

平成21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007 - 2008  
 課題番号：19590827  
 研究課題名 (和文) 胚性幹細胞の心血管細胞分化における microRNA の役割  
 研究課題名 (英文) Role of microRNA in embryonic stem cell differentiation into cardiovascular cells  
 研究代表者  
 高橋 知三郎 (TAKAHASHI TOMOSABURO)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20381973

研究成果の概要：本研究では、最近、新しい細胞機能制御機構として注目されている機能性非翻訳 RNA である miRNA の胚性幹細胞の心血管細胞分化における役割を検討し、心血管細胞分化に伴い発現が変動する多数の miRNA を同定し、その内、miR-1 が筋細胞分化に促進的に働き、さらにこの miRNA 生成系が細胞分化・血管内皮細胞機能に深く関わっていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

## 1. 研究開始当初の背景

障害され機能不全に陥った臓器に対して、幹細胞を直接あるいは間接的に利用することにより、その機能を回復させ治療を行おうという、再生療法が注目を浴びている。循環器領域においても、虚血性疾患に対する

血管新生療法、心不全に対する心筋再生療法が注目され、一部では、臨床での検討も始まっていた。しかし、ここで用いられる体性幹細胞、ES細胞の心血管細胞への分化の分子機構は依然、不明な点が多い。機能性非翻訳 RNA である microRNA (miRNA) が、多彩な生物学的

機構を介して細胞機能の制御に関わることが徐々に明らかとなりつつあったが、miRNAの心血管細胞の分化発生における発現と役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞といった心血管細胞の分化・機能におけるmiRNAの発現、制御機構と役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

miRNA registry に登録されているmiRNAを網羅するマイクロアレイを作成し、未分化ES細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などの心血管細胞分化細胞でmiRNAの発現プロファイルを行い、分化や細胞形質の変化に伴い特異的にその発現が制御されているmiRNAを同定する。またmiRNA生成に必須の酵素であるDicerのsiRNAによる抑制、過剰発現の系を確立し、miRNA全般の細胞機能における役割を解析、さらに上述した発現プロファイリングにより特異的に発現制御を受けることが明らかになった特定のmiRNAのsiRNAによる抑制、過剰発現の系を確立し、特定のmiRNAの機能解析を行う。

## 4. 研究成果

本研究では、ES細胞の心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞への分化を誘導し、その過程でのmiRNA発現の変化をマイクロアレイを用いてプロファイリングを行い、明らかにした。さらに血管内皮細胞のマトリゲルにおける血管様構造の形成においても、多数のmiRNA発現に変動が見られることを明らかにした。miRNAの生成に必須のRNase DicerはES細胞においては、細胞分化に必須であり、ノックダウンにより心血管細胞への

分化が著明に抑制されること、また、血管内皮細胞においては、Dicerは、細胞増殖、遊走、血管様構造の形成といった血管新生に関わる機能に重要な働きをしており、またアポトーシス刺激時の細胞死耐性にも関与することを示した。さらに筋特異的miRNAであるmiR-1は筋細胞分化において、様々な段階で促進的に働くが、他の細胞腫への分化を妨げないことも示した。これらの結果より、miRNAが心血管細胞においてダイナミックに調節を受け、その細胞機能に深く関わることが明らかとなった。

## 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21件)

1. Takahashi T, Matsubara H. New targeted angiogenic strategy: bursting bubbles. *Circ Res.* 2007;101:232-233.
2. Kitamura R, Takahashi T, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Ueno H, Ueyama T, Yoshikawa T, Matsubara H, Oh H. Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells. *Circ Res.* 2007;101:78-87.
3. Matsui A, Okigaki M, Amano K, Adachi Y, Jin D, Takai S, Yamashita T, Kawashima S, Kurihara T, Miyazaki M, Tateishi K, Matsunaga S, Katsume A, Honshou S, Takahashi T, Matoba S, Kusaba T, Tatsumi T, Matsubara H. Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function. *Circulation.* 2007;116:1041-1051.
4. Tateishi K, Ashihara E, Takehara N,

- Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. *J Cell Sci.* 2007;120:1791-1800.
5. Yamamoto T, Shirayama T, Sakatani T, Takahashi T, Tanaka H, Takamatsu T, Spitzer KW, Matsubara H. Enhanced activity of ventricular Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1254-H1264.
  6. Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Matsubara H, Oh H. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352:635-641.
  7. Nomura T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Ueyama T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in delta-sarcoglycan knockdown cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352:668-674.
  8. Ogata T, Ueyama T, Nomura T, Asada S, Tagawa M, Nakamura T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Osteopontin is a myosphere-derived secretory molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359:341-347.
  9. Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S, Hayashi H, Kimata M, Honsho S, Nishikawa S, Mano A, Shiraishi J, Yamada H, Takahashi T, Matoba S, Kobara M, Matsubara H. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. *Hypertens Res.* 2007;30:427-437.
  10. Asada S, Takahashi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H2512-2521.
  11. Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Harada K, Takahashi T, Shioi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol.* 2008;28:3424-3436.
  12. Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, Takahashi T, Takamatsu T, Fukushima M, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1858-1865.
  13. Harada K, Ogai A, Takahashi T, Kitakaze M, Matsubara H, Oh H. Crossveinless-2 Controls Bone Morphogenetic Protein Signaling during Early Cardiomyocyte Differentiation in P19 Cells. *J Biol Chem.* 2008;283:26705-26713.
  14. Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Takehara N, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am J*

*Physiol Cell Physiol.* 2008;295:C490-498.

15. Nomura T, Ueyama T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Nakajima N, Isodono K, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;365:863-869.

16. Sawada T, Takahashi T, Yamada H, Dahlof B, Matsubara H. Rationale and design of the KYOTO HEART study: effects of valsartan on morbidity and mortality in uncontrolled hypertensive patients with high risk of cardiovascular events. *J Hum Hypertens.* 2008.

17. Yamamoto T, Shirayama T, Takahashi T, Matsubara H. Altered expression of Na(+) transporters at the mRNA level in rat normal and hypertrophic myocardium. *Heart Vessels.* 2009;24:54-62.

18. 五十殿弘二, 浅田聡, 高橋知三郎, 辰巳哲也, 松原弘明. 【冠動脈疾患をめぐる最近の話題】 心筋梗塞への再生医療 Update 骨髄単核球を利用した細胞治療の現状. *内科.* 2007;100:529-535.

19. 的場聖明, 高橋知三郎, 松原弘明. 【"難病"診療の最前線】 心血管難病に挑む再生医療. *京都府立医科大学雑誌.* 2008;117:783-792.

20. 竹原有史, 天野克也, 高橋知三郎, 王英正, 夜久均, 田畑泰彦, 松原弘明. 心臓血管における組織工学 ヒト心臓由来多能性幹細胞と bFGF 徐放生体吸収ゼラチンゲルシート同時移植による心筋再生医療. *人工臓器.* 2008;37:S-32.

21. 竹原有史, 天野克也, 高橋知三郎, 王英正, 松原弘明. 【虚血性心疾患 診断と治療の進歩】 最近の話題 心臓再生医療の

現状と将来. *日本内科学会雑誌.* 2009;98:343-350.

[学会発表] (計12件)

① 中島規雄, 高橋知三郎, 北村亮治, 五十殿弘二, 浅田聡, 上山知己, 松原弘明, 王英正. 心筋・骨格筋特異的 microRNA-1 は、骨格筋細胞分化を制御する. 第36回日本心臓血管作動物質学会, 2007; 徳島.

② 北村亮治, 高橋知三郎, 中島規雄, 浅田聡, 五十殿弘二, 上山知己, 松原弘明, 王英正. 胚性幹細胞における内因性 Smad2 活性化による心筋細胞分化の時期特異的な相反する制御. 第36回日本心臓血管作動物質学会, 2007; 徳島.

③ 高橋知三郎, 王英正, 松原弘明. やさしい再生医療 - 幹細胞と心筋再生 -. 第71回日本循環器学会総会・学術集会, 2007; 神戸.

④ Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. MicroRNA-1 Facilitates Skeletal Myogenic Differentiation without Affecting Osteoblastic and Adipogenic Differentiation. 第71回日本循環器学会総会・学術集会, 2007; 神戸.

⑤ Kitamura R, Takahashi T, Nakajima N, Asada S, Isodono K, Ueno H, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Endogenous TGF-β Negatively Regulates Cardiac Differentiation through Smad2 Activation in Embryonic Stem Cells. 第71回日本循環器学会総会・学術集会, 2007; 神戸.

⑥ Nomura T, Ueyama T, Tateishi K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Myostatin-independent Activin Type II Receptor Ligands Signaling Regulate the Growth of Postnatal Muscle-derived Cardiac Progenitor

Cells. 第71回日本循環器学会総会・学術集会, 2007; 神戸.

⑦ Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Nakajima N, Itodono K, Asada S, Takehara N, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. A novel but evolutionary conserved muscle-restricted coiled-coil protein, MURC, regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. 第72回日本循環器学会総会・学術集会; 2008.03, 2008; 福岡.

⑧ Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Shioi T, Takahashi T, Harada K, Matsubara H, Oh H. A Novel Muscle-restricted Coiled-coil Protein, MURC, Induces Cardiac Dysfunction Accompanied with an Altered Gene Expression Profile. 第72回日本循環器学会総会・学術集会; 2008.03, 2008; 福岡.

⑨ Asada S, Takahashi T, Isodono K, Imoto H, Adachi A, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Cellular functions of Dicer in human endothelial cells. 第72回日本循環器学会総会・学術集会; 2008.03, 2008; 福岡.

⑩ Harada K, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Crossveinless-2 antagonizes the bone morphogenetic protein signaling to regulate cardiac mesodermal specification and differentiation in P19Cl6 embryonic carcinoma cells. 第72回日本循環器学会総会・学術集会; 2008.03, 2008; 福岡.

⑪ Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, Ogata T, Ueyama T, Takahashi T, Tanaka H, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Dose-dependent Functional Recovery of Human Cardiac Stem Cell Transplantation Combined with Control-Delivery of Angiogenic Growth Factor in Chronic Myocardial Infarction. 第72回日本循環器学会総会・学術集会; 2008.03, 2008; 福岡.

⑫ Isodono K, Takahashi T, Ogata T, Asada S, Imoto H, Adachi A, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. PARM-1, a Novel Transmembrane Molecule Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Cardiac Myocytes. 第72回日本循環器学会総会・学術集会; 2008.03, 2008; 福岡.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 知三郎 (TAKAHASHI TOMOSABURO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 20381973