

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10140

研究課題名(和文) BMPR2遺伝子改変ラットを用いた肺高血圧血管病変形成機序の解明

研究課題名(英文) Role of BMPR2 mutation in Pulmonary Hypertension in Rats

研究代表者

澤田 博文(Sawada, Hirofumi)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30362354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成因子2型受容体(BMPR2)変異は、肺動脈性肺高血圧の主要な遺伝的危険因子である。BMPR2変異保有患者は、予後が不良であるが、機序は不明である。マウスの肺高血圧(PH)モデルでは、高度のPH作成は困難であったが、近年ゲノム編集により、容易にラットの遺伝子操作が可能となり、進行性ラットPHモデルを用い検討が可能となった。BMPR2遺伝子変異ラットでは、BMPR2遺伝子に1塩基挿入によるミスセンス変異が確認された。変異ラットのPHは早期には野生型と同等であったが、変異ラットの生存率は低かった。ゲノム編集により、BMPR2変異の意義をPHの発症初期から進行期まで縦断的に検討が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性高血圧は予後不良疾患であり、小児においても主な死亡の原因である。原因としてBMPR2遺伝子の変異があげられ、同遺伝子変異保有患者は、重症となるとされる。しかし、肺動脈性高血圧における、BMPR2の意義は完全には理解されておらず、BMPR2変異保有患者が、より重症のPAHに進展する機序は不明である。BMPR2変異マウスを用いた研究では、ヒトと同様の病変や進行性の病態を評価することは困難であったが、最近、ゲノム編集技術の開発により、BMPR2変異ラットを用いた研究が可能となり、本研究では、最新のゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9による変異導入ラットを用いた世界初の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Mutations in bone morphogenetic protein receptor type-2(BMPR2) are the main genetic risk factor for developing pulmonary arterial hypertension (PAH). Recent studies have shown that PAH patients with BMPR2 mutation present earlier with severe hemodynamic compromise and worse transplant-free survival than those without mutations. The mechanisms underlying the difference in clinical phenotype in BMPR2 mutation carriers remain unclear. We tested the hypothesis that rats with a CRISPR/Cas9-mediated monoallelic BMPR2 mutation develop more severe pulmonary hypertension (PH) leading to poor survival than those without the mutation. For the first time using CRISPR/Cas9, this study demonstrates that rats with BMPR2 mutation develop MCT-PH similarly to wildtype until day21 but had poor survival thereafter and warrants further studies into underlying mechanism directing towards precision medicine in PAH targeted therapy for patients with BMPR2 mutations.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧 動物モデル 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧血管病変形成における BMPR2 の意義

肺動脈性肺高血圧(PAH)は、特発性以外に先天性心疾患、新生児呼吸器疾患、門脈圧亢進症、自己免疫疾患など幅広い疾患に関連して発症する、難治性の病態である。2000年に TGF β -superfamily である BMP(bone morphogenetic protein)に対する受容体遺伝子(BMPR2)が特発性 PAH(IPAH)の疾患責任遺伝子と同定されたが肺血管病変形成機序は未だ不明である。本症は、組織学的には内膜中膜を中心とした血管壁の構成要素の肥厚と叢状病変(plexiform lesion)などの血管閉塞性病変で特徴づけられる。これらの血管病変形成には、血管壁を構成する、血管内皮、血管平滑筋、繊維芽細胞ばかりでなく、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球などの炎症細胞も重要な役割を担っていると考えられさらに、PAH患者では IL-1、IL-6、TNF- α など血中の炎症性サイトカインの上昇が認められ、臨床的にも炎症機序の関わりが示唆されているしかし炎症が血管リモデリングを来す機序は、明らかではない。最近我々は、BMPR2の減少した肺動脈内皮細胞では、p38MAPKの活性化がみられ、GM-CSF産生が亢進し、ヒトIPAH病変ではGM-CSFレセプター陽性炎症細胞が病変血管に集積している事を見いだした(Sawada H, 2014)。しかし、in vivoでのBMPR2減少の意義の確立のためには、BMPR2のハプロ不全を誘導した、動物モデルを用いて、病初期からの観察を行う必要があると考えられた。

ヒト特発性肺動脈性肺高血圧(IPAH)類似の肺高血圧動物モデル

PAH研究に用いられる動物モデルでは、マウスでは低酸素暴露モデルのみであり同モデルでは、病変が中膜肥厚に限られ、進行性ではない。進行性で致死的であるモノクロタリンモデルや、最近報告された血管内皮増殖因子受容体阻害剤SU5416投与と低酸素モデル(SU5416/低酸素)はラットでのみ作成される。BMPR2の意義を検討するため、BMPR2ノックアウトマウスを用い、SU5416/低酸素作成を試みたが、ラットと同様のヒトIPAHと類似の病変形成は認めなかった。(未発表)そこで、今回、ゲノム編集によりBMPR2-ノックアウトラットを作製し、モノクロタリンとSU5416/低酸素によるラットを用いたPH研究を行った。

ゲノム編集技術を応用した遺伝子改変動物の作成

マウスでは1990年代から、胚性幹(ES)細胞を用い、相同的遺伝子組みかえにより、遺伝子を破壊したノックアウトマウスが作成され、遺伝子の個体レベルでの機能解析に役割を果たしてきた。ラットでは、同様のノックアウトの報告も2010年になされたが、ES細胞の分化などのため広く普及には至らず、改善が必要であった。近年、ZFNやTALENといった人工ヌクレアーゼによるゲノム編集技術により、ES細胞を用いない遺伝子改変動物の作成が可能となった。さらに2013年、細菌や古細菌が持つ獲得免疫系であるCRISPR/Casを用いたゲノム編集技術が登場し、同システムを応用した動物個体における遺伝子改変の報告もなされた。CRISPR/Casでは、人工的に1本鎖のガイドRNA(sgRNA)を、目的遺伝子の標的配列を認識するようにデザインし合成を行い、細胞に導入することで、任意の部位で遺伝子改変が可能である。sgRNAとCas9mRNAを受精卵に導入することにより、遺伝子ノックアウトラットの作成も報告されラットモデルを用いた個体レベルでの遺伝子の機能解析が可能となった。

上述の様に、肺高血圧の動物モデルでは、使用する動物種により、その病変は大きく異なり汎用されるモノクロタリンモデル、SU5416/低酸素モデルはラットでの病変形成が特徴である(Table 1)。したがって、ゲノム編集によるラット遺伝子操作技術の進歩は、肺高血圧研究の領域では、大きなブレークスルーであると考えられるが、これまでに、同技術を応用した研究は報告されていない。

Table 1 種による肺高血圧の肺血管病変の違い (ヒト、マウス、ラット)

	中膜肥厚	内膜病変	叢状病変
ヒト IPAH	+	+	+
マウス 低酸素	+	-	-
ラット 低酸素	+	-	-
マウス モノクロタリン	-	-	-
ラット モノクロタリン	+	-	-
マウス SU5416/低酸素	+	-	-
ラット SU5416/低酸素	+	+	+

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を用いて作成した BMPR2 遺伝子改変ラットを用い肺動脈性肺高血圧 (PAH) 病変形成における BMPR2 遺伝子異常の意義を検討した。PAH は難治性で、予後不良の疾患であり、2000 年以降 BMPR2 など責任遺伝子が同定され、PAH の病態の理解が進んでいるが、依然として BMPR2 遺伝子変異から病変形成にいたる機序は不明である。これまで、遺伝子改変動物は、主にマウスを用いて行われてきたが、マウスにおいて、高い再現性をもって、ヒト類似の肺高血圧病変を形成するモデルは存在しない。今回 CRISPR/Cas9 システムを応用し BMPR2 ノックアウトラットを作成し、モノクロタリン PH モデルにおいて肺血管病変を検討した。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムによる K/O ラットにおける肺高血圧モデル作成

BMPR2 の Exon1 に位置するプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 直上の標的配列に対してガイド RNA をデザインし、sgRNA と Cas9mRNA を受精卵に導入し作成する。同ラットを野生型 Sprague-Dawley (SD) ラットと交配し、産仔を得、尾から DNA を抽出し、標的配列を含む領域を PCR により増幅し、PCR 産物を直接シーケンスにより遺伝子型を確認する。挿入欠損 (InDel) を確認した個体を K/O とし、野生型をコントロールとして以後の実験に用いる。7 週齢の WT と (+/-) に MCT (60mg/kg) を皮下投与し、投与前 7 日、16 日、21 日、28 日に、肺動脈圧、右室肥大 (RV/[LV+S])、PVD、生存率の解析を行った。

4. 研究成果

WT では MCT 投与後 7 日目には有意な PVD が形成され、16 日には有意な肺動脈圧上昇が認められ 21 日にはさらに進行した。 (+/-) ラットでは、BMPR2 遺伝子に 1 塩基挿入によるミスセンス変異が確認され、肺組織 BMPR2 蛋白、並びに下流の Smad リン酸化が低下していた ($p < 0.01$)。 MCT 投与後 7 日、21 日の検討では、WT、 (+/-) ラットの PH は同等であった。 (mean PAP: 19.2 vs 19.4 [day7], $p=0.91$; 36.4 vs 34.2 [day21], $p=0.85$; RV/[LV+S]: 0.28 vs 0.27 [day7], $p=0.86$; 0.45 vs 0.41 [day21], $p=0.59$; %muscularization: 58.9 vs 60.1 [day21], $p=0.96$)。 MCT 投与 21 日以降死亡が観察され、 (+/-) ラットの生存率は低く RV/[LV+S] は高かった ($p < 0.05$)

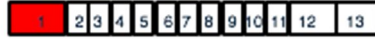
野生型と BMPR2 変異ラットの遺伝子型解析と肺組織での BMPR2 タンパクの減少と下流シグナリングの減弱. 左、DNA 配列 (exon1 の 1塩基挿入) と右、肺組織ウエスタンブロット

Wild Type

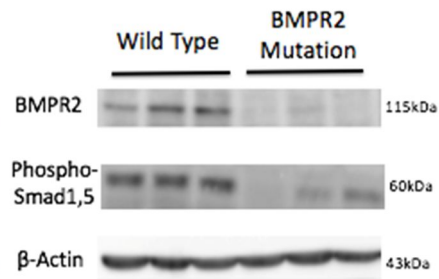
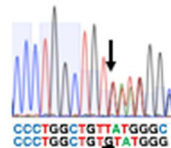
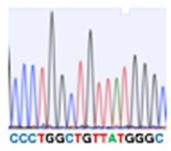


ATGACTTCCTCGCTGCAG
CGGCCCTTTCGGGTGCCC
TGGCTGTTATGGGCCGTC

BMPR2 Mutation



ATGACTTCCTCGCTGCAG
CGGCCCTTTCGGGTGCCC
TGGCTGTGATGGGCCGT



疫学研究が示す BMPR2 遺伝子の PAH 発症における低い浸透率 (約 20%) から、PAH 発症には遺伝子と環境因子の連関が推定され、細胞レベルでは、BMPR2 遺伝子変異による血管細胞機能の変化が報告されている。しかし、肺血管病変形成機序における、BMPR2 の意義は完全には理解されておらず、さらに、BMPR2 異常保有患者が、より重症の PAH に進展する機序は不明である。当研究室も含め、BMPR2 ノックアウトマウスを用いて、多くの研究がなされたが、ヒト同様の病変や進行性の病態を評価することは困難であった。最近、TALEN、Zinc Finger Nuclease (ZFN) などの技術で作成された、BMPR2 変異ラットを用いた PAH 研究が報告されたが (Hautefort A *Circulation*. 2019;139(7):932-948; TianW, *Circulation* 2019 Aug 29.)、他には同様の研究はなく、本研究は、CRISPR/Cas9 による変異導入ラットでの、BMPR2 変異の意義を PH の発症初期から進行期まで縦断的に検討した世界初の研究である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Sawada H, Mitani Y, Nakayama T, Fukushima H, Kogaki S, Igarashi T, Ichida F, Ono Y, Nakanishi T, Doi S, Ishikawa S, Matsushima M, Yamada O, Saji T	4. 巻 199
2. 論文標題 Detection of Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension by School Electrocardiography Mass Screening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Respir Crit Care Med	6. 最初と最後の頁 1397-1406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Mitani Y, Tsuda E, Kato H, Higaki T, Fujiwara M, Ogawa S, Satoh F, Nakamura Y, Takahashi K, Ayusawa M, Kobayashi T, Ichida F, Matsushima M, Kamada M, Suda K, Ohashi H, Sawada H, Komatsu T, Waki K, Shinoda M, Tsunoda R, Yokoi H, Hamaoka K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Emergence and Characterization of Acute Coronary Syndrome in Adults After Confirmed or Missed History of Kawasaki Disease in Japan: A Japanese Nationwide Survey.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Pediatr.	6. 最初と最後の頁 275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Morikawa M, Mitani Y, Holmborn K, Kato T, Koinuma D, Maruyama J, Vasilaki E, Sawada H, Kobayashi M, Ozawa T, Morishita T, Bessho Y, Maeda S, Ledin J, Aburatani H, Kageyama R, Maruyama K, Heldin C-H, and Miyazono K.	4. 巻 12
2. 論文標題 The ALK-1/SMAD/ATOH8 axis protects against hypoxia and development of pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaay4430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 澤田博文	4. 巻 35
2. 論文標題 総説 肺高血圧の基礎研究：小児肺高血圧に関連の深い実験モデル：-肺動脈性肺高血圧・気管支肺異形成・先天性横隔膜ヘルニア	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児循環器学会雑誌	6. 最初と最後の頁 99-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Maruyama Kazuo, Maruyama Junko, Sawada Hirofumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Endogenous and Inhaled Nitric Oxide for the Treatment of Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IntechOpen	6. 最初と最後の頁 89381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Sumitomo Naokata, Mitani Yoshihide, Sawada Hirofumi	4. 巻 82
2. 論文標題 Guidelines for Heart Disease Screening in Schools (JCS 2016/JSPCCS 2016) Digest Version	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-66-0153	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8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kitamura S, Sawada H, Mitani Y, Ohashi H, Yodoya N, Ooya K, Matsushita K, Koike Y, Otake K, Inoue M, Uchida K, Maruyama K and Hirayama M
2. 発表標題 Inhaled Iloprost Added-On to Nitric Oxide Rescues a Neonate with Severe Congenital Diaphragmatic Hernia without Using Extracorporeal Membrane Oxygenation
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kabwe JC, Sawada H, Mitani Y, Oshita H, Zhang E, Maruyama J, Hirayama M, Maruyama K
2. 発表標題 Role of BMPR2 Mutation in Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension: Analysis Using Rats with a Crispr/Cas9-induced Truncating BMPR2 mutation.
3. 学会等名 Japanese Circulation Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironori Oshita, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Jane Kabwe, Noriko Yodoya, Naoki Tsuboya, Kazunobu Ohya, Hiroyuki Ohashi, Kazuo Maruyama, Masahiro Hirayama.
2. 発表標題 Perinatal Hypoxia Aggravates Occlusive Pulmonary Vasculopathy in the Adolescent Rats: Establishment of a Fatal Sugen/hypoxia Model and Its Molecular Basis
3. 学会等名 American Heart Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuhei Toba, Yoshihide Mitani, Hiroyuki Ohashi, Hirofumi Sawada, Noriko Yodoya, Hidetoshi Hayakawa, Masahiro Hirayama, Ayano Futsuki, Naoki Yamamoto, Hisato Ito, Takeshi Konuma, Hideto Shimpo, Motoshi Takao
2. 発表標題 Quantitative Analysis of Chest X-Ray Using Deep Learning to Predict Pulmonary to Systemic Flow Ratio in Patients With Congenital Heart Disease
3. 学会等名 American Heart Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田博文、三谷義英、淀谷典子、大橋啓之、大矢和伸、坪谷尚季、北村創矢、早川豪俊、丸山一男、平山雅浩
2. 発表標題 周産期・新生児期の病態に起因する肺高血圧へのアプローチ -多領域連携の重要性・必要性-
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田博文
2. 発表標題 閉塞性肺血管病変の退縮に向けた実験的アプローチ
3. 学会等名 1st Japan PAH Frontier Summit (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jane Kabwe, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Hironori Oshita, Erquan Zhang, Junko Maruyama, Masahiro Hirayama, Kazuo Maruyama
2. 発表標題 Role of BMPR2 Mutation in Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension: Analysis Using Rats with a Crispr/Cas9-induced Truncating BMPR2 mutation
3. 学会等名 Japanese Circulation Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田博文、三谷義英、大下裕法、篠原務、Jane C. Kabwe、淀谷典子、大橋啓之、西村有平、丸山一男、平山雅浩
2. 発表標題 新規PAH治療標的開発に向けた肺トランスクリプトーム解析の利用
3. 学会等名 日本小児循環器学会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018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	丸山 一男 (Maruyama Kazuo) (20181828)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	三谷 義英 (Mitani Yoshihide) (60273380)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	