

研究助成 2021 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	京都府立医科大学 循環器内科
氏 名	木谷 友哉
研究テーマ	CRISPR スクリーニングによる糖尿病性心不全治療標的分子の探索

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
（図表、写真などの貼付を含む）

【研究目的】 糖尿病患者および糖尿病を基礎疾患として心不全を発症する患者数は増加の一途をたどっている。しかし、糖尿病が心臓に直接与える影響については不明な点が多く残されており、またその影響を軽減する方法は現在も確立していない。そこで我々は、心筋細胞において代謝異常が及ぼす影響を細胞レベルでの表現型から判断し、その際に治療標的となりうる分子機構を遺伝子スクリーニングから解明することを目的として設定し、研究を実施した。

【研究方法】 健常人由来多能性幹細胞よりヒト心筋細胞を大量に作出し、CRISPR/Cas9 技術を用いた遺伝子ノックアウトスクリーニングを実施した。糖尿病モデルとしては既報にてヒト心筋細胞に対して使用が報告されている GEC 培地（10 mM glucose, 10 nM endothelin-1, 1 μM cortisol）を用いた。心筋細胞における病的異常表現型としては細胞内の ProBNP の蓄積ないしは脂肪滴の蓄積を指標とすることし、抗体を用いた免疫染色、ないしは BODIPY 試薬にてフローサイトメトリーにより各々評価を行った。ProBNP ないしは脂肪滴が高度/軽度の心筋細胞をフローサイトメトリーによる細胞分取にて回収し、各々のゲノム DNA より NGS ライブラリーを作成し、gRNA へのアライメント情報を元に、細胞に表現型影響を与える遺伝子ランキングを作成した。

【研究結果】 GEC 培地による刺激によって心筋細胞内には ProBNP の蓄積および脂肪滴の蓄積が認められた。そこでまず ProBNP の蓄積に影響を与える遺伝子を検索するため、全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウトライブラリーを用いたスクリーニングを計 4 回実施し、遺伝子ランキングの作成を行った。結果、Serine/Threonine Kinase 11 (STK11、別名 LKB1) が心筋内脂肪蓄積において重要な役割を果たす可能性が高い遺伝子であるという結果が得られたものの、本遺伝子に関しては糖代謝を含め細胞での役割が既報にて詳細に明らかにされていることから引き続き研究を継続する標的として不適であると判断した。

次に、実際に糖尿病罹患患者で確認される心筋細胞内の脂肪蓄積を糖尿病状態による心筋細胞障害の指標として用いる事とした。さらに、キナーゼはこれまでに創薬標的として盛んに研究が実施されてきた歴史的経緯から、新規の治療標的を同定するためにエピゲノム制御に関連する遺伝子を標的とした遺伝子ノックアウトライブラリーを用いたスクリーニングを新たに実施した。現在計 2 回のスクリーニングの実施を完了し、初期の結果が得られている状態である。現在のランキングに基づいて、治療標的として最も有望である可能性が高い心筋内脂肪蓄積抑制遺伝子はクロマチンリモデリングに影響する遺伝子であり、これまでに DNA 損傷応答や細胞内代謝における役割が報告されている。しかし、心筋細胞においては発生時の役割に関するのみ報告されている状態であり、成体の疾患における役割は不明な状態である。今後同定した遺伝子の心筋細胞における遺伝子ノックアウトの表現中を解析し、動物モデルなどを用いて糖尿病から心不全へと至る病態の治療標的となりうるかの評価を継続する予定としている。

研究助成 2021 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	京都府立医科大学
氏 名	木谷 友哉

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2024年3月	第88回日本循環器学会総会、木谷友哉、Uncovering Mechanisms and Therapeutic Targets for Cardiovascular Disease Using Human Cardiomyocytes Derived from Pluripotent Stem Cells
2		
3		
4		
5		
6		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2024年7月	Basic Cardiovascular Sciences 2024 Scientific Sessions
2		
3		
4		
5		
6		