

心筋緻密化の背景にある受容体 GFRA2 を介する新規シグナル経路の解明

八代健太

京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態科学

【研究の背景】

心筋緻密化障害は、心臓形成初期に生じる心室内肉柱形成の異常か、その後の心筋緻密化と呼ばれる心室壁の密度と厚みが増す過程そのものの異常により生じると考えられている。しかし、従来から得られている知見は断片的で、病理病態の多くが不明である^{1,2)}。

私たちの研究室では、モデル動物としてマウスを用いて、神経栄養因子 GDNF ファミリーの一つ NRTN の特異的受容体と考えられて来た GFRA2 が、心臓前駆細胞で時空間的に特異的な発現をしており、この分子を介したシグナル伝達経路が心筋緻密化の過程に必要である事を世界で初めて明らかにした³⁾。この GFRA2 受容体を介したシグナルは従来知られていた経路とは全く異なる新規のシグナル経路であったが、その本態を明らかにするまでには至っていない。

【目 的】

Gfra2 遺伝子の機能を軸に、心筋緻密化層の形成過程の分子生物学的メカニズムを解析し、心筋緻密化障害の分子病態の理解を深める。

【方 法】

1. GFRA2 を介する心臓の発生に関わるシグナル経路の本態を、遺伝子ノックアウトを行った ES 細胞を用いて解析する。
2. 心筋緻密化過程を *in vitro* で模倣できるオルガノイドの樹立を試みる。

【結 果】

1 シグナル経路の解析

- 1.1 当初はヒト ES 細胞も用いて行う計画であったが、大阪大学から京都府立医科大学への異動により新しい研究体制の立ち上げを行う必要性が生じ、また、京都府立医科大学にてヒト ES 細胞使用を文部科学省へと申請し認可を得る必要が生じたため、本助成期間中にヒト ES 細胞でのデータの取得にまでは至らなかった。当初よりも研究計画に遅れが生じているが、遺伝子変異細胞における遺伝子発現プロファイルデータを取得するための準備を行っている。
- 1.2 GFRA2 を介するシグナルとは並行して、転写因子 *Sox17* に依存するシグナル経路が心内膜で活性化し、このシグナルの異常は初期胚心臓の肉柱形成が妨げられ心筋緻密化に異常をきたすことを見出した。

2 オルガノイドの樹立

- 2.1 上述の通り、規制と手続き上の問題で、移籍先の新しい施設で年度内にヒト ES 細胞の使用を開始できず、まずはマウス ES 細胞を用いた検証へと方針転換を行った。
- 2.2 オルガノイド作成へ向けた最初のステップとして、まずは心内膜細胞(心臓前駆細胞由来の内皮細胞成分)の分化誘導と単離を行うシステムの確立に着手し、セルソーターを用いて GFRA2 陽性の心臓前駆細胞由来の内皮細胞マー

カーKDR を発現する細胞の単離にまで成功している。

【考 察】

1 シグナル経路の解析

- 1.1 既存の GFRA2 を介する可能性のあるシグナル経路からは、心筋緻密化に関与するシグナル経路へとの関連を今の段階ではまだ明らかにすることができていない。これにはさらなる検証を要する。
- 1.2 心筋緻密化に関与する未知シグナルを解明するには、次世代シーケンサーによる遺伝子発現プロファイルの解析に期待したい。準備が完了次第、データ取得に移る予定である。

2 オルガノイドの樹立

- 2.1 GFRA2 陽性心臓前駆細胞由来の内皮細胞成分は心内膜と見なし得ると考えられるが、心内膜のマーカーNFATc1などの発現を検証し、心内膜とみなし得るかどうかのさらなる検証を要する。
- 2.2 心内膜細胞を得る実験系が確立できれば、次に心筋との相互作用を観察するためのオルガノイドの樹立作業へと着手する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

約 80%の心筋緻密化障害の症例は、遺伝学的背景が不明である^{2,4)}。遺伝子異常が見出されている場合は、大半が MYH7 を代表するサルコメア構成分子の変異であり、ついで多いのが Bath 症候群の原因となりミトコンドリア機能の異常を生じる TAZ 遺伝子の変異である²⁾。MYH7 は緻密化障害以外の心筋症でも変異が多く見出されており、ヒトの臨床遺伝学的所見からは遺伝子型と表現型との相関の解釈に難渋しているのが現状である。一方で、動物実験からは、心筋緻密化には心臓の形態形成過程における肉柱の形成とその後の肉柱の消退の過程が必要で、前者は NOTCH シグナルが、後者は PCP 経路とミトコンドリアの機能が重要だと示されてきている¹⁾。残念ながら、上述したヒトの臨床遺伝学的所見とこれらの実験動物から得られた分子機構に関する情報との間には、現状では情報が十分ではないために接点が見出し難く、大きなギャップがある。従って、GFRA2 を介した新規シグナルを軸とした新たな心筋緻密化過程に関与する分子機構の情報は、このギャップを埋め、心筋緻密化障害の分子病態を理解するための新しい基盤となることが期待できる。また、ヒト心筋緻密化障害の大半で遺伝学的背景が不明なことから、緻密化過程を模倣できる *in vitro* のシステムとしてのオルガノイドが確立できれば、患者由来の iPS 細胞を用いることで、病理病態のさらなる理解への大きな一助になるはずであると考えられる。

【参考・引用文献】

1. Zhang, W., Chen, H., Qu, X., Chang, C. P. & Shou, W. Molecular mechanism of ventricular trabeculation/compaction and the pathogenesis of the left ventricular noncompaction cardiomyopathy (LVNC). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163C, 144-156, doi:10.1002/ajmg.c.31369 (2013).
2. Ichida, F. Left ventricular noncompaction - Risk stratification and genetic consideration. *J Cardiol* 75, 1-9, doi:10.1016/j.jcc.2019.09.011 (2020).
3. Ishida, H. et al. GFRA2 Identifies Cardiac Progenitors and Mediates Cardiomyocyte Differentiation in a RET-Independent Signaling Pathway. *Cell Rep* 16, 1026-1038, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.050 (2016).
4. van Waning, J. I. et al. Genetics, Clinical Features, and Long-Term Outcome of Noncompaction Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 71, 711-722, doi:10.1016/j.jacc.2017.12.019 (2018).