である。現在まで *in vivo* 実験により、*Rnf213* 変異体（ヒト p.R4810K に相当）血管内皮特異的トランスジェニック（EC-Tg）マウスにおける脳低酸素下での angiogenesis 低下、*Rnf213* ノックアウト（KO）における総頸動脈結紮下での血管リモデリング変化の抑制が報告されている。本研究では、angiogenesis および血管リモデリングが脳虚血への代償機構として機能する点に着目し、遺伝子改変マウスで脳低灌流モデルを作製して脳血流および脳血管変化を解析することで、*RNF213* が脳低灌流応答に果たす役割の検討を行った。

### B. 研究方法

EC-Tg、KO および野生型（WT）の 3 群について 8-10 週齢のマウスを実験に用いた。脳低灌流モデルは 0.18 mm コイルを用いた両側総頸動脈狭窄（BCAS）法により作成し、術後 28 日間の観察を行った。脳血流測定は術前、7 日後、28 日後の時点で arterial spin-labelling MR イメージングで行い、また T2 強調画像、拡散強調画像、MRA 画像の撮影も行った。イメージング後には屠殺して脳組織標本を作製し、Glut1 免疫染色による脳毛細血管数の評価を行った。統計的検定は、Kaplan–Meier 法による生存解析においてはログランク検定で、その他の項目については one-way ANOVA 後に Tukey 法による *post hoc test* で行った。

### C. 研究結果

BCAS 術後に EC-Tg (8 匹) および WT (15 匹) マウスではすべてのマウスが観察期間中生存したのに対し、KO マウスでは 8 匹中 3 匹がそれぞれ術後 1、8、11 日に死亡し、Kaplan–Meier 解析により KO と WT マウスの間に有意な差が示された ( $p=0.033$ )。さらに術後 11 日で死亡した KO マウスについては術後 7 日で行われた MR イメージングにより脳梗塞が認められた。

BCAS 術前の脳血流量は KO、EC-Tg、WT マウス間で差がなかったのに対し、術後 7 日では KO マウスの脳血流量が顕著に減少し、WT マウスおよび EC-Tg マウスに比べて有意な低下を示した (図)。さらに術後 28 日では WT マウスと比較して KO および EC-Tg の血流量の回復が十分でなく、有意差が認められた (図)。MRA による検討では、術後 7 日の前方循環でのシグナル低下と 28 日の部分的なシグナル強度の回復を認めたが、KO、EC-Tg、WT マウス間での差はなかった。また明確な脳血管狭窄やもやもや血管の形成は観察されなかった。

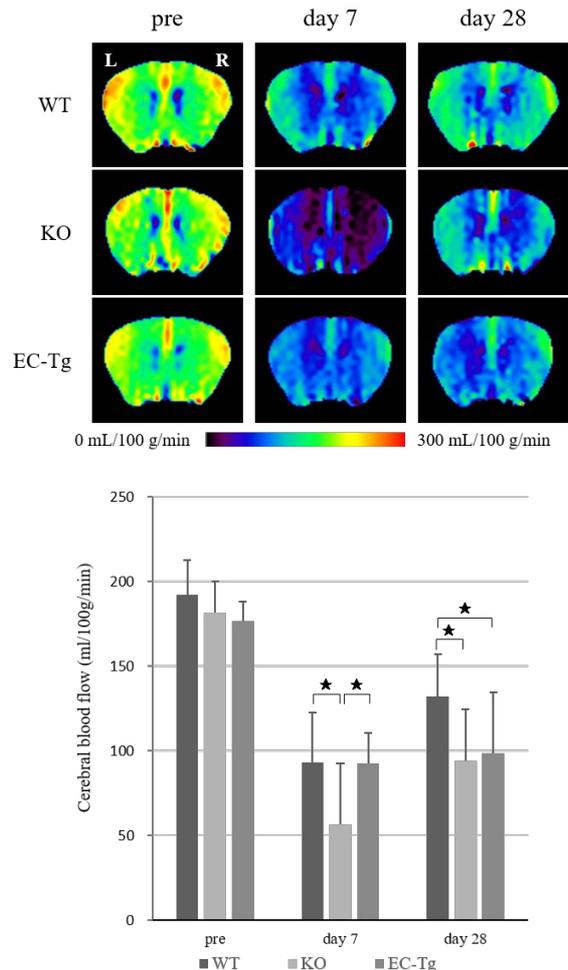
Glut1 免疫染色による脳毛細血管の評価を行った結果、術後 28 日時点で KO および EC-Tg マウスの脳毛細血管数は WT マウスより有意に低く、angiogenesis の抑制が示された。

### D. 結論

本研究により、KO マウスが脳低還流後早期に高度な脳血流低下を示すことが証明され、脳梗塞発生・生存率低下につながると推測される。それに対し、脳低還流後の後期では KO のみならず EC-Tg マウスにおいても脳血流量の回復が阻害され、これには angiogenesis 抑制が関与すると考えられる。以上より、*RNF213* が脳血流の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

脳虚血への代償的応答として、早期には arteriogenesis (側副血管の拡張とリモデリング)

が、後期には angiogenesis が主たる役割を果たすことが知られている。したがって、*RNF213* 欠損は arteriogenesis と angiogenesis に、*RNF213* 変異体発現は angiogenesis に影響する可能性がある。



図：BCAS術後マウスの脳血流量経時変化

(上) KO、EC-Tg および WT マウスの代表的な冠状面血流量イメージング画像 (arterial spin-labelling 法)  
(下) 大脳皮質領域での血流量定量化データ

\* $p < 0.05$  one-way ANOVA with Tukey's post hoc test

### E. 文献

富永 悌二, 鈴木 則宏, 宮本 享, 小泉 昭夫, 黒田 敏, 高橋 淳, 藤村 幹, 寶金 清博. もやもや病 (ウイルス動脈輪閉塞症) 診断・治療ガイドライン (改訂版). 脳卒中の外科, 46(1): 1-24, 2018

Morimoto T, Enmi J, Hattori Y, Iguchi S, Saito S, Harada KH, Okuda H, Mineharu Y, Takagi Y, Youssefian S, Iida H, Miyamoto S, Ihara M,

Kobayashi H, Koizumi A. Dysregulation of RNF213 promotes cerebral hypoperfusion. *Sci Rep.*, ;8(1):3607, 2018

Matsuda Y, Mineharu Y, Kimura M, Takagi Y, Kobayashi H, Hitomi T, Harada KH, Uchihashi Y, Funaki T, Miyamoto S, Koizumi A. RNF213 p.R4810K Variant and Intracranial Arterial Stenosis or Occlusion in Relatives of Patients with Moyamoya Disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, 26(8):1841-1847, 2017

Morimoto T, Mineharu Y, Ono K, Nakatochi M, Ichihara S, Kabata R, Takagi Y, Cao Y, Zhao L, Kobayashi H, Harada KH, Takenaka K, Funaki T, Yokota M, Matsubara T, Yamamoto K, Izawa H, Kimura T, Miyamoto S, Koizumi A. Significant association of RNF213 p.R4810K, a moyamoya susceptibility variant, with coronary artery disease. *PLoS One.*, 12(4):e0175649, 2017