

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03958

研究課題名（和文）遺伝子変異導入モデルマウスによる、乳幼児突然死解明の革新的診断スキームの構築

研究課題名（英文）An innovative diagnostic scheme for elucidating sudden death using genetically mutated model mice

研究代表者

山本 琢磨（YAMAMOTO, TAKUMA）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50634458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,600,000円

研究成果の概要（和文）：Rbm20-1538T遺伝子変異動物モデルを作製した。12週齢の雄性マウスの各genotypeにおいて、左室内径短縮率、左室拡張末期径に明らかな差は認められなかった。組織検査では拡張や線維化は認められなかった。スプライシング解析では、Ttn遺伝子のexon51・52・53の含有が、遺伝子発現解析では、Mybpc2・Myot遺伝子がhomo群で優位に増加していた。Rbm20-1538Tノックインマウスにおいては、変異の有無によって形態的・生理学的異常は認められなかったが、Rbm20遺伝子の関与する各種遺伝子のスプライシングおよび遺伝子発現に影響が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実務上経験した突然死症例において検出された遺伝子変異に関して、モデル動物を用いた検討で病的意義を証明することができた。本研究はRbm20遺伝子変異の解析という点とともに、法医実務における課題をモデル動物を用いて解決したという点においても、法医学突然死研究の意義を示すことができたと考える。今後検出される遺伝子変異についても、変異動物モデルを用いた機能解析・病態再現を行うことで病的意義を持つpathogenic変異であるのが判明し、家族への予防へと繋げることが期待される。

研究成果の概要（英文）：RBM20 is one of the genes predisposing to dilated cardiomyopathy (DCM). Variants in the RS domain have been reported in many DCM patients, but the pathogenicity of variants within the RNA-recognition motif remains unknown. A human patient with the I536T-RBM20 variant without an apparent DCM phenotype was identified in sudden death cohorts. An I538T knock-in mouse model was generated to determine the significance of this variant. In the mouse experiments, Rbm20 I538T mice showed different splicing patterns in Ttn, Ldb3, Camk2d, and Ryr2. The expressions of Casq1, Mybpc2, and Myot were upregulated in Rbm20 I538T mice, but Rbm20 I538T mice showed neither DCM nor cardiac dysfunction on histopathological examination and ultrasound echocardiography. The I536T-RBM20 (I538T-Rbm20) variant changes gene splicing and affects gene expression, but the splicing and expression changes in Ttn and Ca handling genes such as Casq1, Camk2d, and Ryr2 do not cause DCM morphology in the mouse model.

研究分野：法医学

キーワード：突然死 死後遺伝子解析 遺伝子変異 RBM20

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

突然死症例の死因究明に関しては、従来の肉眼解剖・病理検索では診断できないものも多く、診断に苦慮していた。そこで我々は遺伝子解析によって機能性疾患の診断を行うことを目標にこれまで複数の遺伝子変異を報告してきた(Yamamoto et al., Mol Genet Metab 2011, Yamamoto et al., Brain Dev 2014, Yamamoto et al., Mol Genet Metab Reports 2015, Oshima, Yamamoto et al., J Hum Genet 2017)。これらの変異は、過去に病的変異と報告があることや、頻度が低いあるいは新規変異であることから意義のあるものと判断したり、組織学的変化を伴うことから診断したりしてきた。しかし、変異そのものがどのような病態を引き起こすのかについては解析できておらず、あくまで「突然死症例に変異が見つかった」にとどまっていたのが現実であり、「変異がどのように疾患に影響を及ぼしているのか」を明らかにすることが課題であった。特に複数の遺伝子変異を持つ症例では、その意義を明らかにせずに残された家族への還元は困難であった(Yamamoto et al., Forensic Sci Int 2019)。

我々はこの問題を克服すべく、死後の iPS 細胞樹立に取り組んできたが、一例の樹立に成功しただけであり(Yamamoto et al., Stem Cell Res 2019)、実務応用へのハードルはまだ高いと言える。そこで、より簡便な実用性の高いモデル動物解析を行うことにより、突然死の実務例から動物モデルでの病態解明、さらには治療・予防といった臨床への還元がなされると考えた。

本研究によって、これまでに検出された遺伝子変異について、変異動物モデルを用いた機能解析・病態再現を行うことで、単なる rare variant であるのか、病的意義を持つ pathogenic 変異であるのかが判明し、家族への予防へと繋げることが期待された。

### 2. 研究の目的

近年、RBM20 遺伝子変異が拡張型心筋症の原因遺伝子の一つであると報告されている(Guo et al., Nature 2012)。RBM20 遺伝子はタイチンのスプライシングに影響を及ぼすもので、RBM20 変異により巨大なタイチンが合成されることが一つの理由とされている。

我々は、心臓致死性不整脈が疑われる若年性突然死症例に本遺伝子の新規 I536T 変異を検出した(Yamamoto et al., Forensic Sci Int 2019)。偶然にも本症例は筋ジストロフィーを併発しており、骨格筋では筋線維不均等症も認められた。

この症例に認められた心臓不整脈や骨格筋ミオパチーが、RBM20 変異の影響をどの程度受けていたのは不明であったため、本変異を導入したノックインマウスを作製し、各種遺伝子のスプライシングパターン解析、遺伝子発現解析、病理組織像を検討することで、本遺伝子変異の病態を検討することを目的とした。

この遺伝子は拡張型心筋症の原因として一定数報告されているが(Haas et al., Eur Heart J 2015)、I536T 変異やその周辺の RNA recognition domain 領域についての知見は乏しく、この病態が明らかになることで難治性心筋症の治療応用へと進むことも期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1)モデル動物作製

C57BL/6 マウスを用い、Crispr Cas9 法により Rbm20-I538T 遺伝子変異動物モデルを作製した。

#### (2)心機能評価

各 genotype について雄性マウス 12 週齢で心臓エコーを用いて、左室内径短絡率や左室拡張末期径を計測し、心機能評価を行なった。

#### (3)病理組織学的検索

各 genotype について雄性マウス 12 週齢で、安楽死後に心臓・大腿四頭筋を採取し、HE 染色・MT 染色を行なった。

#### (4)遺伝子発現解析

各 genotype について雄性マウスを 1・12・36 週齢で安楽死後に心臓・大腿四頭筋を採取した。RNA を抽出後、RNAseq、RTQPCR 解析を行なった。

#### (5)スプライシング解析

RNAseq 後、各遺伝子毎に PSI 解析、RTPCR を行い、スプライシングバリエーションを評価した。

### 4. 研究成果

#### (1)Rbm20-I538T マウスは突然死を起こさない

36 週齢まで、各 genotype において突然死を起こしたマウスは認められなかった。

#### (2)Rbm20-I538T マウスの心機能は低下しない

心機能解析では、左室内径短絡率、左室拡張末期径に明らかな差は認められなかった(図 1)。組織学的検索では心室の拡張や線維化は認められなかった。心不全マーカー・線維化マーカーの遺伝子発現に差は認められなかった(図 2)。以上のことから、遺伝子変異によって phenotype には影響を及ぼさないと言える。

#### (3)心筋では筋構成分子やカルシウムハンドリングに関わる分子に異常が生じる

一方で、スプライシング解析では、Ttn 遺伝子の exon51・52・53、Ldb3 遺伝子の exon5・6・7、Camk2d の exon15、Ryr2 の exon84 の含有が wild 群と比較して homo 群で優位に上昇していた(図3)。遺伝子発現解析では、Mybpc2・Myot、Casq1 遺伝子が homo 群で優位に増加していた(図4)。以上のことから、各種筋構成分子やカルシウムハンドリングに関わる分子に影響を及ぼす変異であることが明らかになった。

(4)骨格筋では異常は生じない

骨格筋においても、形態学的変化は認められなかった。また、Ttn、Ldb3 のスプライシング異常や構成分子の遺伝子発現にも差は認められなかったことから、心筋とは異なり、骨格筋に対する影響は及ぼさない変異であった。

本研究期間において、解析が終了した変異は一例であったが、実務上経験した突然死症例において検出された遺伝子変異に関して、モデル動物を用いた検討で病的意義を証明することができた。本研究は Rbm20 遺伝子変異の解析という点とともに、法医実務における課題をモデル動物を用いて解決したという点においても、法医学突然死研究の意義を示すことができたと考える。

図 1

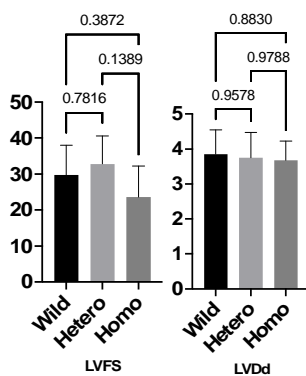


図 2

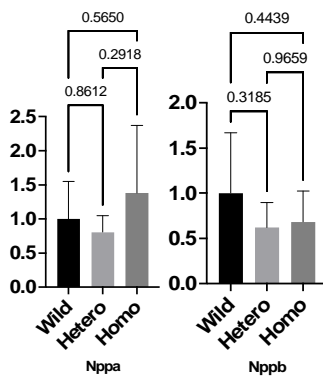


図 3

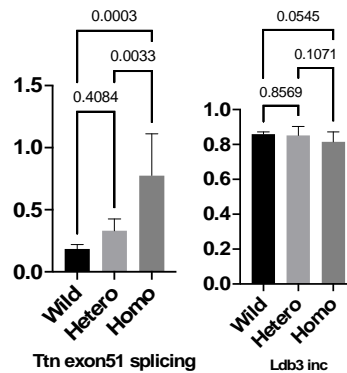
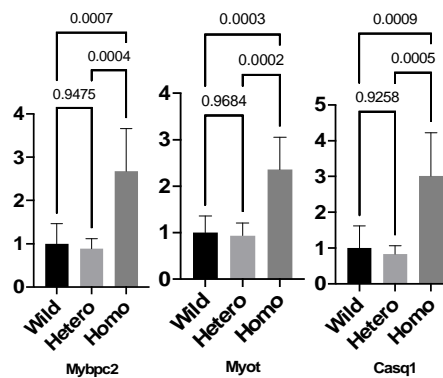


図 4



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 Yamamoto T, Sano R, Miura A, Imasaka M, Naito Y, Nishiguchi M, Ihara K, Otani N, Kominato Y, Ohmuraya M, Kuroyanagi 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 1741-54
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本琢磨、佐野利恵、今坂舞、三浦綾、西口美紀、大谷成人、小湊慶彦、大村谷昌樹、西尾元
2. 発表標題 Rbm20ノックインマウスを用いた若年性突然死症例の病態解明
3. 学会等名 日本法医学会第106次全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 琢磨、今坂 舞、三浦 綾、大谷 成人、大村谷 昌樹、西尾 元
2. 発表標題 RNA sequencingと遺伝子変異動物モデルにより解明した若年突然死症例
3. 学会等名 第4回法医分子病理研究会
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
研究分担者	大谷 成人  (Otani Naruhito)  (10561772)	兵庫医科大学・医学部・講師    (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	村瀬 壮彦  (Murase Takehiko)  (40823315)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教    (17301)	
研究分担者	今坂 舞  (Imasaka Mai)  (50759553)	兵庫医科大学・医学部・助教    (34519)	
研究分担者	大村谷 昌樹  (Omuraya Masaki)  (60398229)	兵庫医科大学・医学部・教授    (34519)	
研究分担者	池松 和哉  (Ikematsu Kazuya)  (80332857)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授    (17301)	
研究分担者	三浦 綾  (Miura Aya)  (90814814)	兵庫医科大学・医学部・助教    (34519)	

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