

平成30年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15254

研究課題名(和文)動物モデルによるエンドセリンA型受容体遺伝子異常症の発症メカニズム解明と病態予測

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of endothelin type A receptor gene disorder by animal model

研究代表者

栗原 由紀子 (KURIHARA, Yukiko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：80345040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト先天性奇形の顎顔面異型性症の原因遺伝子異常の一つがエンドセリンA受容体(ETAR)の一塩基変異である。本研究では、CRISPR/CASを用い変異マウスモデルとエンドセリン3(ET3)ノックアウトマウスを作成し、ET3/変異ETARの機能獲得が原因であることを示した。また、薬理学的実験よりリガンド親和性またはG蛋白活性化の増強が原因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：One of the causative gene of human congenital anomaly, Mandibulofacial Dysostosis with Alopecia is a single nucleotide mutation of endothelin A receptor (ETAR). In this study, we generated the mutant mouse model and endothelin 3 (ET3) knockout mice using CRISPR/CAS and showed that the cause of MFDA was gain-of-function of mutant ETAR through ET3. The pharmacological experiments revealed that it is due to the enhancement of ligand binding affinity for ET3.

研究分野：分子生物学

キーワード：endothelin A receptor 顎顔面異常症 GPCR

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、エンドセリン-1 (ET1) やエンドセリン A 受容体 (ETAR) の遺伝子改変マウスにより、ET1-ETAR シグナルが神経堤細胞に作用して上顎と下顎の違いを決定すること、大血管や冠動脈の形成にも寄与することを明らかにしてきた (Kurihara Y et al. Nature 1994; Kurihara Y et al., JCI 1995; Sato T et al. PNAS 2008; Arima Y et al. Nat Commun 2012)。しかし同じ神経堤細胞に作用して腸管神経節や黒色細胞分化に関与する ET3-ETBR シグナルが Hirschsprung 病の原因遺伝子であることが早くから報告されたのに対し、ET1-ETAR シグナルの遺伝子異常に起因するヒト疾患ではこれまで同定されていなかった。最近、頭部顔面異常を有するヒト症例において ET1/ETAR 遺伝子異常が相次いで発見され、特に ETAR 遺伝子の点突然変異 (Y129F または E303K) を有する症例は我々が報告した ET1 ノックインマウスの表現型と似ていることから、機能獲得変異と考えられた (Gordon CT et al. Am J Hum Genet 2015)。そこで、これらの変異のうち、ETAR (GPCR 型受容体) の第 2 膜貫通領域の変異と同じ変異 (Y129F) を CRISPR/Cas9 システムによりマウスに導入したところ、顎や耳にヒト症例と同じ表現型が生じ、その因果関係が確認された。しかし、ヒト症例でもマウスモデルでも骨格系の異常は上顎骨の一部から頬骨～側頭骨の一部に留まり、ET1 ノックインによる上顎の下顎構造への形質転換に比べて軽度で限局した表現型であった。一方、ヒト疾患における無毛症に相当する異常はマウスにおいては再現されず、ヒトの毛髪とマウスの体毛の間にはその形成過程での ET シグナル依存性に違いがある可能性が考えられる。さらには、ET の多彩な生物学的作用を考えると、その機能獲得変異は将来新たな病態形成の引き金になることが予想され、その予測と病態解析は症例本人に資するとともに、ET が関与する新たな病態解明にもつながる。以上から、GPCR シグナルに関する基礎研究からヒト疾患に直接寄与する臨床研究まで、本マウスモデルが果たしうる貢献は極めて大きいと考え、本研究を提案するに至った。

## 2. 研究の目的

最近、ヒトにおいて顎と耳の形成異常および先天性無毛症を合併するエンドセリン A 型受容体遺伝子異常が発見され、マウスでも同じ遺伝子変異により同一の顔面形成異常を呈することからその因果関係が確認された。本研究では、この表現型が機能獲得変異であることに注目してその分子メカニズムを解明するとともに、ヒト症例とマウスモデルの違い、発がんや心血管病などのリスク評価な

どにより、エンドセリンの新しい病態生理的意義の解明と将来発症しうる病態への予防・治療法の提案を目指す。

## 3. 研究の方法

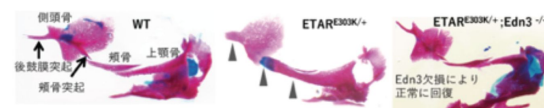
ヒトエンドセリン A 型受容体 (ETAR) 遺伝子異常症の 2 つのタイプそれぞれについて同一変異マウスを作成し、両者の表現型およびヒト疾患との比較により、特に頭部顔面異常の病態形成のメカニズムを明らかにする。変異による恒常的活性化のメカニズムについては、ET-3 ノックアウトマウスを作成し、リガンド依存性の可能性を ET-3 複合変異導入によって検証する。

変異による恒常的活性化のメカニズムについて、薬理学的実験により詳細を明らかにする。ETAR 野生型 (WT) 変異型 (Y129F, E303K) の発現ベクターを作成し、細胞株に過剰発現させ次の実験を行う。ETAR は Gq 蛋白を介するシグナルを活性化することが知られているので下流シグナルとして ET1 または ET3 に対する ERK のリン酸化と細胞内カルシウム濃度を、更にリガンド親和性、G 蛋白活性化能を評価する。

## 4. 研究成果

ヒト ETAR 遺伝子異常症モデルマウスは ET3 ノックアウトマウスによりレスキューされた。

CRISPR/Cas システムを用いてヒトと同じ Y129F または E303K 変異を持つマウスを作成したところ、E303K 変異においても Y129F と同様に、無毛以外は、上顎・耳小骨・耳介等にヒト症例とほぼ同じ表現型が生じ、その因果関係が確認された。そこでその機序として推測される機能獲得変異を証明するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて ET3 ノックアウトマウス (Edn3+/-) を作成し、Y129F または E303K 変異を持つマウスと掛け合わせたところ表現型はレスキューされ正常に戻ったことから、生体内において変異 EDNRA の ET3 に対する機能獲得が証明された。



正常 ETAR は、ET1 に親和性があるが ET3 には親和性がなく、下顎は ET1、ET3 の発現があったが、上顎は ET3 の発現しかなかった。このことから上顎においては、正常では ET1 リガンドの発現がないのでエンドセリンシグナルが活性化しないが、変異 ETAR では ET3/ETAR シグナルが活性化するので、異所性に機能獲得し異常を惹起していると考えられた。他の異常出現部位でもほぼ同様の機序が働いていると推測できた。

### 変異 ETAR の薬理学的特性

・ET3 に対する ETAR の反応性は、リン酸化 ERK の EC50 で、Y129F, E303K は WT の 100 倍

に上昇しており、細胞内カルシウム濃度でも上昇していた。ET1 に対する ETAR の反応性は、3 者とも大きくは違いがなかった。  
・ET1 に対する親和性は3 者とも同等であったが、ET3 に対する親和性は WT<E303K<Y129F で、Gq 活性化能は WT, Y129F < E303K であった。  
・以上の結果から、Y129F 変異は ET3 リガンドに対する親和性の上昇により、また、E303K 変異は ET3 リガンドに対する親和性の上昇と G 蛋白活性化能の上昇により、ET3 の反応性が ET1 と同程度になり携帯変化をおこしたと考えられた。

#### 病態との関連

変異 ETAR モデルマウス Y129F, E303K 樹立後の観察において、出生時の奇形とは別の病態を呈するマウスが散見された。これらの多くは1 年以上経過してから外観に病変が見られることから、計画的に、出生時より同じ環境で生育したマウス同士で比較する必要があると考えた。すなわち同胞のオス同士、メス同士を同じケージで長期飼育し、統計をとりつつ解析するため、現在飼育観察中である。新たな次の2 年があるとすれば解析が進むと期待できる。

#### 今後の展望

DNA 一塩基置換により、Y129F ではチロシンがフェニルアラニンに変化し、E303K ではグルタミンがリジンに変化した。このアミノ酸の変化が ET3 リガンドの親和性をどのように上昇させたかが新たな問題である。GPCR は細胞膜脂質二重層の中で細動しながら存在していると考えられているので、分子動力学シミュレーションを用いて ETAR 3 種類のホモロジーモデルを作成し、構造レベルから ET3 リガンド親和性上昇を説明しようとしている。

#### 引用文献

Am J Hum Genet 2015  
Mutations in the Endothelin Receptor Type A Cause Mandibulofacial Dysostosis with Alopecia  
**Christopher T. Gordon**, K. Nicole Weaver, Roseli Maria Zechi-Ceide, Erik C. Madsen, Andre L.P. Tavares, Myriam Oufadem, **Yukiko Kurihara**, Igor Adameyko, Arnaud Picard, Sylvain Breton, Sebastien Pierrot, Martin Bioso-Duplan, Norine Voisin, Cecile Masson, Christine Bole-Feysot, Patrick Nitschke, Marie-Ange Delrue, 13 Didier Lacombe, Maria Leine Guion-Almeida, Priscila Padilha Moura, Daniela Gamba Garib, Arnold Munnich, Patrik Ernfors, Robert B. Hufnagel, Robert J. Hopkin, **Hiroki Kurihara**, Howard M. Saal, David D. Weaver, Nicholas Katsanis, Stanislas Lyonnet, Christelle Golzio, David E. Clouthier, and **Jeanne Amiel**

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Furutera T, Takechi M, Kitazawa T, Takei J, Yamada T, Vu Hoang T, Rijli FM, Kurihara H, Kuratani S, Iseki S. Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick. Development. 2017 144(18): 3315-3324. doi: 10.1242/dev.149765. 査読あり

Asai R, Haneda Y, Seya D, Arima Y, Fukuda K, Kurihara Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Amniogenic somatopleure: a novel origin of multiple cell lineages contributing to the cardiovascular system. Sci Rep. 2017, 7(1)8955 1-14 DOI 10.1038/s41598-017-08305-2. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

2016.12 月 分子生物学会  
GPCR エンドセリン A 受容体変異マウスによるヒト希少疾患の病態解明と予後の推測  
栗原由紀子 (代表者)

2017, 3 月 Gordon Research Conference  
Molecular Pharmacology, GPCRs: From Single Molecules to New Forms of Treatment  
Lucca (Barga), Italy  
Human Mutations in Endothelin A Receptor Provide an Insight into Structural rearrangement in GPCR  
Yukiko Kurihara (代表者)

2017.12 月 分子生物学会  
ヒトエンドセリン A 受容体異常性から明らかになった GPCR のリガンド結合-シグナル活性化連関の新たな側面  
栗原由紀子 (代表者)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

栗原 由紀子 (KURIHARA, Yukiko)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80345040

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

栗原 裕基 (KURIHARA, Hiroki)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20221947

##### (4) 研究協力者

・ 益田 将 (MASUDA Sho)  
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生

・ Jeanne Amiel  
INSERM, Institute Imagine,  
Universite Paris Descartes-Sorbonne,  
Necker 小児病院・PI

・ Christopher T. Gordon  
INSERM, Institute Imagine,  
Universite Paris Descartes-Sorbonne,  
Necker 小児病院・研究員