

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08154

研究課題名(和文) 難病疾患肺動脈性肺高血圧症の新規発症感受性遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel susceptibility genes for the development of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

伊波 巧 (Inami, Takumi)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：80580381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)の原因遺伝子としてBMPR2が報告されているが、その変異によるPAH発症機序は解明されていない。また、我々はPAHの新しい感受性遺伝子としてRNF213を同定した。本研究ではBMPR2とRNF213それぞれのhot-spot変異を有する遺伝子改変マウスを作成した。BMPR2変異マウスを用いたシングルセル解析によって、肺組織中のど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た。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た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、難病疾患である肺動脈性肺高血圧症(PAH)の発症機序全容解明に繋がる研究成果を得ることができた。これらの成果はPAH患者の早期診断や早期治療介入による予後改善に繋がることを期待される。また、患者で認めるhot-spot変異を再現した遺伝子改変マウスを用いた本研究成果は、難病疾患領域における病態解明研究のモデルケースとして他難病疾患へも応用可能であり、学術的意義および社会的意義が高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：BMPR2 has been reported as a causative gene for pulmonary arterial hypertension (PAH), but the pathogenic mechanism of PAH due to BMPR2 mutations has not been elucidated. We also identified RNF213 as a new susceptibility gene for PAH. In this study, we generated genetically modified mice with hot-spot mutations in BMPR2 and RNF213, respectively. Single-cell analysis using BMPR2 mutant mice has led to the elucidation of the pathogenic mechanism of PAH onset due to changes in gene expression levels of cells in lung tissue. In addition, verification using RNF213 mutant mice has led to the elucidation of the downstream signal pathway of RNF213 leading to the onset of angiopathy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症

## 1. 研究開始当初の背景

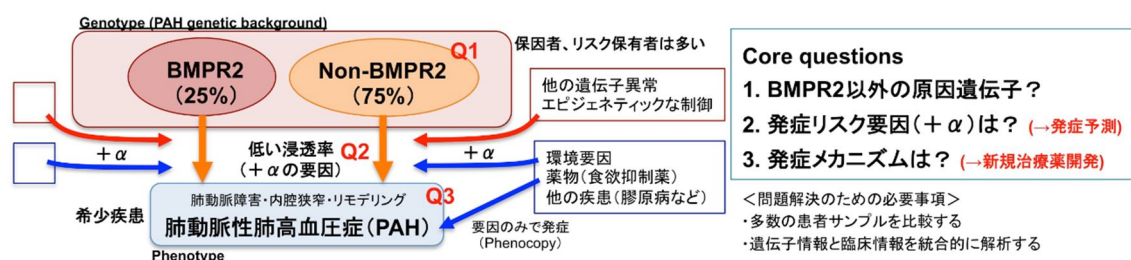
肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary Arterial Hypertension: PAH)は肺動脈の内膜や中膜が肥厚して肺動脈圧が上昇し、右心不全を起こす生命予後は不良の指定難病である(国内認定患者数は2017年時点で約3500人)。約3/4の患者は、膠原病等との関連等の原因を特定できない「特異性PAH(以下IPAH)」に鑑別される。

IPAHの中で遺伝的な背景が示唆される家族性症例から、2000年に染色体2q33に存在する”2型骨形成タンパク受容体(以下BMPR2)遺伝子”の変異が発見された(International PPH Consortium, Nat Genet. 2000)。しかしながら、BMPR2遺伝子異常はIPAHの約15-20%、家族性PAHの中でも70%程度である。即ち、IPAHの過半では原因を特定出来ていない。さらに、男性ではBMPR2遺伝子変異を有しても発症しないことが多い。女性の場合、浸透率は50%以下と推定でき遺伝子変異に加えて発症を促進する要因の存在が強く示唆される。特に女性ホルモンが促進要因と示唆されるが、思春期以前や更年期近くでの発症、複数回の妊娠後も発症しない例もあり一定ではない。PAHにおけるBMPR2遺伝子異常の報告から17年が経過しており、少数の症例でのCaveolinやEIF2AK4遺伝子の変異や低酸素刺激などのセカンドヒットの可能性など近年いくつかの文献報告はあるものの、未だに残された過半数の症例に関しての発症機序は不明である。即ち、PAHの根本的な発症概念は確立しておらず、肺動脈肥厚に至る分子機構は不明で治療方法も確立していない。

本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、

1. BMPR2以外の原因遺伝子は存在するのか、存在する場合それはどのような遺伝子か、
  2. 環境要因に加える発症リスク要因は何か、その遺伝的背景はどのようなものか、
  3. 原因遺伝子と発症リスク要因を合わせた発症メカニズムはどのようなものか、
- を問うことである。

近年、ゲノムワイド連鎖解析や次世代シーケンサー(以下、NGS)での変異解析、miRNAを含めた発現解析が普及しつつあり、我々もIPAHでのNGSによるエキソーム解析を実施し、発症への関与が強く疑われる幾つかの特異的な遺伝子変異・感受性変異を見出した。本研究課題では、エキソーム解析により既に縛りこんだ候補遺伝子から発症に関わる遺伝子を確定証明し、さらにin vitroとin vivoの集学的評価解析によって、PAH発症機序の解明を目的とする。



## 2. 研究の目的

ヒトゲノム解析以降、遺伝性疾患の多くで原因遺伝子が特定され、また従来は遺伝性が明瞭でなかった疾患においても多くの「原因遺伝子」が特定されてきた。しかしながら、小児期に発症する古典的なメンデル遺伝病とは異なり、PAHを含めて成人期に発症する疾患や遺伝性は認められるものの浸透率が低い疾患においては、直接的な原因に加えて日常の生活習慣、生活環境、生育環境を含めた長期的な生活史等の環境要因が複雑に相互作用し発症に至ると考えられ、「感受性」または「発症リスク要因」とも表現される。PAHの発症には年齢、性、嗜好等の多くのリスク要因が想定されているが、その遺伝的解析は皆無である。

我々はPAHの最大のサンプルバンクと診療施設、最新の分子生物学的解析技術を有している。本研究ではこれらを駆使し、より広範な患者試料を用いた候補遺伝子の変異の検索と検証、またin vitroとin vivoの実験系による機能解析を併せて実施し、PAH発症に関与する新規遺伝子を確立証明することを目的とする。我々は、PAHの「原因遺伝子」であるBMPR2遺伝子とは別に、全く未解明の「感受性/リスク遺伝子」の候補としてRNF213遺伝子を特定しており、世界に先

駆けた独自性の高い解析を実施可能である。また、今回の新規発症関与遺伝子の機能解析を基とした、PAH の発症病態とその進行機序を臨床と基礎研究を統合し、早期発見・早期治療に結び付く新規診断法の創造開発と診療の質向上が期待される。

### 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、肺組織中のど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 1件）

1. 著者名 Hiraide Takahiro, Suzuki Hisato, Shinya Yoshiki, Momoi Mizuki, Inami Takumi, Katsumata Yoshinori, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro, Kataoka Masaharu	4. 巻 4
2. 論文標題 TET2 Variants in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CJC Open	6. 最初と最後の頁 416 ~ 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cjco.2021.11.008	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
連携研究者	片岡 雅晴  (Kataoka Masaharu)  (20445208)	産業医科大学・医学部第2内科学・教授    (37116)	

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