

博士論文（要約）

もやもや病の遺伝子解析

—*RNF213* と臨床像の関連解析・

重症度に関わる新規遺伝子の探索—

石神 大一郎

論文題目 もやもや病の遺伝子解析—*RNF213* と臨床像の関連解析・重症度に関わる新規遺伝子の探索—

氏名 石神 大一郎

【背景】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、これが MMD とどのように関与しているかについては不明点も多い。過去には *RNF213* の knock-out, knock-down, knock-in のいずれのモデルもマウスやゼブラフィッシュで作成されているが、いずれにおいても MMD のような表現型を得ることができていない。現在 *RNF213* と MMD の関与についての研究は、多くは臨床像の比較で行われている。p.Arg4810Lys の有無で重症度がどのように変わるかという研究のみならず、*RNF213* 遺伝子上の他の SNV がどのような臨床的意義を持つかなどの研究が多数行われているが、controversial な点も少なからずある。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 (有病率に基づいた場合)。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。

【目的】この度我々は、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。

【結果】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。

【考察】研究Ⅰは、この研究は本邦における最大の人数での研究であり、早期発症や両側脳卒中については新規性のある結果となった。*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。最近の研究報告論文では、中国からの大規模コホートにおける遺伝子型と表現型の相関について言及されているが、MMD 患者における *RNF213* hotspot variant の保有率は、中国と日本では大きく異なっており、遺伝的背景が異なることが示唆されている。日本では、2012 年の Miyatake らの報告以来、MMD 患者における遺伝子型と表現型の関連を確認した大規模な報告はない。また、我々のコホートにおける発症の定義は「虚血・出血のみ」であり、Miyatake らの報告における「頭痛・てんかん・意識消失も含む」ものとは異なっている。実際に手術適応を決める上で重要なのは虚血・出血であり、より臨床に則した定義であると考えられる。

*RNF213* hotspot の遺伝子型と両側の「血管狭窄」との関係については頻繁に議論されているが、両側の「症状」については議論されていない。今回の研究では、単変量解析と多変量解析の双方で、GA 群の患者は GG 群の患者よりも両半球で症状が出る可能性が高いことが

示された。注目すべきは、発症年齢が *RNF213* hotspot の遺伝型と有意に関連していたことである。これらの結果から、*RNF213* hotspot 遺伝型は、直接的にも間接的にも両側大脳半球の脳卒中と関連していることが示唆される。

研究IIでは、*RNF213* 遺伝子全体の RDV についての解析を行った。結果的に、MMD と重症度と RDV の関連・GG 群における RDV の compound heterozygosity は認めなかった。むしろ、MMD 患者・健常対照を問わず、*RNF213* c.14429G>A を持つ allele 上には RDV は存在しない傾向が分かった。これは hotspot variant の周囲配列の保存性が高いと考えられている既報に合致している。本研究では hotspot variant carrier でかつ RDV carrier である症例が非常に少なかったため、RDV の効果についての検証は不十分であるが、2/90 しか RDV carrier がいなかったことから、これらが表現型に関与している可能性は比較的低いと考えられる。

研究IIIにおいては、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。*PKHD1* は小児における常染色体劣性多発性嚢胞腎を起こす原因遺伝子として知られており、missense/truncating mutation に伴う loss of function により、腎臓・肝臓において嚢胞形成することで知られる。多発性嚢胞腎のより一般的な原因遺伝子である *PKD1*, *PKD2* と異なり、*PKHD1* については、脳血管での表現型について殆ど報告がない。最近になり *TSC1* or *TSC2* の変異が陰性の結節性硬化症の表現型を呈す患者において、*RNF213*, *PKHD1* の germline mutation を認めたという報告があった。*RNF213*, *PKHD1* の両方の遺伝子が同じ病態に関わる、ないしタンパク間作用が存在している可能性を示唆する重要な報告と考えている。

今回 discovery cohort, validation cohort で共に有意差があった 2 つの SNV のうち、p.Ser3210Cys については polycystic liver disease の表現型を呈している患者において報告が過去にある。今回我々が解析対象とした集団の中に、多発性嚢胞腎・多発肝嚢胞を指摘されている患者については記録の限りは存在しなかったが、そもそも精査されていないだけの可能性も十分あり、今後関連性を解析する必要はあると考えられる。また、今回 gene-level test では、ExAC における任意の population における MAF が 0.01 未満のものに限定していたが、疾患群において p.Ile2364Asn, p.Ser3210Cys のどちらかを保有しているものは約 15% と高い水準であった。この結果だけを見れば、この SNVs が疾患感受性変異であるようにも見えるが、ToMMo における日本人における allele frequency を調べるとどちらの変異の allele frequency も 0.05 程度であり、一般の population にも保有者は一定数いることになる。ExAC dataset や gnomAD dataset における Asian population においてはどちらも 0.003–0.005 程度の allele frequency であり、日本に多い変異であることもわかる。これはまさに、*RNF213* hotspot variant と同様であるという点も興味深い。*PKHD1* 遺伝子が MMD や ICAS の血管表現型の決定因子であるということを実証するためには、MMD 動物モデルが必要だが、これは現時点で作成できていないため検証が不可能であった。今後は MMD, ICAS 患者における血管内皮の mRNA 発現について探索し、*RNF213*, *PKHD1* の変異とどのような関係があるかを探る必要があると考えられる。