

二国間交流事業 共同研究報告書

令和4年4月16日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
東京医科歯科大学・難治疾患研究所
[職・氏名]
准教授・竹内 純
[課題番号]
JPJSBP 120209910

1. 事業名 相手国: オーストラリア (振興会対応機関: OP)との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 心筋-血管内皮の運命決定・成熟・心疾患に関わる Notch シグナルの活性化因子

(英文) Notch-Signal Modifiers for the Specification, the Maturation and the disease of
Cardiomyocytes-Endothelial Cells3. 共同研究実施期間 2020年4月1日 ~ 2022年3月31日 (2年0ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Victor Chang Cardiac Research Institute ・ Professor, Director ・
Harvey Richard Paul

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,800,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,900,000 円
	2年度目執行経費	1,900,000 円
	3年度目執行経費	0 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	7 名
相手国側参加者等	5 名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	0	0	0
2年度目	0	0	0
3年度目	0	0	0

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣:委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。
受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

=*in vivo/in vitro* 心筋—血管相互作用による **Notch** シグナルの活性化と制御機構研究からの発展=

初期発生において、心筋—心臓血管内皮(心内皮)は互いに相互作用しながら運命決定・分化・成熟されることから、発生学研究・心疾患発症機序の理解においても優れた研究モデルである(Monte-Nieto et al., **Nature** 2018)。興味深いことに、心筋と血管内皮細胞は共通の前駆細胞(**Fik1/KDR·Islet1** 陽性細胞)から分化してくることから系譜では非常に近縁の細胞同士である(Yang et al., **Nature** 2008; Laugwitz et al., **Development** 2008; Yamashita et al., **Nature** 2000)。心筋分化—血管内皮細胞の分化には **Notch** の発現可否が重要であるが、各々の細胞運命を選別する機能因子は明らかにされていない。また、その後の心筋増殖・成熟過程においても **Notch** 不活性化が重要であるが、そのメカニズムも不明であった。本交流の結果、3つのことを明らかにできた。

1)オス特異的な心疾患:Notch シグナルを制御する新規クロマチンリモデリング因子 **Arip4** の遺伝子破壊マウスにおいて、オスにおいて重度な心筋症を発症することを見出した(メスでは非常に軽度または変化なし)。本交流のオーストラリアグループと議論した結果、性差ホルモンが産生される以前に **Notch** シグナルの活性化が雌雄において相違がある可能性が明らかとなり、**Arip4** が役割を担っている萌芽的結果を得た。現在、分子機構の研究と生体モデルにおける生理学解析(心エコー・心電図)を用いて、本研究結果の確証を行っている。今夏を目標に投稿を目指す(Asanuma et al., *in preparation* 2022)。また、発生過程において性差の新規非コード RNA 分子(ncRNAs)を単離した(Hori et al., **BMC genomics** 2018)。本研究において、①ホルモン非依存的な制御機構がなぜ生じるのか?②メスにおいては代償的作用があるとする、どのような特定因子なのか?③性差疾患の発症頻度を制御する候補因子として、網羅的な研究解析の必要がある、と考えられる。

2)Shh/FGF シグナル調節因子 **GPC5** および転写因子 **Sall4**:本研究過程において、**Notch** シグナルを活性化する **GPC5** を単離した。**GPC5** はグリピカン系膜タンパク質であるが、**Arp4** の下流制御因子として細胞増殖活性を担っていることを報告した(Takeuchi et al., **PLOS ONE** 2021)。さらに、癌化細胞増殖制御において **GPC5** および心筋細胞増殖の制御機構において **Sall4** の機能について報告した(Higashino et al., *submitted* 2022 ; Katano et al., *submitted* 2022)。

3)血管・心筋運命のスイッチ機構:発生過程の分化以前にすでにゲノム再編成が行われていること、心筋分化・血管内皮分化のスイッチ機構を制御する分子メカニズムが明らかし、現在投稿中である(Morita et al., *submitted* 2022)。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

本交流研究によって、3つの新規な知見を得ることができた。

1)性差特異的な Notch シグナルの活性化と発現制御機構の理解: ncRNA および **Arip4** のエピジェネティック制御機構を生体(オーストラリア)—分子(日本)で連携を取ることによって、今まで不明であった **Notch** の発現制御機構と活性化メカニズムを明らかにできた(Asanuma et al., *in preparation* 2022)。これからの発生学・解剖学・先天性異常に関するサイエンスは、性差を区別して研究解析し今までの研究情報を再確認していく必要があると考えられる。今後は、医学研究者との連携強化、情報解析研究者との研究解析系の構築、学際的な取り組み(日本小児循環器学会・日本先天異常学会・国際 Weinstein 発生・再生学会・Keystone Conference)に積極的に参加し共同研究を開始する。

2)増殖スイッチ機構: **Notch-Shh-FGF** シグナルを集約し、細胞増殖を制御する膜タンパク質 **GPC5**

を報告した (Takeuchi et al., **PLOS ONE** 2021)。さらに、GPC5 は癌化細胞の増殖時及び心臓再生時においても特異的に機能している萌芽的な結果を得ている (Higashino et al., *submitted* 2022; Takeuchi, *in preparation* 2022)。この結果は細胞外シグナルから効率よく情報集約し細胞増殖を行うことを提示した研究結果である。また、心筋に特化して研究を行ってきた。Sall4 は核内で転写調節する転写因子であるが、Myocardin を共役パートナーとして心筋増殖を制御していることが明らかにできた (Katano et al., *submitted* 2022)。今後は、癌化細胞モデルおよび生体モデルを用いて細胞外シグナルから細胞増殖・停止スイッチ機能の解明を目指す。

3) 初期発生過程における中胚葉性細胞の運命決定機構: 哺乳類初期発生において、心筋と血管内皮の運命決定時期と領域については詳細な報告はない。この理由として、非常に早期に運命が決定すること、両者を生み出す前駆細胞が共通であり派生領域が近いこと、が考えられる。そのため、両者の細胞分化機構は別々に研究されてきた。しかしながら、今回、早期においてその決定機構が明らかとなった。血管分化を抑制して心筋運命が制御されることが明らかとなった (Morita et al., *submitted* 2022)。今後は、①分子メカニズムの解明と②胚前方向のみでの特異な制御機構を解明することで、心臓の位置の進化的な意味を探る。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学术交流することによって得られた成果)

学会発表:

- 1) 竹内純 日本小児科学会総会 (京都) 2021
- 2) Jun K. Takeuchi 20th anniversary Gladstone Symposium (サンフランシスコ・米国) 2021
- 3) 掛野佐恵, 森田唯加, 藤川大地, 堀田秋津, 村岡真人, 小柴和子, 古川哲史, 家田真樹, 竹内純 「心房・心室の運命決定と分化転換を制御する因子群」、日本再生医療学会、横浜(web)、2020年

論文化:

- 1) 性差特異的な Notch シグナルの活性化と発現制御機構の理解: 投稿準備中 (Asanuma et al., *in preparation* 2022)。
- 2) 増殖スイッチ機構: 論文化 (Takeuchi et al., **PLOS ONE** 2021)、投稿中および投稿準備中 (Higashino et al., *submitted* 2022; Katano et al., *submitted* 2022; Takeuchi, *in preparation* 2022)。
- 3) 初期発生過程における中胚葉性細胞の運命決定機構: 投稿中 (Morita et al., *submitted* 2022)

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

本研究交流を通して、基礎生物学・基礎医学研究の研究協力体制を学ぶ機会を得たことは非常に貴重であった。時差がほぼないため、同時刻での議論が可能である。さらに、国際的な系統発生学・循環器学リーダー達の協調的研究連携ノウハウを直接学べたことは大きな財産である。今後、国内においても基礎生物学と基礎医学が連携した融合研究を構築し、次世代へ継承すべきだと痛感した。本研究において、少なくとも2つの課題に対して克服する可能性を見出した。

- 1) 個別医療の一つ、性差医学への新規概念の提示
- 2) 邦的研究と豪的研究の相違と協調

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

本研究において、3名の若手研究者および1名の学生の研究実績を得た (Morita et al., *submitted* 2022; Katano et al., *submitted* 2022; Asanuma et al., *in preparation* 2022; Kakeno et al., *in preparation* 2022)。さらに、本研究を通して研究留学への意欲向上につながったことから、今後も若手研究者・学生を参加

型の国際交流事業は継続すべきであると考えおり計画之中である。ただ、2年間かけて得た結果を形（論文）にするには、実際には他の研究財源を必要としている。このことから、将来、慎重に国際科学研究を担っていく可能性ある若手の育成には、2年の養成実施期間に1年の結果報告期間が必要であると感じている。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

今回の結果では大きく2つの展開が期待される。

- 1) 現状で分子メカニズムが解明されていない男性優位心疾患発症（心筋緻密化障害・拡張型心筋症病態）の理解に貢献すると考えられる。心筋緻密化障害は1/10万人の割合で発症する心筋症であり、スポンジ状心筋層が遺存し心機能が低下する。また、男性優位の疾患であるが多く原因不明でエピジェネティックな要因との関係性が議論されており、今後は臨床研究者との密に交流を行い、疫学研究と遺伝子変異を同定する。また、研究結果2)はシグナル因子であるため治療展開に適していると考えられ、将来的には緻密化障害を緩和する方法を探索する。
- 2) 男性・女性のおミックス解析。今までホルモン依存的と考えられていたが、初期胚発生時期から相違が考えられる。この予測をもとに遺伝的・細胞運命地図において既に男女間での解剖学的違いについての研究展開が見込められ、これからは性ホルモンが産生される時期以前でのおミックス解析と細胞系譜解析を実施する。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

現在、研究展開において2申請中であるため記載を遠慮したい。