

審査の結果の要旨

氏名 石神 大一郎

もやもや病 (Moyamoya disease, MMD) は、内頸動脈終末部が進行性に狭窄する疾患であり、大脳基底核や視床、側脳室周辺に脆弱な「もやもやとした」穿通枝の異常ネットワーク形成を特徴とする。本邦における 2011 年の genome-wide association study (GWAS) を経て *RNF213* 遺伝子上の hotspot variant (c.14429G>A, p.Arg4810Lys) と MMD の関連が判明した。*RNF213* タンパクは E3 ubiquitin ligase であり、脂質制御や免疫学的機能を持つことが明らかになってきているが、*RNF213* の knock-out, knock-down, knock-in では MMD の表現型は得られていない。また、*RNF213* p.Arg4810Lys は general population においても minor allele frequency (MAF) は 1%程度と比較的高く、保因者のうち MMD を発症するのは 150–300 人に 1 人と計算される。すなわち、他の修飾因子の存在が示唆され、濃厚な家族性発症を考慮すると *RNF213* 遺伝子以外の遺伝的修飾因子の存在が示唆される。

また、*RNF213* p.Arg4810Lys 変異が関係する疾患として、intracranial artery stenosis (ICAS) が知られている。これは、頭蓋内主幹動脈が狭窄する疾患であるが、*RNF213* p.Arg4810Lys 保因者の 50 人に 1 人が発症するとされている。当初内頸動脈終末部や中大脳動脈近位部の狭窄を伴う ICAS 患者と分類されていた者が、病期進行により MMD の表現型を呈することもあり、ICAS と MMD は密接な関わりがある。

本研究では、3 段階に分けて研究を行った：I) 既知の *RNF213* p.Arg4810Lys は臨床にどのような影響を及ぼすか II) *RNF213* 遺伝子上の他の rare variant (MAF < 1%) かつ in silico 解析上タンパク構造に機能的変化を及ぼすとされる damaging variant と臨床病型に関係はあるか III) MMD/ICAS の表現型に関わる *RNF213* 以外の遺伝的修飾因子は存在するか。

研究 I においては、当院および関連施設における MMD 患者 225 人を解析対象とし、*RNF213* p.Arg4810Lys の heterozygote (GA) 群 vs. wildtype (GG) 群での比較を行った。遺伝型は Sanger sequencing により同定。結果、GA 群は GG 群と比較して、MMD の早期発症（特に 25 歳以前）であり、および両側脳卒中（虚血・出血性イベント）のリスクを有することが明らかとなった。

研究 II においては、90 人の MMD 患者と 446 人の健常対照における rare かつ damaging と推測される variant (RDV) の保有数を調べ、MMD 患者特有の RDV がないか、そして case-control で個数差がないか解析した。各血液サンプルから抽出した DNA は whole-exome sequencing (WES) を経て遺伝型を確認した。また、compound heterozygosity (p.Arg4810Lys + 他の RDV, ないし異なる 2 つの RDV による) が疾患の発症・重症度と関与しているかにつ

いては phasing により推定した。その結果、MMD 患者 90 人において、RDV を持つのは 2 人のみであり、重症度と RDV の関連は認めなかった。また、*RNF213* p.Arg4810Lys を保有しない MMD 患者（研究 I における GG 群）においては、RDV の compound heterozygosity は認めなかった。そして、MMD 患者・健常対照を問わず、*RNF213* p.Arg4810Lys を持つ allele 上には RDV は存在しなかった。以上の結果は、c.14429G の周囲の領域の保存性が高いという過去の報告に一致しており、RDV は MMD における臨床病型（重症化するかどうか）への寄与は少ないと推測された。

研究 III においては、両側 MMD 患者 75 名・片側 MMD 15 名・ICAS 患者 37 名・健常対照 446 名を対照として、GWAS および gene-level test (SKAT/SKAT-O) を行った。Case-control 比較の GWAS, gene-level tests では有意に保有率に差がある locus は認めなかったが、両側 MMD 群とそれ以外の疾患群を比較した際に、SKAT, SKAT-O いずれにおいても、*PKHD1* が top hit の結果となった。*PKHD1* 遺伝子内で解析対象となった variant は p.Ile2364Asn と p.Ser3210Cys であったため、独立した 216 人のコホートにおいて Sanger sequencing で検証したところ、両側 MMD 群でこの 2 つの変異の保有率が高いことが判明した。公開されているマウスの脳血管・血管周囲細胞の single-cell RNA sequencing の data を用いて解析したところ、一部の血管内皮細胞のクラスターに有意に *Pkhd1* が発現していることがわかった。

研究 I では、*RNF213* c.14429G>A (p.Arg4810Lys) GA 群は、GG 群と比較して、MMD の早期発症（特に 25 歳以前）と両側脳卒中のリスクを有することが明らかとなった。これは臨床上の follow-up の方法を決める上で重要な事項であり、手術適応となる患者の予測や、高リスク群に対しての介入方法が考慮される結果となった。

研究 II・III では、MMD・ICAS における患者群内における表現型の差を生む遺伝的要素の解析を、WES を用いて行い、*PKHD1* が血管表現型の重症度と関連することが示唆された。また、*PKHD1* 上の変異は日本人に多いことも示された。*PKHD1* 変異は MMD/ICAS において、両側疾患となる確率を上げることに寄与していると想定される。これが疾患の表現型にどのように関わるかはさらなる研究が必要だが、MMD/ICAS の病態解明へに一步近づく結果となったと言える。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。