

もやもや病の末梢血細胞DNAメチル化解析による 発病機序の解明

北海道大学脳神経外科・特任助教 内野 晴登



1. 研究の背景とこれまでの成果

もやもや病は内頸動脈終末部の進行性狭窄により脳卒中や高次脳機能障害をきたす原因不明の脳血管疾患である。厚生労働省指定難病で、現在、約16,000人が登録を受けているが、実際の患者数はさらに多い。1960年代に本邦で疾患概念が確立され、日本人の発症率が高い疾患である。その他、韓国、中国といった東アジアでも好発するが、近年では国際的にも認知が高まり、欧米、その他の国からの報告も増えている。乳幼児から成人まで、いずれの年齢でも発生する可能性があり、家系内発症を認める場合もある。小児では一過性脳虚血発作や脳梗塞で発症することが多いが、特に乳幼児では重症度の高い経過をたどることが多い。一方で成人では小児に比較し、脆弱血管の破綻による脳出血の割合が相対的に高くなる。これらの脳卒中は機能予後、生命予後を悪化させる。また脳卒中を発症しなくても、脳循環不全により高次脳機能障害をきたし、社会的予後、生活の質の悪化につながる。早期の外科的血行再建術が脳卒中予防に効果を示すが、薬物などによる発症予防、進行抑制といった治療は確立されていない。

最近では、本邦の研究グループにより疾患感受性遺伝子RNF213が同定され、日本人患者の約80%に特定の一塩基多型 (c. 14429G>A) を認めることが判明した。これにより、その後の病因・病態研究は大きく進展した一方で、RNF213単独では疾患発症に至らないこと、疾患の不均一性を説明できないことが判明している。すなわち、1) RNF213多型保有者のもやもや病有病率、すなわち浸透率が0.5%程度と低いこと、2) Caucasian患者では、上記RNF213多型は認められず、genome-wide association studyでも他の関連遺伝子は同定されていないこと、3) 大部分(約80%)の日本人患者はRNF213ヘテロ変異型であるが、多彩な臨床像を示す亜型を含んでいることである。したがって、RNF213の臨床バイオマーカーとしての有用性は限定的であり、発症においてもRNF213以外の何らかの修飾因子が想定されている(図1)。また、本疾患の診断は専ら血管形態によるものであり、発症前や、ごく初期での診断は困難であるとともに、脳動脈硬化症との鑑別が難しい場合がある。さらに血管構築の評価のみでは、個々の患者の予後を必ずしも判断できない。以上のことから、RNF213以外に発症に寄与する因子、客観的診断・予後予測のためのバイオマーカーの同定が本疾患の診療における重要な課題といえる。

もやもや病疾患概念の確立から半世紀以上経過した現在まで、病因・病態に関する研究は日本を中心に数多く進められてきた。血液・髄液中のサイトカインや血管前駆細胞の解析、疫学的・遺伝学的解析、血管病理学的解析などである。バセドウ病などの自己免疫性疾患においても、もやもや病をきたす場合があることも従来より知られている。したがって発症修飾因子として、遺伝素因に加え、炎症、ウイルス感染、自己免疫などの関与が想定されているが、未だ決定的な解明に至っていない。そうした発症修飾因子を解明するため、申請者らはエピゲノム機構に着目し、表現不一致一卵性双生児の検体を用いた研究デザインにより疾患特有のmicroRNA発現プロファイルを報告した(Uchino et al, BMC medical genomics, 2018, 図2)。現在、300名以上のより大規模なコホートで追加解析を実施し、疾患バイオマーカーとしての意義・有用性、病態との関連を検証している(unpublished data)。さらに患者および健康者単核球由来のiPS細胞を樹立し、疾患との関連が想定される血管内皮細胞への分化にも成功している(Hamauchi, Uchino et al. PLoSOne, 2016)。患者血液中と血管内皮細胞において、共通した発現変動を認めるmicroRNAも複数確認した。本疾患では病変血管を直接採取し解析すること

は困難である。一方で、炎症・免疫といった全身疾患としての側面も注目されており、患者血液サンプルの解析により得られるデータは有用であると考えている。

図1 もやもや病発症と多彩な臨床型に関連が想定される因子

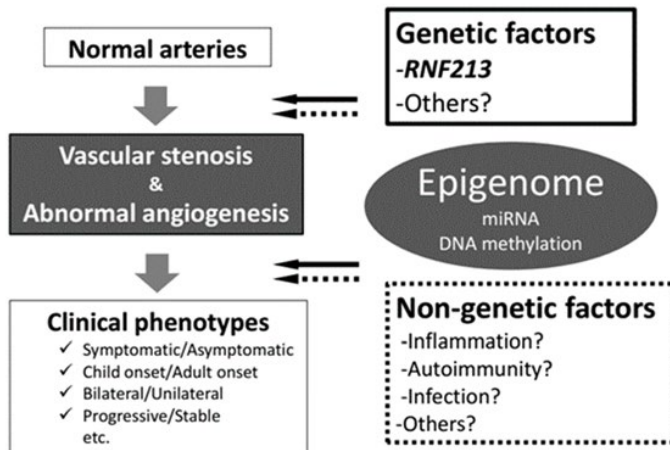
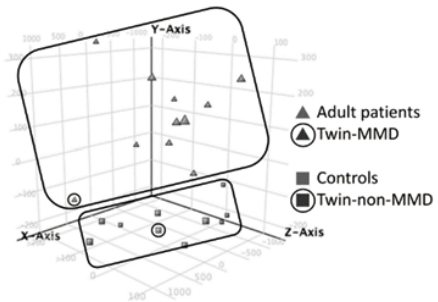


図2 microRNA 発現の主成分解析



2. 目的

本計画では、microRNAとともに主要なエピゲノム機構であるDNAメチル化解析によって、もやもや病特有のDNAメチル化状態、それにより制御される遺伝子や生物学的機能を分析し、発症機序・病態の解明につなげることを主目的とする。

3. 方法

患者群および健常群の末梢血白血球DNAを抽出し、TaqMan assayによるRNF213遺伝子型解析を行う。RNF213変異型とRNF213野生型の患者、および年齢・性別をマッチさせた健常者をそれぞれ層別化し、患者20名、健常者20名（計40名）を解析対象とする。この中に、我々がサンプルを保有する表現不一致一卵性双生児、および両親と兄弟の希少家系も対象として加える。抽出したDNAを用いて、マイクロアレイ（Illumina Infinium Human MethylationEPIC Bead-Chip）による全ゲノム網羅的メチル化データを取得する。GenomeStudio software（Illumina）にてデータ処理を行い、各部位のメチル化状態を評価する。まずはクラスター解析により患者群と健常群のメチル化状態の差を概観する。さらに、メチル化状態の異なる個別の領域を比較し、患者群に特有のメチル化変動遺伝子を同定する。その遺伝子リストからGene Ontology解析、パスウェイ解析を行い、本疾患において発現制御される遺伝子、その分子生物学的機能を検証する。対象者をRNF213遺伝子型で層別化することにより、RNF213「野生型」患者、RNF213「変異型」健常者の表現型とDNAメチル化状態がどのように関連しているのか、つまりこれまで未知であったRNF213遺伝子型と表現型の不一致の機序、それに対するDNAメチル化の関連性を検証することが可能である。さらに表現不一致一卵性双生児ペアを含む家系解析では、発症に関わるDNAメチル化部位ないしは発症修飾因子の核心に迫ることができる可能性がある。

分子生物学的機能解析の結果、病態や診断において、より重要で関連性が高いと考えられるメチル化部位に関しては、pyrosequencing assayによって定量解析を行う。特に各対象群におけるRNF213発現制御領域のメチル化状態に着目し、RNF213発現と疾患発症の関連についても検証する。

4. 進捗

申請者らは、所属施設のバイオバンクと連携し、もやもや病患者および比較対照用健常者の血液などの生体試料、および付随する詳細な臨床情報の集積システムを構築している。患者群および健常群、合わせて250名以上で、末梢血白血球DNAを抽出し、Taqman assayによるRNF213遺伝子型解析を実施した。この中から対象を選択し、マイクロアレイによるDNAメチル化解析を進めていく予定である。