

2021 年度大学間連携等による 共同研究経費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

獣医学部獣医保健看護学科 教授 袴田陽二

慶應義塾大学研究代表者

慶應義塾大学医学部内科学 (循環器) 助教 平出貴裕

2. 研究の目的

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は 20-40 歳代女性に好発する難治性循環器疾患であり、根治療法に乏しい予後不良の疾患である。これまで、我々の研究グループは未発症家族員を含めて 300 症例以上の臨床データと遺伝子変化の情報を蓄積してきた。PAH の発症原因遺伝子として BMPR2 が 2000 年に同定され、BMP シグナルが PAH 発症に関わる主要な原因と想定されている。しかし、BMPR2 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で、自然発症疾患モデルも確立されていない。また我々は次世代シーケンサによる全エキソーム解析を 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、BMPR2 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

BMPR2 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

BMPR2 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、BMPR2 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 R4828K 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。阻害薬を加えた実験では PAH が軽度になることを確認し、根治療法に向けた治療ターゲットとなる可能性が示唆された。今後は投与経路の検討等を含め、新規創薬の可能性について検証中である。

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

[雑誌論文]

- 1) Hiraide T, Teratani T, Uemura S, Yoshimatsu Y, Naganuma M, Shinya Y, Momoi M, Kobayashi E, Hakamata Y, Fukuda K, Kanai T, Kataoka M. Pulmonary arterial hypertension caused by AhR signal activation protecting against colitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 203. 2021. 385-388. doi: 10.1164/rccm.202009-3385LE.
- 2) Hiraide T, Suzuki H, Shinya Y, Momoi M, Inami T, Katsumata Y, Fukuda K, Kosaki K, Kataoka M. *TET2* variants in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *CJC open.* 4. 2021. 416-419. doi: 10.1016/j.cjco.2021.11.008.

[学会発表]

- 1) 平出貴裕, 片岡雅晴. 右室肺循環における個別化医療の最前線. 第 69 回心臓病学会 シンポジウム. 2021 年 9 月 18 日. web.
- 2) 平出貴裕. 新規疾患概念: RNF213 関連血管病の提唱と個別化医療実現への課題. 第 6 回肺高血圧・肺循環学会 学術集会. 2021 年 5 月 7 日. web.