

2019年度大学間連携等による 共同研究に係る研究成果報告書（慶應義塾大学）

1 ゲノム編集技術を駆使した肺高血圧関連遺伝子改変マウスの作製と解析

1. 本学研究代表者

獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門
教授 袴田陽二

慶應義塾大学研究代表者

医学部 内科学（循環器） 講師 片岡雅晴

2. 研究の目的

指定難病疾患である肺高血圧症の病態の全容解明を目的とし、発症原因となる遺伝子について組換えDNA実験を含めた各種基礎研究を実施する。肺高血圧症は肺動脈の血管内皮細胞や平滑筋細胞の異常増殖により内膜や中膜が肥厚して肺動脈圧が上昇し、右心不全を起こす生命予後不良の指定難病である。肺高血圧症の難病登録患者数は約3500名で、そのうち約3/4が原因を特定できない「特発性肺動脈性肺高血圧症（以下 idiopathic PAH）」と鑑別される。PAHの中で遺伝的な背景が示唆される家族性症例から、2000年に染色体2q33に存在する2型骨形成タンパク受容体（以下 BMPR2）遺伝子の変異が発見され原因遺伝子とされた（International PPH Consortium, Nat Genet. 2010）。しかし、BMPR2遺伝子異常はPAHの約25%、家族性PAHの中でも70%程度であり、また浸透率が約20%と低く、肺高血圧症発症のメカニズムは不明な点も多い。PAHの過半数では原因を特定出来ないため根本的な発症概念は確立されておらず、肺動脈肥厚に至る分子機構は不明で、治療方法も確立していない。肺高血圧症の進展に関与していると考えられる遺伝子、もしくは、肺高血圧症の新規発症原因遺伝子の同定のため、次世代シーケンサー等にて候補を絞り込んだ遺伝子について、これらの遺伝子異常をマウスに導入し、遺伝子変異と肺高血圧症発症との関連性を検証する。

3. 研究の計画・方法

次世代シーケンサーによるPAHの網羅的な発症、原因遺伝子探索の結果挙げられた発症原因候補遺伝子をCRISPR-Cas9システムを用いてノックインしたマウスを作製、系統化を目指すとともに、病態解析実験を同時進行でおこなう。作製したマウスを正常酸素ならびに低酸素刺激による肺高血圧症発症の有無を評価する。刺激したマウスをイソフルランで吸入麻酔をした後、右内頸静脈よりカテーテルを挿入し右室圧を評価する。安楽死させた後、肺高血圧症による右心不全の程度、および肺病変を評価する。また肺動脈内皮細胞や平滑筋細胞を分離し、mRNAや蛋白の発現解析を行う。

4. 研究の成果

我々の研究チームはPAHの国内最大バイオバンクを用いた解析からRNF213変異が約1割の日本人PAH患者で認めることを見出した（Suzuki, Kataoka, et al. Circ Genom Precis Med. 2018）。興味深いことに、このRNF213変異は末梢性肺動脈狭窄症やモヤモヤ病の発症感受性遺伝子としても近年報告されている。さらに、我々は、このRNF213変異を有するPAH患者が極めて予後不良の一群であることを確認した。これらの知見は、RNF213変異によって、何らかの要因で肺・脳という異なる臓器の微小血管にphenotypeを生じる難治性血管病が、RNF213関連血管病とも言うべき、新規血管病概念として統合整理されることを示唆する。

このRNF213症候群は、発症原因となるRNF213遺伝子上での”Hot-Spot”部位が決まっている[c.14429G>A (p.Arg4810Lys, rs112735431)]。欧米人ではこのHot-Spot部位の報告は皆無であり、そのために欧米からの文献報告はされておらず、研究も行われていない。しかしながら、一般日本人集団では約0.8%（全国推定100万人程度）が保有している（東北メディカル・メガバンク機構より公開されている日本人3554名のゲノムデータベースより）。よって、その発症病態解明と発症予防法・治療法の開発は日本人にとって急務である。これまで臓器別に分類・治療されていた複数の難病指定血管病のうち、日本人に特有のRNF213変異に基づく症候群の病態を統合整理し、より大規模な患者群の臨床データを客観的に捉え直し、発症に至る共通の分子機構を詳細に解明することで、診断法・治療法の開発が飛躍的に進むことが期待される。

我々は、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術によるRNF213 p.Arg4810Lys変異マウスを作成し、低酸素飼育刺激によって、RNF213 p.Arg4810Lys +/-マウスではWTマウスと比較して、右室収縮期圧・右室肥大を認めることを明らかにした。さらに、これらのマウスの肺組織から抽出したRNAを用いた発現解析によって、RNF213シグナル経路で重要ないくつかの細胞周期調整・細胞増殖を制御する因子を同定することに成功した。日本人に特有のRNF213変異に基づく血管病の病態全容と、治療薬の開発に向けて、今後も研究に邁進していく。

5. 研究発表（2019年度の研究成果）

〔雑誌論文〕

- 1) Isobe, S., Kataoka, M., Endo, J., Moriyama, H., Okazaki, S., Tsuchihashi, K., Katsumata, Y., Yamamoto, T., Shirakawa, K., Yoshida, N., Shimoda, M., Chiba, T., Masuko, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Saya, H., Fukuda, K., Sano, M. Endothelial-Mesenchymal

- Transition Drives Expression of CD44 Variant and xCT in Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*: 61, 2019, 367-379. doi: 10.1165/rcmb.2018-0231OC
- 2) Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Yamada Y, Moriyama H, Kitakata H, Endo J, Yuasa S, Arai Y, Hirose N, Satoh T, Hakamata Y, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K. Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*: 39, 2020, 103-112. doi: 10.1016/j.healun.2019.08.022
- 〔学会発表〕
- 1) 片岡雅晴．パネルディスカッション2: 肺高血圧症の生涯医療－小児から成人へ－成人期の特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症 - 保因者家族を含めて．第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会，2019年6月22日，アクトシティー浜松コンgresセンター．
- 2) 片岡雅晴．パネルディスカッション4: PAHにおける Precision medicine－PAH最適化治療の実現へ－PAHの診断治療における遺伝子診断の意義．第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会，2019年6月22日，アクトシティー浜松コンgresセンター．