

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19397

研究課題名(和文) GATA4を介した循環器疾患と運動器症候群の病態連関

研究課題名(英文) Relationship between cardiovascular and muscular disorders via GATA4

研究代表者

高谷 智英 (Takaya, Tomohide)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：00450883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心筋で発現する循環器病の増悪因子GATA4は、骨格筋幹細胞にも発現して筋再生に寄与することから、高頻度で併発する循環器-運動器疾患には生理的な連関があると考えられる。骨格筋芽細胞の分化を促進する分子をスクリーニングした結果、18塩基の新規配列myoDNの同定に成功した。myoDNは筋芽細胞の分化を促進するだけでなく、ES/iPS細胞の心筋分化を誘導する作用を示した。myoDNは、骨格筋と心筋に共通する標的に作用し、細胞の運命決定を制御していると考えられる。myoDNは、糖尿病患者で増悪する筋分化を改善するなど、循環器・代謝疾患に関連して生じる筋萎縮の予防や治療に有用な分子であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋や骨格筋の分化を誘導するオリゴDNAはmyoDNが世界初である。myoDNは革新的な核酸分子として、筋萎縮に代表されるロコモティブ症候群の予防・治療に有用な医薬品や機能性食品の素材として応用展開が期待される。また、myoDNを投与するだけでiPS細胞の心筋分化が著明に誘導されることから、心臓再生療法や創薬スクリーニングに不可欠な心筋細胞の作成に貢献できると考えられる。本研究成果を基盤として、myoDNと類似の作用を示す新規オリゴDNA配列や、myoDNの作用を増強する小分子を同定するなど、オリゴDNAによる細胞分化の制御技術の開発も進んでいる。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disorders and muscular diseases are considered to be related because transcription factor GATA4 is commonly expressed both in cardiomyocytes and skeletal muscle stem cells. By high-throughput screening using myoblasts, we identified a novel 18 nt-oligodeoxynucleotide, named myoDN, which intensively induces myogenic differentiation. myoDN also enhanced myocardial differentiation of pluripotent stem cells. myoDN is considered to be regulate cell fates by affecting the common target(s) existing both in cardiac and skeletal muscle. myoDN improved the deteriorated myoblast differentiation of diabetic patients. It indicates that myoDN will be a useful molecule for prevention and therapy of muscle atrophy caused by cardiovascular and metabolic disorders.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々には心筋・骨格筋・平滑筋の三種の筋肉がある。健康的な生活には全筋肉の機能が必須である。循環器疾患は心筋・血管平滑筋の、運動器症候群は骨格筋の障害や異常を伴う疾病だが、超高齢社会で急増するこれらの病態の連関を解明し、筋肉の全身的疾患として対処することは、健康長寿社会の実現に不可欠である。例えば、慢性心不全は骨格筋の萎縮を高頻度で併発する。しかし各筋肉の違いが障壁となり、循環器・運動器の統合的な理解は進んでいなかった。

(2) 転写因子 GATA4 は、循環器病の増悪因子として知られる。心筋は増殖しないため、ストレスを受けた心筋は GATA4 の活性化により代償的に肥大するが、最終的に心不全に陥る。血管平滑筋は増殖するが、GATA4 によって病的な分裂が誘導されると血管狭窄や心筋梗塞の原因となる。一方、骨格筋は細胞膜と基底膜の間に衛星細胞(幹細胞)を持ち、強靱な再生能を有する。筋組織が障害されると、衛星細胞は活性化して筋芽細胞となり、増殖・分化・融合を経て筋管を形成し、骨格筋を再生する。我々は、GATA4 が筋芽細胞の増殖を促進し、筋分化を抑制することを見出した。GATA4 が心筋・血管平滑筋・骨格筋の全てで働くことから、心血管機能が悪化する循環器疾患と、筋力や筋量が衰える運動器症候群の病態に連関があるのではないかと着想し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

循環器疾患と運動器症候群の連関を探求し、健康長寿社会にするため、これらの疾患に対する新たな病態理解と予防戦略を提案する。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋芽細胞の分化に影響する分子のスクリーニング系を確立した。マウス骨格筋から採取した筋芽細胞を 96 穴マルチプレートで培養する。筋芽細胞は増殖培地で維持、あるいは分化培地で筋分化を誘導する。これら筋芽細胞に各種ライブラリの分子を添加して培養し、対照群と比較して細胞分裂や筋分化が変化するかを検討する。細胞分裂は EdU の取り込み(染色体の分裂)、筋分化はミオシンの発現を指標とする。各々の蛍光画像の撮影と解析は、細胞イメージアナライザーで自動的に行い、ハイスループットでスクリーニングする。

(2) 上記スクリーニングで得られた分子が多能性幹細胞の分化に影響するかを検討する。具体的には、マウス ES/iPS 細胞をゼラチンコートディッシュに播種し、上記分子を添加した分化培地で自発的な分化を誘導する。多能性幹細胞の分化を、検鏡や定量的 PCR による遺伝子発現解析によって検討する。

4. 研究成果

(1) 筋芽細胞のスクリーニングにより、筋芽細胞の分化を強力に誘導する、テロメア型 18 塩基の新規オリゴ DNA 配列「myoDN」の同定に成功した。オリゴ DNA による筋分化の誘導は世界初の例である。myoDN は、ヒト、マウス、ニワトリの筋分化を促進することから、種間で保存されている分子基盤に作用することが示唆された。糖尿病患者やがん患者はしばしば筋萎縮を併発する。我々は、糖尿病患者から採取した筋芽細胞の分化が悪化していること、大腸がん細胞の分泌物が筋芽細胞の分化を抑制することを見出し、臨床的な筋疾患の in vitro モデルを確立した。myoDN は、これらの筋萎縮モデル系において、悪化した筋芽細胞の分化を有意に改善したことから、筋萎縮の予防や治療に有用な核酸分子であることが示された。

(2) myoDN を ES/iPS 細胞に投与した結果、自発的に拍動する心筋細胞のコロニーが多数得られた。心筋マーカーの発現を解析した結果、分化誘導 4 日目以降に myoDN を投与すると多能性幹細胞の心筋分化が顕著に促進されることがわかった。一方、分化誘導 3 日目に myoDN を投与すると、対照群と比較して、心筋分化が完全に抑制された。以上の結果から、myoDN は、多能性幹細胞において心筋細胞への運命を決定する因子に作用し、筋分化を制御することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Nihashi Y, Ono T, Kagami H, Takaya T*. Toll-like receptor ligand-dependent inflammatory responses in chick skeletal muscle myoblasts. *Dev Comp Immunol*. 2019; 91: 115-122.
DOI: 10.1016/j.dci.2018.10.013
2. Mitani T, Takaya T, Harada N, Katayama S, Yamaji R, Nakamura S, Ashida H. Theophylline suppresses interleukin-6 expression by inhibiting glucocorticoid receptor signaling in pre-adipocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2018; 646: 98-106.
DOI: 10.1016/j.abb.2018.04.001
3. Takaya T*, Nihashi Y, Kojima S, Ono T, Kagami H. Autonomous xenogenic cell fusion of murine and chick skeletal muscle myoblasts. *Anim Sci J*. 2017; 88: 1880-1885.
DOI: 10.1111/asj.12884
4. 高谷智英*. 筋疾患における転写因子 GATA4 の役割. *信州大学農学部紀要*. 2017; 53: 9-16.
<http://hdl.handle.net/10091/00019536>

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 石岡美奈, 二橋佑磨, 鏡味裕, 下里剛士, 高谷智英. 筋形成型オリゴ DNA はマウス多能性幹細胞の心筋分化を誘導する. 日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京), 2019/03/27 (口演).
2. Nakamura S, Yonekura S, Shimosato T, Takaya T. Myogenic differentiation-inducing oligodeoxynucleotide recovers the myoblast differentiation impaired by abnormal glucose concentration. The 4th International Conference on Pharma-Food (Shizuoka, Japan), 2018/11/15 (Poster), Won the Poster Presentation Award.
3. 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. ベルベリン類縁体による筋分化誘導型オリゴ DNA の作用増強. 日本農芸化学会中部支部第 183 回支部例会 (名古屋), 2018/09/15 (ポスター).
4. 石岡美奈, 二橋佑磨, 鏡味裕, 下里剛士, 高谷智英. 筋分化誘導型オリゴ DNA による多能性幹細胞の分化誘導. 日本農芸化学会中部支部第 183 回支部例会 (名古屋), 2018/09/15 (ポスター).
5. 中村駿一, 米倉真一, 下里剛士, 高谷智英. 糖濃度依存的な骨格筋分化抑制に対する筋分化誘導型オリゴ DNA の作用. 日本農芸化学会中部支部第 183 回支部例会 (名古屋), 2018/09/15 (ポスター).
6. Shinji S, Umezawa K, Shimosato T, Takaya T. Functional structure analyses of the DNA-alkaloid complex promoting myogenic differentiation. 2018 International

Symposium on Animal Science and Technology (Ina, Japan), 2018/08/10 (Poster).

7. Ishioka M, Nihashi Y, Kagami H, Shimosato T, Takaya T. Myogenic oligodeoxynucleotide, myoDN, induces myocardial differentiation of murine iPS cells. 2018 International Symposium on Animal Science and Technology (Ina, Japan), 2018/08/10 (Poster).
8. 高谷智英, 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士. 骨格筋分化を誘導する新規オリゴ DNA の同定と機能解析. 第 18 回日本抗加齢医学会 (大阪), 2018/05/25 (優秀演題受賞講演), 最優秀演題受賞.
9. 二橋佑磨, 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士, 小野珠乙, 鏡味裕, 高谷智英. 筋分化誘導型オリゴ DNA とベルベリンの複合体によるニワトリ筋芽細胞の分化誘導. 日本家禽学会 2018 年度春季大会 (東京), 2018/03/30 (口演), 優秀発表受賞.
10. 進士彩華, 中村駿一, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. 筋分化誘導型オリゴ DNA は横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制する. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋), 2018/03/17 (口演).
11. 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. テロメリックアプタマーとアルカロイドによる骨格筋分化誘導. 核酸化学若手フォーラム 2017 (東京), 2017/11/13 (ポスター).
12. 梅澤公二, 進士彩華, 大塚雅夢, 下里剛士, 高谷智英. 筋分化を誘導する DNA 配列に関する立体構造的特徴の計算化学による探索. 核酸化学若手フォーラム 2017 (東京), 2017/11/13 (ポスター).
13. Takaya T. Novel DNA aptamer activating skeletal muscle stem cells. Symposium on Advanced Materials and 3D Printing for Biomedical Applications, The 7th Institute for Biomedical Sciences International Symposium (Matsumoto, Japan), 2017/10/20 (Talk).
14. 二橋佑磨, 進士彩華, 小野珠乙, 鏡味裕, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. 乳酸菌オリゴ DNA による筋分化誘導を活用した鶏肉増産法の開発. 日本農芸化学会中部支部第 180 回支部例会 (名古屋), 2017/10/07 (ポスター).
15. 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. 乳酸菌オリゴ DNA と生薬分子の複合体による骨格筋分化誘導. 日本農芸化学会中部支部第 180 回支部例会 (名古屋), 2017/10/07 (ポスター).
16. 高谷智英. 骨格筋分化を促進するアプタマー: ロコモティブ症候群の予防を目指して. 日本薬学会東海支部特別講演会 (静岡), 2017/09/27 (特別講演).
17. 高谷智英. 骨格筋幹細胞における GATA4 の役割. 日本畜産学会第 123 回大会 (伊那), 2017/09/06 (口演).
18. 二橋佑磨, 進士彩華, 小野珠乙, 鏡味裕, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. 乳酸菌由来オリゴ DNA によるニワトリ筋芽細胞の分化誘導. 日本畜産学会第 123 回大会 (伊那), 2017/09/06 (口演).
19. 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. 筋分化を促進する乳酸菌オリゴ DNA によるヒト横紋筋肉腫の増殖抑制. 日本畜産学会第 123 回大会 (伊那), 2017/09/06 (口演).
20. Shinji S, Nihashi Y, Umezawa K, Shimosato T, Takaya T. Application of the oligodeoxynucleotide from lactic acid bacteria that promotes myogenic differentiation. 2017 Japan-Thailand International Symposium on Animal Biotechnology (Ina, Japan), 2017/07/05 (Poster).
21. 高谷智英, 進士彩華, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士. 骨格筋分化を特異的に促進する新規

核酸アプタマーの同定. 第 3 回国際心血管薬物療法学会日本部会学術集会 (東京), 2017/06/17 (ポスター), 研究奨励賞受賞.

22. 進士彩華, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英. 骨格筋幹細胞の分化に作用する乳酸菌由来オリゴ DNA の探索. 日本畜産学会第 122 回大会 (神戸), 2017/03/29 (口演).
23. 高谷智英, 進士彩華, 下里剛士. 口コミティブ症候群の予防に有益な機能分子の探索. 平成 28 年度長野県看護大学研究集会 (駒ヶ根), 2017/03/17 (ポスター).
24. 高谷智英. 転写因子 GATA4 は骨格筋幹細胞の増殖・分化を制御する. 第 2 回国際心血管薬物療法学会日本部会学術集会 (徳島), 2016/06/25 (ポスター).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 心筋分化促進剤

発明者: 高谷智英

権利者: 信州大学

番号: 特願 2018-142473

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

名称: 筋分化促進剤および筋分化促進方法および筋分化促進オリゴ DNA とその増強剤およびオリゴ DNA

発明者: 高谷智英、下里剛士、梅澤公二

権利者: 信州大学

番号: 特願 2017-150320

出願年: 2017 年

国内外の別: 国内

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、研究者個人に帰属されます。