

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08229

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞および骨格筋細胞分化における脂肪酸受容体作用の解析

研究課題名(英文) Effects of free fatty acid receptors on the differentiation of human skeletal myogenesis.

研究代表者

今村 武史 (Imamura, Takeshi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00552093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト骨格筋細胞分化モデルを用いて、筋繊維特異的な分化機序を明らかにした。骨格筋細胞分化初期に一過性の高発現が認められたmicroRNA (miR)-494は、分化成熟に伴い有意な発現量減少が認められた。miR-494過剰発現により、骨格筋細胞分化は好氣的代謝活性の高いα型筋繊維形成有意が有意に抑制され、細胞の酸素消費率を低下させることが見出した。即ち、miR-494発現が過剰である場合は好氣的代謝活性の高い骨格筋線維が減少すると考えられた。以上の筋繊維型特異的な骨格筋細胞分化調節機序より、miR-494がサルコペニアなどの筋萎縮症に対する創薬標的となり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： In this study, we have established human induced-pluripotent stem (hiPS) cells transfected with MyoD expression vector, which differentiate to myotubes with more than 80% efficiencies (MyoD-hiPS cells). Using this system, we have detected a unique microRNA, miR-494 which was downregulated after myogenic induction. To explore the therapeutic potential of miR-494, we investigated the role of miR-494 during human skeletal myogenesis. In MyoD-hiPS cells transfected with miR-494 precursor, the level of type IIa myofiber marker proteins specifically decreased, while no change in the total number of cells was observed. In contrast, the expression of both type I and type IIx myofiber markers was unaffected by miR-494 overexpression. Furthermore, miR-494 overexpression suppressed mitochondrial oxygen consumption rate concomitant with the inhibition of myotube formation. These results suggest that miR-494 could be a therapeutic target for muscular diseases, such as sarcopenia.

研究分野：薬理学

キーワード：骨格筋細胞 脂肪酸受容体 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、GPR43 や GPR120 を含む脂肪酸受容体機能の解析が進められ、インスリン抵抗性環境下における代謝改善作用が明らかにされつつある。本研究代表者はこれまでに、 ω -3 長鎖不飽和脂肪酸受容体である GPR120 遺伝子改変マウス、および短鎖脂肪酸受容体 GPR43 遺伝子改変マウスを用いた共同研究において、GPR120 および GPR43 受容体がインスリン感受性改善作用を有することを報告した。脂肪細胞に高発現するこれらの受容体作用により、脂肪組織のみならず肝臓や骨格筋などの代謝組織においてインスリン感受性が改善し、糖尿病をはじめインスリン抵抗性症候群の治療薬としての効果が期待されている。これまでに得られた知見として我々は、GPR120 あるいは GPR43 アゴニストによるインスリン感受性改善作用の 1 つとして高脂肪食負荷により生じた脂肪細胞肥大を改善させたことが挙げられる。脂肪細胞肥大を生じる原因は脂肪蓄積量の増大に見合う数量の脂肪細胞が新規供給されないためと捉えることができることから、GPR43 あるいは GPR120 作用により幹細胞が活性化し、新生脂肪細胞の供給数増加の結果として細胞肥大が改善した可能性が考えられた。即ち、即ち、脂肪酸受容体作用により幹細胞が活性化され、新生細胞供給増加による組織再生を生じるという仮説を得た。

2. 研究の目的

今回我々は、幹細胞としてヒト iPS 細胞からの (1) 骨格筋細胞分化および (2) 血管内皮細胞分化における脂肪酸受容体作用とその分子機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

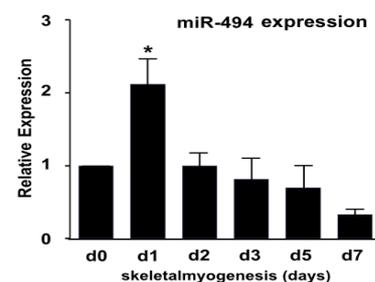
(1) ヒト骨格筋は収縮速度が遅い I 型線維と、速い II 型線維に大別できる。II 型はさらにミトコンドリアが豊富な IIa 型線維と少ない IIx 型線維に分けられる。2 型糖尿病ではミトコンドリアが豊富で有酵素的解糖能が高い I 型や IIa 型線維の割合が低くなることが知られており、骨格筋における I 型および IIa 型線維萎縮を介した基礎代謝低下が耐糖能悪化を招く例が多く報告されている。筋線維特異的なヒト骨格筋細胞分化機序は未だ不明の部分が多い。まず、培養ヒト iPS 細胞に GPR43、GPR120 アゴニストを附置し、幹細胞増殖能 (レゾルフィン蛍光アッセイ定量)、分化能 (三胚葉特異的分化マーカー遺伝子発現解析) を定量した。同時に、G 蛋白共役型受容体としてのシグナル伝達因子について、セカンドメッセンジャー阻害剤の附置により、受容体特異的な作用であることを確認した。また、各因子に対するインヒビターおよび RNAi を用いたノックダウン法により、脂肪酸受容体が幹細胞機能に与える作用を確認した。次に、多能性幹細胞から機能細胞への分化過程における受容体作用を検討するため、骨格筋特異的転写因子 MyoD1 を発現させたヒト iPS 細胞・iPS-

MyoD 細胞を用いた。即ち、ドキシサイクリン添加による Tet-ON-MyoD1 遺伝子の発現誘導により、骨格筋細胞分化を開始した iPS-MyoD 細胞および対照 iPS 細胞に対し、時間軸特異的に GPR43、GPR120 アゴニストを附置した。上述と同様の方法により、骨格筋細胞および筋繊維型特異的マーカー (Myh2、Myh7) 遺伝子およびタンパク発現量を分化時間軸において定量評価するとともに、成熟骨格筋としての筋管形成効率をミオシン重鎖抗体による蛍光抗体染色を用いて定量評価・比較した。更に、筋繊維に特徴的なミトコンドリア活性を測定するために、フラックスアナライザーを用いた酸素消費量の測定を行った。

(2) 一方で我々は、インスリン抵抗性条件下では、血管内皮細胞障害が生じる分子機序をこれまで数多く報告してきた。血管内皮細胞は血管機能の中心的役割を果たしており、糖尿病合併症の初発部位として、血管内皮障害の存在は広く知られている。近年、糖尿病患者の血中における血管内皮前駆細胞数が少なく、また増殖能が減弱していることが報告されており、インスリン抵抗性下では幹細胞から血管内皮細胞への分化能が低下していると考えられた。まず、培養ヒト iPS 細胞に FGF2 および BMP4 附置を行い血管内皮細胞への誘導を開始した。分化誘導 4 日目より VEGF および cAMP 附置を行い、9 日目にセルソーターを用いて VECad⁺、CD31⁺細胞の選別を実施した。分化誘導 8 日目までの時間軸特異的に GPR43、GPR120 アゴニストを附置した。上述と同様の方法により、血管内皮細胞特異的マーカー遺伝子およびタンパク発現量を分化時間軸において定量評価するとともに、成熟血管内皮細胞への分化効率を VECad 蛍光抗体染色により定量評価・比較した。更に、血管内皮細胞特異的活性を測定するために、Ach 刺激を用いた一酸化窒素 (NO) 産生量の測定を行った。

4. 研究成果

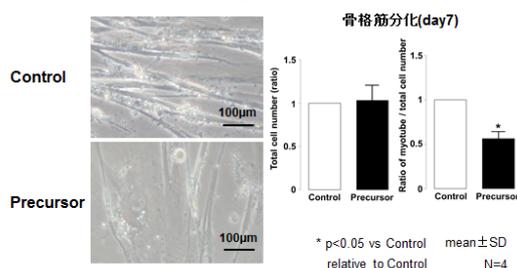
(1) ヒト iPS 細胞のクローンごとの違いを確認するため、すべての実験において iPS-MyoD 細胞は 2 クローンを使用し、ほぼ同様の結果が得られた。これにより、細胞クローン間の違いによる影響は除外できた。ヒト iPS-MyoD 細胞を用いた骨格筋細胞分化過程の網羅的遺伝子発現解析により、我々は microRNA の 1 つである miR-494 が分化誘導直後に一過性に発現上昇し、以降は有意に減少することを見出した。



上図のように、miR-494はヒト骨格筋分化誘導初期(day1)に一過性に発現上昇し、day2以降において有意に減少した。このmiR-494発現の一過性増加現象が、骨格筋細胞分化に与える影響を明らかにするため、まずmiR-494阻害実験で分化初期(day1)の一過性上昇を阻害したが、成熟した筋管細胞への分化、骨格筋細胞の酸素消費速度、mitotracker red染色で染まる筋管細胞の割合には有意な変化を認めなかった。GPR43アゴニスト・butyric acid附置によるmiR-494発現量は変化しなかったが、GPR120アゴニストであるdocosahexaenoic acidあるいはGW9508附置により、miR-494発現の一過性増加現象を増大させることを見出した。

(2)一方、day1以降もmiR-494を過剰発現させ続けたところ、多核を有する筋管細胞形成能の低下が観察された。骨格筋細胞の酸素消費速度が減少し、mitotracker red染色で染まる筋管細胞の割合も減少した。また、miR-494過剰発現によってI型筋線維マーカータンパク(Myh7)発現は有意な変化がなかったが、IIa型筋線維マーカータンパク(Myh2)発現は有意に低下し、NADH染色およびSDH染色で染まる筋管細胞の割合も減少した。ミトコンドリアDNA、ミトコンドリア関連タンパク発現については有意な変化を認めなかった。更に、分化day5でMyh2に対するsiRNAをトランスフェクションすることによってMyh2をノックダウンすると、骨格筋細胞の酸素消費速度が減少し、mitotracker red染色で染まる筋管細胞の割合も減少し、NADH染色およびSDH染色で染まる筋管細胞の割合も減少した。

筋管細胞形成能の検討



(3)分化誘導7日目におけるヒト骨格筋細胞の酸素消費率について、miR-494過剰発現細胞と対照細胞をFlux Analyzerを用いて定量比較したところ、miR-494過剰発現細胞では基礎酸素消費率(basal oxygen consumption rate)が有意に減少していた。即ち、miR-494過剰発現によって有酸素的解糖能の高い骨格筋細胞の分化形成が阻害されていることが示された。ただし、最大酸素消費率(maximal mitochondrial respiration /basal oxygen consumption rate)に有意差は認められず、miR-494はミトコンドリア呼吸能自体には影響を与えないことが示唆された。また、ミトコンドリアDNAコピー数の検討ではmiR-494過剰発現細胞と対照細胞間に有意差は無く、

SDHA (succinate dehydrogenase complex subunit A)、およびMnSOD (manganese superoxide dismutase)タンパク発現量は、単位タンパク量にて補正した場合miR-494過剰発現細胞と対照細胞ともに有意差はなかった。以上の結果、miR-494はヒト骨格筋細胞分化の障害を惹起するが、ミトコンドリア生合成には影響を与えないものと考えられた。

(4)ヒト骨格筋細胞分化に関与するmiR-494の標的遺伝子を探るため、miR-494過剰発現細胞と対照細胞由来の有酸素的解糖能の高い筋管細胞を比較検討することにより、有酸素的解糖能の高い骨格筋細胞形成に重要なタンパク発現量の検討を行った。有酸素的解糖能の高い筋繊維はI型およびIIa型筋繊維の中で、I型筋繊維特異的分子マーカーであるMyh7タンパク発現量はmiR-494過剰発現細胞と対照細胞間に有意差は認められなかったが、IIa型筋繊維特異的分子マーカーであるMyh2タンパク発現量はmiR-494過剰発現細胞において有意に減少した。更にSDH活性染色により、有酸素的解糖能の高い筋管細胞数が有意に減少していることを見出し、これはIIa型筋繊維相当の筋管細胞数減少という上述の結果と合致するものであった。以上の成果は

以上より、GPR120刺激作用は骨格筋細胞分化において有酸素的解糖能の高い筋繊維形成を抑制する可能性が示唆された。

(5)ヒトiPS細胞から血管内皮細胞への分化誘導実験は既報(PLoS One2017, 12:e0173271)に従って、誘導初期のFGF2およびBMP4附置、および分化誘導4日目以降のVEGFおよびcAMP附置を行い、セルソーターを用いたVECad⁺、CD31⁺細胞の選別を行ったところ、両者陽性の細胞が幅広く分布しており、明らかな集団形成が認められなかった。中央値を基準として選別した細胞を誘導9日目からさらに継続培養し、14日目の細胞を血管内皮細胞機能実験に用いた。しかし、Ach刺激による血管内皮細胞由来NO産生能は実験毎の反応量に差が認められ、実験条件の調整による改善が得られなかった。原因として、セルソーターによる細胞選別に至るまでの過程において、建艦内皮細胞への分化過程に影響を与える未知要因が含まれていたと考えているが、本実験系は今後更に改良を進める予定である。

そこで我々は当初の研究計画を変更し、GPR120アゴニストであるdocosahexaenoic acid負荷ラットを作成し、摘出血管における血管内皮細胞機能改善効果を評価した。インスリン刺激などによる血管拡張作用は、血管内皮細胞における一酸化窒素(NO)産生を介するが、インスリン抵抗性環境下では逆に酸化物質(superoxide等)の産生を亢進させる。その結果、細胞外ではNO酸化現象による血管拡張反応抑制を引き起こすが、GPR120アゴニストは4-hydroxyhexenal(4-HHE)産生介して酸化ストレスにより活性化されたp38MAPキ

ナーゼを抑制することで血管拡張反応を改善させることを見出した。以上の結果より、GPR120 アゴニストは血管内皮細胞機能障害に対し、酸化ストレスおよび炎症性反応抑制を介した血管機能改善効果を有することが示された。

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 5 件)

① Okada T, Morino K, Nakagawa F, Tawa M, Kondo K, Sekine O, Imamura T, Okamura T, Ugi S, Maegawa H. N-3 polyunsaturated fatty acids decrease the protein expression of soluble epoxide hydrolase via oxidative stress-induced P38 kinase in rat endothelial cells. *Nutrients* (査読有) 2017, 9(7):1-14. DOI:10.3390/nu9070654

② Tawa M, Kinoshita T, Asai T, Suzuki T, Imamura T, Okamura T. Impact of type 2 diabetes on vascular reactivity to cGMP generators in human internal thoracic arteries. *Vascul. Pharmacol.* (査読有) 2017, 91: 36-41. DOI:10.1016/j.vph.2017.03.001

③ Shimosato T, Tawa M, Iwasaki H, Imamura T, Okamura T. Aging does not affect soluble guanylate cyclase redox state in mouse aortas. *Physiol. Rep.* (査読有) 2016, 4(10):e12816. DOI:10.14814/phy2.12816.

④ Tawa M, Shimosato T, Iwasaki H, Imamura T, Okamura T. Different influences of extracellular and intracellular superoxide on relaxation through the NO/sGC/cGMP pathway in isolated rat iliac arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (査読有) 2015, 65(2):160-167. DOI:10.1097/FJC.000000000000173.

⑤ Iwasaki H, Imamura T, Morino K, Shimosato T, Tawa M, Ugi S, Sakurai H, Maegawa H, Okamura T. MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis in human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 2015, 468(1-2):208-213. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.10.128.

[学会発表] (計 6 件)

① Imamura T, et al. : MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis by targeting transcriptional coactivator p300 in human induced pluripotent stem cells. 第 18 回 WCP 国際薬理学会 (2018 年 7 月 1 日、国立京都国際会

議場)

② 今村武史、他：筋線維型特異的ヒト骨格筋細胞分化における転写共役因子 p300 の役割 第 16 回日本再生医療学会総会 (2017 年 3 月 7 日、仙台国際センター)

③ 今村武史、他：microRNA-494 はヒト骨格筋細胞分化において筋線維型特異的分化を制御する 第 59 回日本糖尿病学会総会 (2016 年 5 月 19 日、国立京都国際会議場)

④ 今村武史、他：筋線維型特異的ヒト骨格筋細胞分化における microRNA-494 の役割 第 15 回日本再生医療学会総会 (2016 年 3 月 17 日、大阪国際会議場)

⑤ 今村武史、他：MicroRNA-494 はヒト iPS 細胞由来の骨格筋細胞においてミトコンドリア酸素消費量を制御する 第 127 回日本薬理学会近畿部会 (2015 年 11 月 20 日、千里ライフサイエンスセンター)

⑥ Imamura T, et al. : The Role of MiR-Shiga in the Human Skeletal Muscle Differentiation. *Keystone Symposia - Diabetes, Insulin Action and Resistance* (2015 年 10 月 25 日、都ホテル京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/molpharm/3213/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 武史 (IMAMURA, Takeshi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00552093

(2) 研究分担者

森野 勝太郎 (MORINO, Katsutarou)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90444447

(3) 連携研究者

櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号：80528745

田和 正志 (TAWA, Masashi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10510274

(4) 研究協力者

岩崎 広高 (IWASAKI, Hiroataka)