

遺伝子改変ヒト iPS 細胞の作製による心筋症発症機序の解析

宮岡佑一郎

東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト

【研究の背景】 スプライシング因子 RBM20 の変異による心筋症の発症

拡張型心筋症は致死性心疾患であり、約 3 分の1が遺伝性である。その遺伝的要因の中で注目されているのが、スプライシング因子の RBM20 の変異である¹⁾。RBM20 に関する研究は、これまで RBM20 変異ラット、培養細胞および心筋症患者の生検などを用いて解析され、RBM20 が心臓特異的なスプライシングを制御することが示されている²⁾。しかし、これらの変異が心筋症を引き起こす詳細な分子機構は不明のままである。

【目 的】 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心筋症発症機序の解明

RBM20 の点変異による心筋症発症機序を理解するには、ラットなどのモデル生物や患者の生検だけでなく、遺伝的背景が同一のヒト細胞で変異が与える影響を検討できる実験系が必要であった。そこで本研究は、健常者由来 iPS 細胞に RBM20 の点変異を導入し、心筋細胞に分化させることで、RBM20 点変異がヒト心筋細胞に与える影響を分子レベルで解析し、心筋症発症機序の解明と治療法開発へとつなげることを目的とした。

【方 法】 ゲノム編集により RBM20 に変異を導入した iPS 細胞由来心筋細胞のトランスクリプトーム解析

私は自身の開発した、ゲノム編集技術を用いて変異を導入したヒト iPS 細胞を、デジタル PCR を用いて限界希釈を繰り返すことで単離する技術³⁾により、RBM20 の R636S 点変異、さらに 8 塩基欠失もしくは 1 塩基挿入のフレームシフト変異を持つヒト iPS 細胞を作製した。これらの RBM20 変異を持つ iPS 細胞とその親株の細胞を、小分子を介した Wnt シグナル調節により心筋細胞へと分化させ、培地のグルコースを乳酸に置換する手法で 90%以上の純度の心筋細胞を精製した^{4, 5)}。得られた心筋細胞から RNA を精製し、illumina Hi-Seq による paired-end 100 bp の RNAseq を行った。Cincinnati Children's Hospital の Salomonis 博士の協力によりデータを解析し、各遺伝型的心筋細胞における遺伝子発現様式、および RBM20 の変異によってスプライシング異常を生じる遺伝子を同定した。またその一部は、RT-PCR によってスプライシング異常を直接確認した。

【結 果】 RBM20 変異は機能欠失変異であると推測される

RBM20 の 8 塩基欠失変異 および 1 塩基挿入変異はフレームシフト変異であるため、RBM20 の機能欠失変異であると考えられる。RNAseq 解析の結果、これらフレームシフト変異を持つ iPS 細胞由来心筋細胞の遺伝子発現様式、およびスプライシング様式は、RBM20 R636S 点変異のものと類似していることが明らかになった。したがって、これまで点変異が RBM20 にどのような影響を与えるのかについて明確な解答が得られていなかったが、本研究の結果は、R636S などの点変異が機能欠失変異であることを強く示唆している。

【考 察】RBM20 変異は胎児型から成体型へのスプライシング様式の切替えを阻害する

本研究により、RBM20 の R636S などの点変異が RBM20 の機能を損なうことにより、心筋症の発症につながることを示唆された。RBM20 のスプライシングの標的遺伝子として既に知られている CAMK2D のスプライシング様式を見ると、RBM20 の変異によって胎児型から成体型のスプライシングへの切替えが阻害されていることが明らかとなった。RNAseq による網羅的な解析からも、全体として RBM20 に変異を持つ iPS 細胞由来心筋細胞ではスプライシング様式が胎児型のものに近く、RBM20 が非常に多様な標的遺伝子のスプライシングを制御していることが示唆される。今後は、R636S だけでなく S635A、S637A などの他の点変異がもたらす影響の比較も行い、なぜ RBM20 のこの領域に点変異が集積しているのかを明らかにし、RBM20 の正常な心筋細胞での機能、およびその破綻による心筋症の発症機序について、さらに詳細な解析を進めていきたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】スプライシング異常による心筋症治療戦略への示唆

これまでスプライシングと心筋症発症の関連性は詳細な解析がなされてこなかったが、本研究によって RBM20 というスプライシング因子を介して、明確に両者のつながりが明らかとなった。本研究の結果から RBM20 の点変異は機能欠失変異であると推測されるため、RBM20 の機能を回復させられるような薬剤が得られれば、治療／予防薬となる可能性がある。また、本研究によって RBM20 の標的遺伝子が明らかになったため、その中で最も RBM20 のスプライシング制御を強く受ける遺伝子を選定し、その遺伝子のスプライシングにより GFP などの蛍光遺伝子が発現するようなレポーターを作製すれば、薬剤スクリーニングに使用することも可能であり、今後の心筋症研究に大きく貢献することが期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Guo, *Nat Med* **18**:766, 2012
- 2) Maatz, *J Clin Invest* **124**:3419, 2014
- 3) Miyaoka, *Nat Methods* **11**:291, 2014
- 4) Lian, *PNAS* **109**:E1848, 2012
- 5) Tohyama, *Cell Stem Cell* **12**:127, 2013