

平成 31 年 4 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16486

研究課題名(和文)骨格筋におけるプロテアソームの筋量調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of role of proteasome system in regulation of skeletal muscle mass

研究代表者

北嶋 康雄(kitajima, yasuo)

熊本大学・発生医学研究所・特別研究員(SPD)

研究者番号：70734416

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):本研究の目的は、主のたんぱく分解系であるプロテアソーム機能不全が骨格筋に与える影響について明らかにすることであった。骨格筋および筋幹細胞でのプロテアソーム機能不全は、筋再生不全を起こし、幹細胞プールの減少をもたらした。以上により、骨格筋におけるタンパク分解系不全は骨格筋恒常性の破綻をもたらすことを示した。また、タンパク分解系の機能不全は、老化と関連することが示唆され、今後の更なる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの体において、骨格筋は体重の約40%を占める最も大きな臓器である。骨格筋では健康な状態を保つために日々損傷と再生が繰り返されており、この筋再生に欠かせないのが筋幹細胞である。筋幹細胞を正常に保つ仕組みの解明は、骨格筋そのものを正常に保つメカニズムの解明につながる。本研究では、タンパク質分解系が骨格筋の幹細胞を維持するために必須であり、それらの破綻は筋再生不全を引き起こすことを明らかにした。これらの成果は、幹細胞研究の基礎的な理解と再生医療への応用につながる可能性があると考えます。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study was to clarify the effects of proteasome dysfunction, a major protein degradation system, on skeletal muscle. Proteasome dysfunction in skeletal muscle and muscle stem cells caused muscle regeneration failure and resulted in decreased stem cell pool. Thus, protein degradation in skeletal muscle resulted in disruption of skeletal muscle homeostasis. In addition, dysfunction of protein degradation system is suggested to be related to aging, and further analysis is needed in the future.

研究分野：筋細胞生物学

キーワード：骨格筋 筋再生 筋幹細胞 タンパク分解系 サテライト細胞

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

1. 研究開始当初の背景

我が国は未体験の超高齢社会に突入している。ますます進行する超高齢化社会においてサルコペニア（加齢に伴う筋萎縮）に伴う運動機能低下が多く、要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。興味深いことに、骨格筋量そのものが、心血管疾患率、がん発症率、認知機能低下率との負の相関を示し、健康寿命の長さとも強い相関が得られている。すなわち、筋量調節機構の解明により筋量そのものの維持・増進ができれば、高齢者のQOLを保ち、国民の生産性を向上させ、我が国の発展・維持につながる。

骨格筋量は合成と分解のバランスで決定され、筋萎縮は合成系の抑制または分解系の活性化によると考えられていた。申請者は、骨格筋においてのみ分解系の主であるプロテアソーム不全を起こすことのできる遺伝子改変マウスを作成し解析したところ、驚くことに、骨格筋は分解系の抑制により筋肥大するのではなく、むしろ筋萎縮を起こし、さらには筋線維内に中心核が常時存在する筋再生不良を呈した (Kitajima et al. J Cell Sci 2014)。すなわち、プロテアソームによる適切なタンパク分解は、むしろ筋量維持に重要であることを明らかにした。骨格筋恒常性維持機構におけるタンパク分解系の役割は、未だ不明な点が多くあり、更なる研究が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、主のたんぱく分解系であるプロテアソーム機能の不全が骨格筋に与える影響について明らかにすることであった。

3. 研究の方法

筋幹細胞特異的にプロテアソーム機能不全を起こすために、筋幹細胞特異的な Pax7 プロモーター下流に Cre 組換え酵素を挿入した Pax7-CreERT2 マウスおよび骨格筋特異的な mIc1f-Cre マウスに、Rpt3f/f マウスを掛け合わせて筋幹細胞特異的および骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスを作成した。

4. 研究成果

まず、コントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスの筋重量の比較を行った。腓腹筋および前脛骨筋の筋重量は、コントロールマウスと比較して、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスでは、有意に小さい値を示した。骨格筋萎縮の組織学的な評価を行うため、laminin 抗体を用いて筋横断面の蛍光免疫組織化学染色を行ったところ、コントロールマウスと比較して、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスでは、筋線維が小さいことが分かった。

たんぱく質分解系の不全は、アミノ酸にも影響を与えていると考え、上記の萎縮筋を用いてアニオンモードとカチオンモードの2つの方法でメタボローム解析を行った。アニオンモードでは65個、カチオンモードでは69個の代謝物質の検出を行った。アニオンモードでは、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスとコントロールマウスで有意に差がでた物質は26個であり、検出限界未満のため検出不可能であった物質が15個であった。カチオンモードでは、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスとコントロールマウスで有意に差がでた物質は38個であり、検出限界未満のため検出不可能であった物質は7個であった。これにより、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスでは、骨格筋において分解系不全のため代謝異常を起こしているという可能性を示唆した。今後は、得られた代謝データを元に個々の代謝物の更なる検証が必要である。

筋再生中には壊れた筋タンパク質などが新しい筋タンパク質に置き換わるため、タンパク質分解系の不全マウスでは、筋再生不良を起こすと仮説をたてた。一般的に筋再生実験で用いられているカルディオトキシンを前脛骨筋に筋注することで筋再生実験モデルとした。結果は、コントロールマウスと比較して骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスでは、筋再生不良を呈した。筋再生中には多くのユビキチン化タンパク質が蓄積しており、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスではこれらが除去されずに骨格筋内に蓄積していた。筋再生後の筋横断面の免疫染色では、筋の繊維化が進んでいることも確認した。また、intactな骨格筋でのマイクロアレイのデータ比較では、骨格筋特異的プロテアソーム機能不全マウスにおいてコラーゲンを主とする結合組織の遺伝子発現や細胞周期関連の遺伝子発現が有意に変動していた。これらを踏まえ、さらに詳細に検討するために、筋再生に大きく寄与する骨格筋幹細胞の解析を進めた。

骨格筋幹細胞でのプロテアソーム機能の影響を明らかにするために、骨格筋幹細胞特異的にプロテアソーム機能不全を起こすマウスを作成した。骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスの骨格筋幹細胞のみをFACS (fluorescence activated cell sorter) を用いて単離し、Rpt3 遺伝子発現を定量PCRにより評価した。ノックアウトでは、コントロールと比較して有意なRpt3 遺伝子発現の抑制を示した。さらにノックアウト群では遺伝子抑制が確認できたため、同様のモデルを用いてプロテアソーム活性の評価を行ったところ、ノックアウトでは、コントロールに比べてキモトリプシン様およびトリプシン様プロテアソーム活性が有意に抑制されていることを確認した。以上により、骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム欠損マウスモデルは、筋幹細胞特異的にRpt3 遺伝子欠損が起こり、プロテアソーム活性を抑制することが明らか

になり、妥当なモデルであることが確認できた。

ノックアウトマウスはプロテアソーム活性を抑制することが明らかになったため、筋再生におけるプロテアソーム機能の役割を明らかにするために筋再生実験を行った。筋再生 3、7、14 日目に前脛骨筋のサンプリングを行ったところ、再生 7、14 日目では顕著に再生筋が小さいことが観察された。そこで、筋重量を定量したところ、再生 7、14 日目においてノックアウトでは、コントロールと比較して有意に筋重量が減少していることが分かった。さらに体重の影響を除くために、体重あたりの筋重量を定量したところ、上記と同様に再生 7、14 日目においてノックアウトでは、コントロールと比較して有意に減少していた。ノックアウトでは、筋重量が回復してきていないことが明らかになったため、免疫組織化学染色による筋組織像の観察を行った。再生 14 日目に collagen I による筋横断面の染色を行ったところ、ノックアウトでは collagen I が顕著に染まっていることが確認でき、繊維化が進行していることが明らかになった。以上により、骨格筋幹細胞特異的な Rpt3 遺伝子欠損マウスでは、顕著な骨格筋再生不良を呈することが示された。

骨格筋幹細胞特異的なプロテアソーム機能不全マウスでは、顕著な筋再生不良を呈した。骨格筋の再生は、筋幹細胞が主に担っているため筋幹細胞を FACS を用いて定量した。それにより、ノックアウトにおいてコントロールと比較して、筋幹細胞プールが減少していることが分かった。以上により、骨格筋幹細胞特異的なプロテアソーム機能不全マウスでは、筋幹細胞プールが減少しており、Rpt3 が関与するプロテアソーム機構は筋幹細胞の維持機構に必須であることが示唆された。

近年、プロテアソームと老化についての知見も報告されている。本研究の筋幹細胞特異的なプロテアソーム機能不全マウスの筋幹細胞では、老化遺伝子としても有名な p53 発現が有意に亢進していた。p53 は細胞内の多彩なイベントに関与しており、細胞周期の停止や細胞死の誘導などにも関わることが広く知られている。本研究でも、p53 の経路が活性化し、細胞周期を停止し細胞死を誘導し、その結果、幹細胞プールの減少に至っていることが考えられる。培養系では、p53 の発現を抑制することで細胞死を抑制し、細胞数の維持につながることも突き止めた。今後は、さらにマウス個体レベルでも、骨格筋幹細胞特異的なプロテアソーム機能不全マウスに p53 遺伝子をダブルノックアウトすることで筋幹細胞プールの維持につながるかどうかの検証も必要である。これまでに、タンパク質分解系の不全や p53 は老化との関連も指摘されており、今回の知見は骨格筋幹細胞とタンパク質分解系、さらには老化をつなぐ研究の端緒になると考え、更なる解析が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. [Kitajima Y](#), et al. The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2018 Dec 11;11(6):1523-1538. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.009. Epub 2018 Nov 8.
2. [Kitajima Y](#) et al. Visualization of PAX7 protein dynamics in muscle satellite cells in a YFP knock-in-mouse line. *Skelet Muscle*. 2018 Aug 24;8(1):26. doi: 10.1186/s13395-018-0174-x.
3. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, Ono H, Nishiyama A, Izumi R, [Kitajima Y](#) et al. Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2018 Sep; 307:164-179. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.06.009. Epub 2018 Jun 20.
4. Harada A, Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, [Kitajima Y](#), et al. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun*. 2018 Apr 11;9(1):1400. doi: 10.1038/s41467-018-03845-1.
5. Fujimaki S, Seko D, Kitajima Y, et al. Notch1 and Notch2 Coordinately Regulate Stem Cell Function in the Quiescent and Activated States of Muscle Satellite Cells. *Stem Cells*. 2018 Feb;36(2):278-285. doi: 10.1002/stem.2743. Epub 2017 Nov 26.
6. Shijo T, Warita H, Suzuki N, [Kitajima Y](#), et al. Aberrant astrocytic expression of chondroitin sulfate proteoglycan receptors in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2018 Feb;96(2):222-233. doi: 10.1002/jnr.24127. Epub 2017 Jul 28.
7. Nunomiya A, Shin J, [Kitajima Y](#), et al. Activation of the hypoxia-inducible factor pathway induced by prolyl hydroxylase domain 2 deficiency enhances the effect of running

training in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 May;220(1):99-112. doi: 10.1111/apha.12751. Epub 2016 Jul 25.

8. Uruno A, Yagishita Y, Katsuoka F, Kitajima Y, et al. Nrf2-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Glycogen Metabolism. *Mol Cell Biol*. 2016 May 16;36(11):1655-72. doi: 10.1128/MCB.01095-15. Print 2016 Jun 1.

9. Klionsky DJ, . . . , Kitajima Y, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.

10. Kitajima Y, Ogawa S and Ono Y. Visualizing the functional heterogeneity in muscle stem cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1516:183-193. doi: 10.1007/7651_2016_349.

〔学会発表〕(計 5件)

1. 北嶋康雄. 招待講演 骨格筋幹細胞におけるプロテアソーム系の役割およびサテライト細胞研究の新たなツールと応用. 東北大学特別セミナー. 2018.

2. 北嶋康雄、小野悠介. 筋サテライト細胞に発現する Pax7 の可視化と応用. 第 40 回日本分子生物学会. 2017.

3. 北嶋康雄、小野悠介. 筋サテライト細胞を生きのまま可視化する. 第 72 回日本体力医学会大会. 2017.

4. 北嶋康雄、小野悠介. サテライト細胞研究における Pax7 ノックインマウスの応用. 第 5 回骨格筋生物学研究会. 2017.

5. 北嶋康雄. シンポジウム 3: 体力科学分野における科学的検証法～分野間における共通点と違い～ 分子生物学分野における研究目的と用いられる研究手法. 第 71 回日本体力医学会大会. 2016

〔図書〕(計 1件)

1. Kitajima Y, Suzuki N. Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Skeletal Muscle. Springer Nature. 2017.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

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。