

ギャップ結合遺伝子異常に着目した血管奇形の病態解明と治療法探索



東京大学医学部脳神経外科・助教 本郷 博貴

【緒言】

血管奇形は異常血管の集簇を特徴とする疾患の総称である。全身に広く発生し、各臓器の機能障害や疼痛、整容上の問題等の原因となる。治療として外科的摘出や血管内治療が行われるものの難治な症例も多く、原因・病態の解明とそれに基づいた根治的な薬物療法の開発が求められてきた。筆者らは先行研究において、血管奇形における未知の病態の解明を目的に、原因遺伝子が未同定の眼窩内海绵状血管奇形に着目した解析を行い、*GJA4*の体細胞点変異 *GJA4* c.121G>T (p.Gly41Cys) が眼窩内海绵状血管奇形に高頻度に認められることを明らかにした。細胞実験により、同変異が血管内皮細胞機能異常の原因となることも同定した。同変異はその後皮膚、肝臓などの血管奇形にも認められることが報告された。*GJA4*は血管組織（内皮細胞や平滑筋細胞）においてヘミチャネルやギャップ結合を形成するタンパク質として知られていたが、遺伝子変異と血管奇形との関連は知られていなかったことから、*GJA4*変異の解析を行うことで血管奇形における未知の病態の解明につながる可能性があると考えられ、本研究を行った。

【方法・結果】

1. *GJA4* c.121G>Tノックインマウスの作製

GJA4 c.121G>T の機能解析を目的とし、同変異ノックインマウスを作製した。B57BL/6マウス受精卵に対しCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集を行うことで、全身性に*GJA4* c.121G>Tをノックインしたマウスを作製した。まずヘテロ接合体を得て、野生型B57BL/6との交配を行うことでマウスを繁殖したところ、ヘテロ接合型変異体では明らかな表現型が観察されなかった。そこで、ヘテロ接合型変異体同士を交配しさらに繁殖したところ、得られた産子は野生型もしくはヘテロ接合型変異体のいずれかでありホモ接合型変異体は認められなかった。そこで妊娠中のマウスで帝王切開を行うことで胎児を得て観察したところ、E12.5（胎生12.5日齢）までの胎児ではホモ接合型変異体が認められたもののE13.5以降ではホモ接合型変異体で生存が確認された胎児は含まれなかった。以上の結果から、*GJA4* c.121G>Tのホモ接合型変異体では、E13.5頃に死亡すると考えられた。

2. *GJA4* c.121G>Tノックインマウスの胎児の評価

GJA4 c.121G>Tノックインマウス胎児について、各胎齢のマウスの表現型を評価した。まず、胎生早期のマウスとしてE9.5の胎児を観察したところ、ヘテロ接合型変異体、ホモ接合型変異体とも、野生型胎児と比較し明らかな外観の差異は認められなかった（図1上段）。続いてE14.5の胎児を評価したところ、ホモ接合型変異体では死亡していた一方で、ヘテロ接合型変異体では、外観上、野生

型と比較し明らかな表現型は観察されなかった（図1下段）。さらに、以上のタイミングの間で、生存したホモ接合型変異体が観察されていたE12.5の胎児を評価したところ、ホモ接合型変異体では全身の皮膚がやや赤色調を呈しており、一部では異常血管を疑うような拡張血管と思われる所見が認められた。ヘテロ接合型変異体については明らかな表現型は認められなかった（図1中段）。以上の結果から、*GJA4* c.121G>Tは生体内で有害であり、胎生中期に血管形成障害を惹起することによりマウスを死亡させることが示唆された。

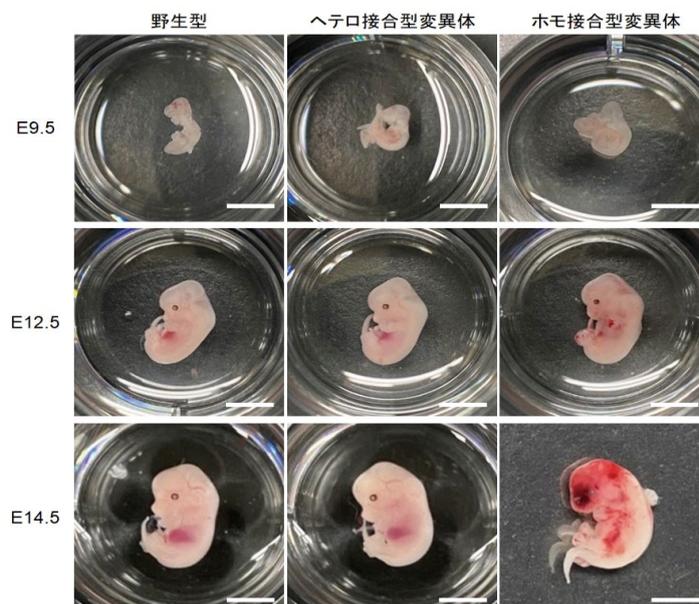


図1. 全身性*GJA4*ノックインマウス胎児ホモ接合型変異体胎児はE12.5で皮膚血管拡張を示しE14.5までに死亡した。

3. ヒト血管内皮細胞株を用いた遺伝子発現変動の評価

眼窩内海綿状血管奇形においては病変内の血管内皮細胞が間葉細胞の性質をもつ細胞へ分化する内皮間葉転換（Endothelial-to-Mesenchymal Transition：EndMT）を生じ、これが病態の形成に関与していることが過去の報告で示唆されている（引用）。そこで、*GJA4* c.121G>TによりEndMTに合致する遺伝子発現変動が生じるかどうかを評価した。一般的なヒト血管内皮細胞株であるHUVECを用い、レトロウイルスベクターを用いて変異型および野生型*GJA4*を導入した。導入3日後の細胞からRNAを抽出し、血管内皮細胞マーカー（*CDH5*, *PECAMI*）、EndMTマーカー（*ACTA2*, *TAGLN*, *VIM*, *CDH2*）、EndMT誘導転写因子（*KLF4*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*）のmRNA発現を比較した。この結果、変異型HUVECでは一部の血管内皮細胞マーカー（*PECAMI*）の発現が低下しEndMT誘導転写因子（*KLF4*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*）の発現が上昇する傾向が認められた（図2）。以上の結果から、眼窩内海綿状血管奇形において*GJA4* c.121G>TがEndMTを誘導する要因となっている可能性が示唆された。

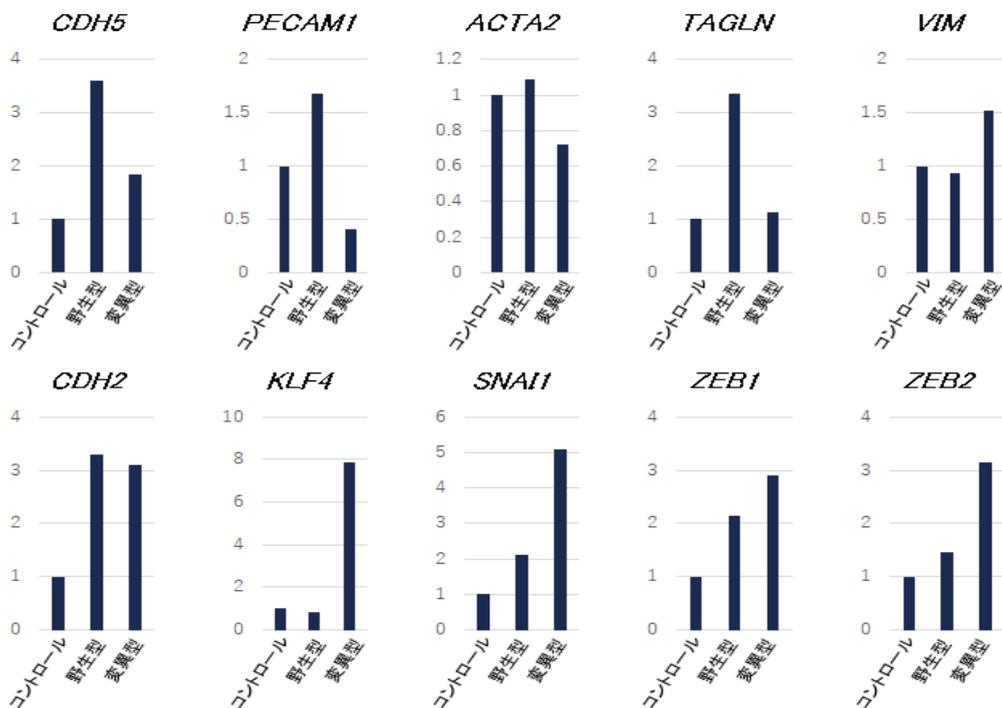


図2. 野生型/変異型*GJA4*導入HUVECにおけるEndMTマーカー発現
 変異型HUVECでは、血管内皮細胞マーカー *PECAM1* のmRNA発現が低下し、
 EndMT誘導転写因子 (*KLF4*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*) のmRNA発現が上昇した。

【考察】

全身性*GJA4* c.121G>Tノックインマウスを作製し、同*GJA4*変異が生体内で有害であることを明らかにした。同遺伝子変異が、血管内皮細胞内においてEndMTを誘導する因子となっている可能性を示した。今後、より発展的なモデル動物を対象により詳細な解析を行うことで、*GJA4* c.121G>Tにより血管奇形形成に至る詳細な分子メカニズムを解明することを目指す。