

脳動脈瘤のDNAマイクロアレイ解析：ゲノム情報を用いて

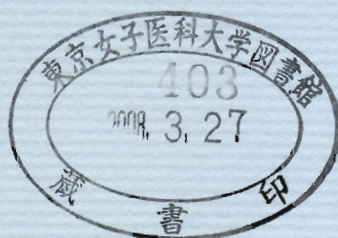
課題番号：17591533

平成17年度—平成18年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C))

研究成果報告書

平成19年3月30日



研究代表者 糟谷英俊 (東京女子医科大学医学部講師)



はしがき

脳動脈瘤は現在、脳梗塞とともに脳血管障害の最も大きな関心事であるといえる。まず、脳動脈瘤はまれな疾患とはいいがたい事実が明らかにされてきた。最近の脳ドックの普及などにより、成人での保有率が、20人に1人と、きわめてありふれた疾患であることが明らかとなった。次に、破裂以外で発見された脳動脈瘤（未破裂脳動脈瘤）が出血するリスクがそれまで予想されていたよりも、はるかに低いことが明らかとなってきた。1998年、くも膜下出血の既往がなく、大きさが10mm以下の脳動脈瘤の年間の出血率は、0.05%との報告がなされた。ついで、同じ研究グループから、7mm以下のウィルス輪前半の脳動脈瘤の出血率は5年間で0%、同じ部位の7-12mmの脳動脈瘤の出血率は2.6%と報告された。脳動脈瘤の出血率に関しては、現在も国内外で追試研究が進行中であり、早晚これらの研究成果がでると思われる。くも膜下出血をおこした場合の死亡率は4割であるため、脳ドックなどで検出された場合、どのようなタイプの脳動脈瘤を治療するべきであるのか、医師も患者も悩んでいるのが現状である。治療にはリスクが伴うために、手術の適応が問題となるが、現時点では脳動脈瘤の大きさと部位、年齢以外に決定的なエビデンスがあるわけではなく、個々の症例にあわせて対応しているのが現状である。

大きな脳動脈瘤が出血しやすいというのは確実と考えられるが、くも膜下出血を来たした脳動脈瘤の多くは10mm以下であるのも事実である。そのために、未破裂で偶然発見され、そのままの大きさを保ち出血に至らないタイプ、だんだん大きくなり出血に至るタイプなどのほかに、脳動脈瘤が発生してすぐに出血するタイプの存在も示唆されている。

脳動脈瘤・くも膜下出血の原因としては後天的と先天的な2つの要素が考えられる。前者では、高血圧、喫煙などの環境要因が重要である。特に喫煙は、これまでのほとんどの患者対照試験で、3-4倍のリスクとして報告されてきた。また、多くの脳動脈瘤は血管の分岐部に発生することから、血行力学的な要因も、脳動脈瘤の原因として重要視されている。

一方、脳動脈瘤に遺伝要素も関係している。遺伝性疾患に脳動脈瘤が合併することや、脳動脈瘤やくも膜下出血が多発する家系が存在する。我々は、これまで、くも膜下出血・脳動脈瘤の成因を遺伝子のレベルから解明することを目指してきた。脳動脈瘤が合併する常染色体優性の多発性のう胞腎 polycystic kidney disease のような遺伝性疾患では、遺伝解析はかなり進んでおり、原因となる遺伝子やその変異も明らかとなり、疾患の発現機序も明らかにされつつある。しかし、遺伝性疾患に合併しないほとんどの脳動脈瘤はそう単純ではない。例えば遺伝的要素が濃厚な家系の存在が明らかとされても、疾患遺伝子、遺伝様式が単一ではなく、疾患に至る浸透率もさまざまである。また、環境要因も複雑にからむことから、遺伝の解析は容易ではない。

我々は、日本脳神経外科学会認定の全国の脳神経外科施設に依頼し、脳動脈瘤の85家系、104罹患同胞対のサンプルを収集した。各家系は最低で2名以上の脳動脈瘤症例を有し、脳血管撮影、3D-CTA, MRA, 手術所見のいずれか一つ以上で、直径5mm以上の脳動脈瘤が同定された症例とした。収集されたサン

ルは全部で 179 症例で、男性 51 例、女性 128 例であった。それぞれの患者の末梢血液 7 ml からゲノム DNA 50–200 μ g を抽出し、これを PCR (polymerase chain reaction) の鋳型としタイピングを行った。多型遺伝マーカーは、Linkage Mapping Set version 2 (Applied Biosystems 社)に、日本人で情報量が高いマーカーを我々が調べて加えた合計 404 個を使用し、ゲノム全域を網羅した。最大数 179 個の genomic DNA 5 ng を鋳型に、マーカーの塩基配列を挟むようにデザインされた蛍光色素でラベルしたプライマーを用いて PCR 反応を行い、その PCR 産物を DNA Sequencer model 377 (Applied Biosystems 社)を用いて電気泳動を行った。タイピング作業は、GENESCAN, GENOTYPER software (Applied Biosystems 社)を用いて半自動的に行った。連鎖解析には、SAGE (Statistical Analysis for Genetic Epidemiology) package の SIBPAL program と GENEHUNTER program を用いた。

その結果、第 5 番染色体長腕 (5q22-31; MLS = 2.24; $p = 0.00149$)、第 7 番染色体長腕 (7q11; MLS = 3.22; $p = 0.00046$)、第 14 番染色体長腕 (14q22; MLS = 2.31; $p = 0.00120$) に連鎖を認めた。それぞれの maximum MLS はマーカー *D5S1983*、*D7S2472*、*DI4S1036* の近傍に認めた。また、LOD score > 1.0 の範囲 (90%以上の確率で原因遺伝子が存在する) は、*D5S471* – *D5S2010* (14 cM)、*D7S2415* – *D7S657* (21 cM)、*DI4S258* – *DI4S74* (11 cM) であった。

正常脳血管 ($n=4$)、破裂脳動脈瘤壁 ($n=4$)、未破裂脳動脈瘤壁 ($n=6$) の 3 群を比較するため、それぞれの群から等量ずつ用いてレファレンスとなる RNA サンプルを作成した。アジレント社 in-situ オリゴ DNA マイクロアレイキットのプロトコールに添って実験を進めた。Agilent microarray scanner を用いてアレイのスキャンを行い、それぞれの遺伝子の発現量は、Feature Extraction software を用いて解析した。データは LOWESS normalization method を用いて正規化した。スライド上すべてに発現していた遺伝子を対象とし、バックグラウンドに比較して、シグナルの弱いものは除外した。また、色素交代によって、相関係数が正であるサンプルは除外の対象とした。発現差の検定には、permutation 法、クロスバリデーション、階層クラスタリング法などを用いて行った。これまでの脳動脈瘤感受性遺伝子研究で得られたゲノム情報を用いた解析では、第 5 染色体では約 69 Mb の距離に相当し、そこには約 180 個の遺伝子が、第 7 染色体では約 31 Mb の距離に相当し、そこには約 70 個の遺伝子が、第 14 染色体では約 14 Mb の距離に相当し、そこには約 60 個の遺伝子が含まれている。これらの遺伝子の発現量の差は明らかではなかった。そこで、gene Ontology (GO) を GeneSpring GX software version 7.5 を用いて、gene canonical pathway と functional network 解析を Ingenuity Pathways Analysis を用いて行った。この結果、GO では、antigen processing が最も関連が高かった。また、canonical pathway では antigen presentation pathway が最も有意に関連があった。第 5 番染色体長腕 (5q22-31)、第 7 番染色体長腕 (7q11)、第 14 番染色体長腕 (14q22) の近傍遺伝子の発現は、正常脳血管、破裂脳動脈瘤壁、未破裂脳動脈瘤壁では有意な差はなかった。

研究組織

研究代表者：糟谷英俊（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：井ノ上逸朗（東京大学医科学研究所助教授）

研究分担者：赤川浩之（東京女子医科大学医学部助手）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,200 千円	0 千円	2,200 千円
平成 18 年度	1,300 千円	0 千円	1,300 千円
総計	3,500 千円	0 千円	3,500 千円

研究発表

（1）学会誌等

1. Akagawa H, Kasuya H, Onda H, Yoneyama T, Sasahara A, Kim CJ, Lee JC, Yang TK, Hori T, Inoue I: Endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism is not a factor influencing the aneurysm size. *J Neurosurg* 102: 68-71, 2005
2. Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Takeshita M, Hori T: Application of nicardipine prolonged-release implants: Analysis of 97 consecutive patients with acute subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 56: 895-905, 2005
3. Kubota Y, Kawamata T, Kubo O, Kasuya H, Muragaki Y, Hori T: Large facial nerve schwannomas without facial palsy: case reports and review of the literature. *Neurosurg Rev* 28:234-238, 2005
4. Krischek B, Kasuya H, Inoue I: Collagen Morphology Is Not Associated With the Ala549Pro Polymorphism of the COL1A2 Gene. *Stroke* 36:2068-69, 2005 (response to a letter)
5. Kasuya H: Application of nicardipine prolonged-release implants: Analysis of 97 consecutive patients with acute subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 58: E799, 2006 (response to a letter)
6. Kasuya H, Kubo O, Tanaka M, Amano K, Hori T: Clinical and radiological features related to the proliferating potential in 342 patients with meningioma. *Neurosurg Rev* 29:293-297, 2006
7. Krischek B, Narita A, Akagawa H, Kasuya H, Tajima A, Onda H, Yoneyama T, Hori T, Inoue I: Is there any evidence for linkage on chromosome 17cen in affected Japanese sib-pairs with an intracranial aneurysm? *J Hum Genet* 51: 491-494, 2006
8. Krischek B, Kasuya H, Akagawa H, Onda H, Hori T, Inoue I: Using endothelial nitric

- oxide synthase gene polymorphisms to identify intracranial aneurysms that are more prone to rupture in Japanese patients. *J Neurosurg* 105: 717-722, 2006
9. Akagawa H, Tajima A, Sakamoto Y, Krischek B, Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Hori T, Kubota M, Machida T, Saeki N, Hata A, Hashiguchi K, Kimura E, Kim CJ, Yang TK, Kimm K, Inoue I: A haplotype spanning two genes, ELN and LIMK1, decreases their transcripts and confers susceptibility to intracranial aneurysms. *Hum Mol Genet* 15: 1722-1734, 2006
10. Izawa M, Chernov M, Hayashi M, Kubota Y, Kasuya H, Hori T: Fatal intratumoral hemorrhage immediately after Gamma knife radiosurgery for brain metastases: Case report. *Minim Invasive Neurosurg* 49: 251-254 2006
11. Kato K, Yamane F, Hayashi M, Kasuya H, Okada Y, Kubo O, Oguni H, Oosawa M, Hori T: Hypothalamic hamartoma associated with anterior paraclinoid aneurysm of the internal carotid artery. Case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 46:491-494, 2006
12. Krischek B, Kasuya H, Hori T, Inoue I: The A/T Polymorphism of the Alpha-1-Antichymotrypsin (SERPINA3) Gene and Ruptured Intracranial Aneurysms in the Japanese Population. *Cerebrovascular Diseases* 23:46-49, 2007
13. Sasahara A, Kasuya H, Akagawa H, Ujiie H, Kubo O, Yoneyama T, Onda H, Sakamoto Y, Krischek B, Hori T, Inoue I: Increased expression of ephrin A1 in perinidal parenchyma of brain arteriovenous malformation: DNA microarray analysis. *Neurosurg Rev* (in press)
14. Barth M, Capelle HH, Weidauer S, Weiss C, Münch E, Thomé C, Luecke T, Schmiedek P, Kasuya H, Vajkoczy P: Effect of nicardipine prolonged-release implants on cerebral vasospasm and clinical outcome following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage – a prospective, randomized, double-blinded phase IIa study. *Stroke* 38 : 330-336, 2007
15. Akagawa H, Narita A, Yamada H, Tajima A, Krischek B, Kasuya H, Hori T, Kubota M, Saeki N, Hata A, Mizutani T, Inoue I: Systematic screening of lysyl oxidase-like (LOXL) family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptible gene to intracranial aneurysms. *Hum Genet* 121:377-387, 2007
16. Krischek B, Kasuya H, Onda H, Hori H: Clinical trial of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm: Analysis of 100 consecutive patients. *Neurol Med Chir (Tokyo)* (in press)
17. Izawa M, Chernov M, Hayashi M, Nakaya K, Kamikawa S, Higa T, Ujiie H, Kasuya H, Kawamata T, Okada Y, Kubo O, Iseki H, Hori T, Takakura K: Management and prognosis of cysts developed on the long-term follow-up after Gamma knife radiosurgery for intracranial arteriovenous malformations. *Surg Neurol* (in press)
18. Krischek B, Kasuya H, Hori T, Inoue I: Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells *Lancet Neurol* (submitted)
19. 糟谷英俊：脳動脈瘤の遺伝解析。脳卒中 27:596-601,2006
20. 糟谷英俊、恩田英明、氏家弘、山口浩司、川島明次、谷茂、比嘉隆、加藤宏一、久保田有一、岡田芳和、堀智勝：重症くも膜下出血の治療：ニカルジピン徐放剤を用いて。脳卒中の外科 34:274-279,2006

(2) 口頭発表

1. Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Takeshita M, Hori T: Impact of cerebral vasospasm on outcome after the application of nicardipine prolonged-release implants: Analysis of 97 consecutive patients with acute subarachnoid hemorrhage. 2005 American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. New Orleans, Louisiana April 16-21, 2005
2. Sasahara A, Kasuya H, Hori T: Increased expression of ephrin A1 in perinidal parenchyma of brain arteriovenous malformation: DNA microarray analysis. 2005 American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. New Orleans, Louisiana April 16-21, 2005
3. Kasuya H, Onda H, Hori T: Clinical trial of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm. The 13th World Congress of Neurological Surgery. Marrakesh, Morocco, June 19-24, 2005
4. Kasuya H, Kubo O, Tanaka M, Amano K, Hori T: Clinical and radiological features related to the growth potential of meningioma. 2006 American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. San Francisco, CA April 22-27, 2006
5. Kasuya H, Hori T: Meningioma at the posterior surface of the petrous bone: experience of 65 patients in 10 years. The Japanese American Friendship Symposium. 2006 American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. San Francisco, CA April 22-27, 2006 (invited lecture)
6. Krisheck B, Kasuya H, H Akagawa, Tajima A, Narita A, H Onda, T Hori, I Inoue: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms do not identify intracranial aneurysms that are more prone to rupture in Japanese patients. 2006 American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. San Francisco, CA April 22-27, 2006 (Poster Award)
7. Kasuya H: Change of gene expressions following subarachnoid hemorrhage. 9th International Conference on Cerebral Vasospasm. Istanbul 2006/6/28-30 (invited lecture)
8. Kasuya H, Onda H, Hori T: Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage is completely prevented by calcium antagonist in human. 9th International Conference on Cerebral Vasospasm. Istanbul 2006/6/28-30
9. Kasuya H, Kubo O, Chenov M, Hori T: Clinical and radiological features related to the growth potential of meningioma. 5th International Congress on Meningioma and Cerebral Venous System. Fujinomiya City 2006/11/27-29
10. Kasuya H, Hori T: Meningioma at the posterior surface of the petrous bone: experience of 65 patients in 10 years. 5th International Congress on Meningioma and Cerebral Venous System. Fujinomiya City 2006/11/27-29
11. Hori T, Kasuya H: Surgical management of foramen magnum meningioma. 5th International Congress on Meningioma and Cerebral Venous System. Fujinomiya City 2006/11/27-29
12. Hori T, Kasuya H: Tuberculum sellae meningioma: Anterior interhemispheric approach. 5th International Congress on Meningioma and Cerebral Venous System. Fujinomiya City 2006/11/27-29
13. Chernov M, Kasuya H, Kato K, Ono Y, Muragaki Y, Iseki H, Hori T, Takakura K:

Correlations between MRI and proton MRS features of intracranial meningiomas and their histopathological characteristics. 5th International Congress on Meningioma and Cerebral Venous System. Fujinomiya City 2006/11/27-29

14. 糟谷英俊：くも膜下出血と遺伝子。(シンポジウム：脳卒中への分子遺伝学的アプローチ) 第30回日本脳卒中学会総会 盛岡 2005/4/21,22 抄録集 pp109
15. 糟谷英俊：脳血管攣縮レビュー；基礎編(特別講演) 第21回 スパズムシンポジウム 盛岡 2005/4/21
16. 糟谷英俊、氏家弘、山口浩二、川島明次、谷茂、比嘉隆、岡田芳和、堀智勝：重症くも膜下出血の治療：ニカルジピンペレットを用いて 第34回日本脳卒中の外科学会 盛岡 2005/4/22,23 抄録集 pp98
17. 糟谷英俊：スパズムに対するニカルジピンペレット療法 (100例の使用経験) 第6回 舞連カンファレンス 徳島 2005/8/13
18. 糟谷英俊、赤川浩之、Boris Krischek, 恩田英明、米山琢、堀智勝：脳動脈瘤遺伝子発現プロファイリング解析 第6回分子脳神経外科学会 大阪 2005/9/4,5 抄録集 pp30
19. Krischek Boris、糟谷英俊、赤川浩之、恩田英明、井ノ上逸朗、堀智勝：脳動脈瘤の易破裂性とeNOS遺伝子多型の関連解析。第6回分子脳神経外科学会 大阪 2005/9/4,5 抄録集 pp34
20. 糟谷英俊：脳動脈瘤 最近の話題 のう胞性腎疾患研究会 (特別講演) 東京 2005/9/18
21. 谷茂、糟谷英俊、堀智勝：顔面けいれんの術中モニタリングについて。第8回脳神経減圧術研究会。横浜 2005/10/4 抄録集 pp7
22. 糟谷英俊、久保長生、日山博文、田中雅彦、堀智勝：MIB-1 index からみた髄膜腫増大を予測する臨床因子の検討。(シンポジウム：良性脳腫瘍の増大予測因子) 第64回日本脳神経外科学会総会 横浜 2005/10/5-7
23. 恩田英明、糟谷英俊、赤川浩之、堀智勝 脳動脈瘤破裂に関する genetic factor の探索。第64回日本脳神経外科学会総会 横浜 2005/10/5-7
24. Krischek Boris、糟谷英俊、赤川浩之、恩田英明、堀智勝：脳動脈瘤とSERPINA3遺伝子A/T多型の関連解析。 64回日本脳神経外科学会総会 横浜 2005/10/5-7
25. 糟谷英俊、田中雅彦、天野耕作、石川達也、堀智勝：premeatal posterior petrous meningioma : lateral suboccipital approach の有用性。第10回日本脳腫瘍の外科学会 佐賀 2005/11/24,25 抄録集 pp97
26. 糟谷英俊 脳動脈瘤 最近の話題 最新医療研究会 (特別講演) 東京 2006/1/20
27. 糟谷英俊、恩田英明、堀智勝：カルシウム拮抗薬はスパズムに有効か？ 第22回 スパズムシンポジウム 横浜 2006/3/19 抄録集 pp35
28. 赤川浩之、糟谷英俊、恩田英明、米山琢、クリシェクボリス、井ノ上逸朗、堀智勝：脳動脈瘤関連遺伝子座ELN/LIMK1連鎖不平衡ブロックの同定。 第7回日本分子脳神経外科学会 東京2006/9/2,3 抄録集 pp29 シンポジウム(脳動脈瘤の成因)
29. 米山琢、糟谷英俊、恩田英明、赤川浩之、堀智勝：脳動脈瘤感受性遺伝子同定に向けて連鎖解析後のSNPを利用した遺伝子関連解析について - COL1A2へ至

る道。第7日本分子脳神経外科学会 東京2006/9/2,3 抄録集 pp30 シンポジウム
(脳動脈瘤の成因)

30. クリシェクボリス、糟谷英俊、田嶋敦、恩田英明、赤川浩之、堀智勝、井ノ
上逸朗：網羅的遺伝子発現解析から明らかになった脳動脈瘤関連パスウェイ。

第7日本分子脳神経外科学会 東京2006/9/2,3 抄録集 pp42

31. 谷茂、糟谷英俊、堀智勝：静脈によるねじれが原因の三叉神経痛の1例。第
9回脳神経減圧術研究会 京都 2006/10/17

32. 糟谷英俊、加藤宏一、中谷幸太郎、Mikheil Chernov、久保長生、堀智勝：斜
台錐体後面髄膜腫手術症例の長期 follow-up: QOL と再発 第64回日本脳神経外
科学会総会 京都 2006/11/18-20

33. 中谷幸太郎、糟谷英俊、加藤宏一、Chernov Mikhail、井澤正博、林基弘、久
保長生、堀智勝：髄膜腫手術後ガンマナイフ治療の長期成績 第64回日本脳神
経外科学会総会 京都 2006/11/18-20

34. Krischek Boris、糟谷英俊、赤川浩之、恩田英明、堀智勝：日本人集団におけ
る脳動脈瘤形成および破裂に関わる遺伝要因。第64回日本脳神経外科学会総会
京都 2006/11/18-20

35. 糟谷英俊、加藤宏一、中谷幸太郎、久保長生、堀智勝：大きな髄膜腫の手
術 第11回日本脳腫瘍の外科学会 大阪 2006/12/8,9

(3) 出版物

1. 糟谷英俊：脳動脈瘤・くも膜下出血の分子遺伝学。板倉徹：脳血管シンポジ
ウム I 2005 ブレーン出版 pp43-52

2. 糟谷英俊：脳動静脈奇形切除術 高崎真弓、弓削孟文、稲田英一、岩崎寛、
麻酔科診療プラクティス 18 周術期の輸液・輸血療法 東京 文光堂 2005
pp168-169

3. 糟谷英俊、森舞：髄膜腫：傍矢状洞髄膜腫摘出術。堀智勝、氏家弘：術中看
護マニュアル 脳神経外科 学研研究社 2006 東京 pp114-125

4. 糟谷英俊、恩田英明、堀智勝：カルシウム拮抗薬はスパズムに有効か？脳卒
中の外科 (増刊号) 34 (suppl): 83-86, 2006

5. 糟谷英俊：プラバスタチンによるくも膜下出血後脳血管攣縮の急性期治療：
脳血管攣縮、自動調節能、遅発性虚血症状に対する効果 Medical Briefs in Brain
and Nerve 15: 3, 2006

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果