



Title	血管疾患と自己免疫応答の関連に関する研究
Author(s)	安田, 充孝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17034号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17034
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100087
Type	doctoral thesis
File Information	YASUDA_Mitsutaka.pdf, 全文



学位論文

血管疾患と自己免疫応答の関連に
関する研究

(Autoimmune response in vascular diseases)

2026 年 6 月

北海道大学

安田 充孝

Mitsutaka Yasuda

学位論文

血管疾患と自己免疫応答の関連に
関する研究

(Autoimmune response in vascular diseases)

2026 年 6 月

北海道大学

安田 充孝

Mitsutaka Yasuda

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 要旨	3 頁
2. 略語表	6 頁
3. 緒言	8 頁
4. 第一章 もやもや病疾患関連遺伝子 RNF213 の機能解析	11 頁
4.1 緒言	12 頁
4.2 目的	16 頁
4.3 方法	17 頁
4.4 結果	25 頁
4.5 考察	41 頁
4.6 結語	45 頁
5. 第二章 SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種後の抗リン脂質抗体価の変動に関する検討	46 頁
5.1 緒言	47 頁
5.2 目的	52 頁
5.3 方法	53 頁
5.4 結果	56 頁
5.5 考察	65 頁
5.6 結語	67 頁
6. 総括	68 頁
7. 謝辞	70 頁
8. 利益相反	71 頁
9. 引用文献	72 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿した。

1. RNF213-TRAF2 Interaction Enhances NF- κ B Activation in Moyamoya Disease

Mitsutaka Yasuda^{1,2*}, Kaoru Murakami^{1*}, Jing-Jing Jiang^{1,3*}, Masaki Ito^{4*}, Yuki Tanaka⁵, Hiroki Tanaka¹, Rie Hasebe⁶, Takeshi Yamasaki⁶, Ari Hashimoto⁷, Shintaro Hojyo¹, Tatsuya Atsumi², Shigeru Hashimoto¹, Masaaki Murakami^{1,4,5,8}, and Miki Fujimura⁴.

International Immunology, 2025, submitted.

本研究の一部は下記の学会に発表した。

1. 安田 充孝, 藤枝 雄一郎, 崎山 広大, 多田 麻里亜, 土田 直央, 西野 慶, 守谷 悠,

河野 通仁, 加藤 将, Olga Amengual, 渥美 達也. SARS-CoV-2 ワクチン接種による抗リン脂質抗体プロファイルの変化に関する検討. 第 44 回日本血栓止血学会学術集会, 2022 年 6 月 23-25 日, 仙台.

2. 安田 充孝, 藤枝 雄一郎, 崎山 広大, 多田 麻里亜, 守谷 悠, 久田 諒, 河野 通仁, 加藤 将, Olga Amengual, 渥美 達也. SARS-CoV-2 ワクチン接種後の抗リン脂質抗体価の変化に関する検討. 第 37 回日本臨床リウマチ学会, 2022 年 10 月 29-30 日, 札幌.

3. Mitsutaka Yasuda, Yuichiro Fujieda, Kodai Sakiyama, Maria Tada, Haruka Moriya, Ryo Hisada, Michihito Kono, Masaru Kato, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi. Evaluation of changes in antiphospholipid antibody titers following vaccination with COVID-19 mRNA in patients with antiphospholipid syndrome. 第 67 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2023 年 4 月 24-26 日, 福岡.

4. Mitsutaka Yasuda, Yuichiro Fujieda, Kodai Sakiyama, Maria Tada, Haruka Moriya, Jiang Wei, Ryo Hisada, Michihito Kono, Masaru Kato, Olga Amengual, Atsushi Yasumoto, Eriko Morishita, Tetsumei Urano, and Tatsuya Atsumi. Elevation of antiphospholipid antibody titers following vaccination with SARS-CoV-2 mRNA in patients with antiphospholipid syndrome and/or systemic lupus erythematosus. The 31st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 24-28, 2023, Montreal, Canada.

5. 安田 充孝, 藤枝 雄一郎, 守谷 悠, 久田 諒, 河野 通仁, 加藤 将, Olga Amengual, 安本 篤史, 森下 英理子, 浦野 哲盟, 渥美 達也. SARS-CoV-2 ワクチン接種はホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の産生を亢進させうる. 第46回日本血栓止血学会学術集会, 2024年6月13-15日, 金沢.

1. 要旨

血管疾患(vasculopathy)は、狭窄や閉塞を特徴とする多様な病態を含み、その発症には遺伝的要因や免疫異常が関与すると考えられている。しかしながら、その分子的・病態生理的機構については未解明な点が多い。本研究では、免疫異常との関連が示唆されている2つの血管関連疾患を対象とし、それぞれ異なるアプローチから病態形成機構の解明を試みた。第1章では、両側内頸動脈終末部の進行性狭窄・閉塞を呈する脳血管疾患であるもやもや病(Moyamoya disease)を取り上げ、その主要な疾患感受性遺伝子である RING finger protein 213(RNF213)の機能解析を行った。特に、東アジア人に多く認められる p.R4810K 変異に着目し、非免疫細胞における炎症増幅機構である interleukin-6 amplifier(IL-6 アンプ)との関連を検討した。

第2章では、自己免疫性の血栓症を特徴とする抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome: APS)および全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)を対象とし、SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種が抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody: aPL)価および血栓症発症に与える影響について検討した。本研究は、免疫学的背景を有する血管関連疾患の病態形成およびワクチン接種の安全性に関する理解を深めるものである。

<第一章：もやもや病疾患関連遺伝子 RNF213 の機能解析>

【背景と目的】もやもや病は日本人に多発する内頸動脈終末部の狭窄および閉塞をきたす脳血管疾患であり、発症契機として炎症や自己免疫応答が想定されているがその原因は未だ不明である。RNF213(RING finger protein 213)はもやもや病の疾患感受性遺伝子として同定され、日本人もやもや病患者の約80-90%が4810番目のアルギニンがリシンに置換される p.R4810K 変異を有することが明らかとなったが、RNF213の詳細な機能や、もやもや病の病態形成への関与は不明である。我々が報告した非免疫細胞における慢性炎症増幅機構である『IL-6 アンプ (炎症回路)』と RNF213 との関連について検討した。

【方法】未破裂脳動脈瘤患者、内頸動脈狭窄の患者、p.R4810K 変異を有するもやもや病患者の手術検体から側頭筋やくも膜由来の細胞を

SV40 (simian vacuolating virus 40) 遺伝子導入にて不死化し、これらに IL-6 アンプを誘導する IL-6 と Tumor necrosing factor- α (TNF- α) の同時刺激を行った。これにより誘導される IL-6 や各種ケモカインの messenger RNA (mRNA) 発現を quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) 法で解析した。また, shRNA (short hairpin RNA) を用いて RNF213 のノックダウン細胞を作出し、同様に IL-6, TNF- α の同時刺激を行って IL-6 mRNA の発現を評価した。さらに、野生型 RNF213 や p.R4810K 変異 RNF213 の complementary DNA (cDNA) を導入したプラスミドで過剰発現系を構築し, NF- κ B p65 response element や IL-6 プロモーターを用いてレポーター活性を測定した。IL-6 アンプは非免疫細胞での NF- κ B 過剰活性化機構であることから、次に, RNF213 を過剰発現させた HEK293T 細胞を用い、免疫沈降法によって RNF213 と相互作用する NF- κ B 関連分子の探索を行うとともに、分子の結合部位の特定を行った。

【結果】 RNF213 p.R4810K 変異を有するもやもや病患者由来の細胞において、有意に IL-6 アンプの亢進がみられた。siRNA 法により RNF213 のノックダウンを行った細胞では IL-6, TNF- α の共刺激を加えても IL-6 mRNA 発現が抑制された。一方で, RNF213 を過剰発現させた細胞においては p.R4810K 変異 RNF213 の導入と TNF- α 刺激により NF- κ B p65 response element の活性が著明に上昇した。RNF213 を過剰発現させた細胞を用いた免疫沈降法により, RNF213 および p.R4810K 変異 RNF213 は TNF 受容体複合体を形成する主要な分子である TRAF2 および TRADD と結合することが示唆された。さらに、野生型 RNF213 に比べて p.R4810K 変異 RNF213 は TRAF2 分子により強く結合することが示唆された。

【考察】 p.R4810K 変異 RNF213 は非免疫細胞において TRAF2 との相互作用がより強かったため, TNF 受容体複合体からの信号を増強することにより, NF- κ B 経路を活性化させて IL-6 アンプの亢進に関与していることが明らかとなった。

【結論】 RNF213 p.R4810K 変異は局所における IL-6 アンプの亢進を通してもやもや病の発症に関与する可能性がある。

＜第二章：SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種後の抗リン脂質抗体価の変動に関する検討＞

【背景と目的】抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome : APS)は病原性自己抗体である抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPLs)の存在下でおこる自己免疫性血栓症ならびに妊娠合併症であるが、病態形成の詳細な機構については不明な点が多い。一方、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19; coronavirus infectious disease) の重症例では血栓傾向を呈し、一部の症例において aPL が検出される。ワクチン接種と抗リン脂質抗体および血栓症との関連を明らかにするため、APS、全身性エリテマトーデス (SLE)患者および健常者(HC)における SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) mRNA ワクチン接種前後の抗リン脂質抗体(aPL)価の変動について検討した。

【方法】原発性 APS(PAPS)、SLE 合併 APS (SLE/APS)、抗リン脂質抗体陽性 SLE (SLE/aPL+)、aPL 陰性 SLE(SLE/aPL-)、健常人 (HC) を対象にワクチン接種前後の血清抗カルジオリピン抗体(aCL)、抗 β_2 GPI (β_2 glycoprotein I antibody) 抗体(a β_2 GPI)、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) の IgG、IgM を測定し、ワクチン接種後に新規に aPL が出現するかについて、および有意に上昇する aPL がみられるかについて解析した。また、患者群において mRNA ワクチン接種前後の抗 SARS-CoV-2 抗体(S-IgG) 価の推移を測定、評価した。ワクチン接種後、血栓症発症の有無を 3 か月間観察した。

【結果】患者 118 例 (aPL 陽性群 : PAPS 19 例, SLE/APS 25 例, SLE/aPL+ 35 例, SLE/aPL- 39 例) と HC 670 例が研究に参加した。SARS-CoV-2 mRNA ワクチン 2 回接種後に患者の 77.1%が抗 S-IgG 抗体陽性となり、ワクチン接種前と比較して有意な上昇を認めた。ワクチン接種後の a β_2 GPI IgG と aPS/PT IgG の新規陽性率については aPL 陽性群で aPL 陰性群および HC 群と比較して有意に高かった。aPL 陽性群では、aCL IgG、a β_2 GPI IgG および aPS/PT IgG の顕著な上昇が観察された例があった。観察期間中に血栓症の新規発症はみられなかった。

【考察】ワクチン接種前に何らかの aPL を有している APS 患者や SLE 患者において、mRNA ワクチンは aPL 産生の引き金となる可能性を有し、特に a β_2 GPI IgG と aPS/PT IgG という血栓症発症と強く関連する aPL を誘導する可能性があるため、十分な観察を行うことが求められる。

【結論】mRNA ワクチンは aPL 陽性患者において新規の aPL を誘導し、aPL 抗体価を変動させる可能性が示唆された。

2. 略語表

本文中, および図中で使用した略語は以下の通りである.

a β ₂ GPI	Anti- β ₂ glycoprotein I antibodies
aCL	Anticardiolipin antibodies
ACR	American College of Rheumatology
aPL	Antiphospholipid antibodies
APS	Antiphospholipid syndrome
aPS/PT	Phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibodies
CLEIA	Chemiluminescent immunoassay
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
CYLD	CYLD lysine 63 deubiquitinase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EULAR	European League Against Rheumatism
FBS	Fet al, bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GWAS	Genome wide association study
HEK293T	Human Embryonic Kidney cells 293 T cell
HEK293FT	Human Embryonic Kidney cells 293 FT cell
	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
I κ B α	inhibitor alpha
IKK	I κ B kinase
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 receptor
IP	Immunoprecipitation
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PAPS	Primary antiphospholipid syndrome
PBS	Phosphate buffered saline
PF4	Platelet factor 4
PS	Phosphatidylserine

PT	Prothrombin
qPCR	Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
RIP	Receptor interacting protein
RNF213	Ring finger protein 213
SARS-	
CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SLE	Systemic lupus erythematosus
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPATA2	Spermatogenesis-associated protein 2
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosing factor- α
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VITT	Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia
WB	Western blotting

3. 緒言

血管は平滑筋細胞や細胞外基質からなる管腔構造であり，その内腔面は内皮細胞によって被覆されている．血管障害(vasculopathy)をきたす2つの主要な機序として「狭窄」と「閉塞」が挙げられる．これらの病態を呈する疾患はアテローム性動脈硬化症や血栓塞栓症など多岐にわたるが，その原因や詳細な病態生理が未だ不明なものも多い．もやもや病(ウイリス動脈輪閉塞症, moyamoya disease)は内頸動脈終末部の狭窄をきたす原因不明の進行性脳血管疾患であり，本邦において「難病の患者に対する医療等に関する法律」に基づき指定される指定難病の1つである．1950年代から国内で散発的に少数例が報告され，1960年代後半に1つの疾患概念として認知された．内頸動脈終末部に慢性進行性の狭窄を生じ，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)が形成されることが特徴とされる．脳血管撮影検査所見においてこれらの血管が立ちのぼる煙のように “もやもや”とみえるため，“もやもや病”と名付けられた(Fujimura et al, 2022)．

もやもや病は家族性の発症を10～20%に認め，発症年齢は5～10歳，30～40歳の二峰性分布を示す．日本人などアジア人に多発する疾患であることは知られていたが，2011年になって疾患感受性遺伝子として *RNF213*(*RING finger protein 213*)が初めて同定された．特に同遺伝子の4810番目のアルギニンがリシンに置換されるp.R4810K変異がもやもや病発症に関与することが報告されている(Kamada et al, 2011; Liu et al, 2011)．一方で，この遺伝子変異のみではもやもや病の発症には至らないとされ，炎症など何らかの「セカンドヒット」となる要因が発症には必要であると考えられている．*RNF213*はAAA+ ATPase domainとRING (really interesting new gene) finger domainの2つのdomainを有する巨大なタンパクであるが，もやもや病の病態形成における詳細な機能については不明な点が多いのが現状である．

慢性炎症性疾患の病態形成において，我々は「IL-6アンプ」という機構を報告している．これは血管内皮細胞や線維芽細胞といった非免疫細胞でNF- κ B (Nuclear factor-kappa B kinase)経路とSTAT3 (Signal transducers and activator of transcription 3)経路が同時に活性化することでNF- κ B 経路が過剰に活性化され，IL-6 (interleukin-6)をはじめとする種々の炎症性サイトカイン，ケモカイン，増殖因子を含む遺伝子群が相乗的に過剰発現

し、局所においてさらなるIL-6産生を招くことで慢性炎症が形成されるというものであり、これまで関節リウマチ、尋常性乾癬、ケロイド、変形性関節症、シェーグレン症候群、癌、臓器移植後の拒絶反応、感染症、代謝性疾患、神経変性疾患および精神疾患など様々な疾患領域においてIL-6アンプとの関連を報告してきた(Murakami et al, 2019). 本研究の結果から、RNF213がNF- κ B経路を活性化させ、IL-6アンプを正に制御することでもやもや病の病態形成に関与している可能性が示唆されたため、ここに報告する.

一方で、血栓症により血管の閉塞をきたす自己免疫疾患の代表例として挙げられるのが抗リン脂質抗体症候群(Antiphospholipid syndrome: APS)である. APSは抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL)の存在下でおこる自己免疫性血栓症ならびに妊娠合併症と定義され、後天性血栓性疾患として最も頻度が高いもののひとつである(Amengual and Atsumi, 2018). 動脈血栓症のみならず静脈血栓症もきたすことが特徴のひとつであり、aPLが血栓症発症に際して病原性をもつとされるが、その詳細な機序は不明である. APSの治療においてはグルココルチコイドや免疫抑制剤の効果が明らかでなく、凝固療法や抗血小板療法による二次予防にとどまっているのが現状である(Tektonidou MG et al, 2009). APSにおける血栓形成に関しても、aPLを有している状態に加えて誘因となる「セカンドヒット」の存在が必要であると考えられている(Fujieda et al, 2021). その機序として血管内皮細胞、単球、血小板の活性化(Schreiber et al, 2018)や好中球細胞外トラップ(NETs)の関与(Knight JS et al, 2022)、補体経路の活性化(Oku et al, 2009)などが想定されているが、正確な病態生理については不明な点が多く残されている. さらに、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)のパンデミック下において集中治療室に入室した重症COVID-19患者が多発性脳梗塞をきたし、当該患者血清でaPLが検出されたとする報告や(Xiao et al, 2020)、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対するウイルスベクターワクチン接種後に重篤な血栓症と血小板減少をきたすワクチン誘発性免疫性血栓性血小板減少症 (VITT) とよばれる病態の発症が報告される(Greinacher et al, 2021)など、コロナ禍とよばれた過去数年間においてAPSとCOVID-19、ワクチン接種に関連した新たな病態の存在が示唆されてきた. その中で、わが国でも広く用いられたmRNAワクチンと血栓症の発症の関与、とりわけ自己免疫性の血栓素因を有するAPS患者を対象とした研究は十分でないのが現状であることから、我々はAPS患者や全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)患者におけるSARS-CoV-2

mRNAワクチン接種後の血栓症発症の有無，およびワクチン接種後のaPL抗体価の変動について検討すべく臨床研究を行った．

4. 第一章

もやもや病疾患関連遺伝子 RNF213 の機能解析

4.1 緒言

もやもや病は日本人に多発する内頸動脈終末部の狭窄および閉塞をきたす原因不明の進行性脳血管疾患であり、本邦で 1957 年に竹内、清水らによって両側性内頸動脈不全症として報告され(竹内一夫, 清水健太郎, 1957), 1969 年に”Moyamoya disease”と命名された (Suzuki et al, 1969). 脳虚血を代償するために発達した側副血行路が脳血管造影において血管網として描出され、これらが立ち上る煙のように「もやもや」としてみえたことが疾患名に由来している. 本邦におけるもやもや病の有病率は約 1 万人に 1 人であり (Houkin et al, 2012), 1:1.8 で女性に多く, 10 歳未満, もしくは 20 歳代後半から 40 歳代にかけて好発する (Kuroda, et al, 2008). 小児期では多くは脳虚血症状により発症するが, 成人期では脳虚血症状に加え脳出血で発症する症例もみられる (Fukui et al, 2000).

もやもや病の診断は脳血管造影を含めた画像診断によって行われ,

- 1) 頭蓋内内頸動脈終末部を中心とした領域に狭窄または閉塞がみられる,
- 2) もやもや血管(異常血管網)が動脈相においてみられる(注: 両側性, 片側性を問わない), ことが主な診断基準として挙げられている (Kuroda et al, 2022).

一過性脳虚血発作や脳梗塞を呈するもやもや病の治療は頭蓋外内バイパス術をはじめとする血行再建術が主体であるが, 抗血小板薬や抗凝固薬, 超急性期における遺伝子組換え組織型プラスミノゲンアクチベータ(recombinant tissue plasminogen activator: rt-PA)の投与などの薬物治療も行われる. もやもや病の正確な原因は未だ不明とされているが, 発症が日本人を含めたアジア人に多くみられる点, 約 15%に家族歴が認められる点など, 遺伝要因の関与はこれまでも疑われてきた(Kuroda, et al, 2008). ゲノムワイド関連解析(genome wide association study: GWAS)やもやもや病家系の解析の結果から, *RNF213*(RING finger protein 213)とよばれる 17 番染色体長腕に位置する遺伝子における 4810 番目のアルギニンがリシンに置換される p.R4810K 変異がもやもや病の疾患感受性遺伝子であることが明らかとなった(Kamada et al, 2011; Liu et al, 2011). この *RNF213* p.R4810K 変異は日本人もやもや病患者の 80-90%が有しており, 日本人健常者の約 1-2%にも保因がみられる(Koizumi et al, 2016). しかし, p.R4810K 変異単独では発症に至らず, 発症には追加的な環境因子または免疫学的刺激など「セカンドヒット」の存在が必要であると考えられている.

RNF213 は 5,207 のアミノ酸からなる分子量 591 kDa の巨大なタンパクであり, AAA+ ATPase domain と RING (really interesting new gene) finger domain の 2 つの domain を有している(Liu et al, 2011). AAA+ ATPase domain では ATP の結合や加水分解が行われ, ring finger domain はタンパクの分解やシグナル伝達に関わるユビキチン化を行う E3 ligase 機能を有し, ユビキチン活性化酵素である E1, ユビキチン結合酵素である E2 と共同して機能を発揮すると想定されているが, 詳細な機能と構造, 細胞内分布については不明な点が多い. また, 近年はもやもや血管を有さないが頭蓋内主幹動脈に部分的な狭窄・閉塞を有する症例の約 20%に *RNF213* p.R4810K 変異がみられるとする報告(Miyawaki et al, 2012)や, *RNF213* 変異を有しもやもや病と腎動脈狭窄を合併した症例報告(Ou P et al, 2006), 末梢型肺動脈狭窄症で遺伝子変異を有する姉妹の症例報告(Goto et al, 2022), さらに *RNF213* p.R4810K 変異がアテローム血栓性脳梗塞の強力な感受性遺伝子であるとした報告(Okazaki et al, 2019) など, *RNF213* 遺伝子多型がもやもや病にとどまらず様々な血管病変の感受性遺伝子である可能性が示唆されている. こうした *RNF213* p.R4810K 変異由来の血管病変は *RNF213* 関連血管症(*RNF213* vasculopathy)とも総称される(Hiraide et al, 2022).

本邦の診断基準において, もやもや血管が甲状腺機能亢進症を除く自己免疫疾患や髄膜炎, 脳腫瘍, ダウン症候群, 神経線維腫症 1 型, 放射線照射の既往などに合併してみられる症例については類もやもや病(quasi moyamoya disease)として除外される. また, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* などによる細菌感染症や水痘・帯状疱疹ウイルス, EB ウイルスや新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)などのウイルス感染症によっても類もやもや病が発症するとされる(Suzuki et al, 1983). さらに, もやもや病においても近年関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)やシェーグレン症候群(Sjögren's syndrome), 多発性硬化症(multiple sclerosis), 全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)といった自己免疫疾患と関連する可能性があるとする報告もみられる(Asselman et al, 2022).

RNF213 と免疫系との関連については, *RNF213* が樹状細胞や単球に多く発現し, *RNF213* をノックアウトした樹状細胞や変異型 *RNF213* ノックインマウスで抗原提示能の低下がみられるとした報告(Tashiro et al, 2021)や, 日本人もやもや病患者の頭蓋内血管を用いたトランスクリプトーム解析で免疫応答に関連する遺伝子の発現上昇がみられたとする報告(Kanamori et al, 2021)がある. これらの報告を踏まえると, 感染症や自己免疫疾患などによ

る免疫系の活性化がもやもや病の「セカンドヒット」となり得ることを示唆している。

また, RNF213 が nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル伝達経路の制御に関与しているとする報告も複数みられる. RNF213 の RING ドメインに生じた変異により同分子の E3 リガーゼ活性が低下し, AAA+ ATPase 依存性に NF- κ B の活性化や Caspase-3 によるアポトーシスを誘導するとした報告 (Takeda et al, 2020) や, 低酸素環境下の細胞において RNF213 の RZ ドメインが NF- κ B の負の制御因子である CYLD/SPATA2 に作用し, NLRP3 インフラマソームの活性化や炎症性細胞死(pyroptosis)を介して NF- κ B の活性化をきたすとする報告がみられる (Bhardwaj et al, 2025). したがって, もやもや病の発症リスク増加に寄与する RNF213 p.R4810K 変異は RNF213 の E3 リガーゼとしての酵素活性だけではなく, RNF213 と他分子間の相互作用に変化を及ぼしている可能性が示唆される。

我々は自己免疫疾患を始めとした様々な疾患における慢性炎症誘導機構として『interleukin-6 amplifier (IL-6 アンプ:炎症回路)』を同定してきた (Ogura et al, 2008; Murakami et al, 2019). この機構は, 非免疫細胞において NF- κ B 経路と Signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3) 経路が同時に活性化することにより NF- κ B 経路が過剰に活性化され, 種々の炎症性サイトカイン, ケモカイン, 増殖因子を含む炎症回路標的遺伝子群が相乗的に過剰発現し, 免疫細胞浸潤によって恒常性が破綻し慢性炎症を引き起こすものである. 本機構はサイトカイン誘導性関節炎モデル, 多発性硬化症モデル, 移植片慢性拒絶モデル等の疾患モデルおよび様々な炎症性疾患における臨床検体を用いた検討で存在していることが確認された (図 1) (Ogura et al, 2008; Murakami et al, 2011; Arima et al, 2012, 2015; Lee et al, 2013; Arima et al, 2017; Lee et al, 2012, Atsumi et al, 2014; Harada et al, 2015; Meng et al, 2016; Okuyama et al, 2018; Tanaka et al, 2019; Stofkova et al, 2019; Fujita et al, 2019; Ota et al, 2020; Takada et al, 2020; Higuchi et al, 2020; Shimoyama et al, 2021). さらに我々は RNAi を基盤としたゲノムワイドスクリーニングを行うことで, IL-6 アンプに関連する約 1200 種類の正の制御因子及び約 500 種類の標的遺伝子を同定した (Ogura et al, 2008; Murakami et al, 2013).

以上の背景を踏まえ, 本研究では RNF213 と IL-6 アンプの関連性ならびに RNF213 p.R4810K 変異が NF- κ B 経路に与える影響について解析し, もやもや病の発症機構における RNF213 の役割を明らかにすることを目的とした。

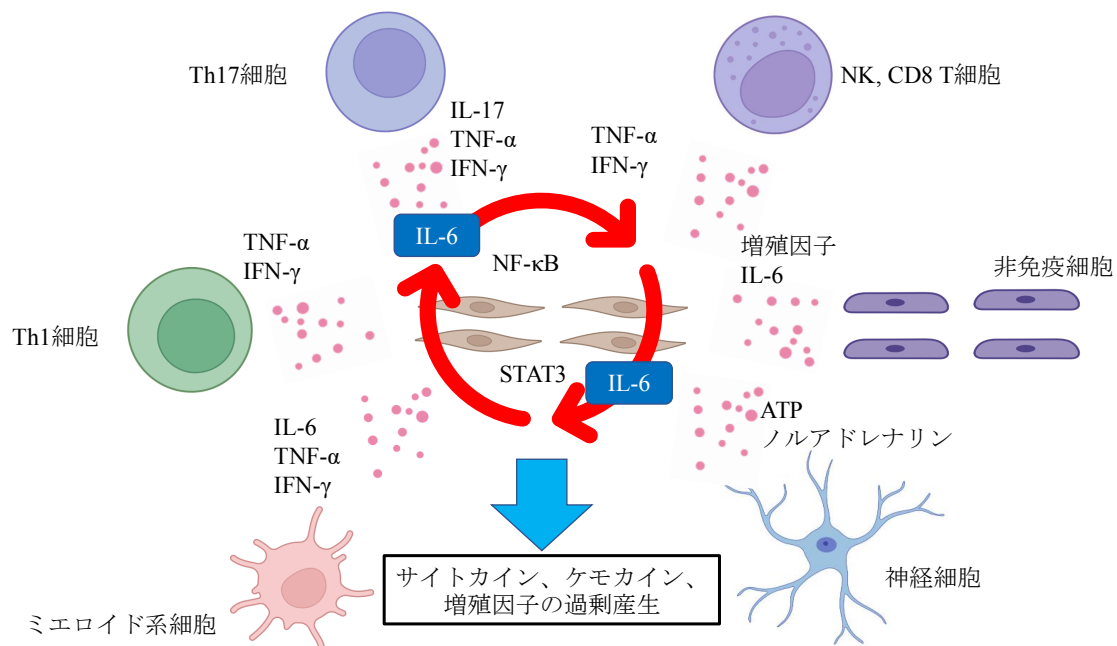


図 1. IL-6 アンプの概念図

非免疫細胞において NF-κB と STAT3 が同時に活性化されることにより NF-κB の過剰な活性化が引き起こされ、種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子が大量に発現することで恒常性が破綻し慢性炎症性疾患が引き起こされる。(Ogura et al, 2008; Lee et al, 2012, 2013; Murakami et al, 2013; Atsumi et al, 2014, 2017; Harada et al, 2015; Meng et al, 2016) より一部改変.

4.2 目的

本研究は、もやもや病の主要な疾患感受性遺伝子である RNF213 に着目し、その変異体が炎症性シグナル伝達の制御に与える影響を分子レベルで明らかにすることを目的とする。特に、NF- κ B 経路との関連性を中心に据え、RNF213 が非免疫細胞における IL-6 アンプの制御に果たす機能的役割を解明することで、炎症性環境を介した病態形成機構における RNF213 の意義を明らかにし、もやもや病の新たな分子病態像の構築に資する知見を得ることを目指す。

4.3 方法

1 細胞と刺激条件

ヒト脳腫瘍細胞 H4, ヒト胚性腎細胞 HEK293T および HEK293FT は, ATCC (Sumitomo Dainippon Pharma, Osaka, Japan), Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)よりそれぞれ購入した. 未破裂脳動脈瘤, 内頸動脈閉塞, もやもや病患者のくも膜および側頭筋由来の細胞は北海道大学大学院医学研究院 脳神経外科より譲渡を受けた. 患者由来の細胞には SV40 (simian vacuolating virus 40)遺伝子を導入し, 不死化して用いた. いずれの細胞も Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Gibco)に 10%ウシ胎児血清(fet al, bovine serum ; FBS)(CORNING)を添加したものをを用いて, 37°C かつ 5% CO₂ の条件下において継代, 培養した. また培養に使用した器具類はすべてオートクレーブによる滅菌処理を施し, すべての操作をクリーンベンチ内で無菌的に行った. 細胞に行ったサイトカイン刺激については, ヒト IL-6 (100 ng/mL; Toray Industries, Tokyo, Japan) および可溶性ヒト IL-6 受容体(100 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN), ヒト TNF- α (50 ng/mL; PeproTech, Tokyo, Japan) を用いた.

2 抗体

以下の表 1 に示す抗体は western blotting (WB), 免疫沈降法 (immunoprecipitation ; IP), 蛍光組織化学染色, 免疫組織化学染色 (immunohistochemistry ; IHC), 共焦点顕微鏡での観察および免疫細胞染色 (Immunocytochemistry ; IC)に用いた.

表 1. 実験に用いた抗体

抗 RNF213 抗体	HPA003347, Sigma-Aldrich
抗 RIP 抗体	4393, Cell Signaling Technology
IKBA 抗体	4812, Cell Signaling Technology
TRAF2 抗体	4724, Cell Signaling Technology
抗 TRADD 抗体	3684, Cell Signaling Technology
抗 FLAG 抗体	14793, Cell Signaling Technology
抗 Myc 抗体	C3956, Sigma-Aldrich
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	715-035-150, Jackson Immuno Research Laboratories
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	711-035-152, Jackson Immuno Research Laboratories
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen
Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate	H3570, Life Technologies

3 プラスミド

Flag タグ融合 RNF213 発現プラスミド DNA を、次の手順で作成した。ヒト RNF213 をコードする cDNA はかずさ DNA 研究所より購入した。これを制限酵素で処理し(Bam HI, Sal I in high buffer; Takara), pEF-BOS-Ex ベクターも同様に処理した。制限酵素処理を行った RNF213 cDNA および pEF-BOS-Ex ベクターを Ligation high Ver 2 (TOYOBO)を用いて Ligation し、コンピテントセル(ECOS DH5, NIPPPON GENE)に Transfection した後, Ampicillin 含有 LB 培地に植え付け, 37°C で一晩培養した。

発生したコロニーを pick up して, Ampicillin 含有 LB 培養液に懸濁し, 再度 37°C で一昼夜培養した。GenElute™ Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich)を用いて, 培養液から Flag タグ融合 RNF213 発現プラスミド DNA を抽出した。なお, 抽出した DNA は BigDye Direct Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた標準プロトコールで, シーケンスが正しいことを確認した。

4 quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

各種細胞は, 12-well plate に 1×10^5 個/well で播種して一晩培養した。翌日, IL-6+IL-6R 30 ng/mL, TNF α 5 ng/mL で細胞刺激を行った後, RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)を用いた標準プロトコールで mRNA を抽出し, Revertra Ace RT kit (TOYOBO)を用いた標準プロトコールで cDNA を作成した。標的 mRNA レベルは, ABI Prism7300 fast real-time PCR system (Applied Biosystems)と SYBR Green FAST qPCR master mix (KAPA Biosystems)を用い, 初期熱変性 94°C・10 分, 熱変性 94°C・15 秒, アニリング/伸長反応 60°C・60 秒×40 サイクルのプロトコールで qPCR を行った。内在性コントロールとしてヒト由来細胞で *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を使用した。用いたプライマー配列は表 1 の通りである。

5 ヒト RNF213 に対する small interfering RNA (siRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

H4(ヒト神経膠腫由来細胞株), または Human dermal fibroblast(HDF)を 12-well plate に 1×10^5 個/well で播種し, Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて siRNA (5 μ M) 0.5 μ L をトランスフェクションした。使用した siRNA は以下のとおりである。human si-RNF213 (1:

s33659, 2: s33569, Invitrogen), human si-p65 (SASI_Hs01_00171090; Sigma-Aldrich)及び human si-nontarget (Sigma Mission SIC-001s; Sigma-Aldrich). トランスフェクションした細胞は, 37°C 5% CO₂ 下で 48 時間培養し, サイトカイン刺激後に qPCR を行った.

6 ヒト RNF213 に対する short hairpin RNA (shRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

安定した shRNA 介在性遺伝子サイレンシングを実現するため, pLKO.1-puro をベクターとして用いた再組み換えレンチウイルスを作成した. pLKO.1-puro ベクター(Sigma Mission shRNA ライブラリ, ヒト RNF213 用: sh1, TRCN0000150582; sh2, TRCN0000151569; sh3, TRCN0000153221; sh4, TRCN0000153316, Sigma-Aldrich) またはコントロールとして scramble shRNA (1864, Addgene) を, エンベローププラスミド pMD2.G (12259, Addgene) およびパッケージングプラスミド psPAX2 (12260, Addgene) と共に, Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて 293FT 細胞に導入した. 48 時間後, 培養上清を回収し, 0.45 µm フィルター (Advantec)でろ過し, 得られたレンチウイルス調製物を polybrene (8 µg/mL)の存在下で H4 細胞に添加した. 24 時間後, 1 µg/mL の puromycin を 1 週間程度添加して, 感染細胞を選別した. 樹立したクローンについて WB を行い, 目的遺伝子のノックダウン効率の検証を行い, 安定ノックダウン細胞株として以降の実験に用いた.

7 Western blotting (WB)

WB に用いる細胞は, 10 cm dish または 6-well plate に播種して培養した. 必要に応じてサイトカインで刺激した後に細胞を氷上に置き, 培養液を吸引除去した後に氷冷した Phosphate buffered saline (PBS)で洗浄し, 適量の PBS とセルスクレーパー(BIOLOGIX)を用いて細胞を回収した. 1,500 rpm, 4°C, 5 分間の遠心により上清を除き, 細胞ペレットを適切なバッファーで溶解処理した. すべての行程において, 細胞溶解バッファーには 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich), phosphatase inhibitor cocktail 2(Sigma Aldrich), および phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich)を添加した. 得られたサンプルは全て 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C, 5 分間煮沸させ, 氷冷後に WB に供試した. 5-12%濃度勾配の SDS-PAGE ゲル(和光純薬工業)で Bio-Rad のウエットウェスタンブロットシステムを用いてポリアクリルアミド電

電気泳動(SDS-PAGE)を行い、泳動分離したタンパク質を Immobilon®-P (Millipore)に転写した。転写膜は、5% Bovine serum albumin; BSA, Nacalai tesque)あるいは 5% Skim milk を用いて 1 時間ブロッキングした。その後、標的分子に対する一次抗体反応を 12 時間、続いて HRP 標識した二次抗体反応を 1 時間行った。全細胞分画および細胞質分画の内部コントロールとして、tubulin に対する抗体を用いた。一次抗体、二次抗体を加えた後は TBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween 20)液で 5 分間 3 回洗浄し、Chemi-Lumi One L for HRP (nacalai tesque), または Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher)を用いた基質反応を行った。反応後、ChemiDoc Imaging System (BioRad)を用いてタンパク質バンドの検出を行った。

8 Luciferase Reporter Assay

レポーター活性の測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて標準プロトコールに従って行った。12-well plate に 1×10^5 cells/well で播種した HEK293T 細胞を 24 時間培養した後、PEI (Polyethylenimine)を用いて pEF-BOS (Mock), *RNF213* 発現プラスミドおよび *RNF213* p.R4810K 変異を有するプラスミドを 100 ng/well で導入、加えて加えて pGL4.32 [luc2P/ NF- κ B RE/Hygro](4.5 ng/well, Promega), pGL4.21-human IL-6 promoter (−1178/+13) (4.5 ng/well, Promega), および pGL4.74 [hRluc/TK](0.25 ng/well, Promega)を導入した。各遺伝子導入を導入してから 24 時間培養後に培養液を除去し、ヒト IL-6 および可溶性 IL-6R (30 ng/mL), TNF- α (5 ng/mL), および両者の混合溶液を含有した培養液で 5 時間刺激した。PBS で細胞を洗浄し、Passive lysis buffer (40 μ L/well)を加えて 4°C で 20 分間穏やかに振盪して細胞を溶解した。その後、その細胞溶解液 5 μ L と発光基質 25 μ L を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター(GloMax®-Multi Detection System, Promega)で測定した。なお、細胞間の導入効率の補正のために、遺伝子導入の際に同時に導入した pGL4.74 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとし、これとの比を算出して NF- κ B あるいは IL-6 ルシフェラーゼ活性とした。

9 ヒトもやもや病および非もやもや病脳血管疾患由来の不死化クモ膜細胞の樹立

もやもや病または非炎症性脳血管障害（未破裂脳動脈瘤，頸動脈狭窄）の患者から採取した新鮮なヒトクモ膜組織を PBS で 3 回洗浄．その後，組織をコラーゲンゼーゼ I (1 mg/mL)と DNase I(0.1 mg/mL)を含む溶液中で，37°C で 30 分間，穏やかに攪拌しながら酵素的分散処理を行った．酵素消化後，組織懸濁液を 70 μ m の細胞ストレーナーに通して，消化されなかった残骸を除去した．得られた細胞懸濁液を遠心分離し，10% 胎児牛血清および抗生物質を添加した DMEM に再懸濁し，培養皿に播種した．細胞を 37°C, 5% CO₂ の加湿雰囲気中で維持し，2~3 日ごとに培地を交換した．1 週間の培養後，細胞に SV40 large-T 抗原をコードするレンチウイルスベクターを用いて不死化誘導を行った．その結果，不死化したクモ膜細胞株は線維芽細胞のような形態を示し，その後の実験のために初期継代で増殖させた．

10 免疫沈降法(Immunoprecipitation assay :IP)

2 × 10⁶個の HEK 293T 細胞に PEI を用いて pEFBOS-Flag-RNF213 野生型 (WT), p.R4810K 変異体(p.R4810K), または pcDNA-Flag-GFP (Mock)をトランスフェクションした．48 時間後，細胞をプロテアーゼおよび phosphatase inhibitor cocktail (Thermo)を添加した 500 μ L の NP-40 緩衝液中で溶解した．NF- κ B 経路関連分子と RNF213 の結合ドメインマッピングのため，2 × 10⁶個の HEK 293T 細胞に pEFBOS-Flag-RNF213 WT または p.R4810K, pcDNA-Flag-GFP(GFP), および pEFBOS-myc-TRAF2 WT またはその N 末端ドメインのみ(1-260 アミノ酸 ; N)あるいは C 末端ドメインのみ(261-501 アミノ酸 ; C)を別々にトランスフェクションした．Nonidet P-40 (NP-40) buffer(50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40 and 3 mM EDTA)による溶解後，標的タンパク質の相対的な発現レベルを WB により評価した．これらの結果に基づき，各条件間で等しいレベルを確保するために各タンパク質の量を調整した．さらに総タンパク質投入量を標準化するために，NP-40 緩衝液中で溶解した HEK 293T 細胞から調製した細胞溶解物を補充することにより，各サンプルの最終的なタンパク質濃度を 1 mg に調整した．前処理された上清を 4°C で 3 時間，回転させながら 30 μ L の抗 FLAG 抗体結合アガロースビーズ(Sigma-Aldrich)とインキュベートした．ビーズを 1 mL の NP-40 緩衝液で 6 回洗浄し，免疫沈降物を 95°C で 3 分間煮沸して SDS サンプル緩衝液中で溶出した．その後，サンプル

をさらなる解析のために WB に供した。

IP に用いる細胞はすべて 10 cm dish に播種，培養した。バッファーで溶解されたサンプルはプロテイン G セファロースビーズ(Pharmacia)をサンプル 1mg タンパク質相当量に対して 10 μ g 添加し，4°C 下で 1 時間緩徐に転倒混和しプレクリアを行った。その後 9,000 rpm, 1 分間，4°C で遠心した後に上清を回収し，目的に応じて抗 FLAG 抗体ビーズ (富士フィルム和光)を加えて 2 時間 4°C 下で緩徐に転倒混和した。サンプルとビーズ・抗体複合体は 24 時間，4°C で混和した後，細胞溶解バッファーで 5 回洗浄した。IP 後において，FLAG 融合タンパク質は 3 $\times$ FLAG ペプチド(Sigma Aldrich)を用いて溶出し，プロテイン G セファロースビーズは 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C, 5 分間煮沸し溶出した。溶出液は WB に供試し，その際に全細胞分画サンプルの一部を IP の input として用いた。

11 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内タンパク局在の観察

TNF- α 刺激による p65 の核内移行を確認するため，H4 細胞を使用して shRNA を用いた RNF213 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を作成し，TNF- α 50 ng/ml で 0 分，15 分，および 30 分間刺激した。刺激後の細胞は 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し，Perm/Wash solution (Cytotfix/Cytoperm kit, BD Biosciences)で透過処理を施した後に，2% FBS で 30 分間ブロックした。次に，一次抗体として抗 p65 抗体を 1 時間反応させ，細胞を洗浄して余分な一次抗体を除いた後，二次抗体として抗ウサギ Alexa Fluor-488 標識抗体と Hoechst 33342 nuclear stain で 30 分間反応させた。

p65 の局在について，共焦点レーザー顕微鏡 (LSM980, Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

12 もやもや病手術検体を用いた免疫化学染色

北海道大学病院において，もやもや病や内頸動脈狭窄症に対する血行再建術を受けた患者の側頭筋や浅側頭動脈組織を採取した。全例において個々の患者からインフォームド・コンセントを取得し，北海道大学病院の倫理委員会によって承認された『もやもや病の発病素因遺伝子と病態修飾因子の解析(臨床研究番号 指 024-0257)』の一環として実施した。パラフィンに包埋されたもやもや病患者の浅側頭動脈組織からミクロトームにより 4 μ m 厚で切り出した切片を 40°C の蒸留水上に浮遊させた

後、スライドガラスに切片を移し一昼夜乾燥させた。キシレンで脱パラフィンを行った後、無水エタノールで検体を完全脱水させた。超純水で洗浄した後、抗原を賦活化する目的でクエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) に浸して 10 分間煮沸した。スライドガラスが室温に戻った後、超純水で洗浄し、内在性酵素を不活化するために 3%過酸化水素水で 5 分間処理した。ブロッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories)を用いた標準プロトコールで行った。一次抗体には抗リン酸化 p65 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質としては DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories) を用いた。

13 統計処理

実験データは平均値±標準誤差 (Mean±SEM)で示した。本研究では 2 群間の有意差検定に Student's t 検定を用いた。3 群間以上の有意差検定には analysis of variance (ANOVA) 検定を用いた。p 値は 0.05 未満のものを有意とし、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, および*** $p < 0.001$ で示した。

4.4 結果

4.4.1 RNF213 の IL-6 アンプへの関与についての検討

RNF213 が IL-6 アンプの活性化に関与するかどうかを検討するため、まず一過性ノックダウン系として、small interfering RNA (siRNA)を用いた実験を行った。具体的には、不死化ヒト皮膚線維芽細胞 (human dermal fibroblasts: HDF)、および神経系由来の H4 細胞に対し、RNF213 特異的 siRNA(si-1, si-2)、または非標的 siRNA (si-nontarget: si-NC)を導入し、IL-6 および tumor necrosis factor- α (TNF- α)の共刺激後に誘導される IL-6 mRNA 発現量を定量的 PCR (qPCR)により測定した。

その結果、HDF においては、siRNA-1 で統計的に有意な発現抑制が認められ、siRNA-2 でも抑制傾向が観察された (図 2a)。一方で、IL-6 アンプのモデル細胞として用いてきた H4 細胞においては、いずれの siRNA においても有意な IL-6 mRNA 発現の抑制は得られなかった(図 2b)。H4 細胞は神経系由来の非免疫細胞であり、神経炎症の文脈において IL-6 アンプの解析に適したモデルであることから、本細胞系において RNF213 の機能的役割を明確化することは極めて重要であった。

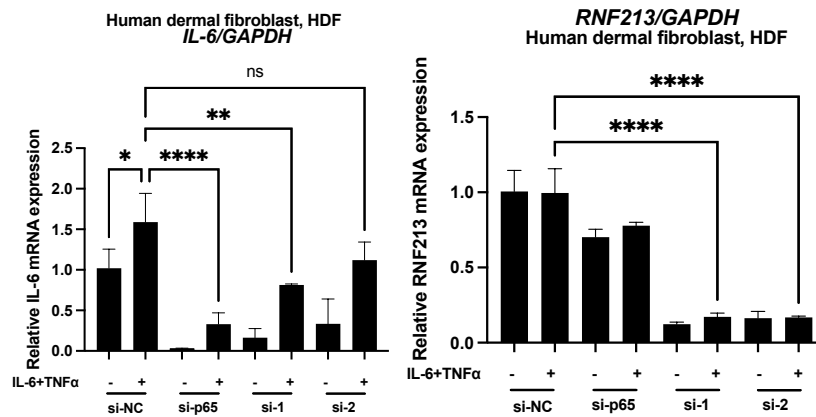
そこで、一過性の抑制では効果が不十分であった H4 細胞において、より恒常的かつ強力なノックダウン効果が期待される short hairpin RNA (shRNA)を用いた実験系への切り替えを行った。RNF213 を標的とする 4 種類の shRNA をコードしたレンチウイルスベクターを H4 細胞に導入し、puromycin による薬剤選択を経て RNF213 ノックダウン細胞を樹立した。各 shRNA のノックダウン効率はウェスタンブロットにより評価し、その結果、sh1 および sh3 が高いノックダウン効率を示したため、以降の実験ではこれら 2 種を使用した(図 3a)。

IL-6 および TNF- α による共刺激下での IL-6 mRNA 発現を qPCR で解析したところ、RNF213 をノックダウンした H4 細胞では、対照の scramble shRNA 導入細胞と比較して有意な発現抑制が認められた (図 3b)。このことから、RNF213 が H4 細胞における IL-6 アンプの活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに、IL-6 アンプの下流分子として知られるケモカイン CCL2 および STAT3 についても検討を行った。RNF213 のノックダウンは NF- κ B の標的遺伝子である CCL2 の発現を有意に抑制したが、STAT3 の発現には影響を与えなかった (図 3c, 3d)。これらの結果から、RNF213 は TNF- α -NF- κ B シ

グナル伝達経路を介して, IL-6 アンプの増強作用に寄与している可能性が強く示唆された.

a



b

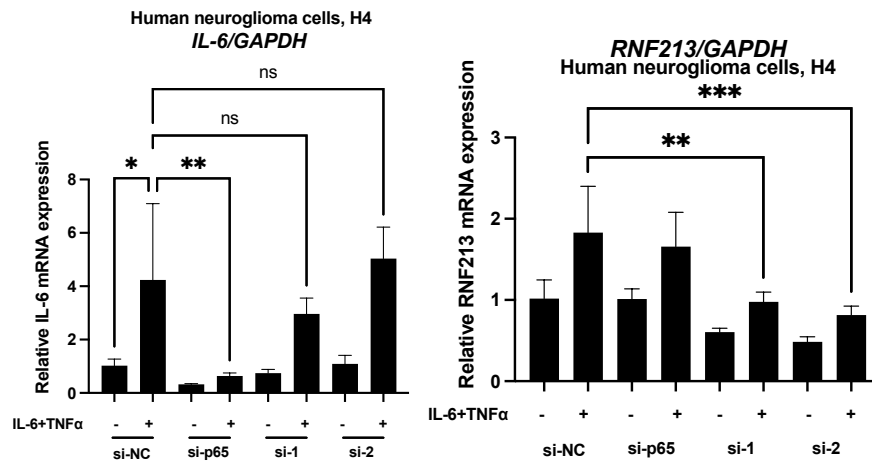


図 2. ヒト H4 細胞および HDF 細胞における siRNA を用いた RNF213 ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

(a) HDF 細胞において *IL-6* mRNA および *RNF213* siRNA のノックダウン効率を qPCR 法で評価し, IL-6+IL-6 受容体および TNF α の共刺激の有無で比較した.

(b) H4 細胞において *IL-6* mRNA および *RNF213* siRNA のノックダウン効率を qPCR 法で評価し, IL-6+IL-6 受容体および TNF α の共刺激の有無で比較した.

データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を内在性コントロールとしての GAPDH に対する相対値で示し, *および**は, t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05, 0.01 未満のものを, ***および **** は t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.001, 0.0001 未満のものを示す.

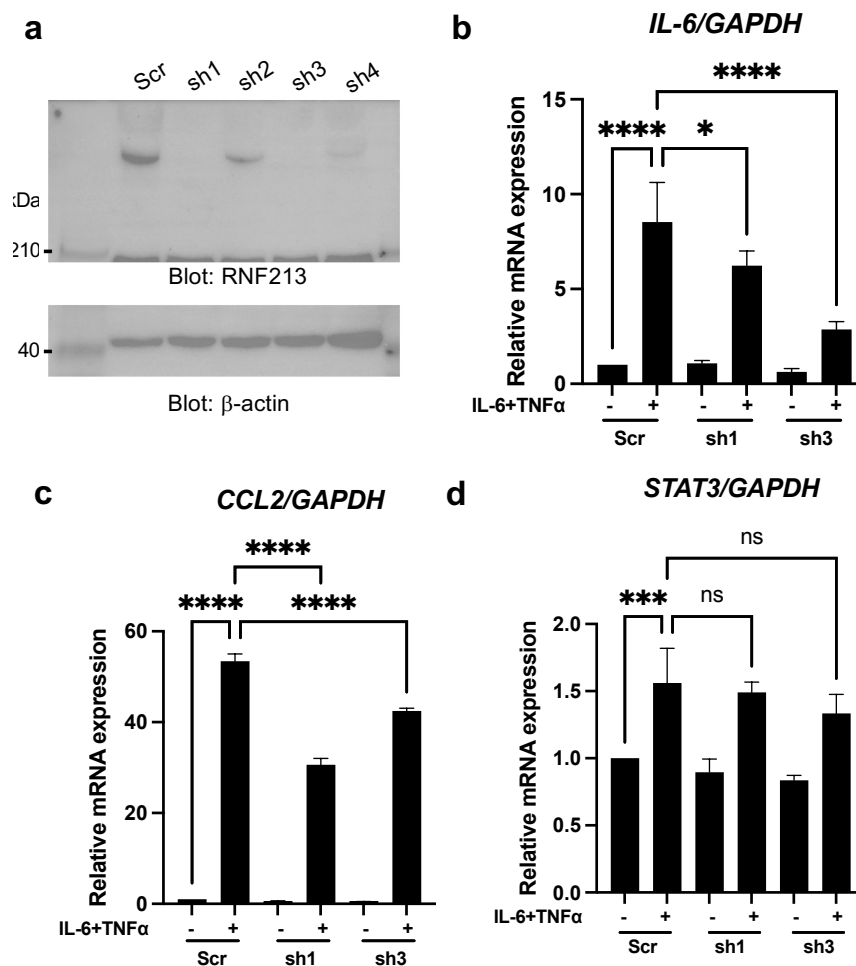


図 3. ヒト H4 細胞における shRNA を用いた RNF213 ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

(a) H4 細胞においてスクランブル shRNA (Scr) を陰性対照として用い, 4 種類の RNF213 に対する shRNA (sh1–sh4) のノックダウン効率を WB で評価した.

(b) Scr, sh1, sh3 をそれぞれ導入した H4 細胞を TNF- α , IL-6 および可溶性 IL-6 受容体で 3 時間刺激後の *IL-6* mRNA 発現量を測定した.

(c, d) 同一の実験条件下において, *CCL2* (c) および *STAT3* (d) の mRNA 発現量を測定した.

遺伝子発現レベルは Scr 導入・未刺激細胞の発現レベルを 1 とした.

データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を内在性コントロールとしての *GAPDH* に対する相対値で示し, *および****は, t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05, 0.0001 未満のものを示す. *** は t 検定で比較した際の p 値が 0.001 未満のものを示す.

4.4.2 *in vivo* における RNF213 の生理学的役割についての検討

RNF213 の *in vivo* における生理学的機能について、これまでの当研究室の報告で IL-6 アンプの関与が示されているマウス皮膚炎モデルを用いて検討を行った。TLR7 アゴニストであるイミキモドをマウスの耳介に塗布することで炎症を惹起し、数日で出現する炎症性変化(耳介の腫脹, 発赤, 落屑)について観察を行い, 耳介部の厚みを測定することで半定量評価を施行した。本モデルにおいて, day0 から day2 まで, イミキモドに加え RNF213 特異的 siRNA (si-RNF213), 陽性対照(si-p65), 陰性対照(si-NC)をそれぞれ塗布した。その結果, si-RNF213 を投与したマウスでは, NF- κ B 経路の抑制を指標とする陽性対照 si-p65 群と同程度に耳介の肥厚が有意に抑制された (図 4)。この結果から, RNF213 のノックダウンが IL-6 アンプによって惹起される炎症反応を抑制することが示唆された。

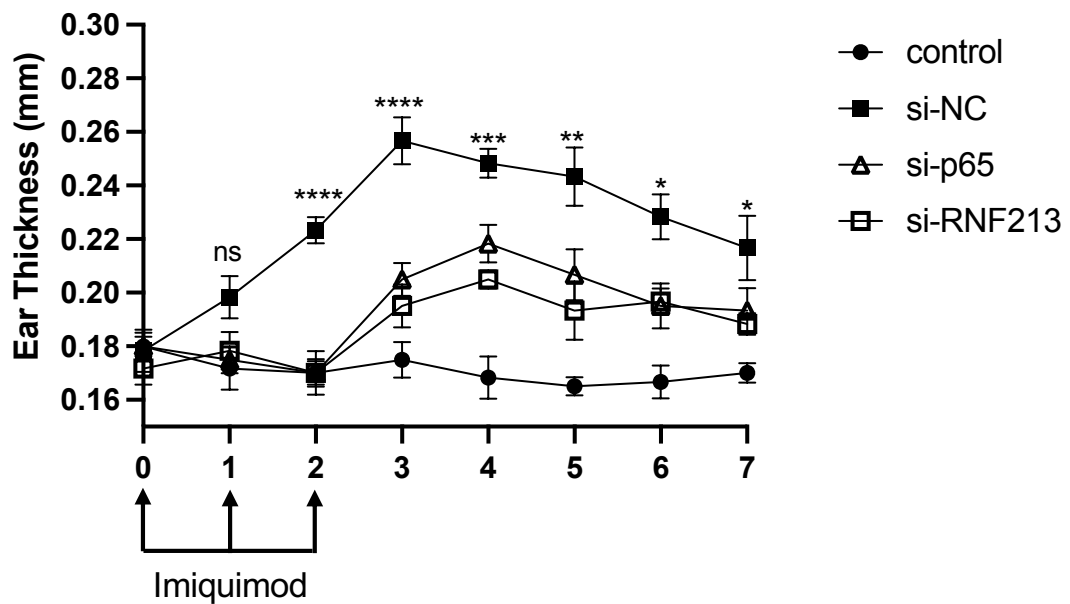


図 4. マウス皮膚炎モデルにおける RNF213 ノックダウンによる炎症抑制効果の検討

Day0-2 でイミキモドと陰性対照としての軟膏, si-RNA(si-NC, si-p65, si-RNF213)を含んだ軟膏をそれぞれ同時に塗布し, 耳介の厚さを day7 まで測定した. Day2-7 で si-RNF213 塗布群において有意に耳介肥厚が抑制された (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$).

4.4.3 RNF213 過剰発現が NF- κ B 転写活性に与える影響の検討

次に、もやもや病に関連する RNF213 p.R4810K 変異が野生型 RNF213 と比較して NF- κ B 経路をより強く活性化させる可能性を検証するため、HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。これは、H4 細胞において RNF213 p.R4810K 変異が自然に存在している可能性が極めて低いことに基づく。実際、H4 細胞は Caucasian 男性由来の脳組織を起源としており、c.14429G>A 変異 (p.R4810K) は主に東アジア人の集団に高頻度に認められ、Caucasian 集団における報告頻度は極めて低いことが知られている (Kuroda S, Houkin K, 2008; Scott RM, Smith ER, 2009; Ihara M et al, 2022)。したがって、H4 細胞が当該変異を自然に保有している可能性は極めて低く、本細胞株に p.R4810K 変異が内在しているとは考えにくい。一方、HEK293T 細胞においては、Protein Atlas における遺伝子発現データに基づき、RNF213 の内因性発現量が極めて低いことが予測された。実際に、本研究において H4 細胞と HEK293T 細胞の間で RNF213 発現量を比較したところ、Western blot 解析により HEK293T 細胞では H4 細胞と比較して顕著に低発現であることが確認された (図 5a)。これらの結果を踏まえ、HEK293T 細胞は外因性 RNF213 導入による機能的比較検討に適した細胞背景であると判断された。このため、HEK293T 細胞に野生型 RNF213 または p.R4810K 変異型 RNF213 をそれぞれ過剰発現させ、IL-6 プロモーター活性および NF- κ B p65 応答配列 (response element) に依存した転写活性を測定するルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。TNF- α 刺激濃度を 0, 1, 2.5, 5 ng/mL の 4 条件で検討した結果、p.R4810K 変異型 RNF213 の過剰発現により NF- κ B 活性は TNF- α 濃度依存的に有意に上昇し、野生型 RNF213 に比べて顕著な活性化作用を示した (図 5b, c)。さらに、TNF- α 非刺激条件下においても、p.R4810K 変異型 RNF213 の過剰発現は NF- κ B 活性を上昇させ、この変異体は発現されるのみで NF- κ B 経路を活性化しうる機能を有することが示唆された (図 5b, c)。続いて、HEK293T 細胞を用いた人工的な発現系に加えて、より病態に近い *in vitro* モデルを用いた検証を行うことで本変異の生理的意義を明確化することを目的とした。具体的には、もやもや病患者由来のくも膜組織より取得した細胞に SV40 large T 抗原を導入して樹立された不死化ヒトくも膜細胞株を使用した。この細胞株は、手術中に採取された新鮮なヒトくも膜組織を酵素処理し、初代培養後にレンチウイルスベクターを用いて不死化を誘導したものであり、線維芽細胞様形態を呈し、初期継代にて使用された。

この細胞株を用いて, RNF213 p.R4810K 変異を内在的に有するもやもや病患者由来細胞(2170)において, IL-6 および TNF- α による共刺激後の IL-6 mRNA 発現を qPCR にて測定した結果, IL-6 の有意な発現上昇が認められた(図 5d). 一方, 野生型 RNF213 を有する未破裂脳動脈瘤患者(2175)および内頸動脈閉塞症例(2177)由来の細胞では, 同様の刺激条件下において IL-6 発現の有意な上昇は認められなかった. これらの結果は, HEK293T 細胞を用いた遺伝子導入実験に加えて, 臨床検体由来のくも膜細胞系においても p.R4810K 変異が NF- κ B 転写活性および IL-6 アンプ活性を亢進させることを支持しており, 本変異が gain-of-function 型の病態関連変異である可能性を強く示唆している.

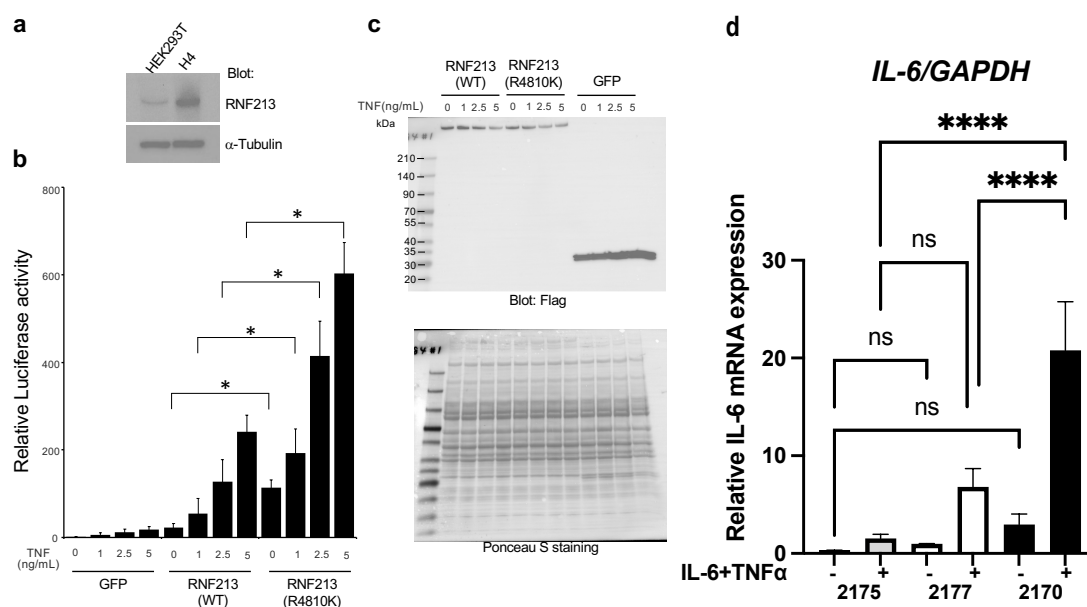


図 5. *RNF213* p.R4810K 変異の NF- κ B 経路亢進に関わる機能評価

(a) HEK293T 細胞と H4 細胞間での *RNF213* 発現レベルをイムノブロッティングにより評価した。

(b) Flag タグ付きの野生型 *RNF213* (WT), p.R4810K 変異体 (R4810K) GFP (対照) をトランスフェクションした HEK293T 細胞において TNF- α 刺激 3 時間の有無で NF- κ B 応答配列含有プラスミドを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。ルシフェラーゼ活性は GFP 導入・TNF- α 未刺激細胞の活性を 1 とした。

(c) H4 細胞における Flag タグ付き *RNF213* WT, R4810K, GFP の発現をイムノブロッティングおよび Ponceau S 染色により確認した。

(d) もやもや病患者 (A/G ; 2170), 未破裂脳動脈瘤患者 (G/G ; 2175), および頸動脈狭窄症患者 (G/G ; 2177) のくも膜組織由来不死化非免疫細胞における IL6 mRNA 発現レベルを示す。細胞を TNF- α , IL-6, および可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) で刺激した。遺伝子発現は患者 2175 由来の未刺激の細胞を 1 とした。

RNF213 p.R4810K 変異を導入した HEK293T 細胞において, TNF- α 濃度依存性に NF- κ B 活性の上昇がみられた(*: $p < 0.05$). また, *RNF213* p.R4810K 変異を有する患者由来のくも膜細胞を用いた検討によっても IL-6+TNF- α 刺激により IL-6 アンプの大きな亢進がみられた(****: $p < 0.0001$).

4.4.4 RNF213 と相互作用する分子の探索

これまでの結果より, RNF213 が TNF- α -NF- κ B シグナル伝達に関与し, 特に p.R4810K 変異体が野生型 RNF213 に比して NF- κ B 活性化を有意に増強することが示された. そこで本節では, これらの分子機能の基盤となる RNF213 の相互作用分子の同定を目的として, 分子間相互作用の解析を行った.

まず, HEK293T 細胞に FLAG タグ付きの野生型 RNF213 または p.R4810K 変異型 RNF213 をそれぞれ強制発現させ, 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行った. 免疫沈降物をウェスタンブロット法により解析した結果, RNF213 は TNF- α シグナル伝達の主要構成因子である receptor-interacting protein 1(RIP1)および tumor necrosis factor receptor-associated factor 2(TRAF2)と強く相互作用することが確認された. 一方, tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein(TRADD)との相互作用は比較的弱かった(図 6a). 興味深いことに, p.R4810K 変異型 RNF213 は, 野生型と比較して TRAF2 との相互作用が顕著に増強されていた.

さらにこの相互作用の構造的基盤を明らかにするために, 精製した組換え TRAF2 および RNF213 タンパク質を用いたドメインマッピング実験を実施した. その結果, p.R4810K 変異型 RNF213 は野生型よりも full-length TRAF2 に対して強い結合親和性を示し, TRAF2 の C 末端領域が RNF213 との相互作用における主要な結合部位であることが明らかとなった(図 6b).

TNF- α -NF- κ B シグナルにおいては, TNF- α が TNF receptor 1(TNFR1)に結合すると, TRADD がリクルートされ, 続いて RIP1 および TRAF2 との会合が誘導される. この複合体はさらに IKK 複合体(IKK α , IKK β , NEMO)を活性化し, p65 および I κ B α のリン酸化を介して I κ B α の分解と NF- κ B の核移行を引き起こすことで転写活性化を導く [Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. *Cell* 2017]. 本研究の結果は, RNF213 が TNFR1 複合体の中核構成因子と直接的に結合し, 特に p.R4810K 変異によって TRAF2 への結合親和性が増強されることで, TNF- α 刺激による NF- κ B 活性の亢進に寄与している可能性を示唆するものである.

さらに, 既報においては, NF- κ B 活性を負に制御する脱ユビキチン化酵素 CYLD が, TRAF2 の C 末端領域に結合し, NF- κ B シグナルの抑制に寄与することが報告されている [Nature 2003 Aug 14;424(6950):801-5]. したがって, RNF213, 特に p.R4810K 変異体が TRAF2 の同一領域に結合することで CYLD との結合を競合的に阻害し, 結果的に NF- κ B 活性を増強する機構が

存在する可能性が考えられる．本研究で得られた RNF213-TRAF2 結合の強化という知見は，このような抑制性因子との拮抗を通じた NF- κ B 増強機構の一端を担っている可能性があり，今後さらなる検討が求められる．

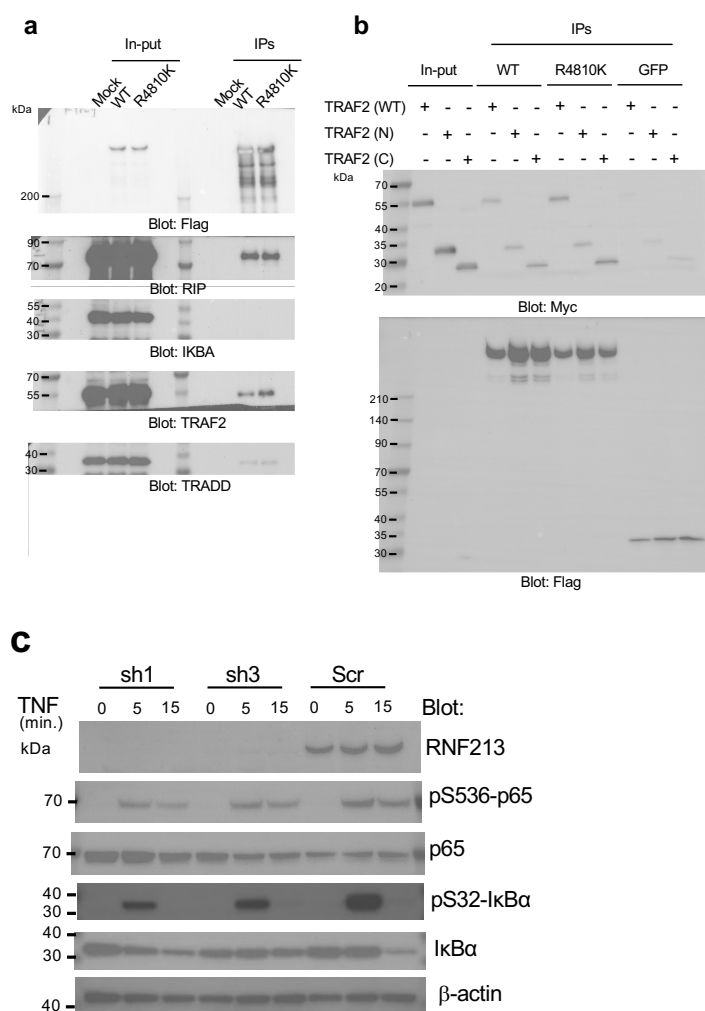


図 6. RNF213 p.R4810K 変異体は TRAF2 とより強固に結合し TNF- α 刺激を介して NF- κ B 活性化を促進する

HEK293T 細胞に RNF213-FLAG を過剰発現させ、その細胞溶解液を抗 FLAG ビーズで免疫沈降し、NF- κ B 経路の上流分子との結合を調べた。複数回施行したデータのうち代表的なデータを示す。

(a) Flag タグ付き RNF213 WT, p.R4810K, または空ベクター (Mock) を発現させた HEK293T 細胞において、TRAF2 との相互作用を評価するため IP を実施した。

(b) myc タグ付き TRAF2 の全長(WT), TRAF2 の N 末端(N), および C 末端(C)と Flag タグ付き RNF213 WT, R4810K, または GFP を共発現させ、ドメインマッピングを実施した。

(c) Scr, sh1, または sh3 RNF213 shRNA を発現する H4 細胞を TNF- α で 0, 5, または 15 分間刺激した。リン酸化 p65 (Ser536), 総 p65, リン酸化 IkBa (Ser32), IkBa, RNF213, およびチューブリンのタンパク質量を評価した。

4.4.5 RNF213 ノックダウンによる NF- κ B 活性化及び p65 核内移行変化の検討

図 6 の結果より, RNF213 が TNF- α -NF- κ B シグナル伝達において上流因子と結合することでその活性化を促進する可能性が示唆された. そこで, RNF213 が NF- κ B 経路の活性化過程そのものを直接的に制御しているのではないかという仮説のもと, 分子機序に関する検討を行った.

まず, RNF213 が NF- κ B 経路の下流イベントに関与するかを明らかにするため, H4 細胞において shRNA(sh-1, sh-3)を用いて RNF213 をノックダウンし, TNF- α 刺激によって誘導される p65 および I κ B α のリン酸化状態と I κ B α の分解を免疫ブロットにより評価した. その結果, RNF213 ノックダウン細胞では, p65(Ser536)および I κ B α (Ser32/36)のリン酸化がいずれも著明に抑制され, さらに I κ B α の分解も抑制されていた(図 7a). これらの所見は, RNF213 が TNF- α 刺激に応答した NF- κ B 活性化シグナルの進行に関与していることを強く示唆する. 次に, p65 の Ser536 リン酸化が核内移行と転写活性に密接に関与することが知られていることから, RNF213 のノックダウンが p65 の核内移行動態に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡で解析した. H4 細胞に shRNA を導入し, TNF- α 刺激後の 0, 5, 15, 30 分の 4 時点で細胞を固定し免疫染色を行った結果, コントロール群(Scr)では 5 分後に p65 の明瞭な核内移行が認められたのに対し, RNF213 ノックダウン群では 15 分経過後においても核内移行の遅延が顕著であった(図 7b). 以上より, RNF213 は p65 のリン酸化および核内移行を含む NF- κ B 活性化の主要ステップにおいて正の制御因子として機能している可能性が示唆された.

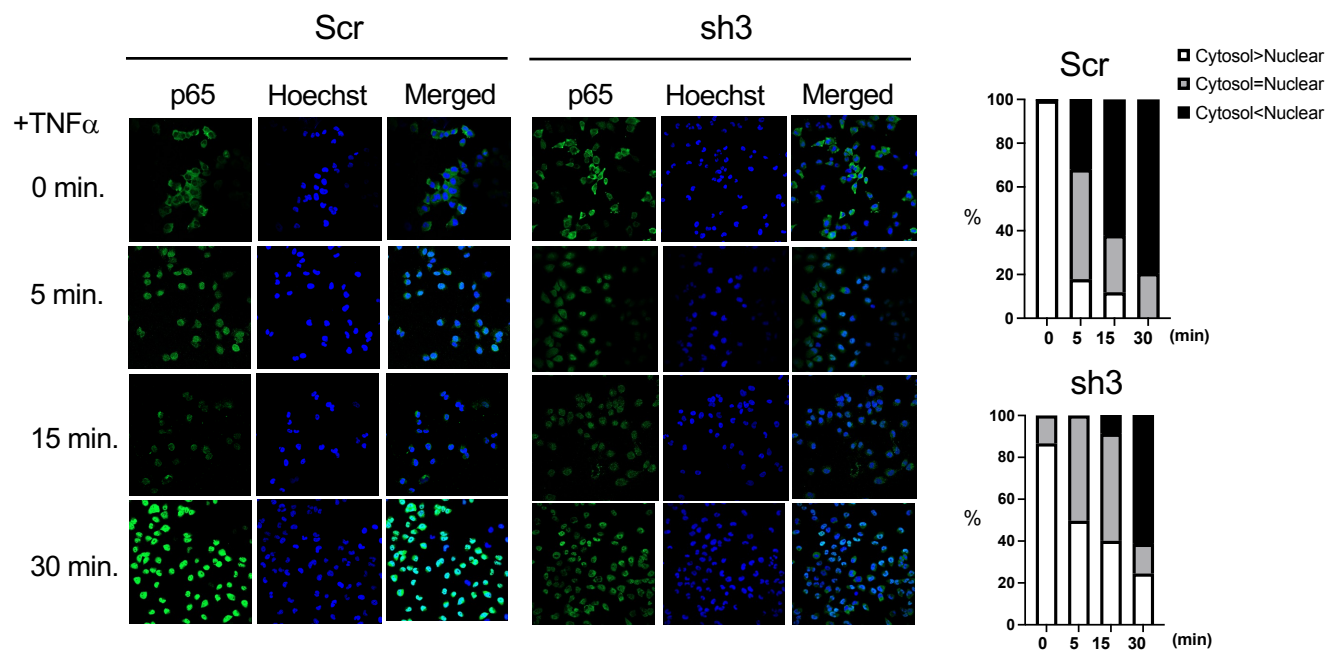


図 7. RNF213 ノックダウンによる p65 の核内移行の変化

P65, 核をそれぞれ免疫染色し, TNF- α 刺激による p65 の核内移行を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に確認した. RNF213 のノックダウンにより p65 の核内移行が遅延した. 複数回施行したデータのうち代表的なデータを示す.

4.4.6 もやもや病手術検体を用いた局所における NF- κ B 活性化の確認

最後に、もやもや病患者の病変部位においても RNF213 p.R4810K 変異による NF- κ B 経路の活性化が生体内で認められるかを確認するため、術中に採取されたくも膜組織に対して免疫染色を行った。

RNF213 p.R4810K ホモ接合型変異を有する患者(2277), ヘテロ接合型(2154), および野生型(2196)の手術検体を用い, phospho-p65(pp65)および phospho-STAT3(pSTAT3)を標的とした免疫染色を実施した. その結果, ホモ接合型変異を有する 2277 の検体において, 内膜と内弾性板間の線維芽細胞増生が認められ, それらの細胞は pp65 および pSTAT3 陽性であった. 一方, ヘテロ接合型および野生型の検体では, 同様の線維芽細胞の増多は認められなかった(図 8). これらの所見は RNF213 p.R4810K ホモ接合型変異が生体内の局所において IL-6 アンプの活性化を促進し, 炎症反応および病変形成の重症化に関与している可能性を示唆している.

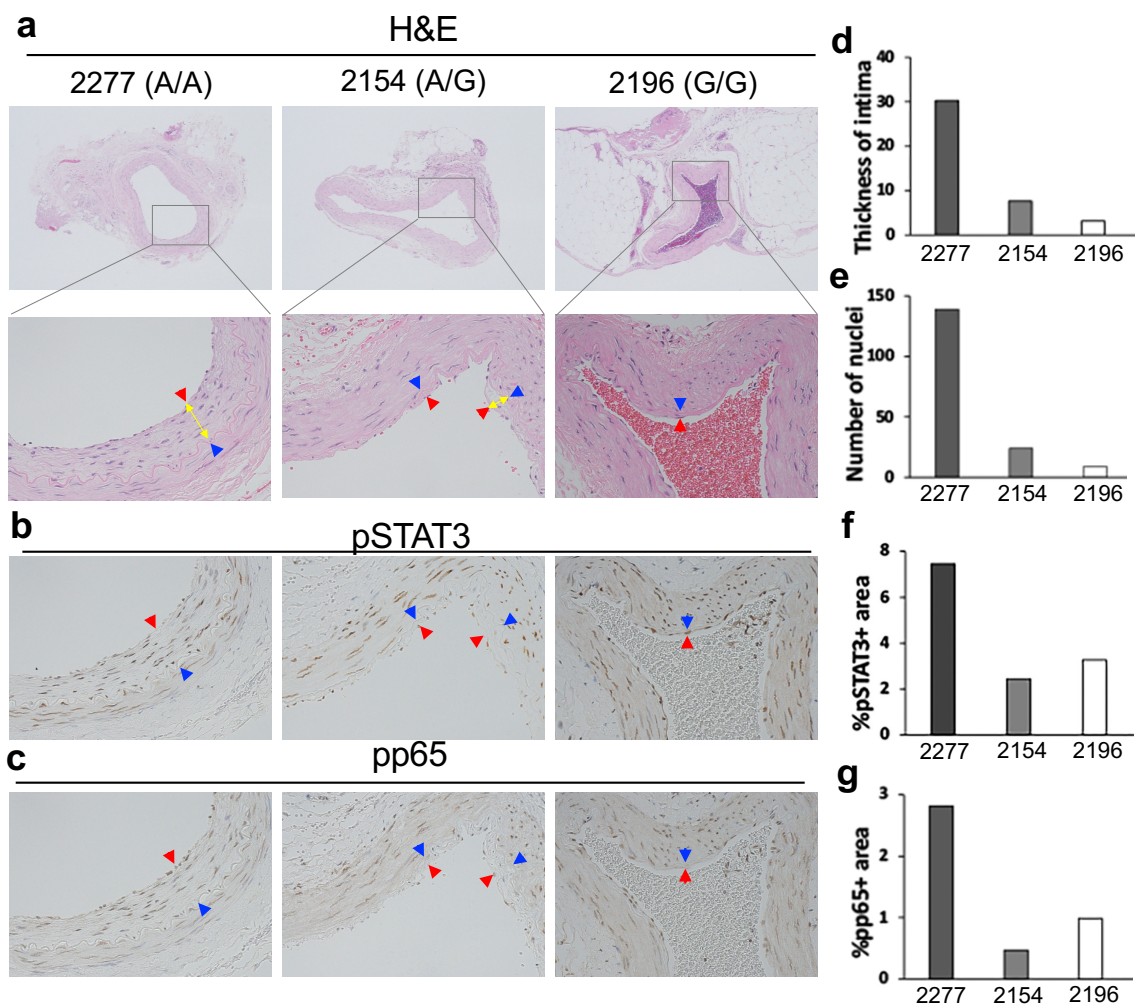


図 8. もやもや病患者くも膜検体を用いた免疫染色

もやもや病患者のくも膜由来の病理組織検体をリン酸化 p65 (pp65), リン酸化 STAT3 (pSTAT3)で免疫染色した. RNF213 p.R4810K ホモ接合型変異を有する 2277 の検体においてのみ内膜と内弾性膜間に線維芽細胞の増生がみられた(b,c; 赤および青三角の間の部分). 内膜の厚さ, 細胞核の数, pSTAT3 陽性細胞の割合, pp65 陽性細胞の割合を評価すると 2277 の検体で増加傾向がみられた(d-g).

4.5 考察

本研究の結果から, RNF213 が NF- κ B シグナル伝達経路に直接関与し炎症増幅機構である IL-6 アンプの制御因子として機能することが示され, もやもや病の病態形成における中心的な役割が明らかとなった. 特に, 疾患関連変異である p.R4810K 変異体は, TRAF2 との結合能を増強することで NF- κ B 活性化を促進し, 遺伝的素因が異常な免疫活性化へと結びつく分子的機構を提供していると考えられる.

RNF213 をノックダウンした H4 細胞においては, TNF- α および IL-6 による共刺激に対する IL-6 遺伝子発現が有意に抑制された. この抑制は NF- κ B 応答遺伝子に特異的であり, STAT3 経路には明確な影響を与えなかったことから RNF213 は TNF- α -NF- κ B カスケードにおいて選択的に機能していることが示唆された. さらに, イミキモド誘導性皮膚炎モデルにおいても RNF213 欠損マウスでは NF- κ B 依存的炎症応答が著しく抑制され, RNF213 が *in vivo* においても免疫制御因子として機能していることが示された.

特筆すべきは, p.R4810K 変異体が野生型 RNF213 と比較して TRAF2 との結合能を顕著に高めることで, NF- κ B 活性化をより強力に増幅させる点である. 通常 TRAF2 の活性は脱ユビキチン化酵素である CYLD およびそのアダプター分子 SPATA2 によって負に制御されている. CYLD-SPATA2 複合体は TRAF2 に付加された非 K48 型ポリユビキチン鎖を除去し, IKK 活性化を制限することで NF- κ B 経路を抑制する. 本研究の知見に加え, RNF213 が RZ ドメインを介して CYLD-SPATA2 複合体のユビキチン化および分解を誘導することが報告されており, 本変異体による NF- κ B 持続活性化には, ① TRAF2 との結合増強による下流シグナルの持続化, ② CYLD-SPATA2 複合体の除去・分解促進による抑制機構の破綻, という二重の分子機構が関与していると考えられる. こうした制御バランスの破綻は, もやもや病をはじめとする炎症関連疾患における慢性炎症活性化の一因となる可能性がある.

さらに, p.R4810K 変異を有するもやもや病患者由来の不死化くも膜細胞において, TNF- α および IL-6 の共刺激による IL-6 mRNA 発現の著明な亢進が認められたが, 野生型由来細胞では同様の反応は確認されなかった. 加えて, 免疫染色により p.R4810K ホモ接合型血管組織において内膜下の線維芽細胞様細胞における IL-6 アンプの強い活性化が観察され, 対照的にヘテロ接合型および野生型組織ではその活性化は乏しかった. これらの所見は

IL6 アンプの活性化が RNF213 の遺伝型と炎症性マイクロ環境の両者により厳密に調節されていることを示しており、もやもや病の病態重症度を規定する一因と考えられる。

もやもや病の異常血管産生に関与する分子機序のひとつとして、IL-6 による血管内皮細胞増殖因子(VEGF: vascular endothelial growth factor)の発現増加があげられる。IL-6 が STAT3 の活性化を通して VEGF の転写を誘導する経路は腫瘍の血管新生においてよく知られているが(Wei LH et al, 2003, Adachi et al, 2006), STAT3 自体が VEGF プロモーターを刺激し、炎症亢進によって血管新生をきたすという報告も存在する (Niu G et al, 2002)。したがって、もやもや病において IL-6 アンプが活性化することによって病変の局所において慢性炎症および血管新生を惹起する環境が成立し、構造的に未熟かつ不十分な血行動態を呈する「もやもや血管」が産生されるという機序を想定することができる。一方で、こうした炎症性の環境は STA-MCA バイパス術をはじめとするもやもや病の外科的血行再建術において、バイパス後の血管周囲に新生血管の発達を促すことで良好な神経学的予後をもたらすことが報告されている(Fujimura et al, 2021)。また、*RNF213* p.R4810K 変異を有するもやもや病患者において直接・間接複合血行再建術後の軟膜側副血管形成が増強されることも報告されている(Ito et al, 2022, Kawabori et al, 2023)。 *RNF213* p.R4810K 変異を有するもやもや病患者は、複合血行再建術後の急性期において一過性血管原性浮腫や側頭筋腫脹をきたすリスクも有意に高く、これらは手術の合併症として知られるものである(Uchino et al, 2023, Mizushima et al, 2024)。こうした現象の正確な機序はいまだ不明であるが、NF- κ B 経路の活性化および局所の IL-6 過剰発現による炎症反応の亢進がもやもや病における上記の特徴的な術後経過に関与している可能性がある。

もやもや病でみられる血管はしばしば脆弱で破裂をきたしやすく、梗塞性、出血性の両方の合併症をきたしうる。過剰な VEGF の活性化は悪性腫瘍に加え、未熟児網膜症や糖尿病網膜症といった眼科疾患における病的血管新生のメカニズムとしても提唱されており(Apte RS et al, 2019)、もやもや病における不完全な血管リモデリングにも関与していると考えられる。癌関連およびもやもや病関連の血管新生は、炎症により誘導される血管不安定性という共通の分子機序を有している可能性がある。

これらの知見はもやもや病の発症過程における「セカンドヒット」仮説、すなわち *RNF213* p.R4810K 変異などの遺伝子変異の存在のみではもやもや病は発症せず、感染などの因子が加わって発症するというものとも一致す

る。RNF213 p.R4810K 変異が血管内皮細胞の炎症に対する感受性に影響を及ぼし、セカンドヒットになりうる因子として NF- κ B 経路の活性化をきたす炎症性の刺激が加わることでもやもや病が発症している可能性が考えられる。

もやもや病患者の末梢血を用いた既報でも、この仮説を支持するものがみられる。種々の病期のもやもや病患者から採取した末梢血単核球(PBMC)でマスサイトメトリーを行った検討では、早期のもやもや病患者において単球、T 細胞、樹状細胞、単球系骨髄由来免疫抑制細胞において NF- κ B 経路の活性化がみられた(Liu C et al, 2024)。さらに、別の報告では単球や樹状細胞のサブセットにおいて Toll 様受容体(TLR)-MyD88(myeloid differentiation factor 88)- NF- κ B 経路の過剰活性化が認められたとされており(Liu C et al, 2024)、遺伝的に感受性のある個体が炎症性の環境におかれることでもやもや病を発症する機序が様々な観点から解明され始めている。

本研究の結果から、もやもや病において RNF213、とりわけ RNF213 p.R4810K 変異の存在による IL-6 の過剰産生が狭窄・閉塞血管の線維性リモデリングおよび病的なもやもや血管の新生という 2 つの病態の形成に関与していることが示唆された。現行のもやもや病診断基準では”もやもや病(ウイリス動脈輪閉塞症)は原因不明の疾患であり、類似の脳血管病変は、「類もやもや病」として除外する”と記述されており、狭義のもやもや病は自己免疫疾患の要素を含まないものとされている。しかしながら、本研究の結果を含め RNF213 の自己免疫応答や感染防御などに関わる多彩な機構が明らかになりつつある現在においては、これらの知見をもとにもやもや病の診断基準に関するパラダイムシフトが起こる可能性があると考えられる。

もやもや病の発症および重症化のメカニズムについては NF- κ B 経路の活性化以外にも多くの機序が関与していることが推測されるが、RNF213 によって引き起こされる IL-6 依存性の慢性炎症を IL-6 阻害薬などにより制御することができれば、RNF213 p.R4810K 変異を有する個体においてもやもや病の発症を未然に防ぐことができる可能性がある。一方で、もやもや病患者における NF- κ B 経路の活性化を判定する有用なバイオマーカーは存在しないのが現状であり、最新の診断基準において脳血管の閉塞や狭窄がもやもや病診断の必須要件となっていることを考慮すると、もやもや病治療の中心をなすのはやはりバイパス術をはじめとした手術療法である。もやもや病における precision medicine の実現に向け、NF- κ B 経路の活性化、IL-6 や VEGF の発現上昇や線維芽細胞の活性化を検出するバイオマーカーの発

見や、もやもや病の病勢や予後予測因子となりうる分子の同定などに向けたさらなる研究が必要である。

4.6 結語

本研究により, RNF213 の疾患関連変異である p.R4810K が TRAF2 への結合を介して NF- κ B 経路を活性化し, IL-6 アンプを過剰に駆動することが明らかとなった. この分子機構は, 局所の慢性炎症を持続的に増幅させることでもやもや病の発症および進展に深く関与している可能性が高いと考えられる. また, CYLD-SPATA2 複合体の分解促進や抑制経路の破綻を通じた二重の活性化メカニズムを示す本知見は, NF- κ B を中心とした炎症経路がもやもや病における病態制御の鍵であることを示唆し, 今後の新たな治療標的としての可能性を示すものである.

第二章

SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種後の 抗リン脂質抗体価の変動に関する検討

5.1 緒言

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome : APS)は病原性自己抗体である抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL)の存在下でおこる自己免疫性血栓症ならびに妊娠合併症である。APS は単独で発症すれば原発性 APS と分類されるが、その約半数は全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus : SLE)に合併する二次性 APS である(渥美達也, 2015)。APS では静脈血栓のみならず動脈血栓をきたすことが特徴的であり、脳梗塞や一過性脳虚血発作といった脳血管障害をきたす頻度が非常に高い。妊娠合併症に関しては習慣流産が最も多いが、子宮内胎児発育不全や妊娠高血圧症の発症も知られている。aPL には、ループスアンチコアグラント (LA) , 抗カルジオリピン抗体 (aCL) , 抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体 (a β_2 GPI) など様々な抗体が存在し、これらは APS の病原性自己抗体として知られている。また、プロトロンビンに対する自己抗体であるホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT: phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibodies) は、現行の APS 分類基準には含まれていない non-criteria aPL であるが、APS における血栓症や LA の存在と強く関連していることが報告されている(Fujieda et al, 2012)。LA は複雑な検査手法を必要とし判定困難なことも多く、抗凝固療法中には判定不能であるなどの問題点がある。しかし、aPS/PT はこのような症例や血漿確保が困難な症例において有用な検査となりうる。aPS/PT はホスファチジルセリンを ELISA プレートに固相化し、プロトロンビンを吸着させて抗原としたものを用いて ELISA で測定する。現時点で aPS/PT の測定キットは標準化されておらず、また保険収載もされていないが、こうした検査利便性を踏まえ aPS/PT が criteria aPL に含まれることが期待される(Atsumi et al, 2004)。

APS の国際分類基準は 1998 年に札幌で行われた国際抗リン脂質抗体シンポジウムの際に提唱された Sapporo criteria が 2004 年にシドニーで一部改訂され、札幌クライテリア・シドニー改変と呼ばれ広く用いられてきた(表 1)(Miyakis et al, 2006)が、2023 年にアメリカリウマチ学会/ヨーロッパリウマチ学会(ACR/EULAR)の新たな分類基準が発表された(Barbhaiya et al, 2023)。新基準は 6 つの Clinical domain と 2 つの Laboratory domain で構成されており、それぞれの総合点が 3 点以上で臨床基準を満たす。これまでの血栓症は Macrovascular (Domain1, Domain2) に分類され、血栓症のリスクの有無で重みづけされる。そのほか Domain3 には新たに微小血管病変 (microvascular) が定義され、リベド様血管病変、抗リン脂質抗体腎症、肺

胞出血，心筋疾患，副腎出血が含まれた。Domain4 に妊娠合併症が定義され，Domain5 には心臓弁膜症，Domain6 には血小板減少症が定義された。

Laboratory domain として，Domain7 に LA，Domain8 に aCL，a β_2 GPI が定義された。LA は Sapporo criteria 同様 12 週以上あけて 2 回検査し評価するが，aCL，a β_2 GPI については標準化された ELISA による測定が必須とされ，抗体価によって重みづけがされた(中力価：40-79U，高力価：80U 以上)。新分類基準の感度は 84%，特異度は 99%であり，従来の分類基準の感度 100%，特異度 91%と比べ感度が低下，特異度が上昇したものとなった。これまでには原発性 APS と動脈硬化などの血栓リスクを伴った APS，SLE に代表される 2 次性 APS など，多様な病態が分類されていたが，新基準では治験や臨床研究を前提とした限定的な集団を分類する基準となった。したがって，日常診療においては引き続き Sapporo criteria を APS 患者の分類に使用することも可能である。

一方，新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は，重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2）によって引き起こされるウイルス性呼吸器感染症であり，2019 年に中国湖北省武漢市で発生して以来世界的なパンデミックをきたしてきた。世界保健機関(WHO)が 2023 年 5 月に「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」の宣言を中止し，本邦においても同時期に COVID-19 が 2 類感染症相当である「新型インフルエンザ等感染症」から 5 類感染症へ変更となっているが，高齢者や合併症を有する患者，免疫不全の患者等にとっては未だ脅威となりうる感染症である。COVID-19 の主な症状は発熱，咳嗽，全身倦怠感などであるが，人工呼吸器による管理を要するような重症例では重篤なウイルス性肺炎に伴う急性呼吸窮迫症候群(ARDS)や血栓塞栓症をきたしうる(Attaway et al, 2021)。COVID-19 でみられる血栓症については様々な報告が相次いでなされてきたが，集中治療室に入室した重症 COVID-19 患者のうち，多発性脳梗塞をきたした患者で aPL が検出されたと報告されており(Zhang et al, 2020)，一部の症例では aPL が持続陽性となったとされるが，一般的なウイルス感染症に伴って一過性に出現する aPL と COVID-19 に伴い産生される aPL との明確な相違点は明らかになっていない。

SARS-CoV-2 に対するワクチン接種が免疫応答を促進し，重症化を予防することは，本邦および世界中で広く確認されている。現在用いられている SARS-CoV-2 mRNA ワクチンは新型コロナウイルスのスパイクタンパク質をコードしており，これが脂質二重膜に囲まれた構造をとっている(図 9)。

mRNA は Toll 様受容体(TLR)を刺激し, I 型インターフェロン(IFN)や炎症性サイトカインの産生を引き起こす(Müller-Calleja et al, 2021). 一方で, 特定のウイルスベクターワクチンでは, 接種後に重篤な血栓症と血小板減少をきたすワクチン誘発性免疫性血栓性血小板減少症 (VITT) とよばれる病態の発生が報告された(Greinacher et al, 2021).

VITT は血小板に対する自己抗体である抗 PF4(platelet factor 4)抗体がワクチン接種により産生され, 血小板が消費的に活性化されることで血栓症や血小板減少をきたす. 脳静脈洞血栓症や深部静脈血栓症, 肺塞栓症など動脈・静脈いずれにも血栓症をきたすことが報告されている(Favaloro et al, 2022). こうしたウイルスベクターワクチン接種による重篤な有害事象が相次いで報告される中で, 本邦では APS をはじめとした血栓傾向を有する患者へのワクチン接種に対する不安や懸念が高まった.

自己免疫性に血栓素因を有する APS 患者に対するワクチン接種で血栓症をきたしうるかは不明であったが, 中国で広く用いられている SARS-CoV-2 不活化ワクチンに関しては APS および SLE 患者の aPL プロファイルや血栓症リスクに影響を与えないことが報告された(Pan et al, 2023). 一方で, mRNA ワクチンを接種した APS や SLE 患者における aPL 産生や抗体価の変化, 血栓症への影響については十分な検討がなされていないのが現状である. これらの点を踏まえ, 当院に通院中の APS や SLE 患者, さらにには自己免疫疾患を有さない健常者を対象とし, SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種前後の抗リン脂質抗体価に変動がみられるか, また新規の血栓症がみられるかについて臨床研究を行った.

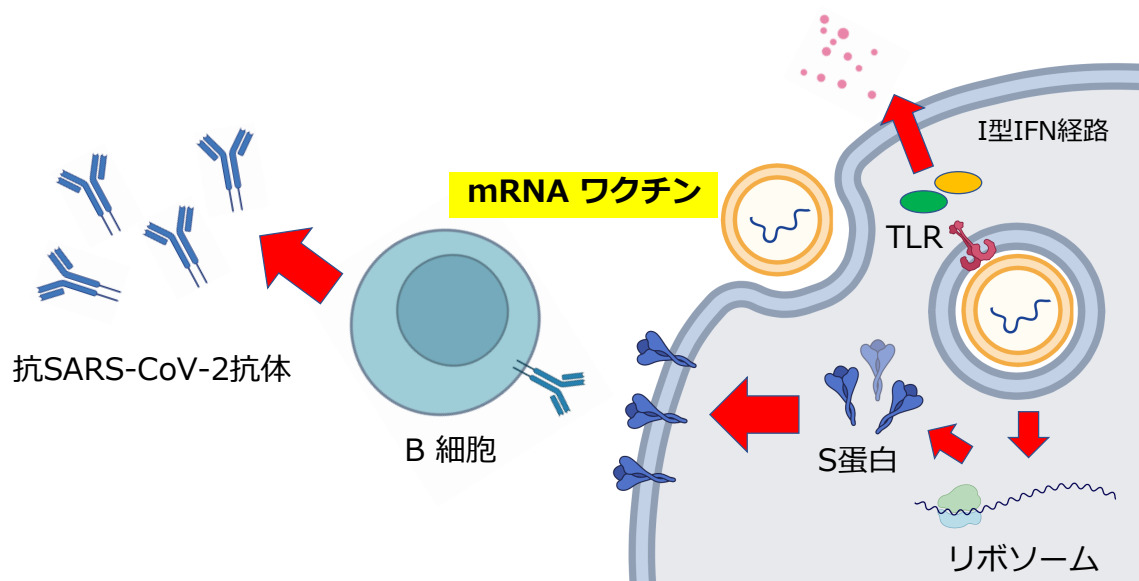


図9 mRNA ワクチンの作用機序(筆者作成)

脂質二重膜を有する mRNA ワクチンが細胞内に取り込まれ、I 型 IFN 経路を介して炎症性サイトカインが産生される。SARS-CoV-2 の mRNA をもとに SARS-CoV-2 S 蛋白が産生、細胞表面に提示されることで抗ウイルス免疫応答が形成され、B 細胞から抗 SARS-CoV-2 抗体が産生される。

表 2 抗リン脂質抗体症候群 (APS) の分類基準

(札幌クワイテリア・シドニー改変. Miyakis et al, 2006 より筆者が翻訳)
臨床所見、検査所見を 1 項目以上満たす場合に APS と分類する.

臨床所見

1. 血栓症

画像診断,あるいは病理学的に確認された血管壁の炎症を伴わない動脈あるいは小血管の血栓症

2. 妊娠合併症

- a. 妊娠 10 週以降で,他の原因のない正常形態胎児の死亡,または
- b. ①子癇,重症の妊娠高血圧腎症または②胎盤機能不全による妊娠 34 週以前の正常形態胎児の早産,または
- c. 3 回以上続けての妊娠 10 週以前の流産 (母体の解剖学的異常,内分泌学的異常,父母の染色体異常を除く)

検査所見

1. International Society of Thrombosis and Hemostasis のガイドラインに基づいた測定法でループスアンチコアグラントが 12 週間以上の間隔において 2 回以上検出される

2. 標準化された ELISA 法において,中等度以上の力価の (>40GPL or MPL,または>99 パーセンタイル) IgG 型または IgM 型の抗カルジオリピン抗体が,12 週間以上の間隔において 2 回以上検出される

3. 標準化された ELISA 法において,中等度以上の力価の (>99 パーセンタイル) IgG 型または IgM 型の抗 β_2 -グロブリン I 抗体が,12 週間以上の間隔において 2 回以上検出される

5.2 目的

APS ならびに SLE 患者，健常者の SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種前後における aPL 抗体価の変化および新規の血栓症出現の有無について検討する．

5.3 方法

5.3.1 研究デザイン

本研究は多施設前向き観察研究として実施された(生 021-0101; 承認番号 1025-6; AMED 課題番号: 21ek0210154h0002). 対象者は, SARS-CoV-2 mRNA ワクチンを 2 回接種した北海道大学病院に通院中の原発性 APS (PAPS), SLE 合併 APS (SLE/APS), aPL 陽性の SLE (SLE/aPL+), aPL 陰性の SLE (SLE/aPL-) 患者, および自己免疫疾患の既往を有さない健常者 (HC) とした. HC の血清は金沢大学病院, 浜松医科大学病院からも提供を受けた. APS の分類には 2006 年の札幌クライテリア・シドニー改変 APS 分類基準を, SLE の分類には 1997 年改訂アメリカリウマチ学会 (ACR) SLE 分類基準を用いた. PAPS, SLE/APS, SLE/aPL+患者を「aPL 陽性群」, SLE/aPL-患者を「aPL 陰性群」とそれぞれ定義した. この患者分類には criteria aPL として分類基準に記載されている LA, aCL, a β_2 GPI の 3 種を用いた.

5.3.2 血清サンプルの収集

血清サンプルは, 患者群からはワクチン接種前後に, 健常対照群からはワクチン接種後のみ採取した. 本研究は各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施され, すべての参加者から書面によるインフォームド・コンセントを取得した. 末梢血は 0.105M クエン酸を含む試験管に採取し, 得られた末梢血は 4°C において 3000rpm, 15 分間の遠心分離後に, 上清を回収し-80°C に保存して抗リン脂質抗体の測定に供試した.

5.3.3 抗リン脂質抗体価、抗 SARS-CoV2 抗体価の測定

血清 aCL IgG/IgM と a β ₂GPI IgG/IgM は化学発光免疫測定法 (CLIA) (QUANTA Flash[®] Werfen, Barcelona, Spain)を用いて検出し, aPS/PT IgG/IgM は既報の酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を用いて下記のように測定した (Atsumi et al, 2000).

まずホスファチジルセリンの固相化のため, 非照射マイクロタイタープレート (スミロンタイプ S, 住友ベークライト, Tokyo, Japan) を使用し, 50 μ g/ml ホスファチジルセリン (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) を各ウェル 40 μ L ずつ分注した後 4°C で一晩静置した. タンパク質の非特異的結合を避けるため 1% 脂肪酸フリーの BSA (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) および 5mM 塩化カルシウム (BSA-Ca) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 150 μ l でブロッキング処理を行った. 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) および 5mM 塩化カルシウムを含む TBS(TBS-Tween-Ca) で 3 回洗浄した後, 10 μ g/mL の精製ヒト PT (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) を含む BSA-Ca を 50 μ l ずつ半分のウェルに, BSA-Ca のみ (検体ブランク) を残りの半分のウェルにアプラインし, 37°C, 1 時間でインキュベーションした. その後プレートを洗浄し, BSA-Ca で 100 倍に希釈した血清 50 μ L を各ウェルに加えた. ALP 結合ヤギ抗ヒト IgG/IgM 抗体と基質を加え, 室温で 1 時間インキュベート後に吸光度を測定した. 各サンプルの aPS/PT 力価は, 陽性コントロールの希釈倍率に応じた標準曲線から導出した. aPS/PT IgG>1.2 U/mL, IgM> 5.2 U/mL にカットオフ値を設定した.

抗 SARS-CoV-2 の S 蛋白に対する抗体 (抗 S-IgG) についても CLIA 法で測定した (シスメックス株式会社, HISCL SARS-CoV-2 S-IgG). カットオフ値は 20 BAU/mL に設定した.

aPL 抗体価の変動については, ワクチン接種前に陰性だった aPL が接種後に新たに陽性になった場合を「新規陽性」と定義した. 例えば, ワクチン接種前に aCL IgG のみが陽性であった患者のワクチン接種後検体で aPS/PT IgG も陽性であった場合, これを「aPS/PT 新規陽性」とした. また, aPL の「顕著な上昇」については, ワクチン接種前の力価から 50% 以上の上昇または新規に陽性になったものと定義した. ワクチン 2 回目接種後の 3 ヶ月間, 血栓イベントの発生の有無について観察した.

5.3.4 統計解析

各群間のワクチン接種後の新規陽性 aPL の割合の差は Fisher の正確確率検定で分析した. aPL と抗 S-IgG の力価変化は Wilcoxon の符号順位検定で分析した. p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした. すべての統計解析は JMP® Pro 16.2.0 を用いて実施した.

5.4 結果

5.4.1 患者背景

患者背景について表 3 に示す. 計 788 例 (患者群 118 例, 健常者 670 例) が研究に参加した. 患者群 118 例の内訳は, aPL 陽性群 79 例 (PAPS 19 例, SLE/APS 24 例, SLE/aPL+ 36 例) と aPL 陰性群 39 例 (SLE/aPL-) であった. 患者の 83.9% (99/118) が女性で, 年齢中央値は 48 歳 (IQR : 38-59 歳) であった. 患者群における血栓症の最も一般的なリスク因子は高血圧 (30/118 例; 25.4%) であった. aPL 陽性患者 79 例のうち, 35 例 (44.3%) が aPL single positive, 30 例 (38%) が double positive, 14 例 (17.7%) が血栓症発症の強いリスク因子となりうる triple positive(LA, aCL, a β_2 GPI 同時陽性)例であった(表 4).

表 3 研究に参加した患者および健常者の背景

	合計	PAPS	SLE/APS	SLE/aPL+	SLE/aPL-	HCs
人数, n (%)	118 (100)	19 (16.1)	24 (20.3)	36 (30.5)	39 (33.1)	670 (100)
女性, n (%)	99 (83.9)	13 (68.4)	23 (95.8)	32 (88.9)	32 (88.9)	372 (55.5)
年齢の中央値 (IQR)	48 (38-59)	58 (47-58)	52.5 (41.75-63)	42 (35-51.75)	48 (37-56)	29 (22-45)
動脈血栓症, n(%)	26 (100)	15 (57.7)	11 (42.3)	0 (0)	0 (0)	N. A
脳梗塞	21 (100)	11 (52.4)	10 (47.6)	0 (0)	0 (0)	N. A
腎梗塞	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N. A
虚血性心疾患	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	N. A
肺塞栓症	3 (100)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	N. A
静脈血栓症, n (%)	15 (100)	5 (33.3)	10 (66.7)	0 (0)	0 (0)	N. A
深部静脈血栓症	14 (100)	4 (28.6)	10 (71.4)	0 (0)	0 (0)	N. A
網膜中心静脈閉塞症	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N. A
妊娠合併症, n (%)	4 (100)	1 (25)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	N. A
早産および流産	4 (100)	1 (25)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	N. A
妊娠高血圧腎症	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N. A
胎盤機能不全	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N. A
高血圧, n (%)	30 (25.4)	9 (47.4)	10 (41.7)	5 (13.9)	6 (15.4)	N. A
脂質異常症, n (%)	27 (22.9)	6 (31.6)	9 (37.5)	3 (8.3)	9 (23.1)	N. A
糖尿病, n (%)	7 (5.9)	1 (5.3)	3 (12.5)	1 (2.8)	2 (5.1)	N. A
喫煙歴, n (%)	15 (12.7)	5 (26.3)	1 (4.2)	5 (13.9)	4 (10.3)	N. A

表 4 aPL 陽性群における aPL プロファイル

	All		PAPS		SLE/APS		SLE/aPL+	
LA, n (%)	46	(39.0)	13	(68.4)	17	(70.8)	16	(44.4)
aCL (IgG/IgM)								
aCL-IgG, n (%)	35	(29.7)	13	(68.4)	7	(29.2)	15	(41.7)
aCL-IgM, n (%)	7	(5.9)	3	(15.8)	3	(12.5)	1	(2.8)
aβ₂GPI (IgG/IgM)								
aβ ₂ GPI-IgG, n (%)	54	(45.8)	13	(68.4)	16	(66.7)	25	(69.4)
aβ ₂ GPI-IgM, n (%)	6	(5.1)	3	(15.8)	2	(8.3)	1	(2.8)
aPS/PT (IgG/IgM)								
aPS/PT-IgG, n (%)	33	(28.0)	7	(36.8)	14	(58.3)	12	(33.3)
aPS/PT-IgM, n (%)	8	(6.8)	5	(15.8)	2	(8.3)	1	(2.8)
Single positive, n (%)	35	(44.3)	5	(26.3)	12	(10.2)	18	(15.3)
Double positive, n (%)	30	(38)	7	(36.8)	7	(29.2)	16	(44.4)
Triple positive, n (%)	14	(17.7)	7	(36.8)	5	(20/8)	2	(5.6)
Triple positive かつ aPS/PT 陽性, n (%)	9	(7.6)	5	(26.3)	4	(16.7)	0	(0.0)

5.4.2 ワクチン接種による抗 SARS-CoV-2 抗体価の変化

SARS-CoV-2 ワクチン接種による S-IgG 抗体獲得の有無に関しては、患者群のワクチン接種前後の抗 SARS-CoV-2 S IgG 力価を測定することで評価した(図 10, 表 5). 2 回のワクチン接種後, 全患者の 77.1% (91/118 名) でワクチン接種前と比較してワクチン後の血清で有意に SARS-CoV-2 S IgG の上昇がみられた. 中央値は接種前の 0.4 U/mL から接種後の 187.9 U/mL へと上昇した($p<0.001$) .

5.4.3 ワクチン接種後の新規陽性 aPL

aPL 陽性群, aPL 陰性群, HC 群の 3 群間において, 新規陽性の aPL の割合に差がみられるかを評価した(表 4). aCL IgG および IgM に関しては, 3 群間で有意差はみられなかった (aCL IgG: aPL+ 10.7%, aPL- 0%, HC 7.3%, $p=0.12$; aCL IgM: aPL+ 2.1%, aPL- 0%, HC 0.75%, $p=0.52$) .

一方, α_2 GPI IgG と aPS/PT IgG の新規陽性率については aPL 陽性群で aPL 陰性群および HC 群と比較して有意に高かった (α_2 GPI IgG: aPL+ 30.4%, aPL- 7.7%, HC 0.75%, $p<0.001$; aPS/PT IgG: aPL+ 20.5%, aPL- 0%, HC 0%, $p<0.001$) .

5.4.4 ワクチン接種後の aPL 抗体価変動

顕著に上昇した aPL に関しては, aPL 陽性群が aPL 陰性群と比較して高い割合を示した. aPL 陽性群では, aCL IgG で 11.4%, α_2 GPI IgG で 11.4%, aPS/PT IgG で 13.9%の顕著な上昇が観察された. aPL 陰性群では aCL IgG で 0%, α_2 GPI IgG で 7.7%, aPS/PT IgG で 0%と明らかな上昇はみられなかった(図 10).

また, ワクチン接種によって新規に陽性となった aPL が持続陽性となっているかを評価するため, 新規陽性の aPS/PT IgG を示した患者を対象に aPS/PT を再測定した. 新規陽性 aPS/PT IgG を示した 9 名の患者のうち, 6 名 (66.7%) がフォローアップ測定時に陽性を維持していた.

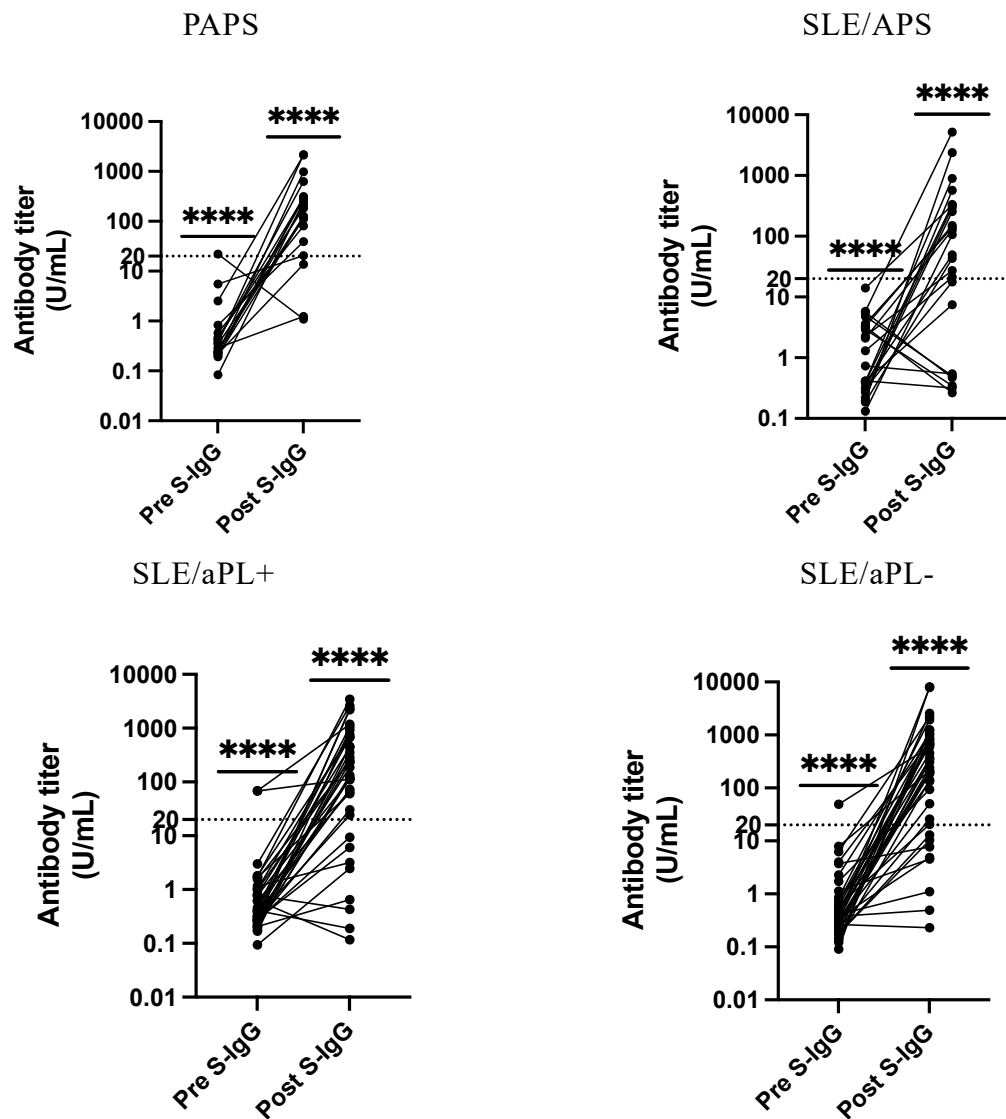


図 10 mRNA ワクチン接種前後における患者群の抗 SARS-CoV-2 抗体価の変化

mRNA ワクチン接種前後で抗 SARS-CoV-2 抗体価(S-IgG)を CLIA 法により測定し、抗体価の中央値を接種前後で比較した(Wilcoxon の符号順位検定). 2 回のワクチン接種ですべての患者群において有意な抗体価の上昇を認めた(PAPS: 接種前 0.344 vs 接種後 183.4; SLE/APS: 接種前 0.573 vs 接種後 78.21; SLE/aPL+: 接種前 0.4005 vs 接種後 159.9; SLE/aPL-: 接種前 0.3903 vs 接種後 310.0. ****: $p < 0.0001$).

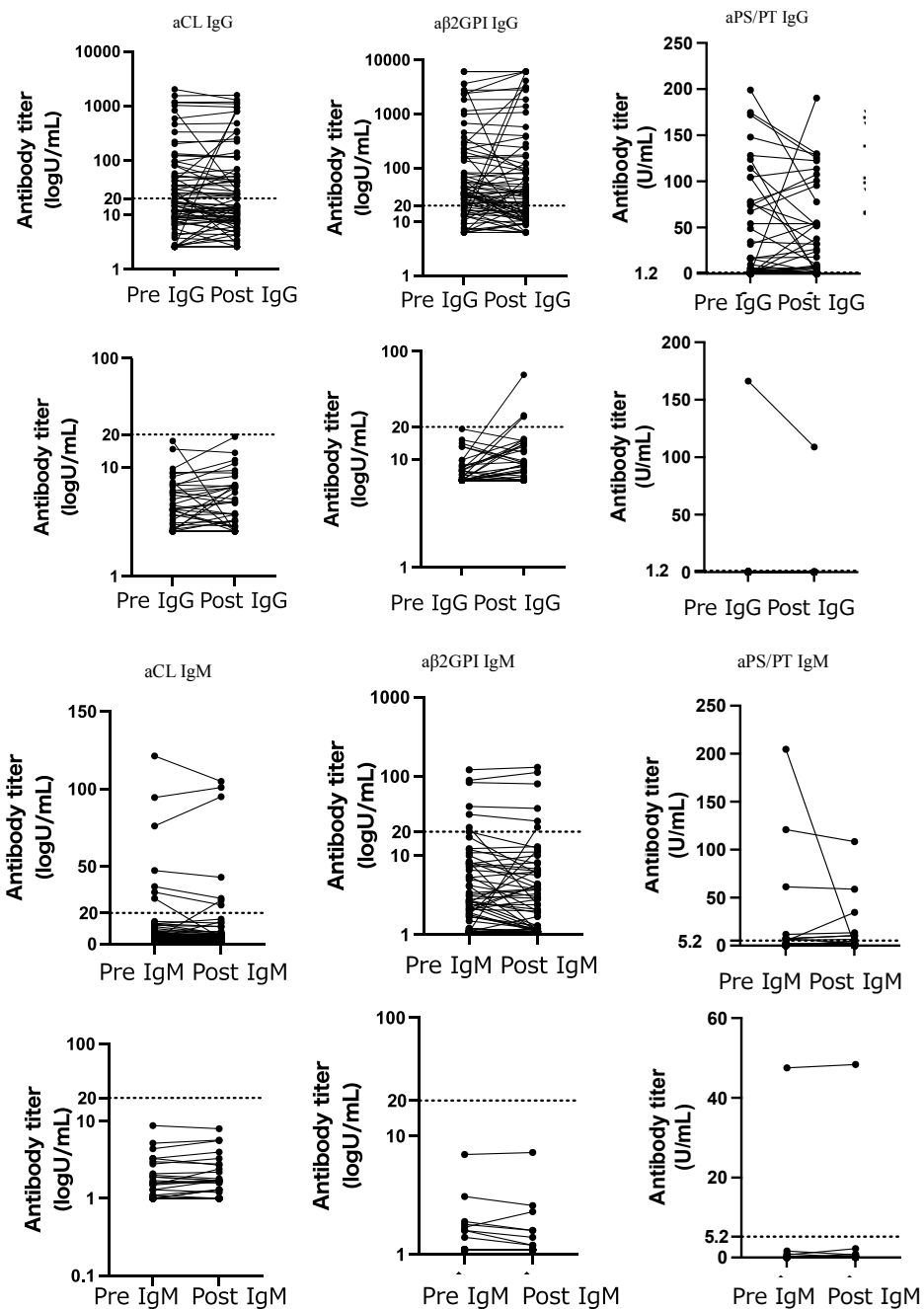


図 11 mRNA ワクチン接種前後の aPL 抗体価変動

SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種前後の血清を用いて aCL IgG/IgM, aβ2GPI IgG/IgM, aPS/PT IgG/IgM を測定した. aPL 陽性群においてワクチン接種後に aPL 抗体価が上昇する傾向がみられた.

表 5 mRNA ワクチン接種前後における患者群の抗 SARS-CoV-2 抗体価の変化

	合計	PAPS	SLE/APS	SLE/aPL+	SLE/aPL-
S-IgG 陽性	91 (77.1%)	16 (84.2%)	17 (68%)	26 (81.3%)	32 (76.2%)
S-IgG 陰性	27 (22.9%)	3 (15.8%)	8 (32%)	6 (18.7%)	10 (23.8%)

表 6 aPL 陽性群, aPL 陰性群, 健常者における新規陽性 aPL の割合の比較
aPL 陽性群と aPL 陰性群, 健常者(HC)の 3 群間において新規陽性となった aPL の割合に差がみられるかを Fisher の正確検定を用いて評価した.
aβ₂GPI IgG と aPS/PT IgG において aPL 陽性群でワクチン接種後に新規陽性の aPL を認めた患者数が有意に多かった (aβ₂GPI IgG: aPL+ 30.4%, aPL- 7.7%, HC 0.75%, p<0.001; aPS/PT IgG: aPL+ 20.5%, aPL- 0%, HC 0%, p<0.001) .

aPLs	aPL 陽性群	aPL 陰性群	HC	P* 値
aCL IgG, n (%)	5 (10.64)	0 (0.0)	49 (7.31)	0.12
aCL IgM, n (%)	1 (2.13)	0 (0.0)	5 (0.75)	0.52
aβ ₂ GPI IgG, n (%)	7 (30.43)	3 (7.69)	5 (0.75)	<0.001
aβ ₂ GPI IgM, n (%)	1 (4.35)	0 (0.0)	3 (0.45)	0.13
aPS/PT IgG, n (%)	9 (20.45)	0 (0.0)	0 (0.00)	<0.001
aPS/PT IgM, n (%)	1 (2.27)	0 (0.0)	0 (0.00)	0.11

5.4.5 ワクチン接種後の血栓症発症についての追跡

788名の参加者（APS 19名, SLE 99名, 健常対照者 670名）のうち, mRNA ワクチン接種後3ヶ月の観察期間中に新規の血栓症は発生しなかった. この評価は, 定期的な臨床フォローアップと患者の自己報告に基づいて行われた.

5.5 考察

本研究では, SARS-CoV-2 mRNA ワクチン 2 回接種後に 77.1%が抗 S-IgG 抗体陽性となった患者群において, ワクチン接種後の新規陽性 a β_2 GPI IgG と aPS/PT IgG の割合について, aPL 陽性群, aPL 陰性群, HC 群の 3 群間で有意な差がみられた. 3 ヶ月の観察期間中に血栓イベントは検出されなかった.

免疫系の活性化が aPL 産生を促進する可能性があるとする既報では, APS 患者における IFN- α レベルの上昇が aPL 産生と関連していること (Cecchi I et al, 2024) や 細菌感染や炎症性サイトカインによる免疫系の活性化が, β_2 GPI に対する自己抗体の産生を促進する可能性があることが報告されている (McDonnell T et al, 2020) .

SARS-CoV-2 ワクチン接種や SARS-CoV-2 感染によって誘導される aPL については, これまでもいくつかの報告がある. aPL はいくつかのウイルス感染で一過性に誘導されることが知られているが (Vista E et al, 2021), COVID-19 感染では, LA は一過性であるのに対し, aCL IgM は一部の患者で持続することが報告されている (Orgic M et al, 2022) . 健常者を対象とした研究では, COVID-19 感染や SARS-CoV-2 ワクチン接種により一過性の aCL や a β_2 GPI が一定の頻度で見られるものの, aPS/PT は誘導されないことが示されている (Liu T et al, 2021) .

本研究は, APS や aPL 陽性患者において mRNA ワクチン接種によって aPL プロファイルに変化が生じることを初めて示したものである. 正確な機序は明らかにはなっていないものの, 不活化ワクチンと mRNA ワクチンの間には免疫原性に何らかの違いがある可能性があると考えられる.

APS 以外の自己免疫疾患における SARS-CoV-2 ワクチン接種の影響についても, 様々な検討がなされている. SLE 患者では, SARS-CoV-2 ワクチン接種が 2 回目接種後 90 日までの中期的な主観的および客観的疾患活動性や疾患の再燃に有意な影響を与えなかったことが報告されている (Yoshida et al, 2022). また, 自己申告によるオンラインの世界的調査である COVAD

(COVID-19 vaccination in autoimmune disease) 研究では, SLE, 関節リウマチ, 全身性強皮症, 特発性炎症性筋疾患といった自己免疫疾患患者における SARS-CoV-2 ワクチン接種の安全性, 忍容性が報告されている (Naveen R et al, 2023).

SARS-CoV-2 ワクチンと血栓症発症との潜在的な関連性は、ワクチン接種開始以来、様々な形で議論されてきた。ウイルスベクターワクチンによる VITT の報告を受けて、特に APS などの血栓素因を持つ患者において、SARS-CoV-2 ワクチン接種に対する懸念が生じた。triple positive の APS 患者を対象とした検討では、mRNA ワクチンやウイルスベクターワクチン接種によって重篤な有害事象や COVID-19 の増悪はみられなかったことが報告されている (Pengo V et al, 2022)。また、102 名の aPL 陽性患者において mRNA ワクチン 2 回接種後に血栓症は観察されなかったとする報告や、抗凝固療法を受けている APS 患者において、COVID-19 感染やワクチン接種が臨床経過を悪化させなかったという報告もみられる (Sciascia S et al, 2021; Ott O et al, 2023)。本研究でも、ワクチン接種を受けた APS や SLE 患者で aPL 陽性の場合でも血栓イベントは観察されず、これらの結果は、自己免疫性血栓性疾患を持つ患者における mRNA ワクチン接種の安全性を支持するものと考えられる。

また、一部の aPL 陽性群患者において mRNA ワクチン接種後も持続的な aPL が観察された。mRNA ワクチン接種によって誘導される aPS/PT の血栓症に関わる病原性については、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究については、重症 SARS-CoV-2 感染への懸念が高まる中でワクチン接種前の血清を短期間で入手することが困難であったため、サンプルサイズが限られていた点、健常者のワクチン接種前の血清を得ることができなかったため、健常者のワクチン接種前後の aPL 力価を比較することができなかった点が限界的である。

5.6 結語

SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種によって aPL 陽性患者において有意に a β ₂GPI IgG と aPS/PT IgG が産生されることが明らかとなった。ワクチン接種後の血栓症は観察されなかったものの, APS 患者においては血栓症の発生に注意する必要があると考えられる。自己免疫性血栓症患者におけるワクチン接種後の血栓リスクを明確にするためには, さらなる検討が必要である。

6. 総括

本研究では、血管障害をきたす疾患としてもやもや病および抗リン脂質抗体症候群を取り上げ、それぞれの疾患と自己免疫応答との関与について検討した。本研究から得られた知見は以下の通りである。

第一章

- ・もやもや病疾患感受性遺伝子 RNF213 のノックダウンにより、IL-6 アンプは抑制される。
- ・イミキモド皮膚炎モデルにおいても RNF213 のノックダウンにより炎症応答の抑制がみられる。
- ・ p.R4810K 変異を有する RNF213 は野生型と比較してより強力に NF- κ B 経路の活性化をきたし、これは RNF213 と TRAF2 との直接的な分子相互作用によってもたらされる
- ・ RNF213 p.R4810K 変異を有するもやもや病患者の細胞では有意に IL-6 アンプが亢進している。
- ・ RNF213 p.R4810K ホモ接合型変異を有するもやもや病患者の血管では内皮細胞の増生がみられ、IL-6 アンプの亢進が局所で起きている可能性がある。

第二章

- ・ SARS-CoV-2 mRNA ワクチンの 2 回接種により、多くの APS, SLE 患者で抗 SARS-CoV-2 抗体 S-IgG が得られる。
- ・ 何らかの aPL を有する患者において、SARS-CoV-2 mRNA ワクチンの接種により新規に a β_2 GPI IgG および aPS/PT IgG が産生される。
- ・ 何らかの aPL を有する患者において、SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種前後で aCL IgG, a β_2 GPI IgG および aPS/PT IgG の上昇がみられる。
- ・ ワクチン接種による血栓症の発症はみられない。
- ・ 一部の症例ではワクチン接種後も aPS/PT IgG が持続陽性となっており、mRNA ワクチンが臨床経過に長期的な影響を及ぼす可能性は否定できない。

第一章では、もやもや病の疾患感受性遺伝子である RNF213 の機能解析を行うことによって、同分子が IL-6 アンプを正に制御する分子であることを明らかにし、その機序として TNF- α シグナル伝達経路の活性化および

NF- κ B 経路の活性化があることを見出した。これは主に RNF213 と TRAF2 との結合によってもたらされ, *RNF213* p.R4810K 変異によってより結合が強固になることを新規に報告した。もやもや病の病態形成に関わる機序のひとつとして IL-6 アンプの活性化が関与している可能性を報告したが, RNF213 自体の詳細な分子機能については今後もさらなる検討を重ねる必要があると考えられる。

第二章では, APS および SLE 患者に対する SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種前後で抗リン脂質抗体プロファイルに変化があるかを検討した。自己免疫性の血栓症および血栓傾向を有する患者においてワクチン接種自体で血栓症はみられなかったため, ワクチン接種自体の安全性を確認した上で, 血栓症発症には至らないものの aPS/PT IgG など血栓リスクに関わる aPL が産生されることを示し, SARS-CoV-2 mRNA ワクチンがもつ免疫原性について示唆することができた。今後は mRNA ワクチン接種による aPL 産生の詳細な機序の解析や, より長期的な血栓症発症の有無等についての検討が望まれる。

本研究が, 血管の狭窄および閉塞という 2 つの重要な血管病変の形成機序に関して, 自己免疫の側面から新たな知見を加え, 同病態のさらなる解明の一助となることを願う。

7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室および遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学分野 博士課程に在籍中の研究結果をまとめたものです。免疫・代謝内科学教室教授である渥美達也先生ならびに分子神経免疫学分野教授の村上正晃先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたってご指導を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。分子神経免疫学分野准教授である橋本茂先生には第一章の研究に際し、実験の計画・遂行から論文の作成に至るまで終始熱心なご指導を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。また、同分野の特任講師・蔣菁菁先生、特任講師・田中宏樹先生、特任助教・村上薫先生、内藤正一郎先生をはじめ実験に関してご助力、ご指導をいただいた先生方、分子神経免疫学分野の皆様にご心から感謝申し上げます。

免疫・代謝内科学教室膠原病グループ講師 藤枝雄一郎先生には第二章の研究についての仮説立案、実験計画を含め、私が大学院生としての研究を行う上であらゆる面からご指導、ご助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。免疫・代謝内科学教室膠原病グループ講師 Olga Amengual 先生、講師 加藤将先生 (現 富山大学 教授)、講師 河野通仁先生、助教 久田諒先生には研究の遂行にあたり、日頃より有益なご討論、ご助言を頂きました。阿部靖矢先生、麻生邦之先生、佐藤太貴先生、吉村大先生、竹山脩平先生、蜷川慶太先生、垂水政人先生、小住由衣先生、工藤友喜先生には大学院生の先輩として様々な面でアドバイスをいただき大変感謝しております。Jiang Wei 先生には実験に関して多大なサポートをいただきました。また、同期の崎山 広大先生、多田麻里亜先生、土田直央先生、西野慶先生、守谷悠先生は臨床・研究のどちらにおいても深い知識と高い意欲を持ち、常に切磋琢磨しあえる大事な仲間でした。私が大学院生活进行ける上で欠かすことのできなかった存在であり、ここに深く感謝を申し上げます。大学院生の冲庸太郎先生、鎌田和郎先生、井上雄太先生、宮本健一先生はともに学び励ましあい大学院生活の支えとなってくれました。心より感謝申し上げます。また、当教室実験助手の藤田悠介さんのご協力なしにはこの研究を遂行することは不可能でした。様々な面でご助力をいただき、深く感謝申し上げます。この他にも、本論文作成にあたり多くの皆様にご協力・ご指導・ご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

最後に、妻の風湖にはたくさんの心配をかけましたが、いつも私の心の支えとなってくれました。この場を借りて、日頃の感謝を伝えさせていただきます。

8. 利益相反

本研究において開示すべき利益相反状態はない。

9. 引用文献

Adachi Y, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Takayama K, Curiel DT, Nishimoto N. Interleukin-6 induces both cell growth and VEGF production in malignant mesotheliomas. *International Journal of Cancer*. 2006;119(6).

Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid syndrome, “the best prophet of the future”. *Modern Rheumatology: Taylor and Francis Ltd*; 2018. p. 409-16.

Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 2019.

Arima Y, Harada M, Kamimura D, Park JH, Kawano F, Yull FE, et al. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*. 2012;148(3).

Arima Y, Kamimura D, Atsumi T, Harada M, Kawamoto T, Nishikawa N, et al. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *eLife*. 2015;4.

Arima Y, Ohki T, Nishikawa N, Higuchi K, Ota M, Tanaka Y, et al. Brain Micro-Inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *eLife*. 2017;6.

Asselman C, Hemelsoet D, Eggermont D, Dermaut B, Impens F. Moyamoya disease emerging as an immune-related angiopathy. *Trends in Molecular Medicine*2022.

Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Koike T, editors. Antiprothrombin antibodies - Are they worth assaying? *Thrombosis Research*; 2004.

Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, Bando H, Meng J, Arima Y, et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research*2014.

Attaway AH, Scheraga RG, Bhimraj A, Biehl M, Hatipoğ Lu U. Severe covid-19 pneumonia: Pathogenesis and clinical management. *The BMJ*2021.

Barbhaiya M, Zuily S, Naden R, Hendry A, Manneville F, Amigo MC, et al. 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2023;82(10).

Cecchi I, Radin M, Barinotti A, Foddai SG, Menegatti E, Roccatello D, et al. Type I interferon pathway activation across the antiphospholipid syndrome spectrum: associations with disease subsets and systemic antiphospholipid syndrome presentation. *Frontiers in Immunology*. 2024;15.

Favaloro EJ, Pasalic L, Lippi G. Review and evolution of guidelines for diagnosis of COVID-19 vaccine induced thrombotic thrombocytopenia (VITT). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*2022.

Fujieda Y, Amengual O. New insights into the pathogenic mechanisms and treatment of arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *European Journal of Rheumatology*. 2021;8(2).

Fujieda Y, Atsumi T, Amengual O, Odani T, Otomo K, Kato M, et al. Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012;21(14).

Fujimura M, Tominaga T. Flow-augmentation bypass for moyamoya disease. *Journal of Neurosurgical Sciences*2021.

Fujimura M, Tominaga T, Kuroda S, Takahashi JC, Endo H, Ogasawara K, et al. 2021 Japanese Guidelines for the Management of Moyamoya Disease: Guidelines from the Research Committee on Moyamoya Disease and Japan Stroke Society. *Neurologia Medico-Chirurgica*. 2022;62(4).

Fujita M, Yamamoto Y, Jiang JJ, Atsumi T, Tanaka Y, Ohki T, et al. NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2019;139(2).

- Fukui M, Kono S, Sueishi K, Ikezaki K. Moyamoya disease. *Neuropathology* 2000.
- Giannopoulou N, Gupta L, Andreoli L, Lini D, Nikiphorou E, Aggarwal R, et al. COVID-19 vaccine safety during pregnancy in women with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews* 2023.
- Gil-Vila A, Ravichandran N, Selva-O'Callaghan A, Sen P, Nune A, Gaur PS, et al. COVID-19 Vaccination in Autoimmune Diseases (COVAD) study: Vaccine safety in idiopathic inflammatory myopathies. *Muscle and Nerve*. 2022;66(4).
- Goto Y, Nanto M, Oka H, Murakami N, Nakagawa T, Kimura S, et al. Radiological and clinical features of twig-like middle cerebral artery in comparison with moyamoya angiopathy: a multicenter retrospective study. *Journal of Neurosurgery*. 2022;137(6).
- Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(22).
- Harada M, Kamimura D, Arima Y, Kohsaka H, Nakatsuji Y, Nishida M, et al. Temporal Expression of Growth Factors Triggered by Epiregulin Regulates Inflammation Development. *The Journal of Immunology*. 2015;194(3).
- Higuchi H, Kamimura D, Jiang JJ, Atsumi T, Iwami D, Hotta K, et al. Orosomucoid 1 is involved in the development of chronic allograft rejection after kidney transplantation. *International Immunology*. 2020;32(5). doi: 10.1093/inti もやもや病 xaa003.
- Hiraide T, Suzuki H, Momoi M, Shinya Y, Fukuda K, Kosaki K, et al. RNF213-Associated Vascular Disease: A Concept Unifying Various Vasculopathies. *Life* 2022.
- Houkin K, Ito M, Sugiyama T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, et al. Review of Past Research and Current Concepts on the Etiology of Moyamoya Disease. *Neurologia Medico-Chirurgica* 2012.

Ito M, Kawabori M, Sugiyama T, Tokairin K, Tatezawa R, Uchino H, et al. Impact of RNF213 founder polymorphism (p.R4810K) on the postoperative development of indirect pial synangiosis after direct/indirect combined revascularization surgery for adult Moyamoya disease. *Neurosurgical Review*. 2022;45(3).

Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *Journal of Human Genetics*. 2011;56(1).

Kanamori F, Yokoyama K, Ota A, Yoshikawa K, Karnan S, Maruwaka M, et al. Transcriptome-wide analysis of intracranial artery in patients with moyamoya disease showing upregulation of immune response, and downregulation of oxidative phosphorylation and DNA repair. *Neurosurgical Focus*. 2021;51(3).

Kawabori M, Ito M, Kazumata K, Tokairin K, Hatanaka KC, Ishikawa S, et al. Impact of RNF213 c.14576G>A Variant on the Development of Direct and Indirect Revascularization in Pediatric Moyamoya Disease. *Cerebrovascular Diseases*. 2023;52(2).

Knight JS, Kanthi Y. Mechanisms of immunothrombosis and vasculopathy in antiphospholipid syndrome. *Seminars in Immunopathology*2022.

Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Youssefian S. A new horizon of moyamoya disease and associated health risks explored through RNF213. *Environmental Health and Preventive Medicine*2016.

Kuroda S, Fujimura M, Takahashi J, Kataoka H, Ogasawara K, Iwama T, et al. Diagnostic Criteria for Moyamoya Disease-2021 Revised Version. *Neurologia Medico-Chirurgica*. 2022;62(7).

Kuroda S, Houkin K. Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *The Lancet Neurology*2008.

Lee J, Nakagiri T, Kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, et al. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *International Immunology*. 2013;25(5).

Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, et al. IL-6 Amplifier, NF- κ B–Triggered Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses. *The Journal of Immunology*. 2012;189(4).

Liu C, Ge P, Zhang B, Chan L, Pang Y, Tao C, et al. Mass cytometry revealed the circulating immune cell landscape across different Suzuki stages of Moyamoya disease. *Immunologic Research*. 2024;72(4).

Liu T, Dai J, Yang Z, Yu X, Xu Y, Shi X, et al. Inactivated SARS-CoV-2 vaccine does not influence the profile of prothrombotic antibody nor increase the risk of thrombosis in a prospective Chinese cohort. *Science Bulletin*. 2021;66(22).

Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS ONE*. 2011;6(7).

McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V, et al. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Reviews* 2020.

Meng J, Jiang J-J, Atsumi T, Bando H, Okuyama Y, Sabharwal L, et al. Breakpoint Cluster Region–Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *The Journal of Immunology*. 2016;197(8).

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(2).

Miyawaki S, Imai H, Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Saito N. Identification of a genetic variant common to moyamoya disease and intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke*. 2012;43(12).

Müller-Calleja N, Hollerbach A, Royce J, Ritter S, Pedrosa D, Madhusudhan T, et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science*. 2021;371(6534).

Murakami M, Harada M, Kamimura D, Ogura H, Okuyama Y, Kumai N, et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Reports*. 2013;3(3).

Murakami M, Kamimura D, Hirano T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 2019.

Naveen R, Parodis I, Joshi M, Sen P, Lindblom J, Agarwal V, et al. COVID-19 vaccination in autoimmune diseases (COVAD) study: Vaccine safety and tolerance in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2023;62(7).

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2002;21(13).

Ogrič M, Žigon P, Sodin-Semrl S, Zlatković-Švenda M, Zdravković M, Ovuka M, et al. Longitudinal Analysis of Antiphospholipid Antibody Dynamics after Infection with SARS-CoV-2 or Vaccination with BNT162b2. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1).

Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Kanamoto M, et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 2008;29(4).

Okazaki S, Morimoto T, Kamatani Y, Kamimura T, Kobayashi H, Harada K, et al. Moyamoya Disease Susceptibility Variant RNF213 p.R4810K Increases the Risk of Ischemic Stroke Attributable to Large-Artery Atherosclerosis. *Circulation*. 2019;139(2).

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009;68(6).

Okuyama Y, Tanaka Y, Jiang J-J, Kamimura D, Nakamura A, Ota M, et al. Bmi1 Regulates I κ B α Degradation via Association with the SCF Complex. *The Journal of Immunology*. 2018;201(8).

Ota M, Tanaka Y, Nakagawa I, Jiang JJ, Arima Y, Kamimura D, et al. Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147–Mediated NF- κ B Activation. *Arthritis and Rheumatology*. 2020;72(6).

Ott O, Herrmann E, Schulz A, Lindhoff-Last E. The APSANTICO Study: A Prospective Observational Study to Evaluate Antiphospholipid Antibody Profiles in Patients with Thromboembolic Antiphospholipid Syndrome (APS) after COVID-19 Infection and/or Vaccination. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6).

Ou P, Dupont P, Bonnet D. Fibromuscular dysplasia as the substrate for systemic and pulmonary hypertension in the setting of Moya-Moya disease. *Cardiology in the Young*. 2006;16(5).

Pan H, Tang Z, Teng J, Sun Y, Liu H, Cheng X, et al. COVID-19 vaccine affects neither prothrombotic antibody profile nor thrombosis in primary anti-phospholipid syndrome: a prospective study. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2023;62(2).

Pengo V, Del Ross T, Tonello M, Andreoli L, Tincani A, Gresele P, et al. Impact of COVID-19 and COVID-19 vaccination on high-risk patients with antiphospholipid syndrome: a nationwide survey. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2022;61(S12).

Schreiber K, Sciascia S, De Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, et al. Antiphospholipid syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4.

Sciascia S, Costanzo P, Radin M, Schreiber K, Pini M, Vaccarino A, et al. Safety and tolerability of mRNA COVID-19 vaccines in people with antiphospholipid antibodies. *The Lancet Rheumatology* 2021.

Shimoyama S, Nakagawa I, Jiang JJ, Matsumoto I, Chiorini JA, Hasegawa Y, et al. Sjögren's syndrome-associated SNPs increase GTF2I expression in salivary gland cells to enhance inflammation development. *International Immunology*. 2021;33(8).

Stofkova A, Kamimura D, Ohki T, Ota M, Arima Y, Murakami M. Photopic light-mediated down-regulation of local α 1A -adrenergic signaling protects blood-retina barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. *Scientific Reports*. 2019;9(1).

Suzuki J, Kodama N. Moyamoya disease-A review. *Stroke*. 1983;14(1).

Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular “Moyamoya” Disease: Disease Showing Abnormal Net-Like Vessels in Base of Brain. *Archives of Neurology*. 1969;20(3).

Takada Y, Kamimura D, Jiang JJ, Higuchi H, Iwami D, Hotta K, et al. Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation via the IL-6 amplifier. *International Immunology*. 2020;32(10).

Takeda M, Tezuka T, Kim M, Choi J, Oichi Y, Kobayashi H, et al. Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NF κ B activation and apoptosis in an AAA+ domain-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;525(3).

Takeuchi K. Hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries. *Brain nerve*. 1957;9.

Tanaka H, Arima Y, Kamimura D, Tanaka Y, Takahashi N, Uehata T, et al. Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;216(6).

Tashiro R, Niizuma K, Kasamatsu J, Okuyama Y, Rashad S, Kikuchi A, et al. Dysregulation of Rnf 213 gene contributes to T cell response via antigen uptake, processing, and presentation. *Journal of Cellular Physiology*. 2021;236(11).

Tektonidou MG, Laskari K, Panagiotakos DB, Moutsopoulos HM. Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis Care and Research*. 2009;61(1).

Uchino H, Ito M, Tokairin K, Tatezawa R, Sugiyama T, Kazumata K, et al. Association of RNF213 polymorphism and cortical hyperintensity sign on fluid-attenuated inversion recovery images after revascularization surgery for moyamoya disease: possible involvement of intrinsic vascular vulnerability. *Neurosurgical Review*. 2023;46(1).

Vista ES, Crowe SR, Thompson LF, Air GM, Robertson JM, Guthridge JM, et al. Influenza vaccination can induce new-onset anticardiolipins but not β 2-glycoprotein-I antibodies among patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012;21(2).

Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003;22(10).

Xiao M, Zhang Y, Zhang S, Qin X, Xia P, Cao W, et al. Antiphospholipid Antibodies in Critically Ill Patients With COVID-19. *Arthritis and Rheumatology*. 2020;72(12).

Yoshida T, Tsuji H, Onishi A, Takase Y, Shirakashi M, Onizawa H, et al. Medium-term impact of the SARS-CoV-2 mRNA vaccine against disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus Science and Medicine*. 2022;9(1).

Zhang Y, Xiao M, Zhang S, Xia P, Cao W, Jiang W, et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(17).