

二国間交流事業 共同研究報告書

令和5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 120219910

1. 事業名 相手国: 米国 (振興会対応機関: OP) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) ヒト心疾患発症重症化の理解と緩和を目指す in vivo/in vitro 統合研究

(英文) Integrated research with in vivo-in vitro technology for understanding and repairing

cardiac heart disease in humans.

3. 共同研究実施期間 2021年4月1日 ~ 2023年3月31日 (2年0ヶ月)【延長前】 年 月 日 ~ 年 月 日 (年 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Gladstone Institute・Director, Professor・Bruneau G. Benoit

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	- 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	9名
相手国側参加者等	6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(0)
2年度目	0	0	0(0)
3年度目			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)

本交流研究は、『*TBX* 遺伝子の研究を通して、『遺伝子変異箇所に依存した形態・機能性異常の分子メカニズム』の課題を紐解くこと』をゴールとしている。*TBX/Tbx* 遺伝子群は 10 種類以上も報告されており、基本的な分子機能は保存されているが発現箇所・時期が多岐に渡っている。申請者と相手国は、*Tbx5* 遺伝子における研究交流実績があり、研究報告もある(Takeuchi et al., **Nat. Commun.** 2011; Takeuchi & Bruneau, **Nature** 2009)。さらに、*Tbx5* 遺伝子はヒトでは先天性心臓-上肢疾患は発症する Holt-Oram 症候群の責任遺伝子であり、頻繁に重症化する (Bruneau et al., **Cell** 2001)。これらの理由から、本研究を遂行する上で優れた研究モデルとなると考えられた。そのため、限られた期間内である本交流事業では *TBX* 遺伝子群のうち *Tbx5* に着目し、2つの因子の機能解析を通じて *Tbx5* 疾患発症理解を目指してきた。また、本研究では機能解析のために新技術を構築して研究を遂行した。その結果、本交流事業では、2つの新規な発見することができた。以下に記す。

1) 新規非コード RNA Gm5563 理解のための新規技術を用いたモデル生物作製および生体解析

*組織学・生理学解析および生化学解析を用いた Gm5563/Gm421017 の生体機能の理解: 生体モデルを作成して組織学解析を行なった。また、そのようなタンパク質と相互作用しているのか調べることは、Gm5563 の生体機能が明らかにできるだけでなく、非コード RNA の包括的な機能理解に繋がると考えられる。

*迅速な生体モデル作成のための新規技術開発: 技術革新 (iGONAD 法) を確立した。

交流研究先であるグラッドストーンチームは 2021 年度にエピゲノムによる運命転換研究結果を報告している (Hota et al., **Nature** 2022)。よって、同研究結果を基盤として次年度中に論文投稿を目指す。

2) Tbx5 制御下左室筋増殖を制御する Sall4 モデル生物作製および生体解析

*細胞増殖を制御する Sall1Sall4 の機能: 心臓特異的に *Sall1/4* の機能を阻害するマウス (*Sall* 機能阻害マウス) を用いた結果で、*Sall1/4* が *Cdk1*、*Ccnb1*、*Ccne2* の発現を制御して心筋細胞の増殖と維持を制御することが示された。

*細胞増殖を制御する Sall-Myocardin(Myocd)-SRF 機能複合体の機能: *Sall4* と *Srf/Myocd* が共役して *Cdk1*、*Ccnb1*、*Ccne2* 遺伝子座近傍のエンハンサー領域に結合し *Cdk1*、*Ccnb1*、*Ccne2* 遺伝子発現制御に寄与していることが示された。2022 年国際発生生物学会(SDB)にて発表し、現地で相手国研究者と論文文化に向けた方向性について議論した。また現在投稿中 (Katano et al., **Development**)。

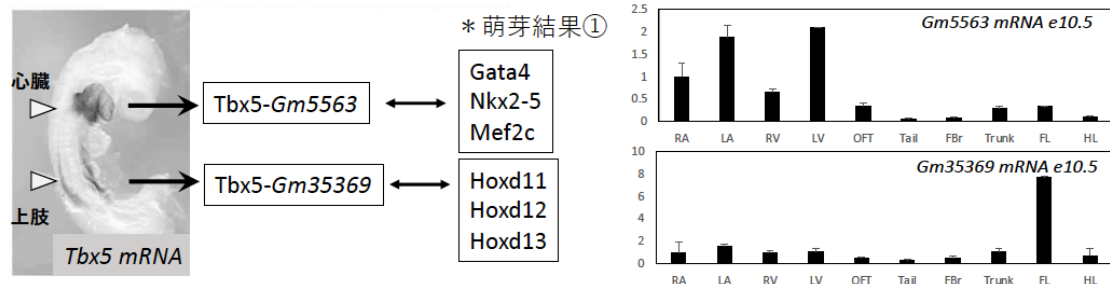
Sall-Myocardin-SRF* 多重遺伝子破壊モデル (*Sall1/Sall4/Myocd* TKO マウス) の作成: *Sall4gt/+* 胚および *Myocd* KO 胚では心室筋増殖が抑制されること報告されているが (Huang et al., **J. Clin. Invest. 2012; Huang et al., **PNAS** 2009; Koshiba-Takeuchi, Takeuchi, **Nat. Commun.** 2006)、多重遺伝子破壊マウス TKO 胚の心臓形成はより重症化した表現型を示した。この結果は遺伝学的にも相互作用が存在することが示唆された。

(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)

1) 新規非コード RNA Gm5563 理解のための新規技術を用いたモデル生物作製および生体解析

研究代表者は、本研究においてグラッドストーンチームと議論し、生体遺伝子破壊技術を用いて多重遺伝子破壊マウスの作成、およびその表現型解析を行ってきた。Gm5563/Gm421017 の機能解析を開始する前に、組織における局在を調べた (図 2)。興味深いことに、Gm5563 は心臓領域で強く、Gm421017 は上肢で強く局在していた。

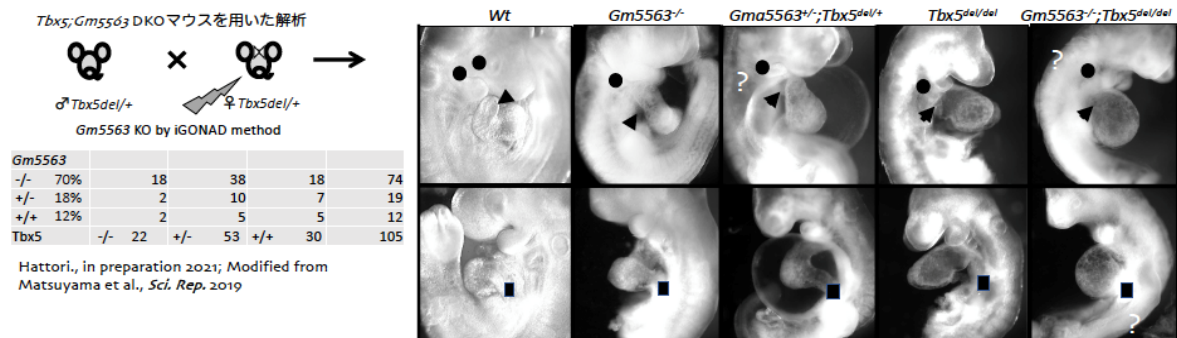
(図2) 本研究の目的: *lncRNA*の機能理解から*Tbx5*依存的な心臓-上肢特異的発症重症化のメカニズムを解く



* 組織学・生理学解析を用いた *Gm5563/Gm421017* の生体機能の理解: 先行研究で心臓発生過程において重要な転写因子群のプロモーターには逆方向に転写される *lncRNA*(bidirectional *lncRNA*)のうち、*Tbx5* 遺伝子座に存在する *Gm5563* 破壊マウスを作出しており、*Tbx5* 遺伝子との二遺伝子単一对立遺伝子破壊マウス (*Gm5563^{+/-};Tbx5^{+/-} Double Hets*) の表現型は *Tbx5* 遺伝子破壊(*Tbx5* KO)の表現型と酷似することを見出している (Hattori, 2023 [in preparation]; Hori, *BMC genomics* 2018)。さらに、*Gm5563^{-/-}/Tbx5^{+/-}*ホモマウスは/*Tbx5^{+/-}*単一遺伝子破壊マウスより重度の奇形胚を生じ、*Gm5563^{+/-}/Tbx5^{+/-}*多重ヘテロマウスは *Tbx5^{+/-}*マウスと同程度の重度奇形を生じていた (図3)。よって、*Tbx5* の機能的な活性化に関与していると予想される。

(図3) 生体機能: *Gm5563;Tbx5*多重遺伝子破壊モデルを用いた組織学・生理学解析

* 萌芽結果②



* *Gm5563^{+/-};Tbx5^{+/-} Dhets* = *Tbx5^{-/-} KO*と同症状

* *Gm5563^{-/-};Tbx5^{-/-} DKO* (二重遺伝子破壊マウス) は、流出路異常(▲), 咽頭弓形成不全(●) and 流入路・心房消失(■)を生じる

* 生化学を用いた *Gm5563/Gm421017* の生体機能の理解: RNA-タンパク質相互作用実験。RNA-タンパク質免疫沈降法(RIP)を用いた *Gm5563* と心臓転写因子 (*Tbx5*, *Gata4*, *Tbx1*, *Mef2c*) との相互作用を調べたところ、*Gm5563* が *Tbx5* 特異的に共役している萌芽的結果を得た。この結果は非コード RNA が特定の転写因子と相互作用していることを示す。

* 迅速な生体モデル作成のための新規技術開発: 本研究に必要な遺伝子破壊技術 (Tetraploid aggregation, *in utero* CRISPR/Cas) の実績をもとに施設を立ち上げ、技術革新 (iGONAD 法) を目指した (松山誠博士: 重井医学研究所室長との共同研究)。同技術は遺伝子破壊生物の作出が迅速に行えるだけでなく、実験生物数を抑えることができる利点がある。国内では非常に限られた研究室でのみ成功しており、申請者の実績は非常に優位性が高いことがメリットである。

交流研究先であるグラッドストーンチームは 2021 年度にエピゲノムによる運命転換研究結果を報告している (Hota et al., *Nature* 2022)。よって、同研究結果を基盤として次年度中に論文投稿を目指す。また、*Tbx5* 遺伝子座近傍にはもう一つ別の非コード RNA(*Gm42017*)が存在することがわかった。*Gm42017* はエンハンサーRNA として機能している可能性があり、今後継続して研究を遂行する。

2) Tbx5 制御下左室筋増殖を制御する Sall4 モデル生物作製および生体解析

*細胞増殖を制御する **Sall1/Sall4** の機能：心室壁の緻密化には心筋細胞の増殖が重要であり、その不全は心室緻密化障害などの心筋症の発症につながる。近年の研究から、心筋細胞の増殖に関わるシグナル伝達系や **Cdk/Cyclin** 遺伝子は明らかにされつつあるが、それらを制御する上流の転写制御ネットワークについては未だ不明な点が多い。**Zn finger** 転写因子の **SALL1** と **SALL4** は先天性心疾患の原因因子として知られており、マウスにおいて心筋と心臓前駆細胞に強く発現していることが報告されている。**Sall1/4** が心臓形態形成に及ぼす影響について詳細に解析するために、心臓特異的に **Sall1/4** の機能を阻害するマウス (**Sall** 機能阻害マウス) を作製して表現型を詳細に解析したところ、心室・心房中隔の形成不全、肉柱心筋の低形成と心室壁の著しい菲薄化が認められた。そこで、心筋細胞の増殖・維持への影響を調べると、**Sall** 機能阻害マウスでは増殖心筋細胞の著しい減少とアポトーシスの亢進が認められた。これらの結果は、**Sall1/4** が心筋細胞の増殖と維持を制御することで、心室壁の緻密化に関与していることを示唆する。次いで、E10.5 の心室領域を用いて RNA-seq による発現解析を行った結果、**Sall** 機能阻害マウスでは細胞周期に関連する遺伝子群の発現が著しく発現変動しており、心筋細胞の増殖促進に重要な **Cdk/Cyclin** 遺伝子の **Cdk1**、**Ccnb1**、**Ccne2** の発現が特に減少していた。

*細胞増殖を制御する **Sall-Myocardin(Myocd)-SRF** 機能複合体の機能：RNAseq の結果から、心室壁の緻密化に重要な転写因子 **Srf** と **Myocd** の発現が **Sall** 機能阻害マウスにおいて抑制されていた。coIP 解析の結果から、興味深いことに **Sall4** と **Srf/Myocd** が共役していること、さらに ChIPseq の結果から **Sall4** と **Srf/Myocd** は **Cdk1**、**Ccnb1**、**Ccne2** 遺伝子座近傍のエンハンサー領域に結合していることがわかった。このことから、**Sall-Myocd-SRF** 機能複合体として機能し **Cdk1**、**Ccnb1**、**Ccne2** 遺伝子発現制御に寄与していると示唆される。初代培養心筋細胞を用いた siRNA によるノックダウン(KD)実験の結果から、**Sall4** と **Myocd** のダブルノックダウン (DKD)ではそれぞれの単独 KD よりも心筋細胞の増殖が有意に抑制されていた。以上の結果から、**Sall4** が **Srf/Myocd** と協調しながら **Cdk/Cyclin** 遺伝子の発現を制御し、細胞周期の進行を促進することで心室壁の増殖に寄与するという、新たな分子メカニズムが明らかになった。現在投稿中 (Katano et al., **Development**)。

* **Sall-Myocardin-SRF** 多重遺伝子破壊モデル (**Sall1/Sall4/Myocd** TKO マウス) の作成：前述で記載した新技術の *in utero* CRISPR/Cas 法(iGONAD)を用いることにより、効率よく短期間 (F0 で解析可能) で多重遺伝子破壊マウスが作出に成功した。**Sall4gt/+**胚および **Myocd** KO 胚では心室筋増殖が抑制されること報告されているが (Huang et al., **J. Clin. Invest.** 2012; Huang et al., **PNAS** 2009; Koshiba-Takeuchi, Takeuchi, **Nat. Commun.** 2006)、TKO 胚の心臓形成はより重症化しており、単層構造のみならず流出路形成欠損を伴っていた。この結果は遺伝学的にも相互作用が存在することが示唆された。現在、投稿準備中である。

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

1 論文

Takeuchi M., Takeuchi K., Monobe Y., Takai T., Yamaguchi R., Furukawa T., Akagi K., Takeuchi JK. Subcellular localization of glypican-5 is associated with dynamic motility of the human mesenchymal stem cell line U3DT. PLOS ONE doi.org/10.1371/journal.pone.0226538 2021 *: correspondence to this work 「査読有」

*Sutrisno AA, Katano W, Kawamura H, Tajika Y, Koshiba-Takeuchi K. Combined method of whole mount and block-face imaging: Acquisition of 3D data of gene expression pattern from conventional

2 口頭発表(国際)

- * Takeuchi JK. International Symposium at The Gladstone 2021(zoom) 2021
- * Katano W, Mori S, Tajika Y, Takeuchi JK and Koshiba-Takeuchi K. Interaction between Sall1/4 and Myocd is critical for myocardial compaction through the regulation of cyclin genes. SDB Annual meeting, 2022
- * Katano W, Mori S, Tajika Y, Takeuchi JK and Koshiba-Takeuchi K. Sall1/4 are required for cardiac conduction system development by delimiting Hcn4-positive region. 55th Annual Meeting of JSDB, 2022

3 口頭発表 (国内)

- * 竹内純 日本小児学会総会(京都)2021
- * 片野亘, 森俊太, 多鹿友喜, 竹内純, 小柴和子 Sall1/4 は Srf/Myocd と協調して胎児期の心筋増殖を制御する 2022 年日本心臓血管発生研究会
- * Katano W, Mori S, Tajika Y, Takeuchi JK and Koshiba-Takeuchi K. Sall1/4 cooperate with Myocd to promote cell cycle progression for ventricular myocardial compaction. 2022 年分子生物学会

- (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。時差が生じるため、web での議論に苦勞を要した。一方、次世代を担う若手学生が国際学会に参加する機会が設けられ、論文化することができたこと、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) 本国内研究と米国研究の相違と協調

- (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、2名の学生の研究実績を得た (Sutrisno et al.,2022; Katano et al., 2023)。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当中である。ただ、2年間かけて得た結果を形(論文化)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)

今回の交流事業で大きく2つの展開が期待される。

- 1) 非コード RNA (lncRNA : Gm5563/Gm42017)の核内制御機構の可視化 : RIP 解析により核内で転写因子 Tbx5-クロマチン因子 Brg1 との共役化の強化に関わることがわかった。この系を発展さ

せ、*biotin-Gm5563*(および *Gm42017*)発現生体モデルを用いて、共役因子を網羅的探索、特異的なゲノム制御領域を探索する。さらに、*Gm5563/ Gm42017* 遺伝子変異モデルを用いて組織学解析・生理学解析から同因子の機能理解を目指す(B.Bruneau 教授・D.Srivastava 教授 (UCSF グラッドストーン研究所) との共同研究；国際共同加速基金 B 継続中)。

また先行研究で、胚発生過程で転写される *lncRNA* をプロファイル化し主要遺伝子の近傍には組織特異的発現する *lncRNA* が存在することを見出しており (Hori, *BMC genomics* 2018)、その理由についてゲノム構造から明らかにする。

- 2) Sall4 を中心とした心筋増殖機構と疾患解明への課題: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ビ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。

(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)

科学研究費助成事業 国際共同加速基金(国際共同強化(B):2022-2025)に採択され、本事業を発展させる機会を得られた。