



令和4年3月18日

東京女子医科大学附属足立医療センター

脳動脈瘤の発生メカニズムに迫る遺伝要因の解明に成功！ 関連家系に次世代シーケンシング・機能分析で新たな感受性遺伝子を同定

公表ポイント

- 脳卒中の中で、くも膜下出血は依然として死亡率の高い危険な疾患です。その主な原因である脳動脈瘤の成因には遺伝的な関与も認識されていますが、解明には至っていません。
- この度、日本人家族性脳動脈瘤の某家系に対して次世代シーケンシング（Next-Generation Sequencing, NGS）や機能解析を行い、脳動脈瘤の新たな感受性遺伝子 *NPNT*、*CBY2* を同定しました。
- 結果として、家族性脳動脈瘤は同一家系であっても複数の遺伝要因で発症し、その遺伝背景は多彩で家系によっても異なることがわかりました。
- 本件の研究成果は脳動脈瘤に対する新たな治療法や予防法の開発につながることを期待されます。

【研究の概要】

近年の厚生労働省発表資料等によれば、脳卒中は年間死亡者数の上位第4位以内に位置していると言われています。この中でも特に死亡率が高いのがくも膜下出血です。くも膜下出血のおよそ8割は脳動脈瘤の破裂に起因し、出血により半数以上の患者が死亡あるいは重篤な後遺症を残す結果となります。さらにくも膜下出血の発生頻度には明確な国別地域間格差が存在し、世界的にも日本人は最も発症頻度が高いと報告されています（人口10万人当たり20人/年：脳卒中治療ガイドライン調べ）。脳動脈瘤の成因には、高血圧症や喫煙などの環境因子が関連していることはよく知られていますが、しばしば家族集積性を示すことがあり、遺伝要因の関与も認識されています。このように環境要因と遺伝要因が相互作用して発症に至るものが多因子疾患とされますが、要因となる遺伝子（感受性遺伝子）が特定できれば疾患の分子生物学的な成因が解明でき、新たな治療法や予防法の開発に結びつくことが期待されます。

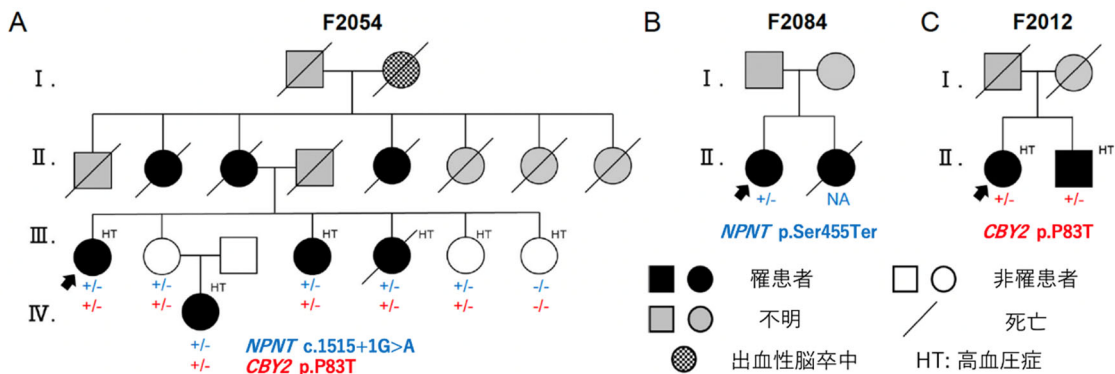
このような多因子疾患においてはゲノムワイド関連解析（Genome wide association study, GWAS）が標準的な遺伝解析手法であり、我々のチームも脳動脈瘤における世界初その他施設国際共同によるGWASに参画し、いくつかの感受性遺伝子を報告しています（Nat Genet.40:1472-7,2008; Nat Genet.42:420-5,2010; PNAS.108:19707-12,2011）。特に複数の日本人集団での解析で再現性があるものに *ANRIL* (9p21.3)や *EDNRA* (4q31.23) 遺伝子座があります。いずれも脳動脈瘤の成因に動脈硬化の機序が関連することを示しておりました。

しかしながら一方で、GWASで特定される感受性遺伝子座単独での効果サイズは小さいこと（脳動

脈瘤ではオッズ比にして 1.2~1.3 程度)、GWAS のような頻度の高い多型の解析では捉えられない遺伝要因 (いわゆる missing heritability) が存在することが問題点として認識されるようになりました。そのため、最近では次世代シーケンサーを駆使して集団での頻度が低く効果サイズの高いレア・バリエーションの解析も行われるようになってきています。欧米の研究班からは、もやもや病の感受性遺伝子として知られる *RNF213* 遺伝子や循環血管新生誘導因子をコードする *ANGPTL6* 遺伝子のレア・バリエーションとの関連が報告され始めています (Am J Hum Genet.99:1072-85,2016; 102:133-41,2018)。

我々はこれまで家族性脳動脈瘤の家系を収集してきましたが、このうち 3 世代にわたって 7 人の患者を生じた大家系に注目しました (図 1)。本研究では、まず網羅的に次世代シーケンシング (Next-Generation Sequencing, NGS) を行い、検出された候補遺伝子をリシーケンシングで詳細に解析し、脳動脈瘤の病態解明のための新たな感受性遺伝子の発見を目指しました。

図 1. 家系図



【研究の内容】

本家系 (F2054) から罹患者 4 人・非罹患者 3 人に NGS を行いました。有害な変異が罹患者で共有される候補遺伝子が 7 個検出されましたが、そのうち特に変異の有害度の指標が最も高かった *NPNT* (Nephronectin) と *CBY2* (Chibby family member 2) に着目しました (表 1)。

NPNT は細胞外マトリクスの蛋白質ネフロネクチンをコードし、インテグリン $\alpha 8/\beta 1$ の機能的なリガンドで腎臓の発達に欠かせないほか、いくつかのインテグリンを結びつけて細胞接着などに関与するとされています。*NPNT* の異常は血管内皮機能に影響し、正常な血管新生が阻害されることが報告されており (Scientific Report 2016 Oct 26;6:36210)、本研究でははまず機能解析を行いました。

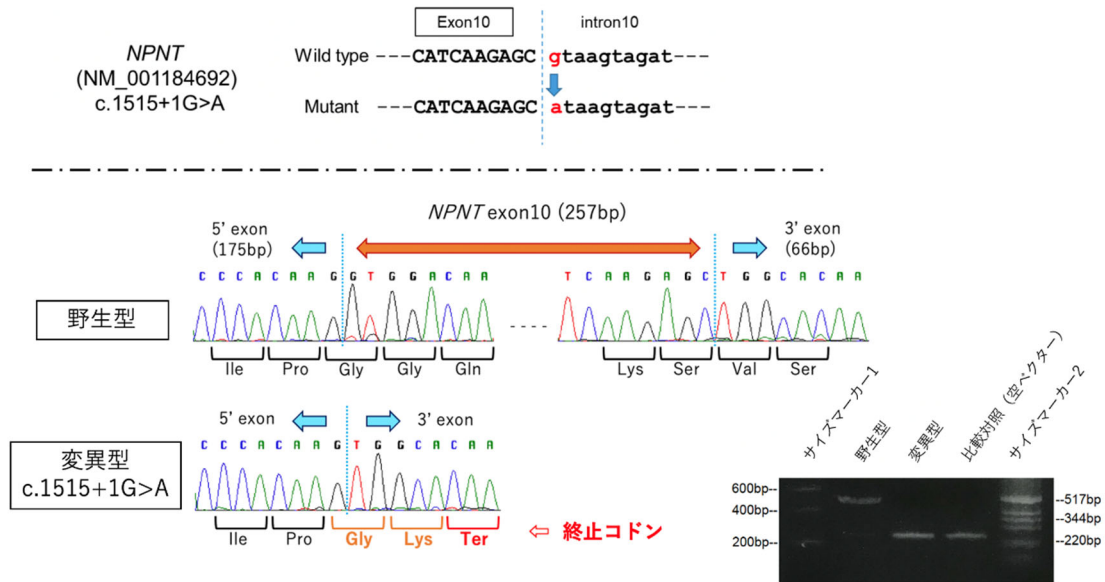
表 1. F2054 家系から確認された 7 つの代表的な候補遺伝子

遺伝子	配列変化	dbSNP	遺伝子型								IBD セグメント (幅 cM) 共有されたメンバー	CADD v1.2	HGVD ver.1.42	gnomAD exome
			III-1	III-2	III-4	III-5	III-6	III-7	IV-1					
<i>ALB</i> [NM_000477]	c.1490T>A (p.V497D)	-	T/A	T/A	T/A	T/A	T/T	T/T	T/A	chr4:59692718-75681216 (11.13cM) III-1,2,4,5,IV-1	14.4	0	0	
<i>NPNT</i> [NM_001184692]	c.1515+1G>A (exon10 skipping)	rs776559543	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/G	G/A	chr5:78334484-113356961 (33.07cM) III-1,2,4,5,IV-1	27.2	0	0.0002	
<i>ANKRD55</i> [NM_024669]	c.115G>C (p.D39H)	rs201139565	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/G	G/C	chr5:55352770-60941929 (5.61cM)	18.77	0.0064	0.0008	
<i>ACTBL2</i> [NM_001017992]	c.223G>A (p.G75R)	-	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/G	G/A	III-1,2,4,5,IV-1	14.57	0	0	
<i>HOXC6</i> [NM_004503]	c.250C>T (p.L84F)	rs767298048	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T	chr12:53153129-55342935 (3.07cM)	21.7	0	<0.0001	
<i>NCKAP1L</i> [NM_005337]	c.A248A>G (p.E83G)	-	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/A	A/G	III-1,2,4,5,IV-1	22.3	0	0	
<i>CBY2</i> [NM_001286342]	c.247C>A (p.P83T)	rs200515699	C/A	C/A	C/A	C/A	C/A	C/C	C/A	chr13:40852484-4635951 (7.20cM) III-1,2,4,5,IV-1	26.6	0.0018	0.0005	

dbSNP: 一塩基多型のデータベース (NCBI提供)、IBD: 同祖断片、CADD: ヒトゲノムの一塩基バリエーションおよび挿入/欠損による有害性をスコア化したもの
HGVD: 日本人健康者のゲノム配列を解析したデータベース (京都大学)、gnomAD: ゲノムデータを集約したデータベース

今回検出された *NPNT* のスプライスドナー部位の変異 c.1515+1G>A を minigene assay で詳細に解析したところ、この変異は異常なスプライシングを引き起こして第 10 エクソン全体を skipping させることが確認されました (図 2)。第 10 エクソン欠失では図 2 のクロマトグラムのように下流で早期に終止コドンとなり、ハプロ不全を来すことが確認され、明らかな機能喪失型変異であることがわかりました。

図 2. *NPNT* exon10 スプライシング部位変異の解析



一方、*CBY2* は cDNA ライブラリーを確認すると主に精巣に分布しているとされていますが、脳でも少し見られることが記されています。しかしこれまでに脳動脈瘤や血管疾患との関わりが報告されておらず、病態との関連が不明なため、より詳細に解析を行いました。免疫組織学的検討では脳血管平滑筋に発現しており、*CBY2* の isoform 2 に特異的でした (図 3)。*CBY2* で検出されたミスセンス変異 p.Pro83Thr について生細胞イメージングによる機能解析を行ったところ、赤色蛍光タンパク発現では変異により細胞質内での異常凝集が引き起こされました (図 4)。さらに *CBY2* の変異は他の動脈瘤家系や孤発症例からも検出されていたため、追加脳動脈瘤患者 500 例、対照 323 例を用いて *CBY2* 全域のリシーケンシングを行いました。そこで 3 つの有害なレア・バリエント (p.Arg46His、p.Pro83Thr、p.Leu183Arg) が確認され、対照(0/323)と比較して脳動脈瘤患者群(8/501)で有意に多く検出されました (P=0.026) (表 2)。

図 3. 脳動脈の免疫組織化学染色

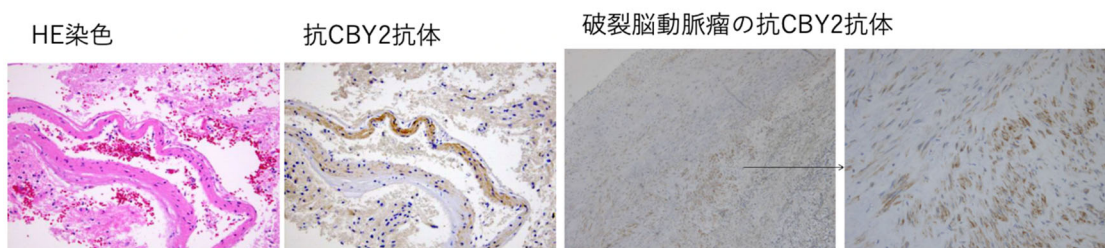


図 4. COS7細胞でCBY2-DsRed融合タンパク質を発現させる生細胞イメージング解析

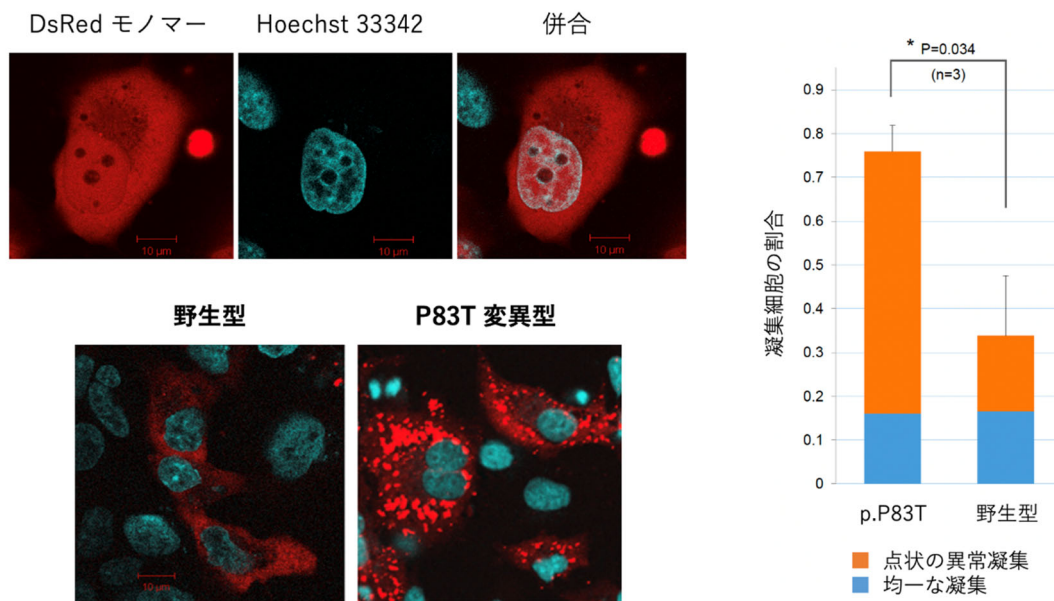


表2. CBY2で検出されたレアバリエントの関連解析

Locus	ヌクレオチド変化	アミノ酸変化	dbSNP	No. of detected subjects			SIFT	PolyPhen2 HumDiv
				家族例 (154例)	孤発例 (347例)	コントロール (323例)		
Exon3	c.137G>A	p.R46H	rs1248037417	1	0	0	Deleterious	Probably Damaging
Exon3	c.247C>A	p.P83T	rs200515699	2	3	0	Deleterious	Probably Damaging
Exon3	c.456G>C	p.M152I	rs1370354284	0	1	0	Tolerated	Benign
Exon3	c.548T>G	p.L183R	rs533443725	1	1	0	Deleterious	Probably Damaging
Exon3	c.919G>C	p.A307P	-	0	0	1	Tolerated	Possibly Damaging
有害な変異の総数				4	4	0		
総和検定 Burden association test				p=0.026 (対 全症例), p= 0.011 (対 家族例)				

Exon : 翻訳配列 (遺伝情報がコードされている部分)、dbSNP : 一塩基多型のデータベース (NCBI提供)
 SIFT、PolyPhen2 : 変異によって起こるアミノ酸置換がタンパク質の機能に与える影響を評価
 Deleterious : 有害、Tolerated : 影響なし、Probably Damaging : 高確率で有害、Possibly Damaging : 低確率で有害、Benign : 良性

結論として NPNT と CBY2 の変異が、それぞれ脳血管内皮および平滑筋細胞の機能障害を惹起して脳動脈瘤の発生に寄与すると考えられ、NPNT と CBY2 は脳動脈瘤の新しい感受性遺伝子であることが示唆されました。このことから家族性脳動脈瘤は同一家系であっても複数の遺伝要因で発症し、その遺伝背景は多彩で家系によっても異なることが明らかになりました。本研究のように脳動脈瘤発生率が高い家系を中心に精緻な分析を行い、脳動脈瘤の高度な遺伝的異質性や多因子要因を明らかにし、今後脳動脈瘤に対する新たな治療法や予防法が開発されることが期待されます。

【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

前川達哉 (マエガワ タツヤ)

東京女子医科大学附属足立医療センター 脳神経外科 助教

〒123-8558 東京都足立区江北 4-33-1

Tel : 03-3857-0111 Fax :03-6807-1956

E-mail : maegawa.tatsuya@twmu.ac.jp

(2022年4月1日以降 tmaegawa430@hotmail.com)

<報道取材に関すること>

東京女子医科大学 広報室

〒162-8666 東京都新宿区河田町 8 - 1

Tel : 03-3353-8111 Fax : 03-3353-6793

E-mail: kouhou.bm@twmu.ac.jp

【プレスリリース情報】

1. 掲載誌名 : 「PLOS ONE」
2. 論文タイトル : Whole-exome sequencing in a Japanese multiplex family identifies new susceptibility genes for intracranial aneurysms
3. 著者名 ; 所属 :
前川達哉 ; 足立医療センター 脳神経外科 助教、総合医科学研究所 兼務
赤川浩之 ; 総合医科学研究所 准教授、足立医療センター 脳神経外科 准教授 (兼任)
恩田英明 ; 甲府脳神経外科病院 脳神経外科 部長、足立医療センター 脳神経外科 非常勤講師
糟谷英俊 ; 足立医療センター 脳神経外科 教授
4. 論文のオンライン掲載日 2022年3月17日 (現地時間)