

## 175. ギャップ結合遺伝子変異による血管奇形形成機序の解明

本郷 博貴

東京大学 医学部附属病院 脳神経外科

Key words : 血管奇形, 遺伝子変異, ギャップ結合, モデル動物

### 結 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根治が困難な症例も多く、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いる。

我々は先行研究で、ギャップ結合タンパク質の一種である *GJA4* の体細胞点変異 *GJA4* c.121G>T (p.Gly41Cys) が、眼窩内海綿状血管奇形において高頻度 (25/26 例 [96.2%]) に認められることを新規に同定した [1]。まず様々な血管奇形 16 例に対し次世代シーケンサーを用いた網羅的なシーケンスを行い、眼窩内海綿状血管奇形に *GJA4* 変異が共通することを見出した。そこで droplet digital PCR を用いた追加解析を行い、同血管奇形 26 例中 25 例 (96.2%) に同変異を同定した。免疫組織染色の結果 *GJA4* タンパク質は病変中の血管内皮細胞に発現しており、magnetic-activated cell sorting を併用した変異解析により、血管内皮細胞マーカーである CD31 (PECAM1) 陽性細胞で同 *GJA4* 変異の MAF (mutation allele frequency) が高くなる結果が得られた。*GJA4* は Cx37 と呼ばれ、ヒトで 21 種あるコネキシンファミリータンパク質の一つである [2]。コネキシンは細胞膜上にヘミチャネルと呼ばれる 6 量体を形成し細胞内外のイオン、情報伝達物質の交換に働く。さらに、隣接する細胞のヘミチャネル同士が結合することで細胞間結合の一種としてよく知られるギャップ結合を形成し、隣接細胞間の情報伝達を担う。*GJA4* はコネキシンの中でも血管組織 (内皮細胞や平滑筋細胞) に高発現なアイソフォームで、血管構築や血管機能の維持に働くことが知られている [3]。そこで *GJA4* が形成するヘミチャネル、ギャップ結合の機能解析として、*Xenopus* oocyte を用いた電気生理学的解析によりチャネル活性を評価したところ、変異型において *GJA4* が形成し細胞内外の情報伝達に働くヘミチャネルの活性が亢進することが明らかとなった。また、レトロウイルスベクターにより同変異タンパク質をヒト臍帯静脈内皮細胞株 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) へ過剰発現させた結果、血管内皮細胞機能異常 (細胞形態異常、細胞生存能の低下、tube formation の低下) が惹起され、これらの異常はヘミチャネル/ギャップ結合阻害剤である carbenoxolone (CBX) により緩和された。以上の結果から、*GJA4* 変異が、channel 活性を亢進させる機能獲得型変異として頭部海綿状血管奇形の driver となっている可能性が高いと考えられた。

そこで本研究では、*GJA4* c.121G>T によるギャップ結合タンパク質の機能異常により海綿状血管奇形発生に至る分子機構を明らかにすることを目的とし実験を行った。*in vivo* 実験として同遺伝子変異ノックインマウスを作製し、さらに同変異を導入した HUVEC を用い細胞機能障害に関わる遺伝子発現変動を評価した。

### 方法および結果

#### 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。マウスとして、遺伝子改変実験に一般的に用いられる B57BL/6 (以下 B6) マウスを使用した。B6 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 (文部科学省

先端モデル動物作製支援プラットフォームの支援により作製)。まずヘテロ接合体を得て、野生型 B6 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、ホモ接合型変異体で表現型が観察される可能性を考えヘテロ接合型変異体同士を交配しさらに繁殖した。しかしヘテロ接合型変異体同士の交配によって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。このことからホモ接合型変異体が胎生致死となっている可能性が考えられた。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。この結果、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 (表 1)。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。

表 1. 胎齢毎に認められた *Gja4*c.121G>T ノックインマウスの各遺伝型の数

	野生型	ヘテロ接合型 変異体	ホモ接合型 変異体
E9.5	2	5	8
E10.5	1	5	0
E11.5	2	2	0
E12.5	8	20	6
E13.5	2	8	0
E14.5	8	12	0
E15.5	1	7	0
E16.5	1	1	0

E13.5以降で生存したホモ接合型変異体胎児は認められなかった。

## 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。この胎齢のマウスについては、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)。いずれの遺伝型マウスについても顕微鏡観察下において帝王切開後間もなくは心拍動が観察されたことで生存していたことが確認できた。続いて、野生型、ヘテロ接合型変異体数が十分認められたにも関わらずホモ接合型変異体で生存していた胎児が認められなかった E14.5 の胎児を評価した。この胎齢のマウスでは、ホモ接合型変異体では死亡しており、体は既に軟化していた。一方、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ず、帝王切開後間もなくは体動も認められたことから生存が確認された (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。この胎齢のマウスでは、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。同胎齢の胎児においても、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。

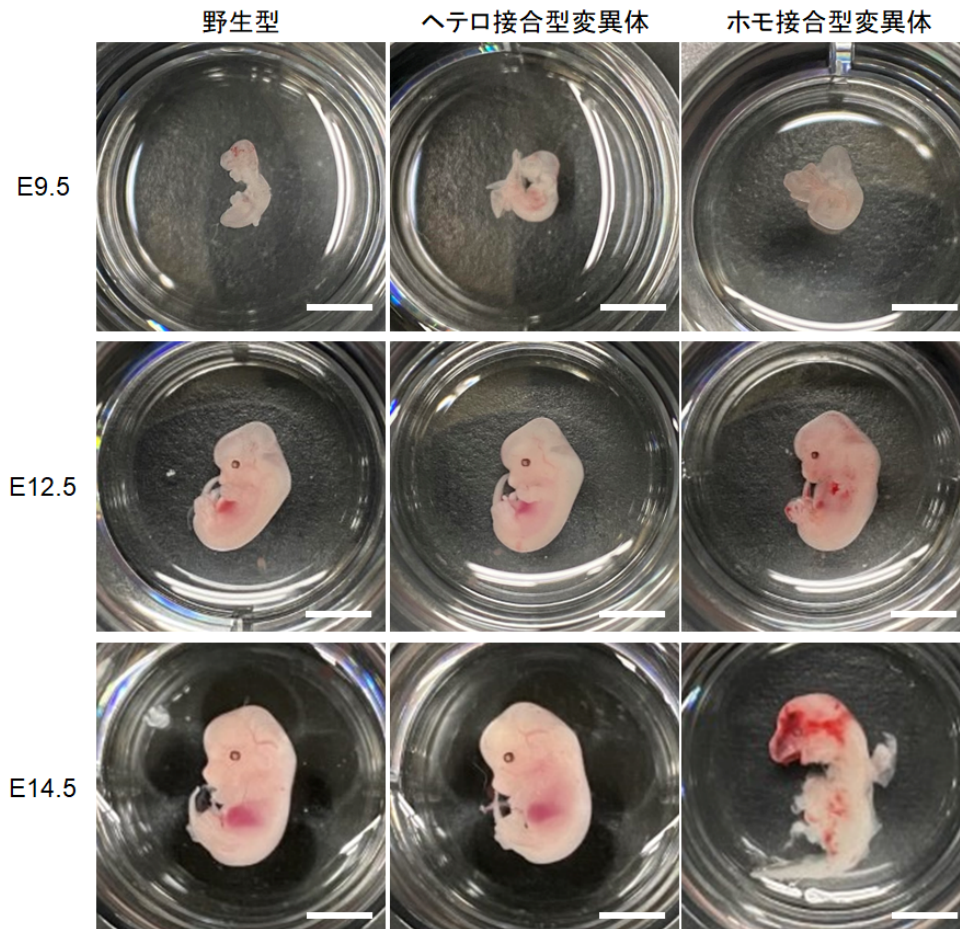


図1. 全身性 *Gja4* ノックインマウス胎児の外観

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

*GJA4* c.121G>T により血管内皮細胞内に生じる遺伝子発現変動を評価するための *in vitro* 解析を行った。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 [4]。そこで、血管内皮細胞株に *GJA4* c.121G>T を導入することで 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。細胞として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*, *PECAM1*)、EndMT マーカー (*ACTA2*, *TAGLN*, *VIM*, *CDH2*)、EndMT 誘導転写因子 (*KLF4*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*) の mRNA 発現をリアルタイム PCR を用いて比較した。この結果、変異型 HUVEC では野生型やコントロールと比較し、一部の血管内皮細胞マーカー (*PECAM1*) の発現が低下、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)。この結果から、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。

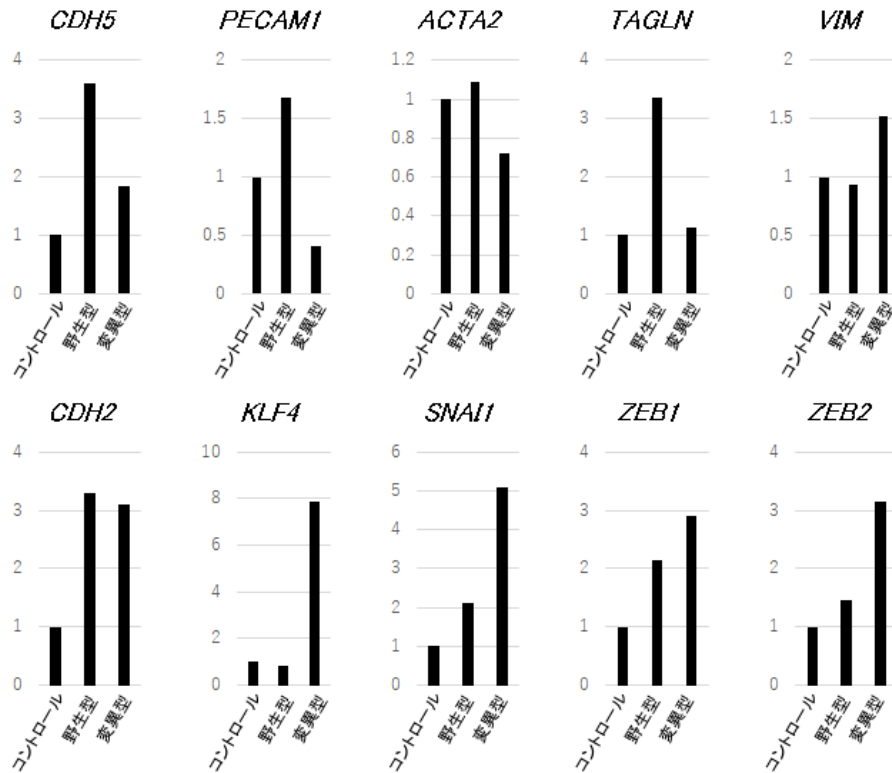


図 2. 野生型/変異型 *GJA4* 導入 HUVEC における EndMT マーカー発現解析  
 変異型 HUVEC では野生型やコントロールと比較し、血管内皮細胞マーカー  
*PECAM1* の mRNA 発現が低下し、EndMT 誘導転写因子 (*KLF4*, *SNAI1*, *ZEB1*、  
*ZEB2*) の mRNA 発現が上昇した。

## 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、同モデル動物や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。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学の齊藤延人教授、宮脇哲講師、東京大学大学院医学系研究科形成外科学の栗田昌和講師である。この場を借りて深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Hongo H, Miyawaki S, Teranishi Y, Mitsui J, Katoh H, Komura D, Tsubota K, Matsukawa T, Watanabe M, Kurita M, Yoshimura J, Dofuku S, Ohara K, Ishigami D, Okano A, Kato M, Hakuno F, Takahashi A, Kunita A, Ishiura H, Shin M, Nakatomi H, Nagao T, Goto H, Takahashi SI, Ushiku T, Ishikawa S, Okazaki M, Morishita S, Tsuji S, Saito N. Somatic GJA4 gain-of-function mutation in orbital cavernous venous malformations. *Angiogenesis*. 2023 Feb;26(1):37-52. PMID: 35902510 DOI: 10.1007/s10456-022-09846-5
- 2) Laird DW, Lampe PD. Therapeutic strategies targeting connexins. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Dec;17(12):905-921. PMID: 30310236 DOI: 10.1038/nrd.2018.138
- 3) Pohl U. Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function. *Physiol Rev*. 2020 Apr 1;100(2):525-572. PMID: 31939708 DOI: 10.1152/physrev.00010.2019
- 4) Takada S, Hojo M, Tanigaki K, Miyamoto S. Contribution of Endothelial-to-Mesenchymal Transition to the Pathogenesis of Human Cerebral and Orbital Cavernous Malformations. *Neurosurgery*. 2017 Jul 1;81(1):176-183. PMID: 28368503 DOI: 10.1093/neuros/nyx078.