

博士論文

頭蓋内主幹動脈狭窄病変の遺伝的要因の解析

—もやもや病関連遺伝子 *RNF213* の解析—

宮脇 哲

頭蓋内主幹動脈狭窄病変の遺伝的要因の解析

— もやもや病関連遺伝子 *RNF213* の解析 —

脳神経外科学

齊藤 延人

宮脇 哲

## 目次

I. 要旨 .....	1
II. 序文 .....	2
A. 頭蓋内主幹動脈狭窄 .....	2
B. もやもや病とその原因遺伝子 .....	6
C. <i>Ring finger protein 213 (RNF213)</i> .....	9
D. もやもや病に関連する <i>RNF213</i> の遺伝子変異.....	10
E. もやもや病の表現型の多様性.....	10
F. 本研究の目的 .....	12
III. 方法 .....	14
A. 対象 .....	14
1. 対象 .....	14
2. 脳血管疾患の診断基準 .....	14
3. 倫理面への配慮 .....	20
B. 遺伝子変異解析 .....	21
1. 血液サンプル収集 .....	21
2. Genomic DNA 抽出 .....	21

3. <i>RNF213</i> c.14576G>A を含む領域 (exon 61) の polymerase chain reaction	
(PCR) 法による増幅、電気泳動 .....	22
4. PCR 産物の精製.....	24
5. Sanger sequence .....	24
C. 各疾患群－健常者群関連解析 .....	24
1. もやもや病群における <i>RNF213</i> c.14576G>A の解析および家族例の分析..	24
2. 各疾患群－健常者群関連解析.....	25
3. <i>RNF213</i> c.14576G>A を有する頭蓋内主幹動脈狭窄の臨床的特徴の検討	25
4. 統計解析.....	25
IV. 結果 .....	26
A. <i>RNF213</i> c.14576G>A の遺伝子解析.....	26
1. DNA 抽出の結果 .....	26
2. PCR の結果.....	26
3. Sanger sequence の結果 .....	28
B. もやもや病群における <i>RNF213</i> c.14576G>A の解析および家族例の分析 .....	28
1. もやもや病群における <i>RNF213</i> c.14576G>A の解析結果.....	28
2. もやもや病家族例の分析・検討 .....	30
C. 疾患群－健常者群関連解析.....	35

1. 患者背景および各疾患群における <i>RNF213</i> c.14576G>A 変異の頻度	35
2. 関連解析の結果	40
3. <i>RNF213</i> c.14576G>A を有する頭蓋内主幹動脈狭窄の臨床的特徴の検討	42
V. 考察	48
A. 本研究の意義	48
B. もやもや病の疾患概念のパラダイムシフト	50
C. アジア系集団における頭蓋内主幹動脈狭窄の遺伝的要因	51
D. 脳卒中のリスクアレル	52
E. 本研究の限界	53
F. 今後の研究	54
VI. 結語	56
VII. 謝辞	57
VIII. 引用文献	58

## I. 要旨

頭蓋内主幹動脈狭窄は虚血性脳卒中（脳梗塞）の主要な原因である。生活習慣等の後天的要因がその主たる原因と考えられている。本研究においては、頭蓋内主幹動脈狭窄に共通する遺伝的要因を同定した。それは頭蓋内主幹動脈の進行性狭窄を主たる病態とする特発性疾患である「もやもや病」の関連遺伝子として同定された *RNF213* という遺伝子のミスセンス変異であった (c.14576G>A, p. R4859K, rs112735431)。この *RNF213* の変異は、脳卒中のリスクアレルと考えられる。遺伝子診断により脳卒中リスクを評価することは、定期的な経過観察を通して予防医療の実施につながると考えられ、脳卒中診療における新たな「遺伝的診断に基づく予防医療」を確立できる可能性がある。

## II. 序文

### A. 頭蓋内主幹動脈狭窄

脳卒中は世界中で年間約 1500 万人が罹患していると報告されており世界的に主要な死因の 1 つであり、ひとたび発症すると重篤な身体の後遺機能障害をもたらす社会的にも強い影響のある疾患である<sup>1,2</sup>。

虚血性脳卒中（脳梗塞）の主要な原因の 1 つに頭蓋内主幹動脈狭窄が挙げられる。頭蓋内主幹動脈は、内頸動脈から前大脳動脈、中大脳動脈といった頭蓋内の主要な動脈の近位部の位置の血管を指す。脳梗塞の原因となった症候性の頭蓋内主幹動脈の高度狭窄病変では、薬物療法下においても年間 10～24%の高い脳梗塞の再発リスクを有していることが報告されている<sup>3-5</sup>。厚生労働省厚生科学研究費補助金（H11-健康-020）による脳卒中急性期患者データベースである脳卒中データバンクによれば、登録された虚血性脳卒中急性期患者 21094 例のうち、頭蓋内主幹動脈の中等度以上の狭窄（50%以上）あるいは閉塞所見が 5477 例（25.9%）に認められた<sup>6</sup>。日本の脳卒中の実態解明を目的とした大規模コホート研究である久保らの久山町研究によれば、脳梗塞の年間発症率（1988～2000 年）は 10 万人年当たり約 300 人とされている<sup>7</sup>。これを適用し日本の人口を 1 億 2500 万人とすると、1 年間に発症する脳梗塞は 37.5 万人で、そのうち中等度以上の頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する症例は 10 万人が該当すると考えられる。ま

た昨今の MRI・脳ドックの普及により偶発的に発見される無症候性の頭蓋内主幹動脈狭窄は増加してきている<sup>8,9</sup>。

頭蓋内主幹動脈狭窄の原因は様々あるが、最も多いものは後天的な要因によって生じるアテローム性動脈硬化である。その他に、頻度は下がるが、心原性塞栓症や動脈解離、血管炎や自己免疫性疾患そして特発性疾患のもやもや病などが挙げられる<sup>10,11</sup>。

頭蓋内に生じるアテローム性動脈硬化は頭蓋外に生じるものとの疫学の違いが報告されており、その病因の違いが示唆されている。例えば、頸部頸動脈に生じるアテローム性動脈硬化と冠動脈のアテローム性動脈硬化との合併に関する報告は多い<sup>12,13</sup>。一方で、頭蓋内動脈病変と冠動脈病変の合併は少ないとされている<sup>14,15</sup>。頭蓋内主幹動脈に生じるアテローム性動脈硬化はヨーロッパ系集団に比較して日本を始めとしたアジア系集団に多い発生を認めることが報告されており、その背景に遺伝的要因の存在が示唆されている<sup>16-18</sup>。

以上より、頭蓋内主幹動脈狭窄は日本を始めとしたアジア系集団において重要な脳梗塞の原因病変であり、その発症機序の解明・治療法の確立が切望されている。

頭蓋内主幹動脈狭窄の脳卒中発症の予防は、抗血小板剤などの薬物療法（内科的治療）やバイパス術やステント留置術などの外科的治療がある程度の効果



を示しているものの<sup>19-21</sup>、脳血流量・脳血管予備能が著しく低下した例においては虚血性脳卒中の発症リスクが非常に高く、ひとたび脳障害をきたすと重篤な後遺障害を残す結果となる<sup>22,23</sup>。

脳卒中の重篤性は中枢神経組織の不可逆的な虚血脆弱性に起因し、根本的な治療法が確立していないのが現状である。中枢神経組織、神経細胞の虚血脆弱性の分子生物学的・生理学的メカニズムの解明そして治療法の開発のため、当研究室グループにおいても分子レベルから動物レベルまで様々なレベルにおいて種々の脳卒中のモデル研究が行われてきた<sup>24-41</sup>。治療の面においては動物実験レベルで虚血神経細胞死に対して、神経成長因子投与による内在性の神経幹細胞賦活化による神経再生の研究も行われ一定の成果を上げている<sup>42-45</sup>。しかしながら、こうした長年にわたる継続した研究活動に関わらず、神経細胞の虚血脆弱性の全貌は明らかにされておらず、世界的にみても実際の臨床応用にまで至る治療法が確立していないのが実情である。

このように脳卒中の発症後の機能回復は困難を極め、未だ有効な治療法が確立しておらず、発症そのものを未然に防ぐ予防医療が非常に重要視される。脳卒中は喫煙や飲酒、肥満等の生活習慣、またそうした生活習慣に起因する高血圧や糖尿病、脂質異常症等の基礎疾患など、後天的な要因がその主たる危険因子と考えられている<sup>46</sup>。一方で、こうした従来から考えられている危険因子以

外にも未だ明らかとなっていない要因の存在が示唆されている<sup>47</sup>。その有力な候補として遺伝的な要因が挙げられる。脳卒中に関連する遺伝的要因が明らかとなれば脳卒中の正確なリスク評価につながり、より適切な予防医療につながれると考えられる。

脳卒中の遺伝的要因は、発症の地域による集団差や家系内発症などからこれまでも注目されてきた<sup>48,49</sup>。昨今の遺伝子解析技術の進歩は目覚ましく、全ゲノム領域に及ぶ関連解析が可能となり、脳卒中に特定の subtype に対する遺伝的リスクアレルが同定されてきている<sup>50,51</sup>。一例を挙げると、*paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2)* や *zinc finger homeobox 3 (ZFHX3)* と心原性脳塞栓症、*histone deacetylase 9 (HDAC9)*、9p21 locus や 6p21.1 locus とアテローム血栓症との関連などが報告されている<sup>52,53</sup>。しかしながら、こうした genome-wide association study (GWAS) から導き出された遺伝的リスクアレルの脳卒中発症に対する odds ratio は小さなもので、予測される遺伝的要因のほんの一部を構成するに過ぎないと考えられ、脳卒中に関わる遺伝的要因は未解明な部分が多くある。特に頭蓋内主幹動脈狭窄に関してはアジア系集団において多いという地域差からその遺伝的要因が示唆されており、日本においてはその解明が切望されている。

本研究においては頭蓋内主幹動脈狭窄の遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。その候補として、日本を始めとした東アジア系集団に多く発生を認める特発性の進行性の頭蓋内主幹動脈狭窄を主たる病態とする「もやもや病」の原因遺伝子に着目した。

## B. もやもや病とその原因遺伝子

もやもや病の主たる病態は、両側の内頸動脈終末部の慢性進行性狭窄であり、側副路として脳底部に発達・形成される異常血管網（もやもや血管）を特徴とする疾患である。当疾患は厚生労働省の定める難治性疾患克服研究事業、および特定疾患治療研究事業の対象疾患の1つである。

当疾患は、竹内、清水ら東京大学グループによって、内頸動脈に閉塞を認める疾患として1957年に初めて報告された<sup>54</sup>。また1965年には東京大学脳神経外科の初代教授の佐野圭司らによって初めて「脳と神経」という雑誌に特集が組まれた<sup>55</sup>。「もやもや病」という病名は、血管造影によって見える異常血管網がタバコの煙の「もやもや」とたちのぼる様子に似ていることからくるもので、東北大学のグループによって命名された。1969年に初めて「Moyamoya disease」という表現が論文で用いられ現在でも世界中で使用されている<sup>56</sup>。また、日本において開発された外科的な治療法の有効性が確立されている<sup>57</sup>。外科的治療

の目的は内頸動脈の進行性狭窄に伴う脳の低灌流を改善することにあり、頭蓋外の動脈である浅側頭動脈を頭蓋内の中大脳動脈に吻合する直接血行再建術に加え、側頭筋を有茎で脳表に接着し、血管新生そして血行再建を促す間接血行再建術の有効性も当研究室グループの先行研究により明らかにされてきている<sup>37, 58</sup>。

もやもや病は、日本において有病率は約1万人に1人である<sup>59, 60</sup>。男女比に関しては1:1.8と女性に多く、発症年齢は10歳未満に大きなピークと20歳代後半から40歳代にかけてゆるやかなピークがある<sup>60</sup>。小児期では脳虚血症状にて発症することがほとんどで、成人では脳虚血症状に加えて脳出血によって発症することもある<sup>61</sup>。また、もやもや病は約15%に家族歴が認められる。世界的に見ると、もやもや病はヨーロッパ系集団では少なく、日本、韓国および中国など東アジア系集団において頻度が高い疾患である。こうした地域による集団差や家族性発症の多さから、遺伝要因の関与が疑われてきた<sup>60</sup>。

もやもや病の原因遺伝子に関しては、2000年前後より原因遺伝子の探索が本格的に行われるようになった。連鎖解析によって3p24-26<sup>62</sup>、6q25<sup>63</sup>、8q23<sup>64</sup>、12p12-13<sup>64</sup>および17q25.3<sup>65-67</sup>が関与していることが報告されてきた。そして近年、もやもや病の感受性遺伝子の同定に関する報告が複数のグループから相次いでなされた。2つの別のグループ（東北大学のグループと京都大学のグループ）が

それぞれ異なる手法を用いて、17q25.3 に存在する *ring finger protein 213*

(*RNF213*; 本論文における reference sequence は National Center for Biotechnology Information Reference Sequence NM\_020914.4, NP\_065965.4 とする) が感受性遺伝子として同定された。

東北大学のグループは東アジア系集団におけるもやもや病の発症頻度が他の地域に比べて際立って高いことに着目し、この地域のもやもや病発症に創始者効果が関与している、という仮説のもと、孤発もやもや病患者 72 名と正常対象者 45 名を対象に 100 万個の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) のタイピングを行い、GWAS を行った。結果、17q25-ter の狭い領域に存在する多数の SNP ともやもや病の強い関連が認められ、さらにその領域の詳細な解析の結果、7 個の SNP からなるハプロタイプが強い関連を認め、それらは *RNF213* 内に存在していた。*RNF213* の全エクソン解析によって、1 つのミスセンス変異 (*RNF213* c.14576G>A, p.R4859K, rs112735431) がもやもや病患者の 71% で認められ、ハプロタイプ解析の結果と合わせて創始者変異と考えられ、*RNF213* が疾患感受性遺伝子として同定された<sup>68</sup>。

京都大学のグループは上記の東北大学のグループとは別のコホートにて複数の 3 世代続くもやもや病家系の連鎖解析によって、17q25.3 が疾患感受性領域であることを同定した<sup>65-67</sup>。続いて、比較的大きな 8 家系について、それぞれの家

系内のうち最も典型的なケースと思われる 8 名を選び、その 8 名に関して全ゲノム領域のエクソン解析を行った。その結果、8 名に共通するミスセンス変異が 1 つだけ同定された。その変異は東北大学のグループの同定したものと同じ、*RNF213* c.14576G>A (p.R4859K, rs112735431)であった。さらに詳細な検討の結果、*RNF213* が疾患感受性遺伝子として同定された<sup>69</sup>。

### C. *Ring finger protein 213 (RNF213)*

*RNF213* は 17 番染色体長腕に存在し 5256 のアミノ酸からなるタンパク質を code する遺伝子である<sup>68-70</sup>。*RNF213* のタンパク質は really interesting new gene (RING) finger ドメインと AAA ATPase ドメインを有しており、E3 ユビキチンリガーゼと ATP 分解機能を有する新しいタイプのタンパク質である<sup>68,69</sup>。E3 ユビキチンリガーゼは、いくつかのサブタイプがあるがタンパク質をユビキチン化しプロテアソームによる分解を促す酵素である。ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解は細胞周期やシグナル伝達、DNA 修復、転写制御などに関わることが知られている<sup>71</sup>。AAA ATPase は unfoldase としての機能を有し、タンパク質の修飾に関わる酵素である<sup>72</sup>。*RNF213* を zebrafish において発達期に発現を抑制すると頭蓋内の眼動脈や脊椎動脈の分岐に異常が出ることが示され、血管形成に関わる遺伝子であることが示唆されている<sup>69</sup>。さらなる分子生物学

的機能解析に関する報告もなされているが、現時点においては *RNF213* の血管形成そしてもやもや病発症における正確な機能は未だ明らかとなっていない<sup>73-75</sup>。

#### D. もやもや病に関連する *RNF213* の遺伝子変異

*RNF213* の多型の中でも、ただ 1 つのミスセンス変異が日本を始めとした東アジアの人種において、もやもや病（家族性、孤発性の両方）に強い関連があることが過去の報告から明らかとなっている<sup>68-70, 76, 77</sup>。その変異は、c.14576G>A, p.R4859K (rs112735431) である。この一塩基変異により *RNF213* の 4859 番目のアルギニンがリシンに変わるミスセンス変異である。日本人のもやもや病発症者の約 80%がこの変異を有していることが報告されている。ほとんどの発症者が heterozygous の変異を有しており、一部は homozygous の変異を有している。Homozygous の変異が重症化や低年齢での発症に関連しているという報告がある<sup>70</sup>。この変異は日本人の健常者においても 2%程度存在する<sup>78</sup>、一方でヨーロッパ系集団においてはこの変異はほとんど認められないという地域差が報告されている<sup>69, 78</sup>。すなわちこの変異の頻度の地域差が、アジア系集団にもやもや病の発症が多いという地域差を説明する遺伝的要因であると考えられている。

#### E. もやもや病の表現型の多様性

もやもや病には厳格な診断基準が存在する<sup>79,80</sup>。その根本をなすのは画像所見および除外診断である。簡潔にまとめると以下の3点を満たすことが条件である。

1. 内頸動脈の終末部の進行性の狭窄病変と側副血行路として的大脑基底核におけるもやもや血管の発達を認めること
2. その所見が両側に存在すること
3. 動脈狭窄を来す基礎疾患（染色体異常、遺伝性疾患、炎症性疾患、外傷、腫瘍、動脈硬化など）が存在しないこと

しかしながら、実際の臨床の場合においては、もやもや病を明確に診断することが困難な場合がある。特に高齢者においては、頭蓋内主幹動脈にある程度、動脈硬化性の変化を生じるため、高齢になって偶発的に発見された頭蓋内主幹動脈の狭窄・閉塞病変はもやもや病なのか、動脈硬化性に生じているのかの鑑別がしばしば困難である。

また、家族性に発症のもやもや病の家系内において、もやもや病の診断基準を満たさない、片側の病変や、中大脳動脈などの一部の頭蓋内主幹動脈の軽度の狭窄のみを呈する症例が存在することが報告されている<sup>67,69</sup>。こうした症例はもやもや病の家族歴という事実から考えれば、もやもや病と共通の entity と考えられる。すなわちこうした家族性もやもや病の分析からは、もやもや病とい



う疾患の持つ表現型のスペクトラムは現在の診断基準よりも広いスペクトラムを持つ可能性が示唆される。しかしながら、こうした診断基準を満たさない病変を有する症例は孤発的に発見されれば、もやもや病とは分類されず、多くの場合はアテローム性動脈硬化性の頭蓋内主幹動脈狭窄という診断となってしまう。

以上から、もやもや病および頭蓋内主幹動脈狭窄病変において、画像所見や基礎疾患による鑑別・明確な診断はしばしば困難であり、表現型によらない明確な診断基準が求められており、その共通する遺伝的要因による診断がその候補となりうると考える。本研究において、もやもや病の *RNF213* c.14576G>A 変異がもやもや病を含めた様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄の共通する遺伝的要因である、という仮説を立てた。

## F. 本研究の目的

本研究の目的は、頭蓋内主幹動脈狭窄の遺伝的要因を明らかにすることである。その候補として、日本を始めとした東アジア系集団に多く発生を認める特発性の進行性の頭蓋内主幹動脈狭窄を主たる病態とする「もやもや病」の感受性遺伝子に着目した。もやもや病関連遺伝子変異 *RNF213* c.14576G>A が、もやもや病の診断基準を満たさない様々な表現型の頭蓋内主幹動脈病変に関連する

という仮説を立てた。すなわち、*RNF213* c.14576G>A はこれまでは後天的要因がその発症の主たる原因と考えられてきたアテローム性動脈硬化病変を含めた様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄病変の遺伝的要因であると考えた。様々な脳血管疾患において、*RNF213* c.14576G>A の関連解析を行ない、この仮説を検証する方針とした。

### III. 方法

#### A. 対象

##### 1. 対象

2011年10月から2013年4月にかけて、東京大学医学部附属病院および関東脳神経外科病院にて外来および入院患者のうちで、研究の趣旨を説明し同意が得られた519人を対象とした。関東脳神経外科病院は埼玉県北部の脳卒中診療の中核病院である。東京大学医学部附属病院からは297名、関東脳神経外科病院からは222名の参加が得られた。

##### 2. 脳血管疾患の診断基準

脳血管疾患の診断は、magnetic resonance angiography (MRA)に基づいて行った。頭蓋内主幹動脈に狭窄性病変を呈している者はMRA所見および基礎疾患等の臨床情報に基づき3つの表現型に分類した。その3つは、もやもや病、片側もやもや病、アテローム性動脈硬化の頭蓋内主幹動脈狭窄（以下、頭蓋内狭窄）である。

もやもや病の診断基準は、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服事業もやもや病（ウイリス動脈輪閉塞症）における病態・治療に関する研究班の作成した「もやもや病（ウイリス動脈輪閉塞症）診断・治療ガイドライン」に基

づいて行った<sup>79,80</sup>。その詳細は表1に示す。簡単にまとめると以下の3点を満たすことが条件である。本研究においては、もやもや病確実例のみを「もやもや病」群に分類した。

1. 内頸動脈の終末部の進行性の狭窄病変と側副血行路として的大脑基底核におけるもやもや血管の発達を認めること
2. その所見が両側に存在すること
3. 動脈狭窄を来す基礎疾患（①動脈硬化、②自己免疫疾患、③髄膜炎、④脳腫瘍、⑤ダウン症候群、⑥レックリングハウゼン病、⑦頭部外傷、⑧頭部放射線照射後の脳血管病変、⑨その他）が存在しないこと

片側もやもや病は現在の診断基準からすると、もやもや病確実例とは区別される<sup>79,80</sup>。表2に片側もやもや病の定義を示した。片側もやもや病がもやもや病確実例の成因や遺伝的背景を共通とするかどうかは明らかとなっていない<sup>81-85</sup>。よって、本研究においては「片側もやもや病」群としてもやもや病確実例と別のグループに分類した。

もやもや病、片側もやもや病のいずれにも該当しないが、頭蓋内の主幹動脈に狭窄性病変を来しているものを「頭蓋内狭窄」群に分類した。この群に含まれる症例の大部分は、片側の頭蓋内主幹動脈（内頸動脈や中大脳動脈など）に部分的な狭窄・閉塞を認め、もやもや血管を認めない症例であった。大部分の

表 1. もやもや病の診断基準（文献 79、80 より引用）

<p>1. もやもや病の診断基準</p> <p>(1) 診断上、脳血管撮影は必須であり、少なくとも次の所見がある。</p> <p>① 頭蓋内内頸動脈終末部，前および中大脳動脈近位部に狭窄または閉塞がみられる。</p> <p>② その付近に異常血管網が動脈相においてみられる。</p> <p>③ ①と②の所見が両側性にある。</p> <p>(2) ただし、磁気共鳴画像（MRI）と磁気共鳴血管撮影（MRA）の所見が下記のすべての項目を満たしうる場合は脳血管撮影は省いてもよい。</p> <p>① MRA で頭蓋内内頸動脈終末部，前および中大脳動脈近位部に狭窄または閉塞がみられる。</p> <p>② MRA で大脳基底核部に異常血管網がみられる。</p> <p>注：MRI 上、大脳基底核部に少なくとも一側で 2 つ以上の明らかな flow void を認める場合、異常血管網と判定してよい。</p> <p>③ ①と②の所見が両側性にある。</p> <p>(3) もやもや病は原因不明の疾患であり、下記の基礎疾患に伴う類似の脳血管病変は除外する。①動脈硬化，②自己免疫疾患，③髄膜炎，④脳腫瘍，⑤ダウン症候群，⑥レックリングハウゼン病，⑦頭部外傷，⑧頭部放射線照射後の脳血管病変，⑨その他</p> <p>(4) 診断の参考となる病理学的所見</p> <p>① 内頸動脈終末部を中心とする動脈の内膜肥厚と，それによる内腔狭窄ないし閉塞が通常両側性に認められる。ときに肥厚内膜内に脂質沈着を伴うこともある。</p> <p>② 前大脳動脈，中大脳動脈，後大脳動脈などウイリス動脈輪を構成する動脈に，しばしば内膜の線維性肥厚，内弾性板の屈曲，中膜の菲薄化を伴う種々の程度の狭窄ないし閉塞が認められる。</p> <p>③ ウイリス動脈輪を中心として多数の小血管（穿通枝および吻合枝）がみられる。</p> <p>④ しばしば軟膜内に小血管の網状集合がみられる。</p> <p>2. 診断の判定</p> <p>1. (1) ～ (4) を参考として，下記のごとく分類する。なお脳血管撮影を行わず剖検を行ったものについては，(4) を参考として別途に検討する。</p> <p>確実例：(1) あるいは (2) のすべての条件および (3) を満たすもの。ただし，小児では一側に (1) あるいは (2) の①，②を満たし，他側の内頸動脈終末部付近にも狭窄の所見が明らかにあるものを含む。</p> <p>疑い例：(1) あるいは (2) および (3) のうち，(1) の③あるいは (2) の③の条件のみを満たさないもの。</p>
--

表 2. 片側もやもや病および類もやもや病の定義（文献 79、80 より引用）

<p>1. 片側もやもや病の定義</p> <p>もやもや病疑診例 (probable moyamoya disease) は、片側型もやもや病 (unilateral moyamoya disease) とも呼ばれ、片側の内頸動脈終末部に狭窄ないし閉塞をきたし、その周囲にもやもや血管の形成を伴うものを指す。</p> <p>このような片側性変化は、甲状腺機能亢進症、脳動静脈奇形、Down 症候群、Apert 症候群、von Recklinghausen 病、頭部放射線治療後、SLE、Sjögren 症候群など、もやもや病診断除外項目疾患にも合併することがあるため、これらの基礎疾患を有する場合は類もやもや病に分類し、片側型もやもや病には含めない。また小児例においては反対側内頸動脈終末部に狭窄性病変を認めた場合もやもや病確診例に含め、片側型もやもや病には含めない。</p> <p>2. 類もやもや病の定義</p> <p>類もやもや病とは基礎疾患に合併して内頸動脈終末部、前大脳動脈および中大脳動脈の近位部に狭窄または閉塞がみられ、異常血管網を伴うものをいう。片側性の病変であっても基礎疾患があれば、類もやもや病に含める。日本語名は「類もやもや病」とし、英語名は「quasimoyamoya disease」(「moyamoya syndrome」「akin moyamoya disease」と同義)とする。基礎疾患がない片側性のものはもやもや病疑診例とし、類もやもや病とは区別する。</p> <p>附記</p> <p>基礎疾患としては下記のような疾患が報告されている。動脈硬化、自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群、結節性動脈周囲炎、Sjögren 症候群)、髄膜炎、von Recklinghausen 病、脳腫瘍、Down 症候群、頭部外傷、放射線照射、甲状腺機能亢進症、狭頭症、Turner 症候群、Alagille 症候群、Williams 症候群、Noonan 症候群、Marfan 症候群、結節性硬化症、Hirschsprung 病、糖尿病 I 型、Prader-Willi 症候群、Wilms 腫瘍、一次性シュウ酸症、鎌状赤血球症、Fanconi 貧血、球状赤血球症、好酸球肉芽腫、2 型プラスミノーゲン異常症、レプトスピラ症、ピルビン酸キナーゼ欠損症、プロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症、線維筋性過形成症、骨形成不全症、多発性嚢胞腎、経口避妊薬、薬物中毒 (コカインなど)</p>
---

症例は比較的高齢で高血圧、糖尿病、高脂血症などの基礎疾患を有しており、画像上頭蓋内血管に動脈硬化性変化を伴っており、アテローム性動脈硬化による動脈狭窄病変と診断される症例であった。本研究において頭蓋内狭窄群には心原性脳塞栓症や動脈解離、血管炎、その他血管狭窄を来す基礎疾患を有しているものは含まれていない。なお、こうした血管狭窄をきたす基礎疾患を有し、画像上もやもや病あるいは片側もやもや病に合致する所見を呈するものは「類もやもや病」と定義され、もやもや病や片側もやもや病とも区別される（表2）<sup>81</sup>。本研究において、「類もやもや病」に該当する症例は、いずれの群にも含まれていない。

その他の疾患群は、「頸部頸動脈狭窄」群、「脳動脈瘤」群、「脳内出血」群、「健常者」群である。「頸部頸動脈狭窄」群には頸部の内頸動脈に狭窄あるいは閉塞を有する症例を分類した。「脳動脈瘤」群には頭蓋内主幹動脈に嚢状あるいは紡錘状の動脈瘤を認めた症例を分類した。「脳内出血」群には高血圧性脳内出血を呈した症例を分類した。この群においては、脳動静脈奇形など血管異常を伴うものは含まれず、頭蓋内主幹動脈に異常のない高血圧性脳内出血を対象とした。「健常者」群には、脳血管障害の既往がないものを分類した。その大部分が外傷やスクリーニング検査のためにMRIを施行し頭蓋内主幹動脈に狭窄性病変を有しない症例であった。

鑑別診断の概略と各群の構成を図 1 に示した。また各群代表的な画像所見を

図 2 に示した。

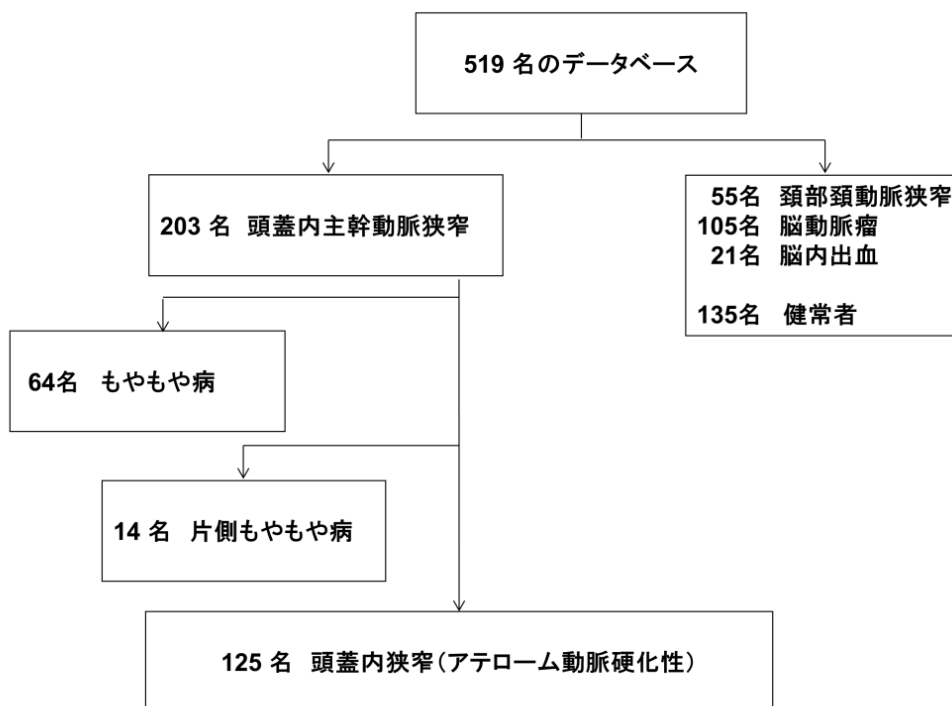


図 1. 各脳血管疾患群の鑑別診断の概略と構成

本論文の著者の発表論文「Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic Variant RNF213 c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. Stroke 2013 Oct(10):2894-7.」より Stroke 誌の許可を得て一部改変して引用。Promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile- device format is prohibited without the permission from the publisher Lippincott Williams & Wilkins. Please contact “journalpermissions@lww.com for further information”. Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the adapted version of figure.



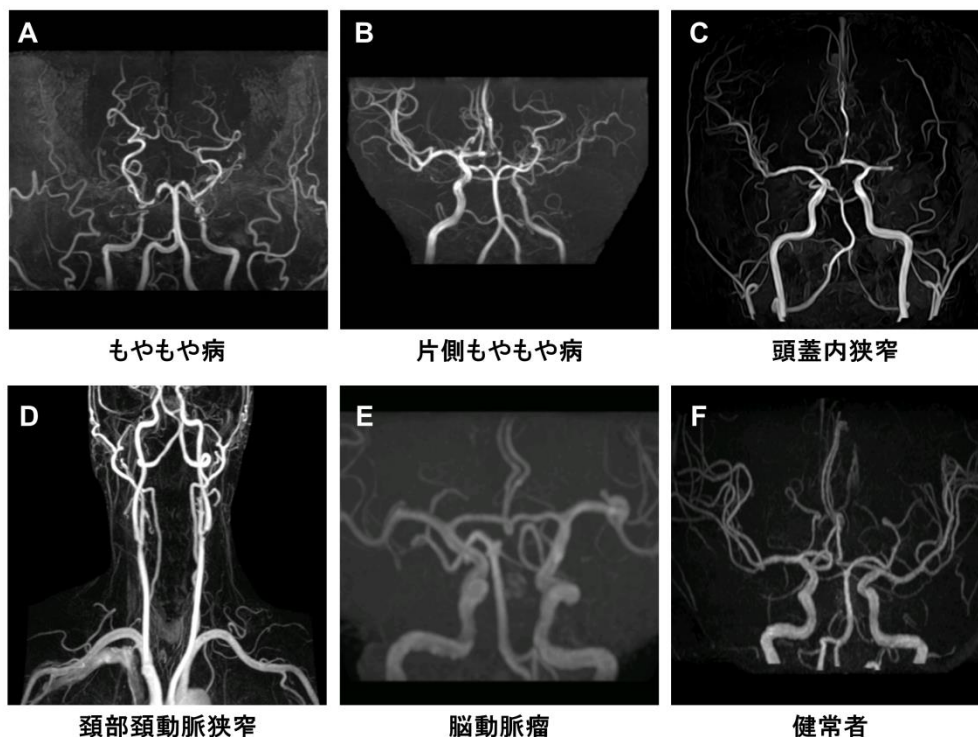


図 2. 各脳血管疾患群の代表的な MRA 所見  
 なお脳内出血群は頭蓋内主幹動脈には異常がないため提示していない。

### 3. 倫理面への配慮

本ヒトゲノム遺伝子解析研究に関して、すべての参加者に説明文書を用いて十分な説明の後、手書きの同意を得て採血を行い DNA 抽出・解析等を行った。また未成年者や成年でも十分な判断能力のない場合や意識のない場合は代諾者に、説明文書を用いて説明し、同意のもと被験者として参加していただいた。代諾者の候補としては、任意後見人、親権者、後見人や補佐人が定まっているときはその人とした。いないときは、提供者本人の配偶者、成人の子、父母、成人の兄弟姉妹もしくは孫、祖父母、同居の親族またはそれらの近親者に準ず

る人の中から関係者間で協議して選定してもらった。また、未成年者であっても、研究参加の決定に賛意（アセント）を表す事が出来る場合は、可能なかぎり、代諾者のインフォームド・コンセント以外に、本人のインフォームド・アセントを得るようにした。

本研究は東京大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得ている（承認日：平成 23 年 9 月 12 日 承認番号：3516）。また同様に関東脳神経外科病院の倫理委員会の承認も得ている（承認日：平成 24 年 6 月 23 日）。

## B. 遺伝子変異解析

### 1. 血液サンプル収集

本遺伝子解析研究の趣旨を説明し参加の同意を得られた患者さんに対して、静脈採血にて約 10 ml 採血を行い、EDTA 採血管に保存した。DNA 抽出を行うまでは 4°C で保存した。

### 2. Genomic DNA 抽出

SRL 社に依頼し Talent Srl 社の DNA Extraction Kit を用いて DNA 抽出を行った。一部は東京大学医学部脳神経外科の研究室において、QIAGEN 社の QIAamp DNA Blood Mini キットを用いてプロトコールに従って行った。抽出した DNA は 4°C に保存した。

3. *RNF213* c.14576G>A を含む領域 (exon 61) の polymerase chain reaction (PCR) 法による増幅、電気泳動

*RNF213* の遺伝子の構造 (既知のドメイン) および今回解析の対象にする遺伝子変異 c.14576G>A、p.R4859K (rs112735431) の遺伝子上の位置を図 3 に示す。変異は exon 61 に存在する<sup>68,69</sup>。

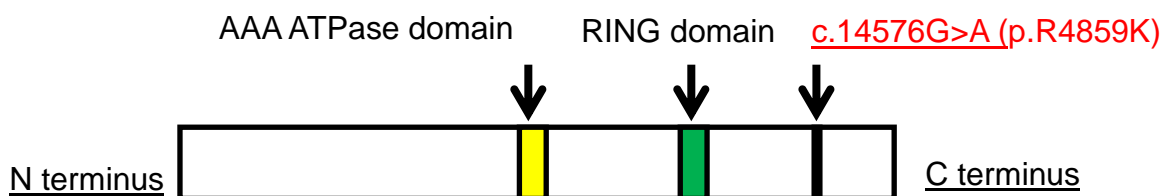
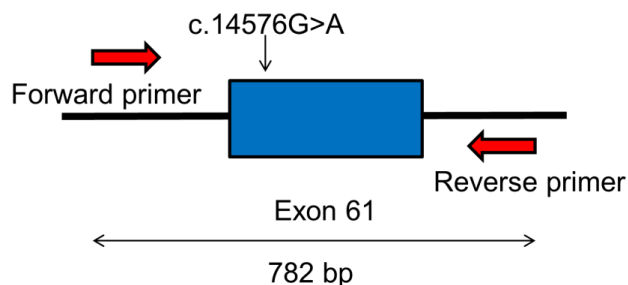


図 3. *RNF213* の遺伝子構造および c.14576G>A の位置

変異の検出はダイレクトシーケンスにて行う方針とした。そのための鋳型 DNA の増幅を PCR 法にて行った。*RNF213* c.14576G>A を含む forward と reverse の primer は過去の論文を参考に設計した<sup>69</sup>。Primer 設計および primer の配列は以下の通りである (図 4)。



Forward primer	CTGCATCACAGGAAATGACACTG
Reverse primer	TGACGAGAAGAGCTTTCAGACGA

図 4. Primer 設計および primer 配列

PCR 条件は以下の通りである。

○反応液組成

Double distilled water (DW)	1.6 $\mu$ l
dNTP mix (2 mM)	4 $\mu$ l
Buffer 2x	10 $\mu$ l
Primer forward (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer reverse (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
DNA polymerase (KOD FX Neo)	0.4 $\mu$ l
DNA template (total 50 ng)	2 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20 $\mu$ l

DNA polymerase は東洋紡社の KOD FX Neo ( $\alpha$  型 DNA polymerase) を使用した。

○PCR 条件

Pre-denaturation	94°C	2 minutes	1 cycle
<hr/>			
Denaturation	98°C	10 seconds	
Annealing	60°C	30 seconds	30 cycles
Extension	68°C	30 seconds	
<hr/>			
Final extension	68°C	1 minute	1 cycle
Soak	4°C	$\infty$	1 cycle

#### 4. PCR 産物の精製

PCR 産物は 1.5%アガロースゲルを用いて 20 分間電気泳動して、目的の大きさの band が検出されることを確認した。その後 band を切り出して、QIAGEN 社の Gel Purification Kit を用いてプロトコールに従って PCR 産物を精製した。

#### 5. Sanger sequence

Sanger sequence は FASMAC 社に依頼し、Applied Biosystems 社の Genetic Analyzer 3130xl あるいは DNA Analyzer 3730xl を用いて行った。Sequence 用の primer は PCR にて使用したものと同一のものを使用した。シーケンスの結果は Applied Biosystems 社の Sequence Scanner version 1.0 あるいは Blue Tractor Software Ltd 社の DNA Dynamo を使用した。

### C. 各疾患群—健常者群関連解析

#### 1. もやもや病群における *RNF213* c.14576G>A の解析および家族例の分析

まず、自験例のもやもや病症例において *RNF213* c.14576G>A の頻度を解析した。そして、もやもや病家系における表現型（発症の有無、画像所見）と *RNF213* c.14576G>A の遺伝子型について解析した。

## 2. 各疾患群－健常者群関連解析

次に、様々な脳血管疾患グループと遺伝子多型 *RNF213* c.14576G>A との関連を解析し、もやもや病以外の表現型の脳血管疾患との関連を検証した。

## 3. *RNF213* c.14576G>A を有する頭蓋内主幹動脈狭窄の臨床的特徴の検討

もやもや病において *RNF213* c.14576G>A 変異と発症年齢の関連が報告されており<sup>70</sup>、本研究においても頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する3つの群（もやもや病、片側もやもや病、頭蓋内狭窄）において発症年齢との関連を検証した。

## 4. 統計解析

*RNF213* c.14576G>A が各疾患群および健常者群で Hardy-Weinberg 平衡に適合しているかどうかは Pearson chi-square test を用いて検定した。*RNF213* c.14576G>A の表現型間での頻度の違いは Fisher's exact test を用いて検定した。発症年齢（正規分布しない連続変数）の比較に関しては Mann-Whitney U test と Kruskal-Wallis test を用いて検定した。すべての解析は JMP Pro version 10.0.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC)を用いておこなった。 $p$  値  $< 0.05$  を統計学的に有意とした。

## IV. 結果

### A. *RNF213* c.14576G>A の遺伝子解析

#### 1. DNA 抽出の結果

DNA 抽出の結果、SRL 社に依頼したものは概ね、200 ng/μl 前後、QIAGEN 社の QIAamp DNA Blood Mini キットで抽出したものは 30 ng/μl 前後であった。260 nm/280 nm 吸光度比は 1.9 前後で純度に問題がないことを確認した。また抽出 DNA を電気泳動にてバンドのパターンを確認し、degradation など問題ないことを確認した (図 5)。

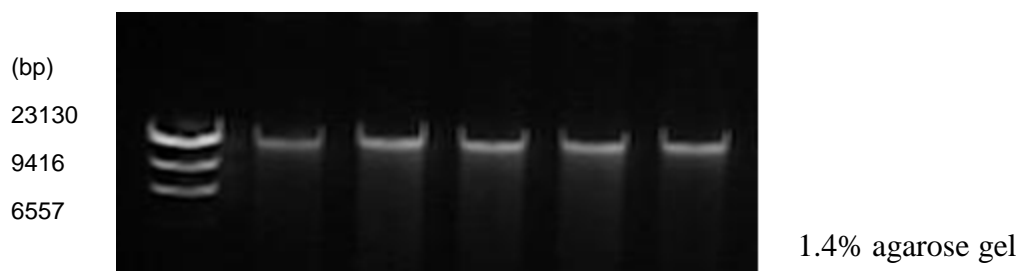


図 5. 抽出した DNA の電気泳動のバンドパターンの一例。マーカは  $\lambda$ /HindIII (TOYOBO 社)。Degradation などなく、バンドパターンに問題がないことが確認される。

#### 2. PCR の結果

PCR 産物の電気泳動の結果を図 6 に示す。目的の長さ (782 bp) の産物が生成されていることを確認した。また degradation 等なく、バンドパターンに問題がな

いことを確認した。そのバンドを切り出して、QIAGEN 社の Gel Purification Kit を用いて精製した。生成した PCR 産物の一部を再度電気泳動し、バンドの大きさ・パターンに問題がないことを確認した (図 7)。

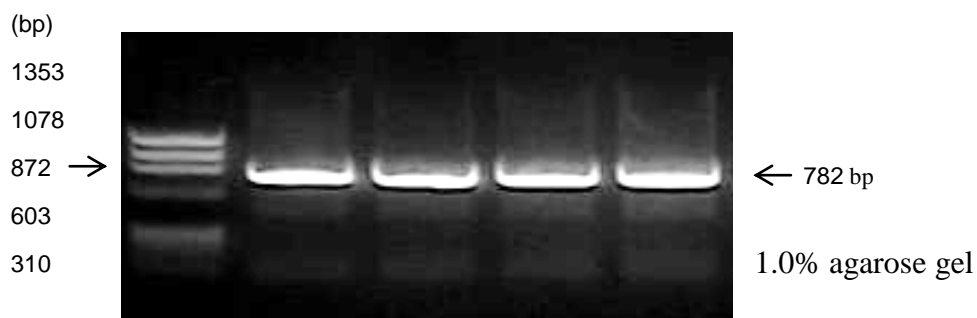


図 6. PCR 産物の電気泳動のバンドパターンの一例。マーカーは  $\phi$ X174/HaeIII digest (TOYOBO 社)。目的の大きさ (782 bp) の PCR 産物が生成されていることが確認される。Degradation などなく、バンドパターンに問題がないことが確認される。

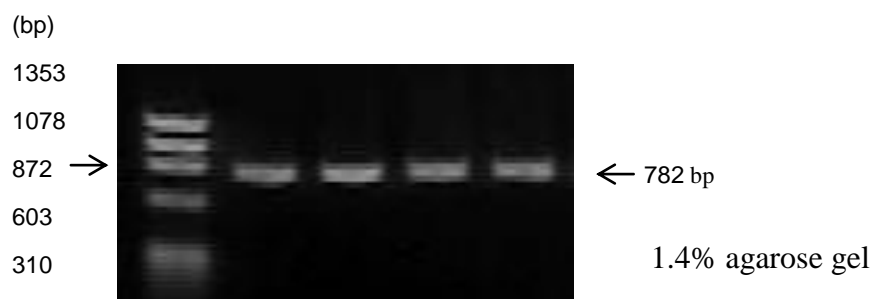


図 7. PCR 産物精製後の電気泳動のバンドパターンの一例。マーカーは  $\phi$ X174/HaeIII digest (TOYOBO 社)。目的の大きさのバンド (782 bp) が検出され、degradation などなく、バンドパターンに問題がないことが確認される。



### 3. Sanger sequence の結果

Sanger sequence のデータを Blue Tractor Software Ltd 社の DNA Dynamo によって解析した結果 (クロマトグラム) の 1 例を図 8 に示す。変異は forward, reverse 両側からの sequence で一致して検出された。今回シーケンスした範囲においては、c.14576G>A 以外の変異は認められず、また PCR エラーと考えられる配列異常も認められなかった。

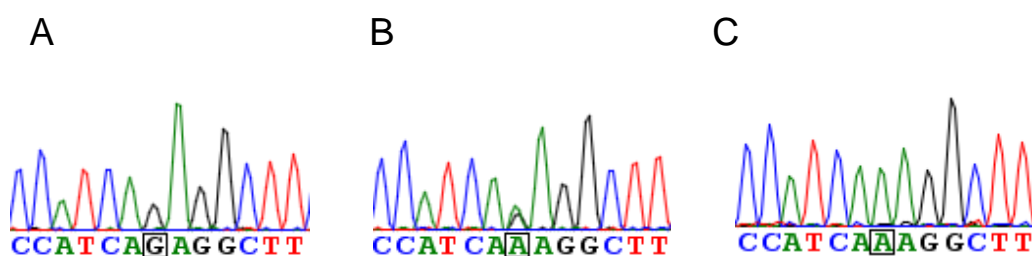


図 8. Sanger sequence の結果 (クロマトグラフ)。□で示した塩基が c.14576G>A の位置である。A が wild type (G/G)、B が heterozygote (A/G)、C が homozygote (A/A)の結果である。

#### B. もやもや病群における RNF213 c.14576G>A の解析および家族例の分析

##### 1. もやもや病群における RNF213 c.14576G>A の解析結果

我々の施設において、もやもや病群および健常者群における RNF213 c.14576G>A の頻度を表 3 に示す。もやもや病群における変異の頻度 (heterozygote

A/G + homozygote A/A) は 82.8% (64 人中 53 人) であり、健常者群においても 1.5% (135 人中 2 人) において変異を認めた。

表 3. もやもや病群および健常者群における *RNF213* c.14576G>A の頻度

	Definite MMD	Control
No. of patients	64	135
Genotype, n (%)		
Wild type: G/G	11 (17.2)	133 (98.5)
Heterozygous: A/G	51 (79.7)	2 (1.5)
Homozygous: A/A	2 (3.1)	0 (0)
Allele, n (%)		
G	73 (57.0)	268 (99.3)
A	55 (43.0)	2 (0.7)
HWE ( <i>p</i> value)	No (0.0001)	Yes (0.94)

MMD indicates moyamoya disease (もやもや病) ; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

関連解析の結果を表 4 に示す。*RNF213* c.14576G>A 変異は健常者群と比較してもやもや病群と統計学的に有意な関連を認めた ( $p < 0.0001$ , odds ratio 320.4, 95% CI 68.6 – 1494.4)。*RNF213* c.14576G>A 変異が有意な関連を有する遺伝子変異であることが確認された。

表 4. もやもや病群における *RNF213* c.14576G>A 変異 (A/G + A/A) の関連解析

c.14576G>A, (A/G+A/A)/n (%)		P value	Odds ratio	95% CI
Definite MMD	Control			
53/64 (82.8)	2/135 (1.5)	<0.0001	320.4	68.6–1494.4

MMD indicates moyamoya disease (もやもや病) ; CI, confidence interval.

## 2. もやもや病家族例の分析・検討

本研究において得られた家族性のもやもや病の家系図の一覧は図 9 の通りである。表現型 (画像所見) と *RNF213* c.14576G>A の遺伝型の関係を示した。画像情報と遺伝情報は完全ではないが、本研究において家族性のもやもや病家系の発症者はすべて *RNF213* c.14576G>A を有していた。もやもや病の家系内には、もやもや病の診断基準には該当しない片側もやもや病や、頭蓋内狭窄が少なからず存在する。これは過去の報告からも言われていることであるが、本研究においてもそれが確認された。もやもや病、あるいは *RNF213* c.14576G>A 変異は広いスペクトラムの表現型をきたすことが示唆される。

さらに特徴的な家系 2 例 (図 9 の家系 1 および 10) に関して臨床情報を詳細に検討した。

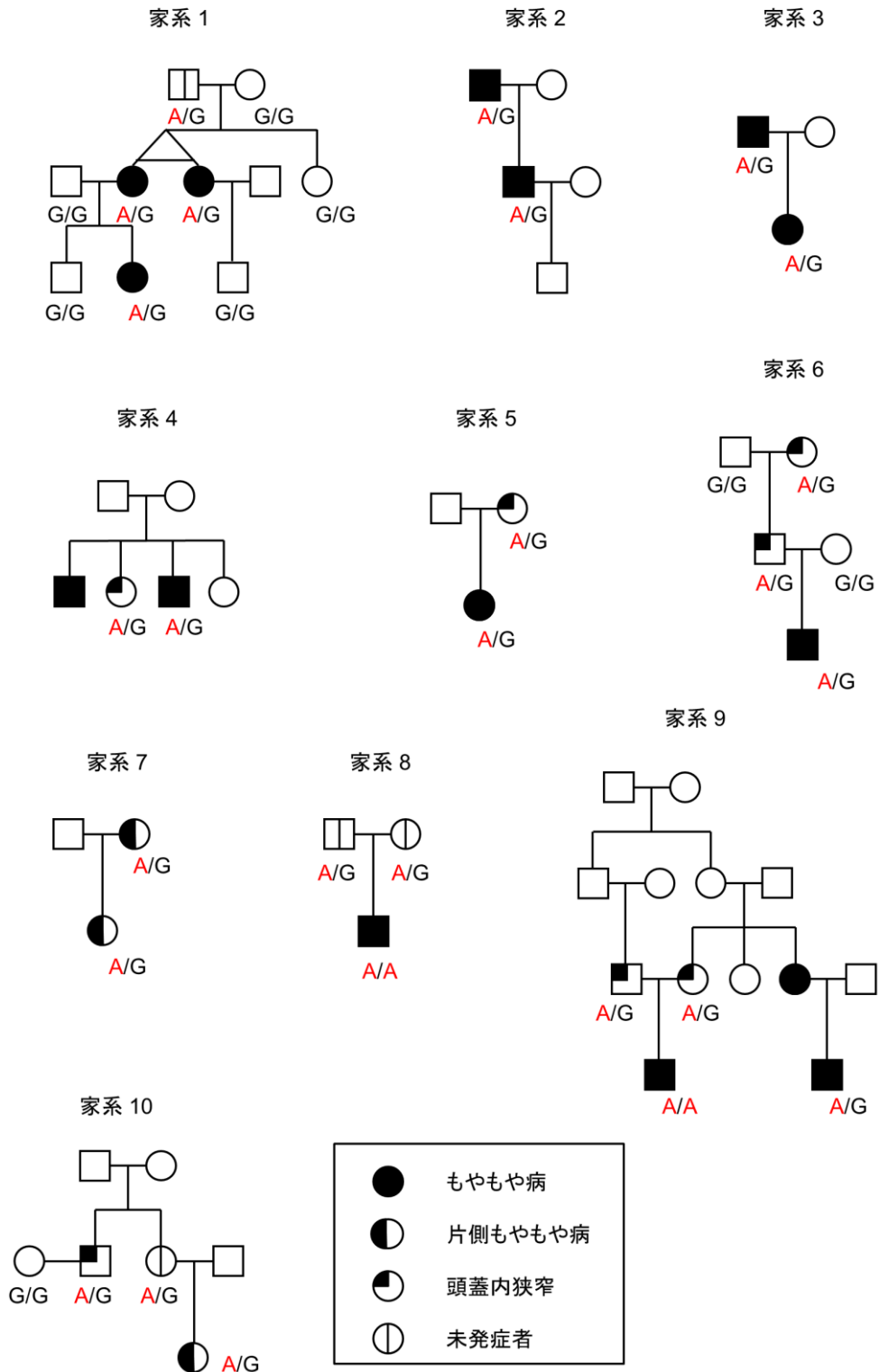


図 9. 家族性もやもや病の家系図および遺伝子型。G/G は *RNF213* c.14576G>A wild type、A/G は heterozygote、A/A は homozygote を示す。

家系 1 は一卵性双生児を含めた家族性に発症者を認めるもやもや病の家族例である (図 10)。発症者の 3 人はすべて *RNF213* c.14576G>A 変異を有していた。この家系の変異の発端者は I-1 であったが、I-1 は MRA 上頭蓋内主幹動脈に明らかな狭窄病変は認めず、変異を有していても発症しないことが確認された。発症者に関しても、*RNF213* c.14576G>A という共通の変異を有していても発症年齢等の臨床像には違いがあり、この変異以外に発症・表現型に影響を与える因子の存在が想定される。また、その他の者に関して、すべては画像検査を施行しているわけではないが、少なくとも脳虚血症状を呈する症候性のもやもや病あるいは頭蓋内狭窄は発症していない。すなわち家系内において *RNF213* c.14576G>A 変異の wild type の者は、もやもや病を含めた頭蓋内狭窄の発症リスクは低いと言える。

家系 10 は診断基準上は、もやもや病に該当しない、頭蓋内狭窄および片側もやもや病の家族例である (図 11)。II-2 が最初に一過性の脳虚血発作にて発症した。高齢であることや虚血性心疾患を含めた既往歴、画像上頭蓋内主幹動脈に動脈硬化性の変化が強いことから、当初はアテローム性動脈硬化の頭蓋内狭窄と診断され、血行再建術が施行された。III-1 は脳虚血症状にて発症し、画像所見と基礎疾患がほとんどないことや比較的若年の発症であることから、片側もやもや病と診断された。遺伝子解析の結果、両者とも *RNF213* c.14576G>A 変

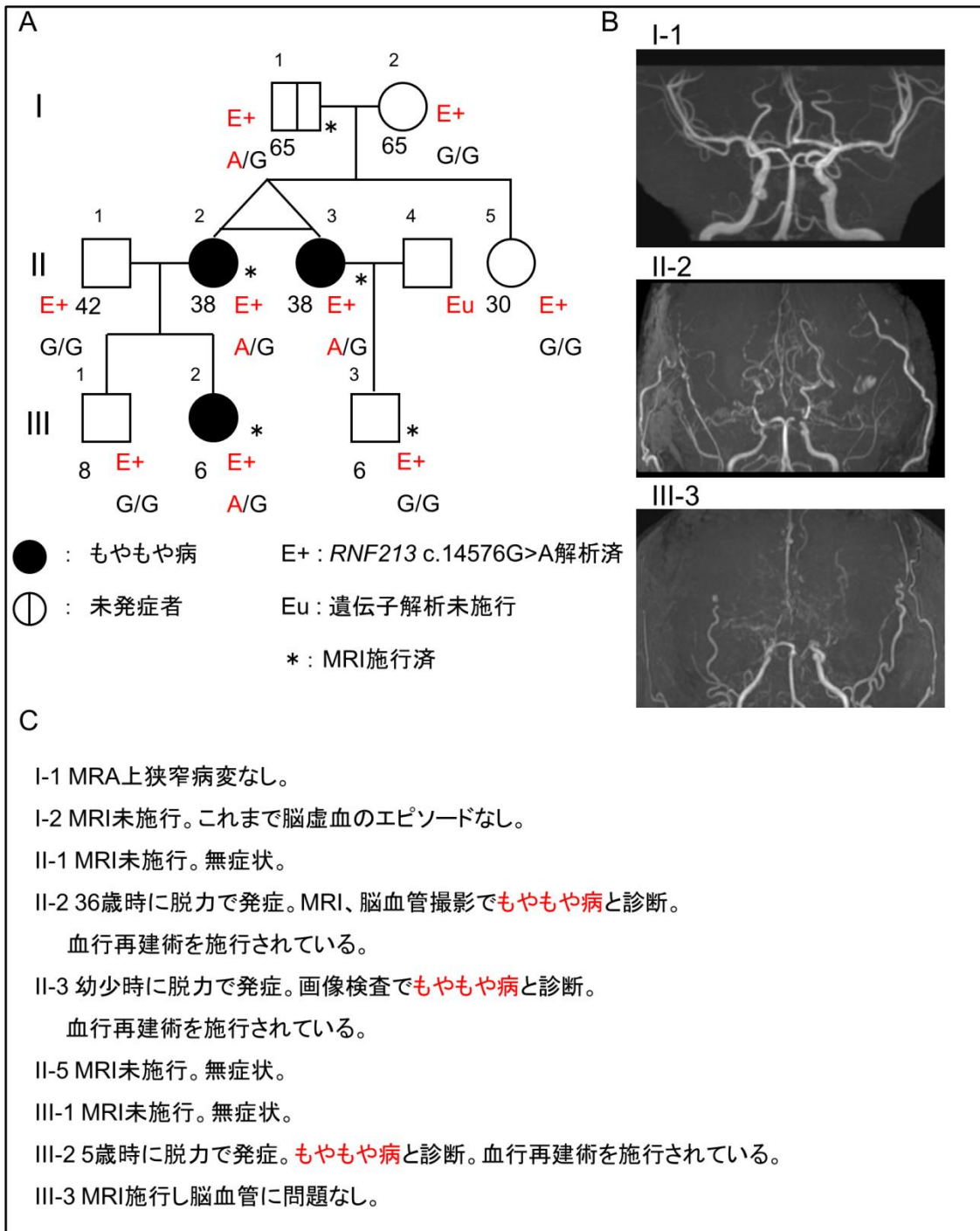


図 10. 家系 1 の詳細な臨床情報および画像所見（家系図内の年齢は遺伝子診断時の年齢）。A: 家系図。B: MRI 所見。C: 臨床情報。

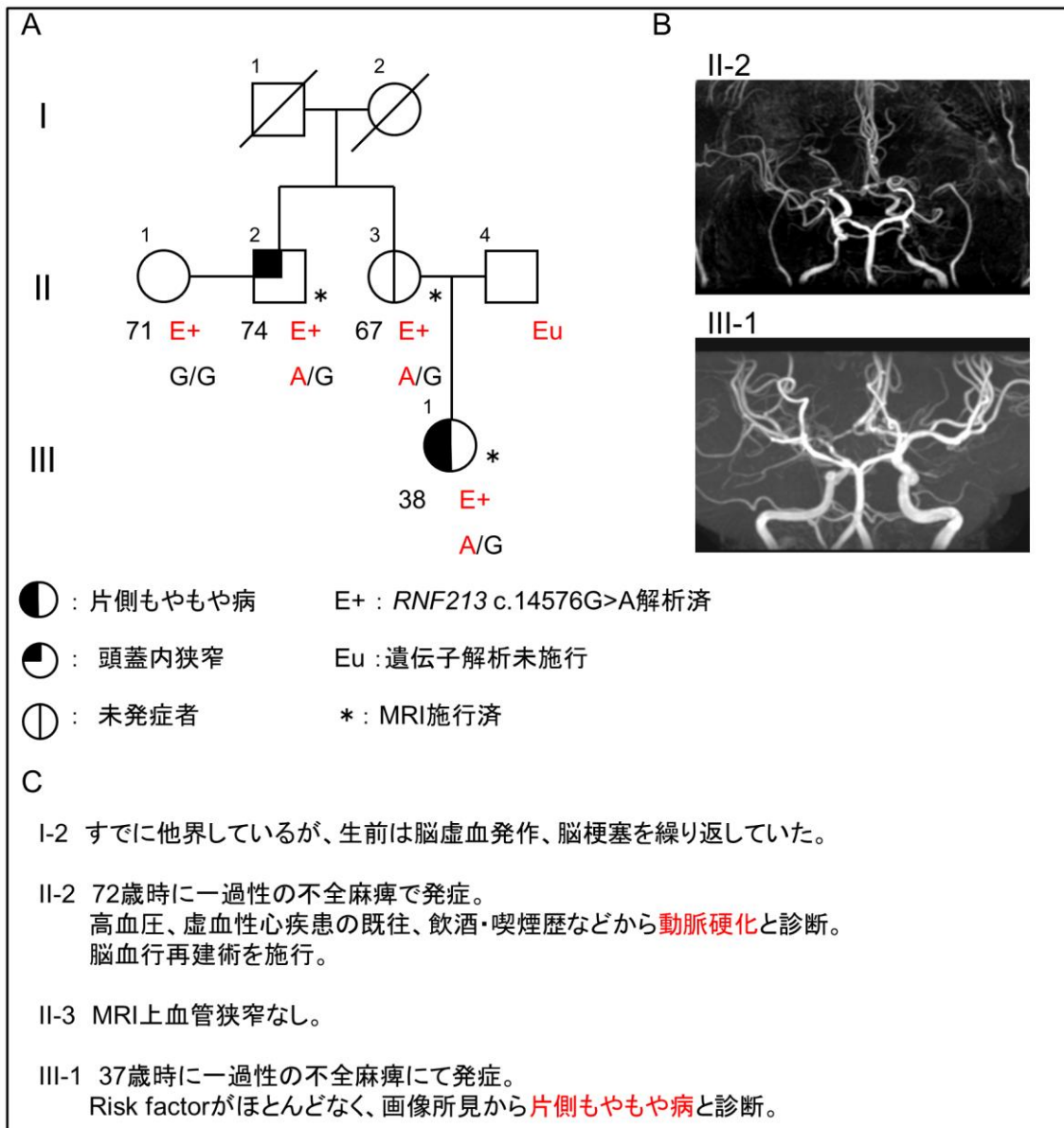


図 11. 家系 10 の詳細な臨床情報および画像所見 (家系図内の年齢は遺伝子診断時の年齢)。A : 家系図。B : MRI 所見。C : 臨床情報。

異を有しており、共通の遺伝的背景を持つことが明らかになった。なお、II-3 に関しては画像検査にて頭蓋内狭窄は認められず、未発症者と考えられる。

この家系は示唆に富む症例である。加齢に伴って多くの場合、高血圧等の動脈硬化の危険因子を有するようになり、また頭蓋内の血管も動脈硬化性の変化を伴うようになる。もともと、もやもや病あるいは *RNF213* c.14576G>A 変異という遺伝的背景を持って頭蓋内狭窄を呈しているが、加齢に伴って動脈硬化性の変化が加わった場合、画像所見だけでは純粋に後天的な要因による動脈硬化による病変なのか、*RNF213* c.14576G>A 変異という先天的要因を持っているかは判別が難しい。

こうした症例は、これまでも画像所見上はアテローム性動脈硬化性の頭蓋内狭窄と考えられてきたもののなかに *RNF213* c.14576G>A 変異を背景にもつものが少なからず存在するという仮説を支持するものである。続いて、様々な脳血管疾患における *RNF213* c.14576G>A 変異の関連解析を施行した。

## C. 疾患群－健常者群関連解析

### 1. 患者背景および各疾患群における *RNF213* c.14576G>A 変異の頻度

各群の患者背景情報（採血時の年齢や性別、基礎疾患など）を表 5 に示した。

年齢は頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する 3 つの群のうち、もやもや病群、片側もや



もや病群、頭蓋内狭窄群の順に低い傾向にあった。性別に関しては、もやもや病群・片側もやもや病群は女性の頻度が高い傾向にあったのに対して、頭蓋内狭窄群においては男性が多い傾向にあった。

基礎疾患に関しては、後天性疾患と考えられる、頭蓋内狭窄群、脳動脈瘤群、頸部頸動脈狭窄群、脳内出血群は、もやもや病群・片側もやもや病群と比較して高い頻度で基礎疾患を合併している傾向にあった。

各群における *RNF213* c.14576G>A 変異の頻度を表 6 に示した。*RNF213* c.14576G>A は、先に提示したように、もやもや病群で 82.8% (53/64; 51 heterozygote, 2 homozygote) の頻度で認められた。一方で、片側もやもや病群で 57.1% (8/14; 8 heterozygote)、頭蓋内狭窄群で 23.2% (29/125; 28 heterozygote, 1 homozygote) の頻度で認められた。その他の群については、頸動脈狭窄群においては 1.8% (1/55; 1 heterozygote)、脳動脈瘤群では 1.0% (1/105; 1 heterozygote)、脳内出血群では 0% (0/21)、健常者群では 1.5% (2/135) という結果であり、ほとんど変異を認めなかった。

なおもやもや病群を除いて、その他の群全てにおいて *RNF213* c.14576G>A の頻度は Hardy-Weinberg 平衡に適合しており、得られた集団データには大きな問題がないものと考えられた。

表 5. 患者背景と臨床的特徴

Characteristics	All patients	Definite MMD	Unilateral MMD	NonMMD ICASO	ECAS	Cerebral aneurysm	ICH	Control
No. of patients	519	64	14	125	55	105	21	135
Age, y								
Mean±SD	55.4±16.8	47.6±18.9	48.6±14.1	61.7±12.1	68.8±8.6	63.8±10.4	60.5±11.6	41.1 ± 15.0
Range	6–93	6–85	26–71	16–86	38–83	35–93	31–79	8–90
Female, n (%)	275 (52.9)	42 (65.6)	12 (85.7)	51 (40.8)	7 (12.7)	68 (64.7)	4 (19.0)	91 (67.4)
Conventional risk factors, n (%)								
Hypertension	226 (43.5)	20 (31.2)	2 (14.2)	77 (61.6)	42 (76.3)	61 (58.0)	21 (100)	3 (2.2)
Diabetes	69 (13.2)	4 (6.2)	0 (0)	33 (26.4)	18 (32.7)	12 (11.4)	2 (9.5)	0 (0)
Dyslipidemia	103 (19.8)	6 (9.3)	2 (14.2)	42 (33.6)	21 (38.1)	20 (19.0)	8 (3.8)	4 (2.9)
Ischemic heart disease	26 (5.0)	1 (1.5)	0 (0)	11 (8.8)	8 (14.5)	4 (3.8)	1 (4.7)	1 (0.7)
Smoking	105 (20.2)	5 (7.8)	1 (7.1)	32 (25.6)	34 (61.8)	25 (23.8)	5 (2.3)	3 (2.2)
Alcohol	74 (14.2)	5 (7.8)	1 (7.1)	18 (14.4)	23 (41.8)	18 (17.1)	6 (2.8)	3 (2.2)

MMD indicates moyamoya disease (もやもや病); NonMMD ICASO, non-moyamoya disease intracranial major artery stenosis/occlusion (頭蓋内狭窄); ECAS, extracranial carotid atherosclerosis (頸部頸動脈狭窄); ICH, intracerebral hemorrhage (脳内出血); SD, standard deviation.

本論文の著者の発表論文「Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic Variant RNF213 c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. *Stroke* 2013 Oct(10):2894-7.」より *Stroke* 誌の許可を得て一部改変して引用。Promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile- device format is prohibited without the permission from the publisher Lippincott Williams & Wilkins. Please contact “journalpermissions@lww.com for further information”. Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the adapted version of figure.

表 6. 患者背景および各疾患群における *RNF213* c.14576G>A の変異の頻度

c.14576G>A genotype	All patients	Definite MMD	Unilateral MMD	NonMMD ICASO	ECAS	Cerebral aneurysm	ICH	Control
No. of patients	519	64	14	125	55	105	21	135
Genotype, n (%)								
Wild type: G/G	425 (81.9)	11 (17.2)	6 (42.9)	96 (76.8)	54 (98.2)	104(99.0)	21 (100)	133 (98.5)
Heterozygous: A/G	91 (17.5)	51 (79.7)	8 (57.1)	28 (22.4)	1 (1.8)	1 (1.0)	0 (0)	2 (1.5)
Homozygous A/A	3 (0.6)	2 (3.1)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Allele, n (%)								
G	941 (90.7)	73 (57.0)	22 (78.6)	220 (88.0)	109 (92.7)	209 (99.5)	42 (100)	268 (99.3)
A	97 (9.3)	55 (43.0)	8 (21.4)	30 (12.0)	1 (7.3)	1 (0.5)	0 (0)	2 (0.7)
HWE ( <i>p</i> value)	Yes (0.85)	No (0.0001)	Yes (0.33)	Yes (0.82)	Yes (0.99)	Yes (0.95)	-	Yes (0.94)

MMD indicates moyamoya disease (もやもや病) ; NonMMD ICASO, non-moyamoya disease intracranial major artery stenosis/occlusion (頭蓋内狭窄) ; ECAS, extracranial carotid atherosclerosis (頸部頸動脈狭窄) ; ICH, intracerebral hemorrhage (脳内出血) ; HWE; Hardy-Weinberg equilibrium.

本論文の著者の発表論文「Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic Variant *RNF213* c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. *Stroke* 2013 Oct(10):2894-7.」より *Stroke* 誌の許可を得て一部改変して引用。Promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile- device format is prohibited without the permission from the publisher Lippincott Williams & Wilkins. Please contact “journalpermissions@lww.com for further information”. Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the adapted version of figure.

頭蓋内狭窄群の中で *RNF213* c.14576G>A 変異を有した症例の MRA の例を図 12 に示した。これらの症例は、大部分が片側の内頸動脈あるいは中大脳動脈の軽度から高度の狭窄を呈しており、大脳基底部に側副血行路としてのもやもや血管の発達を認めない症例であった。概して比較的高齢で、高血圧・糖尿病・脂質異常症などの動脈硬化のリスクファクターを有しており、アテローム性動脈硬化の頭蓋内主幹動脈狭窄と診断される症例であった。

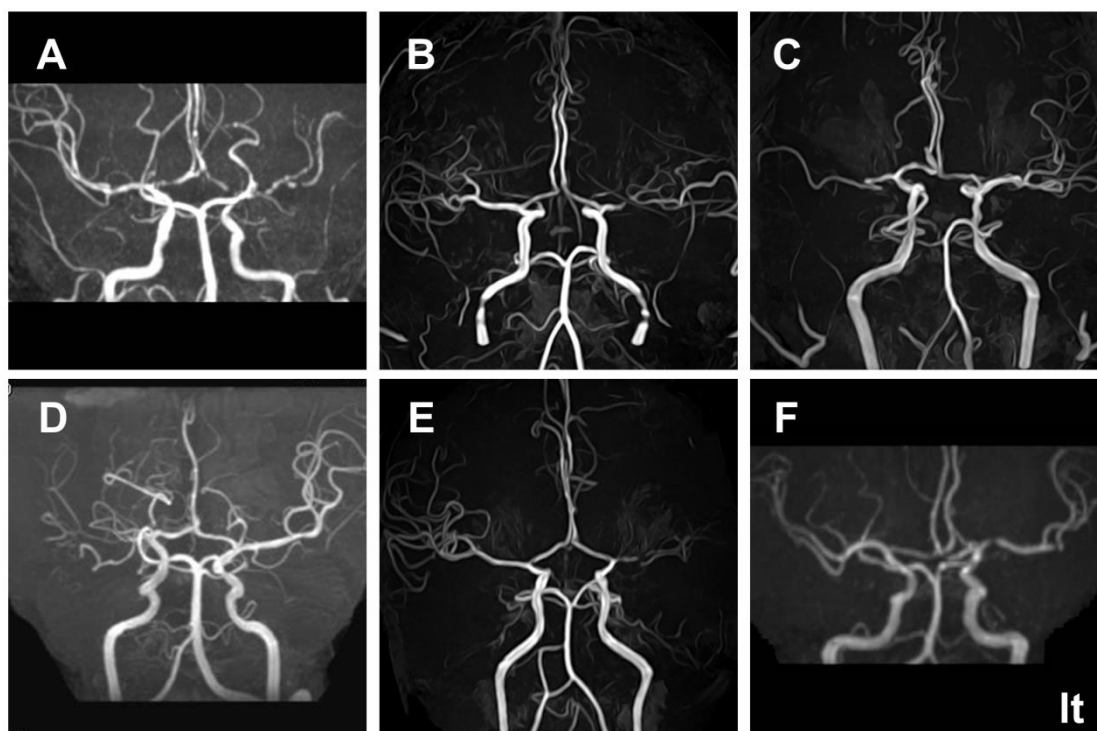


図 12. 頭蓋内狭窄群の中で *RNF213* c.14576G>A 変異を有した症例の MRA の例。A: Case 1, 43 歳男性。左中大脳動脈 M1 segment の中等度狭窄。B: Case 2, 63 歳女性。左 M1 の部分的な高度狭窄。C: Case 3, 52 歳女性。左 M1 の部分的な高度狭窄。D: Case 4, 65 歳男性。右 M1 の閉塞。E: Case 5, 52 歳女性。左 M1 の部分的な高度狭窄。F: Case 6, 68 歳女性。左 M1 の部分的な軽度狭窄。

本論文の著者の発表論文「Miyawaki S, Imai H, Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Saito N. Identification of a genetic variant common to moyamoya disease and intracranial major artery

stenosis/occlusion. Stroke 2012 Dec;43(12):3371-4.」および「Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic Variant RNF213 c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. Stroke 2013 Oct(10):2894-7.」より Stroke 誌の許可を得て一部改変して引用。Promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile- device format is prohibited without the permission from the publisher Lippincott Williams & Wilkins. Please contact “journalpermissions@lww.com for further information”. Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the adapted version of figure.

## 2. 関連解析の結果

関連解析の結果を表 7 に示す。先に提示した通り、従来の報告通り、*RNF213* c.14576G>A はもやもや病群と有意に関連することが示された ( $p < 0.0001$ , odds ratio 320.4, 95% CI 68.6-1494.4)。また、片側もやもや病群 ( $p < 0.0001$ , odds ratio 88.6, 95% CI 15.3-511.3) や頭蓋内狭窄群 ( $p < 0.0001$ , odds ratio 20.0, 95% CI 4.68-86.2) とも有意な関連が示された。一方その他の群 (頸部頸動脈狭窄群、脳動脈瘤群、脳内出血群) とは有意な関連は認められなかった。

以上より *RNF213* c.14576G>A は様々な程度の表現型の頭蓋内主幹動脈狭窄病変と関連することが明らかとなった。

表 7. *RNF213* c.14576G>A 変異の各疾患群における頻度と各疾患群－健常者群関連解析の結果

	Definite MMD	Unilateral MMD	NonMMD ICASO	ECAS	Cerebral aneurysm	ICH	Control
Rate of occurrence, n* (%)	53/64 (82.8)	8/14 (57.1)	29/125 (23.2)	1/55 (1.8)	1/105 (0.9)	0/21 (0)	2/135 (1.5)
<i>P</i> value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1.00	1.00	1.00	
Odds ratio	320.4	88.6	20.0	1.23	0.63	0	
95% CI	68.6-1494.4	15.3-511.3	4.68-86.2	0.10-13.8	0.05-7.1		

\*No. of patients with c.14576G>A variant (A/G + A/A)/total no. of patients.

MMD indicates moyamoya disease (もやもや病) ; NonMMD ICASO, non-moyamoya disease intracranial major artery stenosis/occlusion (頭蓋内狭窄) ; ECAS, extracranial carotid atherosclerosis (頸部頸動脈狭窄) ; ICH, intracerebral hemorrhage (脳内出血) ; CI, confidence interval.

本論文の著者の発表論文「Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic Variant *RNF213* c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. *Stroke* 2013 Oct(10):2894-7.」より *Stroke* 誌の許可を得て一部改変して引用。Promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile- device format is prohibited without the permission from the publisher Lippincott Williams & Wilkins. Please contact “journalpermissions@lww.com for further information”. Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the adapted version of figure.

### 3. *RNF213* c.14576G>A を有する頭蓋内主幹動脈狭窄の臨床的特徴の検討

頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する3つの群（もやもや病群、片側もやもや病群、頭蓋内狭窄群）の発症年齢の分布を図13に示した。なお、無症候性の症例は、初めて画像検査で診断された年齢を発症年齢とした。もやもや病群は従来の報告通り、小児期の発症のピークがあり、また成人期に別の発症のピークを認めた。片側もやもや病群はもやもや病群より発症年齢は高い傾向にあり、頭蓋内狭窄群はさらに高い傾向にあった。

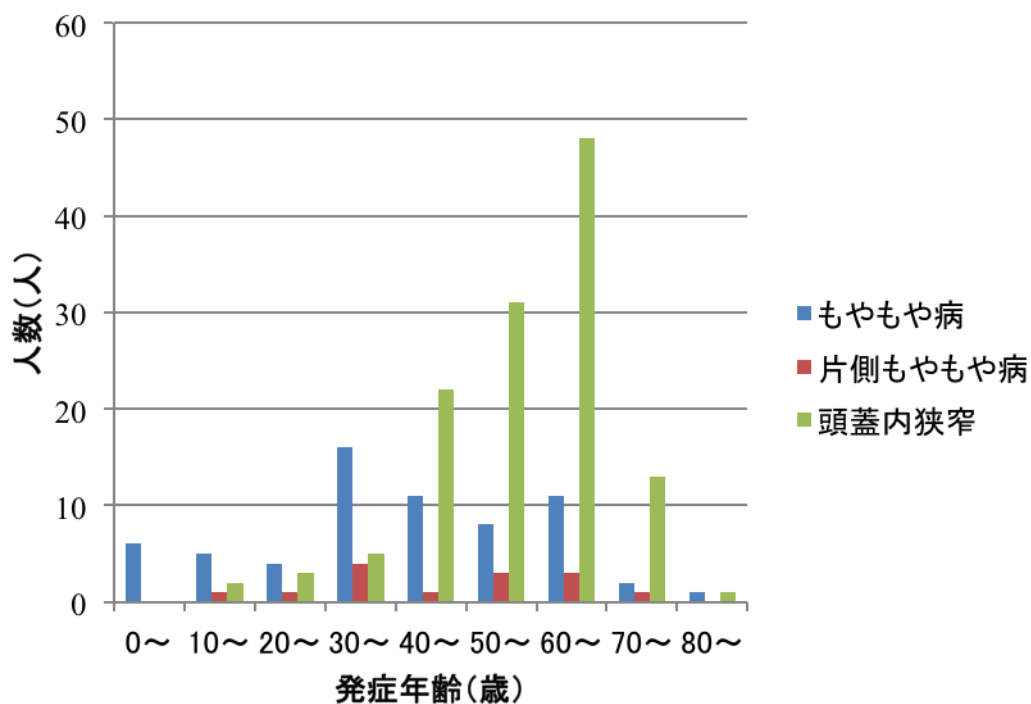


図13. 頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する3つの群（もやもや病群、片側もやもや病群、頭蓋内狭窄群）の発症年齢の分布。

各群において、*RNF213* c.14576G>A 変異と発症年齢の関連解析を行った。結果を表8に示した。もやもや病群においては、*RNF213* c.14576G>A の homozygous の変異 (A/A) を有するものが他の群と比較して有意に発症年齢が低かった。頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する3つの群を統合すると *RNF213* c.14576G>A 変異を有する者は (A/A + A/G) は wild type (G/G) と比較して有意に発症年齢が低かった。しかしながら頭蓋内狭窄群においては変異の有無では発症年齢に差は認められなかった。*RNF213* c.14576G>A 変異の有無での発症年齢の分布を図14に示した。

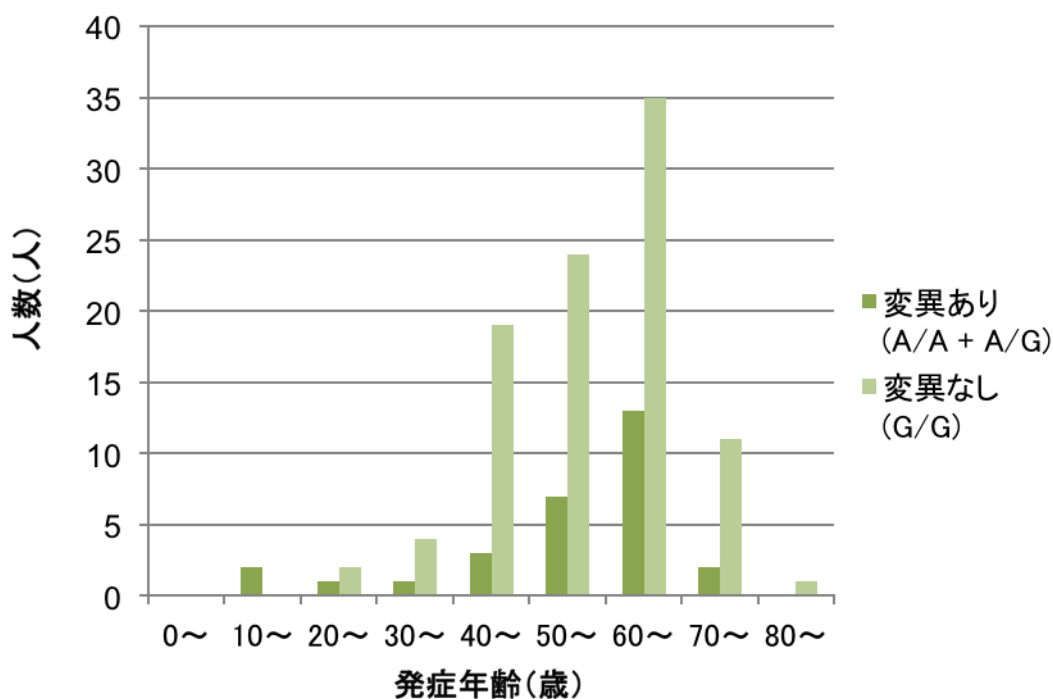


図14. 頭蓋内狭窄群において *RNF213* c.14576G>A 変異の有無での発症年齢の分布 (変異ありは A/A + A/G、変異なしは G/G)。



表 8. 頭蓋内主幹動脈狭窄を呈する 3 つの群における発症年齢と *RNF213* c.14576G>A の関連解析の結果

Characteristics	Age of onset, mean±SD (range), y; Number of cases				Comparison, <i>p</i> value				
	Total	A/A	A/G	G/G	A/A vs. A/G vs. G/G	A/A vs. A/G	A/A vs. G/G	A/G vs. G/G	A/A+A/G vs. G/G
All ICASO cases	51.1±16.8 (1-80); 203 cases	22±32.1 (1-59); 3 cases	46.7±18.2 (5-80); 87 cases	55.2±13.4 (11-80); 113 cases	0.001	NS	NS	0.001	0.0005
Definite MMD	41.2±19.4 (1-80); 64 cases	3.5±3.5 (1-6); 2 cases	42.8±19.4 (5-80); 51 cases	40.6±14.0 (14-64); 11 cases	NS	0.01	0.02	NS	NS
Unilateral MMD	45.3±17.1 (11-70); 14 cases	- (-); 0 case	45.5±13.4 (21-65); 8 cases	45.1±22.5 (11-70); 6 cases	NS	-	-	NS	NS
NonMMD ICASO	56.8±12.3 (15-80); 125 cases	59 (59); 1 case	54.2±15.0 (15-73); 28 cases	57.5±11.4 (24-80); 96 cases	NS	NS	NS	NS	NS

ICASO indicates intracranial major artery stenosis/occlusion (頭蓋内主幹動脈狭窄); MMD, moyamoya disease (もやもや病); NonMMD ICASO, non-moyamoya disease intracranial major artery stenosis/occlusion (頭蓋内狭窄); SD, standard deviation; NS, not significant.

本論文の著者の発表論文「Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic Variant *RNF213* c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. *Stroke* 2013 Oct(10):2894-7.」より *Stroke* 誌の許可を得て一部改変

して引用。Promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile- device format is prohibited without the permission from the publisher Lippincott Williams & Wilkins. Please contact “[journalpermissions@lww.com](mailto:journalpermissions@lww.com) for further information”. Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the adapted version of figure.

次に、発症年齢と変異の有無に関して性別にて層別解析を行った。結果を表9に示した。変異あり (AA + A/G) の割合は男性群より女性群の方が高かった。平均年齢は男性群においても女性の群においても変異の有無で有意な差はなかった。また変異あり群、変異なし群いずれにおいても、平均年齢は性別では有意な差はなかった。*RNF213* c.14576G>A 変異の有無、性別による4群での発症年齢の分布を図15に示した。

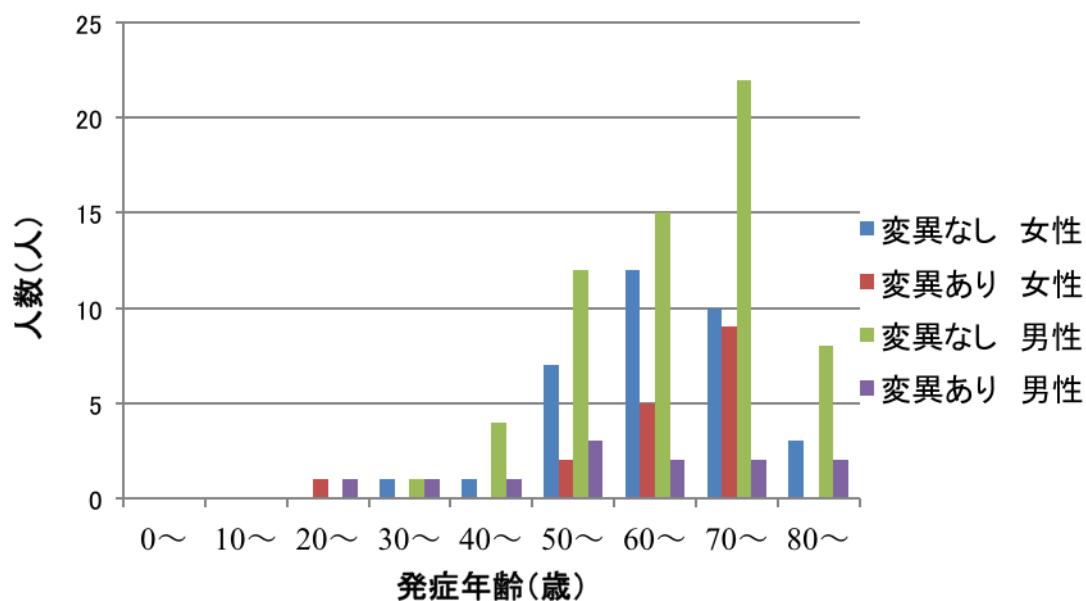


図15. 頭蓋内狭窄群において *RNF213* c.14576G>A 変異の有無、性別での発症年齢の分布 (変異ありは A/A + A/G、変異なしは G/G)。

表 9. 頭蓋内狭窄群における発症年齢と変異の有無の関連解析（性別による層別解析）

Characteristics	Age of onset, mean±SD (range), y;			A/A+A/G vs G/G
	Number of cases			
	Total	A/A+A/G	G/G	
Total	56.8±12.3 (15-80); 125 cases	54.4±14.8 (15-73); 29 case	57.5±11.4 (24-80); 96 cases	NS
Male	56.8±12.7 (19-80); 74 cases	51.3±16.9 (19-73); 12 cases	57.9±11.5 (29-80); 62 cases	NS
Female	56.6±11.8 (15-75); 51 cases	56.5±13.2 (15-67); 17 cases	56.7±11.2 (24-75); 34 cases	NS
Male vs female	NS	NS	NS	

SD indicates standard deviation; NS, not significant.

## V. 考察

### A. 本研究の意義

本研究の重要な発見は、もやもや病関連遺伝子変異 *RNF213* c.14576G>A はもやもや病のみならず、片側もやもや病やアテローム性動脈硬化頭蓋内狭窄を含めた様々な表現型の頭蓋内主幹動脈狭窄病変に有意に関連していることが示された点にある<sup>86,87</sup>。

過去の報告での、もやもや病発症者と *RNF213* c.14576G>A 関連解析の結果をまとめたものを表 10 示した。本研究においても、*RNF213* c.14576G>A はもやもや病群と有意に関連することが示され ( $p < 0.0001$ , odds ratio 320.4, 95% CI 68.6–1494.4)、過去の報告が確証される結果となった。

これまで病因や遺伝的背景が、もやもや病とは異なると考えられてきた片側もやもや病やアテローム性動脈硬化の頭蓋内主幹動脈狭窄に、もやもや病と共通の遺伝的要因が存在しているということが示されたのが、本研究の新しい知見である。これまで生活習慣等の後天的な要因がその主たる原因と考えられてきたアテローム性動脈硬化による頭蓋内狭窄に、非常に関連の強い遺伝子変異が存在したことは重要な意味を持つ結果であると言える。

表 10. 過去のもやもや病群における *RNF213* c.14576G>A 変異 (A/G + A/A) の関連解析の報告のまとめ

Previous studies	c.14576G>A, (A/G+A/A)/n (%)		<i>P</i> value	Odds ratio	95% CI
	Definite MMD	Control			
Kamada et al. <sup>68</sup>	46/63 (73.0)	6/429 (1.3)	$1.2 \times 10^{-43}$	190.8	71.7–507.9
Liu et al. <sup>69</sup>	187/251 (74.5)	18/757 (2.4)	$1 \times 10^{-119}$	111.8	64.0–195.3
Miyatake et al. <sup>70</sup>	168/204 (82.4)	5/283 (1.8)	<0.001	259	100–674

MMD indicates moyamoya disease (もやもや病) ; CI, confidence interval.

この結果は、「もやもや病の疾患概念のパラダイムシフト」、「アジア系集団における頭蓋内主幹動脈狭窄の遺伝的要因」、「脳卒中のリスクアレル」、という3つの観点から非常に意義深いものであると考えられる。

## B. もやもや病の疾患概念のパラダイムシフト

本研究の結果は、従来のもやもや病の画像所見に基づく診断基準・疾患概念に一石を投じるものである。もやもや病と非常に近い画像所見を呈しながら、片側のみの病変や高齢者において動脈硬化性変化を伴うような場合は正確な診断を下すのは困難で、これまでは、もやもや病の診断基準から除外されてきた<sup>81-85</sup>。

もやもや病の関連遺伝子変異である *RNF213* c.14576G>A が、もやもや病のみならず様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄と関連していることが示されたことは、従来のもやもや病と診断されてきた病態は広い表現型（様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄）のスペクトラムを持つ疾患群の一部にすぎないと考えられる。すなわち *RNF213* c.14576G>A を中心にして考えると、*RNF213* c.14576G>A に関連する様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄からなる疾患群が想定される（図 16）。今後、これまでは画像所見や既往歴などの「表現型」でしか鑑別できなかったもやもや病そして頭蓋内主幹動脈狭窄の診断基準が「遺伝子型」によって定義

される診断基準へとパラダイムシフトをきたす可能性がある。本研究の結果より我々は *RNF213* 変異の遺伝子型によって定義される「*RNF213* 変異関連疾患 (*RNF213* variant related disease)」という疾患概念を提案する。

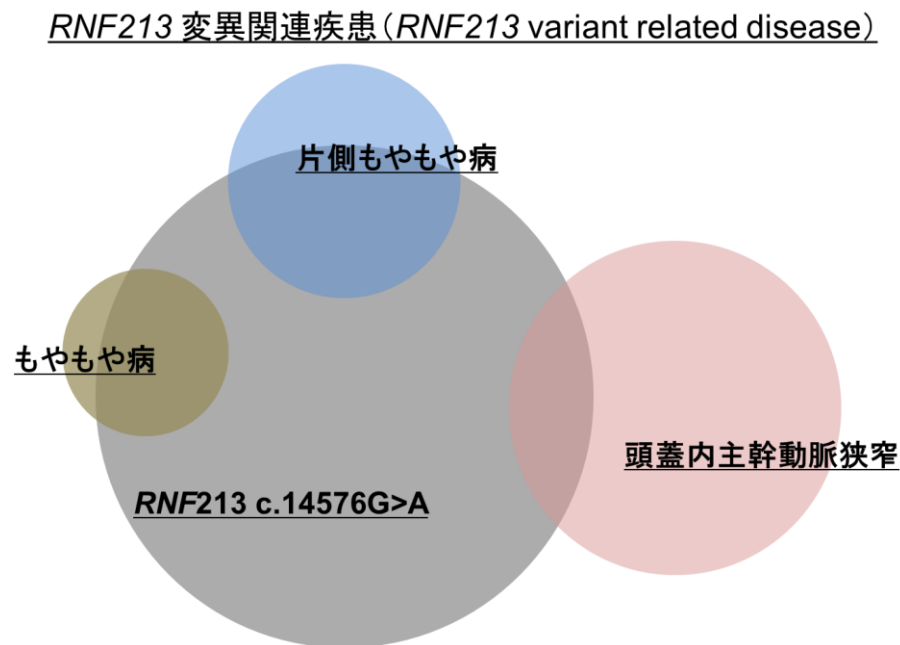


図 16. *RNF213* 変異関連疾患 (*RNF213* variant related disease) の疾患概念図。

### C. アジア系集団における頭蓋内主幹動脈狭窄の遺伝的要因

もやもや病のみならず、アテローム性動脈硬化頭蓋内主幹動脈狭窄は、ヨーロッパ系集団と比較して、日本を始めとしたアジア系集団に多く発症が認められることが疫学的に示されており<sup>88,89</sup>、遺伝的要因の存在が示唆されてきたがこれに関してもまたはっきりしたものは現在のところ同定されてこなかった。



*RNF213* c.14576G>A はヨーロッパ系集団においてはほとんど認められず、日本など東アジア系集団の一般人口の1~2%程度認められることから、この変異がもやもや病とともにアテローム性動脈硬化の頭蓋内主幹動脈狭窄の発症の地域差を説明する遺伝的要因の1つの候補であると考えられる。

#### D. 脳卒中のリスクアレル

後天的要因が強いと考えられる脳卒中の領域において、発症に関連する遺伝的要因はこれまでの報告では、GWAS等の全ゲノム領域の関連解析においても、そのほとんどが odds ratio が2以下とあまり大きくなく、疾患の病態機序の全貌を明らかにするには至っていない。本研究によって *RNF213* c.14576G>A は脳卒中の主たる原因である頭蓋内主幹血管狭窄に対する odds ratio が20.0と非常に高値であることが明らかとなった。一方でこの変異は高血圧に関連することを示唆する報告がある<sup>90</sup>。この変異は一般の日本人に2%程度と比較的高頻度に存在する<sup>78</sup>。以上よりこの変異を有する者は頭蓋内主幹動脈狭窄そして脳卒中の高リスク群であると考えられ、日本の脳卒中の領域においては顕著な遺伝的要因（リスクアレル）であると言える。頭蓋内主幹動脈狭窄は虚血性脳卒中の主要な原因であり、*RNF213* c.14576G>A は重要な脳卒中のリスクアレルと考えら

れる。*RNF213* c.14576G>A の遺伝子診断は、新たな脳卒中のリスク評価、より適切な診断・予防的加療につながる可能性がある。

*RNF213* の機能に関しては未解明の部分が多い<sup>73-75</sup>。*RNF213* の機能解析が進めば、頭蓋内主幹動脈狭窄に対して新たな治療法が開発される可能性がある。脳卒中という後天的な疾患におけるこうした影響力の強い遺伝的要因にもとづく疾患の発症のメカニズム解明に関する研究は、高血圧や糖尿病、冠動脈疾患など他の後天的な疾患にも転用可能なモデルケースとなりうると考える。この観点においては今後の研究発展性も期待できる。

#### E. 本研究の限界

我々は *RNF213* 上の変異 c.14576G>A が頭蓋内主幹動脈狭窄に大きな関連を持つことを明らかにした。一方で、頭蓋内主幹動脈狭窄を有する患者の中には変異 c.14576G>A を持たない者も存在する。これらの患者の中には c.14576G>A 以外の *RNF213* の変異を持つ者が存在する可能性があり検討が必要である。頭蓋内主幹動脈狭窄を有する患者および健常者において、*RNF213* 全体の resequencing を行うことで、疾患に関連する c.14576G>A 以外の変異を明らかにする必要がある。

本研究においては *RNF213* 一塩基変異の有無のみを評価しており、*RNF213* を含む染色体領域の大きな挿入・欠失の有無に関しては検証していない。過去の報告においては挿入・欠失はなかったとされているが<sup>68,69</sup>、我々のコホートにおいても確認の必要がある。

#### F. 今後の研究

今後、本研究を発展させるために4つの方向性を考えている。

1つ目は、*RNF213* c.14576G>A を有する頭蓋内狭窄の臨床的特徴を明らかにすることである。もやもや病においては、従来の報告通り *RNF213* c.14576G>A の homozygote (A/A) は発症年齢が低いことが明らかとなったが、頭蓋内狭窄群においてはそうした傾向は得られなかった。症例数を重ねてさらなる検討が必要と考える。また、遺伝学的視点からは *RNF213* c.14576G>A を有する頭蓋内狭窄に関して、頭蓋内狭窄や脳卒中の家族歴がどの程度存在するかを明らかにすることは重要であると考ええる。

2つ目は上に述べたように、*RNF213* 上の c.14576G>A 以外の疾患に関連する変異を同定することである。c.14576G>A 以外のリスクアレルを同定できる可能性がある。またこうした変異が同定されれば、疾患発症に関わる *RNF213* の機能ドメイン同定につながる可能性がある。また *RNF213* 上の c.14576G>A を含

めた複数の多型・変異の組み合わせによって発症や重症度の影響を来すかを明らかにする必要がある。

3つ目は、*RNF213* の分子生物学的機能解析である。*RNF213* の機能に関しては遺伝子改変動物モデルにおいて血管形成異常を来すことや、*in vitro* レベルで *RNF213* c.14576G>A 変異が血管内皮細胞の血管新生能や細胞周期に影響を与えることなどが報告されているが、機能の全容は明らかでない<sup>73-75</sup>。現在、*RNF213* の結合タンパク質を同定することで *RNF213* 機能に関連する既知の分子機構の同定を目指している。

4つ目は、*RNF213* c.14576G>A という同じ遺伝変異を持ちながら、表現型の違いをもたらす要因の解明である。それは、*epigenetic* な変化を含めて別な遺伝的な要因、また後天的な環境要因など様々な可能性がある。正確な発症予測および、発症予防のためには表現型の違いをもたらす要因の解明は必須であると考えられる。全ゲノム領域の変異解析等によって、表現型の違いをもたらす多型・変異を明らかにすることが必要である。表現型に違いをもたらす、複数の多型・変異の組み合わせや相互作用も検証する必要がある。

## VI. 結語

*RNF213* c.14576G>A はもやもや病という稀な疾患のみならず、広く様々な程度の頭蓋内主幹動脈狭窄と関連があることを明らかにした。今後脳卒中診断・治療が従来の生活習慣や画像所見などの「表現型」に基づくものから「遺伝子型」に基づくものへ、パラダイムシフトをきたし、より適切な診断・治療が可能となると考えられる。遺伝子診断により脳卒中リスクを評価することは、定期的な経過観察を通して予防医療の実施につながると考えられる。脳卒中診療における新たな「遺伝的診断に基づく予防医療」の確立の可能性はある。

## VII. 謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座教授・齊藤延人先生に深く感謝いたします。研究のテーマや実験計画、論文作成につき具体的な御指導を賜りました東京大学医学部附属病院脳神経外科特任講師・今井英明先生に深く感謝いたします。臨床検体の収集に際し多大なる御尽力を賜りました関東脳神経外科病院副院長・清水暢裕先生に深く感謝いたします。また日々の研究現場において厚く御指導、御助言を賜りました研究グループの方々や 松浦令子・研究技術員に感謝いたします。

### VIII. 引用文献

1. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*;8:355-369. 2009
2. Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol*;6:182-187. 2007
3. Prognosis of patients with symptomatic vertebral or basilar artery stenosis. The Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID) Study Group. *Stroke*;29:1389-1392. 1998
4. Thijs VN, Albers GW. Symptomatic intracranial atherosclerosis: outcome of patients who fail antithrombotic therapy. *Neurology*;55:490-497. 2000
5. Kasner SE, Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG, Cloft HJ. Predictors of ischemic stroke in the territory of a symptomatic intracranial arterial stenosis. *Circulation*;113:555-563. 2006
6. 小林祥泰. 脳卒中データバンク 2009. 東京, 中山書店 ; 2009

7. Kubo M, Kiyohara Y, Ninomiya T, Tanizaki Y, Yonemoto K, Doi Y, Hata J, Oishi Y, Shikata K, Iida M. Decreasing incidence of lacunar vs other types of cerebral infarction in a Japanese population. *Neurology*;66:1539-1544. 2006
8. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MM, van der Lugt A. Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med*;357:1821-1828. 2007
9. 一般社団法人日本脳ドック学会. 脳ドックのガイドライン 2008. 札幌、響文社 ; 2008
10. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J. Basic mechanisms in intracranial large-artery atherosclerosis: advances and challenges. *Cerebrovasc Dis*;20 Suppl 2:75-83. 2005
11. Ono H, Nakatomi H, Tsutsumi K, Inoue T, Teraoka A, Yoshimoto Y, Ide T, Kitanaka C, Ueki K, Imai H, Saito N. Symptomatic recurrence of intracranial arterial dissections: follow-up study of 143 consecutive cases and pathological investigation. *Stroke*;44:126-131. 2013
12. Miyawaki S, Maeda K. Surgical Treatment for Cervical Carotid Artery Stenosis in the Elderly: Importance of Perioperative Management of Ischemic Cardiac Complications. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013 (Epub ahead of print)



13. Craven TE, Ryu JE, Espeland MA, Kahl FR, McKinney WM, Toole JF, McMahan MR, Thompson CJ, Heiss G, Crouse JR, 3rd. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case-control study. *Circulation*;82:1230-1242. 1990
14. Miyawaki S, Maeda K. A Comparative Study of Risk Factors and the Occurrence Rate of Coronary Atherosclerosis in Extra- and Intracranial Atherosclerotic Lesions. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013 (Epub ahead of print)
15. Bae HJ, Yoon BW, Kang DW, Koo JS, Lee SH, Kim KB, Lee J, Roh JK. Correlation of coronary and cerebral atherosclerosis: difference between extracranial and intracranial arteries. *Cerebrovasc Dis*;21:112-119. 2006
16. Caplan LR, Gorelick PB, Hier DB. Race, sex and occlusive cerebrovascular disease: a review. *Stroke*;17:648-655. 1986
17. Arenillas JF. Intracranial atherosclerosis: current concepts. *Stroke*;42:S20-23. 2011
18. Suri MF, Johnston SC. Epidemiology of intracranial stenosis. *J Neuroimaging*;19 Suppl 1:11S-16S. 2009
19. JET Study Group. Japanese EC-IC Bypass Trial(JET Study) –中間解析結果(第二報)–. *脳卒中の外科*;30:434-437. 2002

20. Powers WJ, Clarke WR, Grubb RL, Jr., Videen TO, Adams HP, Jr., Derdeyn CP. Extracranial-intracranial bypass surgery for stroke prevention in hemodynamic cerebral ischemia: the Carotid Occlusion Surgery Study randomized trial. *JAMA*;306:1983-1992. 2011
21. Failure of extracranial-intracranial arterial bypass to reduce the risk of ischemic stroke. Results of an international randomized trial. The EC/IC Bypass Study Group. *N Engl J Med*;313:1191-1200. 1985
22. Kuroda S. Long-term prognosis of medically treated patients with internal carotid or middle cerebral artery occlusion: can acetazolamide test predict it? *Stroke*;32:2110-2116. 2001
23. Ogasawara K. Cerebrovascular reactivity to acetazolamide and outcome in patients with symptomatic internal carotid or middle cerebral artery occlusion: a xenon-133 single-photon emission computed tomography study. *Stroke*;33:1857-1862. 2002
24. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*;1:53-60. 1981

25. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*;239:57-69. 1982
26. Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM. Ebselen protects both gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke*;32:2149-2154. 2001
27. Imai H, McCulloch J, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. New method for the quantitative assessment of axonal damage in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*;22:1080-1089. 2002
28. Tosaka M, Hashiba Y, Saito N, Imai H, Shimizu T, Sasaki T. Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a new hydroxyl radical scavenger. *Acta Neurochir (Wien)*;144:1305-1310; discussion 1310. 2002
29. Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*;34:56-63. 2003
30. Shimizu T, Imai H, Seki K, Tomizawa S, Nakamura M, Honda F, Kawahara N, Saito N. Cyclophilin C-associated protein and cyclophilin C mRNA are

upregulated in penumbral neurons and microglia after focal cerebral ischemia.

*J Cereb Blood Flow Metab*;25:325-337. 2005

31. Tomizawa S, Imai H, Tsukada S, Simizu T, Honda F, Nakamura M, Nagano T, Urano Y, Matsuoka Y, Fukasaku N, Saito N. The detection and quantification of highly reactive oxygen species using the novel HPF fluorescence probe in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neurosci Res*;53:304-313. 2005
32. Honda F, Imai H, Ishikawa M, Kubota C, Shimizu T, Fukunaga M, Saito N. Cilostazol attenuates gray and white matter damage in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke*;37:223-228. 2006
33. Imai H, Konno K, Nakamura M, Shimizu T, Kubota C, Seki K, Honda F, Tomizawa S, Tanaka Y, Hata H, Saito N. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg*;104:123-132. 2006
34. Shimizu T, Sugawara K, Tosaka M, Imai H, Hoya K, Takeuchi T, Sasaki T, Saito N. Nestin expression in vascular malformations: a novel marker for proliferative endothelium. *Neurol Med Chir (Tokyo)*;46:111-117. 2006
35. Hashiba Y, Tosaka M, Saito N, Imai H, Shimizu T, Sasaki T. Vasorelaxing effect of the Rho-kinase inhibitor, Y-27632, in isolated canine basilar arteries. *Neurol Res*;29:485-489. 2007

36. Tanaka Y, Imai H, Konno K, Miyagishima T, Kubota C, Puentes S, Aoki T, Hata H, Takata K, Yoshimoto Y, Saito N. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. *Stroke*;39:205-212. 2008
37. Nakamura M, Imai H, Konno K, Kubota C, Seki K, Puentes S, Faried A, Yokoo H, Hata H, Yoshimoto Y, Saito N. Experimental investigation of encephalomyosynangiosis using gyrencephalic brain of the miniature pig: histopathological evaluation of dynamic reconstruction of vessels for functional anastomosis. Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr*;3:488-495. 2009
38. Kubota C, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *J Biol Chem*;285:667-674. 2010
39. Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. *Brain Res*;1397:55-65. 2011

40. Puentes S, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Yoshimoto Y, Mikuni M, Imai H, Ishizaki Y. Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage. *Brain Res*;1469:43-53. 2012
41. Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Kirino T. Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*;24:212-223. 2004
42. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*;110:429-441. 2002
43. Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N. Region-specific proliferative response of neural progenitors to exogenous stimulation by growth factors following ischemia. *Neuroreport*;19:805-809. 2008
44. Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N. Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of

- neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. *Neuroscience*;158:683-692. 2009
45. Yoshikawa G, Momiyama T, Oya S, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N. Induction of striatal neurogenesis and generation of region-specific functional mature neurons after ischemia by growth factors. Laboratory investigation. *J Neurosurg*;113:835-850. 2010
46. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*;376:112-123. 2010
47. Sacco RL, Ellenberg JH, Mohr JP, Tatemichi TK, Hier DB, Price TR, Wolf PA. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. *Ann Neurol*;25:382-390. 1989
48. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke*;35:212-227. 2004

49. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: a family history study. *Stroke*;34:1364-1369. 2003
50. Sharma P, Yadav S, Meschia JF. Genetics of ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;84:1302-1308. 2013
51. Meschia JF, Tournier-Lasserre E. Advances in stroke: genetics 2012. *Stroke*;44:309-310. 2013
52. Holliday EG, Maguire JM, Evans TJ, Koblar SA, Jannes J, Sturm JW, Hankey GJ, Baker R, Golledge J, Parsons MW, Malik R, McEvoy M, Biros E, Lewis MD, Lincz LF, Peel R, Oldmeadow C, Smith W, Moscato P, Barlera S, Bevan S, Bis JC, Boerwinkle E, Boncoraglio GB, Brott TG, Brown RD, Jr., Cheng YC, Cole JW, Cotlarciuc I, Devan WJ, Fornage M, Furie KL, Gretarsdottir S, Gschwendtner A, Ikram MA, Longstreth WT, Jr., Meschia JF, Mitchell BD, Mosley TH, Nalls MA, Parati EA, Psaty BM, Sharma P, Stefansson K, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Traylor M, Verhaaren BF, Wiggins KL, Worrall BB, Sudlow C, Rothwell PM, Farrall M, Dichgans M, Rosand J, Markus HS, Scott RJ, Levi C, Attia J. Common variants at 6p21.1 are



- associated with large artery atherosclerotic stroke. *Nat Genet*;44:1147-1151.  
2012
53. Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, Malik R, Paul NL, Jackson C, Farrall M, Rothwell PM, Sudlow C, Dichgans M, Markus HS. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke*;43:3161-3167. 2012
54. 竹内一夫, 清水健太郎. 両側内頸動脈形成不全症. *No To Shinkei*;9:37-43.  
1957
55. 佐野圭司. 大脳基底部の telangiectasia 一私見-. *No To Shinkei*;17:748-750.  
1965
56. Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*;20:288-299. 1969
57. Karasawa J, Kikuchi H, Furuse S, Kawamura J, Sakaki T. Treatment of moyamoya disease with STA-MCA anastomosis. *J Neurosurg*;49:679-688.  
1978
58. Saito N, Imai H. Insights on the revascularization mechanism for treatment of Moyamoya disease based on the histopathologic concept of angiogenesis and arteriogenesis. *World Neurosurg*;75:204-205. 2011

59. Houkin K, Ito M, Sugiyama T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Kuroda S. Review of past research and current concepts on the etiology of moyamoya disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)*;52:267-277. 2012
60. Kuroda S, Houkin K. Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol*;7:1056-1066. 2008
61. Fukui M, Kono S, Sueishi K, Ikezaki K. Moyamoya disease. *Neuropathology*;20 Suppl:S61-64. 2000
62. Ikeda H, Sasaki T, Yoshimoto T, Fukui M, Arinami T. Mapping of a familial moyamoya disease gene to chromosome 3p24.2-p26. *Am J Hum Genet*;64:533-537. 1999
63. Inoue TK, Ikezaki K, Sasazuki T, Matsushima T, Fukui M. Linkage analysis of moyamoya disease on chromosome 6. *J Child Neurol*;15:179-182. 2000
64. Sakurai K, Horiuchi Y, Ikeda H, Ikezaki K, Yoshimoto T, Fukui M, Arinami T. A novel susceptibility locus for moyamoya disease on chromosome 8q23. *J Hum Genet*;49:278-281. 2004
65. Yamauchi T, Tada M, Houkin K, Tanaka T, Nakamura Y, Kuroda S, Abe H, Inoue T, Ikezaki K, Matsushima T, Fukui M. Linkage of familial moyamoya

disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) to chromosome 17q25.

*Stroke*;31:930-935. 2000

66. Mineharu Y, Liu W, Inoue K, Matsuura N, Inoue S, Takenaka K, Ikeda H, Houkin K, Takagi Y, Kikuta K, Nozaki K, Hashimoto N, Koizumi A. Autosomal dominant moyamoya disease maps to chromosome 17q25.3. *Neurology*;70:2357-2363. 2008
67. Liu W, Hashikata H, Inoue K, Matsuura N, Mineharu Y, Kobayashi H, Kikuta K, Takagi Y, Hitomi T, Krschek B, Zou LP, Fang F, Herzig R, Kim JE, Kang HS, Oh CW, Tregouet DA, Hashimoto N, Koizumi A. A rare Asian founder polymorphism of Raptor may explain the high prevalence of Moyamoya disease among East Asians and its low prevalence among Caucasians. *Environ Health Prev Med*;15:94-104. 2010
68. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*;56:34-40. 2011

69. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Krischek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*;6:e22542. 2011
70. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*;78:803-810. 2012
71. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*;78:399-434. 2009
72. Lupas AN, Martin J. AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol*;12:746-753. 2002
73. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A.

- Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients. *Biochem Biophys Res Commun*;438:13-19. 2013
74. Kobayashi H, Yamazaki S, Takashima S, Liu W, Okuda H, Yan J, Fujii Y, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Koizumi A. Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. *Biochem Biophys Res Commun*;432:519-525. 2013
75. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality. *Biochem Biophys Res Commun*;439:419-426. 2013
76. Wu Z, Jiang H, Zhang L, Xu X, Zhang X, Kang Z, Song D, Zhang J, Guan M, Gu Y. Molecular analysis of RNF213 gene for moyamoya disease in the Chinese Han population. *PLoS One*;7:e48179. 2012

77. Wang X, Zhang Z, Liu W, Xiong Y, Sun W, Huang X, Jiang Y, Ni G, Zhou L, Wu L, Zhu W, Li H, Liu X, Xu G. Impacts and interactions of PDGFRB, MMP-3, TIMP-2, and RNF213 polymorphisms on the risk of Moyamoya disease in Han Chinese human subjects. *Gene*;526:437-442. 2013
78. Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A. Distribution of moyamoya disease susceptibility polymorphism p.R4810K in RNF213 in East and Southeast Asian populations. *Neurol Med Chir (Tokyo)*;52:299-303. 2012
79. Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis; Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Intractable Diseases. Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis). *Neurol Med Chir (Tokyo)*;52:245-266. 2012
80. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服事業ウイリス動脈輪閉塞症における病態・治療に関する研究班. もやもや病(ウイリス動脈輪閉塞症)診断・治療ガイドライン. *脳卒中の外科*;37:321-337. 2009
81. Hayashi K, Horie N, Suyama K, Nagata I. An epidemiological survey of moyamoya disease, unilateral moyamoya disease and quasi-moyamoya disease in Japan. *Clin Neurol Neurosurg*;115:930-933. 2013

82. Nagata S, Matsushima T, Morioka T, Matsukado K, Mihara F, Sasaki T, Fukui M. Unilaterally symptomatic moyamoya disease in children: long-term follow-up of 20 patients. *Neurosurgery*;59:830-836; discussion 836-837. 2006
83. Hirotsune N, Meguro T, Kawada S, Nakashima H, Ohmoto T. Long-term follow-up study of patients with unilateral moyamoya disease. *Clin Neurol Neurosurg*;99 Suppl 2:S178-181. 1997
84. Houkin K, Abe H, Yoshimoto T, Takahashi A. Is "unilateral" moyamoya disease different from moyamoya disease? *J Neurosurg*;85:772-776. 1996
85. Kawano T, Fukui M, Hashimoto N, Yonekawa Y. Follow-up study of patients with "unilateral" moyamoya disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)*;34:744-747. 1994
86. Miyawaki S, Imai H, Shimizu M, Yagi S, Ono H, Mukasa A, Nakatomi H, Shimizu T, Saito N. Genetic variant RNF213 c.14576G>A in various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke*;44:2894-2897. 2013
87. Miyawaki S, Imai H, Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Saito N. Identification of a genetic variant common to moyamoya disease and intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke*;43:3371-3374. 2012

88. Aizawa H, Azuma N, Katayama T, Hasebe N, Inaba M, Sasajima T, Uchiyama S. Cerebrovascular disease and intracranial artery stenosis in patients with symptomatic peripheral artery disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*;21:825-831. 2012
89. Nishimaru K, McHenry LC, Jr., Toole JF. Cerebral angiographic and clinical differences in carotid system transient ischemic attacks between American Caucasian and Japanese patients. *Stroke*;15:56-59. 1984
90. Koizumi A, Kobayashi H, Liu W, Fujii Y, Senevirathna ST, Nanayakkara S, Okuda H, Hitomi T, Harada KH, Takenaka K, Watanabe T, Shimbo S. P.R4810K, a polymorphism of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease, is associated with blood pressure. *Environ Health Prev Med*;18:121-129. 2013