

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04793

研究課題名(和文)骨格筋再生における筋幹細胞の活性化機構の解明

研究課題名(英文)Activation mechanisms of skeletal muscle stem cells during regeneration

研究代表者

瀬原 淳子 (Sehara-Fujisawa, Atsuko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・連携教授

研究者番号：60209038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋再生において筋幹細胞(SMSC)は筋損傷の際に増殖し、筋細胞に分化する。本研究は、ピルビン酸をAcetyl CoAに変換する糖代謝の要となる酵素、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)が、SMSCの分化促進に必須であることを見出した。SMSC特異的にPDH機能が阻害されるコンディショナルノックアウト(PDH-cKO)マウスから単離したPDH欠損SMSCでは自己複製が優位で分化能が低下すること、筋ジストロフィーモデルマウスでSMSCのPDHが欠損すると、筋再生が不十分となる。このことから、PDHが介する解糖系からTCA回路へのエントリーが、SMSCの分化を促進する一要因であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞がどのようなメカニズムで活性化され、増殖・分化するのか、という問題については、幹細胞研究が盛んな割にはわかっていない。その中であって、最も基本的なエネルギー利用の観点から、糖代謝の変化が骨格筋幹細胞の分化に必要ということを、細胞レベル・個体レベルで示すことができ、学術的にも、医学応用的にも、非常に重要な知見を生み出すことができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated factors stimulating differentiation of skeletal muscle satellite cells (SMSCs), and found that pyruvate, the end product of glycolysis, stimulates their differentiation. Pyruvate antagonizes effects of hypoxia on preferential self-renewal of SMSCs through dephosphorylation or activation of pyruvate dehydrogenase (PDH), which mediates opening of the gateway from glycolysis to tricarboxylic acid (TCA) cycle by producing acetyl coA from pyruvate. PDH kinase 1 is decreased under normoxic conditions, leading to an increase in dephosphorylated PDH. Conditional deletion of PDH in SMSCs affects cell divisions generating myocytes and subsequent myotube formation skeletal muscle regeneration upon injury, and aggravated pathogenesis of dystrophin-deficient mice. Thus, the metabolic flow from glycolysis to TCA cycle mediated by PDH plays a pivotal role in the efficient differentiation of SMSCs, which is critical for the progression of skeletal muscle regeneration.

研究分野：発生生物学・細胞生物学

キーワード：再生医学 細胞・組織 発生・分化 生体分子 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

骨格筋幹細胞（骨格筋に接し、骨格筋とともにラミニンやコラーゲンからなる基底膜に囲まれているため、骨格筋衛星細胞と呼ばれる）は、発生／成長過程のPax7 陽性(+)細胞に由来するが、発生・発達に関わる筋前駆細胞と異なり、また恒常的に増殖している腸や皮膚の幹細胞と違い、いつもは静止期にあって細胞増殖を停止しており、必要時に活性化されて増殖し、分化細胞と自己複製された幹細胞を産生するところに、その大きな特色がある。

2. 研究の目的

骨格筋には、激しい運動や疾患により損傷すると、それを効率よく修復する高い再生能力がある。この再生に関わる筋幹細胞は、発生期の筋前駆細胞同様Pax7(+)細胞系譜であるが発生期と異なり普段は静止期にあり、損傷時にのみ活性化されて多核の筋繊維を再生するとともに、自己複製して次の筋再生に備える。我々はマウスを用いて、こどもから大人への成長に伴い幹細胞の静止期が獲得されること、そのプロセスにmiR-195/497 による細胞周期の抑制が関与することを報告した(Sato T. et al., Nature Commun., 2014)。一方その静止期からの活性化は、筋形成転写因子Myf-5/MyoD の発現とそれに続く非対称分裂をもたらすが、これらのプロセスの引き金と促進に関わる細胞・分子機構は殆ど未解明である。本研究は、マルチフォトン顕微鏡を用いて生きたマウス個体で筋幹細胞の活性化の様子を捉え、その活性化における、炎症細胞を中心とする周囲の細胞とそれらが発現するシグナル分子・プロテアーゼの役割を解明する。

3. 研究の方法

本研究は、幹細胞の活性化機構を、再生プロセスの個体レベルでの観察に基づいて明らかにする。

- (1) 生きたマウス個体における筋再生プロセスを、マルチフォトンを用いて3次元で示す。
- (2) 幹細胞の静止期からの活性化とそれに続く細胞分裂における炎症細胞の関与、また関与する炎症細胞の同定をMyf-5 の活性化、細胞周期などを指標として、個体レベルで行う。
- (3) 炎症細胞が幹細胞の活性化に関与するシグナリング・接着制御を解明する。
- (4) 幹細胞活性化・増殖・分化における ADAM プロテアーゼの役割と機能を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、様々な角度から骨格筋幹細胞の活性化機構を検討してきた。その中で、幹細胞分化を制御する分子・分子パスウェイを同定することに成功した。

それはミトコンドリアでのTCA サイクル・酸化リン酸化によるエネルギー産生を促進するPDH（ピルビン酸デヒドロゲナーゼ）であった。我々は、嫌気性代謝である解糖系から好気性代謝であるTCA回路への代謝変化が、骨格筋幹細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるかを検討するため、骨格筋幹細胞において特異的にPDH活性をなくす conditional knock out mice を作成した。発生過程において骨格筋特異的にPDH活性をなくすと骨格筋繊維径が大きくなることが報告されていたが(Sukhdeep S, et al: Am J Physiol Hert Circ Physiol 295: 946-952, 2008)、筋再生過程、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞の維持や分化における代謝制御の関与は謎であった。PDH欠損により、骨格筋損傷後Myogeninの活性化は起きるが、再生筋形成が遅れることがわかった。単離した筋衛星細胞の培養実験を行い、幹細胞分化における代謝制御の関与について検討したところ、幹細胞の分裂様式に変化が起こることがわかった。免疫染色による解析から、好気性代謝への変化は、幹細胞の自己複製を抑制して、分化に繋がる細胞分裂を促進することがわかった。

筋再生の経過をマルチフォトン顕微鏡で捉えることに成功し、この手法を用いて、筋再生における炎症細胞の役割を検討した。炎症細胞と幹細胞の相互作用について調べるため、Pax7-cre^{ERT2}/Rosa26TdTomato マウスと lysM-EGFP マウスあるいは CX3CR1-EGFP マウス（いずれも阪大・石井優先生（連携研究者）より共同研究として供与を受けている）を掛け合わせ、cardiotoxin により筋障害を誘導し、1日後から5日後の数時間ずつにわたってライブイメージングを行なった。その結果、1日目に好中球の浸潤があり、それらが一箇所にクラスタリングすること、そのクラスタリングサイトでROSが産生されることが見出され、筋障害に寄与することが示唆された。次に、マクロファージの動態を観察し、好中球より少し遅れて浸潤すること、驚いたことに、マクロファージと筋幹細胞は一過的に直接接触することがわかった。そこで、これらの炎症細胞の浸潤を抑制したとき、筋再生が起こるかどうかを調べた。その結果、筋再生は起こるが壊死した骨格筋が多数見られること、その内部で筋形成に必要な myogenin 遺伝子の活性化は起こるが再生筋が形成されていないことがわかった。これらの結果から、炎症細胞が壊死壊死筋の排除と、幹細胞の分化に必要であることが示唆された。

本研究は、骨格筋幹細胞が、静止期から活性化し、分化する機構を解明した。

まず SMSC を単離し培養する際に培地にピルビン酸を添加すると、SMSC の増殖と分化が促進されることを見出した。低酸素条件下においてもピルビン酸は効果を発揮し、Pax7 陽性未分化 SMSC を減少させ、myogenin 陽性分化細胞の産生を促進した。ピルビン酸は、解糖系代謝の最終産物である乳酸の産生と、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) によってアセチル CoA を産生し、TCA 回路・酸化的リン酸化 (TCA-OxPHOS) というミトコンドリア内エネルギー産生経路との分岐点に位置する。ピルビン酸は、低酸素状態で高発現するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼを阻害することが知られている。ピルビン酸添加により解糖系から TCA 回路への入り口に位置する PDH がリン酸化阻害を受け活性化されたことから、PDH による解糖系から TCA 回路へのエントリーが、低酸素状態による SMSC の未分化性を解除し、細胞分化を進展させるのではないかと考えた。

そこで、SMSC 分化における PDH の機能をさらに詳細に解析するため、Pax7 遺伝子プロモーターを利用した誘導型 Cre マウス (Pax7-CreERT2 マウス) と PDH-flox マウスをかけ合わせ、tamoxifen 依存的に SMSC 特異的に PDH 機能が阻害されるコンディショナルノックアウト (PDH-cKO) マウスを作成した。細胞培養実験において、PDH 欠損 SMSC は、Pax7 陽性未分化細胞が増加し、myogenin 陽性筋細胞が減少した。続いて Pax7-Cre で DsRED を発現させることによって可視化された SMSC をライブイメージングによってどのように分裂するかを観察し、その後固定して抗体染色により細胞分裂パターンに注目したところ、PDH 欠損 SMSC では、細胞分裂に際して自己複製が優位となり分化細胞の産生が低下した。また、分化誘導により筋細胞へ分化はするものの筋管形成能が低下することも見出された。さらに Ki67 染色により細胞増殖能を検討したところ、PDH 欠損 SMSC では有意に細胞増殖能が低下しており、PDH 機能が増殖、分化いずれにおいても影響を与えていることが示唆された。

マウスの前脛骨筋の損傷実験では、PDH-cKO マウスにおいて筋再生は起こるものの、再生筋の筋径が有意に小さく、筋再生が不十分であることが見出された。慢性的に骨格筋の損傷と再生を繰り返す筋ジストロフィー症のモデルマウスである DMD マウスでは、SMSC 特異的な PDH 欠損はその骨格筋の症状を悪化させた。

最後に PDH 機能阻害が及ぼす、解糖系から TCA-OxPHOS に至る代謝の変化を検討した。PDH 欠損 SMSC では、ミトコンドリアの機能が低下する一方、乳酸産生が増加していることがわかり、PDH 機能阻害により解糖系が優位になることが示唆された。以上の結果より、PDH が介する解糖系から TCA 回路へのエントリーが、SMSC の分化を促進する一つの要因であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Hori S, Hiramuki Y, Nishimura D, Sato F, [Sehara-Fujisawa A](#). PDH-mediated metabolic flow is critical for skeletal muscle stem cell differentiation and myotube formation during regeneration in mice. *FASEB J*. 2019. 2:fj201802479R. doi: 10.1096/fj.201802479R.
2. Gunawan F, Gentile A, Fukuda R, Tseke AT, Jiménez-Amilburu V, Ramadass R, Iida A, [Sehara-Fujisawa A](#), Stainier DYR. Focal adhesions are essential to drive zebrafish heart valve morphogenesis. *J Cell Biol*. 2019. 4;218(3):1039-1054. doi: 10.1083/jcb.201807175
3. Tsumagari K, Shirakabe K, Ogura M, Sato F, Ishihama Y and [Sehara-Fujisawa A](#). Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation. *Genes to Cells*. 2017. 22, 237-244 doi: 10.1111/gtc.12466
4. Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Matsuzaki F, [Sehara-Fujisawa A](#). Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. *Scientific Rep*. 2016. 6:28873. DOI:10/1035/srep2887
5. Tokumasu Y, Iida A, Wang Z, Ansai S, Kinoshita M, and [Sehara-Fujisawa A](#). ADAM12-deficient zebrafish exhibit retardation in body growth at the juvenile stage without developmental defects. *Dev Growth & Differ*, 2016. 58(4):409-421. DOI:10.1111/dgd.12286

[学会発表] (計 33 件)

1. Atsuko Sehara-Fujisawa. Effects of Space Stay on Skeletal Muscle. International Symposium on LIVING IN SPACE 2019 from basic biology to the MOON, MARS and beyond. 2019
2. 佐藤文規. オプトジェネティクス酸化ストレス誘導法による筋萎縮メカニズムの解明と治療薬探索. 先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム 拡大班会議. 2018

3. Sato F, Choi M, Wang Z, Imamura K, Horiuchi T, Quan W, Fujita I, Uchida S, Kato M, Tanigaki F, Higashibata A, Muratani M, Kobayashi J, Takahashi A, Sugano S, Matsuzaki F, Suzuki Y, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Study on gravity-dependent skeletal muscle maintenance mechanisms using Zebrafish, aquatic organisms. 2018 ASCB EMBO Meeting. 2018
4. 佐藤文規, Choi Minyong, 王梓, 今村聖実, 堀内映美, 吳泉, 藤田生水, 内田智子, 加藤充康, 谷垣文章, 東端晃, 村谷匡史, 小林純也, 高橋昭久, 菅野純夫, 松崎文雄, 鈴木穰, 川上浩一, 瀬原淳子. 人工重力発生装置を用いたゼブラフィッシュ宇宙滞在実験. 宇宙生物学会第32回大会. 2018
5. Atsuko Sehara. Space stay of zebrafish. The 15th Korea-Japan Joint Seminar on Space Environment Utilization Research. 2018
6. 瀬原 淳子. 骨格筋維持における重力の役割-ゼブラフィッシュの宇宙滞在から学ぶ事. 第56回日本生物物理学会年会. 2018
7. Sato F, Tabuchi M, Kamezaki A, Asakawa A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. The ectodomain shedding of NRG1 underlies spatial and temporal regulation of synaptogenesis and myelination of developing motor neurons. 11th meeting of the Zebrafish Disease Models Society (ZDM11). 2018
8. Hori S, Sato F, Sehara-Fujisawa A. Metabolic control of skeletal muscle regeneration. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th. 2018
9. Kuriki M, Sato F, Sumiyama K, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Roles of a transcription factor 19A in the osteoblast development of sternum. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th. 2018
10. Sato F, Tabuchi M, Kamezaki A, Asakawa A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. The ectodomain shedding of NRG1 underlies spatial and temporal regulation of synaptogenesis and myelination of developing motor neurons. 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience. 2018
11. Kuriki M, Sehara-Fujisawa A and Sato F. Roles of a transcription factor 19A in the ossification of sternum. CDB Symposium 2018. 2018
12. Hiroyuki Arai. ADAM19 restricts cardiac neural crest cells to a tenogenic fate by inhibiting chondrogenesis. CDB Symposium 2018. 2018
13. 曾我部 舞奈. スパースモデリングを用いたライブイメージング技術の改善. 2018年電子情報通信学会総合大会. 2017
14. 曾我部 舞奈. スパースモデリングを用いたライブイメージング技術の改善. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017
15. 堀 新平. 骨格筋再生の代謝制御. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017
16. Kuriki M, Sehara-Fujisawa A and Sato F. Roles of a transcription factor 19A in the ossification of sternum. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017
17. 瀬原 淳子. 筋維持・萎縮機構の研究:宇宙から学ぶこと. 第6回実験動物科学シンポジウム. 2017
18. 瀬原 淳子. 筋維持・萎縮機構の研究:宇宙から学ぶこと. 宇宙科学談話会. 2017
19. Atsuo Iida, Zi Wang, Atsuko Sehara-Fujisawa. Endothelial cell-specific Integrin β 1 inhibition results reduction of vascular diameters and induction of cephalic hemorrhage. 第23回小型魚類研究会. 2017
20. Atsuko Sehara-Fujisawa. Visualization of the Ectodomain Shedding of Neuregulin/Glial Growth Factor. 第40回日本神経科学大会. 2017
21. 曾我部 舞奈. 多光子顕微鏡を用いたライブイメージング技術の限界突破. 第69回日本細胞生物学会大会. 2017
22. Tabuchi M, Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K and Sehara-Fujisawa A. Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding in motor neurons in zebrafish. Annual Meeting of the Japanese Society of Development Biologists. 2017
23. Kuriki M, Sehara-Fujisawa A and Sato F. Roles of a transcription factor 19A in the ossification of sternum. Annual Meeting of the Japanese Society of Development Biologists. 2017
24. Arai H, Sato F, Yamamoto T, Kiyonari H and Sehara-Fujisawa A. Involvement of Adam 19 in the fate decision of cardiac neural crest cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Development Biologists. 2017
25. Aosa Kamezaki, Fuminori Sato, Kazuhiro Aoki, Kazuhide Asakawa, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa. Live cell imaging and proteomic approaches shed light on novel aspects of ectodomain shedding in developing neurons. Joint Meeting of German and Japanese Society of Developmental Biologists 2017. 2017
26. 飯田 敦夫. マウスで肥満に関わる ADAM12 遺伝子のゼブラフィッシュ変異体の樹立. 第2回ゼブラフィッシュ創薬研究会. 2016

27. Aosa Kamezaki. Establishment of a fluorescence biosensor to monitor Neuregulin1 ectodomain shedding in zebrafish embryo. モデル動物研究会 ～ムシサカナの会@金沢～. 2016
28. Aosa Kamezaki, Fuminori Sato, Kazuhiro Aoki, Mai Tabuchi, Kazuhide Asakawa,
29. Koichi Kawakami, Fumio Matsuzaki, Atsuko Sehara-Fujisawa. Establishment of a dual-fluorescence probe to visualize Neuregulin lectodomain shedding in developing zebrafish embryos. 第22回小型魚類研究会. 2016
30. 瀬原 淳子. 幹細胞の増殖・分化制御機構のプロテアーゼ制御. 第21回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2016
31. Atsuko Sehara-Fujisawa. Roles of Meltrin β /ADAM19 in development of the heart. Swiss-Kyoto Joint Symposium of Life Science 2016. 2016
32. Daigo Nishimura , Hiroshi Sakai , Takahiko Sato , Fuminori Sato , Satoshi Nishimura ,Noriko Toyama-Sorimachi , JörgW. Bartsch , Atsuko Sehara-Fujisawa. Roles of ADAM8 for skeletal muscle regeneration. 第24回マクロファージ分子細胞生物学会国際シンポジウム 2016
33. Aosa Kamezaki. Development of a fluorescent probe to monitor NRG1 ectodomain shedding in vitro and in vivo. JSDB Special Symposium : Frontier of Developmental Biology (+ 49th Meeting) 2016

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：画像処理装置、コンピュータプログラム及び画像補完方法

発明者：曾我部舞奈、大関真之、瀬原淳子

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2018/022618

出願年：2018

国内外の別： 海外

名称：スパースモデリングを用いて顕微鏡取得画像の情報学的補完を行うソフトウェア。

発明者：曾我部舞奈、大関真之、瀬原淳子

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：2017-117213

出願年：2017

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ：<http://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/rc03/>

6. 研究組織

※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。