

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15900

研究課題名（和文）チロシンキナーゼ遺伝子異常による先天性心疾患を伴う症候群の発症メカニズム解析

研究課題名（英文）Mechanism analysis of a syndrome with congenital heart disease due to tyrosine kinase gene abnormality

研究代表者

山本 英範（Yamamoto, Hidenori）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80801662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：生殖細胞ABL1の機能獲得型変異により先天性心疾患を伴う症候群を発症することが知られているが、その発症メカニズムは不明である。

実験用マウス（C57BL/6）に対してCRISPR-Cas9によりAbl1の機能獲得型変異をノックインした。モデルマウスの胎児心臓から総蛋白を抽出し、プロテオーム解析を行ったところ、心臓発生にも関与することが知られている蛋白Aの発現がモデルマウスにおいて著増していた。さらにその下流蛋白の免疫染色を行った結果、アポトーシス制御に関する蛋白のリン酸化が抑制されていることが確認され、心疾患の発症メカニズムに関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABL1機能獲得型変異による心疾患発症のメカニズムは未解明である。本研究は近年確立した実験手法であるCRISPR-Cas9・プロテオーム解析などを用いて世界で初めてその解明を試みた。骨髄細胞におけるABL1の機能獲得が白血病の原因になることが知られているが、今回の研究により生殖細胞においては骨髄とはまったく異なる分子メカニズムが関与する可能性が示唆された。今後、培養細胞実験で検証を行ったうえで学術発表を計画している。

研究成果の概要（英文）：Germline ABL1 gain-of-function mutations are known to cause a syndrome associated with congenital heart disease, but the mechanism of pathogenesis is unknown.

We knocked in gain-of-function mutations in Abl1 by CRISPR-Cas9 in laboratory mice (C57BL/6). Total proteins were extracted from fetal hearts of model mice, and proteomic analysis revealed that the expression of protein A, which is also known to be involved in cardiac development, was markedly increased in the model mice. Immunostaining of downstream proteins of s showed that the activation of proteins related to the regulation of apoptosis was suppressed, suggesting their involvement in the pathogenesis of cardiac disease.

研究分野：先天性心疾患

キーワード：チロシンキナーゼ 先天性心疾患 CRISPR-Cas9

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) *ABL1* はチロシンキナーゼを発現する前癌遺伝子である。骨髄細胞においては *BCR* との融合遺伝子(フィラデルフィア染色体)が慢性骨髄性白血病の原因として知られている。
- (2) 生殖細胞において *ABL1* の機能獲得型変異が先天性心疾患を伴う症候群を発症することが2017年に初めて報告されたが、そのメカニズムは未解明である。
- (3) 研究代表者は家族性先天性心疾患の家系において *ABL1* の新規機能獲得型変異を発見した。培養細胞を用いた強制発現実験において *UFD1*、*AXIN1*、*ATRX* のリン酸化が本症候群の発症に関与する可能性を報告した。

### 2. 研究の目的

機能獲得型変異をロックインしたモデルマウスを用いて *ABL1* 機能獲得型変異による先天性心疾患の発症メカニズムを解明すること。

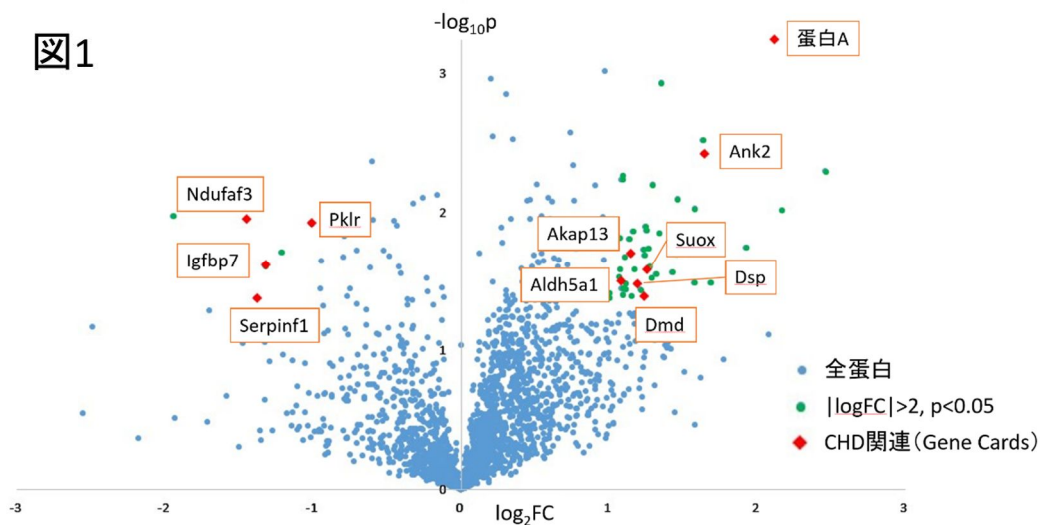
### 3. 研究の方法

- (1) 実験用マウス(C57BL/6)の *Ab1* に対して CRISPR-Cas9 法を用いて機能獲得型変異をロックインする。ロックインする変異は、当時ヒトにおいて報告されていた3つの機能獲得型変異のうち gRNA/Cas9 の切断効率やオフターゲット変異のリスクを元に検討し決定する。ファウンダーマウスを野生型と交配してヘテロで系統維持する。
- (2) モデルマウスの表現型解析は成獣に対して超音波検査などで行う計画であったが、研究開始後にモデルマウスの生存率が極めて低いことが判明したため胎児サンプルを使用する方針に変更した。モデルマウスの精子と野生型の卵子を用いて体外授精を行い ICR マウスに胚移植する。妊娠19日目にセボフルレンによる吸入麻酔下に帝王切開で娩出する。
- (3) 胎児心臓から総蛋白を抽出してプロテオーム解析を行い、心疾患の発症に関与する蛋白を検討する。さらにその関連蛋白について免疫染色等で検証する。

### 4. 研究成果

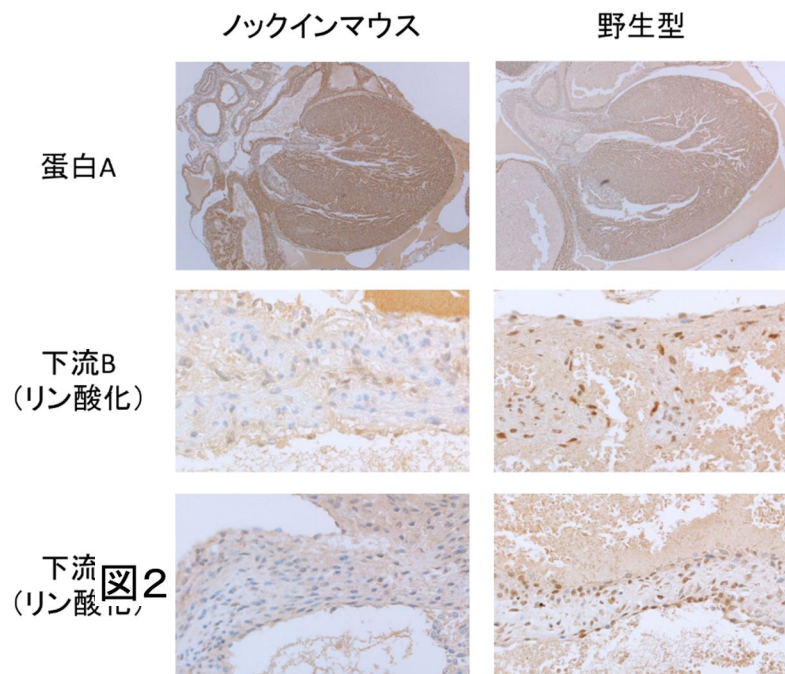
- (1) モデルマウス(ヘテロ)と野生型を交配して得られたマウスを3週齢で遺伝子型判定したところ、ヘテロ率は約20%(理論値50%)と少なく、さらにその一部は成獣になるまでに死亡した。十分な数の成獣サンプルを得ることは困難と判断し、胎児サンプルで検討する方針とした。体外受精・胚移植により得られた胎児マウスにおいてもヘテロ率は同様に約20%であった。

図1



(2) 胎児心臓のプロテオーム解析では、モデルマウスにおいて蛋白 A(先天性心疾患の発症に関与することが知られている)の発現が著増していた。(図1)

(3) 胎児マウスの心臓薄切を作成し、免疫染色を行った。プロテオーム解析の結果通り、モデルマウスにおける蛋白 A の発現亢進が確認された。また蛋白 A のカスケード下流蛋白である B および C (いずれもアポトーシス制御に関与)のリン酸化が抑制されていることが確認された。(図2)これらの蛋白のリン酸化(=活性化)抑制が先天性心疾患の発症に関与していると考えられた。



#### 【今後の展望】

実験用培養細胞を用いて、野生型および変異型 *ABL1* の強制発現実験を行い、免疫染色の結果の検証を行ったうえで学術論文として報告する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Go Kiyotaka, Morimoto Yoshihito, Fukasawa Yoshie, Kato Taichi	4. 巻 64
2. 論文標題 Tension hemothorax 1 week after pericardiocentesis associated with thrombocytopenia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.15395	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 Fukasawa Yoshie, Yamamoto Hidenori, Ito Miharu, Saito Akiko, Go Kiyotaka, Morimoto Yoshihito, Yasuda Kazushi, Sato Yoshiaki, Hayakawa Masahiro, Kato Taichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Case report: High-dose epoprostenol therapy in pediatric patients with pulmonary hypertension and developmental lung disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2023.1116434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Hidenori, Inagaki Hidehito, Hayano Satoshi, Kurahashi Hiroki, Kato Taichi	4. 巻 64
2. 論文標題 Familial cardiac septal defect due to a novel nine base deletion in <i>TBX20</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14995	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 Morimoto Yoshihito, Go Kiyotaka, Yamamoto Hidenori, Fukasawa Yoshie, Nakai Michikazu, Morihana Eiji, Yasuda Kazushi, Nishikawa Hiroshi, Ohashi Naoki, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Conception by assisted reproductive technology in infants with critical congenital heart disease in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive BioMedicine Online	6. 最初と最後の頁 163~170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rbmo.2021.10.005	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 Go Kiyotaka, Horiba Kazuhiro, Yamamoto Hidenori, Morimoto Yoshihito, Fukasawa Yoshie, Ohashi Naoki, Yasuda Kazushi, Ishikawa Yuichi, Kuraishi Kenji, Suzuki Kazutaka, Ito Yoshinori, Takahashi Yoshiyuki, Kato Taichi	4. 巻 396
2. 論文標題 Dysbiosis of gut microbiota in patients with protein-losing enteropathy after the Fontan procedure	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 131554 ~ 131554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2023.131554	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山本 英範, 郷 清貴, 森本 美仁, 深澤 佳絵, 加藤 太一
2. 発表標題 ZC4H2機能喪失は遺伝子Xの発現調節を介して徐脈性不整脈を呈する ~ プロテオーム解析を用いた遺伝性不整脈の機能解析 ~
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidenori Yamamoto, Hidehito Inagaki, Kiyotaka Go, Yoshihito Morimoto, Yoshie Fukasawa, Hiroko Goto, Sayaka Mii, Hiroki Kurahashi, Taichi Kato
2. 発表標題 Comprehensive genetic analysis of 9 families with hereditary WPW syndrome
3. 学会等名 Human Genetecs Asia (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------