

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08467

研究課題名（和文）スプライシング制御因子Rbm20変異による心臓病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Cardiac Pathology Caused by Mutations in the Splicing Regulator Rbm20

研究代表者

井原 健介（Ihara, Kensuke）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：50770210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、変異型RBM20に対するRNA免疫沈降実験・タンパク共免疫沈降実験を行ったところ、変異型RBM20は細胞質においてRNAと結合し、RNA分解に関わるタンパク質と相互作用を示すことを見出した。またスプライシング機能は保持されたまま変異型RBM20を心房特異的に発現するマウスを作成したところ、変異型RBM20はスプライシング機能異常を介さずに病原性を示すことを見出した。RBM20変異による拡張型心筋症は、従来考えられてきたスプライシング制御異常とは異なる機序で、細胞質に存在する変異型RBM20が病態形成に寄与し、特にRNA代謝の異常を来している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により変異型RBM20の不整脈原性への寄与が明らかとなり、また、変異型RBM20は細胞質においてP-bodyと相互作用を来しRNA代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された。変異型RBM20はRBM20変異による心臓病において、新たな治療標的となりうることが示された。

また、近年RBM20遺伝子は一般人口においても心房細動発症に関与する遺伝子として報告されてきており、本研究結果は拡張型心筋症病態解明にとどまらず、脳梗塞の主要な原因となり社会的損失が大きく、やはり新たな治療法開発が望まれている心房細動に関しても全く新たな病態解明・治療法開発に波及効果をもたらす可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, RNA immunoprecipitation and co-immunoprecipitation experiments were conducted on the mutant RBM20, revealing that the mutant RBM20 binds to RNA in the cytoplasm and interacts with proteins involved in RNA degradation. Additionally, when a mouse model specifically expressing the mutant RBM20 in the atria was created, it was found that the mutant RBM20 exhibited pathogenicity without affecting splicing functionality. This suggests that dilated cardiomyopathy caused by RBM20 mutations may contribute to the disease pathology through mechanisms different from the previously thought splicing regulation abnormalities, particularly implicating abnormalities in RNA metabolism due to the presence of mutant RBM20 in the cytoplasm.

研究分野：循環器内科学

キーワード：RBM20 選択的スプライシング 拡張型心筋症 心房細動 RNA代謝

## 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(DCM)は心内腔の拡大、心収縮能低下さらに致死性心室性不整脈を呈する疾患群であり、心不全の重要な基礎心疾患の一つであるが病態メカニズムの解明が進んでおらず、近年の医療技術の進歩による最新の薬物治療や心臓再同期療法・補助人工心肺などが開発・応用されるもいまだ根本的治療は心移植しかない難病である。本邦では約 **28000** 人が指定難病(特発性拡張型心筋症)として登録されており、心移植に至る重症心不全原因疾患として最多で、その病態解明・新たな治療法開発が望まれている。

近年進んでいる DCM 患者の遺伝子解析により様々な原因遺伝子が同定されつつあり、心筋サルコメア構成タンパク質をコードするタイチン(TTN)遺伝子は最も頻度の高い DCM 原因遺伝子である。TTN 遺伝子のスプライシング制御因子である RBM20 も DCM の原因遺伝子として知られ、RBM20 遺伝子変異は TTN のスプライシング異常を来し TTN の機能異常を介して DCM 表現型を呈すると考えられてきたが、RBM20 変異による DCM は TTN 変異による DCM と比較して、**1)**心移植に至る年齢が若い(Clin Res Cardiol.2017;106:127)、**2)**心室性不整脈による突然死が多い(Circulation. 2018;138:1330)、**3)**心房細動(AF)の合併率が多い(Heart Rhythm. 2012;9:390)、等、より重篤な臨床病態を示すと報告されている。しかし、RBM20 変異がなぜこのような重症 DCM を生ずるのか、そのメカニズムは解明されていない。

一方、RBM20 変異における DCM 症例ではその RSRSP 配列に変異が集中していることが知られている(Front Mol Biosci. 2018;28:105)。本研究の研究協力者である黒柳らは、DCM 家系で見出された RSRSP 配列のミスセンス変異を模した Rbm20<sup>S637A</sup> ノックインマウスを作製し、RSRSP 配列が RBM20 の核移行に重要であり、その変異により RBM20 が核内に移行出来なくなるため Ttn 等の標的遺伝子のスプライシング異常を生じることを報告した(Sci Rep. 2018;8:8970)が、その生理的意義・DCM 表現型との関連は不明であった。

この研究に引き続き、申請者はこの Rbm20<sup>S637A</sup> マウスの表現型解析を行い、軽度な心機能低下のみを示す Rbm20 KO マウスと異なり Rbm20<sup>S637A</sup> マウスでは左心室内腔の拡大とより重篤な心臓収縮機能の低下、心室性不整脈・AF といった RBM20 変異の DCM 症例に類似した重症 DCM の表現型が見られることを見出した(Sci Rep. 2020;10:17894)。そこで「RBM20 の RSRSP 配列変異がなぜ重症 DCM を生ずるのか」という学術的問いが自ずと生じてくる。

## 2. 研究の目的

本研究では「変異型 RBM20 の細胞質における未知の機能(非スプライシング作用)が DCM 重症化に関与する」という作業仮説を立て、本研究では細胞質で RBM20<sup>S637A</sup> と作用し DCM 重症化に関与する Key molecule を探索しその病態メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では先述した作業仮説のもと、細胞質で変異型 RBM20 と作用し心臓病態発現に関与する Key molecule を同定しその DCM 重症化のメカニズムを検討するために以下の3つの実験を行った。

免疫細胞染色による変異型 **RBM20** の細胞内局在の評価

**Rbm20** 遺伝子改変マウスの摘出心から心筋細胞単離を行い、単离心筋細胞を抗 **RBM20** 抗体および抗 **DDX6** 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。培養心筋細胞(**HL-1** 細胞)に変異型 **RBM20** を、アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、**Hexandiol** を投与し抗 **RBM20** 抗体で免疫細胞染色を行った。

抗 **RBM20** 抗体を用いた共免疫沈降と **RNA** 免疫沈降

**FLAG** 配列を付与した変異型 **RBM20** を遺伝子導入した培養心筋細胞(**HL-1** 細胞)を用

いて、抗 **FLAG** 抗体により共免疫沈降および **RNA** 免疫沈降を行った。取得したタンパク質は **LC-MS/MS** によるプロテオーム解析を行った。

心房特異的変異型 **RBM20** 発現マウスを用いた心表現型解析

**Rosa26** 遺伝子座に **CAG** プロモーター下に **loxP-STOP-loxP** 配列とその下流に **Rbm20<sup>S637A</sup>** を挿入したマウス(**LSL-Rbm20** マウス)を作成した。心房特異的に **Cre** を発現する **Shn-Cre** マウスと交配させ、心房特異的変異型 **RBM20** 発現マウス(**Shn-Cre, LSL-Rbm20** マウス)を作成し、その心表現型を心臓超音波検査・心電図・心臓電気生理学的検査を用いて解析した。

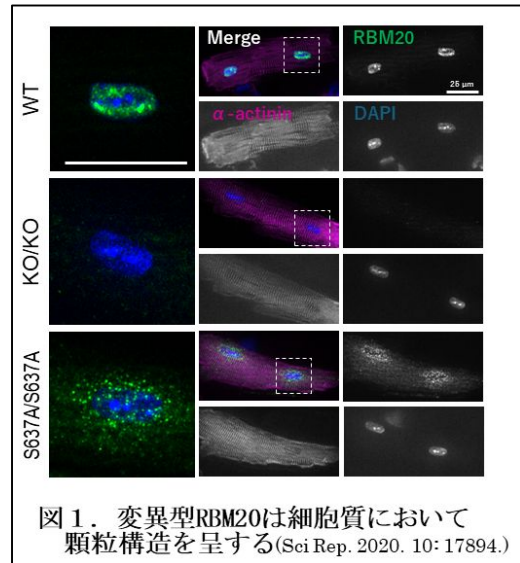


図1. 変異型RBM20は細胞質において顆粒構造を呈する(Sci Rep. 2020. 10: 17894.)

#### 4. 研究成果

まず変異型 **RBM20** の細胞内局在を確認するために **Rbm20<sup>S637A</sup>** マウスの単离心筋細胞を用いて免疫細胞染色を行ったところ、変異型 **RBM20** は確かに核移行できず細胞質で顆粒状構造を呈することが示された(図1)。

**RBM20** がそもそも **RNA** 結合タンパク質であり、**RNA** 結合タンパク質は **RNA** と結合して液-液相分離による **RNA** 顆粒を呈することが知られていることから、この変異型 **RBM20** による顆粒も同様の性質を持つ可能性を考慮

し、液-液相分離解除薬である **Hexandiol** を用いて、変異型 **RBM20** 顆粒の変化を観察した。**HL-1** 細胞に変異型 **RBM20** を遺伝子導入し、**Hexandiol** を投与したところ変異型 **RBM20** 顆粒は解除され液-液相分離により形成されていることが示唆された(図2)。

次に、実際にこの変異型 **RBM20** が細胞質において **RNA** と結合しているかを確認するため、**RNA** 免疫沈降を行ったとこ

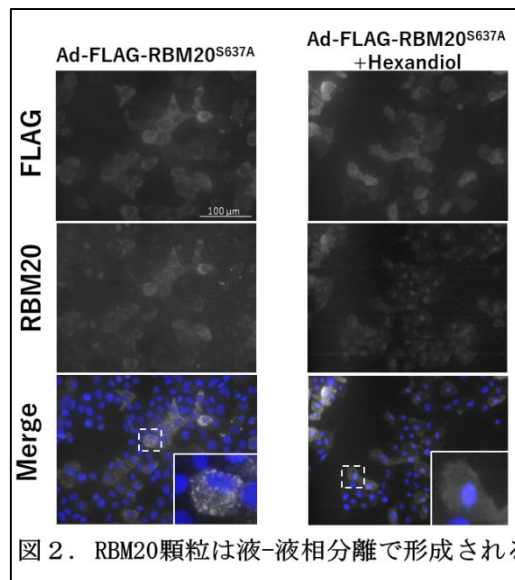


図2. RBM20顆粒は液-液相分離で形成される

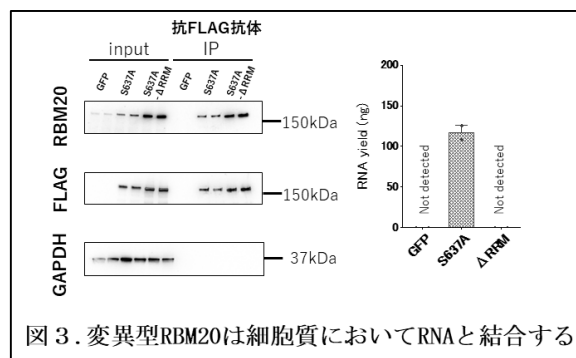


図3. 変異型RBM20は細胞質においてRNAと結合する

る、確かに変異型 **RBM20** は細胞質において **RNA** と結合しており、変異型 **RBM20** の **RNA** 結合ドメイン (**RRM**) を欠失させると **RNA** との結合能が消失することも明らかとなった (図3)。同様に変異型 **RBM20** に対して共免疫沈降を行い、得られたタンパク質に関して網羅的解析を行うと、**mRNA**

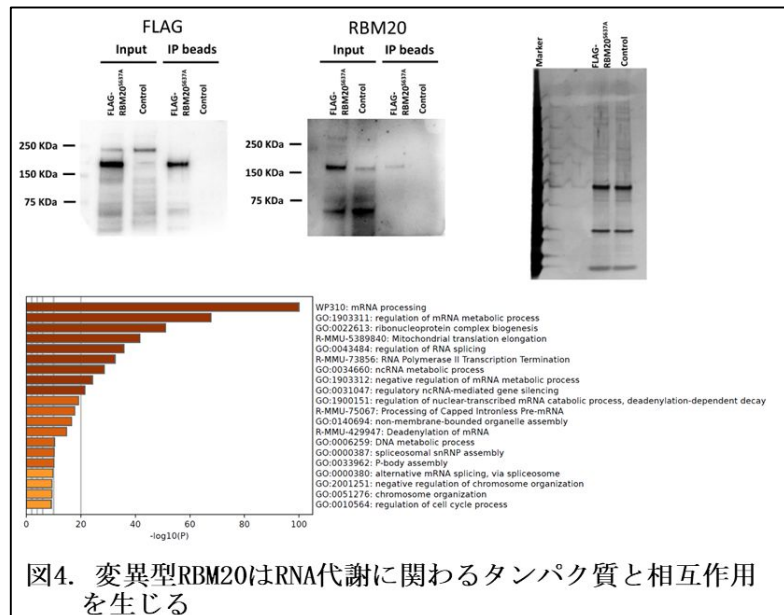


図4. 変異型RBM20はRNA代謝に関わるタンパク質と相互作用を生じる

**mRNA processing, regulatory ncRNA-mediated gene silencing, Processing of Capped Intronless Pre-mRNA, non-membrane-bounded organelle assembly, Deadenylation of mRNA, P-body assembly** などの term が上位に挙がってきた (図4)。P-body は液-液相分離により形成される生理的な非膜細胞小器官と呼ばれ、脱アデニル化や脱キャップ反応、miRNA による遺伝子抑制反応の場であり RNA 代謝を司るとされており、本結果は変異型 **RBM20** が P-body の構成分子と相互作用を生じていることが強く示唆される結果であった。実際に変異型 **RBM20** が P-body と相互作用を生じているか、単離心筋細胞を用いて免疫染色で確認すると確かに変異型 **RBM20** と P-body が共局在していることが明らかとなった (図5)。これらの結果から、変異型 **RBM20** は細胞質において標的 **RNA** と結合し P-body と相互作用することで心筋細胞の **RNA** 代謝を変容させている可能性が考えられた。

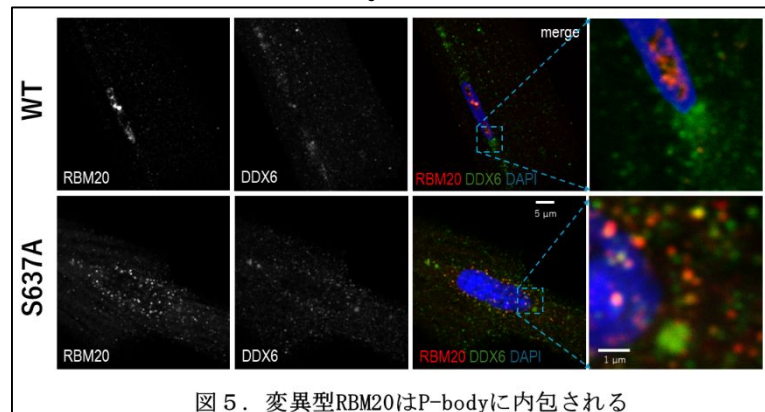


図5. 変異型RBM20はP-bodyに内包される

ここまで述べてきたように **RBM20** 変異は細胞質において変異型 **RBM20** による機能獲得を生じて病態形成に寄与していると考えられるが、**RBM20** 変異は核内においてスプライシング制御能の喪失も同時に引き起こすため、変異型 **RBM20** およびその顆粒が実際に病態形成に寄与しているのか、どの程度寄与しているのかが不明のままである。特に **RBM20** 変異による拡張型心筋症の最大の特徴の一つは高率な心房細動発症であるが、心房筋細胞においては変異型 **RBM20** の機能獲得、核内での **RBM20** 機能喪失だけでなく心室における重篤な心不全の影響も受けており、その病態機序は複雑である。そこで、内因性の **RBM20** が保持されスプライシング制御異常を呈さない心房特異的変異型 **RBM20** 発現マウスを作成し、その心表現型を評価した

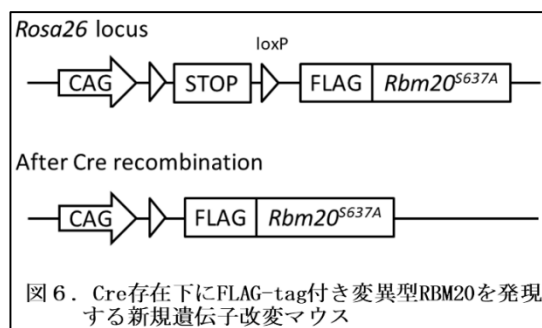


図6. Cre存在下にFLAG-tag付き変異型RBM20を発現する新規遺伝子改変マウス

(図6) 同マウスは、心室機能は正常で心不全を呈さず、変異型 **RBM20** の発現は見られなかった。同マウスにおいて心臓電気生理学的検査を行

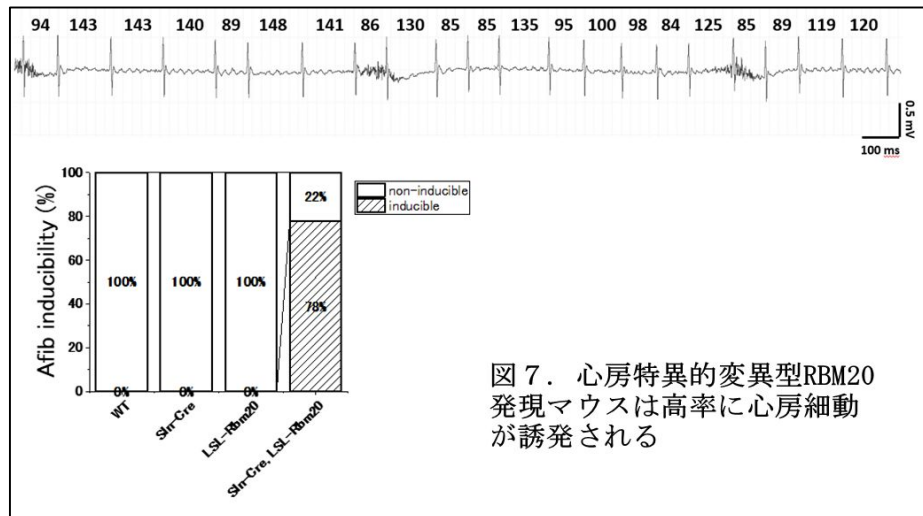


図7. 心房特異的変異型RBM20発現マウスは高率に心房細動が誘発される

うと、コントロール群では心房細動は誘発されなかったが、同マウスでは高率に心房細動が誘発されることが示された(図7)。すなわち変異型 **RBM20** の存在は、スプライシング制御異常や心不全を伴わずに単独で心房不整脈原性を生じることが明らかとなった。しかし、*Rbm20*<sup>637A</sup> マウスでは心房細動は全例において心房細動を自然発症するという極めて強い心房不整脈原性を生じていることを考慮すると([Sci Rep. 2020;10:17894](#))、**RBM20** 変異における高率な心房細動発症は、変異型 **RBM20** による機能獲得のみならず、スプライシング制御異常と心不全の併存も重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Sasano T, Ihara K, Tanaka T, Furukawa T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Risk stratification of atrial fibrillation and stroke using single nucleotide polymorphism and circulating biomarkers.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS ONE.	6. 最初と最後の頁 e0292118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0292118.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ebana Y, Liu L, Ihara K, Abe K, Terao C, Kamatani Y, Sasano T, Furukawa T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Genetic risk score of cerebral infarction in atrial fibrillation genome-wide association study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 e14084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/eci.14084.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwamiya S, Ihara K, Furukawa T, Sasano T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Sacubitril/Valsartan attenuates atrial conduction disturbance and electrophysiological heterogeneity with ameliorating fibrosis in mice.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Front Cardiovasc Med.	6. 最初と最後の頁 1341601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2024.1341601.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihara K and Sasano T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Extracellular Vesicles for the Treatment of Atrial Fibrillation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC Clin Electrophysiol.	6. 最初と最後の頁 159-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacep.2023.01.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto T, Sano R, Miura A, Imasaka M, Naito Y, Nishiguchi M, Ihara K, Otani N, Kominato Y, Ohmuraya M, Karangi H, Nishio H.	4. 巻 100
2. 論文標題 I536T variant of RBM20 affects splicing of cardiac structural proteins that are causative for developing dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Mol. Med.	6. 最初と最後の頁 1741-1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00109-022-02262-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawajiri K, Ihara K, Sasano T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Gene therapy to terminate tachyarrhythmias.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Expert Rev Cardiovasc Ther.	6. 最初と最後の頁 431-442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14779072.2022.2085686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaburagi H, Nagata T, Enomoto M, Hirai T, Ohyagi M, Ihara K, Yoshida-Tanaka K, Ebihara S, Asada K, Yokoyama H, Okawa A, Yokota T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Systemic DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide administration for regulating the gene expression of dorsal root ganglion and sciatic nerve.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Nucleic. Acids.	6. 最初と最後の頁 910-919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2022.05.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamada S, Sasaki K, Kito H, Tooyama Y, Ihara K, Aoyagi E, Ichimura N, Tohda S, Sasano T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Effect of the recording condition on the quality of a single-lead electrocardiogram.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart Vessel.	6. 最初と最後の頁 1010-1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-021-01991-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atrial Fibrillation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 862164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.862164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo, Hiraoka Yuichi, Togo-Ohno Marina, Soejima Yurie, Sawabe Motoji, Tsuchiya Megumi, Ogawa Hidesato, Furukawa Tetsushi, Kuroyanagi Hidehito	4. 巻 10
2. 論文標題 A missense mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74800-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ihara K, Iwamiya S, Hiraoka Y, Kuroyanagi H, Furukawa T, Sasano T.
2. 発表標題 Cytoplasmic RBM20 Granules Cause Atrial Arrhythmogenicity in Mice.
3. 学会等名 The 88th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Iwamiya S, Ihara K, Furukawa T, Sasano T.
2. 発表標題 The Electrophysiological Properties against Atrial Arrhythmogenicity in Murine Heart Failure Treated with Sacubitril/Valsartan.
3. 学会等名 The 88th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4. 発表年 2024年



1. 発表者名 井原健介.
2. 発表標題 RBM20変異と心房性不整脈.
3. 学会等名 日本心血管作動物質学会若手研究者交流シンポジウム.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川紗佳、鈴木杏奈、岩寄利奈、井原健介、古川哲史、笹野哲郎.
2. 発表標題 心房細動時に心房筋が心外膜脂肪組織に与える影響の解明.
3. 学会等名 第266回日本循環器学会関東甲信越地方会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井原健介.
2. 発表標題 異常RNA顆粒による心筋症・不整脈発症機序の検討.
3. 学会等名 第22回関東心・血管フォーラム.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sun Y, Kawajiri K, Iwamiya S, Abe K, Ihara K, Sasano T, Furukawa T.
2. 発表標題 Involvement of Potential microRNAs in Signaling Pathway Networks in Murine Angiotensin II-Mediated Atrial Fibrillation Model.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawajiri K, Nyo ZLM, Ihara K, Furukawa T, Sasano T.
2. 発表標題 The Exosomal miRNA Secreted by Paced Cardiomyocytes Regulates Adipocyte Differentiation.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishikawa S, Suzuki A, Iwasaki R, Ihara K, Furukawa T, Sasano T.
2. 発表標題 Epicardial Adipose Tissue Remodeling Evoked by Extracellular Vesicles Released from Atrial Myocytes.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川尻紘平、ニヨ ジン レイ モン、井原健介、古川哲史、笹野哲郎.
2. 発表標題 ペーシング刺激を受けた心筋細胞から分泌されたexosome含有miRNAの、脂肪細胞分化に対する影響.
3. 学会等名 心電学関連春季大会2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川紗佳、鈴木杏奈、岩寺利奈、井原健介、古川哲史、笹野哲郎.
2. 発表標題 心房筋細胞から放出された細胞外小胞による心外膜脂肪の炎症誘導機転.
3. 学会等名 心電学関連春季大会2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ihara K, Kuroyanagi H, Hiraoka Y, Sasano T, Furukawa T.
2. 発表標題 Atrial Fibrillation in Cardiomyopathy Mice with Rbm20 Mutation.
3. 学会等名 The 86th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iwamiya S, Ihara K, Furukawa T, Sasano T.
2. 発表標題 The effects of Sacubitril/Valsartan on murine atria with pressure overload.
3. 学会等名 The 86th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井原健介、黒柳秀人、平岡優一、笹野哲郎、古川哲史.
2. 発表標題 不整脈原性拡張型心筋症の新規発症機序.
3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩宮賢、井原健介、古川哲史、笹野哲郎.
2. 発表標題 心不全モデルマウスにおけるSacubitril/Valsartanの心房への電気生理学的効果.
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井原健介、黒柳秀人、平岡優一、笹野哲郎、古川哲史.
2. 発表標題 スプライシング制御因子RBM20変異を持つ心房細動モデルマウスの確立.
3. 学会等名 心電学関連研究会2020.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ihara K, Kuroyanagi H, Hiraoka Y, Sasano T, Furukawa T.
2. 発表標題 A mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes atrial fibrillation in mice.
3. 学会等名 The 4th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ihara K, Kuroyanagi H, Hiraoka Y, Sasano T, Furukawa T.
2. 発表標題 Cytoplasmic Expansion of RNA-Binding Motif Protein 20 (RBM20) is Critical for Development of Atrial Fibrillation in Mice.
3. 学会等名 The 84th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------