様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１２６０２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ２１５９８

研究課題名（和文）ヒト加齢性不整脈発症に関わる非コード領域の制御機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of non-coding genome regions causing age-dependent arrhythmia 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）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：心臓―四肢症候群の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２報、総説１報、投稿中２報の実績を得た。A: Gm5568;Tbx5 DKO胚は重度の肉柱形成不全を発症しており、mRNAseq解析から心室筋肉柱増殖・形成に関与する遺伝子群の発現が顕著に抑制されていた。ChIPseq解析およびRIP-qPCR解析結果から直接的に細胞増殖因子の発現調節制御を担っていることを明らかにした。B:WNT-GPC5シグナルがTbx5遺伝子座にエピジェネティック変異を生じさせ、間葉系幹細胞を肉腫化にすることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ヒト先天異常症の重症化のメカニズムの理解は緩和治療・個別化医療を目指す上で不可欠である。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、エピゲノム因子を用いた治療法の開発も期待される。

研究成果の概要（英文）：We are focusing on the epigenetic factors to understand the molecular mechanisms for the diversity of disease severity in heart-hand syndromes. In this project, we has reported 2 scientific papers, 1 review article, and 2 papers in submission over the past 3 years. 1) We found Gm5563;Tbx5 DKO embryos with the severe heart defects including hypoplastic ventricular structures during the heart formation. mRNAseq analysis from the heart tissues in these embryos revealed that the expression of genes function as key players for the ventricular muscle proliferation and formation was markedly suppressed. The results of ChIPseq and RIP-qPCR analysis revealed that the expression of the genes directly regulated the expression of cell growth factors by the synergistic function between Tbx5 and Gm5563. 2) We also reported that WNT-GPC5 signaling causes epigenetic modifications on Tbx5 locus to change the cell fate of sarcoma from that of mesenchymal stem cells.

研究分野：先天異常

キーワード：先天異常　心疾患　Tbx5　非コードRNA　肉腫化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

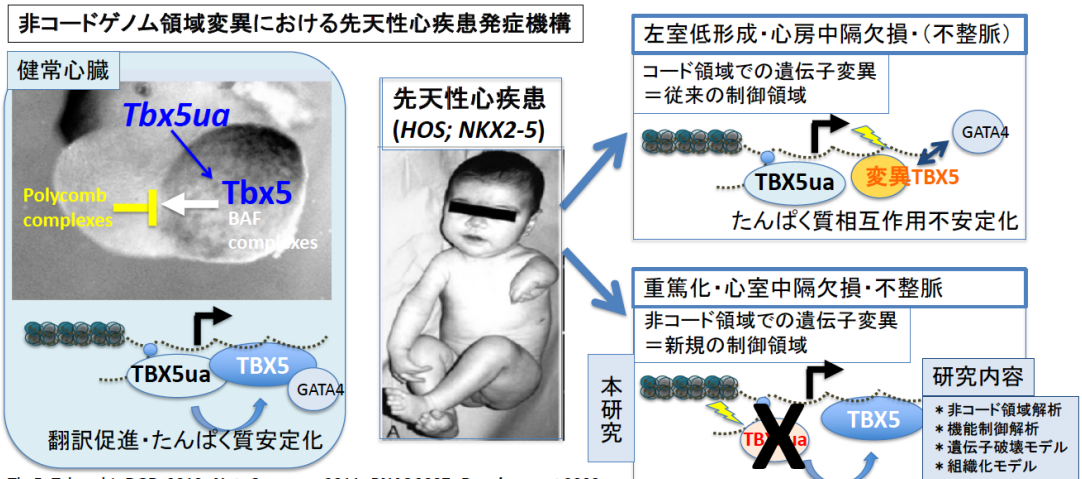
様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

1. 研究種目名：**挑戦的研究（萌芽）**
2. 課題番号：20K21598
3. 研究課題：**ヒト加齢性不整脈発症に関わる非コード領域の制御機構**
4. 補助事業期間：**2020 年度～2022 年度**

１．研究開始当初の背景

心臓―四肢症候群は、ヒト先天異常症において心臓―上肢形成不全だけでなく高い発症率で頭部（頭頸部）形成不全を伴う。近年、共役因子依存的に組織特異的な形成に機能するエピゲノム因子が報告されたことにより、申請者はヒト Holt-Oram 症候群(HOS)モデルとなる *Tbx5* 遺伝子破壊マウスを用いて本課題に取り組んできた。

近年ヒト先天性心疾患の発症と疾患重篤化において、責任遺伝子となる転写因子のみならず、非コード領域から転写される非コード RNA が転写調節を担っており、その変異が原因遺伝子疾患と同様な症状を呈することが明らかとなってきた（下図 1）。申請者はこれまでに、ヒト心不全発症リスク因子となる新規短鎖・長鎖非コード RNA(*miRNA・lncRNA*)プロファイルを報告している(Hori et al., ***BMC genomics*** 2018)。また、米国 UCSF とおよび中国 Fudan 大学とで解析中のヒト先天性心疾患患者由来全ゲノムシーケンス結果と照合して、我々の報告してきた非コード RNA 分子の遺伝子変異によって心疾患発症する家族が存在することを見出した(Ma et al., ***JCMM*** 2020)。同家族は、年齢を経るに従って不整脈・心房細動を発症することから、*TBX5ua*、*NKX2-5lnc* の発現時期と深く相関性がある。このことから、遺伝子性疾患発症に関わる非コード領域が存在すると考えられる。



Tbx5; Takeuchi, ***DGD.*** 2019; ***Nat. Commun.*** 2011; ***PNAS*** 2007; ***Development*** 2003
ncRNA; Hori. ***BMC genomics*** 2018;
（図1）

２．研究の目的

本研究においては、非コード RNA の変異および機能異常がもたらす心疾患発症および重篤化の理解を目指す。具体的には以下の２つの研究に取り組む。

⑴生体（胚発生過程）における非コード RNA の機能を明らかにする。

⑵核内における非コード RNA 分子の転写制御機構を明らかにする。

３．研究の方法

⑴モデル生物作成およびその機能評価

＊機能性非コード RNA の探索：我々はヒト先天心疾患の責任遺伝子である *Tbx5*、*Nkx2-5*、*Sall4* 近傍に非コード RNA 群（*Tbx5ua*、*Nkx2-5lnc*、*Sall4lnc*）が存在することを報告した（Hori et al.,

BMC genomics 2018)。近年のゲノム解析の進歩から EMBL/NCBI データベースを利用して再探索し生体内で発現しているのかを確認する必要ある。

＊疾患生体モデルの作成 : 従来の遺伝子破壊法を用いるのが難しい。我々はゲノム修飾法を改良し目的の遺伝子配列のみ変異を入った疾患モデルマウスの樹立に成功している(Hori et al., ***BMC genomics*** 2018; Takeuchi et al., ***PNAS*** 2007)。この方法と iGONAD 法（ゲノム修飾法を応用した *in utero* 遺伝子破壊法：松山誠室長：重井医学研究所との共同研究・B.Bruneau 教授・UCSF/Gladstone 研究所・J.Rossant 教授 : MtSinai 病院との共同研究）を組合せ直接遺伝子破壊させた妊娠マウスの F0 胎仔を用いて機能解析を行う。この方法は従来の遺伝子破壊マウスの作成方法に比べ、短期・安価・小スペースで作成できる有効な方法である。また、遺伝子変異入れたヒト iPS 細胞も作成済みであり、組織学・発生学・電気生理学を用いて統合的な機能評価を行う。

＊下流遺伝子の同定と機能解析：表現型および RNAseq 解析から選出された候補因子のうち、生命現象において汎用的な機能を明らかにする。得られた結果は特異的な機能を明らかにする上で重要な情報を得ると考えている。

⑵RNA-タンパク質の相互作用および特異な転写制御メカニズムの解明

本研究項目は、実績（構築済み）のあるエピゲノム解析データ (RNA-Seq、ChIP-Seq)および coIP 技術を用いて(網羅的な)RIP（RNA-protein 相互作用）を行い、非コード RNA と共役たんぱく質の同定および特定ゲノム制御領域を同定する。既に、Tbx5 および Nkx2-5 たんぱく質の相互作用は認められており、クロマチン複合体・ヒストン複合体との相互作用を明らかにし、転写機能制御機構を明らかにする。

４．研究成果

⑴モデル生物作成およびその機能評価

＊機能性非コード RNA の探索：

A:マウス胚心臓発生過程における非コード RNA の同定。*Tbx5ua*(*Gm5563*)遺伝子、*Nkx2-5ua*（*Gm17382*）遺伝子、*Sall4ua* の発現様式を追跡した。マウス胚発生および出生後の心臓４区画における *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。同発現様式は MGI データベースの報告と一致している。詳細に調査したところ、*Nkx2-5* 遺伝子座近傍には *Gm17382*、*Gm20468*、*Gm29819*、*Gm41555* の 4 つの非コード RNA が存在しているが、10~20Kb 上流に存在しており今後発現様式を追跡していく必要がある。*Sall4* 遺伝子座においては 3UTR に非コード RNA が存在することが EMBL データベースでは報告されている (*Gm14261*)。*Gm14261* の発現様式は心臓発生過程において発現しており、興味深いことに出生以後においても強発現していることが確認された。我々は、*Nkx2-5* および *Sall4* の転写開始点から逆方向に転写される新規の非コード RNA を見出した(*Nkx2-5ua*、*Sall4ua*)。*Nkx2-5ua* および *Sall4*ua 非コード RNA は胚発生過程においてのみ転写されることから先天性心疾患発症と深く関与すると推察され、興味深い。

B:ヒトゲノムにおける *TBX5*、*NKX2-5*、*SALL4* 遺伝子近傍で転写される非コード RNA の同定。A で見出した非コード RNA のヒトホモログの単離を目指し、*TBX5AS1-2*(*Gm5563* ホモログ)、*NKX2-5*（未確認）、*LINC01-429-201*(*SALL4* 遺伝子座 5Kb 下流に位置するため再考察)を同定した。

＊疾患生体モデルの作成：*lncRNA* 変異モデルの心疾患表現型の組織学的と遺伝学的理解：新技術の *in uterus* 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を作出した。この手法を用いて以下の研究を実施した。

A:*Tbx5;Gm5563* 多重遺伝子破壊マウスの形態解析：*Gm5563 KO* マウス、*Tbx5 KO* マウス、*Gm5563*$^{+/-}$*/Tbx5*$^{+/-}$ ヘテロマウス、*Gm5563*$^{+/-}$*/Tbx5*$^{+/-}$ *KO* マウスの作成→ *Gm5563* 単一遺伝子破壊マウスにおいて *Tbx5* の発現は不変であったが *Nppa*、*Gja5*（Tbx5 の直接標的遺伝子）の発現は顕著に抑制されていた。興味深いことに、*Gm5563*$^{+/-}$*/Tbx5*$^{+/-}$マウスは *Tbx5*$^{-/-}$マウスと同程度の重度奇形を生じていた。これまでの結果から *Gm5563 KO* と *Tbx5 KO* とでは遺伝学的な相関性が予想される。正常胚、*5563 KO* 胚、*Tbx5 KO* 胚、および *Gm5568;Tbx5 DKO* 胚の心臓領域 mRNAseq を行い遺伝子発現プロファイルの作成を試みた。心室筋肉柱増殖・形成に関与する遺伝子群の発現が顕著に抑制されており、細胞増殖因子の発現調節制御を担っていることを明らかにした（現在投稿中：Katano et al., ***revised*** 2023)。

B:*Tbx5; Gm42017* 多重遺伝子破壊マウスの形態解析：iGONAD 法を用いて多重遺伝子破壊マウスの作成に成功している。心臓形態異常は *Tbx5* 単一遺伝子破壊マウスとほぼ同程度であったのに対して、*Tbx5+/-;Gm5563+/-*マウス胚心臓では *Tbx5+/-*マウスと同程度の表現型であったのに対し、上肢においては *Tbx5* 単一遺伝子破壊マウスと同程度の発生異常が見受けられた。このことから二つの非コード RNA によって、Tbx5 は特異性を獲得していると考えられる。

＊下流遺伝子の同定と機能解析：Tbx5-*Gm5563* の下流制御因子の一つとして、GPC5 を単離した。GPC5 は Wnt シグナルを増強するリガンドの一つである。本研究期間で GPC5 が肉腫早期マーカーとなり間葉系幹細胞の肉腫化変異に寄与していることを報告した (Takeuchi, *PLOS ONE* 2021)。また、GPC5 の KO では心形態異常を伴うことを見出した。

これらの結果は、非コード RNA が *Tbx5* 心疾患の重症化に関わるだけでなく、Wnt シグナルを制御してエピゲノム変化を促進している可能性が強く示唆された。今後は、多角的な視野で非コード RNA の機能を解析する必要があると考えられる。特異的な下流遺伝子プロファイルから得られた情報をもとに胚発生のみならず細胞種変化に関わるような領域においても実験を試みて、本研究論文を投稿する。

⑵RNA-タンパク質の相互作用および特異な転写制御メカニズムの解明

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, Sall4、Gata4、Tbx1、Mef2c）との相互作用の理解→*Gm5563*、Tbx5、Gata4、Tbx1、Mef2c 強制発現レトロウイルスを作成し Hela 細胞に 48 時間感染させた細胞抽出液を用いて各々のタンパク質に対する抗体で免疫沈降をおこなった。その後 *Gm5563* 特異的な primer で PCR を行い、相互作用の可否を評価した（以下 : RIP-qPCR)。RIP-qPCR の結果、*Gm5563* が Tbx5—Sαll4 特異的に共役している萌芽的結果を得た。興味深いことに、Tbx5-Sall4-Gata4-Mef2c を強制発現させた場合のみ、Gata4 および Mef2c と *Gm5563* は相互作用できることが明らかとなった。

まとめ

ヒト先天異常症の重症化のメカニズムの理解は緩和治療・個別化医療を目指す上で不可欠である。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ことで、将来的にはエピゲノム因子を標的とした治療法の開発も期待される。

論文・発表関係

心臓―四肢症候群の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、投稿中２報の実績を得た。

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」

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　4件／うちオープンアクセス　5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 －

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 373-386
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

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　3件／うち国際学会　2件）

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 竹内純
2．発表標題 先天性心臓ー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 Takeuchi JK
2．発表標題 Specification of cardiomyocytes ans endothelial cell fate by defined factors
3．学会等名 20th anniversary Gladstone Symposium（招待講演）（国際学会）（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2021年

〔図書〕　計1件

１．著者名 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-	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)	

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