

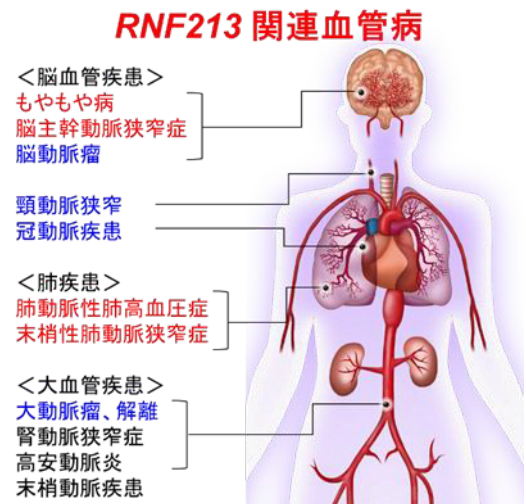
遺伝子変異に起因する全身性難治性血管病の病態解明と新規創薬ターゲットの探索

平出貴裕

慶應義塾大学医学部 難治性循環器疾患病態学寄付研究講座

【研究の背景】

難病疾患に指定されている血管病には、肺動脈疾患や脳動脈疾患、大動脈疾患など全身の血管病変が含まれており、本邦での推定患者数は併せて2万人を超える。しかし発症原因の多くは特定されておらず、根本的な治療法は存在しないのが現状である。このうち、肺動脈性肺高血圧症(PAH)は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の難病指定疾患である。応募者の研究チームは特発性 PAH 患者検体を用いた次世代シーケンサー解析を施行し、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 (*RNF213*) 遺伝子の多型変異(R4810K)を同定した(Suzuki H, Hiraide T, et al. Circ Genom Precis Med.2018)。この変異は日本人肺高血圧症患者の約1割に認め、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の根本的な治療法の開発が望まれる患者群であることを報告した(Hiraide T, et al. J Heart Lung Transplant. 2020)。*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として報告されている(右図)。これら疾患を網羅的に解析することで、これまで原因不明であった疾患群における発症機序の解明や根本的な治療法の新規創薬が期待できる。



【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。分子メカニズムの解析とともに、オミクス解析やハイスループットスクリーニング等を用いて、PAHの根治療法を目的とした創薬ターゲットの検索を行う。また肺動脈に限らず、一つの遺伝子変異に基づいて複数の血管病が発症する機序を解明し、遺伝子変異に起因する疾患の病態解明及び遺伝学的背景に応じた治療法の開発の先駆けとする。

【方 法】

1) *RNF213* R4810K 変異の *in vivo* 機能解析

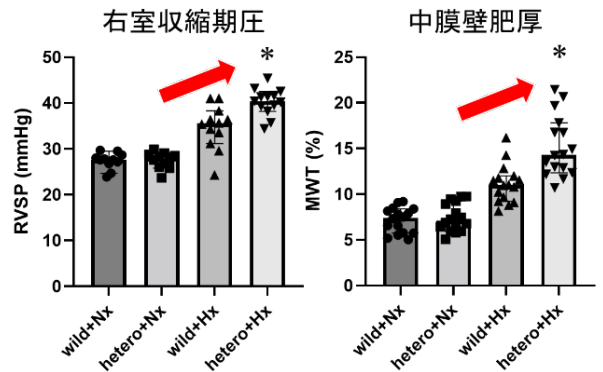
マウス受精卵にて CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子変異を挿入し、*RNF213* R4810K 変異マウスは作製に成功した(図)。低酸素チャンバーや VEGF 受容体拮抗剤投与にてマウスの肺高血圧症誘発を行い、肺高血圧症の重症度を野生型マウスと比較する。肺高血圧症の重症度はマウスの右頸静脈からカテーテルを挿入して収縮期右室圧を測定し、解剖後に右室と左室の重量比、肺の病理切片にて肺血管中膜肥厚で評価を行う。10%低酸素負荷を3か月行い、PAHが惹起されるかを確認した。またトランスクリプトーム解析にて細胞増殖に関連するシグナルの変動を同定し、阻害薬を投与して PAH 発症に関連しているかを確認した。

2) 患者検体を用いたシグナル経路の検証

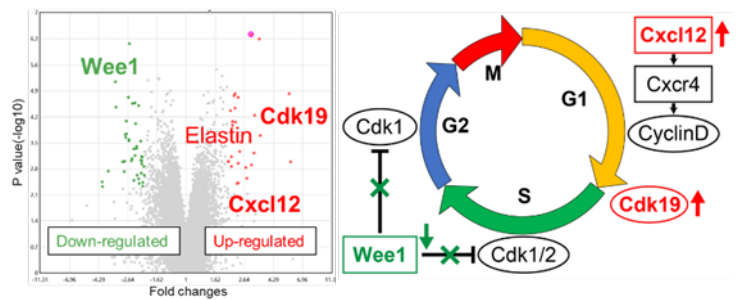
応募者の研究チームは臨床と基礎の密接な共同研究組織であり、日本最大規模の PAH バイオバンクを有している。*RNF213* R4810K を有する患者肺検体のトランスクリプトーム解析等を行い、上記で確認したシグナル経路の活性化等を確認した。患者肺検体を用いる研究はすでに倫理委員会で承認を得ており、研究の実現性は高い。

【結 果】

ヒトでの *RNF213* R4810K 病的バリエントは現行の肺血管拡張薬への治療抵抗性がある予後不良因子であり、また複数の血管病に関連していることから、疾患発症に関連する分子メカニズムの解明が求められる。申請者の研究チームは CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒトの R4810K に相当する *Rnf213* R4828K バリエントのノックインマウスの作製に成功した。野生型および *Rnf213* R4828K 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 *Rnf213* R4810K ヘテロマウス (hetero+Hx) は野生型 (wild+Hx) 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 (右図)。実臨床でも *Rnf213* R4810K は発症感受性遺伝子として報告されており、*Rnf213* バリエントという内的要因に、低酸素負荷 (外的要因) が加わる second hit により PAH が発症したと考えられた。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* R4810K 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因子の上昇を認めた。既報で癌細胞の増殖との関連性が報告されている Cxcl12 に着目し、受容体である 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 が軽症になることを確認した。Cxcl12-Cxcr4 シグナルが *Rnf213* R4810K マウスの PAH 発症に関連していることが示唆された。CXCL12 のリガンドである CXCR4 は、低酸素負荷を行った *Rnf213* R4828K ヘテロマウスの肺組織において、肺動脈内腔および間質に発現していることを免疫染色で確認した。肺高血圧症はこれまで、血管内皮細胞や平滑筋細胞の異常増殖により発症するとされていたが、間質の細胞が PAH 発症に関連している可能性が示唆された。*RNF213* R4810K バリエントを有する重症 PAH 患者の剖検肺病理組織でも、CXCR4 は血管内皮および間質腔に発現しており、ヒトにおける再現性を確認した。CXCR4 の阻害薬である AMD3100 を腹腔内投与すると、有意に PAH が軽症となり、PAH の発症に CXCL12-CXCR4 シグナルが関与していることが示唆された。



Rnf213 signal pathway (in vivo)



【考 察】

RNF213 R4810K バリエントは低酸素環境下で PAH を惹起する疾患感受性遺伝子であり、CXCL12-CXCR4 シグナルを抑制することで PAH が軽度になることを報告した。根本的な治療法の開発を目指した、創薬ターゲットとして有用であった。炎症性ケモカインが PAH と関連している、という報告はこれまでも散見されるが、詳細なメカニズムの解析や創薬に向けた動きは乏しかった。Cxcl12 は好中球の老化や細胞障害と関連した因子であり、免疫細胞と血管障害の関連性を、免疫染色や FACS、シングルセル RNA 解析などの手法を用いて評価することで、詳細な発症メカニズムの解析が今後必要不可欠になると考えられ、新規創薬に向けた研究成果の蓄積が重要となる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、PAH の根治療法開発を目指して、新規発症関連遺伝子や環境因子を探索し、PAH の発症メカニズム解明を目指した研究内容である。実臨床で得た遺伝学的知見を基礎研究に導入する、橋渡し研究(reverse translational research)を実践してきた本施設でのみ可能な研究であり、将来的には、本研究成果によって得られた知見を基に、遺伝子の病的バリエーションに関連した難治性疾患における正確で早期の診断法の開発や患者個別化医療の実現に繋げたい所存である。

【参考・引用文献】

1. Hiraide T, Suzuki H, Momoi M, Shinya Y, Fukuda K, Kosaki K, Kataoka M. RNF213-associated vascular disease: a concept unifying various vasculopathies. *Life*. 2022;12:555.
2. Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Yamada Y, Moriyama H, Kitakata H, Endo J, Yuasa S, Arai Y, Hirose N, Satoh T, Hakamata Y, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K. Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39:103–112.
3. Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One* 2011, 6, 7.