

## Long read sequencing によるもやもや病の新規遺伝子異常の同定

宮脇 哲

東京大学医学部 脳神経外科

### 【研究の背景】

もやもや病は特発性の脳血管狭窄疾患であり、脳卒中を引き起こし患者予後に大きく関わる。その疾患感受性遺伝子として *RNF213* 遺伝子が特定され、この遺伝子上のミスセンス変異 p.Arg4810Lys がもやもや病の発症と関連していることが明らかとなっている。しかしながらこの変異は健常日本人の約 2% が有していることが知られ、一方でもやもや病の有病率が 10 万人に 3-10 人ほどであることから、この変異単独では発病を説明できず、発症機序は未だ不明である。

### 【目 的】

従来の遺伝子解析手法では検出できない構造多型・繰り返し配列の異常伸長などの同定を可能とする long read sequencing という新しい遺伝子解析手法を用いて、もやもや病の新規の疾患関連遺伝子構造異常を同定し発症メカニズムを解明することを目的とする。

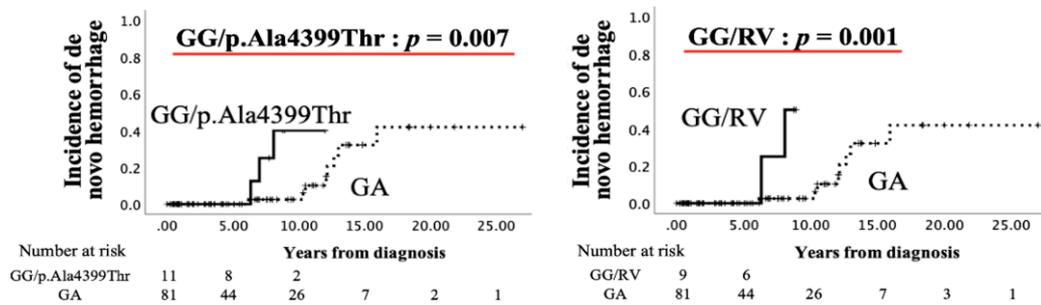
### 【方 法】

もやもや病患者の末梢血から抽出した DNA サンプルを使用し、p.Arg4810Lys に関しては Sanger 法にて評価。*RNF213* のその他の変異に関しては、ショートリードを利用した次世代シーケンサーを用いて評価した (Twist Comprehensive Exome Panel Kit を使用)。さらに Pac Bio Sequel 2 (HiFi reads) を用いた long read sequencing により、*RNF213* を中心に次世代シーケンサーでは解析困難な構造多型・繰り返し配列の解析を行なった。*RNF213* を中心とした領域のキャプチャーは、xGen Lockdown プローブを用いたハイブリダイゼーションキャプチャー法によって約 1Mb の領域をキャプチャーできるようにデザインした。

### 【結 果】

#### 1. 次世代シーケンサーによる解析

まずもやもや病 139 例を対象に、次世代シーケンサーを用いて *RNF213* 全領域を解析、希少変異 (アレル頻度 1% 未満) ならびに既報でもやもや病の出血発症との関連が報告されている p.Ala4399Thr を抽出し、これらの変異がもやもや病の臨床表現型に与える影響を解析した。診断時に脳虚血症状・頭蓋内出血いづれも発症していなかった無症候半球の経過を解析したところ、p.Arg4810Lys を有しておらず代わりに希少変異や p.Ala4399Thr を有している場合は p.Arg4810Lys を有する場合に比して、経過中に新規に頭蓋内出血を発症するリスクが有意に高いことが明らかとなった。即ち、もやもや病の発症と関連する p.Arg4810Lys を持たない場合は、その他の希少変異や p.Ala4399Thr といった変異がもやもや病の臨床表現型に対する修飾因子となっている可能性が示唆された (図)。p.Arg4810Lys 以外の因子にも着目する意義を提起するこの結果は Translational Stroke Research 誌に報告した<sup>1)</sup>。



## 2. Long read sequencing による解析

現時点で得られた 48 検体分の long read sequencing のデータの解析途中の結果ではあるが、もやもや病患者の中でも症例によって長さのばらつきがある繰り返し配列を *RNF213* 内に認める他、健常人との比較でも長さの異なる繰り返し配列を認めている。今後さらに症例数を増やし、健常人と比較してもやもや病に特異的な構造異常や、もやもや病症例の中でも臨床表現型の差異に影響しているような構造異常を同定することを目指している。

## 【考 察】

未だその発症機序や臨床表現型の多様性に関わる因子が明らかとなっていないもやもや病において、従来より着目されてきた p.Arg4810Lys 以外に、他の遺伝子因子を探索することは重要と考えられる。今回次世代シーケンサーを用いた解析で p.Arg4810Lys 以外の変異の重要性を明らかにし、さらに long read sequencing によりこれまで未解明であった遺伝子構造異常にまで解析の幅を広げたいと考えている。特に long read sequencing により解析が可能となる繰り返し配列に関しては、近年多くの疾患との関連が明らかになってきており、また世代を経るごとに発症年齢が若年化・重症化するという表現促進現象にも繰り返し配列の長さに関連していることも明らかとなってきた。もやもや病においても同様の表現促進現象が認められることが知られており、繰り返し配列の解析意義は大きいと考えている。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回、long read sequencing による解析によって新規の遺伝子構造異常ともやもや病との関連が明らかにできれば、もやもや病の病態解明につながる可能性がある。また現時点では病態が未解明であるが故に、もやもや病に対する根本的治療法も確立していない。今後病態が解明されればこうした遺伝子解析に基づいた個別化医療や根本的治療法の開発につながる可能性もあり、本研究の意義・貢献度は大きなものとなる可能性があると考えている。

## 【引用文献】

1. Torazawa S, Miyawaki S, Imai H, Hongo H, Ishigami D, Shimizu M, Ono H, Shinya Y, Sato D, Sakai Y, et al. RNF213 p.Arg4810Lys Wild Type is Associated with De Novo Hemorrhage in Asymptomatic Hemispheres with Moyamoya Disease. *Translational Stroke Research*. 2023. doi: 10.1007/s12975-023-01159-z