

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05948

研究課題名（和文）筋分化誘導型オリゴDNAによる筋萎縮の予防・治療の基盤研究

研究課題名（英文）Preventive and therapeutic strategy of muscle atrophy by myogenic oligodeoxynucleotide

研究代表者

高谷 智英（Takaya, Tomohide）

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：00450883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳酸菌ゲノム配列に由来する18塩基の筋形成型オリゴDNA（myoDN）が、特徴的な立体構造を形成して標的タンパク質ヌクレオリンと結合するアプタマー（核酸抗体）として機能し、骨格筋を形成する筋芽細胞の分化を促進することを明らかにした。myoDNの筋分化促進作用は、糖尿病やがんが併発する筋萎縮モデル、筋芽細胞が腫瘍化した横紋筋肉腫、また家禽であるニワトリの筋芽細胞において確認され、疾患治療や食肉生産への応用可能性が示された。myoDNは、ゲノム配列由来オリゴDNAがアプタマーとして機能することを報告した点でも、核酸医薬開発に大きな波及効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代医薬品として期待される核酸医薬品だが、これまでに上市されたアプタマーは1件に留まる。本研究では、乳酸菌ゲノム配列を由来とするmyoDNが、アプタマーとして筋芽細胞に作用し、疾患モデルにおいて筋芽細胞の炎症反応を抑制するとともに筋分化能を著明に改善することを実証した。本研究は、ゲノム配列由来オリゴDNAが、加齢や様々な疾患で生じる筋萎縮の予防や治療に有望な医薬品シーズとなることを示した点において、学術的にも社会的にも意義が大きい。今後、動物試験を進め、myoDNの臨床応用につなげることで、研究成果の実用化が期待される。

研究成果の概要（英文）：An 18-base myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN) forms a globular structure, serves as an anti-nucleolin aptamer, and induces myogenic differentiation of muscle precursor cells, myoblasts. myoDN improves myogenic differentiation of muscle atrophy models (diabetes and cancer cachexia), rhabdomyosarcoma, and chicken myoblasts. It demonstrates that myoDN can be a functional molecule for disease therapy and meat production. myoDN also indicated that genome sequence-derived oligodeoxynucleotide can serve as aptamers, which provide a novel insight in development of nucleic acid drugs.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：筋形成型オリゴDNA アプタマー 筋萎縮 ロコモティブ症候群

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会では、健康寿命の延伸が喫緊の課題である。特に、加齢や代謝性疾患に伴う骨格筋の萎縮は、運動機能の低下を惹起し、ロコモティブ症候群の主要因となる。運動や代謝に重要な骨格筋の恒常性は、筋芽細胞の増殖と分化によって維持される。だが、筋芽細胞の分化能力は加齢により減弱するため、筋芽細胞に作用し、その機能を活性化する分子の開発と実用化が求められていた。研究代表者は、マウス筋芽細胞を用い、骨格筋マーカーのミオシン重鎖陽性率を指標としたハイスループット・スクリーニングの結果、極めて強力に筋分化を誘導する分子として、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来するオリゴ DNA 配列「myoDN」の同定に成功した。myoDN の筋分化誘導能は、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）の予防や、糖尿病等の代謝疾患で併発する筋萎縮の治療に有用と考えられ、核酸医薬品として応用されることが期待される。

2. 研究の目的

研究代表者が発見した、筋分化誘導型オリゴ DNA 「myoDN」について、(1) myoDN による筋分化誘導機構の分子生物学的な解明、(2) 糖尿病筋芽細胞への応用、(3) がんカヘキシーおよび横紋筋肉腫への応用、に関する研究を行う。これにより、筋分化誘導分子 myoDN を、超高齢社会においてますます増加する加齢性および代謝性の筋萎縮の予防・治療に有用な核酸医薬品へと応用するためのエビデンスを確立する。

3. 研究の方法

(1) myoDN が作用する細胞内シグナル伝達経路を同定するため、myoDN を投与した筋芽細胞における全遺伝子の発現を RNA-seq により定量する。全遺伝子を階層的にクラスタリングし、myoDN 依存的に発現が変化する遺伝子群を抽出する。これらをオントロジー解析によって機能的に分類し、myoDN が活性化ないし抑制する細胞内シグナルネットワークを同定する。以上の解析で同定した遺伝子を筋芽細胞で強制発現またはノックダウンさせ、myoDN を投与した場合と同じ筋分化誘導が再現されるかを検討する。また、同定したシグナル経路のアゴニストやアンタゴニストを投与し、筋芽細胞の増殖・分化の変化を検証する。

(2) 研究代表者は、糖尿病を模した高グルコース・高脂肪酸培地がマウス筋芽細胞の分化を阻害する実験系を確立した。この系を用い、myoDN が高血糖で増悪する筋分化を回復するかを検証する。さらに、ヒト I 型および II 型糖尿病患者の筋芽細胞を用いて同様の実験を行い、糖尿病が呈する筋萎縮について、新しい治療法の提案を目指す。ミオシン重鎖の免疫染色で筋細胞の出現率を、qPCR により筋原性遺伝子および炎症性サイトカインの発現を定量することで、筋分化と炎症応答を評価する。

(3) がんカヘキシー（悪液質）のモデルとして、大腸がん細胞の培養上清でヒト筋芽細胞を誘導し、myoDN 投与によって、がん細胞分泌物による筋分化阻害が改善されるかを検証する。ミオシン重鎖の免疫染色で筋細胞の出現率を、qPCR により筋原性遺伝子および炎症性サイトカインの発現を定量することで、筋分化と炎症応答を評価する。また、ヒト患者から採取された横紋筋肉腫細胞を用い、myoDN が筋分化を促進することで、横紋筋肉腫の増殖を抑制するかを検討する。細胞数の計測および Edu 染色によって細胞増殖を定量する。さらに、生体内での腫瘍増殖を模し

た三次元培養系を用い、myoDN の抗腫瘍作用を検証する。

4 . 研究成果

(1) RNA-seq の結果、myoDN 投与によって筋芽細胞内で発現が変動する 899 遺伝子を同定した。オントロジー解析の結果、myoDN によって発現が誘導される 476 遺伝子は、筋形成、筋収縮、筋発生に関わる因子を多く含んでいた。一方、myoDN によって発現が抑制される 423 遺伝子には、細胞周期や細胞増殖に関わる因子が豊富に含まれていた。myoDN の標的であるヌクレオリンは、p53 mRNA の 5' 側非翻訳領域に結合して、p53 タンパク質の翻訳を阻害することが知られている。myoDN 投与群では、ヌクレオリンが阻害されることで、p53 タンパク質量が増加し、p53 シグナルが活性化し、筋分化が誘導されることが示された。既存の抗ヌクレオリンアプタマーである AS1411 を投与しても、myoDN を投与した場合と同程度に筋分化が促進された。以上の結果から、myoDN は筋芽細胞内でヌクレオリンを阻害することにより p53 シグナル経路を活性化して筋分化を誘導するという作用機序が明らかになった。

(2) ヒト患者から採取された市販の筋芽細胞を用いた結果、I 型および II 型糖尿病患者の筋芽細胞では、健常者と比較し、筋分化能が悪化していることがわかった。myoDN の投与によって、糖尿病患者の筋芽細胞の分化が改善したことから、myoDN は、糖尿病が合併する筋萎縮の予防や治療に有用であることが示された。興味深いことに、糖尿病筋芽細胞で発現が上昇する炎症性サイトカインが、myoDN の投与によって抑制されることが明らかになった。myoDN の抗炎症作用を検討した結果、myoDN はヌクレオリン阻害を介して カテニンの細胞内蓄積を抑制し、NF- κ B の核内移行を阻害することによって炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかになった。

(3) 大腸がん細胞の培養上清でヒト筋芽細胞を分化誘導すると、炎症反応が誘導され、筋分化が著明に悪化した。しかし、myoDN 投与によって炎症応答が抑制され、筋分化が改善された。このことから、myoDN はがん患者の多くが併発するカヘキシーによる筋量減少に有効であることが示唆された。また、横紋筋肉腫細胞株 3 種に myoDN を投与したところ、いずれの細胞株においても細胞増殖が有意に抑制された。myoDN は、三次元培養においても肉腫塊の形成を阻害することが示された。以上の結果から、myoDN は横紋期肉腫の増殖を抑制することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takaya Tomohide, Nihashi Yuma, Ono Tamao, Kagami Hiroshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Transcription of Endogenous Retrovirus Group K Members and Their Neighboring Genes in Chicken Skeletal Muscle Myoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 79～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0200021	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 Nakamura Shunichi, Yonekura Shinichi, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide	4. 巻 12
2. 論文標題 Myogenetic Oligodeoxynucleotide (myoDN) Recovers the Differentiation of Skeletal Muscle Myoblasts Deteriorated by Diabetes Mellitus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 679152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.679152	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 Nihashi Yuma, Shinji Sayaka, Umezawa Koji, Shimosato Takeshi, Ono Tamao, Kagami Hiroshi, Takaya Tomohide	4. 巻 92
2. 論文標題 Myogenetic oligodeoxynucleotide complexed with berberine promotes differentiation of chicken myoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinji Sayaka, Umezawa Koji, Nihashi Yuma, Nakamura Shunichi, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of the myogenetic oligodeoxynucleotides (myoDNs) that promote differentiation of skeletal muscle myoblasts by targeting nucleolin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 616706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.616706	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 Hosotani Marina, Kawasaki Takeshi, Hasegawa Yasuhiro, Wakasa Yui, Hoshino Maki, Takahashi Naoki, Ueda Hiromi, Takaya Tomohide, Iwasaki Tomohito, Watanabe Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Physiological and pathological mitochondrial clearance is related to pectoralis major muscle pathogenesis in broilers with wooden breast syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00579	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 Takaya Tomohide, Nihashi Yuma, Ono Tamao, Kagami Hiroshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Transcription of endogenous retrovirus group K members and their neighboring genes in chicken skeletal muscle myoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 79-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0200021	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 Shinji Sayaka, Nakamura Shunichi, Nihashi Yuma, Umezawa Koji, Takaya Tomohide	4. 巻 84
2. 論文標題 Berberine and palmatine inhibit the growth of human rhabdomyosarcoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 63-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1659714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nihashi Yuma, Umezawa Koji, Shinji Sayaka, Hamaguchi Yu, Kobayashi Hisato, Kono Tomohiro, Ono Tamao, Kagami Hiroshi, Takaya Tomohide	4. 巻 9
2. 論文標題 Distinct cell proliferation, myogenic differentiation, and gene expression in skeletal muscle myoblasts of layer and broiler chickens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52946-4	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 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nihashi Yuma, Miyoshi Mana, Umezawa Koji, Shimosato Takehsi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Osteogenetic oligodeoxynucleotide (osteodN) osteoblast mineralization independently of TLR9
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyoshi Mana, Nihashi Yuma, Umezawa Koji, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN) suppresses proliferation and induces differentiation of vascular smooth muscle cells
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morioka Kamino, Mitani Takakazu, Umezawa Koji, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN) suppresses adipocyte differentiation
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高谷智英
2. 発表標題 骨格筋芽細胞の増殖・分化を制御する分子群の同定
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 骨芽細胞の分化・石灰化を促進する乳酸菌由来オリゴDNAの同定
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第187回支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村駿一, 進士彩華, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 筋形成型オリゴDNAは翻訳制御因子ヌクレオリンを標的として筋分化を誘導する
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第187回支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 新規骨形成型オリゴDNA配列の同定
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田玲奈, 梅澤公二, 二橋佑磨, 下里剛士, 坂本泰一, 高谷智英
2. 発表標題 筋形成型オリゴDNAの短縮化と構造的特徴
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好愛, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 血管平滑筋の分化における筋形成型オリゴDNAの作用
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森岡一乃, 三谷壘一, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 脂肪細胞分化における筋形成型オリゴDNAの作用
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細谷実里奈, 川崎武志, 長谷川靖洋, 若櫻祐衣, 星野真希, 高橋直紀, 植田弘美, 高谷智英, 岩崎智仁, 渡邊敬文
2. 発表標題 プロイラーのWooden Breast病態を左右するミトコンドリアクリアランス機構
3. 学会等名 第1回日本獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaya Tomohide
2. 発表標題 Discovery and application of myogenetic oligodeoxynucleotides (myoDNs)
3. 学会等名 International Joint Seminar 2019 Sejong University-Shinshu University-Kasetsart University (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Sayaka, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Action mechanism of myogenetic oligodeoxynucleotides (myoDNs)
3. 学会等名 International Joint Seminar 2019 Sejong University-Shinshu University-Kasetsart University (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nihashi Yuma, Umezawa Koji, Hamaguchi Yu, Kobayashi Hisato, Kono Tomohiro, Ono Tamao, Kagami Hiroshi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 RNA sequencing for global gene expression associated with proliferation and differentiation in chicken skeletal muscle myoblasts
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Tropical Animal Science and Production (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田玲奈, 梅澤公二, 二橋佑磨, 進士彩華, 下里剛士, 鏡味裕, 高谷智英
2. 発表標題 構造計算に基づいた筋形成型オリゴDNAの短縮化
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田章太郎, 鈴木穰, 高谷智英, 米倉真一
2. 発表標題 骨格筋分化における小胞体ストレス応答因子IRE1によるId3発現制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二橋佑磨, 進士彩華, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 筋形成型オリゴDNAはがん分泌因子による筋分化阻害を回復する
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 進士彩華, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 筋形成型オリゴDNA依存的な遺伝子発現変動の網羅的解析
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田玲奈, 梅澤公二, 二橋佑磨, 進士彩華, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 新規筋形成型オリゴDNAの同定と構造アンサンブルの解析
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura Shunichi, Umezawa Koji, Yonekura Shinichi, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Application of myogenetic oligodeoxynucleotide to diabetic skeletal muscle myoblasts
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishioka Mina, Nihashi Yuma, Umezawa Koji, Kagami Hiroshi, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Induction of cardiac differentiation of pluripotent stem cells by myogenetic oligodeoxynucleotide
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umezawa Koji, Yamamoto Yoshinari, Shimosato Takeshi, Takaya Tomohide
2. 発表標題 Conformational difference between two types of biologically active oligodeoxynucleotides
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二橋佑磨, 進士彩華, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 大腸がん分泌因子で抑制される筋分化に対する筋形成オリゴDNAの作用
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村駿一, 米倉真一, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 筋形成オリゴDNAは高濃度グルコースで抑制される骨格筋分化を改善する
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石岡美奈, 二橋佑磨, 鏡味裕, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 筋形成型オリゴDNAは多能性幹細胞の分化ステージに依存して心筋分化を誘導または阻害する
3. 学会等名 第4回国際心血管薬物療法学会日本部会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村駿一, 米倉真一, 下里剛士, 高谷智英
2. 発表標題 糖尿病筋芽細胞の分化における筋形成型オリゴDNAの作用
3. 学会等名 第4回国際心血管薬物療法学会日本部会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 骨分化促進オリゴヌクレオチド	発明者 高谷智英, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-122713	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂肪分化抑制剤	発明者 高谷智英, 三谷塁一	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-125833	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 骨分化促進オリゴヌクレオチド	発明者 高谷智英, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-126866	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 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	発明者 梅澤公二, 高谷智英	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-142724	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

信州大学農学部分子細胞機能学研究室
<https://t-takaya.net/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------