

43. もやもや病モデルマウス開発と発症機構解明

小林 果

Key words : もやもや病, RNF213, 血管内皮,
トランスジェニックマウス

京都大学 大学院医学研究科
環境衛生学分野

緒 言

もやもや病は、頭蓋内内頸動脈終端部の狭窄と「もやもや血管」とよばれる代償的に形成される異常血管網によって特徴づけられる脳血管疾患であり、若年性脳卒中の主たる原因として知られている。近年、我々はもやもや病の感受性遺伝子として *RNF213* 遺伝子を同定し、p.R4810K が東アジアにおけるもやもや病の感受性多型であることを報告した¹⁾。p.R4810K 多型は日中韓のもやもや病患者において非常に高頻度に認められ、p.R4810K を有することによる発症リスクは 100 倍以上となる。

我々は *RNF213* 全長のクローニングを行い、E3-ligase 活性と ATPase 活性を併せ持つ非常にユニークなタンパク質であることを証明した。また、ゼブラフィッシュ *RNF213* 欠損モデルでは血管発生に関与することが示された²⁾。しかしながら、我々が作製した *Rnf213* ノックアウトマウスでは頭蓋内血管病変は認められなかったが、膵 β 細胞小胞体ストレスによる糖尿病モデルである Akita マウスと交配した結果、*Rnf213* 欠損は Akita マウスの糖尿病進行を改善することが証明され、*RNF213* が小胞体関連分解に何らかの役割を果たすことが示唆された³⁾。続いて我々は *RNF213* R4810K の機能解析を行った。p.R4810K を有するもやもや病患者より iPSC 細胞を作製し、血管内皮細胞 (iPSECs) への分化を行ったところ、患者 iPSEC で血管形成能の低下を認めた。*RNF213* R4810K の強制発現は血管内皮細胞株において血管形成能の低下を再現したが、興味深いことに siRNA による *RNF213* 抑制は血管形成能に影響を与えなかった³⁾。この結果はノックアウトマウスで脳血管異常を認めなかった点と矛盾しない。また、*RNF213* R4810K は細胞分裂 M 期を制御する MAD2 を阻害することで、有糸分裂異常およびゲノム不安定性を引き起こし、その結果細胞死を導くと考えられる⁴⁾。

以上の知見より、*RNF213* R4810K 発現が血管系細胞に与える影響を明らかにすることは、もやもや病の機構解明においてきわめて重要であると考えられる。本研究では、*RNF213* 変異体過剰発現の *in vivo* での脳血管への影響を評価する目的で、組織特異的 *RNF213* 変異体トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、低酸素による脳 angiogenesis を検討した。

方 法

野生型 (WT) あるいは p.R4757K (ヒト p.R4810K に相当) を有するマウス *Rnf213* と CAG プロモーター配列の間に loxP で挟まれた停止配列が存在するコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを直線化および精製した後、C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。出産後 genotyping により Transgene の起こったマウスを選択し、組織特異的 Cre 発現のために、血管内皮特異的 Cre 発現マウス (Tie2 kinase promoter/enhancer-Cre マウス) あるいは血管平滑筋特異的 Cre 発現マウス (smooth muscle protein 22-alpha promoter-Cre マウス) と交配を行い、血管内皮あるいは平滑筋特異的 *Rnf213* Tg マウスを作製した (図 1)。*Rnf213* の組織特異的な強制発現は血管内皮特異的 Tg マウスについては肺より単離した血管内皮細胞を、血管平滑筋特異的 Tg マウスについては大動脈を用いて Western Blotting 法により確認した (図 2)。

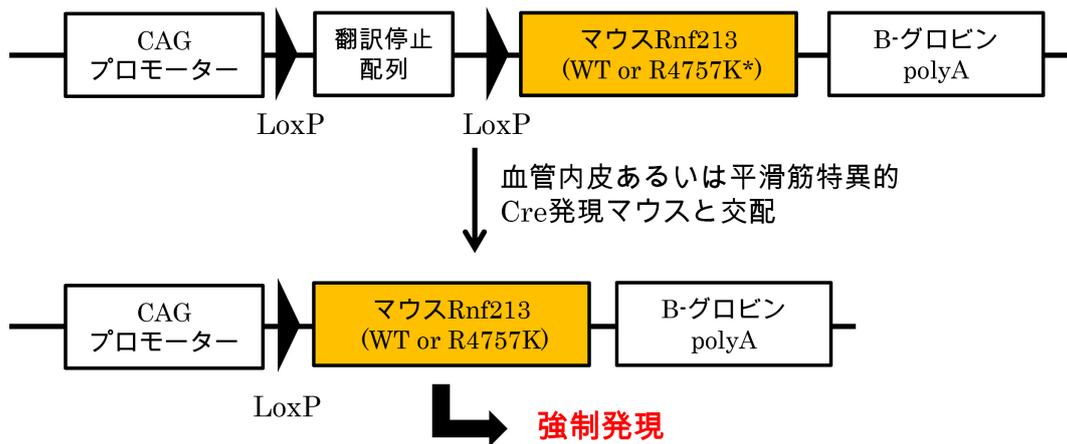


図1. 血管内皮あるいは平滑筋特異的 Rnf213 Tg マウスの作製方法.
*R4757K はヒト R4810K に相当する.

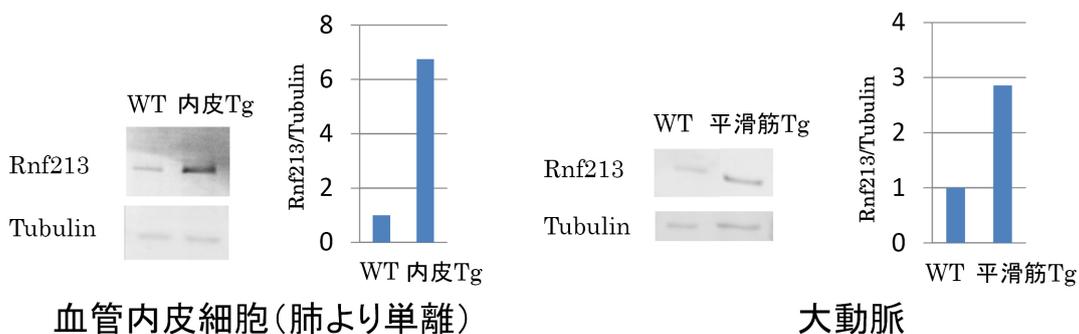


図2. Tg マウスにおける血管内皮あるいは平滑筋特異的 Rnf213 過剰発現.
Tubulin: internal control.

Rnf213 R4757K または Rnf213 WT を血管内皮特異的に発現する Tg マウス (① EC-Mut-Tg および② EC-WT-Tg), Rnf213 R4757K を血管平滑筋特異的に発現する Tg マウス (③ SMC-Mut-Tg), Rnf213 KO マウス (④ KO) および野生型マウス (⑤ WT) の5群のマウスを3週齢より2週間8%酸素下で飼育した後, 小動物用MRIによる脳血管画像解析を行った. さらに Glut1 免疫組織化学により大脳皮質の脳毛細血管数を計測し, angiogenesis を評価した.

結果および考察

MRA イメージングの結果, EC-Mut-Tg, EC-WT-Tg, SMC-Mut-Tg, KO, WT のいずれにおいても低酸素曝露による脳血管狭窄, もやもや血管の形成などの異常は認めなかった (図3). また, T2 強調イメージングによる梗塞巣の検出も行ったが, すべてのマウスに梗塞部位は認めなかった (図3).

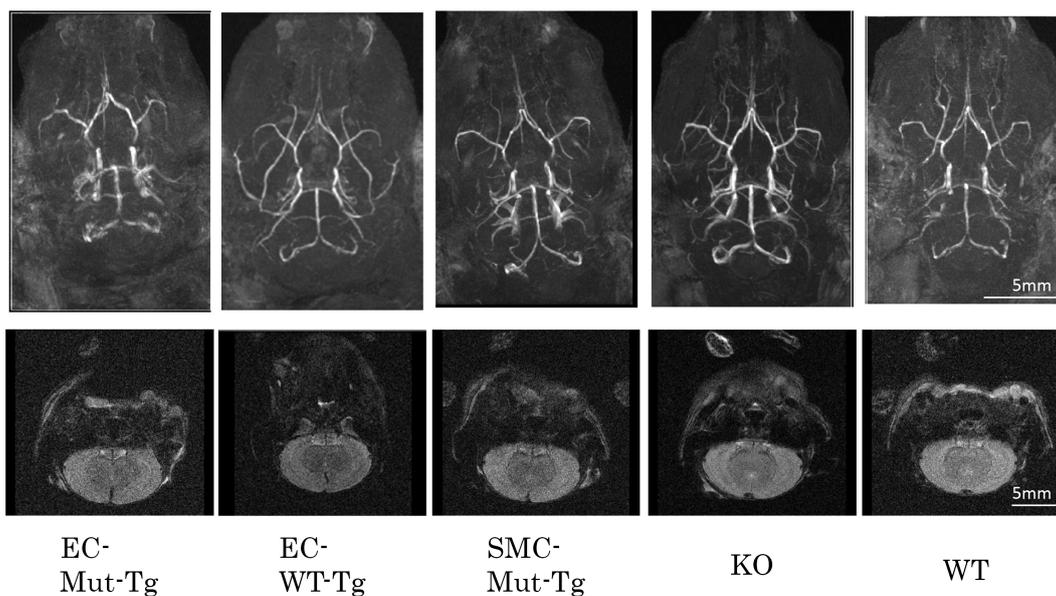


図3. 低酸素曝露した EC-Mut-Tg, EC-WT-Tg, SMC-Mut-Tg, KO および WT マウスの MRI イメージング.
上：代表的な MRA 画像, 下：代表的な T2 強調画像.

さらに、低酸素曝露による脳毛細血管数の変化を評価した結果、EC-Mut-Tg 以外のすべてのマウスで低酸素曝露により脳毛細血管が有意に増加したのに対し、EC-Mut-Tg では有意な増加を認めなかった (図4).

低酸素



通常酸素



EC-
Mut-Tg

EC-
WT-Tg

SMC-
Mut-Tg

KO

WT

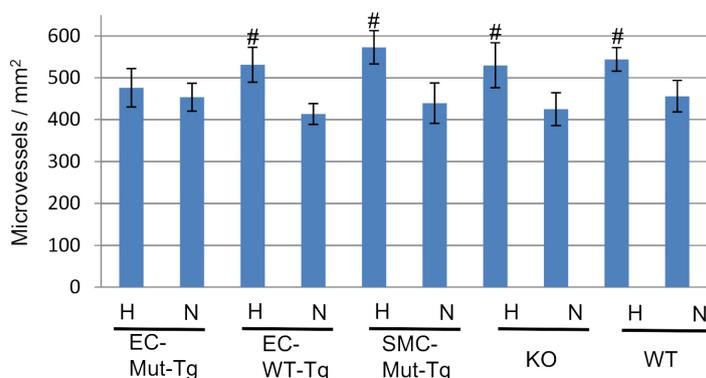


図4. EC-Mut-Tg, EC-WT-Tg, SMC-Mut-Tg, KO および WT マウスにおける低酸素曝露による angiogenesis.

上：代表的な大脳皮質毛細血管染色像（200倍画像），下：脳毛細血管数の定量化. H：低酸素, N：通常酸素. #p < 0.05 vs 通常酸素.

この結果は、マウスモデルにおいて、*in vitro*での結果と同様に、RNF213変異体の血管内皮発現が低酸素による angiogenesis を抑制することを示している。本研究は RNF213 R4810K 保有者は angiogenesis の低下を示すこと、さらに脳低酸素に対して感受性が高い可能性を示唆した⁵⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科の小泉昭夫および人見敏明、京都大学京都大学放射線生物研究センターの土生敏行である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 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, K. H., Fujiyama, A., Herzig, R., Krschek, B., Zou, L., Kim, J. E., 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.
- 2) Kobayashi, H., Yamazaki, S., Takashima, S., Liu, W., Okuda, H., Yan, J., Fujii, Y., Hitomi, T., Harada, K. H., Habu, T. & Koizumi, A. : Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **432** : 519-525, 2013.
- 3) Hitomi, T., Habu, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Harada, K. H., 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.
- 4) Hitomi, T., Habu, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Harada, K. H., 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.
- 5) Kobayashi, H., Matsuda, Y., Hitomi, T., Okuda, H., Shioi, H., Matsuda, T., Imai, H., Sone, M., Taura, D., Harada, K. H., Habu, T., Takagi, Y., Miyamoto, S. & Koizumi, A. : Biochemical and functional characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a susceptibility mutation of moyamoya disease, in angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Heart Assoc.*, **4** : e002146, 2015.