

151. iPS 細胞の遺伝子改変による心筋症発症機序の解明

宮岡 佑一郎

*東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 幹細胞プロジェクト

Key words : 心筋症, iPS 細胞, 疾患モデル, RBM20, ゲノム編集

緒言

致死性の心疾患である拡張型心筋症は、心臓移植を必要とする患者の最多の原因疾患である。拡張型心筋症の3分の1は遺伝性であり、近年注目されている比較的新しい原因遺伝子が、心臓特異的なスプライシング因子のRBM20である¹⁾。これまでの研究で、拡張型心筋症患者の約3%がRBM20の変異を持つことが明らかとなっており、これは同定されている76の原因遺伝子のうち、7番目に多い²⁾。さらに興味深いことに、RBM20の点変異がRSドメインのR634からP638アミノ酸残基に集中していることも示されている(全てヘテロ変異)³⁾。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が成体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^{4,5)}。しかし、RBM20の点変異がRSドメインに集中している理由や、変異が心筋症につながる分子機構の詳細は明らかになっていない。

方法および結果

遺伝的背景が同一のヒトの細胞をモデルとしてヒトの心疾患を解析し、RBM20の変異が拡張型心筋症を引き起こす分子機構を解明するために、我々は健常人から樹立したiPS細胞に、ゲノム編集技術を用いてRBM20点変異の1つであるR636S(ヘテロおよびホモ)と機能欠失変異である1塩基の挿入変異(ヘテロ)を導入した。変異の導入には、我々が開発したデジタルPCRによる変異の検出と、連続的限界希釈を組み合わせた手法を用いた^{6,7)}。変異を導入したiPS細胞と、親株の野生型の細胞を心筋細胞へと分化させた。R636Sのヘテロ変異を持つ細胞では、心筋細胞の機能単位であるサルコメアの形成異常が認められ、作製したiPS細胞由来心筋細胞によって、心筋症の症状が再現できたことを示している。R636Sのホモ変異、および1塩基の挿入変異を持つ細胞のサルコメア構造の解析も現在進めている。これらの心筋細胞からRNAを抽出し、illumina HiSeqによる100 bp paired-endのRNAseqを行った。スプライシング様式を網羅的に解析するプログラムであるAltAnalyze⁸⁾を用いて得られたデータを解析し、RBM20の変異によって特異的に引き起こされるスプライシング異常をゲノムワイドに同定した。

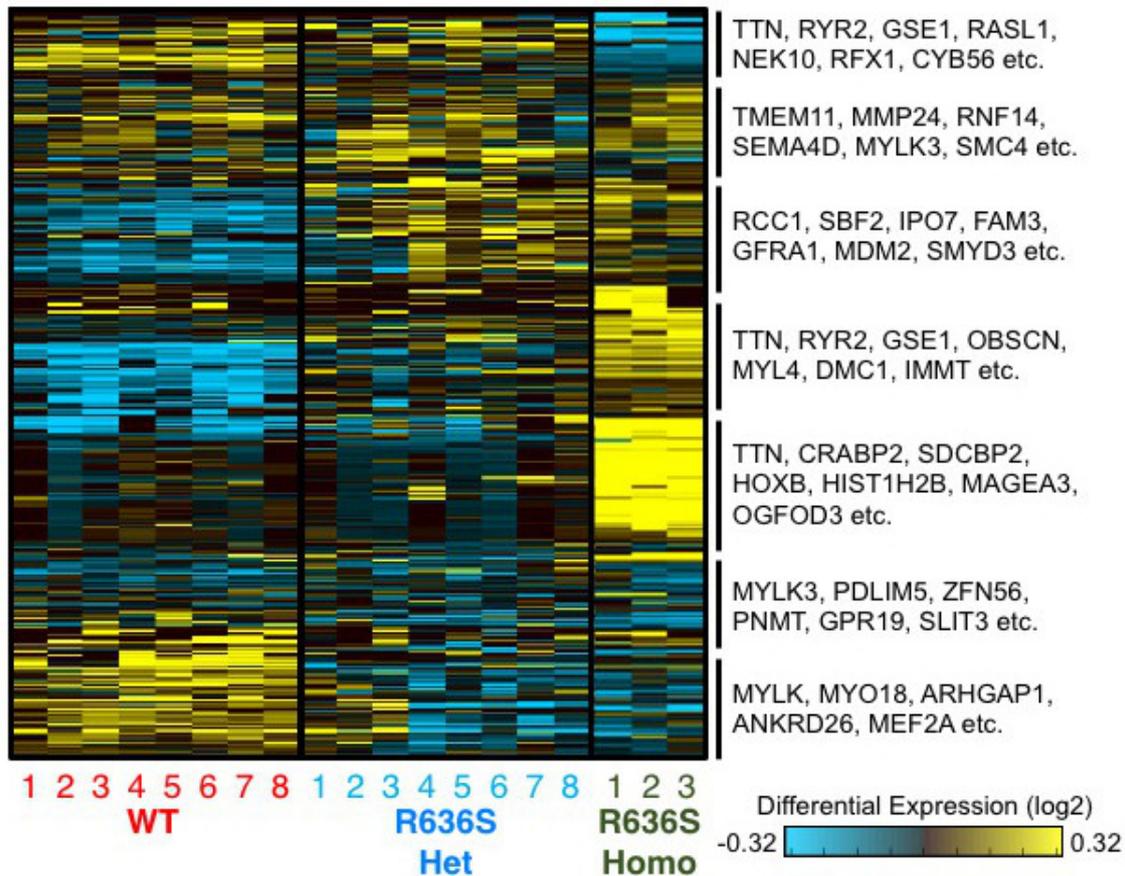


図 1. RBM20 R636S 変異を持つ iPS 細胞由来心筋細胞の RNAseq によるゲノムワイドなスプライシング様式の解析

野生型の親株細胞 (WT、赤)、R636S のヘテロ変異を持つ細胞 (R636S Het、青)、R636S のホモ変異を持つ細胞 (R636S Homo、緑) のスプライシング様式の比較。iPS 細胞から心筋細胞へと独立に分化させたサンプルを、WT、R636S Het、R636S Homo のそれぞれで 8、8、3 セットずつ用意し、RNAseq を行った。各エクソンが転写産物に含まれている頻度を定量した。各エクソンが平均に比べて転写産物に含まれる頻度が高い場合は黄、低い場合を青で表現し、全体のデータをヒートマップで示す。R636S Het で、心筋細胞に関わる多くの遺伝子のスプライシング異常が観察されたことから、これらの遺伝子の機能異常によって心筋症が発症することが予想された。また、R636S Homo では、一部の遺伝子で R636S Het よりも強いスプライシング異常が観察された。しかし、R636S Het と R636S Homo の間で同程度の異常を持つ遺伝子も多数観察された。右に、スプライシング異常が観察されたエクソンを持つ遺伝子の例を示す。

まず、野生型と R636S のヘテロ変異およびホモ変異を持つ細胞の比較を行ったところ、心筋症患者がヘテロ変異を持つことから予想された通り、R636S のヘテロ変異で心筋の機能に関わる *TTN*、*MYLK*、*MEF2A* などの多くの遺伝子にスプライシング異常が観察された (図 1)。これらのスプライシング異常が、実際にどのようにして遺伝子の機能異常につながるのかについて、現在解析を進めている。例えば、*inversin* のスプライシング様式を観察すると、R636S 点変異によって新規のエクソンがスプライシングされ、mRNA として発現していることが示唆される (図 2A)。このエクソンが実際に転写産物に含まれている場合、本来の *inversin* の ORF はフレームシフトを起こし、機能的なタンパク質は産生されないことが予想された。このような例を詳細に解析することで、R636S 変異と心筋細胞の機能低下をつなげる機構の解明を進めている。

また、興味深いことに R636S ヘテロ変異とホモ変異の間でもスプライシング様式の相違が観察された。例えば、*COL16A1*、*RYR2*、*CDC14B*、*GPBP1L1*、*TTN*などの遺伝子ではホモ変異では相乗的な効果が見られ、スプライシング異常がヘテロ変異に比較して増強されていた（図1, 2B）。しかし、その一方で *IMMT*、*NEO1*、*MICAL3*、*DMD*などの多くの遺伝子では、ヘテロ変異とホモ変異を持つ細胞で同程度の強度のスプライシング異常が観察された（図1, 2C）。R636S 変異が単純な機能欠失変異であると仮定すると、多くのスプライシング異常はホモ変異でヘテロ変異よりも顕著になることが予想される。しかし、かなり多くの遺伝子ではヘテロ変異とホモ変異で同等のスプライシング異常も観察されたことから、R636S 変異が単純な機能欠失以外の効果を持つ可能性も考えられた。

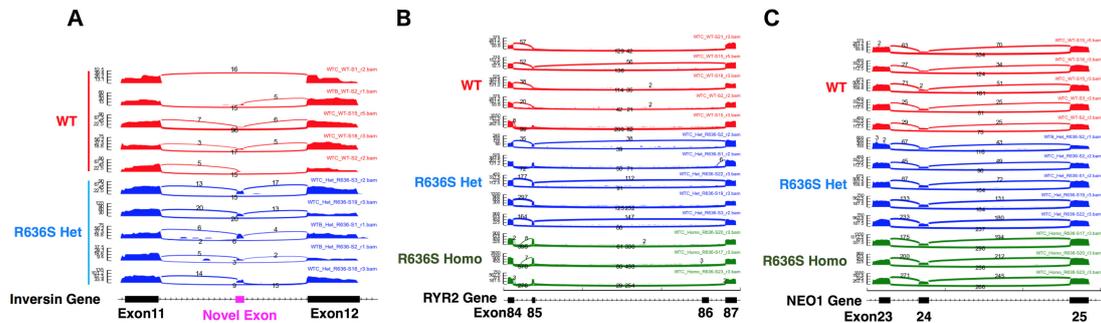


図2. R636S 変異によって生じたスプライシング異常の例

RNAseq データをゲノム DNA 配列にマッピングした図を示す。各図の下部に遺伝子のエクソン構造を示し、RNAseq のリードの蓄積を各ピークの高さで表す。(A) 野生型ではほとんど使われない新規のエクソンが、R636S のヘテロ変異で使われるようになった *inversin* の例。(B) Exon85 が転写産物に含まれる頻度が、R636S ヘテロ変異よりもホモ変異の方が高かった *RYR2* の例。(C) Exon24 が転写産物に含まれる頻度が、R636S 変異ヘテロ変異とホモ変異で同程度だった *NEO1* の例。

そこでさらに直接的に R636S 点変異が機能欠失変異であるかを検討するために、野生型と R636S ヘテロ変異、および 1 塩基挿入のヘテロ変異を持つ細胞の比較を行った。1 塩基挿入変異はフレームシフトを起こして機能欠失変異であると考えられるため、R636S 変異も単純な機能欠失変異であれば、1 塩基挿入変異と R636S 変異のスプライシングへの影響は類似したものになるはずである。しかし、RNAseq データの解析の結果、R636S 変異と 1 塩基挿入変異は、心筋細胞のスプライシング様式に大きく異なる影響を与えることが明らかになった（図3）。これは、R636S 変異が単純な機能欠失変異ではないという仮説をさらに支持する結果であった。

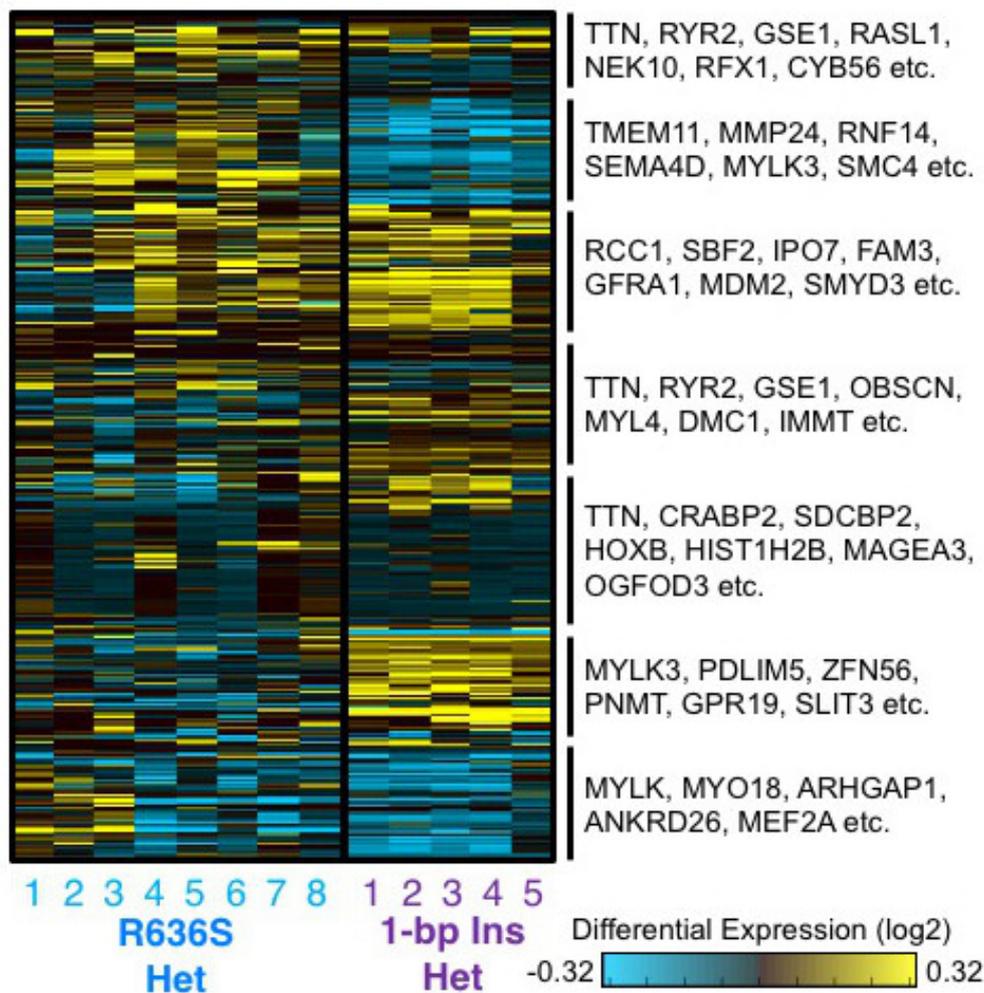


図3. RBM20 R636S ヘテロ変異と1塩基挿入変異のゲノムワイドなスプライシング様式の比較
 R636S のヘテロ変異を持つ細胞 (R636S Het、青) と1塩基挿入ヘテロ変異を持つ細胞 (1-bp Ins Het、紫) のスプライシング様式の比較。R636S Het は図1に示した8サンプルを再び示し、1-bp Ins Het は独立に分化誘導したサンプルを5セット解析した。図1と同様に各エクソンが転写産物に含まれる頻度をヒートマップで示す。R636S Het と1-bp Ins Het では大きく異なるスプライシング異常が認められた。

考 察

RBM20 の単純な機能低下が心筋症発症の原因であると仮定すると、病因となる変異として数多くのフレームシフト変異や、ナンセンス変異が *RBM20* 遺伝子全体に広く分布するはずである。しかしながら、R634 から P638 のわずか5アミノ酸残基に点変異が集中していることから、これらの点変異が単純な機能欠失変異ではないことが推測される。本研究の結果もこの推測を指示する結果となった。変異が集中している5アミノ酸残基は RSRSP という電荷的にも構造的にも非常に特徴的な配列であり、セリンの水酸基がリン酸化される可能性もある。また、RS ドメインはタンパク質間相互作用を担うとも推測されており、我々は RBM20 点変異が、この相互作用を阻害してドミナントネガティブのような効果を持つのではないかとこの仮説を立て、検証を進めている。

今後は、機能欠失変異をホモで有する細胞との比較や、R636S 以外の別の点変異を持つ細胞との比較などを通して、RBM20 変異による拡張型心筋症発症の分子機構をさらに明らかにしていきたい。

共同研究者

iPS細胞の心筋細胞への分化には米国 Gladstone Institutes の Bruce Conklin 博士の協力を得た。また、RNAseq のデータ解析には米国 Cincinnati Children's Hospital の Nathan Salomonis 博士の協力を得た。ここに感謝いたします。また、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Brauch KM, Karst ML, Herron KJ, de Andrade M, Pellikka PA, Rodeheffer RJ, Michels VV, Olson TM. Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Sep 1;54(10):930-41. doi: 10.1016/j.jacc.2009.05.038. PMID:19712804
- 2) Haas J, Frese KS, Peil B, Kloos W, Keller A, Nietsch R, Feng Z, Müller S, Kayvanpour E, Vogel B, Sedaghat-Hamedani F, Lim WK, Zhao X, Fradkin D, Köhler D, Fischer S, Franke J, Marquart S, Barb I, Li DT, Amr A, Ehlermann P, Mereles D, Weis T, Hassel S, Kremer A, King V, Wirsz E, Isnard R, Komajda M, Serio A, Grasso M, Syrris P, Wicks E, Plagnol V, Lopes L, Gadgaard T, Eiskjær H, Jørgensen M, Garcia-Gustiniani D, Ortiz-Genga M, Crespo-Leiro MG, Deprez RH, Christiaans I, van Rijsingen IA, Wilde AA, Waldenstrom A, Bolognesi M, Bellazzi R, Mörner S, Bermejo JL, Monserrat L, Villard E, Mogensen J, Pinto YM, Charron P, Elliott P, Arbustini E, Katus HA, Meder B. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015 May 7;36(18):1123-35a. doi: 10.1093/eurheartj/ehu301. Epub 2014 Aug 27. PMID:25163546
- 3) Refaat MM, Lubitz SA, Makino S, Islam Z, Frangiskakis JM, Mehdi H, Gutmann R, Zhang ML, Bloom HL, MacRae CA, Dudley SC, Shalaby AA, Weiss R, McNamara DM, London B, Ellinor PT. Genetic variation in the alternative splicing regulator RBM20 is associated with dilated cardiomyopathy. *Heart Rhythm*. 2012 Mar;9(3):390-6. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.10.016. Epub 2011 Oct 17. PMID:22004663
- 4) Guo W, Schafer S, Greaser ML, Radke MH, Liss M, Govindarajan T, Maatz H, Schulz H, Li S, Parrish AM, Dauksaite V, Vakeel P, Klaassen S, Gerull B, Thierfelder L, Regitz-Zagrosek V, Hacker TA, Saupe KW, Dec GW, Ellinor PT, MacRae CA, Spallek B, Fischer R, Perrot A, Özcelik C, Saar K, Hubner N, Gotthardt M. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nat Med*. 2012 May;18(5):766-73. doi: 10.1038/nm.2693. PMID:22466703
- 5) Maatz H, Jens M, Liss M, Schafer S, Heinig M, Kirchner M, Adami E, Rintisch C, Dauksaite V, Radke MH, Selbach M, Barton PJ, Cook SA, Rajewsky N, Gotthardt M, Landthaler M, Hubner N. RNA-binding protein RBM20 represses splicing to orchestrate cardiac pre-mRNA processing. *J Clin Invest*. 2014 Aug;124(8):3419-30. doi: 10.1172/JCI74523. Epub 2014 Jun 24. PMID:24960161
- 6) Miyaoka Y, Chan AH, Judge LM, Yoo J, Huang M, Nguyen TD, Lizarraga PP, So PL, Conklin BR. Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection. *Nat Methods*. 2014 Mar;11(3):291-3. doi: 10.1038/nmeth.2840. Epub 2014 Feb 9. PMID:24509632
- 7) Miyaoka Y, Berman JR, Cooper SB, Mayerl SJ, Chan AH, Zhang B, Karlin-Neumann GA, Conklin BR. Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome editing. *Sci Rep*. 2016 Mar 31;6:23549. doi: 10.1038/srep23549. PMID:27030102
- 8) Emig D, Salomonis N, Baumbach J, Lengauer T, Conklin BR, Albrecht M. AltAnalyze and DomainGraph: analyzing and visualizing exon expression data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul;38(Web Server issue):W755-62. doi: 10.1093/nar/gkq405. Epub 2010 May 31. PMID:20513647