

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0218

研究課題名（和文）ヒト先天性心疾患発症を惹起する非コード領域の制御機構の理解と基盤研究

研究課題名（英文）Roles of non-coding genomic regions for understanding congenital heart defects in human

研究代表者

竹内 純 (Takeuchi, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：10451999

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：心臓疾患の発症を惹起し重症化する非コードRNAの機能を明らかにした。さらに、肉腫化においても同様な機能が存在することを報告した。3年間で推進した研究結果を以下に記す。

1:モデル生物を用いた機能解析：心疾患を発症する生体モデルを作成し下流制御因子を報告した（PLOS ONE 2021; Cir. J. 2020）。2:ヒト非コードRNAの遺伝子変異：ヒトTBX5-AS1:2の遺伝子変異は心疾患を発症。今後は別のTBX5-AS1:1の分子メカニズムを追跡する。3:RIP法を改変したRNA-タンパク質の相互作用の解明。4:マウス型心臓オルガノイドの作成に成功（Nat. Commun. 2020）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ヒト先天異常症の重症化のメカニズムの理解には遺伝子非コード領域の制御機構の重要性は認知されていた。本研究では非コードRNAは特異的な疾患責任遺伝子と相互作用し、遺伝性疾患の発症、および重症化せることを報告した。さらに、下流標的遺伝子の発現制御を担っていること、細胞性質をエピジェネティックに変化させることも明らかにした。

今後は、非コードRNAがどのように転写されるのか、相互作用パートナーや標的遺伝子への選択機構を明らかにする必要性が残された課題である。加えて、心臓疾患と頭頸部疾患は密に遺伝的な関係性があり、より強固な国際的な共同研究チームを組織することが不可欠であると結論した。

研究成果の概要（英文）：We have identified the function of non-coding RNAs as a trigger for congenital heart diseases or an accelerator for the development of cardiac disease severely. Furthermore, we reported that similar functions exist not only in cardiac disease but also in sarcomatization. The following are the results of the research promoted during the 3-year period. 1: Functional analysis using model organisms: We created a biological model and found that the incidence of cardiac disease is enhanced. Specific downstream regulators were identified and reported (Takeuchi et al., PLOS ONE 2021; Yang et al., Cir. J. 2020). 2:The genetic mutation of a human noncoding RNA (TBX5-AS1:2) has been shown to cause cardiac disease, and we will now trace the molecular mechanism of another noncoding RNA (TBX5-AS1:1). 3:Elucidation of RNA-protein interactions using a modified RIP method (in preparations 2023). 4:Successfully created cardiac organoids from mouse ES cells: (Lee et al., Nat. Commun. 2020).

研究分野：エピゲノム、小児医学

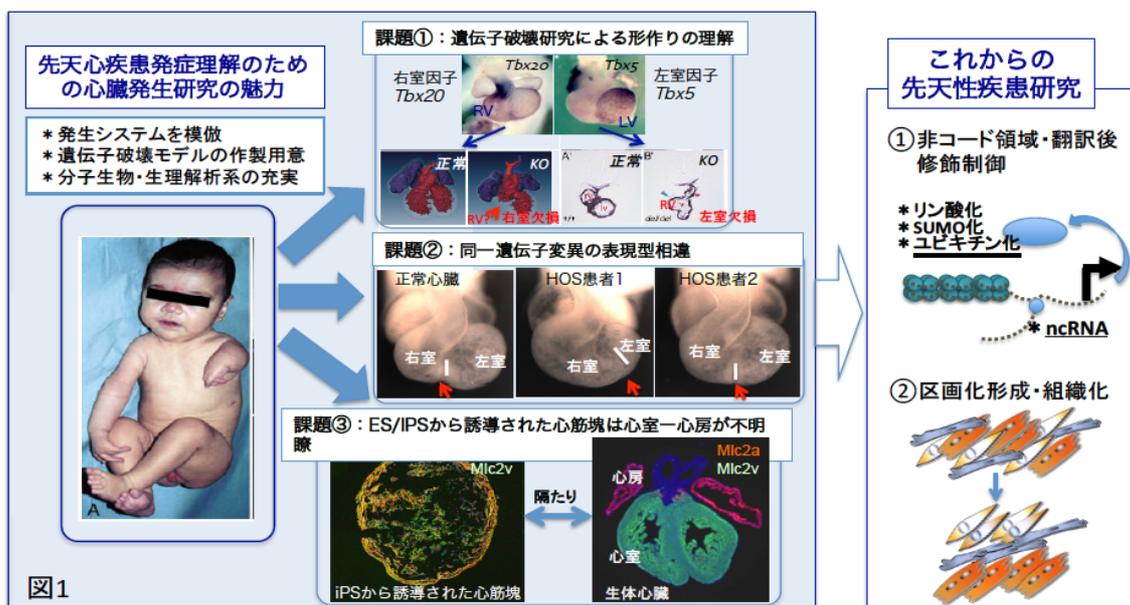
キーワード：先天性疾患 エピゲノム クロマチン制御機構 心臓疾患 非コードRNA 心臓オルガノイド 胎児器官形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究種目名：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化（B））
2. 課題番号：19KK0218
3. 研究課題：ヒト先天性心疾患発症を惹起する非コード領域の制御機構の理解と基盤研究
4. 補助事業期間：令和元年度～令和3年度

1. 研究開始当初の背景

申請者は心室・心房中隔欠損を含む心疾患発症原因のメカニズムの理解に向けて、モデル生物を構築し長期にわたって研究を推進してきた（図1 課題①：Hori et al., *BMC Genomics* 2018; Takeuchi et al., *Nat. Commun.* 2011; Zhu et al., *PNAS* 2008; Koshiba-Takeuchi et al., *Nat. Genet.* 2006; Takeuchi et al., *Development* 2005）。転写因子である *TBX5* 遺伝子変異(HOS)患者は、発症頻度は北米で 1/25000 であり上肢と心臓に疾患が見受けられ（下図1左）、多様な表現型を呈し重篤性が高い場合には胎生致死である（左室 LV 低形成の度合い：図1 課題②）。同一遺伝子変異であるにも関わらず、ヒト心疾患の表現型は発生過程から多岐にわたる。同様に、家族性 *TBX1*(DiGeorge 症候群)、*NKX2-5*、*GATA4* 患者においても多様な表現型を呈し、転写因子の機能のみではこの多様性を説明できない。上記の結果から、ヒト先天性心疾患の発症及びその症状の重篤化に関与する因子が存在すると予測される。



近年、ヒト疾患発症に関わる非コード領域の重要性が取り上げられている(Dallner et al., *Nat. Med.* 2019; Kang et al., *Nature* 2016; Farh et al., *Nature* 2014)。この様な背景から、申請者は原因遺伝子のアミノ酸変異のみでは説明の付かないこの表現型の多様性を理解する一つとしてエピゲノミクス解析を行い、*Tbx5* 遺伝子の転写後調節を担っている新規因子非コードRNA(*Tbx5ua/Gm5563*)を報告してきた (Hori et al., *BMC Genomics* 2018)。*GM5563* は近傍の *Tbx5* 遺伝子の転写後調節を担っていることが明らかとなった。この結果は、申請者が単離した新規 lncRNA 群は近傍の遺伝子の発現調節並びに転写後修飾に関与すると考えられ、先天性心疾患の重篤化解明の起点になると考えられる。

加えて、*TBX5* 遺伝子座の非コード領域(*GM5563*)のゲノム変異が近傍の *TBX5* 遺伝子疾患(HOS)と酷似した表現型を呈していた (Ma et al., *JCMM*; 申請者ら未発表)。この結果は、申請者の報告した lncRNA 変異マウスの結果を支持しているだけでなく、ヒト-マウス lncRNA の機能が保存されていることを示す。このような制御機構は世界で初めてであり、非コード領域の変異が近傍の遺伝子発現に作用しタンパク質との相互作用など分子機構を明らかにすることで、

遺伝子疾患の発症重篤化のメカニズムを紐解けると考えられる。海外協力研究機関である UCSF は網羅的な RNA-タンパク質相互作用解析系及び 3D 複合体形成の特異的制御領域解析が整っている世界で唯一の研究機関であることから、両国の強みとなる研究領域を総合した解析を通して非コード領域制御機構を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の組織メンバーは長年共同で学術研究実績があり、お互いの研究を推進していく方向性を熟知している。申請者が単離した新規 lncRNA 群について国際チームを組織することで、3 年以内に lncRNA についての統合的な機能理解と、ヒト先天性疾患発症原因の理解を目指すための新たな基盤作りを目指す。よって、本国際研究組織は、

(2)ヒト心疾患発症原因：ヒト心疾患を発症する新規制御領域を提唱し責任遺伝子として報告

(3)RNA-タンパク質の相互作用と相互作用による機能特異性：領域・細胞種類特異的な制御機構の理解において RNA 分子の理解は不可欠であり、協調的な機能複合体の同定を目指す

(4)ヒト iPS 細胞由来心臓オルガノイドを用いた機能評価：図 1 課題③に示すように、現行の ES/iPS 細胞を用いた疾患モデル研究では生体心臓様機能性を持った心臓塊の樹立に成功しておらず、先天性疾患がどの様に異常が生じるのか全く不明である。本領域トップリーダーと連携してヒト先天性心疾患 iPS 由来心臓塊を作成する。本項目は、発症時における細胞移動変化・異常を追跡、発症起因する前駆細胞群の特定から緩和医療基盤を構築する。

3. 研究の方法

*本国際共同研究では以下の 4 つの項目の研究を行い、lncRNA とヒト先天性心疾患の発症及び重篤化の理解を目指す。また、若手研究者・学生の交流機会も重要なテーマであると考えている。

(1)モデル生物用いた機能解析—東京医科歯科大：新規 lncRNA (*Tbx5ua*, *Nkx2-5ua*, *Sall4ua*, *Myl2ua*, *Gata6*, *Tbx20*)の生体モデルを作成し生体機能を明らかにする。研究開始 1 年間で単離された全ての lncRNA に関して、変異（遺伝子破壊）細胞株を作成する。すでに *Gm5563* 及び *Myl2Vua* は作製済みであり表現型が得られている。*Nkx2-5ua*, *Sall4ua*, *Tbx20ua*, *Gata6ua* はヒト先天心疾患の責任遺伝子近傍に存在し、疾患重篤化の理解が課題とされている。4 つの lncRNA 遺伝子解析を行うため、4 名の若手研究者・学生を組織してグループで連携して研究する。

(2)ヒト心疾患発症原因-グラッドストーン研究所・ハーバード大：ヒト心疾患を発症する新規制御領域を提唱し責任遺伝子となることを発表する。ヒト先天性心疾患 SNIP 解析を用いて *Gm5563* と *Nkx2-5ua* のヒト変異箇所の詳細に同定し、発表する。申請者はもちろん、若手研究員は現地滞在し大規模スクリーニング解析システムを学ぶ。日本側学生と若手研究者は研究連携を取り、日本国内での解析基盤（遠隔操作で探索可能な）の構築を目指す。

(3)RNA-タンパク質の相互作用と相互作用による機能特異性—UCSF：細胞種類特異的な制御機構の理解において RNA 分子研究は不可欠であり、機能複合体と制御領域の同定を目指す。ホ日本側および米国側双方の研究者はエピゲノム解析 (RNA-Seq, ChIP-Seq)の実績がある。本研究では、世界最先端のシステムを利用し、複雑な lncRNA の転写制御機構を明確化する。

(4)ヒト iPS 細胞由来心臓様組織(オルガノイド)を用いた機能評価—johns Hopkins 大：共同研究先研究者は、短期間で機能評価が可能なヒト型オルガノイド作製の実績がある、本領域トップリーダーである。研究室にて疾患発症の原因の一つとして、細胞移動異常に焦点をあてたりアルタイム解析系を構築する。本研究は lncRNA についての統合的な機能理解と、ヒト先天性疾患発症原因の理解を目指すための新たな基盤作りを目指す。

4. 研究成果

(1)モデル生物用いた機能解析-東京医科歯科大

* *Tbx5* 遺伝子と *Gm5563* の両遺伝子破壊マウスの作成

Tbx5 と *Gm5563* において遺伝学的な相互作用があるか検討するために、*Tbx5* 遺伝子破壊モデルおよび *Gm5563* 遺伝子破壊モデル、両遺伝子同時破壊モデルの作成を試みた。従来の発生工学を用いて遺伝子破壊された生体マウスを樹立するまでには約1年を要するため、iGONAD法(improved GONAD)の立ち上げを行った。結果、単一遺伝子破壊(*Tbx5*^{-/-}および *Gm5563*^{-/-})なら平均して80%の胚において、2遺伝子同時破壊(*Tbx5*^{-/-};*Gm5563*^{-/-})は50%の胚において観察され、重度の心奇形を伴っていた。興味深いことに、*Tbx5*^{+/-};*Gm5563*^{-/-}胚においても *Tbx5*^{-/-}胚と同様の心奇形を生じたことから、*Gm5563* は *Tbx5* 遺伝子の転写および機能を正に制御していると考えられる。

* *Tbx5ua*(*Gm5563*)遺伝子、*Nkx2-5ua* (*Gm17382*) 遺伝子の発現様式

ヒト先天性心疾患発症頻度の高い *Tbx5* 遺伝子と *Nkx2-5* 遺伝子座近傍に存在する2つの非コードRNA(*Gm5563* および *Gm17382*)の発現様式の確認を行った。マウス胚発生(E10.5、11.5、12.5、16.5)および出生後(新生仔4日目、2週齢)の心臓4区画(左房・右房・左室・右室)における *Tbx5* 遺伝子と *Gm5563* は発現様式が酷似していた。一方、*Gm17382* においては右房・右室での発現は非常に高く、左房・左室での発現は非常に低かった。

* *Tbx5*;*Gm5563* に制御される標的遺伝子の同定と機能解析

RNAシーケンス解析を行ったところ、GPC4/GPC5が単離された。同遺伝子は心臓発生過程において興味深い発現を呈することが示された。間葉系細胞(MSC)を用いて同遺伝子の機能を追跡したところ、細胞増殖時に活性化され、RNAiを用いて機能阻害を行うと増殖活性が消失した。さらに、BMPシグナルとは協調せず、FGFをFGFレセプターに呼び込み細胞内へFGFシグナルを増強させてshhの発現制御を行なっていることも明らかとなり、国際学術雑誌に報告した(Takeuchi et al, **PLOS ONE** 2021)。このような特異的制御機構は、心臓発生過程において流出路および心房分化に重要であることが報告されており、Holt-Oram症候群(*TBX5*)患者においても同領域での異常が観察される。特に、この領域に異常が見受けられる患者においては不整脈・若年性心房細動を発症することが知られている。さらに本研究過程で、*Gm5563*の機能減退がマクロファージの侵食が許し炎症作用を亢進することで心房細動の発症に影響を及ぼすことが明らかとなった(Yang et al., **Cir. J.** 2020)。

(2)ヒト心疾患重症化の起因子

Tbx5 遺伝子との相乗的な表現型が得られたことにより、ヒト *TBX5* 遺伝子座近傍に存在する非コードRNA(*TBX5-AS1:2*)の機能を追跡することを議論した。*TBX5-AS1:2*の発現が抑制されたファロー四徴症患者において、重症化することが最近報告された。ヒト *TBX5* 遺伝子座近傍にはもう一つ非コードRNA(*TBX5-AS1:1*)が存在し、両者について北米グループと共同でヒトHolt-Oram症候群患者との関連を調べることを結論つけた(Ma et al., **JCMM**)。

(3)RNA-タンパク質の相互作用と相互作用による機能特異性-UCSF

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しており、現在論文投稿準備中である。

(4)ヒトiPS細胞由来心臓様組織(オルガノイド)を用いた機能評価—Johns Hopkins 大

マウス型心臓オルガノイドの作成に成功した (Lee et al., *Nat. Commun.* 2020)。

まとめ

ヒト先天異常症の重症化のメカニズムの理解にはコーディング領域のみならず、遺伝子非コード領域の制御機構の重要性は認知されていた。本研究で明らかにされた非コードRNAは特異的な疾患責任遺伝子と相互作用し、下流標的遺伝子の発現制御を担っていることを明らかにしただけでなく、がん細胞など細胞性質をエピジェネティックに変化させる機能を持ち合わせていることも明らかにした。これらのことから、非コードRNAが直接的に遺伝性疾患の発症を惹起させ、重症化させることが明確になった。今後は非コードRNAがどのように転写されるのか、どのように相互作用パートナー (タンパク質) を選択するのか、どのように標的遺伝子を選択するのか、これらのメカニズムが各々明らかになる必要が残された課題である。

加えて、心臓疾患と頭頸部疾患は密に遺伝的な関係性があり、疾患重症課の理解を目指した、より強固な国際的な共同研究チームを組織することが今後不可欠であると結論した。

論文・発表関係

HOSを中心とした心臓疾患重症化が多様化する理由をエピゲノム因子の作用から理解することを目指してきた。その結果、本研究は3年間で、学術論文3報、総説1報の実績を得た。下記に記す。

1. 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」

2. Morita and Takeuchi JK*. Cardiac cell specification and differentiation by the defined factors. **Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension** p373-376, 2020 *: correspondence to this work 「査読有」

3. Yang X., Sasano T., Ebana Y., Takeuchi JK., Ihara K., Yamazoe M., Furukawa T. Functional role of L396R mutation of Tks5 identified by Exome-Wide Association Study in atrial fibrillation. **Circulation. J.** doi:10.1253/circj.CJ-20-0101 2020. 「査読有」

4. Lee J., Sutani A., Kaneko R., Takeuchi J., Sasano T., Kohda T., Ihara K., Takahashi K., Yamazoe M., Morio T., Furukawa T., Ishino F. in vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix.

Nat. Commun. 11. 4283. 2020. 「査読有」

国内外発表

1: Jun Takeuchi, Defining the transcriptional factors to specify the cell fate between CMs and ECs during development in mammals, 20th anniversary Gladstone Symposium (SF, US), 2021

2: 竹内純、先天性心臓一上肢疾患重症化におけるエピジェネティック因子の制御機構の理解、日本小児科学学会 (京都、日本)、2021

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 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takeuchi Masao, Takeuchi Kikuko, Takai Tomoyo, Yamaguchi Ritsuko, Furukawa Tetsushi, Akagi Ken-ichi, Takeuchi Jun K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Subcellular localization of glypican-5 is associated with dynamic motility of the human mesenchymal stem cell line U3DT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0226538 ~ 0226538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0226538	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 該当する
1. 著者名 Takeuchi M., Takeuchi K., Monobe Y., Takai T., Yamaguchi R., Furukawa T., Akagi K., Takeuchi JK*.	4. 巻 16
2. 論文標題 Subcellular localization of glypican-5 is associated with dynamic motility of the human mesenchymal stem cell line U3DT.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0226538. eCollection 2021.	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 該当する
1. 著者名 Morita and Takeuchi JK*.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cardiac cell specification and differentiation by the defined factors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 373-376
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yang X., Sasano T., Ebana Y., Takeuchi JK., Ihara K., Yamazoe M., Furukawa T.	4. 巻 84
2. 論文標題 Functional role of L396R mutation of Tks5 identified by Exome-Wide Association Study in atrial fibrillation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation. J.	6. 最初と最後の頁 2148-2157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0101	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 該当する

1. 著者名 Lee J., Sutani A., Kaneko R., Takeuchi J., Sasano T., Kohda T., Ihara K., Takahashi K., Yamazoe M., Morio T., Furukawa T., Ishino F.	4. 巻 11
2. 論文標題 in vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 4283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18031-5	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 該当する

1. 著者名 Katano W, Moriyama Y, Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K.	4. 巻 61(1)
2. 論文標題 Cardiac septation in heart development and evolution.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 114-123.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12580.	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 竹内純
2. 発表標題 先天性心臓-上肢疾患重症化におけるエピジェネティック因子の制御機構の理解
3. 学会等名 日本小児科学学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Takeuchi
2. 発表標題 Defining the transcriptional factors to specify the cell fate between CMs and ECs during development in mammals
3. 学会等名 20th anniversary Gladstone Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeuchi JK
2. 発表標題 Specification of cardiomyocytes and endothelial cell fate by defined factors
3. 学会等名 20th anniversary Gladstone Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 心室 心房の運命決定と分化転換を制御する因子群
3. 学会等名 再生医療学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 心房・心室の運命決定と分化転換を制御する因子群
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanagi N, Ogawa H, Morita Y, Tsuchiya M, Asano T, Shirai M, Schwartz RJ, Morohashi K, Furukawa T, Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK.
2. 発表標題 Arip4 maintains environment for precise trabeculation during embryonic heart formation.
3. 学会等名 14th International symposium of the Institute network for Biomedical Sciences 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 13. 柳のど香、櫛笥博子、竹内純	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メジカルビュー	5. 総ページ数 8
3. 書名 心臓発生とエピジェネティクス	

〔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	井原 健介 (Ihara Kensuke) (50770210)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (12602)	
研究分担者	古川 哲史 (Furukawa Tetshushi) (80251552)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	
研究分担者	小川 英知 (Ogawa Hidesato) (20370132)	大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤) (14401)	

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
---------	---------