

# もやもや病における病態仮説two hit theoryの検証 遺伝学的異常および抗原プロセッシング機構の異常 の検討

著者	田代 亮介
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19113号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129208">http://hdl.handle.net/10097/00129208</a>

博士論文

もやもや病における病態仮説 two hit theory の検証

— 遺伝学的異常および抗原プロセッシング機構の異常の検討

—

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

神経・感覚器病態学講座神経外科学分野

田代亮介

## 目次

[1]要約	2
[2]研究背景	6
[3]研究目的	12
[3]研究方法	12
[4]研究結果	22
[5]考察	28
[6]結論	35
[7]謝辭	36
[8]文献	39
[9]図	50
[10]表	69

## [1] 要約

【背景】もやもや病は頭蓋内内頸動脈終末部の狭窄をきたし、側副血行路としての脳底部もやもや血管の増生を特徴とする脳血管疾患である。比較的稀な疾患であるが、小児・若年成人の脳卒中の原因疾患である。その病態は未解明であり、疾患感受性遺伝子 *ring finger protein 213* (*RNF213*)等の遺伝学的要因、血管内皮細胞・血管形態の異常に加え、感染・放射線等の環境要因が重なって発症する two hit theory が提唱されている。慢性進行性の病態であり、自己免疫疾患との併発が多く、慢性炎症を基盤とする病態と考えられることから、本研究ではもやもや病患者における *human leukocyte antigen* (*HLA*) 遺伝子の異常 (研究 1)、および疾患感受性遺伝子として同定された *RNF213* 遺伝子の血管病変との関連 (研究 2) および免疫機構における役割 (研究 3) を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

研究 1: 超高解像度 DNA タイピング法を用いた次世代シーケンシングによりもやもや病患者 136 例の *HLA* クラス 1 およびクラス 2 (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPB1*) を決定した。また、expectation maximization algorithm を用いてハプロタイプ推定を行なった。さらに、*HLA* アリルと臨床所見の関連を解析した。



**研究 2:** もやもや病患者 58 例、椎骨動脈解離患者 24 例、健常者 48 例の *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を解析した。

**研究 3:** *Rnf213* 遺伝子ノックアウト (*Rnf213*-KO) マウス、ヒト *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A のオーソログを相同部位に挿入した *Rnf213* 遺伝子ノックイン (*Rnf213*-KI) マウス骨髄由来樹状細胞によるエンドサイトーシスおよび抗原プロセッシング、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の活性化および増殖能を評価した。

#### 【結果】

**研究 1:** 日本人もやもや病では *HLA-DRB1\*04:10* アリル(アリル頻度 もやもや病患者 4.77% vs コントロール 1.47%;  $p = 1.7 \times 10^{-3}$ ; オッズ比 3.35)、*HLA-DRB1\*04:10-DQB1\*04:02* ハプロタイプ(ハプロタイプ頻度 もやもや病患者 4.41% vs コントロール 1.35%;  $p = 2.0 \times 10^{-3}$ ; オッズ比 3.37)の頻度が有意に高かった。また、*HLA-DRB1:04:10* を有するもやもや病患者では甲状腺疾患の併発が有意に多かった。

**研究 2:** *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を 69%(40/58)のもやもや病患者で認めたのに対して、椎骨動脈解離患者では 0% (0/24)と *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を有する患者が少なかった( $p < 0.001$ )。

**研究 3:** *Rnf213*-KO、*Rnf213*-KI マウス 樹状細胞では抗原のエンドサイトーシス能の低下、抗原蛋白質分解能の低下、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞活性化能お

よび増殖能の低下を認めた。

【結論】(1) 日本人もやもや病では *HLA-DRB1\*04:10* アリル、*HLA-DRB1\*04:10-DQB1\*04:02* ハプロタイプの頻度が有意に高く、(2) *HLA-DRB1\*04:10* アリルは甲状腺疾患併発と関連した。また、*RNF213* 遺伝子は、(3) 椎骨動脈解離との関連は低く、もやもや病との関連が強いこと、(4) *RNF213* 異常により抗原プロセッシング能の低下、抗原特異的 T 細胞応答が低下することが明らかとなった。さらに、(5) ヒト *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A のオーソログを強制発現した *Rnf213* ノックインマウスは *Rnf213* 欠損マウスと類似した表現型を示し、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は機能喪失型変異であることが示唆された。上記結果より、*RNF213* 遺伝子異常に起因する抗原プロセッシング機構の異常を基盤として、*HLA-DRB1\*04:10* と関連する自己免疫応答や感染等の二次的要因が加わることで前方循環系を主体とする血管狭窄性・閉塞性病変であるもやもや病の発症に至る可能性が示唆された。

## [2]研究背景

もやもや病は、頭蓋内内頸動脈終末部に慢性進行性の狭窄をきたし、側副血行路として脳底部に異常血管網（脳底部もやもや血管）が形成される疾患である<sup>1-2)</sup>（図 1(a)-(c)）。小児、若年成人における脳梗塞および脳出血をきたす原因疾患であり<sup>2)</sup>（図 1(d)(e)）、厚生労働省の指定難病である。疾患概念の確立から約半世紀が経過するが、その病態解明は未だ不明である<sup>2)</sup>。

もやもや病は、我が国をはじめ東アジアに患者が集積しており、10-15%程度の患者が家族歴を有することから遺伝学的要因を中心に研究が展開されてきた<sup>2-4)</sup>。もやもや病患者の全ゲノム解析により、2011年に第17番染色体長腕に存在する ring finger protein (*RNF213*) 遺伝子が疾患感受性遺伝子として同定され、遺伝子多型 *RNF213* p.R4810K が創始者変異であることが Kamada らの先行研究により明らかとなった<sup>3)</sup>。ほぼ同時に Liu らも同一の遺伝子多型がもやもや病の疾患感受性遺伝子として報告した<sup>4)</sup>。東アジア人もやもや病患者の 70-90%が遺伝子多型 *RNF213* p.R4810K を有しており、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A がオッズ比 190.6 ともやもや病と強く関連し<sup>3)</sup>、特にホモ型で遺伝子多型 *RNF213* p.R4810K を有するもやもや病患者は早期発症で重症型が多いことが報告されていることから<sup>5)</sup>、もやもや病の病態を解明するうえで、*RNF213* 遺伝子の機能、特に *RNF213* 遺伝子多型 p.R4810K の生理的意義を明らかにするこ

とが不可欠と考えられる。

もやもや病の病態形成には複合的な要因の関与が疑われる。もやもや病の病態には *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A をはじめとする遺伝学的要因の他に、血管発生学的な異常の関与<sup>6)</sup>、血管内皮細胞の障害<sup>7)</sup>、血管内皮増殖因子や matrix metalloproteinase-9 等の液性因子<sup>8-9)</sup>の関与が指摘されているが、いずれも単独因子ではもやもや病の病態を再現できず、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A をはじめとする遺伝学的異常を基盤として、感染、放射線、慢性炎症や血管内皮細胞の異常が加わることによりもやもや病を発症するとの仮説”two hit theory”が提唱されている<sup>10-12)</sup> (図 2)。病変部位における炎症細胞の直接浸潤は否定的であるが<sup>13-15)</sup>、もやもや病が慢性進行性に血管狭窄をきたすこと<sup>1-2)</sup>、甲状腺機能異常や糖尿病等の自己免疫疾患との併発が多く<sup>16-17)</sup>、*HLA* アリルとの関連が報告されていること<sup>18-22)</sup>、患者血清中の soluble CD163 濃度が上昇していること<sup>23)</sup>、さらに *RNF213* 遺伝子ノックアウトマウスにおいて制御性 T 細胞の減少を認めること<sup>24)</sup>から、免疫寛容の破綻に起因する慢性炎症の存在が、もやもや病における血管狭窄性病変の形成に重要な役割を果たしていると考えた。

そこで、まず多くの自己免疫疾患との関連が指摘されている *human leukocyte antigen(HLA)* に着目した。*HLA* 遺伝子座は、疾患感受性や免疫応答に深く関与し、自己免疫疾患における免疫寛容機構の破綻の基盤となる抗原提

示細胞による T 細胞の刺激機構を理解する上で重要である<sup>25)</sup>。*HLA* 遺伝子座ともやもや病との関連が検討されてきたが、一貫した結果は得られていない<sup>18-22)</sup>。その要因としては、いずれの研究も少数例の検討であることに加えて、血清学的手法や polymerase chain reaction (PCR)法に基づく手法であり遺伝子型の決定が不正確であったことが挙げられる<sup>18-22)</sup>。従来行われてきた Sequence-based typing (SBT)、sequence-specific oligonucleotide (SSO) typing は年々増加する新規 *HLA* アリルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足しているため、いくつかの候補アリルが存在した場合に、単一のアリルに絞り込むことができず、日本人における *HLA* アリル頻度を参照して頻度の高いアリルを最も可能性の高いアリルと判定する「みなしタイピング」が行われてきた。また、2つの多型部位が同一染色体上か、異なる染色体上に位置するのか判定困難である、いわゆる phase ambiguity が生ずる可能性があり<sup>26-27)</sup>、本研究では、エンハンサー・プロモーター領域からすべてのエクソンおよびイントロン領域を網羅する遺伝子全領域を PCR 増幅させ、上記 2 つの問題点を克服した超高解像度 DNA タイピング法(SS-SBT: super-high-resolution single-molecule sequence-based typing)法を用いた次世代シーケンシング<sup>26-27)</sup>により *HLA* 遺伝子座の解析を行なった。

*RNF213* 遺伝子ともやもや病の疾患感受性遺伝子として同定され、研究が進め

られてきたが、RNF213 の生理学的機能およびもやもや病の病態における役割は未だ不明点が多い。RNF213 は AAA<sup>+</sup> ATPase domain と ring finger domain の 2 つのドメインを有することが明らかとなった<sup>3)</sup>。AAA<sup>+</sup> ATPase domain は ATP との結合および加水分解サイクルを通じて、ATP のリン酸結合の化学エネルギーを物理エネルギーに変換させタンパクの高次構造を変化させると報告されている。また、ring finger domain は、蛋白質の分解に関わる E3 リガーゼ機能を有する。これまでに RNF213 が、血管内皮細胞において PI3K-AKT 経路の下流因子であること<sup>28)</sup>、IFN- $\beta$  シグナル経路のメディエーターであること<sup>29)</sup>、protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP1B)により RNF213 の発現が制御され非ミトコンドリア酸素消費の調節に関わること<sup>30)</sup>が報告されている。また、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を有するもやもや病患者の induced pluripotent stem cell を用いた解析では、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A により染色体不安定性の上昇、血管新生能の低下をきたすことが報告されているが<sup>31-32)</sup>、*RNF213* 遺伝子の異常、特に *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A ともやもや病発症との因果関係は未解明である。実際、*Rnf213* 遺伝子ノックアウトマウス (*Rnf213*-KO マウス)、およびヒト p.R4810K のオーソログ p.R4757K を強制発現したトランスジェニックマウス (*Rnf213*-KI マウス) では、もやもや病でみられる頭蓋内内頸動脈の狭窄や異常血管網の増生は認めなかった<sup>33-34)</sup>。RNF213

および *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の生理的機能およびもやもや病の病態との関連を明らかにする必要がある。

*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は、その後、もやもや病のみならず頭蓋内主幹動脈狭窄病変<sup>35)</sup>や冠動脈病変<sup>36)</sup>、肺動脈狭窄症<sup>37)</sup>との関連が指摘され、*RNF213* 遺伝子が種々の血管病変と関連する可能性が指摘されている。もやもや病は、頭蓋内前方循環系の血管狭窄・閉塞性変化を主体とする病変であり、発生的な観点から神経堤細胞由来の原始内頸動脈系に血管狭窄をきたす疾患であるとの仮説が提唱されている<sup>6,38)</sup>。そこで、本研究ではまず、後方循環系を主体とする椎骨動脈解離患者における *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を解析することで、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A と血管病変との関連を明らかにすることを企図した（研究2）。

また、*RNF213* の免疫寛容機構破綻への関与は明らかとなっていない。*RNF213* が有する E3 ユビキチンリガーゼは、リンパ球の分化・活性化、抗原提示、サイトカインによるシグナル伝達等免疫機構の制御に多面的に作用することが知られており<sup>39-46)</sup>、*Rnf213* 遺伝子ノックアウトマウスで制御性 T 細胞の減少を認めただことから<sup>24)</sup>、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A が慢性炎症および免疫寛容機構破綻の基盤となっている可能性が考えられた。*RNF* ファミリーに属する Membrane-associated RING-CH protein 1 (MARCH1) は、抗原提示細胞や B 細

胞で発現しており、初期エンドソームによる抗原の分解、HLA-DM による MHC II-ペプチド複合体の形成に関与すると報告されている<sup>41-42)</sup>。また、E3 ユビキチンリガーゼ Casitas B lineage lymphoma protein (Cbl)は Syk を介した B 細胞シグナル経路に<sup>45-46)</sup>、E3 ユビキチンリガーゼ pallbearer-Skp Cullin F box (Pall-SCF)はマクロファージに発現し貪食に関与することが報告されている<sup>47-48)</sup>。

Kanoke らは、*Rnf213* 遺伝子 KO マウスにおいて免疫賦活後の制御性 T 細胞の誘導低下を示しており、*Rnf213* 遺伝子異常により、抗原刺激に応答し T 細胞の分化誘導・活性化を行う抗原提示細胞の異常をきたす可能性が考えられた<sup>24)</sup>。

近年、中国人もやもや病患者でのゲノムワイド関連解析でもやもや病との関連が示唆された遺伝子座は、免疫組織、特に抗原提示細胞との関連が強いことが明らかとなった<sup>49)</sup>。抗原提示細胞は、エンドサイトーシスにより抗原を取り込んだ後に、細胞内プロセッシングを経て、major histocompatibility (MHC)上に抗原提示し、T 細胞にシグナルを伝える (図 3) ことから、E3 ユビキチンリガーゼドメインを有する RNF213 が、抗原提示細胞による抗原の貪食やプロセッシング機構に関与する可能性を考えた。本研究では *Rnf213* 遺伝子ノックアウトマウスおよび *Rnf213* 遺伝子ノックインマウスを用いて、RNF213 の抗原プロセッシング機構への関与を検証した (研究 3)。



### [3] 研究目的

本研究では、第一に自己免疫疾患との関連が多く報告されている *HLA* アリルおよびハプロタイプと日本人もやもや病との関連を明らかにし、免疫寛容機構破綻の基盤となる抗原提示細胞による T 細胞刺激機構を明らかにするため、もやもや病と *HLA* アリルの関連を明らかにすることを企図した (研究 1)。次いで、疾患感受性遺伝子 *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の血管病変形成との関連を明らかにするため、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A と椎骨動脈解離との関連を調べ、頭蓋内血管病変と *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の関連を明らかにすることとした (研究 2)。さらに、抗原提示細胞である樹状細胞の抗原プロセッシング機構への *RNF213* の関与を明らかにするため、*Rnf213* 遺伝子改変マウス由来の樹状細胞を用いて抗原プロセッシング機構における役割を明らかにすることを目的とした (研究 3)。

### [4] 研究方法

#### (1) もやもや病・椎骨動脈解離患者検体の採取

東北大学病院および広南病院で 2014 年から 2018 年にかけて患者検体を収集した。もやもや病の診断は、もやもや病 (ウイリス動脈輪閉塞症) 診断・治療ガイドラインおよびもやもや病 (ウイリス動脈輪閉塞症) 診断・治

療ガイドライン<sup>2)</sup>に基づいて行った (図 1(a)-(b))。椎骨動脈解離の診断は Magnetic resonance angiogram(MRA)、basiparallel anatomical scanning (BPAS) 、 T1 強調画像 MRI により行った。脳血管撮影を一部の症例で施行した (図 4)。板橋らの報告に基づき、MRA (脳血管撮影施行症例では脳血管撮影) および BPAS における pearl and string sign、紡錘状拡張、瘤様拡張等の血管径の変化を認め (図 4(a)(b))、また T1 強調画像における壁内血腫および内膜剥離の所見を有する場合 (図 4(c)(d))、椎骨動脈解離と診断した<sup>50)</sup>。椎骨動脈低形成は椎骨動脈解離の診断から除外した。脳血管病変の診断は、2 名以上の脳神経外科医師、放射線科医師、脳神経内科医師が行なった。136 名のもやもや病患者、24 名の椎骨動脈解離患者、48 人の脳血管病変を有さない健常者から検体を採取した。本研究はヘルシンキ宣言に則り、全ての被験者から (小児の場合は保護者から) 文書による同意を得て行われた。また、本研究は、東北大学大学院医学系研究科および広南病院両施設の研究倫理委員会で承認のうえ施行された。

## (2) DNA 抽出

ヒト唾液検体は Oragene self-collection kit (OG-500: DNA Genotek Inc., Ontario, Canada)を用いて、またヒト末梢血検体は ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) および抗凝固剤入り採血管を用いて被験者より採取した。唾液検体は 50°Cで培

養後、RNase で処理した。QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて DNA 抽出した。

### (3) *HLA* アリルの決定

Inoko らが開発した超高解像度 DNA タイピング法(SS-SBT)を用いた次世代シーケンシングにより *HLA* アリルを決定した<sup>26-27)</sup>。方法の概略を図 5 に示す。400 ng のゲノム DNA を PCR 反応に利用した。(1) 94°C、2 分間の変性後、98°C、10 秒間の変性と 60°C、20 秒間のアニーリング反応および 68°C、5 分間の伸長反応を 30 サイクル行なった(*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*)。 (2) 94°C、2 分間の変性後、98°C、10 秒間の変性反応および 70°C、5 分間のアニーリング反応を 30 サイクル行なった(*HLA-DRB1*, *HLA-DPB1*)。 (3) 94°C、2 分間の変性後、98°C、10 秒間のアニーリング反応および 70°C 9 分間を 30 サイクル行なった(*HLA-DQB1*)。 Long-range PCR 反応は、サーマルサイクラー Gene Amp PCR システム 9700 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて行った。 Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, CA, USA)により PCR 産物を精製し、Quant-iT Picogreen dsDNA アッセイキット(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)により定量した。次いで、PCR 産物を Ion Plus Fragment Library キットにて標識後、Ion Torrent Personal Genome Machine DNA シーケンシングキット(Life Technologies)を用い

てシーケンシングを行なった。次世代シーケンスのリードデータを、Sequence Based Assigning Software (SeaBass)を用いて 8 桁レベルで *HLA* アリルの決定を行なった。

#### (4) 健常者 *HLA* データベース

健常者の *HLA* データベースは *HLA* & *KIR* Imputation Network (HKimpnet)のデータベースを参照した<sup>51-52)</sup>。健常者検体は 1990 年から 2018 年にかけて収集したものであり、大半の被験者は関東地区在住者である。*HLA* クラス I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*)、*HLA* クラス II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPB1*)アリルは、Luminex multianalyte profiling system xMAP (Luminex Corp., Austin, TX, USA), WAKFlow *HLA* Typing Kit (Wakunaga Pharmaceutical, Osaka, Japan)、LAB-Type SSO *HLA* kit (One Lambds, Canoga Park, CA, USA)により決定した。全ての *HLA* アリルは 4 桁レベルで決定した。

#### (5) ハプロタイプの推定

Bridging Immuno Genomic Data-Analysis Workflow Gaps (BigDAWG)を用いて、2 遺伝子座(*HLA-A-HLA-B*, *HLA-DRB1-HLA-DQB1*)、3 遺伝子座(*HLA-A-HLA-B-HLA-C*, *HLA-DRB1-HLA-DQB1-HLA-DPB1*)のハプロタイプ推定を行なった<sup>53)</sup>。

期待値最大化法(expectation maximization algorithm)により推定されたハプロタイプ頻度を元に、異なる遺伝子座間の連鎖不平衡解析を行なった<sup>54-55</sup>。

#### (6) ヒト *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の解析

*RNF213* 遺伝子多型 rs112735431

([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=112735431](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=112735431))

の解析は、StepOnePlus real-time polymerase chain reaction (PCR) system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いた TaqMan SNP genotyping assay (Assay ID: C\_153120198\_10; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)により行った。

Applied Biosystems® TaqMan® Genotype™を用いて *RNF213* 遺伝子多型

c.14576>A を判定した。なお、被験者の表現型を知らされていない研究者が

*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を判定した。

#### (7) 実験動物

本研究で使用した実験動物は国立大学法人東北大学における動物実験棟に関する規定に従って扱われ、研究計画は東北大学動物実験センターおよび遺伝子実験センター承認のもと行われた。実験動物は自由に飲水と経口摂取可能な環境で飼育し、照明により 12 時間毎の明暗環境で飼育された。

*Rnf213* 遺伝子で最大のエクソン 32 を欠損した *Rnf213* 遺伝子ノックアウト (*Rnf213*-KO)マウスおよび *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A に相同な *Rnf213* 遺伝子多型 p.R4848K 遺伝子多型を全身に発現する *Rnf213* 遺伝子ノックイン (*Rnf213*-KI)マウスは、先行研究で作製したマウスを使用した<sup>24,33-34</sup>)。OT-II T 細胞受容体トランスジェニック(OT-II)マウスは本学加齢医学研究所生体防御学分野小笠原康悦教授および本学大学院医学系研究科免疫学分野石井直人教授の御厚意により分与頂いたものを実験に使用した。

#### (8) RNA 抽出および cDNA 合成

細胞はキアゾール(QIAGEN, Hilden, Germany)に溶解し、RNA は RNeasy ミニキット(QIAGEN)により抽出した。次いで、High-Capacity RNA to cDNA Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)により cDNA を合成した。

#### (9) フローサイトメトリーによる解析

下記の試薬をフローサイトメトリーに使用した。PE-conjugated anti-mouse CD69 (H1.2F3), PE-conjugated anti-mouse CD25 (PC61), PE-conjugated anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2), FITC-conjugated anti-mouse CD3 (17A2), FITC-conjugated anti-mouse CD19 (6D5), FITC-conjugated anti-mouse CD11b (M1/70),

FITC-conjugated anti-mouse Ly6C (HK1.4), FITC-conjugated anti-mouse F4/80 (BM8), APC-conjugated anti-mouse CD45.1 (A20), PE-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 (RM4-5)。上記抗体はすべて Biolegend (San Diego, CA, USA)より購入した。Fc $\gamma$  II/IIIへの非特異的結合を予防するため Fc Block (2.4G2; Biolegend)を使用した。また、アイソタイプコントロールの標識をネガティブコントロールとして行った。FACS Canto II (BD Biosciences)を用いてデータを測定し、FlowJo ソフトウェア(Three Star, Ashland, OR)を用いて解析した。数値は、平均蛍光強度(MFI: mean fluorescence intensity)により表記した。

#### (10) 免疫細胞分画の単離

C57BL/6 マウスの脾臓から各免疫細胞分画を単離した。CD3<sup>+</sup>T 細胞、CD19<sup>+</sup>B 細胞は、FITC 標識マイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Bergisch Galdbach, Germany)を用いた magnetic cell sorting (MACS)法により、CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>high</sup> 赤脾髄マクロファージ、CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> cDC、CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> 単球、CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> 好中球を FACS Aria II (BD Biosciences)を用いて単離した (図 6)。

#### (11) 骨髄由来樹状細胞の誘導

C57BL/6 (WT)、*Rnf213*-KO、*Rnf213*-KI マウスの骨髄を大腿骨および脛骨

より採取した後に、赤血球溶解液(Inivtrogen)により処理した。RPMI-1640 に recombinant murine granulocyte macrophage colony stimulating factor (rmGM-CSF, 20 ng/ml; 315-03; Peprotech) と recombinant murine IL-4 (rmIL-4; 214-14, 20 ng/ml; Peprotech)を含む、10%非活性化ウシ胎児血清、1 mM ピルビン酸、2 mM グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 ng/ml ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを添加した培地中で骨髄細胞を培養した。培地は3日おきに交換し、細胞は37°C、5%環境下で6日間培養後に骨髄由来樹状細胞(Bone marrow-derived dendritic cells: BMDCs)として実験に使用した。

## (12) ラテックスビーズのエンドサイトーシス

WT、*Rnf213*-KO、*Rnf213*-KI マウス BMDC によるラテックスビーズのエンドサイトーシスを共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーにより評価した。WT、*Rnf213*-KO、*Rnf213*-KI マウス BMDC を 35mm ガラスボトムディッシュ (松浪科学工業、大阪) または 96 穴丸底プレート (Costar) に各々  $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$  細胞を分注した。12 時間後に 1:100 の割合で 100 nm FITC 標識ラテックスビーズ (Cayman, MI, USA) を添加した RPMI-1640 に置換した。8 時間後に冷却した PBS に置換しエンドサイトーシスを停止した。トリパンブルー溶液を添加し、37°C、2 分間培養し、細胞表面に付着したラテックスビーズを除去した。Zeiss LSM800 レーザ



ー共焦点顕微鏡(Carl-Zeiss, Germany) の 63 倍対物レンズ (油浸) を用いて撮像した。2 倍のデジタルズームを使用し、1024×1024 の解像度とし、4 画像の平均化を行なった。また、BMDC によるエンドサイトーシスされたラテックスビーズを FITC チャンネルを用いて、FACS Canto II (BD Biosciences)によりエンドサイトーシスの定量評価を行った。

### (13) DQ-OVA 蛋白質の分解

樹状細胞の抗原プロセッシングを、OVA 蛋白質分解後に緑色蛍光を発する DQ-OVA(Molecular Probes)を用いて検証した。BMDC による OVA 蛋白質の分解を共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーにより解析した。BPDIPY 標識 DQ-OVA(Molecular Probes)は、蛋白分解後に緑色蛍光を発することで、細胞内プロセッシングをモニターすることが可能である。WT、*Rnf213*-KO、*Rnf213*-KI マウス BMDC を 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪科学工業) または 96 穴丸底プレート(Costar)に各々  $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$  細胞を分注した。12 時間後に 1:100 の割合で 10  $\mu$ g/ml DQ-OVA を添加した RPMI-1640 に置換した。8 時間後に冷却した PBS に置換し OVA 蛋白質の分解を停止した。共焦点顕微鏡を用いて上記と同様に画像の解析を行なった。DQ-OVA の緑色蛍光は FITC チャンネルにて、FACS Canto II (BD Biosciences)を用いて定量評価した。

#### (14) *in vitro* での抗原特異的 T 細胞応答の解析

37 °C で 15 分間条件下で、5  $\mu$ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を標識した OT- II マウス由来 CD4 陽性 T 細胞  $2 \times 10^4$  細胞を WT、*Rnf213*-KO または *Rnf213*-KI マウス BMDC  $1 \times 10^4$  細胞と 5 mg/ml OVA 蛋白質 (Sigma-Aldrich) または 5  $\mu$ g/ml OVA<sub>323-339</sub> ペプチド (Sigma-Aldrich) 存在下に共培養した (図 4(b))。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 96 時間培養後、CD4 陽性 T 細胞の CFSE 減衰をフローサイトメトリーにより測定し、BMDC による抗原特異的 T 細胞増殖能を評価した。

#### (15) 統計解析

統計解析は JMP Pro version 13 (SAS Institute) および IBM SPSS (version 24, IBM Corp) を用いて行った。*HLA* アリルの解析では、稀なアリル (推定アリル頻度 < 5) は「その他」のカテゴリーに統合した。アリルおよびハプロタイプの頻度、*Rnf213* 遺伝子多型の頻度は  $\chi^2$  乗検定により検定した。アリル、ハプロタイプ頻度は、p 値をアリルおよびハプロタイプ数で乗じて補正 p 値を算出する Bonferroni 補正を行なった。多変量解析は、いずれもポアソン回帰分析を用いた多変量解析により性別および年齢調整を行なった。その他の統計解析は

一元分散分析および事後 Turkey 検定または両側 t 検定を適応した。In vitro の実験は、各実験において 1 検体を 3 ウェルで計測し、かつ 3 回の独立した実験を施行し、代表例を提示した。数値は平均±標準偏差 (standard deviation: SD) で表記した。p < 0.05、また 95%信頼区間が 1 を含まない場合を統計学的に有意と判定した。 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001。

## [5]研究結果

### (1) *HLA-DRB1\*04:10* アリルはもやもや病のリスクアリルである

*HLA* クラス I (*HLA-A*, *HLA-B*, and *HLA-C*) およびクラス II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, and *HLA-DPBI*) アリルの頻度をもやもや病およびコントロールで検討した。表 1-3 に *HLA* クラス I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) の頻度を、表 4-6 に *HLA* クラス II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPBI*) アリルの頻度を示した。*HLA* クラス I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) ともやもや病で有意な相関を示したアリルは存在しなかった (表 1-3)。表 4 に示した通り、*HLA-DRB1\*04:10* アリルの頻度は、もやもや病患者で統計学的有意に増加していた (アリル頻度 もやもや病患者 4.77% vs コントロール 1.47%; p = 1.7 x 10<sup>-3</sup>; オッズ比 3.35)。また、*HLA-DRB1\*04:06* アリルの頻度はもやもや病患者において低かったが、Bonferroni 補正による統計解析では有意な差は認めなかった (アリル頻度 もやもや病患者

1.10% vs コントロール 3.44%;  $p = 0.045$ ; オッズ比 0.31)。なお、表 5-6 に示した通り、HLA クラス II (*HLA-DRB1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DPBI*) アリルでは、もやもや病と有意な相関を認めたアリルは存在しなかった。

## (2) *HLA-DRB1\*04:10-HLA-DQB1\*04:02* ハプロタイプはもやもや病と関連する

期待値最大化法を用いて、ハプロタイプ頻度の推定を行なった。表 7-8 に示す通り、*HLA-A-HLA-B* ハプロタイプ、*HLA-A-HLA-B-HLA-C* ハプロタイプではもやもや病と関連を示したハプロタイプは存在しなかった。*HLA-DRB1\*04:10-HLA-DQB1\*04:02* ハプロタイプの頻度がもやもや病患者において有意に増加していた(ハプロタイプ頻度 患者 4.41% vs コントロール 1.35%;  $p = 2.0 \times 10^{-3}$ ; オッズ比 3.37) (表 9)。また、*HLA-DRB1\*04:05-HLA-DQB1\*04:01* ハプロタイプの頻度はもやもや病患者においてやや少なかったが、Bonferroni 補正による統計解析では有意差を認めなかった(ハプロタイプ頻度 患者 1.10% vs コントロール 3.44%;  $p = 0.045$ ; オッズ比 0.31) (表 9)。なお、表 10 に示す通り、*HLA-DRB1-HLA-DQB1-HLA-DPBI* ハプロタイプではもやもや病との関連を認めたハプロタイプは存在しなかった。

### (3) *HLA-DRB1\*04:10*アリルはもやもや病患者における甲状腺疾患併発と相関する

表 11 に *HLA-DRB1\*04:10*アリルともやもや病の臨床所見との関連を示す。  
*HLA-DRB1\*04:10*アリルを有するもやもや病患者において、*HLA-DRB1\*04:10*アリルを有さないもやもや病患者と比較して、Graves 病や橋本病を含む甲状腺機能異常を有する頻度が統計学的有意に高かった（頻度 もやもや病患者 23.1% vs コントロール 4.1%;  $p = 0.029$ ）。*HLA-DRB1\*04:10*アリルを有するもやもや病患者は、女性（頻度 もやもや病患者 92.3% vs コントロール 75.6%;  $p = 0.297$ ）、若年者（発症年齢 もやもや病患者  $30.1 \pm 13.3$  vs コントロール  $35.4 \pm 16.0$ ;  $p = 0.206$ ）、出血発症（頻度 もやもや病患者 23.1% vs コントロール 7.3%;  $p = 0.091$ ）が、*HLA-DRB1\*04:10*アリルを有さないもやもや病患者と比較して有意に多かったが、統計学的有意差は認めなかった。年齢・性別調整後の多変量解析では、*HLA-DRB1\*04:10*アリルを有さないもやもや病患者と比較して、*HLA-DRB1\*04:10*アリルを有するもやもや病患者では甲状腺疾患の併発が統計学的有意に多かった( $p = 0.039$ )。

### (4) 椎骨動脈解離では *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の頻度が少ない

椎骨動脈解離、もやもや病患者、健常者群における *RNF213* 遺伝子多型

c.14576G>A を有する割合を表 12 に示す。*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を前方循環系血管病変もやもや病患者群では 69.0% (40/58)、頭蓋内後方循環系血管病変椎骨動脈解離患者では 0% (0/24)、健常者では 4.2% (2/48) で認めた (表 12、図 7)。椎骨動脈解離患者では、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を有する率がもやもや病患者群と比較して有意に少なかった ( $p < 0.001$ ) (表 12、図 7)。年齢、性別調整後の多変量解析では、椎骨動脈解離患者における *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は健常者と比較して統計学的優位に少なかった ( $p = 0.021$ , オッズ比 0.58、95%信頼区間: 0.36-0.92) (表 12)。

#### (5) 樹状細胞は *Rnf213* 遺伝子の発現が高い

B 細胞、T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球、好中球、赤脾髄マクロファージにおける *Rnf213* 遺伝子の発現を定量リアルタイム PCR 法で解析したところ、B 細胞や T 細胞といったリンパ球系細胞と比較して、樹状細胞や単球等の骨髄球系細胞で *Rnf213* 遺伝子の発現が高かった (図 8)。

#### (6) *RNF213* は抗原エンドサイトーシス、プロセッシングに関与する

次いで、*RNF213* の生理学的機能を解明するため、抗原提示細胞における抗原プロセッシングを解析した。*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI BMDC では、WT

BMDC と比較してラテックビーズの取り込みを認める細胞の減少を認めた (図 9(a))。また、FITC チャンネルにより FITC 標識ラテックスビーズの取り込みをフローサイトメトリーにより評価したところ、*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC によるラテックスビーズの取り込みは WT BMDC と比較し低下していた (図 9(b)(c))。次いで、RNF213 の抗原プロセッシング機構への関与を検証した。BMDC による卵白アルブミン(DQ-OVA)の分解を共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーにより評価した。共焦点顕微鏡による観察では、WT マウス BMDC と比較して、*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI BMDC による DQ-OVA の緑色蛍光の低下を認め、DQ-OVA 蛋白質の分解低下が示唆された (図 10(a))。また、フローサイトメトリーでの解析においても、共焦点顕微鏡での観察と同様に、*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC では WT マウス BMDC と比較して、緑色蛍光強度の低下を認め、*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC における OVA 蛋白質の分解低下が示唆された (図 10(b)(c))。

(7) *Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI BMDC では抗原蛋白質プロセッシングを介する T 細胞刺激能が低下している

*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC では抗原プロセッシング機構の低下がみられたことから、*Rnf213*-KO、*Rnf213*-KI マウス BMDC による T 細胞

応答に低下を生ずる可能性が考えられた。次いで、樹状細胞による抗原特異的 T 細胞応答を検証した。OVA<sub>323-339</sub> ペプチド存在下では *Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC による T 細胞活性化は WT マウス BMDC と同等であった。一方で、OVA 蛋白質存在下では *Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC による T 細胞活性化は WT マウス BMDC と比較して低下していた (図 11(a)(b))。同様に、OVA<sub>323-339</sub> ペプチド存在下では *Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI BMDC による T 細胞増殖能は WT マウス BMDC と同等であった一方で、OVA 蛋白質存在下では *Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス BMDC による T 細胞増殖能は WT マウス BMDC と比較して低下していた (図 11(a)(c))。

## [6] 考察

本研究では、もやもや病の病態を解明するため、遺伝学的要因および免疫寛容機構の破綻の原因となりうる、*HLA* 遺伝子座および *RNF213* 遺伝子の機能を遺伝学的手法と *Rnf213* 遺伝子改変マウスを用いた動物実験により解析した。

### (1) *HLA* クラス II アリルのもやもや病との関連

まず、多くの自己免疫疾患との関連が知られる *HLA* 遺伝子座ともやもや病の関連を解析した。本研究では *HLA-DRB1\*04:10* がリスクアリルとして、*HLA-*



*DRB1\*04:10-HLA-DQB1\*04:02*がリスクハプロタイプとして同定されたが、過去の報告では *HLA-DRB1\*13:02*、 *HLA-DRB1\*15:01*、 *DQB1\*06:02*、 *DQB1\*06:09* が東アジア人のリスクアリルとして報告されている<sup>18-22)</sup>。本研究と過去の報告で、リスクアリルが一致しなかった要因としては、過去の報告では家族発症例のみに限定した研究であることや少数例での検討であり厳格な統計解析に基づく研究でないことが考えられた。本研究では、希少疾患であるもやもや病としては比較的多数例である 136 例を対象とし、Bonferroni 補正による厳格な統計解析を行うことでより精度の高い解析を企図した。本研究は、もやもや病患者を対象とする *HLA* 解析研究の中では比較的多数例を対象とし、厳格な統計処理に基づいた初めての報告である。

さらに本研究では、甲状腺疾患を併発するもやもや病の遺伝学的背景を示唆する知見が得られた。甲状腺機能異常、特に甲状腺機能亢進症や自己抗体と内頸動脈終末部の狭窄や進行性のもやもや病との関連を示唆する報告が過去に多数なされているが<sup>56-58)</sup>、その機序は全く不明であった。甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症ともに多様な要因が原因と考えられる自己免疫疾患であるが、甲状腺機能亢進症は甲状腺刺激ホルモン受容体刺激ホルモンに対する自己抗体の産生を特徴とし、一方で甲状腺機能低下症は甲状腺細胞のアポトーシスによる病態であり全く異なる機序で起こる疾患である。しかしながら、甲状腺機能亢進症お

よび甲状腺機能低下症は、*HLA-A\*02:07*、*HLA-B1\*35:01*、*HLA-B1\*46:01*、*HLA-DRB4\*53:01* 等のアリルが共通したリスクアリルと報告されており<sup>59-62)</sup>、病態の共通性が示唆される。これまでに *HLA-DRB1\*04:10* と甲状腺疾患との関連は報告されておらず、*HLA-DRB1\*04:10* との関連が報告されている疾患は Vogt-Koyanagi-Harada 病と特発性血小板減少性紫斑病が挙げられる<sup>63-64)</sup>。今後の研究により、*HLA-DRB1\*04:10* のもやもや病の病態における役割、また甲状腺疾患併発例と関連するメカニズムの解明が期待される。

## (2) *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A と血管病変の部位・性状

次いで、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A と血管病変の部位・性状との関連を明らかにするため、血管病変と *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の関連を解析した。本研究では、もやもや病と類似した病理学的・疫学的特徴を有する椎骨動脈解離と *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A の関連を解析した。もやもや病疾患感受性遺伝子である *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は、後方循環系の血管病変である椎骨動脈解離患者との関連が有意に低いことが明らかとなった。これまでに頭蓋内血管病変と *Rnf213* 遺伝子変異との関連は多く報告されており、中大脳動脈狭窄症と *Rnf213* 遺伝子多型 c.14576G>A の関連が Kim YJ らにより報告され、中大脳動脈の解離性病変患者の約 1/3 で *Rnf213* 遺伝子多型

c.14576G>A を認めたと報告している<sup>65)</sup>。また、Kim SJ らは中大脳動脈解離 21 例、内頸動脈解離 2 例、後大脳動脈解離 1 例の計 24 例の頭蓋内動脈解離患者の約 1/3 が、*Rnf213* 遺伝子多型 c.14576G>A を有していたと報告している<sup>66)</sup>。一方で、新谷らは、後方循環系の動脈硬化性血管狭窄症患者 61 例では、*Rnf213* 遺伝子多型 c.14576G>A を有していた患者はみられなかったと報告し、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は後方循環系血管病変との関連が低い可能性を推測している<sup>67)</sup>。*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は頭蓋内後方循環系血管病変椎骨動脈解離との関連は低く、もやもや病を含めた頭蓋内前方循環系血管狭窄性病変と強く関連する一方で、椎骨動脈解離との関連が低いことが本研究で明らかになったことから、血管病変の位置と *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A との関連を明らかにするためには、後方循環系にのみ限局した椎骨脳底動脈狭窄症と *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A との関連を検討することが必要と考えられた。

### (3) *RNF213* の抗原プロセッシング機構への関与

本研究により *RNF213* の異常により、抗原のエンドサイトーシスやプロセッシング能の低下をきたすことが明らかとなったが、抗原のエンドサイトーシスあるいは抗原のプロセッシングに関わる蛋白あるいは細胞内小器官のいずれに *RNF213* が影響を与えているかは不明である。Caveolin や clathrin を介したエ

ンドサイトーシス経路が知られている一方で<sup>68)</sup>、もやもや病患者由来血管内皮細胞では caveolin の異常をきたすことが知られており<sup>69)</sup>、RNF213 がエンドサイトーシスに関わる経路に直接作用する可能性が考えられる。また、*Rnf213* 遺伝子異常を有する樹状細胞は、OVA ペプチド存在下では T 細胞増殖能の低下を認めず、OVA 蛋白質存在下においてのみ T 細胞刺激増殖能の低下を認めたことから (図 11)、蛋白質を処理する過程に RNF213 が関与する可能性が推察される。エンドサイトーシスにより抗原提示細胞内に取り込まれた蛋白質は、初期エンドソームから後期エンドソーム/リソソームに移行し、ペプチドに断片化された後に major histocompatibility complex (MHC) 上に提示されるので<sup>68)</sup>、RNF213 が後期エンドソーム/リソソームにおける蛋白質プロセッシングに関わる可能性が推察される。今後の研究により、RNF213 の標的蛋白を明らかにし、抗原プロセッシング機構における役割を明らかにする必要がある。

さらに、*Rnf213*-KI BMDC が *Rnf213*-KO BMDC とほぼ類似した表現型を呈していたことは、本研究の重要な知見である。*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A はもやもや病の創始者変異である一塩基多型であり、これまでに本変異が染色体不安定性や血管内皮細胞の血管内皮細胞の血管新生能の異常をきたすことが報告されているが<sup>31-32)</sup>、本遺伝子多型が機能獲得型変異、機能喪失型変異のいずれであるかは不明であった。本研究では *Rnff213*-KI BMDC が、

抗原の分解、T細胞応答のいずれも *Rnf213*-KO BMDC と類似した挙動を一貫して示したことから、*Rnf213*-KI は機能喪失型変異であることが明らかとなった。しかしながら、一塩基多型 c.14576G>A は RNF213 の機能ドメインである AAA+ ATPase ドメインおよび E3 リガーゼドメインのいずれにも位置しておらず、かつ両者の機能に著明な影響を与えていないことが報告されており、エクソン 32 に位置する一塩基多型 c.14576G>A が如何にして *Rnf213* 遺伝子ノックアウトマウスと同様の機能喪失をきたすかは不明であり、今後の研究の進展が期待される。

#### (4) 研究 1-3 を踏まえたもやもや病の病態仮説”two hit theory”の検証

本研究では、自己免疫応答の基盤となりうる疾患感受性 *HLA* アリルの同定 (研究 1)、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A と血管病変の関連 (研究 2)、および *Rnf213* 遺伝子の異常による樹状細胞での抗原プロセッシング能の低下および T 細胞刺激能の低下 (研究 3) が明らかとなった。本項では、これらの結果を踏まえて、もやもや病の病態仮説につき考察する。

*RNF213* 遺伝子異常に起因する抗原プロセッシング機構の異常は、従来を提唱されているもやもや病の two hit theory の”one hit”にあたる病態形成の基盤となっている仮説を考えた。*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A はもやもや病患者の 70-

90%に認めるとされており<sup>3-4)</sup>、*RNF213*遺伝子多型 c.14576G>A を有さないもやもや患者が 10-30%程度存在することから、*RNF213*遺伝子多型 c.14576G>A はもやもや病の病態形成の必要条件ではない。また、*RNF213*遺伝子異常を有する者の 1%程度がもやもや病を発症するとされており<sup>3-4)</sup>、*RNF213* 遺伝子異常に加えて、自己免疫応答や感染、放射線曝露等の二次要因が働くことでもやもや病の発症につながると考えられる<sup>3-12)</sup>。研究 3 の知見は、*RNF213* 遺伝子異常が存在することで、外来抗原の処理がコントロールと比較して低下する可能性を示唆している。自己免疫疾患である全身性エリトマトーデスは、DNase I の異常があることで本来アポトーシスに陥り処理されるべき細胞塊が処理されず、これらの二本鎖 DNA に対する自己抗体が産生され、全身の臓器障害をきたすとされ<sup>70)</sup>、*RNF213* の異常に起因する抗原プロセッシング機構の異常が外来抗原への自己抗体産生を惹起する可能性やマクロファージによる過剰な炎症性サイトカイン産生を惹起し、血管平滑筋の増生や細胞間接着の障害等の組織障害をきたす可能性が推察された。

*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A を有する場合でも、平常時は機能障害が顕在化せず、感染・放射線等が加わった際に、外来抗原を適切に処理できずに、異常な免疫応答が誘導され、もやもや病の発症につながる仮説が考えられた<sup>10-12)</sup> (図 12)。

## (5)本研究の限界

本研究はいくつかの限界を有する。1つは、もやもや病患者および椎骨動脈解離検体は、東北大学病院および広南病院で採取された患者検体であり、東北地方の患者に大きく偏っている。また、椎骨動脈解離患者の検体数は24例と少ない。

また、*HLA* アリルの解析では関東地区の患者を中心とするデータベースを参照させて頂いた。今後、多施設共同で、より多くの症例を対象とする研究の施行が望まれる。各群において、サンプリングバイアスを生じた可能性は排除できず、また日本人患者のみを対象としたため日本人以外でも同様の *HLA* アリルの偏りや *Rnf213* 遺伝子異常を認めるか否か、多施設共同あるいは国際共同研究の実施が望まれる。

2つ目は、*Rnf213*-KO マウスは *Rnf213* 遺伝子 mRNA の最大のエクソンであるエクソン32を欠失させるデザインにより構築されたものであるが、*Rnf213* 遺伝子の E3 ユビキチンリガーゼや AAA<sup>+</sup> ATPase 機能がどの程度阻害されているのか不明であり、今後の検証を要する。同様に、*Rnf213*-KI マウスは、ヒト *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A のオーソログをマウス *Rnf213* 遺伝子の相同部位に挿入することで作製されたトランスジェニックマウスであるが *Rnf213* 遺伝子の E3 ユビキチンリガーゼや AAA<sup>+</sup> ATPase 機能がどの程度阻害されているのか不明であり、今後の検証を要する。

## [7]結論

本研究により、(1) *HLA-DRB1\*04:10* アリルおよび *HLA-DRB1\*04:10-HLA-DQB1\*04:02* ハプロタイプともやもや病との関連を認め、(2) *HLA-DRB1\*04:10* アリルを有するもやもや病患者では甲状腺疾患併発の頻度が高いことが明らかとなった。また、(3) *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は椎骨動脈解離との関連は低く、もやもや病との関連が強いこと、(4) *Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI BMDC はエンドサイトーシスの低下、抗原特異的 T 細胞活性化能が低下すること、(5) ヒト *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A オートログを強制発現した *Rnf213*-KI マウスが *Rnf213*-KO マウスと類似した表現型を示したことから、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A は機能喪失型変異であることが示唆された。

本研究の結果は、もやもや病における *RNF213* 遺伝子異常に起因する抗原プロセッシング機構の異常を有すると、*HLA* 抗原の異常をはじめとする自己免疫反応、感染や放射線曝露等の二次要因が加わった際に、外来抗原の適切な処理ができず、異常な免疫応答が誘導されもやもや病における血管狭窄・閉塞性病変の形成をきたす仮説が考えられた。



## [8]謝辞

本研究は、著者が東北大学大学院医学系研究科医科学専攻博士課程在学中に、同大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科学分野富永悌二教授、同大学大学院医工学研究科・医学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科先端治療開発学分野新妻邦泰教授、広南病院藤村幹副院長・脳神経外科部長（元同大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科学分野准教授）の指導のもと行ったものである。広南病院藤村幹副院長・脳神経外科部長、同大学院学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科学分野遠藤英徳講師、同大学院学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科学分野坂田洋之非常勤講師と協働し、もやもや病患者検体を採取した。東海大学医学部猪子英俊名誉教授、東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学分野徳永勝士名誉教授および Seik-Soon Khor 特任助教に御指導頂き、*HLA* 解析の研究デザインの設計、データ解析および解釈を行った。また、東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学分野徳永勝士名誉教授の御高配により、同氏が構築された国際 *HLA* & *KIR* インピュテーションネットワークの健常コントロールデータを参照させて頂いた。なお、*HLA* 研究に際しては、同大学メディカルメガバンク機構安田純客員教授、同大学メディカルメガバンク機構ゲノム遺伝統計学分

野田宮元教授、同大学メディカルメガバンク機構バイオバンク生命科学分野熊田和貴講師に研究デザインの設計につき御助言を頂いた。

フローサイメトリーでの解析、T細胞活性化・増殖の評価系を中心として免疫学的な研究手法は、同大学加齢医学研究所生体防御学分野伊藤甲雄助教、小笠原康悦教授に指導頂き、同大学病院金野なつみ助手に共焦点顕微鏡での観察につき助言を頂いた。また同大学加齢医学研究所生体防御学分野伊藤甲雄助教、小笠原康悦教授、同大学大学院医学系研究科病理病態学講座免疫学分野石井直人教授および奥山祐子助教、同大学大学院医学系研究科感染制御インテリジェンスネットワーク寄付講座笠松純講師に実験データの評価および研究方針の議論を通し御指導頂いた。*Rnf213*-KO マウスおよび *Rnf213*-KI マウスは同大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野小児病態学講座呉繁夫教授および菊池敦生助教との共同研究により作製されたものであり、マウスの作製にあたり御尽力頂き感謝申し上げます。また、*Rnf213*-KO マウスおよび *Rnf213*-KO マウスの交配・維持、遺伝子タイピングを、東北大学病院脳神経外科技術補佐員太田茉莉紗さん、黒石あずささんに御協力頂き厚く御礼申し上げます。

また、本研究は JSPS 科研費 17K0815、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服事業ウイルス動脈輪閉塞症における病態・治療に関する研究、AMED の課

題番号 J170001344 の助成を受けたものである。同大学大学院医学系研究科共通実験室および同大学病院共同実験室、同大学加齢医学研究所共通機器管理室のフローサイトメトリーや共焦点顕微鏡、リアルタイム PCR システム等の実験機器を使用して施行されたものであり、機器使用に際し御協力を賜り感謝致します。

本研究は、上記研究者および技術補佐員の御尽力なくして実現し得なかったものであり、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## [9]文献

1. Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular “moyamoya” disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol* 20: 288-299, 1969.
2. Tominaga T, Suzuki N, Miyamoto S, Koizumi A, Kuroda S, Takahashi Jun C, et al. [Recommendations for the management of moyamoya disease: a statement from research committee on spontaneous occlusion of the circle of Willis (Moyamoya disease) [2<sup>nd</sup> Edition]]. *Surgery Cerebral Stroke* 46:1-24, 2018 (Jpn).
3. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 56:34-40, 2011
4. Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One* 6:e22452, 2011
5. Miyatake S, Miyake N, Touho H, et al. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology* 78; 803-10, 2012.
6. Komiyama M. Moyamoya disease is a progressive occlusive arteriopathy of the primitive internal carotid artery. *Interv Neuroradiol* 9: 39-45, 2003.
7. Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Circulating endothelial progenitor cells as a

- pathogenic marker of moyamoya disease. *J Cerebr Blood Flow Metab* 28;1795-803, 2008.
8. Kang HS, Kim JH, Phi JH, et al. Plasma matrix metalloproteinases, cytokines and angiogenic factors in moyamoya disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:673-8, 2010.
  9. Blecharx-Lang KG, Prinz V, Burek M, et al. Gelatinolytic activity of autocrine matrix metalloproteinase-9 leads to endothelial de-rearrangement in moyamoya disease. *J Cerebr Blood Flow Metab* 2018; 38; 1940-1953.
  10. Fujimura M, Sonobe S, Nishijima Y, et al. Genetics and biomarkers of moyamoya disease: Significance of RNF213 as a susceptibility gene. *J Stroke* 16:65-72, 2014.
  11. Houkin K, Ito M, Sugiyama T, et al. Review of past research and current concepts on the etiology of moyamoya disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 52: 267-77, 2012.
  12. Archol As, Guzman R, Lee M, et al. Pathophysiology and genetic factors in moyamoya disease. *Neurosurg Focus* 26:e4, 2009.
  13. Tatekawa Y, Umezawa T, Ueno Y, et al. Pathological and immunohistochemical findings of an autopsy case of adult moyamoya disease. *Neuropathology* 24: 236-242, 2004.
  14. Takagi Y, Kikuta K, Nozaki K, et al. Histopathological features of middle cerebral

- arteries from patients treated for moyamoya disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 47:1-7, 2007.
15. Takagi Y, Hermanto Y, Takahashi JC, et al. Histopathological characteristics of distal middle cerebral artery in adult and pediatric patients with moyamoya disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 56: 345-349, 2016.
16. Bower RS, Mallory GW, Nwojo M, et al. Moyamoya disease in primarily white, midwestern US population: Increased prevalence of autoimmune disease. *Stroke* 44:1997-1999, 2013
17. Chen BJ, Liu Y, Zhou LX, et al. Increased prevalence of autoimmune disease in patient with unilateral compared with bilateral moyamoya disease. *J Neurosurg* 124:1215-1220, 2016
18. Aoyagi M, Ogami K, Matsuchima Y, et al. Human leukocyte antigen in patients with moyamoya disease. *Stroke* 26:415-417, 1995.
19. Inoue TK, Ikezaki K, Sasazuki T, et al. Analysis of class 2 genes of human leukocyte antigen in patients with moyamoya disease. *Clin Neurol Neurosurg* 99 (Suppl 2): S234-7, 1997.
20. Han H, Pyo CW, Yoo DS, Huh PW, Cho KS, Kim DS. Associations of moyamoya patients with HLA class 1 and class II alleles in the Korean population. *J Korean*

- Med Sci* 18:876-90, 2003.
21. Hong SH, Wang KC, Kim SK, et al. Association of HLA-DR and -DQ genes with familial moyamoya disease in Koreans. *J Koran Neurosurg Soc* 46:558-563, 2009.
22. Kraemer M, Horn PA, Roder C, et al. Analysis of human leukocyte antigen genes in Caucasian patients with idiopathic moyamoya angiopathy. *Acta Neurochir (Wien)* 154:445-454, 2012.
23. Fujimura M, Fujimura T, Kakizaki A, Sato-Maeda N, Niizuma K, Tomata Y, et al: Increased serum production of soluble CD163 and CXCL5 in patients with moyamoya disease: Involvement of intrinsic immune reaction in its pathogenesis. *Brain Res* 1679:39-44, 2018.
24. Kanoke A, Fujimura M, Niizuma K, et al. Temporal profile of magnetic resonance angiography and decrease ratio of regulatory T cells after immunological adjuvant administration to mice lacking RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 2016; 1642: 1-9.
25. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol* 18:325-339, 2018.
26. Hosomichi K, Shiina T, Tajima A, et al. The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *J Hum Genet* 60: 665-673, 2015.

27. Shiina T, Suzuki S, Kulski JK, et al. Super high resolution for single molecule-based typing of classical HLA loci using Ion Torrent PGM. *Methods in molecular Biology* 1802:115-133, 2018.
28. Ohkubo K, Sakai Y, Inoue H, et al. Moyamoya disease susceptibility gene RNF213 links inflammatory and angiogenic signals in endothelial cells. *Sci Rep* 5: 13191, 2015.
29. Kobayashi H, Matsuda T, Hitomi T, et al. 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.
30. Bahn RS, Iorio C, Marcotte R, et al. PTP1B controls non-mitochondrial consumption by regulating RNF213 to promote tumor survival during hypoxia. *Nat Cell Biol* 18:803-813, 2016.
31. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, et al. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs11275431) induces genomic instability by mitotic abnormality. *Biochem Biophys Res Commun* 439:419-26, 2013.
32. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, et al. 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* 438:13-9, 2013.

33. Kanoke A, Fujimura M, Niizuma K, et al. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4T-tesla magnetic resonance angiography and histological analysis in mice with the R4859K mutation of *RNF213*, the susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 1624: 497-505, 2015.

34. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, et al. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking *RNF213*: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 1552: 64-71, 2014.

35. Miyawaki S, Imai H, Shimizu H, et al. Genetic variant *RNF213* c.14576G>A in various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke* 44:2894-97, 2013.

36. Morimoto T, Minehara Y, Ono K, et al. Significant association of *RNF213* p.R4810K, a moyamoya susceptibility variant, with coronary artery disease. *PLoS One* 12: e0175649, 2017.

37. Chang SA, Song JS, Park TK, et al. Nonsyndromic peripheral pulmonary artery stenosis is associated with homozygosity of *RNF213* p.Arg4810Lys regardless of

- co-occurrence of moyamoya disease. *Chest* 153:404-413, 2018.
38. Komiyama M. Cardio-cephalic neural crest syndrome: A novel hypothesis of vascular neurocristopathy. *Interv Neuroradiol* 23:572-576, 2017.
39. Jiang X, cheng ZJ. The role of ubiquitylation in immune defense and pathogen invasion. *Nat Rev Immunol* 12: 35-48, 2011.
40. Waleseng E, Furuta K, Bosch B, et al. Ubiquitination regulates MHC class II-peptide complex retention and degradation in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20465-20470, 2010.
41. Baravalle G, Park H, McSweeney M, et al. Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 187:2966-2973, 2011.
42. Corocoran K, Jabbour M, Bhagwandin C, et al. Ubiquitin-mediated regulation of cd86 protein expression by the ubiquitin ligase membrane-associated ring-ch-1 (march1). *J Biol Chem* 286:37168-37180, 2011.
43. Tze LE, Horikawa K, Domachenz H, et al. CD83 increased MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 208:149-165, 2011.
44. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, et al. Inhibition of MHC class II expression and

- immune responses by c-MIR. *J Immunol* 177:341-354, 2006.
45. Kitaura Y, Jang IK, Wang Y, et al. Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b. *Immunity* 26:567-578, 2007.
46. Katere B, Rosa S, Drake JR. The Syk-binding ubiquitin ligase c-Cbl mediates signaling-dependent B cell receptor ubiquitination and B cell receptor-mediated antigen processing and presentation. *J Biol Chem* 287:16636-16644, 2012.
47. Elliott MR, Ravichandran KS. Pallbearer and friends: leading a hand in apoptotic cell clearance. *Trends Cell Biol* 18:95-97, 2008.
48. Silva E, Au-Yueng HW, Van Goethem E, et al. Requirement for a drosophia Er-ubiquitin ligase in phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 27:585-59, 2007.
49. Duan L, Wei L, Tian Y, et al. Novel susceptibility loci for moyamoya disease revealed by a genome-wide association study. *Stroke* 49:11-18, 2018
50. Itabashi R, Mori E, Furui E, et al. A dilated surface appearance on basiparallel anatomic scanning-magnetic resonance imaging is a useful tool for the diagnosis of spontaneous vertebral artery dissection in lateral medullary infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23: 805-810, 2014.
51. Ueta M, Kannabiran C, Wakamatsu TH, et al. Tran-ethnic study confirmed independent associations of HLA-A\*02:06 and HLA-B\*44:03 with cold medicine-

- related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular surface complications. *Sci Rep* 4:e5891, 2014.
52. Yasunami M, Nakamura H, Tokunaga K, et al. Principal contribution of HLA-DQ alleles, DQB1\*06:04 and DQB1\*03:01, to disease resistance against primary biliary cholangitis in a Japanese population. *Sci Rep* 7:e11093, 2017.
53. Pappas DJ, Marin W, Hollenbach JA, et al. Bridging immunogenomic data analysis workflow gaps (bigdawg): an integrated case-control analysis pipeline. *Hum Immunol* 77:283-287, 2016.
54. Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I General considerations; Heterotic models. *Genetics* 49:49-67, 1964.
55. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12:921-927, 1995.
56. Endo H, Fujimura M, Niizuma K, et al. Efficacy of revascularization surgery for moyamoya syndrome associated with Graves' disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 50:977-983, 2010.
57. Ahn JH, Jeon JP, Ki JE, et al. Association of hyperthyroidism and thyroid autoantibodies with moyamoya disease and its stroke events: a population-based case-control study and meta-analysis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 15:116-123, 2018.

58. Kim SJ, Heo KG, Shin HY, Bang OY, Kim GM, Chung CS, et al. Association of thyroid autoantibodies with moyamoya-type cerebrovascular disease: a prospective study. *Stroke* 1:173-176, 2010.
59. Sasazuki T, Inoko H, Morishima S, et al. Gene map of the HLA region, Graves' disease and Hashimoto thyroiditis and hematopoietic stem cell transplantation. *Advances in immunology* 129:175-249, 2016.
60. Zeitlin AA, Heward JM, Newby PR, et al. Analysis of HLA class II genes in Hashimoto's thyroiditis reveals differences compared to graves' disease. *Genes Immun* 9:358-363, 2008.
61. Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, et al. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet* 56:772-778, 2011.
62. Ueda S, Oryoji D, Yamamoto K, et al. Analysis of HLA class II genes in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. *J Clin Endocrinol Metab* 99:e379-383, 2014.
63. Shindo Y, Inoko H, Yamamoto T, et al. HLA-DRB1 typing of Vogt-Koyanagi-Harada's disease by PCR-RFLP and the strong association with DRB1\*0405 and DRB1\*0410. *Br J Ophthalmol* 78:223-6, 1994.

64. Nomura S, Matsuzaki T, Ozaki Y, et al. Clinical significance of HLA-DRB1\*0410 in Japanese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 15:3616-22, 1998.
65. Kim YJ, Lee JK, Ahn SH, et al. Nonatherosclerotic isolated middle cerebral artery disease may be early manifestation of moyamoya disease. *Stroke* 47:2229-2235, 2016.
66. Kim JS, Lee HB, Kwon HS. RNF213 polymorphism in intracranial artery dissection. *J Stroke*, 20: 404-406, 2018.
67. Shinya Y, Miyawaki S, Imai H, et al. Genetic analysis of *Ring Finger Protein 213* (*RNF213*) c.14576G>A in intracranial atherosclerosis of the anterior and posterior circulations. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26: 2638-2644, 2017.
68. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 15:203-16, 2015.
69. Chung JW, Kim DH, Oh MJ, et al. Cav-1 (Caveolin-1) and arterial remodeling in adult moyamoya disease. *Stroke* 49:2597-2604, 2018.
70. Kaul A, Gordon C, Crow MK, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers* 2:16039, 2016.

## [10]図

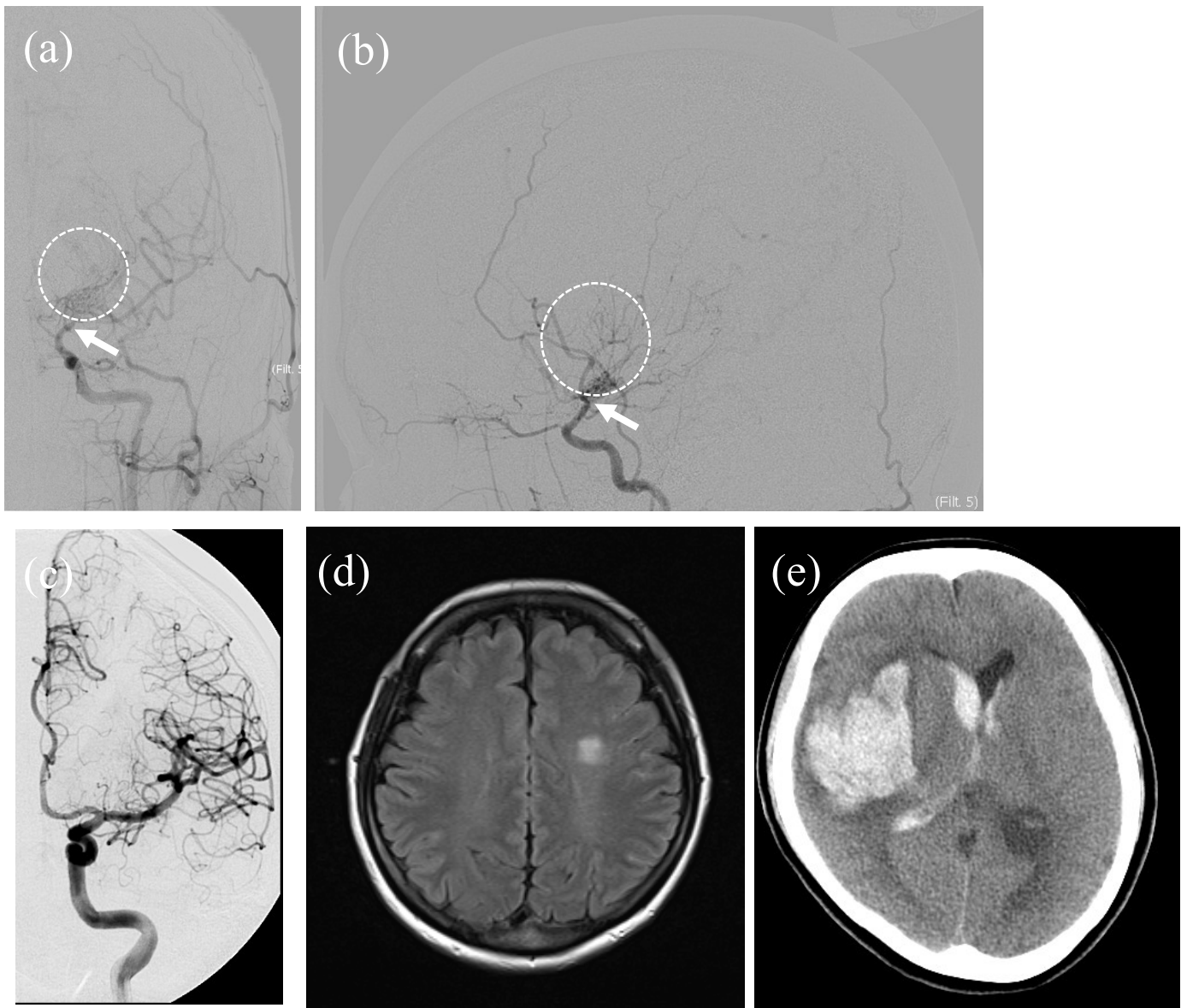


図1 もやもや病の画像所見

(a-b) もやもや病患者の脳血管撮影所見 (A: 左内頸動脈撮影正面像、B: 左内頸動脈撮影側面像)。左内頸動脈終末部の狭窄性変化 (矢印) および脳底部異常血管網の増生 (点線) を認める。

(c) 健常者の脳血管撮影所見 (左内頸動脈撮影正面像)。前大脳動脈および中大脳動脈末梢

まで描出される。

(d-e)もやもや病患者の MRI fluid-attenuated inversion recovery 像(d)および CT 所見(e)。

もやもや病は小児・若年成人の脳梗塞(d)および脳出血(e)の原因疾患である。



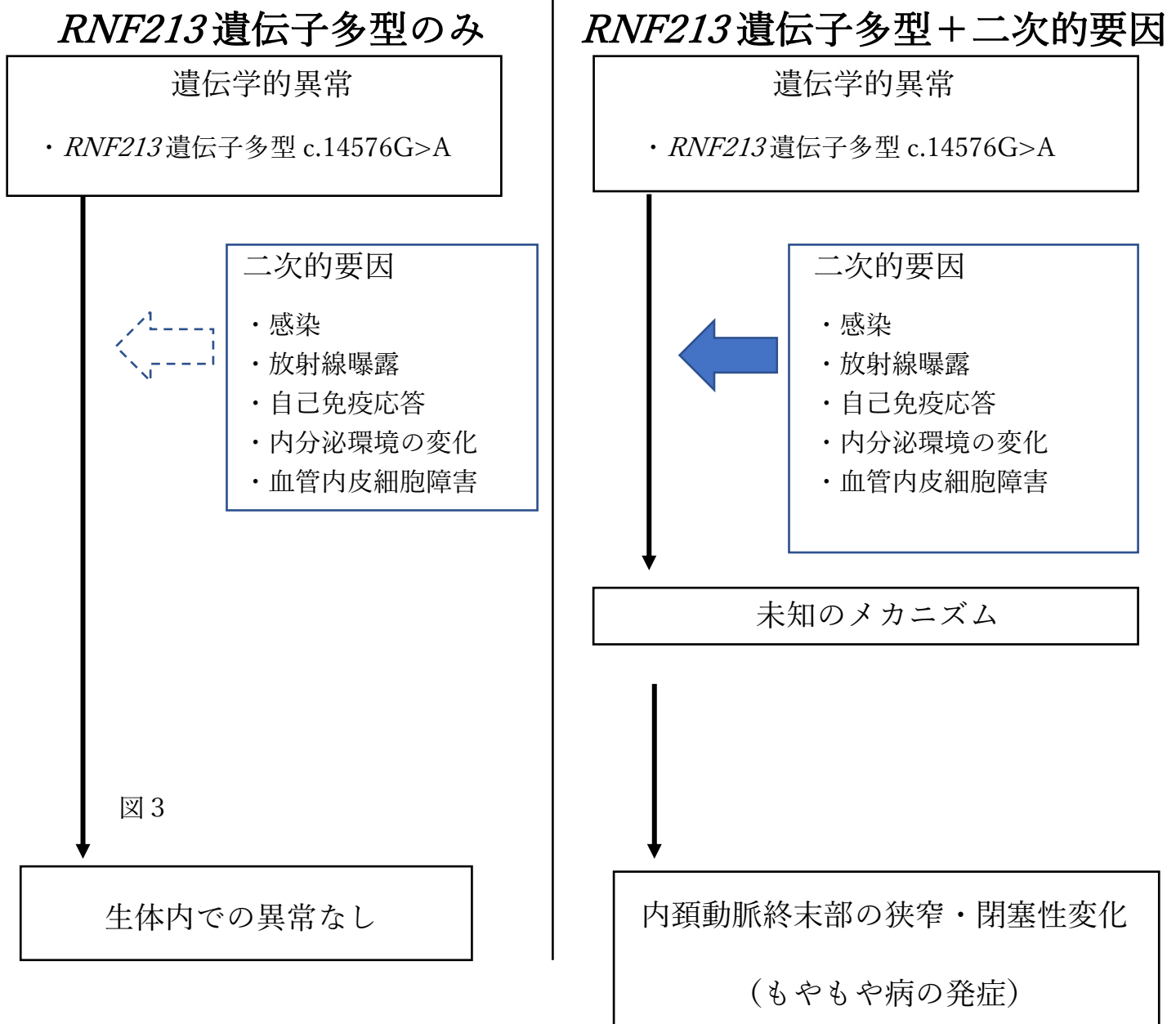


図 2 もやもや病における病態仮説 two hit theory

疾患感受性遺伝子 *ring finger protein 213* (*RNF213*) 遺伝子多型 c.14576G>A のみでは、もやもや病は発症しない。感染、放射線曝露、自己免疫応答等の二次的要因が加わることで、もやもや病が発症する two hit theory が提唱されているが、詳細なメカニズムは不明である。

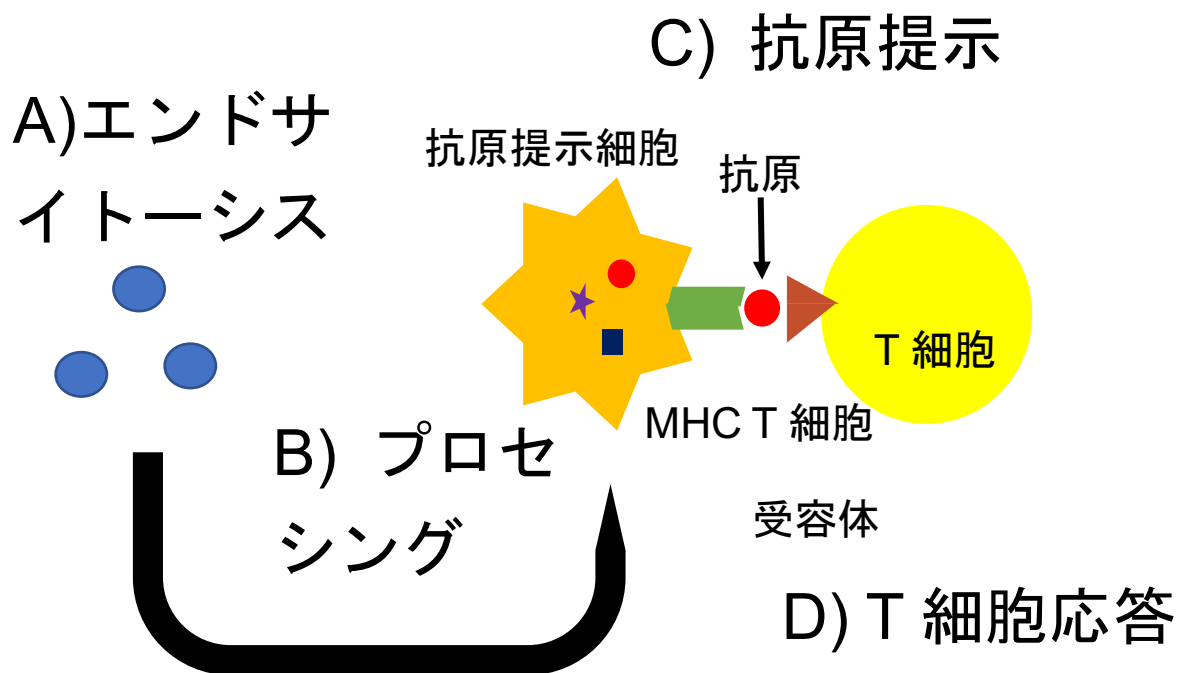


図3 抗原のエンドサイトーシス・プロセッシング機構

樹状細胞は、抗原をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込み (A)、細胞内で蛋白質をペプチド断片に分解する細胞内プロセッシングを経て(B)、major histocompatibility complex (MHC)上に抗原提示し(C)、T細胞にシグナルが伝えられ、T細胞による免疫応答が起こる(D)。

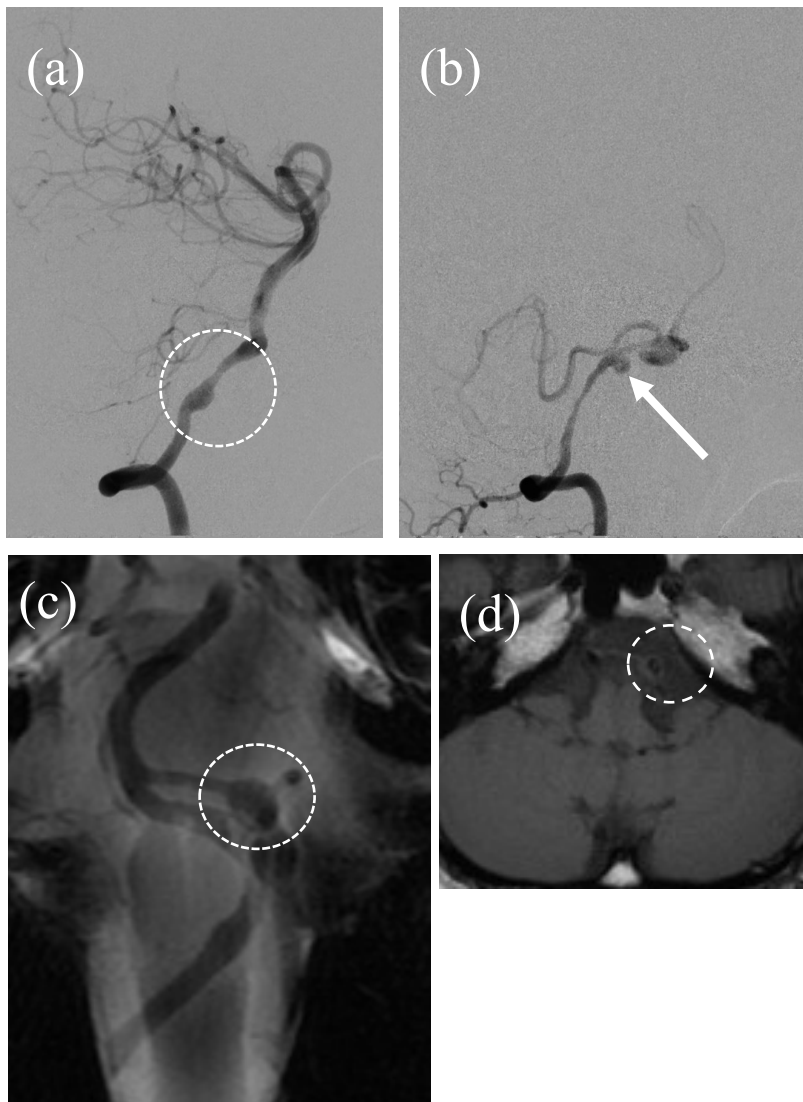


図4 椎骨動脈解離の画像所見

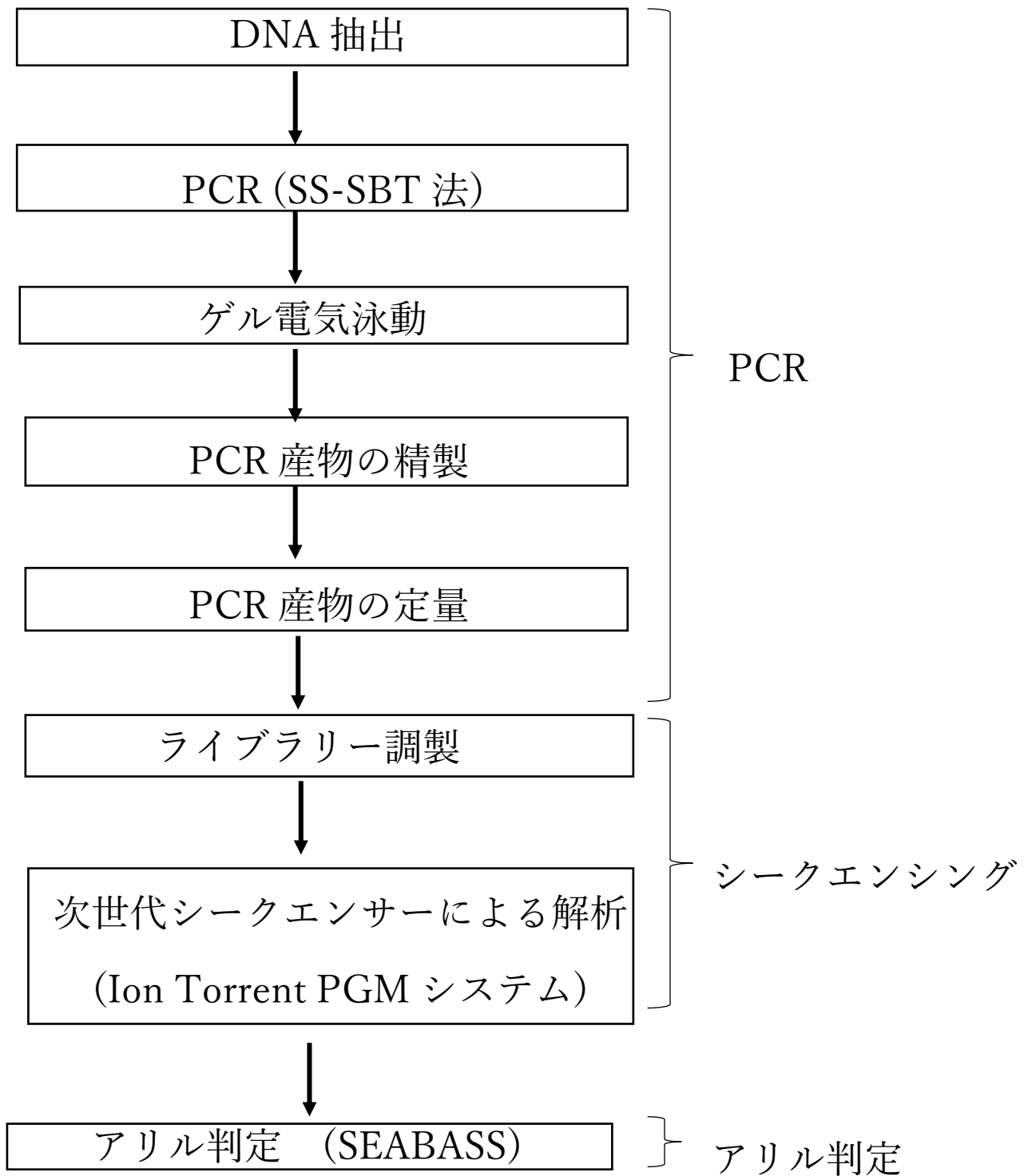
(a) 椎骨動脈解離患者の脳血管撮影所見（右椎骨動脈撮影側面像）。右椎骨動脈に pearl and string 様の解離病変（点線）を認める。

(b) 椎骨動脈解離患者の脳血管撮影所見（左椎骨動脈撮影側面像）。左椎骨動脈に瘤様拡張（矢印）を認める。

(c) 椎骨動脈解離患者の MRI Basi-parallel anatomical scanning。左椎骨動脈の瘤様拡張を

認める。

(d) 椎骨動脈解離患者の MRI T1 強調画像。左椎骨動脈に壁内血腫（点線）を認める。



## 図 5 SS-SBT 法による次世代シーケンシングを用いた *HLA* アリルの決定

遺伝子全領域を各遺伝子座毎に増幅可能な高解像度 DNA タイピング(Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT)法による polymerase chain reaction(PCR)の後、Ion Torrent PGM system により次世代シーケンシングを行った。次世代シーケンス用アリル判定プログラム(SEquence Alignment Based ASsigning Software; SEABASS)を用いてアリル判定を行なった。

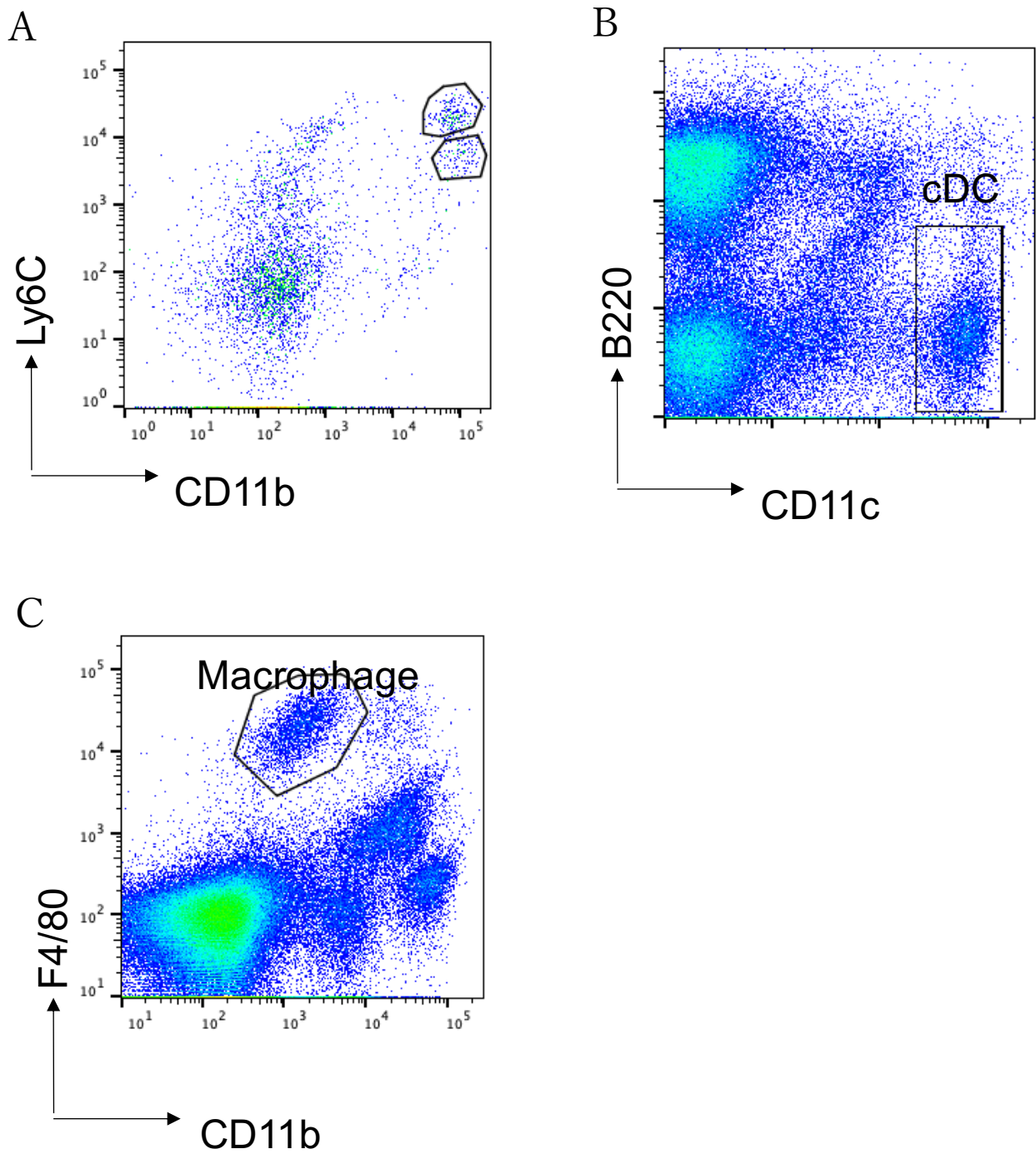


図6 免疫細胞分画の単離

(a)  $CD11b^+Ly6C^{high}$  分画を単球として、 $CD11b^+Ly6C^{int}$  を好中球として分離した。

(b)  $CD11c^+B220^-$  分画を conventional dendritic cell (cDC) として分離した。

(c) CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>high</sup>分画を脾臓マクロファージとして分離した。

略語：cDC, conventional dendritic cell



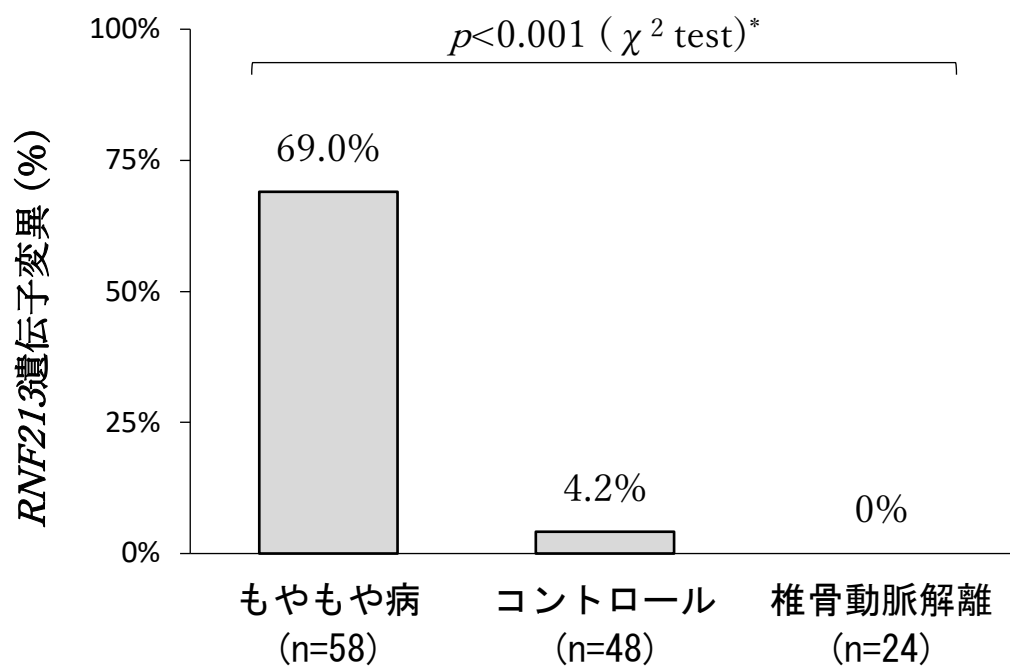


図7 頭蓋内血管病変と *RNF213* 遺伝子多型 c.G1457G>A の関連

*RNF213* 遺伝子多型 c.1457G>A の頻度をもやもや病患者(n = 58)、健常者(n = 48)、椎骨動脈解離患者(n = 24)で比較した。もやもや病患者と比較して、椎骨動脈解離患者では、*RNF213* 遺伝子多型 c.1457G>A を有する頻度が統計学的有意に低かった( $p < 0.001$ )。

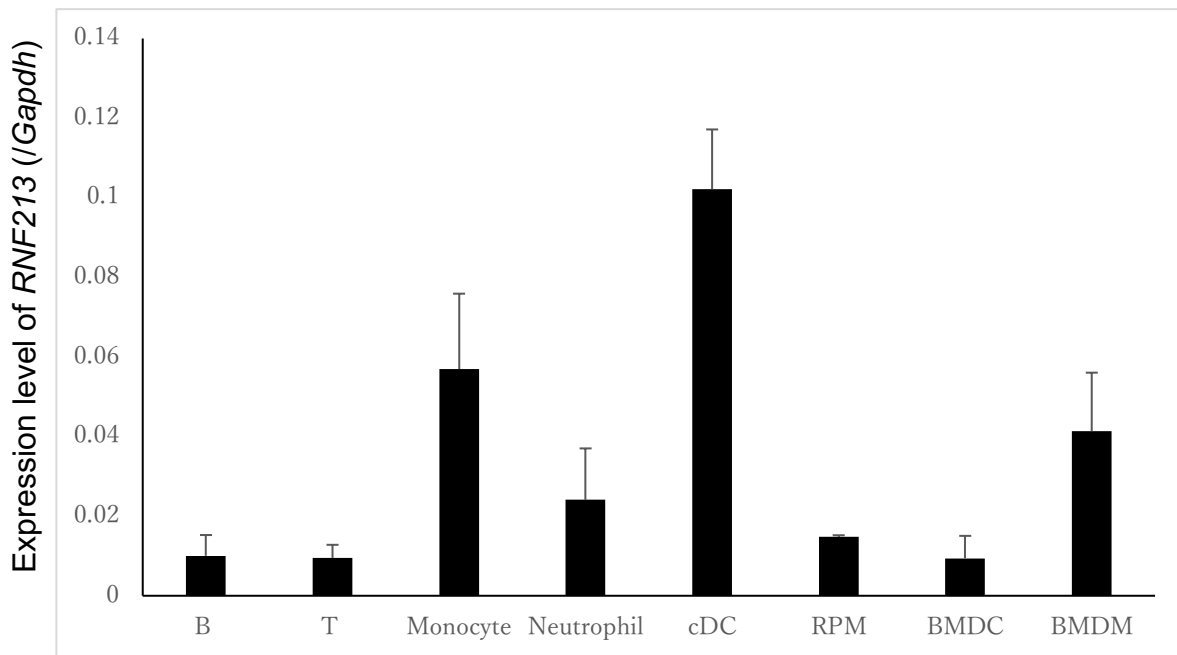
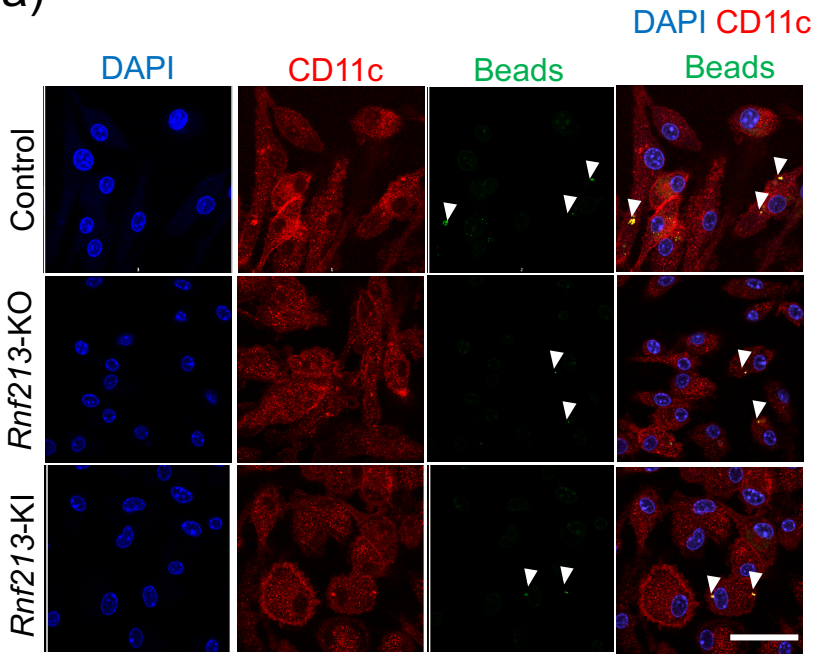


図 8 各免疫細胞分画における *Rnf213* 遺伝子の発現

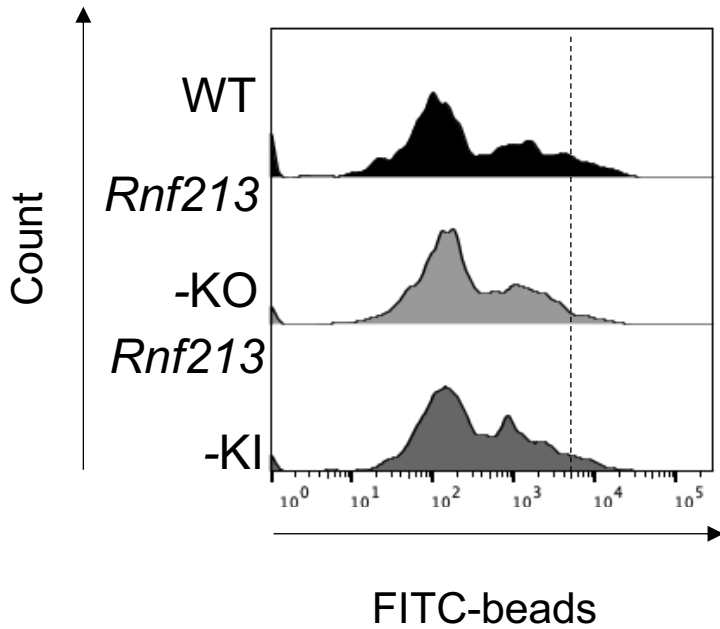
CD19<sup>+</sup>B 細胞、CD3<sup>+</sup>T 細胞、CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> 単球、CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> 好中球、CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> conventional dendritic cell、CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>high</sup> 脾臓マクロファージ、骨髄由来樹状細胞、骨髄由来マクロファージを RNA 抽出後、定量リアルタイム PCR 法により *Rnf213* 遺伝子の発現を解析した。単球、cDC において *Rnf213* 遺伝子の発現が高かった。

略語: cDC, conventional dendritic cells; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; BMDM, bone marrow-derived macrophage

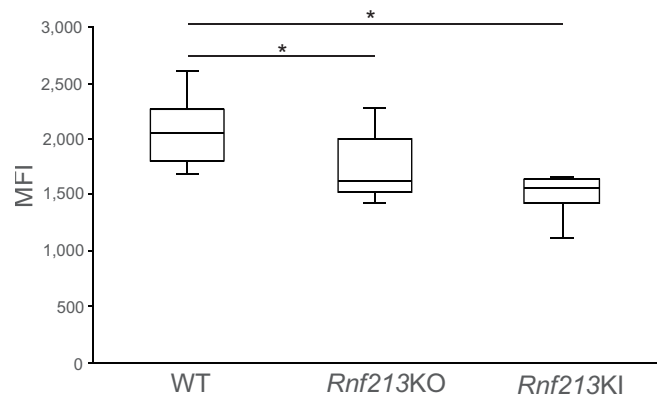
(a)



(b)



(c)

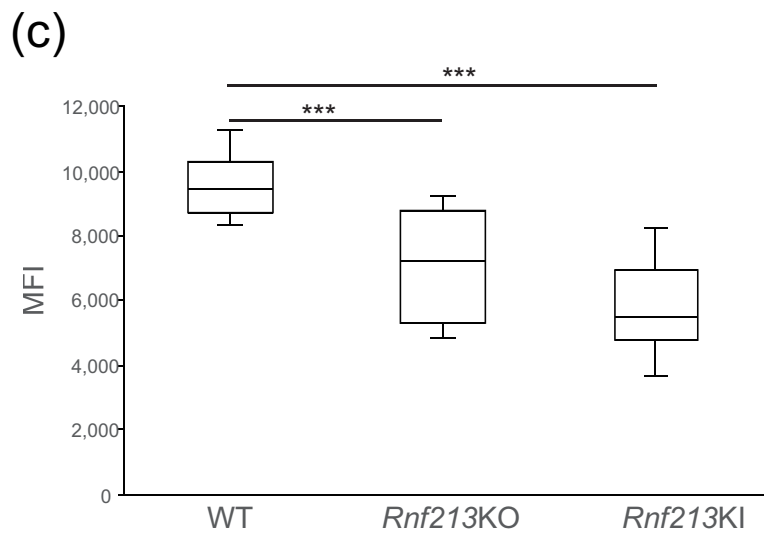
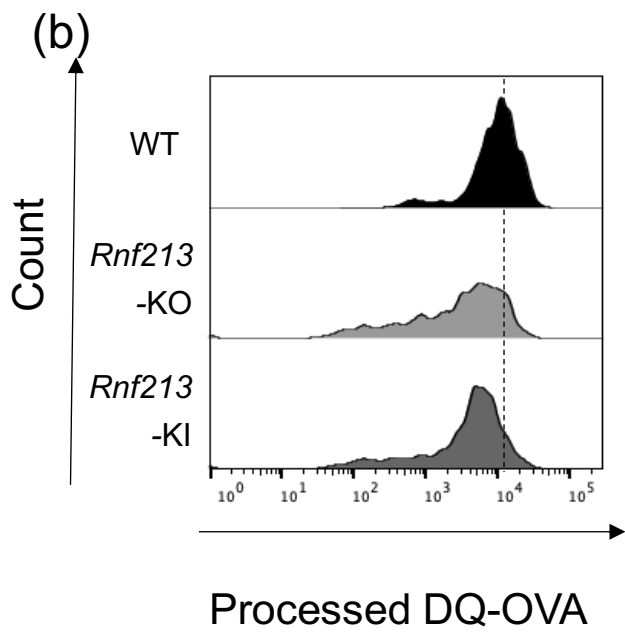
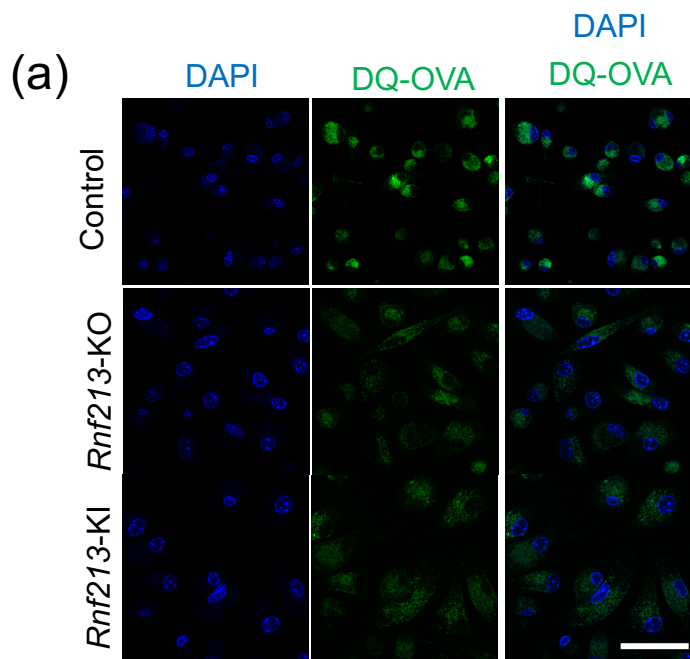


## 図9 樹状細胞による抗原エンドサイトーシス

WT, *Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI マウス骨髄由来樹状細胞の培養上清中に 100 nm FITC 標識ラテックスビーズを添加し、8 時間後に共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーでエンドサイトーシスを評価した。

(a) ビオチン標識抗ハムスター抗 CD11c 抗体および Alexa488 標識抗ハムスターIgG 抗体で蛍光染色した骨髄由来樹状細胞によるラテックスビーズのエンドサイトーシスを共焦点顕微鏡で観察した。WT マウス樹状細胞と比較して、*Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI マウス樹状細胞によるラテックスビーズのエンドサイトーシスの低下を認めた。スケールバー, 20  $\mu\text{m}$ 。

(b-c) フローサイトメトリーによる評価。FITC チャンネルの平均蛍光強度(mean fluorescence intensity; MFI)により樹状細胞によるラテックスビーズの取り込みを評価した。WT マウス骨髄由来樹状細胞と比較して、*Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI マウス樹状細胞によるラテックスビーズのエンドサイトーシスの低下を認めた。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ 。



## 図 10 樹状細胞による抗原プロセッシング

樹状細胞による抗原プロセッシング機構を評価するため、卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)が分解されると緑色蛍光を発する DQ-OVA 蛋白質を用いた。WT, *Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI マウス骨髄由来樹状細胞の培養上清中に 10 µg/ml DQ-OVA を添加し、8 時間後に共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーで抗原プロセッシングを評価した。

(a) DQ-OVA 添加 8 時間後に共焦点顕微鏡で樹状細胞による DQ-OVA の蛍光強度を評価した。*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス骨髄由来樹状細胞では WT マウス骨髄由来樹状細胞と比較して DQ-OVA の分解が低下していた。スケールバー, 20 µm。

(b-c) DQ-OVA 添加 8 時間後に、フローサイトメトリーにより DQ-OVA 分解後の緑色蛍光を FITC チャンネルで平均蛍光強度(mean fluorescence intensity; MFI)を評価した。

*Rnf213*-KO および *Rnf213*-KI マウス骨髄由来樹状細胞では、WT マウス骨髄由来樹状細胞と比較して、DQ-OVA の分解が低下していた。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ 。

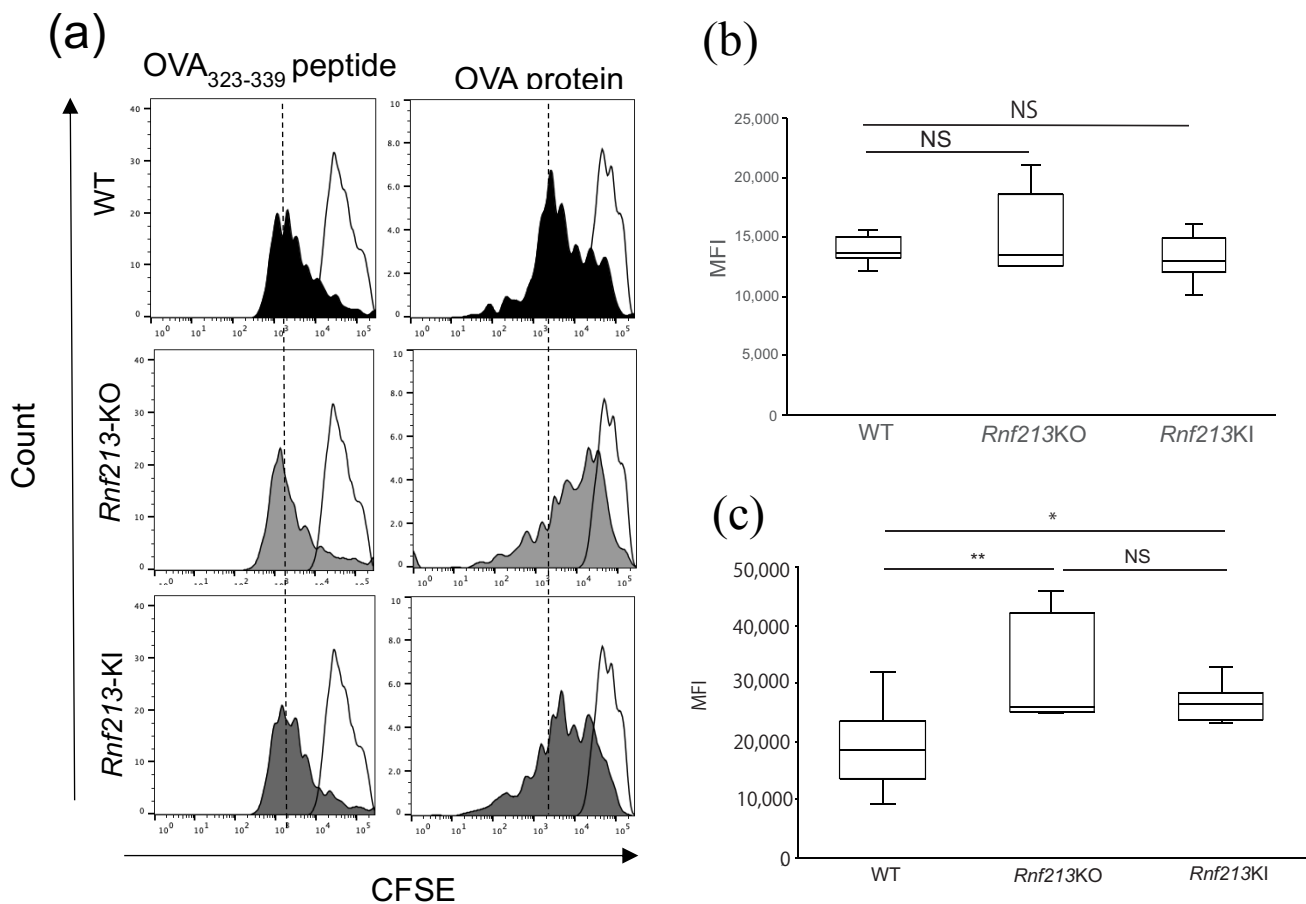


図 11 樹状細胞による T 細胞活性化能

樹状細胞による T 細胞活性化を評価するため、5  $\mu$ g/ml OVA<sub>323-339</sub> ペプチドまたは 5 mg/ml OVA 蛋白質存在下に骨髓由来樹状細胞と carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 標識した OT-II マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を共培養し、4 日後に CD4<sup>+</sup>T 細胞の CFSE 減衰をフローサイトメトリーで解析した。

(a) 代表例の CFSE 減衰のヒストグラム。Rnf213-KO, Rnf213-KI マウス骨髓由来樹状細胞による CD4<sup>+</sup>T 細胞の CFSE 減衰は OVA<sub>323-339</sub> ペプチド存在下では WT マウス骨髓由来樹状細胞と同等であったが、OVA 蛋白質存在下では WT マウス骨髓由来樹状細胞と比

較して CFSE 減衰の鈍化がみられた。

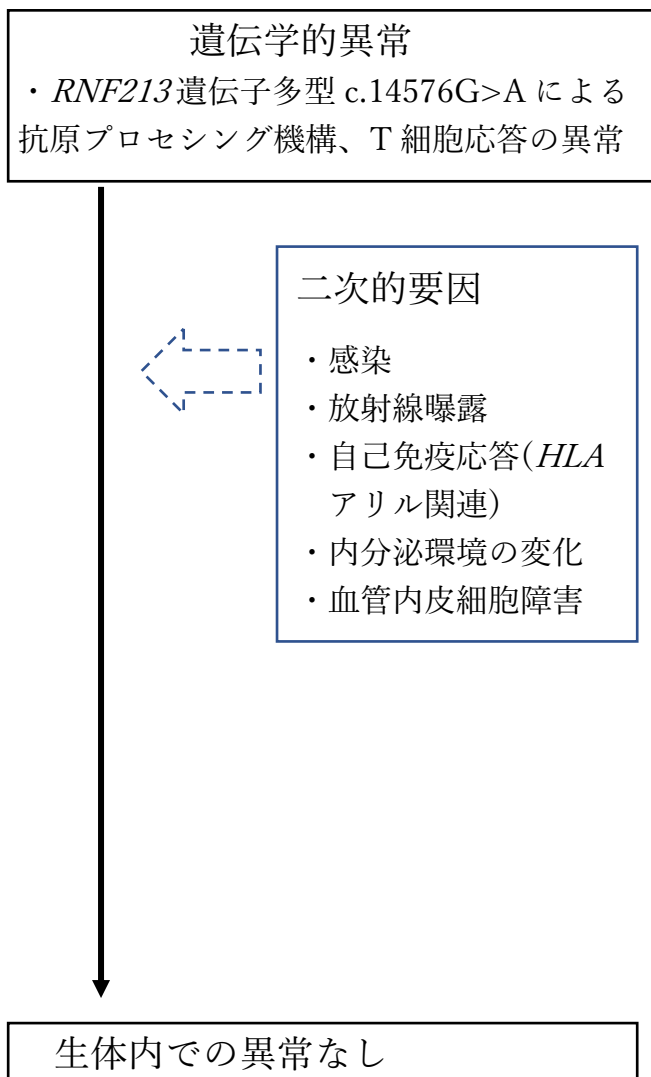
(b) フローサイトメトリーの定量評価。FITC チャンネルで平均蛍光強度(mean fluorescence intensity; MFI)を評価した。OVA<sub>323-339</sub> ペプチド存在下では、*Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI マウス骨髄由来樹状細胞による CD4<sup>+</sup>T 細胞の CFSE 減衰は WT BMDC による CFSE 減衰と同程度であった。

(c) フローサイトメトリーの定量評価。OVA 蛋白質存在下では、WT マウス骨髄樹状細胞と比較して、*Rnf213*-KO, *Rnf213*-KI マウス骨髄由来樹状細胞による CD4<sup>+</sup>T 細胞の CFSE 減衰が統計学的有意に低下していた。

NS, not significant. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



## RNF213 遺伝子多型のみ



## RNF213 遺伝子多型 + 二次的要因

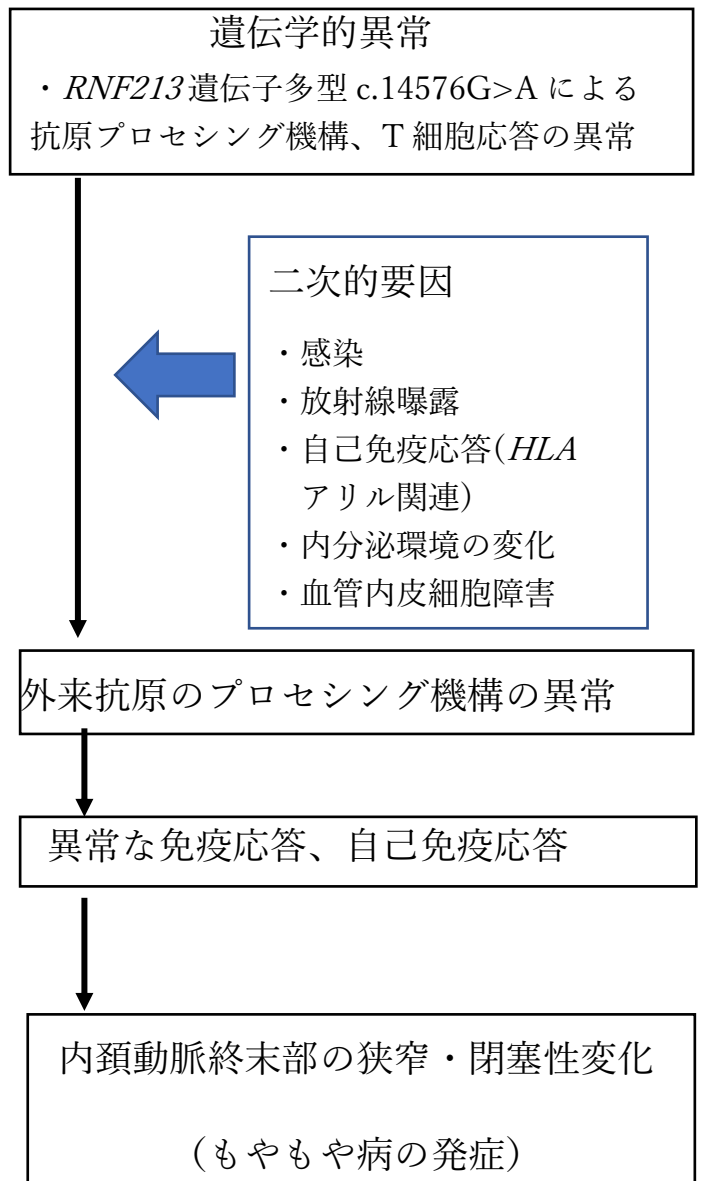


図 12 two hit theory に基づくもやもや病の病態仮説

*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A 保因者の一部がもやもや病を発症する。感染、放射線曝露、内分泌環境、*HLA-DRB1\*04:10* アリルによる免疫寛容機構の破綻の変化等の二次的要因が加わった際に、*RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A 保因者は、外来抗原のプロセッシング

が低下し、自己免疫応答をはじめとする異常な免疫応答が惹起される結果、内頸動脈終末部の狭窄・閉塞性変化をきたす”two hit theory”の病態仮説が考えられた。

## [10]表

遺伝子座	アリル	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	P 値	補正 p 値
A	2:01	10.4 (85)	11.0 (30)	1.06 (0.66-1.68)	0.785	NS
A	2:06	7.13 (58)	11.0 (30)	1.62 (0.98-2.62)	0.041	NS
A	2:07	2.70 (22)	2.21 (6)	0.81 (0.27-2.09)	0.654	NS
A	11:01	9.71 (79)	9.19 (25)	0.94 (0.56-1.53)	0.803	NS
A	24:02	37.7 (307)	37.9 (103)	1.01 (0.75-1.35)	0.964	0.030
A	26:01	7.99 (65)	9.56 (26)	1.22 (0.72-2.00)	0.417	NS
A	26:03	2.70 (22)	3.31 (9)	1.23 (0.49-2.83)	0.603	NS
A	31:01	7.86 (64)	6.99 (19)	0.88 (0.49-1.52)	0.637	NS
A	33:03	8.85 (72)	4.78 (13)	0.52 (0.26-0.96)	0.030	NS
A	Others	4.92 (40)	4.05 (11)	0.82 (0.37-1.65)	0.557	NS

表 1 健常者およびもやもや病患者における *HLA-A* 遺伝子座の頻度

アリル頻度を括弧内に示す。各アリルともやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。

Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。NS, not significant.

遺伝子座	アリル	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 P 値
B	7:02	7.00 (57)	5.15 (14)	0.72 (0.36-1.34)	0.283	NS
遺伝子座	アリル	健常者 (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
B	15:01	8.60 (70)	6.25 (17)	0.71 (0.38-1.25)	0.217	NS
B	35:01	7.99 (65)	9.19 (25)	1.17 (0.69-1.92)	0.532	NS
B	39:01	4.18 (34)	4.18 (7)	0.61 (0.22-1.41)	0.230	NS
B	40:01	5.53 (45)	5.52 (15)	1.00 (0.51-1.86)	0.993	NS
B	40:02	6.76 (55)	9.19 (25)	1.40 (0.82-2.34)	0.183	NS
B	40:06	4.05 (33)	6.25 (17)	1.58 (0.81-2.97)	0.135	NS
B	44:03	8.11 (66)	5.15 (14)	0.61 (0.31-1.13)	0.106	NS
B	46:01	4.67 (38)	3.31 (9)	0.70 (0.29-1.50)	0.340	NS
B	48:01	2.58 (21)	4.78 (13)	1.90 (0.86-4.03)	0.071	NS
B	51:01	8.23 (67)	9.19 (25)	1.13 (0.67-1.86)	0.622	NS
B	52:01	9.71 (79)	12.1 (33)	1.28 (0.81-2.01)	0.254	NS
B	54:01	7.62 (62)	7.35 (20)	0.96 (0.54-1.65)	0.887	NS

B	55:02	2.46 (20)	2.57 (7)	1.05 (0.37-2.62)	0.915	NS
B	Others	12.5 (102)	9.79 (31)	0.90 (0.57-1.39)	0.621	NS

---

**表 2 健常者およびもやもや病患者における *HLA-B* 遺伝子座の頻度**

アリル頻度を括弧内に示す。各アリルともやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。

Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。NS, not significant.

遺伝子座	アリル	健常者 (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
C	1:02	16.5 (134)	15.1 (41)	0.90 (0.60-1.33)	0.590	NS
C	3:03	13.5 (110)	15.1 (41)	1.14 (0.75-1.70)	0.520	NS
C	3:04	12.7 (103)	12.9 (35)	1.02 (0.66-1.56)	0.927	NS
C	7:02	14.9 (121)	12.5 (34)	0.82 (0.53-1.24)	0.334	NS
C	8:01	5.65 (46)	8.82 (24)	1.62 (0.92-2.76)	0.065	NS
C	12:02	9.95 (81)	11.8 (32)	1.21 (0.76-1.89)	0.396	NS
C	14:02	5.90 (48)	6.62 (18)	1.13 (0.61-2.02)	0.666	NS
C	14:03	8.23 (67)	5.15 (14)	0.60 (0.31-1.11)	0.094	NS
C	15:02	3.44 (28)	5.15 (14)	1.52 (0.73-3.04)	0.206	NS
C	Others	9.33 (76)	6.99 (19)	1.53 (0.80-2.82)	0.149	NS

表3 健常者およびもやもや病患者における *HLA-C* 遺伝子座の頻度

アリル頻度を括弧内に示す。各アリルともやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。

Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。NS, not significant.

遺伝子座	アリル	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 P 値
DRB1	1:01	7.00 (57)	5.88 (16)	0.83 (0.44-1.50)	0.523	NS
DRB1	4:03	2.95 (24)	2.57 (7)	0.87 (0.31-2.11)	0.748	NS
DRB1	4:05	14.4 (117)	10.3 (28)	0.68 (0.42-1.07)	0.087	NS
DRB1	4:06	3.44 (28)	1.10 (3)	0.31 (0.06-1.03)	0.045	NS
<b>DRB1</b>	<b>4:10</b>	<b>1.47 (12)</b>	<b>4.77 (13)</b>	<b>3.35 (1.39-8.14)</b>	<b>1.7 x 10<sup>-3</sup></b>	<b>0.030</b>
DRB1	8:02	3.81 (31)	5.15 (14)	1.37 (0.66-2.70)	0.338	NS
DRB1	8:03	7.62 (62)	8.09 (22)	1.07 (0.61-1.80)	0.801	NS
DRB1	9:01	14.9 (121)	18.0 (49)	1.26 (0.85-1.83)	0.216	NS
DRB1	11:01	2.83 (23)	1.84 (5)	0.64 (0.19-0.76)	0.374	NS
DRB1	12:01	3.56 (29)	3.31 (9)	0.93 (0.38-2.04)	0.844	NS
DRB1	12:02	2.21 (18)	1.47 (4)	0.66 (0.16-2.03)	0.453	NS
DRB1	13:02	7.62 (62)	6.25 (17)	0.81 (0.43-1.43)	0.452	NS
DRB1	14:05	1.97 (16)	1.84 (5)	0.93 (0.27-2.70)	0.895	NS
DRB1	14:06	1.60 (13)	2.94 (8)	1.87 (0.66-4.92)	0.163	NS
DRB1	14:54	3.19 (26)	1.47 (4)	0.45 (0.11-1.32)	0.133	NS



DRB1	15:01	8.11 (66)	6.25 (17)	0.76 (0.41-1.33)	0.318	NS
DRB1	15:02	8.60 (70)	10.3 (28)	1.22 (0.74-1.97)	0.398	NS
DRB1	others	4.79 (39)	8.46 (23)	1.84 (1.02-3.22)	0.024	NS

**表 4 健常者およびもやもや病患者における *HLA-DRB1* 遺伝子座の頻度**

アレル頻度を括弧内に示す。各アレルともやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。

Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。補正 p 値が統計学的有意差を示したアレルをボールドで示す。NS, not significant.

遺伝子座	アリル	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
DQB1	3:01	12.0 (98)	14.3 (39)	1.22 (0.80-1.85)	0.323	NS
DQB1	3:02	9.34 (76)	9.19 (25)	0.98 (0.59-1.60)	0.943	NS
DQB1	3:03	15.6 (127)	18.4 (50)	1.22 (0.83-1.77)	0.282	NS
DQB1	4:01	14.4 (117)	9.56 (26)	0.63 (0.39-1.00)	0.042	NS
DQB1	4:02	3.19 (26)	6.99 (19)	2.28 (1.17-4.35)	0.006	NS
DQB1	5:01	7.74 (63)	6.62 (18)	0.84 (0.46-1.48)	0.542	NS
DQB1	5:02	2.09 (17)	1.47 (4)	0.70 (0.17-2.17)	0.522	NS
DQB1	5:03	3.56 (29)	2.94 (8)	0.82 (0.32-1.87)	0.625	NS
DQB1	6:01	16.2 (132)	18.0 (49)	1.14 (0.77-1.65)	0.491	NS
DQB1	6:02	7.86 (64)	5.88 (16)	0.73 (0.39-1.31)	0.279	NS
DQB1	6:04	7.37 (60)	6.25 (17)	0.84 (0.45-1.49)	0.533	NS
DQB1	others	0.62 (5)	0.37 (1)	0.60 (0.01-5.37)	0.635	NS

表 5 健常者およびもやもや病患者における *HLA-DQB1* 遺伝子座の頻度

アリル頻度を括弧内に示す。各アリルともやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。

Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。NS, not significant.

遺伝子座	アリル	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
DPB1	2:01	25.2 (205)	29.4 (80)	1.24 (0.90-1.69)	0.170	NS
DPB1	2:02	4.30 (35)	1.84 (5)	0.42 (0.13-1.08)	0.062	NS
DPB1	3:01	4.42 (36)	4.41 (12)	1.00 (0.42-2.00)	0.994	NS
DPB1	4:01	6.02 (49)	4.41 (12)	0.72 (0.34-1.40)	0.319	NS
DPB1	4:02	10.1 (82)	8.09 (22)	0.79 (0.46-1.30)	0.335	NS
DPB1	5:01	38.0 (309)	36.4 (99)	0.94 (0.70-1.25)	0.645	NS
DPB1	9:01	7.86 (64)	9.93 (27)	1.29 (0.77-2.11)	0.287	NS
DPB1	others	4.18 (34)	5.52 (15)	1.34 (0.67-2.57)	0.357	NS

表 6 健常者およびもやもや病患者における *HLA-DPB1* 遺伝子座の頻度

アリル頻度を括弧内に示す。各アリルともやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。

Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。NS, not significant.

A/B	健常者 (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 P 値
*02:06-*39:01	2.33 (19)	1.10 (3)	0.47 (0.09-1.60)	0.212	NS
*02:07-*46:01	2.33 (19)	2.21 (6)	0.94 (0.31-2.49)	0.903	NS
*11:01-*15:01	2.58 (21)	0.74 (2)	0.28 (0.03-1.16)	0.067	NS
*11:01-*54:01	2.09 (17)	3.31 (9)	1.60 (0.62-3.86)	0.254	NS
*24:02-*40:02	2.58 (21)	2.94 (8)	1.14 (0.43-2.73)	0.749	NS
*24:02-*51:01	2.33 (19)	2.94 (8)	1.27 (0.47-3.08)	0.578	NS
*24:02-*52:01	9.46 (77)	12.1 (33)	1.32 (0.83-2.07)	0.206	NS
*24:02-*54:01	3.93 (32)	3.31 (9)	0.84 (0.35-1.82)	0.641	NS
*26:01-*35:01	2.09 (17)	1.84 (5)	0.88 (0.25-2.51)	0.880	NS
*26:01-*40:02	1.97 (16)	3.68 (10)	1.90 (0.76-4.52)	0.110	NS
*31:01-*51:01	2.83 (23)	2.94 (8)	1.04 (0.40-2.45)	0.921	NS
*33:03-*44:03	7.49 (61)	4.41 (12)	0.57 (0.27-1.09)	0.079	NS
Others	52.2 (425)	53.7 (146)	1.06 (0.80-1.41)	0.675	NS

表 7 健常者およびもやもや病患者における推定 *HLA-A-HLA-B* ハプロタイプ保因者の頻度

期待値最大化法により推定したハプロタイプ頻度を括弧内に示す。各ハプロタイプ頻度と

もやもや病との関連は $\chi^2$ 検定により評価した。Bonferroni補正による補正 p 値を示す。NS,  
not significant.

A/B/C	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
*02:06-*39:01-*07:02	2.09 (17)	1.10 (3)	0.52 (0.10-1.83)	0.295	NS
*02:07-*46:01-*01:02	2.33 (19)	2.21 (6)	0.94 (0.31-2.49)	0.903	NS
*11:01-*54:01-*01:02	1.97 (16)	3.31 (9)	1.71 (0.66-4.16)	0.201	NS
*24:02-*07:02-*07:02	5.77 (47)	4.41 (12)	0.75 (0.36-1.47)	0.391	NS
*24:02-*40:02-*03:04	1.97 (16)	2.94 (8)	1.51 (0.55-3.79)	0.343	NS
*24:02-*51:01-*14:02	1.84 (15)	2.57 (7)	1.41 (0.48-3.71)	0.459	NS
*24:02-*52:02-*12:02	9.46 (77)	11.8 (32)	1.28 (0.80-2.01)	0.273	NS
*24:02-*54:01-*01:02	3.81 (31)	2.94 (8)	0.77 (0.30-1.73)	0.506	NS
*26:01-*35:01-*03:03	2.09 (17)	1.84 (15)	0.88 (0.25-2.51)	0.800	NS
*26:01-*40:02-*03:04	1.97 (16)	4.04 (11)	2.10 (0.87-4.89)	0.057	NS
*31:01-*51:01-*14:02	1.84 (15)	2.57 (7)	1.41 (0.48-3.71)	0.459	NS
*33:03-*44:03-*14:03	7.49 (61)	4.41 (12)	0.57 (0.27-1.09)	0.080	NS
Others	59.6(467)	57.0 (152)	0.67 (0.71-1.25)	0.667	NS

表 8 健常者およびもやもや病患者における推定 *HLA-A-HLA-B-HLA-C* ハプロタイプ保因者の頻度

期待値最大化法により推定したハプロタイプ頻度を括弧内に示す。各ハプロタイプ頻度と

もやもや病との関連は $\chi^2$ 検定により評価した。Bonferroni補正による補正 p 値を示す。NS,  
not significant.

DRB1/DQB1	コントロール (2n = 814)	健常者 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
*01:01-*05:01	7.00 (57)	5.88 (16)	0.83 (0.44-1.50)	0.523	NS
*04:03-*03:02	2.83 (23)	2.57 (7)	0.91 (0.33-2.22)	0.826	NS
*04:05-*04:01	14.3 (116)	9.56 (26)	0.64 (0.39-1.01)	0.047	NS
*04:06-*03:02	3.44 (28)	1.10 (3)	0.31 (0.06-1.03)	0.045	NS
*04:10-*04:02	1.35 (11)	4.41 (12)	3.37 (1.34-8.53)	0.002	0.036
*08:02-*03:02	1.97 (16)	2.94 (8)	1.51 (0.55-3.79)	0.343	NS
*08:02-*04:02	1.84 (15)	2.21 (6)	1.20 (0.38-3.32)	0.707	NS
*08:03-*06:01	7.62 (62)	7.72 (21)	1.01 (0.58-1.73)	0.955	NS
*09:01-*03:03	14.4 (117)	17.3 (47)	1.24 (0.84-1.82)	0.247	NS
*11:01-*03:01	2.58 (21)	1.84 (5)	0.71 (0.21-1.95)	0.488	NS
*12:01-*03:01	2.58 (21)	2.94 (8)	1.14 (0.43-2.73)	0.749	NS
*12:02-*03:01	2.21 (18)	1.47 (4)	0.66 (0.16-2.03)	0.453	NS
*13:02-*06:04	7.37 (60)	6.25 (17)	0.84 (0.45-1.49)	0.533	NS
*14:05-*05:03	1.84 (15)	1.84 (5)	1.00 (0.28-2.92)	0.996	NS
*14:06-*03:01	1.60 (13)	2.94 (8)	1.87 (0.66-4.92)	0.163	NS



*15:01-*06:02	7.86 (64)	5.88 (16)	0.73 (0.39-1.31)	0.279	NS
*15:02-*06:01	8.60 (70)	10.3 (28)	1.22 (0.74-1.97)	0.398	NS
Others	10.7 (87)	12.9 (35)	1.23 (0.79-1.90)	0.324	NS

表 9 健常者およびもやもや病患者における推定 *HLA-DRB1-HLA-DQB1* ハプロタイプ保

因者の頻度

期待値最大化法により推定したハプロタイプ頻度を括弧内に示す。各ハプロタイプ頻度と

もやもや病との関連は $\chi^2$ 検定により評価した。Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。補

正 p 値が統計学的有意差を示した推定ハプロタイプをボールドで示す。NS, not significant.

DRB1/DQB1/DPB1	コントロール (2n = 814)	もやもや病 (2n = 272)	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値	補正 p 値
*01:01-*05:01-*04:02	6.02 (49)	5.15 (14)	0.85 (0.42-1.59)	0.594	NS
*04:05-*04:01-*05:01	8.35 (68)	6.25 (17)	0.73 (0.40-1.29)	0.263	NS
*04:06-*03:02-*02:01	2.33 (19)	0.74 (2)	0.31 (0.03-1.30)	0.097	NS
*08:02-*03:02-*05:01	0.86 (15)	0.74 (7)	1.41 (0.48-3.71)	0.459	NS
*08:03-*06:01-*02:01	2.46 (20)	4.78 (13)	1.99 (0.90-4.27)	0.053	NS
*08:03-*06:01-*05:01	2.46 (20)	2.21 (6)	0.90 (0.29-2.34)	0.815	NS
*09:01-*03:03-*02:01	4.30 (35)	5.88 (16)	1.39 (0.71-2.63)	0.286	NS
*09:01-*03:03-*05:01	9.21 (75)	10.7 (29)	1.18 (0.72-1.88)	0.482	NS
*13:02-*06:04-*04:01	5.04 (41)	2.94 (8)	0.57 (0.23-1.26)	0.149	NS
*15:01-*06:02-*02:01	4.91 (40)	3.31 (9)	0.66 (0.28-1.41)	0.270	NS
*15:02-*06:01-*09:01	5.90 (48)	7.72 (21)	1.34 (0.74-2.32)	0.286	NS
Others	53.9 (384)	57.4 (130)	1.03 (0.77-1.36)	0.859	NS

表 10 健常者およびもやもや病患者における推定 *HLA-DRB1-HLA-DQB1-HLA-DPB1* ハ

プロタイプ保因者の頻度

期待値最大化法により推定したハプロタイプ頻度を括弧内に示す。各ハプロタイプ頻度と

もやもや病との関連は  $\chi^2$  検定により評価した。Bonferroni 補正による補正 p 値を示す。NS,

not significant.

			単変量		多変量	
	<i>DRB1*04:10</i> (+)	<i>DRB1*04:10</i> (-)	オッズ比	p 値	オッズ比	p 値
	(n = 13)	(n = 123)	(95%		(95%	
			信頼区間)		信頼区間)	
年齢	38.8 ± 10.8	43.6 ± 15.4		0.258 †		
性別 (男: 女)	1:12	30:93	0.26	0.297 †		
			(0.03-			
			2.07)			
既往歴						
糖尿病	0% (0)	0.8% (1)	0	0.744 †		
甲状腺疾患	23.1% (3)	4.1% (5)	7.08	0.029 †	5.61	0.039
			(1.47-		(1.09-	
			34.0)		28.9)	
他の自己免疫疾患	0% (0)	0% (0)	0	1.000 †		

*RNF213* 遺伝子多型 0.784 §

c.14576G>A

G/G 38.5% (5) 30.1% (38) 1.40 0.549 ‡

(0.43-

4.55)

G/A 61.5% (8) 67.4% (83) 0.77 0.771 ‡

(0.24-

2.51)

A/A 0% (0) 1.6% (2) 0 1.000 ‡

鈴木分類 0.187 §

1-2 15.4% (2) 27.6% (34) 0.513 ‡

3-4 86.4% (11) 60.2% (74)

5-6 0% (0) 12.2% (15)

発症年齢 30.1 ± 13.3 35.4 ± 16.0 0.206 †

小児 15.4% (2) 17.9% (22) 0.48 0.822 ‡

(0.11-

			1.75)	
60 歳以上	0% (0)	4.1% (5)	3.64	0.459 †
			(0.77-	
			17.1)	
周産期	0% (0)	4.9% (6)	0	0.415 †
発症様式				0.134 §
虚血	76.9% (10)	88.7% (109)	0.43	0.428 †
			(0.11-	
			1.75)	
出血	23.1% (3)	7.3% (9)	3.80	0.091 †
			(0.88-	
			16.3)	
無症候性	0% (0)	4.1% (5)	0	0.459 †

表 11 もやもや病患者における *HLA-DRB1\*04:10* と臨床所見との関連

Mann-Whitney の U 検定、Fisher の正確確率検定、 $\chi^2$  検定により *HLA-DRB1\*04:10* アレルを有するもやもや病患者群と *HLA-DRB1\*04:10* アレルを有さないもやもや病患者群間での臨床所見との関連を解析した。括弧内に患者数を示す。平均値は平均±標準偏差で

記載した。年齢・性別調整のために多変量解析を行なった。† Mann–Whitney’s U test; ‡

Fisher’s exact test; § chi-square test. *RNF213*, *ring finger protein 213*.

	疾患群		
	もやもや病	コントロール	椎骨動脈解離
N	58	48	24
<i>RNF213</i> 遺伝子多型, n	40	2	0
<i>RNF213</i> 遺伝子多型, %	69.0%	4.2%	0%
		OR 0.61	OR 0.58
多変量解析	1.00 (Reference)	95%CI (0.41 - 0.89)	95%CI (0.36 - 0.92)
		p = 0.010	p = 0.021

表 12 *RNF213* 遺伝子多型 c.14576G>A と頭蓋内血管病変との関連

性別（男、女）、年齢（連続変数）により調整後の多変量解析。ポアソン回帰分析により遺伝子変異率を推定した。OR, odds ratio; CI, confidence interval