

2020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

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は女性に偏り発症する難治性循環器疾患であり、低浸透率だが原因遺伝子としてBMP2が発見され10年以上が経過した。PAH国際コンソーシアムは2000症例以上、我々も300症例以上の臨床と遺伝子変異の情報を蓄積してきた。PAHにおいてはBMP2を介する系が発症に関わる主要な原因と想定されている。しかし、BMP2変異が発症・表現型に繋がる過程、性差や妊娠等の生理的因子が発症に深く関与する機構は未解明のまま、自然発症疾患モデルも確立されていない。我々は次世代シーケンサによる全エクソーム解析を250症例に実施し超長寿者と患者集団の比較という独自の戦略を用い、血管疾患に共通する可能性の高い感受性遺伝子RNF213のHot Spot変異をPAH患者に高頻度に見出した（Suzuki, Kataoka, et al. *Circ Genom Precis Med.* 2018）。また、新しいPAH原因遺伝子としてSox17を報告した（Hiraide, Kataoka, et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018）。そこで、BMP2遺伝子、RNF213遺伝子、Sox17遺伝子のそれぞれのHot Spot変異を保有するマウスを作製し、発症疾患モデルの確立と発症メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の計画・方法

BMP2遺伝子、RNF213遺伝子、Sox17遺伝子のそれぞれのHot Spot変異をCRISPR-Cas9システムを用いてノックインしたマウスを作製した。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した。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した。

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した。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実施した。

4. 研究の成果

BMP2 R899X変異マウスは、低酸素刺激によってWTマウスと比較して著明に肺高血圧症が増悪し、予後が悪化することを確認した。肺組織を用いたsingle cell RNA-seq解析によって、BMP2 R899X変異マウスにおける肺高血圧症発症に重要な遺伝子発現変化を解析中である。

また、RNF213遺伝子 p.Arg4810Lys変異マウスにおいては、低酸素飼育刺激によってWTマウスと比較して、右室収縮期圧の上昇・右室肥大を認めることを確認した。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。それら重要な因子の阻害薬等を用いた研究によって創薬の可能性についても検証中である。

さらに、SOX17変異マウスにおいては、低酸素刺激がなくとも通常飼育下で左室・右室ともにWTマウスに比べて有意な心拡大を認めることを確認した。心拡大をもたらすメカニズムについての詳細な解析を実施中である。

5. 研究発表（2020年度の研究成果）

〔雑誌論文〕

- Shinya Y, Hiraide T, Momoi M, Goto S, Suzuki H, Katsumata Y, Kurebayashi Y, Endo J, Sano M, Fukuda K, Kosaki K, Kataoka M. TNFRSF13B c.226G>A (p.Gly76Ser) as a Novel Causative Mutation for Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Heart Assoc.* 10. 2021. e019245. doi: 10.1161/JAHA.120.019245.

〔学会発表〕

- 片岡雅晴. 肺動脈性肺高血圧症における日本人患者での併用療法の実態と今後求められる治療戦略. 第84回日本循環器学会学術集会・ランチョンセミナー. 2020年7月31日. Web講演.
- 片岡雅晴. 肺高血圧症の遺伝的素因. 第60回日本呼吸器学会学術講演会・シンポジウム. 2020年9月21日. Web講演.