

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04228

研究課題名(和文) GPIアンカー膜蛋白GFRA2が心筋緻密化障害心筋症の病理病態に果たす役割の解明

研究課題名(英文) The Study of Pathophysiological Role of GFRA2, GPI-anchored plasma Membrane Protein, for Left Ventricular Non-Compaction Cardiomyopathy

研究代表者

八代 健太 (Yashiro, Kenta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60432506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)受容体ファミリーであるGFRA2を介する未知の新規シグナル経路は、心臓発生での心筋緻密化に必須で、心筋緻密化障害の原因となり得る。本研究では、この新規GFRA2シグナル経路の本態解明を目的とした基盤研究を行った。GFRA2と相互作用する因子の探索、GFRA2発現細胞の予定運命図の作成、時空間的コンディショナル変異マウスの表現型解析の為に遺伝子改変作業を完了した。今後は、これらを用いた解析へと移行する。また、転写因子Sox17が心内膜への分化に特異的に機能し、心筋緻密化に必要であることも発見した。ヒト心筋緻密化障害症例でのGFRA2変異の探索も継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋緻密化障害は難治で予後不良であり、分子病態も多くが不明である。この疾患に関する基礎研究による知見も限定的かつ断片的で、かつヒト症例の遺伝学とは未だ有機的に関連づけられていない。本研究は、心筋緻密化に関与する分子機構をGFRA2という新たな視点から解析し、断片的な知見のギャップを埋めようとするものである。さらに、心筋緻密化過程に関与する新たな糸口として転写因子Sox17を見出し、新たな解析の起点を提示できた。また、病的意義はまだ不明であるが、ヒト心筋緻密化障害症例においてGFRA2の変異も見出している。今後も研究を継続し、心筋緻密化機構の解明とヒト心筋緻密化障害の分子病態の理解を深めたい。

研究成果の概要(英文)：An unknown non-canonical signal via GFRA2, a glial-cell derived neurotrophic factor receptor family member, is vital for compaction of ventricular myocardium in the mouse embryos. Defect of this is a potent cause of left ventricular noncompaction (LVNC) in humans. In this study, aiming to validate this signal pathway, we have performed the followings: (1) To identify a factor directly interacting GFRA2, genetic modification (GM) on mouse embryonic stem (ES) cells has been completed. Screening with this cell is planned next. (2) GM of mouse ES cells to generate the mice for conditional targeting of Gfra2 as well as for lineage tracing of GFRA2+ cells has been completed. Elucidating the phenotype of GM mice and the fate-map are planned next. (3) Transcription factor Sox17 is found to be specific for endocardium lineage and be essential for compaction. (4) Some mutation of GFRA2 has been found among LVNC patients, although whether sits responsibility for the disease is still unclear.

研究分野：発生学

キーワード：心筋緻密化 GFRA2 心臓前駆細胞 シグナル経路 リガンド 分化 細胞間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋緻密化障害は、重症心不全をきたして予後不良となる拡張型や拘束型心筋症の起因となる重要な病理形態である。その病理病態は多くが未知で、臨床遺伝学的背景も多くの症例で不明である。研究代表者は、これまでにマウス胚体内における心臓前駆細胞の性質とその分化機構の研究を行い、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 受容体ファミリーの一つである GPI アンカー型細胞膜蛋白 *Gfra2* 遺伝子が、心臓前駆細胞で一過的にはあるが特異的に発現し、*Gfra2* と類縁の機能的冗長性を有する *Gfra1* 遺伝子と共に心室壁構造の成熟過程である心筋緻密化に必要であることを見いだした (Ishida, Yashiro et al. *Cell Reports* 2016)。マウス胚で *Gfra2* が変異すると、本来は心臓前駆細胞では発現のない *Gfra1* 遺伝子が異所的に発現し、心筋緻密化障害の表現型をレスキューする。一方で、*Gfra1/2* 二重変異マウスは心筋緻密化障害心筋症を呈する。心臓前駆細胞で *Gfra2* が発現し機能している時期は、二重変異マウスで心筋緻密化障害を発症する時期よりも数日も先行していた。GFRA2 の生理的リガンドである NRTN を介したシグナル経路は心筋緻密化には必要ではなく、心筋緻密化過程に必要である GFRA2 を介したシグナル経路の本態は不明のままであった。

心筋緻密化は生理的な心室壁構造が完成する過程であり、その過程の分子生物学的機構の理解は、心筋緻密化障害の分子病態の理解にとどまらず、3次元構造を有する移植用グラフトを実現するために再生医療 / 組織工学的観点からも重要である。

2. 研究の目的

本研究では、心筋緻密化過程における未知なる GFRA2 を介したシグナル経路の本態と、心筋緻密化過程で GFRA2 が果たす役割を解明し、ヒト疾患における生理的意義を確認する事で難治で予後不良な心筋緻密化障害の病理病態の理解を深める基盤研究を目的とした。具体的に計画している研究項目は、心臓発生に必要な GFRA1/2 を介する未知のシグナル経路の本態を明らかにすること、*Gfra1/2* のマウス心臓発生における心筋緻密化過程に果たす役割の理解、およびヒト心筋緻密化障害患者の *GFRA1/2* 遺伝子変異を探索することによるヒトの病態における意義の確認である。

3. 研究の方法

以下のような研究手法で研究を進めた。詳細は研究成果に記す。

- (1) GFRA2 蛋白と相互作用する分子の探索
- (2) 心臓前駆細胞における *Gfra1/2* 二重変異時における遺伝子発現とリン酸化蛋白のプロファイリング
- (3) マウス胚心臓内での *Gfra2* 陽性心臓前駆細胞系譜の追跡
- (4) *Gfra1/2* 二重コンディショナル変異マウスの作成と解析
- (5) ヒト心筋緻密化障害症例で *GFRA1* と *GFRA2* の変異を探索

4. 研究成果

研究機関内における研究代表者の研究施設の移動、予期し得なかった研究資源の喪失、及び新型コロナウイルス感染拡大による研究活動の制限などにより、当初予定していた研究計画に遅れを生じたものの、各研究目標はそれぞれ下記のように進展した。研究機関終了後も研究を継続し、研究を成果としてまとめ、国際学会・国際誌等で発表していきたい。

- (1) GFRA2 蛋白と相互作用する分子の探索

GFRA2 タンパクと相互作用をする分子を単離し同定するために、マウス ES 細胞に遺伝子改変を行い、GFRA2 分子の N 末に FLAG-PA tag が連結するように遺伝子改変を行った。また、*Gfra2* が変異しても GFRA2 が陽性となるはずの心臓前駆細胞を同定できるように、この *Flag-*

PA-*Gfra2* 遺伝子座に、ゲノム編集を利用してプロモーターと *Flag-PA-Gfra2* との間に in-frame で *tdTomato-2a* 遺伝子カセットのノックインを行い、実験に用いる ES 細胞株を得た。今後は、この ES 細胞を用いて、CRISPR/Cas9 を用いて *Gfra1/2* の二重変異を導入した株をネガティブ・コントロールとして作成し、心臓前駆細胞への分化誘導後に FLAG-PA tag を用いた Tandem Affinity Purification によって濃縮した試料を質量分析計を用いて解析する。これにより GFRA2 タンパクと相互作用する分子の同定する。

(2) 心臓前駆細胞における *Gfra1/2* 二重変異時における遺伝子発現とリン酸化蛋白のプロファイリング

(1)で作成した細胞株を用いて、野生型と *Gfra1/2* 二重変異を比較する形で次世代シーケンサーを用いた RNA-seq と、質量分析計を用いたリン酸化タンパクプロファイルの差を分析する。リン酸化蛋白の濃縮には、IMAC-Fe 樹脂カラム (GE ヘルスケア) を用いる。現在、ネガティブ・コントロール用に、CRISPR/Cas9 によって *tdTomato-2a-Flag-PA-Gfra2* ES 細胞株の *Gfra1* と *Gfra2* 遺伝子に in/del による変異を導入中である。今後、データを取得し、解析を進める。

一方、野生型心臓前駆細胞のシングルセル解析によって、転写因子 *Sox17* が心臓前駆細胞の中で、特に心内膜に分化する系譜で特異的に発現することを見出した。*Sox17* の中胚葉特異的ノックアウトマウスは心筋緻密化障害を生じ、*Gfra1/2* と *Sox17* が同一シグナルカスケード上にある因子であることが示唆された。この結果は国際学会と国際誌にて発表された。

(3) マウス胚心臓内での *Gfra2* 陽性心臓前駆細胞系譜の追跡

Gfra2 を発現した細胞をマウス胚体内で追跡するために、*CreERT2* カセットの *Gfra2* 遺伝子座へのノックイン・マウスの作成を行なっている。*CreERT2* ノックイン・アレルを JM8A マウス ES 細胞株で作成が終了し、キメラマウス作成の段階で新型コロナによる研究活動が制限され、作業が中断した。研究活動制限が解除され次第、キメラマウスの作成に着手し、*Gfra2-CreERT2* ノックインマウスを作成する。その後、このマウスと Cre レポーター *Rosa26-eYFP* マウスと交配し、妊娠 7~8 日目に妊娠母体マウスにタモキシフェンを投与することで *Gfra2* 陽性心臓前駆細胞を eYFP で遺伝学的にラベルし、個体内での *Gfra2* 陽性細胞の時空間的な分布を追跡する。

(4) *Gfra1/2* 二重コンディショナル変異マウスの作成と解析

この目的のために、*Gfra2^{fllox}* アレルの作成を ES 細胞に導入するための作業を行なっている。Targeting ベクターの作成を終了し、現在は *fllox* アレルの導入作業を JM8A マウス ES 細胞株に対して実行中である。作成した *Gfra2^{fllox}* ES 細胞株に CRISPR/Cas9 にて *Gfra1* 遺伝子座に in/del による null アレルを導入し、キメラマウスを経て *Gfra1^{null/+} · Gfra2^{fllox/+}* マウスを作成し、心筋特異的な二重変異マウスの表現型の解析へ進めたい。

(7) ヒト心筋緻密化障害症例における *GFRA1* と *GFRA2* の遺伝子変異の探索

国際医療福祉大学 市田 蒔子特任教授及び富山大学医学部小児科学 廣野 恵一講師との共同研究にて、心筋緻密化障害の患者ゲノムの探索を行い、*GFRA2* 遺伝子に変異を持つ患者の発見に至っているが、現在までにはその病的意義までは明らかではない (K Hirono ら, personal communication: 未発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saba Rie, Kitajima Keiko, Rainbow Lucille, Engert Silvia, Uemura Mami, Ishida Hidekazu, Kokkinopoulos Ioannis, Shintani Yasunori, Miyagawa Shigeru, Kanai Yoshiakira, Kanai-Azuma Masami, Koopman Peter, Meno Chikara, Kenny John, Lickert Heiko, Saga Yumiko, Suzuki Ken, Sawa Yoshiki, Yashiro Kenta	4. 巻 9
2. 論文標題 Endocardium differentiation through Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11953-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48321-y	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 八代健太	4. 巻 37
2. 論文標題 左室心筋と右室心筋は何が違うのか	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊「心不全のサイエンス」	6. 最初と最後の頁 204-211
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 無
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 Yashiro Kenta, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki	4. 巻 82
2. 論文標題 A Lesson From the Thalidomide Tragedy The Past Is Never Dead. It's Not Even Past. William Faulkner, From "Requiem for a Nun"	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2250 ~ 2252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0775	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 Saba Rie, Kitajima Keiko, Rainbow Lucille, Engert Sylvia, Uemura Mami, Ishida Hidekazu, Kokkinopoulos Ioannis, Shintani Yasunori, Miyagawa Shigeru, Kanai Yoshiakira, Azuma-Kanai Masami, Koopman Peter, Meno Chikara, Kenny John, Lickert Heiko, Saga Yumiko, Suzuki Ken, Sawa Yoshiki, Yashiro Kenta	4. 巻 -
2. 論文標題 Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/548289	査読の有無 無
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 八代 健太、宮川 繁、澤 芳樹	4. 巻 68
2. 論文標題 特集 心臓の発生・再生・創生 .心臓の発生と進化 左右軸の分子機構と心臓形成	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 520 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11477/mf.2425200722	査読の有無 無
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 Yashiro Kenta, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki	4. 巻 33
2. 論文標題 臓器錯位症候群の発生機序	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本小児循環器学会雑誌	6. 最初と最後の頁 349 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.9794/jspccs.33.349	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 Bridge Katherine S., Shah Kunal M., Li Yigen, Foxler Daniel E., Wong Sybil C.K., Miller Duncan C., Davidson Kathryn M., Foster John G., Rose Ruth, Hodgkinson Michael R., Ribeiro Paulo S., Aboobaker A. Aziz, Yashiro Kenta, Wang Xiaozhong, Graves Paul R., Plevin Michael J., Lagos Dimitris, Sharp Tyson V.	4. 巻 20
2. 論文標題 Argonaute Utilization for miRNA Silencing Is Determined by Phosphorylation-Dependent Recruitment of LIM-Domain-Containing Proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 173 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.06.027	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

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 4件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 心室中隔の発生～どこからどのように形成されるのか?～
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 心筋分化とiPS細胞研究
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yashiro, K., Saba, R., Ishida, H., Kanai, Y., Meno, C., Koopman, P., Lickert, H., Saga, Y., Miyagawa, S., Suzuki, K., and Sawa, Y.
2. 発表標題 SoxF class transcription factor Sox17 identifies endocardium progenitor cells and regulates the heart development in mice
3. 学会等名 American Heart Association scientific Sessions 2018(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代健太, 佐波理恵, 石田秀和, 小垣滋豊, 宮川繁, 大園恵一, 鈴木憲, 澤芳樹
2. 発表標題 Sry関連HMG-box転写因子Sox17が心内膜前駆細胞の分化と心臓発生に果たす役割
3. 学会等名 第54回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yashiro, K., Saba, R., Ishida, H., Kanai, Y., Meno, C., Koopman, P., Lickert, H., Saga, Y., Miyagawa, S., Suzuki, K., and Sawa, Y.
2. 発表標題 SoxF class transcription factor Sox17 identifies endocardium progenitor cells and regulates the heart development in mice.
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 Sry関連HMG-box転写因子Sox17が 心内膜前駆細胞での発現と心臓形態形成における機能
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現プロファイルより見えてきた心臓前駆細胞の新知見.
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会（第40回日本分子生物学会年会，第90回日本生化学会大会）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現プロファイリングより見えてきた心臓発生の分子機構
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenta Yashiro
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation via an alternative signal pathway.
3. 学会等名 CDB symposium 2017 “Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution”（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidekazu Ishida, Rie Saba, Ioannis Kokkinopoulos, Yasushi Sakata, Leo Dunkel, Andrew Tinker, Anna-Katerina Hadjantonakis, Yoshiki Sawa, Hiroshi Sasaki, Keiichi Ozono, Ken Suzuki, and Kenta Yashiro
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation via an alternative signal pathway.
3. 学会等名 Takao International Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidekazu Ishida, Rie Saba, Ioannis Kokkinopoulos, Yasushi Sakata, Leo Dunkel, Andrew Tinker, Anna-Katerina Hadjantonakis, Yoshiki Sawa, Hiroshi Sasaki, Keiichi Ozono, Ken Suzuki, and Kenta Yashiro
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation via an alternative signal pathway.
3. 学会等名 Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究協力者	松尾 和彦 (Matsuo Kazuhiko) (70599753)		
研究協力者	廣野 恵一 (Hirono Keiichi) (80456384)		
研究協力者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	元岡 大祐 (Motooka Daisuke) (10636830)		
連携研究者	市田 路子 (Ichida Fukiko) (30223100)	国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・特任教授 (32206)	
連携研究者	澤 芳樹 (Sawa Yoshiki) (00243220)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
連携研究者	高島 成二 (Seiji Takashima) (90379272)	大阪大学・生命機能研究科・教授 (14401)	
連携研究者	坂田 泰史 (Sakata Yasushi) (00397671)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
連携研究者	小垣 滋豊 (Kogaki Shigetoyo) (00311754)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	