

令和 4 年 4 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17161

研究課題名(和文)原因/感受性遺伝子Hot-Spot変異導入モデルを用いた肺高血圧症の分子病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular pathology of pulmonary arterial hypertension using murine model with hot-spot mutation of related genes

研究代表者

百瀬 裕一 (Yuichi, Momose)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60795798

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)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は難治性循環器疾患であり、原因遺伝子としてBMPR2が報告されている。しかし、BMPR2変異が発症に繋がる機構は未解明のままである。また、我々は、血管疾患に共通する感受性遺伝子RNF213のHot-Spot変異をPAH患者に高頻度に見出した。よって、発症機序解明のため、BMPR2とRNF213のHot-Spot変異マウスをCRISPR/Cas9システムを用いて作製した。BMPR2変異マウスを用いたシングルセル解析等によって発症機序の解明に繋がる成果を得た。また、血管病発症に至るRNF213の下流シグナル経路の解明に繋がる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、BMPR2やRNF213といった遺伝子全体のノックアウトマウスを用いた研究ではなく、実際のPAH患者で認めるHot-Spot変異部位を再現したマウスを用いた研究である。実際の患者の遺伝子状態を模倣したマウスを用いることによって、より実臨床に近い発症病態を正確に解明することができ、学術的意義が高いと考える。また、このような実臨床に近い発症病態解明によって新しい治療標的分子発掘に繋がる成果を得ており、難病患者の予後改善と難病医療界への貢献において、社会的意義も高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a cardiovascular intractable disease, and BMPR2 has been reported as the causative gene of PAH. However, the mechanism by which the BMPR2 mutation leads to the onset of PAH remains unclear. We also found a hot-spot mutation of RNF213, which is a common susceptibility gene for other intractable vasculopathies, in PAH patients. Therefore, in order to elucidate the pathological mechanism, mice with Hot-Spot mutations of BMPR2 and RNF213 genes were generated using the CRISPR/Cas9 system. We obtained results that led to the elucidation of the pathological mechanism by single-cell analysis using mice with BMPR2 Hot-Spot mutation. In addition, we obtained results that led to the elucidation of the downstream signal pathway of RNF213 leading to the onset of vasculopathies.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 遺伝子変異 遺伝子改変マウス

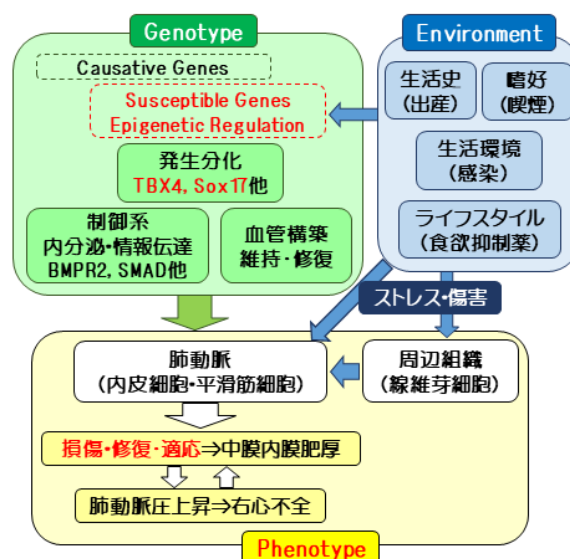
1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は肺血管中内膜の著しい肥厚を特徴とする難治性の循環器疾患で、女性患者は男性の2倍以上、発症は思春期以降、特に妊娠後から閉経期までが多い。指定難病であり登録患者数は約4,000人の希少疾患である。遺伝性を示すPAH症例の解析により、BMPR2遺伝子の変異が見出され遺伝的背景を持つ一群(heritable PAH)の疾患概念が確立された。しかし、遺伝子変異がどのようにPAH発症に関わるかは明らかでない。

Heritable PAHの過半を占めるBMPR2遺伝子の変異について多くの情報が蓄積され、遺伝子の変異の多くは機能ドメインの主要部位にある事、その多くが他の報告と重複しないユニークな変異である事、多くがナンセンスやフレームシフト、エキソン欠失等の機能喪失変異である事が明らかにされている。我々も日本での症例を用いエキソン欠失を含め新生突然変異が少なくとも20%以上存在する事、また機能ドメイン以外で作用機序不明だが世界中で繰返し見出されるHot-Spot変異が存在する事(Kataoka et al. Genet Med. 2013; Aimi et al. J Hum Genet. 2013; Momose et al. Ann Hum Genet. 2015)、家族の解析から全体での浸透率は低いがHot-Spot変異は異なると推定される事(Gamou et al. Clin Genet. 2018)等を報告し、英国に本拠を置くPAH国際コンソーシアムからも注目されている。

我々と国際コンソーシアムとの報告を含めた集計ではPAHの約30-40%にBMPR2遺伝子、10%弱にBMPR2の上下流の情報伝達因子、心奇形関連遺伝子等の変異が見出される。今後の全ゲノム解析によりPAHの大半に原因遺伝子や関連基礎疾患が特定されると期待される。一方、ヒトの多くの症例に対応するBMPR2遺伝子欠損のモデルマウスでは、ホモ(-/-)は胎生致死であり、欠損ヘテロは正常に出産成長する。しかし、野生型マウス、欠損ヘテロマウスは共に2ヶ月の長期低酸素刺激により軽症の肺高血圧を発症するのみであり、欠損変異の影響は観察出来ない。すなわち、自然発症モデルの確立には至っていない。

これらは原因遺伝子BMPR2の多様な機能喪失変異による慢性的な情報伝達の不足もしくは変質が発症の本質である事、生活習慣や環境による生理的因子が発症を促進する事、を強く示唆している(右図)。一方、我々は日本人健常者の1%弱に見出される多型変異だが脳血管疾患のモヤモヤ病患者の80-90%に見出される「感受性遺伝子RNF213遺伝子のHot-Spot変異R4910K」がPAH患者でも7-8%の頻度で認める事、加えてRNF213遺伝子の病原性が予測される変異8種を含め15種の変異が見出される事、これらの変異を持つ一群は重症である事を見出した(Suzuki et al. Circ Genom Precis Med. 2018; Hiraide et al. J Heart Lung Transplant. 2019)。この発見はPAH発症には原因遺伝子BMPR2の変異と生理的因子に加えて、血管疾患共通の感受性遺伝子が関与する可能性、を示唆している。



2. 研究の目的

本研究ではBMPR2系の機能不全とHeritable PAHの表現型間の分子機構を探索する事を目的に、Heritable PAHで報告されている極めて特異なBMPR2遺伝子のHot-Spot変異に着目する。BMPR2遺伝子変異の過半が機能ドメイン中のユニーク変異である中で、この特定の変異部位は例外的に世界各地で反復して見出されるHot-Spot変異で浸透率も高い。

我々は原因遺伝子の変異と表現型発症の間には感受性遺伝子と(または/さらに)生理的因子が介在する事を検証するため、CRIPR/CAS9遺伝子編集技術を用いてPAHの原因遺伝子Hot-Spot

変異及び血管疾患に共通の感受性遺伝子 Hot-Spot 変異(RNF213-R4910K)を持つモデルマウスの作製を行うこととした。

これらの遺伝子改変マウスを用いて、遺伝的因子・生理的因子・環境因子がどのように相互作用し表現型に至るのか等の PAH 発症病態の疑問を解決することを目的とした。

3．研究の方法

CRIPR/CAS9 遺伝子編集技術を用いて PAH の原因遺伝子 BMPR2 の Hot-spot 変異及び血管疾患に共通の感受性遺伝子 Hot-Spot 変異(RNF213-R4910K)を持つモデルマウスの作製を行った。環境因子としての低酸素刺激による影響を検証するため、低酸素チャンバーを用いた飼育実験を実施した。また、カテーテル検査による血行動態評価、シングルセル解析による細胞レベルでの発現解析、病理学的評価等を駆使して研究を実施した。

4．研究成果

BMPR2 変異マウスは低酸素刺激飼育下では WT マウスと比較して明らかに PAH が重症化することを確認した。これは、低酸素刺激という環境因子が遺伝的因子を修飾し発症を促進することを示唆する。さらに、BMPR2 変異マウスを用いたシングルセル解析によって、肺組織中のだの細胞にどのような遺伝子発現量の変化が生じて PAH 発症に至るのか、その発症機序の解明に繋がる成果を得ている。また、RNF213 変異マウスを用いた検証によって、血管病発症に至る RNF213 の下流シグナル経路の解明に繋がる成果を得ている。現在は、これらの知見を整理し、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	佐藤 徹 (Sato Toru)		
研究協力者	片岡 雅晴 (Kataoka Masaharu)		

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