

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19477

研究課題名(和文) ヒト病態を再現する心房細動マウスを用いた薬物スクリーニング系構築の挑戦

研究課題名(英文) Drug screening based on mouse replicating human atrial fibrillation phenotype

研究代表者

古川 哲史 (Furukawa, Tetsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80251552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：RBM20はスプライシング制御因子であり、その機能喪失変異はタイチン(TTN)遺伝子を含む複数の標的遺伝子のスプライシング異常を介して拡張型心筋症(DCM)を生じるとされてきた。我々は、Rbm20S634Aマウスは、世界初のヒト類似の自然発症慢性心房細動を発症することを明らかにした。そこで、Rbm20S634Aマウスが心房細動を発症する分子メカニズムを検討から、細胞質のP-bodyにおけるRNA代謝障害が、ヒト類似の自然発症心房細動をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は、最も頻度の高い不整脈であり、年齢とともに指数関数的に発症頻度が増えること、高頻度に脳梗塞・心不全・認知症を合併する。心房細動を伴う脳梗塞は特に重症であり、我が国の寝たきりの約20%は心房細動にともなう脳梗塞であるという統計もあり、超高齢化社会を迎えた我が国ではその対策が喫緊の課題である。本プロジェクトでは、ヒト類似の心房細動のマウスモデルを世界で初めて作成したことから、社会的に意義がある。また、同モデルの解析から心房細動の新たな分子メカニズムを明らかにしたことが、学術的に意義がある点と考えられる。

研究成果の概要(英文)：RBM20 is a splicing regulator, and its loss-of-function mutations have been shown to produce dilated cardiomyopathy (DCM) via splicing defects in multiple target genes, including the titin (TTN) gene. We have shown that Rbm20S634A mice are the first mice in the world to develop human-like spontaneous chronic atrial fibrillation. In this study, we investigated the molecular mechanism by which Rbm20S634A mice develop atrial fibrillation, and found that a defect in RNA metabolism in the cytoplasmic P-body leads to human-like spontaneous atrial fibrillation.

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 マウスモデル 心不全

1. 研究開始当初の背景

心房細動は高齢者に多く、高頻度に脳梗塞を合併し、寝たきりの約 20%の原因となる。また約 1/3 で心不全を合併し、高い mortality・morbidity を示す。2007 年より超高齢社会(高齢者 21%以上)に突入した我が国では、その対策が喫緊の課題である。ところが、非侵襲的治療としては、抗凝固薬による脳梗塞予防薬などがあるだけで、根本的な治療薬は存在しない。その理由として、ヒト心房細動を再現する小動物モデルが存在しないこと、有効な in vitro アッセイ系がないこと、の 2 つがあげられる。

申請者のグループは、不整脈(心房細動、心室細動)を高頻度で合併するヒト拡張型心筋症の原因遺伝子 *Rbm20* の S637A 変異を有するマウス *Rbm20*^{S637A/+} マウスを作成した。すると、心房細動が自然発症した。*Rbm20*^{S637A/+} マウスは、全マウスで 10 週までに発作性心房細動を発症し、1/3 は発作性心房細動のまま寿命を迎え、残り 2/3 は持続性心房細動へと移行するという、ヒト心房細動の病態に類似する自然経過をとることが明らかとなった。すなわち、*Rbm20*^{S637A/+} マウスは世界初のヒト心房細動病態を再現するマウスモデルと考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、*Rbm20*^{S637A/+} マウスの優位性を最大限生かして、心房細動治療薬の開発の実用化に結びつけるために、以下の 2 つの挑戦的課題を達成することである：

- ✓「心房細動 with 心不全」と「心房細動 without 心不全」の小動物モデルの作成
- ✓心房細動病態を有する *in vivo* 化合物ハイスループットスクリーニング系の構築

3. 研究の方法

心房細動を自然発症する *Rbm20*^{S637A/+} マウスは、心房細動の薬物評価を行う絶好の小動物モデルと考えられるが、1 つ解決すべき問題がある。心房細動は、約 1/3 で心不全を合併し、残り 2/3 は心不全を合併しない。心不全を合併した心房細動では、心房筋の K⁺チャネル遺伝子発現が低下し、活動電位持続時間(APD)が延長している。一方、心不全を合併しない心房細動は、心房筋の K⁺チャネル遺伝子発現が更新し、APD が短縮している。このように病態が正反対の 2 タイプの心房細動を同等にとらえ、一括りにして薬物開発を行うことは理にかなっていない。そこで、*Rbm20*^{S637A/+} マウスを用いて、心不全を合併する心房細動、心不全を合併しない心房細動のマウスモデルを区別して構築する。

(1) 心不全を合併しない心房細動マウスモデル構築の試み：

Rbm20 の S637A 変異はヒト拡張型心筋症の原因遺伝子であり、*Rbm20*^{S637A/+} マウスは心房細動発症時期と前後して心不全を発症することから、「心不全を合併した心房細動モデル」と考えられる。そこで、もう一方の「心不全を合併しない心房細動モデル」構築にチャレンジするため、以下の 4 項目を検討する：

- ✓*Sln-cre* マウスと *merCremer-Rbm20*^{S637A/S637A} マウスを交配することによって心房筋特異的な *Rbm20*^{S637A/S637A} マウスを作成する；
- ✓心房筋特異的 *Rbm20*^{S637A/+} マウスで、心エコー検査、ミラーカテーテルによる容量-圧曲線、心室筋 BNP 遺伝子発現解析で、心不全を合併しないことを確認する；
- ✓全心臓 *Rbm20*^{S637A/+} マウスと心房筋特異的 *Rbm20*^{S637A/+} マウスの心房筋で、K⁺チャネル遺伝子発現を解析する；
- ✓全心臓 *Rbm20*^{S637A/+} マウスと心房筋特異的 *Rbm20*^{S637A/+} マウスにおいて optical

mapping 法で活動電位を記録し、心不全合併心房細動では APD 延長、非心不全合併心房細動では APD 短縮が再現されることを検証する。

(2) マウスから単離した心房筋細胞に対する薬物スクリーニング系の構築：

全心臓 *Rbm20*^{S637A/+} マウス・心房筋特異的 *Rbm20*^{S637A/+} マウスから心房筋を単離し、初代培養系で薬物スクリーニングシステムの構築を試みる。

✓ MEA システムを用いて電気生理学的解析を行う。培養系の心筋シートでも不整脈が検出される場合は、不整脈に対する効果をアウトプットとして薬物評価を行う。

✓ 不整脈が検出されない場合は、APD に対する効果をアウトプットとする。すなわち、全心臓 *Rbm20*^{S637A/+} マウスから単離した心房筋細胞では、APD の短縮をもって効果ありと判定し、心房筋特異的 *Rbm20*^{S637A/S637A} マウスから単離した心房筋では APD の延長をもって効果ありと判定する。

4. 研究成果

心房細動は、約 1/3 で心不全を合併し、残り 2/3 は心不全を合併しない。心不全を合併した心房細動では、心房筋の K⁺チャネル遺伝子発現が低下し、活動電位持続時間(APD)が延長している。一方、心不全を合併しない心房細動は、心房筋の K⁺チャネル遺伝子発現が更新し、APD が短縮している。このように病態が正反対の 2 タイプの心房細動を同等にとらえ、一括りにして薬物開発を行うことは理にかなっていない。申請者のグループは、ヒトでしばしば心房細動を合併する拡張型心筋症の原因遺伝子 *Rbm20* の S637A 変異を有する *Rbm20*^{S637A/+} マウスを作成した。すると、生後 4 週より心房細動が出現し、10 週には全例で発作性心房細動を呈した (Sci. Rep. 2020;10(1), 17894)。 *Rbm20* の S637A 変異はヒト拡張型心筋症の原因遺伝子であり、「心不全を合併した心房細動モデル」と考えられる。そこで、今年度はもう一方の「心不全を合併しない心房細動モデル」構築にチャレンジした。*Sln-cre* マウスと *merCremer-Rbm20*^{S637A/S637A} マウスを交配することによって心房筋特異的な *Rbm20*^{S637A/S637A} マウスを作成した。心房筋特異的 *Rbm20*^{S637A/+} マウスで、心エコー検査、心室筋 BNP 遺伝子発現解析で、心不全を合併しないことを確認した。

スプライシング制御因子 RBM20 の変異はタイチン (*TTN*) 遺伝子などの標的遺伝子のスプライシング異常を介して拡張型心筋症 (DCM) を生じるとされてきたが、RBM20 変異による DCM は他の原因による DCM と比較してより重症となることが知られていた。我々は本研究において RBM20 変異による DCM 症例において変異が集中する RSRSP 配列が RBM20 の核移行に重要であり、RSRSP 配列に変異を持つ *Rbm20*^{S637A} ノックイン (KI) マウスでは細胞質に核移行できない変異型 RBM20 が存在することにより重篤な心機能低下や心室性不整脈・心房細動を呈することを明らかにしてきた。また、組織学的評価では変異型 RBM20 タンパクは細胞質で凝集体を形成していることを明らかにした。

当該年度においては、凝集体の性質を調べるため *in vitro* 実験で RBM20 の RNA 結合ドメインへの変異導入や、デコイ RNA 投与により凝集体形成の抑制を生じることが見いだされ、変異型 RBM20 と RNA の結合が細胞質における凝集体形成に寄与していることが示唆された。*Rbm20* KI マウスの心臓組織において抗 RBM20 抗体を用いた RNA 免疫沈降を行うと、変異型 RBM20 が細胞質においても確かに RNA と結合していることが示された。RNA 免疫沈降で得た RNA で網羅的解析を行うと 3887 遺伝子が enrich されており、*Rbm20* KI マウス心臓において発現が低下している遺伝子群 (1355 遺伝子) に関して検討すると、そのうち約半数の 638 遺伝子で overlap を認め、RBM20 凝集体はその内部に内包した mRNA の発現低下に寄与する可能性が示唆された。

また、*Rbm20* KI マウスを用いて心臓電気生理学的検査・光学マッピングを行うと心房伝導速度の低下が見られ、細胞間伝導を司るコネクシンの発現が低下していることが見いだされた。コネクシンは RNA 免疫沈降実験で RBM20S637A との結合が示唆されており、*in vitro* 実験でも RBM20 の RNA 結合ドメインへの変異導入や、デコイ RNA 投与による RBM20 凝集体の解除とともにコネクシン発現回復が見られ、変異型 RBM20 はコネクシンの発現抑制を介して不整脈原性に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Junji, Chiba Risako, Komuro Hiroaki, Ihara Kensuke, Nozaki Kosuke, Nagai Akiko, Furukawa Tetsushi, Sasano Tetsuo	4. 巻 4
2. 論文標題 Local Injection of Hydroxyapatite Electret Ameliorated Infarct Size After Myocardial Infarction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 38 ~ 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-21-0100	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

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 (招待講演)
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 岩宮賢、井原健介、古川哲史、笹野哲郎
2. 発表標題 心不全モデルのマウス心房に対するSacubitril/Valsartanの電気生理学的効果
3. 学会等名 第262回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2021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 electrophysiological properties of atria in murine hearts with pressure overload
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩宮賢、井原健介、富井直輝、山崎正俊、黒柳秀人、佐久間一郎、古川哲史、笹野哲郎
2. 発表標題 心房細動モデルマウスのOptical mapping による評価
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021 (招待講演)
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

〔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
---------	---------