

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13224

研究課題名(和文) 骨格筋幹細胞の「数」を規定する分子基盤の解明とその応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism for regulating the number of muscle stem cells

研究代表者

藤巻 慎 (Fujimaki, Shin)

熊本大学・発生医学研究所・特別研究員 (SPD・PD・RPD)

研究者番号：10795678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は損傷しても速やかに修復され再生する。この筋再生は骨格筋幹細胞であるサテライト細胞がなっている。本研究はサテライト細胞の機能制御に関して、Notchシグナルに着目した。そこで、サテライト細胞特異的Notch1およびNotch2欠損マウスを作出し、筋分化過程における両遺伝子の役割を解析した。その結果、Notch1およびNotch2がサテライト細胞の休止期維持や筋分化の抑制、自己複製の促進を介して幹細胞プールの維持に貢献することが明らかとなった。本研究を応用することで、筋ジストロフィーやサルコペニアなどの筋疾患予防法・治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、サテライト細胞特異的にNotch1およびNotch2を欠損させた遺伝子改変マウスを用いることで、Notch1およびNotch2遺伝子がサテライト細胞の運命決定を制御して骨格筋幹細胞プールを維持していることを明らかにした。本研究は世界で初めてサテライト細胞特異的Notch受容体欠損マウスを用いた研究であり、本知見によって骨格筋幹細胞の制御機構の解明が加速すると考えられる。さらに、本研究を応用することで、筋ジストロフィーやサルコペニアといった筋疾患の予防・治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Resident muscle stem cells, called as satellite cells, contribute to the postnatal maintenance, growth, repair, and regeneration of skeletal muscle. Current study focused on Notch signaling, which is highly conserved and plays important roles in many biological events, as a molecular mechanism for regulating satellite cell function. Here, I generated satellite cell-specific Notch1 and Notch2-deleted mice and investigated the function of these genes during muscle differentiation. As a result, I clarified that Notch1 and Notch2 coordinately regulate satellite cell pool via maintaining quiescence, preventing differentiation, and promoting self-renewal. This study can provide useful evidences for developing countermeasures against muscle disorders, such as muscle dystrophies and sarcopenia.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：Notchシグナル 骨格筋幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、筋力トレーニングをすることで肥大し、損傷しても速やかに再生されるなど、種々の刺激に応答する優れた可塑性を有した組織である。この可塑性は、骨格筋幹細胞であるサテライト細胞が担う。実際に、加齢や糖尿病によって萎縮した骨格筋では、サテライト細胞の数が減少していることが示されており (Sousa-Victor et al., *Nature*, 2014; Krause et al., *PLoS ONE*, 2013)、骨格筋量とサテライト細胞数には関連があると考えられている。したがって、サテライト細胞数を維持するメカニズムの解明は、サルコペニアや糖尿病による筋萎縮の予防・治療の方策を講じる上で必須であり、介護予防や健康寿命の延伸のために極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

サテライト細胞は通常休止した状態で存在しているが、筋損傷などの刺激を受けて活性化すると速やかに増殖を繰り返し、その大部分は分化・融合して新しい筋線維を形成する。一方で、残りの細胞は自己複製して再び休止状態に戻り、幹細胞プールを維持する。すなわち、サテライト細胞数はサテライト細胞の自己複製能力によって規定される。本研究では、この自己複製を制御する分子基盤として Notch シグナルに着目した。Notch シグナルは、さまざまな組織において、幹細胞プールの維持に貢献していることが知られている (Artavanis-Tsakonas et al., *Science*, 1999; Fre et al., *Nature*, 2005)。加齢や糖尿病によるサテライト細胞数の減少に伴い、Notch シグナル関連遺伝子の発現量が減少することから (Fujimaki et al., *J Biol Chem*, 2014; Fujimaki et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2016)、Notch シグナルがサテライト細胞の自己複製能力を制御し、サテライト細胞数の維持に貢献している可能性が考えられた。そこで、本研究はサテライト細胞における Notch の機能を明らかにすることで、サテライト細胞の「数」を規定する分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではサテライト細胞特異的に Notch1 を欠損させたマウス (*Pax7-CreERT2;Notch1-floxed:N1-scKO*)、Notch2 を欠損させたマウス (*Pax7-CreERT2;Notch2-floxed:N2-scKO*)、さらに Notch1 と Notch2 の二重欠損マウス (*Pax7-CreERT2;Notch1-floxed;Notch2-floxed:scDKO*) を用いることで、サテライト細胞における Notch1 および Notch2 の機能を解析するとともに、両者の相互作用について検討した。

4. 研究成果

(1) 主な研究成果

① Notch1 および Notch2 はサテライト細胞の休止期を維持する

野生型マウス (CONT) および各遺伝子改変マウスの長趾伸筋から単一筋線維を単離し、Pax7 抗体で染色することでサテライト細胞数を定量した。その結果、N2-scKO マウスでサテライト細胞数が減少し、scDKO ではほとんど枯渇していることが明らかとなった (図 1)。このことから、休止期にあるサテライト細胞において、Notch1 と Notch2 は協働して機能し、幹細胞プールの維持に貢献していることが示唆された。

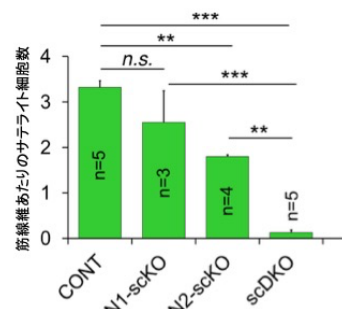


図 1 Notch 欠損によるサテライト細胞数の減少

② Notch1 および Notch2 はサテライト細胞の分化を抑制する

活性化したサテライト細胞における機能を解析するため、CONT および scDKO マウスからサテライト細胞を単離・培養し、タモキシフェンの添加によって遺伝子改変を誘導した。培養 7 日目に細胞を回収し、筋分化マーカータンパク質である Myogenin の抗体を用いて免疫染色を行ったところ、scDKO では筋分化した細胞の割合が有意に高値を示した (図 2)。この結果から、活性化したサテライト細胞において、Notch1 および Notch2 は筋分化を抑制することが示唆された。

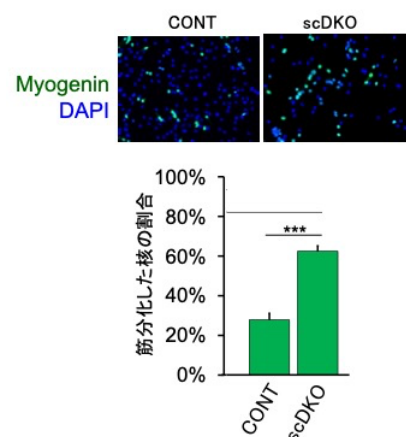


図 2 Notch 欠損による筋分化抑制

③ Notch1 および Notch2 はサテライト細胞の自己複製を促進する

②と同様の方法で遺伝子改変を誘導したサテライト細胞を分化培地で培養した。分化誘導 5 日目の細胞を Pax7 とサテライト細胞の活性化マーカーである MyoD の抗体で免疫染色をし、Pax7 が単独で染まった細胞を自己複製した細胞と規定して、その数を定量した。その結果、自己複製細胞の割合が scDKO で有意に低値を示した (図 3)。したがって、Notch1 および Notch2 はサテライト細胞が活性化した後自己複製を促進することが示唆された。

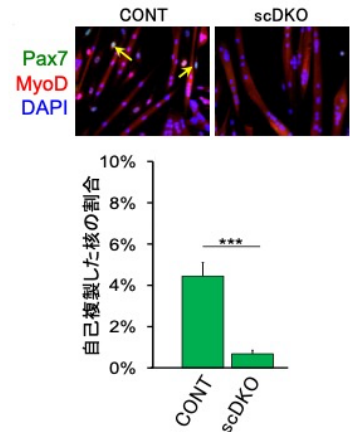
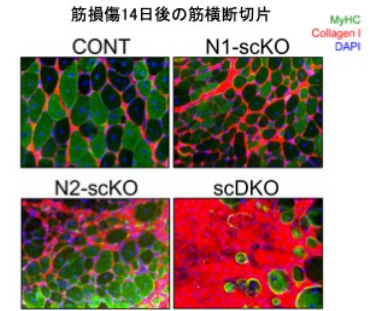


図 3 Notch 欠損による自己複製促進

④ Notch1 および Notch2 は筋再生に必須である

CONT および各遺伝子改変マウスの前脛骨筋に対して蛇毒成分である cardiotoxin を投与して筋損傷を誘導し、14 日後に筋サンプルを回収した。横断切片を筋線維構造タンパク質である Myosin heavy chain と線維化の指標である Collagen1 の抗体で免疫染色し、筋再生を評価したところ、CONT できれいに再生しているのに比べ、N1-scKO および N2-scKO では軽い線維化が見られ、scDKO では深刻な線維化が観察された (図 4)。この結果は、Notch 遺伝子の欠損により生じた幹細胞プールの枯渇に起因すると考えられる。したがって、以上のことから、Notch1 および Notch2 はサテライト細胞プールを維持することで、骨格筋の再生能力を制御していることが示唆された。



赤色部が線維化した部分(Collagen1)
図 4 Notch 欠損による筋再生不全

(2) 研究の国内外における位置づけとインパクト

本研究は、サテライト細胞特異的に Notch1 および Notch2 を欠損させた遺伝子改変マウスを用いることで、Notch1 および Notch2 遺伝子がサテライト細胞の運命決定を制御して骨格筋幹細胞プールを維持していることを明らかにした。本研究は世界で初めてサテライト細胞特異的 Notch 受容体欠損マウスを用いた研究であり、本知見によって骨格筋幹細胞の制御機構の解明が加速すると考えられる。さらに、本研究を応用することで、筋ジストロフィーやサルコペニアといった筋疾患の予防・治療法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitaoka Y, Fujimaki S, Machida M, Takemasa T	4. 巻 24(3)
2. 論文標題 Effect of voluntary wheel running exercise on mitochondrial fusion and fission proteins in aged mouse skeletal muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Exercise and Sports Physiology	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Fujimaki S and Ono Y	4. 巻 7(4)
2. 論文標題 Notch signaling in the regulation of skeletal muscle stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 213-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Fujimaki S, Seko D, Kitajima Y, Yoshioka K, Tsuchiya Y, Masuda S, Ono Y	4. 巻 36(2)
2. 論文標題 Notch1 and Notch2 Coordinately Regulate Stem Cell Function in the Quiescent and Activated States of Muscle Satellite Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 278-285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2743	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 Fujimaki S and Kuwabara T	4. 巻 18(10)
2. 論文標題 Diabetes-Induced Dysfunction of Mitochondria and Stem Cells in Skeletal Muscle and the Nervous System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms18102147	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fujimaki S, Seko D, Kitaoka Y, Kawano F, Ono Y
2. 発表標題 Scrib is required for skeletal muscle hypertrophy following mechanical overload
3. 学会等名 ASCM Conference on Integrative Physiology of Exercise (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujimaki S, Seko D, Zammit P, Ono Y
2. 発表標題 Scrib is required for hypertrophic growth following mechanical overload in skeletal muscle
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference on Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻慎
2. 発表標題 筋分化ステージ特異的なNotchの役割
3. 学会等名 第10回分子骨格筋代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻慎、瀬古大暉、北岡祐、河野史倫、小野悠介
2. 発表標題 細胞極性因子Scribbleは骨格筋の量的可塑性を制御する
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻慎、北岡祐、小野悠介
2. 発表標題 細胞極性因子Scribbleによる骨格筋可塑性の制御
3. 学会等名 第26回運動生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻慎、瀬古大暉、北岡祐、河野史倫、小野悠介
2. 発表標題 細胞極性因子Scribbleによる筋量調節
3. 学会等名 第6回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻慎、瀬古大暉、土屋吉史、北岡祐、河野史倫、小野悠介
2. 発表標題 細胞極性因子Scribbleによる筋線維組成制御
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤巻慎、太田雄也、武政徹
2. 発表標題 除負荷による骨格筋幹細胞機能の変容
3. 学会等名 第25回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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