

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16065

研究課題名（和文）日本人特有のゲノム変異に基づく難治性血管病の病態解明と新規創薬ターゲットの検索

研究課題名（英文）Identification of novel therapeutic target for genetic variant-associated vascular disease

研究代表者

平出 貴裕（Hiraide, Takahiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：20897673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は若年女性に好発する希少疾患で、未治療の際の平均余命は診断から約2.8年と予後不良な疾患である。肺血管拡張薬の開発で予後は改善してきているが、いまだに根治療法はない。RNF213遺伝子のR4810Kバリエーションは、東アジア人特有のPAH発症関連遺伝子変化であるが、バリエーションを有する患者は肺血管拡張薬への反応性に乏しく、新規治療法の開発が期待されている。我々はマウスにバリエーションを導入し、低酸素刺激を加えることでPAHモデルを作製した。肺の組織では炎症性ケモカインが上昇しており、阻害薬を投与することで軽快した。炎症性ケモカインが新たな治療ターゲットになることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日本人特有の遺伝子変化に起因する肺動脈性肺高血圧症の発症メカニズムを解明した。従来の肺血管拡張薬への反応性が乏しかった患者群にとっては非常に有意義な研究成果であり、また根治療法開発に向けた将来性もある。肺動脈性肺高血圧症は指定難病であり、高額な肺血管拡張薬を生涯にわたり使用する必要がある。根治療法を開発することで、医療資源の消費を抑える点で社会的に有用である。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a poor prognostic disease. Despite the recent advance of pulmonary vasodilators, the cure treatment has not been invented. Ring finger protein 213 (RNF213) R4810K variant is a susceptible gene variant in development of PAH in East-Asia population, and we reported this variant as the independent poor prognostic factor in Japanese patients with PAH. We created the mice with this variant using CRISPR-Cas9 system, and we identified that this variant carrier mice developed significant PAH in hypoxic environment. Microarray analysis demonstrated the elevation of inflammatory chemokines in lung of mice with this variant, and the addition of antagonist ameliorated the severity of PAH. Targeting the chemokine signaling may be a novel therapeutic strategy in patients with RNF213 variant carriers.

研究分野：肺高血圧症、脈管学、遺伝学

キーワード：難治性血管病 肺動脈性肺高血圧症 遺伝学 RNF213 病態解明研究 CRISPR-Cas9

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は若年女性に好発する、生命予後不良の指定難病である。申請者の研究チームは、もやもや病の発症感受性遺伝子変化である ring finger protein 213 (*RNF213*) の R4810K バリエントが、健康人集団と比較して日本人 PAH 患者に多く認め、現在使用可能な肺血管拡張薬を複数用いても治療抵抗性を認める患者が多く、PAH の根本的治療法の開発が望まれる患者群であることを報告した。

RNF213 R4810K バリエントは PAH や末梢性肺動脈狭窄症、もやもや病など、全身の様々な血管病変の発症と関連しており、「*RNF213* 関連血管病」という新規疾患概念を提唱した。*RNF213* R4810K 変異は PAH の他にも、もやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病においても発症関連遺伝子変異として報告されている (右図)。有力な新規発症原因候補遺伝子の機能解析を行い新規治療ターゲットの検索をすることで、複数の難治性血管病における根本的な治療法の開発及び創薬が期待できる。

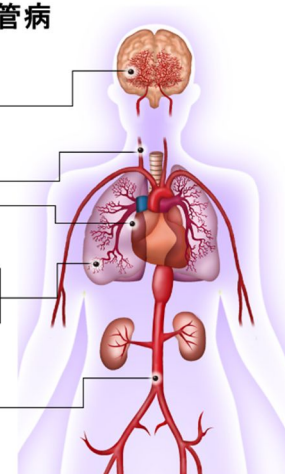
RNF213 関連血管病

<脳血管疾患>
もやもや病
脳主幹動脈狭窄症
脳動脈瘤

頸動脈狭窄
冠動脈疾患

<肺疾患>
肺動脈性肺高血圧症
末梢性肺動脈狭窄症

<大血管疾患>
大動脈瘤、解離
腎動脈狭窄症
高安動脈炎
末梢動脈疾患



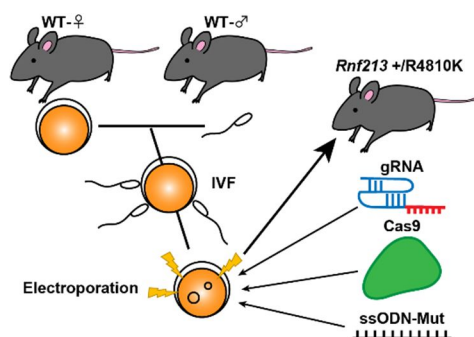
2. 研究の目的

本研究では *RNF213* R4810K 変異が PAH 発症に関わる機構を、in vitro および in vivo の実験系で解析を行うことが目的である。重症 PAH 患者に認めた遺伝学的変化を動物モデルに再現し、発症機序を解明することで、患者背景に即した発症機序の解明が可能となり、遺伝学的背景に応じた根治療法の開発に大きく貢献できる。また複数の血管病に関連した遺伝子変化であり、個々の病態解明では見えなかった発症機序の解明に繋げていくことが最終目標である。

3. 研究の方法

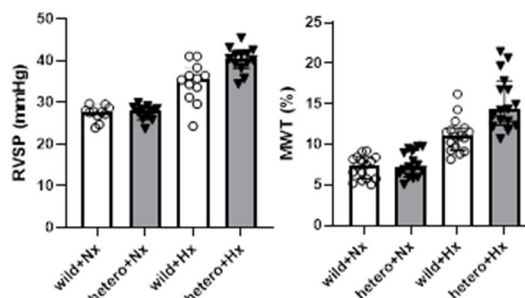
1) *RNF213* R4810K 変異の in vivo 機能解析

マウス受精卵に CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子変異を挿入し、*RNF213* R4810K 変異マウスは作製に成功した (右図)。低酸素チャンバーや VEGF 受容体拮抗剤投与にてマウスの肺高血圧症誘発を行い、肺高血圧症の重症度を野生型マウスと比較する。肺高血圧症の重症度はマウス頸静脈からカテーテルを挿入して測定する収縮期右室圧、右室と左室の重量比、肺血管中膜肥厚で評価を行う。我々の研究チームはこれら肺高血圧症の評価に必要な器材を有しており、低酸素負荷を3か月行った *RNF213* R4810K ヘテロ変異のマウスで PAH が惹起されたことを確認済みである (右下図)。今後はさらに長期の低酸素負荷を行うとともに PAH 肺組織や血液検体のトランスクリプトーム解析、メタボローム解析を行い、PAH 発症に関連する分子メカニズムを解明する。



(2) 患者検体を用いたシグナル経路の検証

応募者の研究チームは臨床と基礎の密接な共同研究組織であり、日本最大規模の PAH バイオバンクを有している。*RNF213* R4810K を有する患者肺検体のトランスクリプトーム解析等を行い、上記で確認したシグナル経路の活性化等を確認する。患者肺検体を用いる研究はすでに倫理委員会で承認を得ている。



(3) 各臓器における *RNF213* R4810K の血管病変

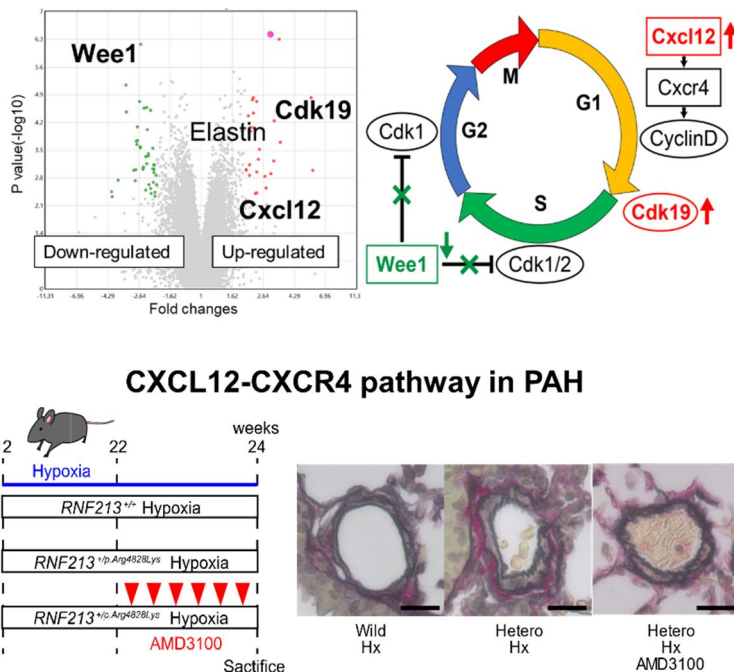
RNF213 関連血管病の発症メカニズムを解明する

ため、全身の臓器における血管病変を検索する。*RNF213* R4810K マウスの脳動脈、大動脈、腎動脈などの全身の血管病変を、CT や MRI、尾静脈からの血管造影等で評価を行う。また各臓器の病理標本を作製し、血管新生や狭窄病変等を確認する。臓器別の表現型の違いがあればクロマチン免疫沈降法やヒストン抗体などを用いて各臓器でのエピジェネティックな修飾因子の差異を探索する。エピジェネティックな因子が PAH と関連する報告は過去にない、新規治療ターゲットとして有力な候補と考える。

4. 研究成果

(1) マウス肺組織における検証

申請者の研究チームは CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒトの *RNF213* R4810K に相当する R4828K のノックインマウスの作製に成功した。野生型およびヘテロマウスを常酸素下、および 10%低酸素下で 3 ヶ月間飼育したところ、常酸素環境下(Nx)では PAH の発症は両群とも認めなかったが、低酸素環境下で飼育したヘテロマウスは野生型マウスと比較して、有意な右室収縮期圧の上昇、および肺血管中膜肥厚を認めた。右室および肺動脈のリモデリングが確認され、低酸素負荷により PAH が惹起された。またマウス肺組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を施行したところ、低酸素負荷を行った *Rnf213* R4828K ヘテロマウスは、低酸素負荷をした野生型マウスと比較して、CXCL12 や CDK19 など細胞増殖シグナルを促進する炎症性ケモカインの上昇を認めた。CXCR4 の阻害薬 (AMD3100)を追加で腹腔内投与すると、低酸素負荷をしたヘテロマウスでの PAH が軽症になり、肺動脈のリモデリングが軽度になることを確認した (右図)。右心カテーテル検査では右室収縮期圧の有意な改善を認め、右室/左室重量比も改善しており、AMD3100 が右室のリモデリングにも関与していることが示唆された。



(2) ヒト肺組織における検証

ヒトの肺組織における検証も実施した。*RNF213* R4810K 陽性の重症 PAH 患者の剖検肺を用いて、EVG 染色および CXCR4 の DAB 染色を行い、CXCR4 発現の局在を確認した。肺動脈における叢状病変の内部(右図赤矢印)および外膜(右図青矢印)に CXCR4 陽性細胞が局在していた。この所見はマウスと同様であり、ヒトでの再現性を確認した。重症肺高血圧症において、CXCL12-CXCR4 シグナルが肺高血圧症発症に関連している可能性が示唆され、新規創薬ターゲット候補と考えられた。



(3) マウスにおける血管病変の検証および細胞実験

当初の研究計画にあった *in vitro* の実験は、*Rnf213* R4828K 陽性の肺血管内皮細胞および肺平滑筋細胞の単離を行い、分子メカニズムを検証する予定であったが、限界希釈のあとに細胞の成熟が難しく、また FACS により細胞が死滅してしまい、培養が困難であったことから、*in vivo* の実験系を中心に研究を行った。肺血管病変を可視化するために、陰茎静脈より造影剤を投与し、肺血管を評価する実験系を計画したが、マウス用の CT の解像度が低かったこと、造影剤が肺静脈にも入っており、肺動脈単独の評価が難しかったことから、実施を断念した。CT による全身血管の評価は実施したが、ヘテロマウスを低酸素環境下においても、有意な大血管病変は生じなかった。今後は病理学的な評価を行い、野生型と比べての変化を検証する。

(4) 今後の研究方針

本研究では、重症 PAH 患者に共通する、東アジア特有の遺伝学的変化である *RNF213* R4810K バリエーションが、CXCL12-CXCR4 シグナルを介して肺高血圧症を惹起していることを基礎研究で解明した。今後は、CXCR4 などの炎症性ケモカインに着目し、CXCL12-CXCR4 シグナルが肺高血圧症を惹起する分子メカニズムの解明、および新規創薬ターゲットの探索を継続する方針である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Takahiro Hiraide
2 . 発表標題 PAH in Japan, focusing on the pathogenetic gene variants in BMPR2 and RNF213 genes.
3 . 学会等名 International Summit on Diagnosis and Treatment of CV Disease-2022（招待講演）（国際学会）
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Takahiro Hiraide
2 . 発表標題 Genetic Assessment for PAH: Challenging for Precision Medicine in Asia.
3 . 学会等名 The ACC Asia 2022（招待講演）（国際学会）
4 . 発表年 2022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
研究協力者	片岡 雅晴 (Kataoka Masaharu) (20445208)	産業医科大学・第二内科学・教授 (37116)	
研究協力者	袴田 陽二 (Hakamata Yoji) (00218380)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	

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
---------	---------