

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09089

研究課題名(和文) 無作為ゲノム変異挿入法による骨格筋老化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Muscle Aging using Random Mutagenesis

研究代表者

細山 徹 (Hosoyama, Tohru)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・室長

研究者番号：20638803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、骨格筋の恒常性維持において重要な役割を果たす骨格筋幹細胞が加齢に伴って老化する可能性が示され、サルコペニアとの関連性が指摘されている。本研究では、ゲノム上にランダムな変異を挿入し得るスリーピングビューティーシステム(SB)を用いて、骨格筋幹細胞老化の分子機構を明らかにすることを目的とした。骨格筋幹細胞特異的にSBを導入したiPS細胞を作出し、骨格筋幹細胞の分化誘導後に老化関連遺伝子の探索を行った。結果として、幹細胞老化に関わる遺伝子群の同定にまでは至らなかったが、SBを用いて幹細胞に変異を入れる技術は様々な細胞種に応用可能であり、今後広範な利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアへの対応は、超高齢社会に突入した我が国において早急に解決すべき喫緊の課題である。本研究では、サルコペニアとの関連性が指摘されている骨格筋幹細胞老化の分子機構を明らかにすることに、幹細胞ゲノム特異的に変異を挿入するというこれまでにない方法を用いて挑戦した。残念ながら本研究では、骨格筋幹細胞の老化に関わる因子の同定には至らなかったが、本システムの汎用性は高く、骨格筋老化のみならず様々な細胞種の老化現象を明らかにする上で今後有効な手段となり得る。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been shown the possibility that skeletal muscle stem cells, which play an important role in maintaining skeletal muscle homeostasis, are aged with aging, and their association with sarcopenia has been pointed out. The purpose of this study was to clarify the molecular mechanism of muscle stem cell aging using the Sleeping Beauty System (SB), which can insert random mutations into the genome. We developed induced pluripotent stem (iPS) cells in which SB was introduced specifically for muscle stem cells, and searched for aging-related genes after inducing differentiation of muscle stem cells. As a result, we have not been able to identify the genes involved in stem cell aging, but the technique of mutating stem cells using SB is applicable to various cell types and is expected to be widely used in the future.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：骨格筋幹細胞 幹細胞老化 スリーピングビューティーシステム マウスiPS細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う骨格筋減弱症であるサルコペニアは、臨床からその概念が提起され、我が国においては近年ようやくその診断基準が設けられた比較的新しい筋原性疾患である (Asian Working Group for Sarcopenia, 2014)。それ故に、基礎的な観点からサルコペニアの本態およびその発症機序を明らかにすることの意義は大きい。実際、これまでに行われてきた多くの基礎的検討により、加齢に伴う骨格筋老化の機序やサルコペニア発症との関連性を示唆する成果が得られてきている。なかでも、欧米の研究グループが中心となって示してきた「骨格筋幹細胞の老化」と「サルコペニア」との関連性についての一連の報告は、当該研究分野ばかりでなく老化に関連する他分野の研究者に対しても大きなインパクトを与えた (Brack *et al.*, Science. 2007; Sousa-Victor *et al.*, Nature. 2014)。すなわち、加齢に伴って生じる幹細胞の老化がサルコペニアをはじめとする様々な疾患の発症や増悪化に関わるという新しい着眼点が提示された。幹細胞に限らず、細胞老化が癌をはじめとする様々な疾患に関わる可能性は高く、実際近年には、老化細胞を除去する方法 (Senolytics) が新たな疾患治療法として注目されており、世界中で熾烈な研究競争が繰り広げられている (Johmura *et al.*, Science. 2021)。しかし幹細胞老化は、炎症性サイトカインなどの SASP 因子を発現し周囲細胞にも影響を与える、いわゆる細胞老化とは異なり、あくまでも質的・量的 (機能的・数的) な減退を伴う老化現象と考えられるが、疾患の発症や増悪化に関わるという点で、細胞老化同様に疾患治療の標的となり得る。

幹細胞老化には、細胞自身の加齢性変化 (intrinsic) や幹細胞を取り巻く環境 (extrinsic) の経年的変化など様々な要因が関わると考えられている。しかしながら、より本質的な「骨格筋幹細胞の老化がどのような分子機構で誘導されるか」は不明であり、幹細胞老化がもたらすサルコペニアの発症や増悪化の機序の解明に向けた重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、標的細胞ゲノムに無作為な変異を挿入する“スリーピングビューティーシステム” (Moriarity and Largaespada. Curr Opin Genet Dev. 2015) を基盤手法とし、骨格筋幹細胞特異的に人為的ゲノム変異を誘導することにより生じる幹細胞老化に関わる誘導因子の同定とサルコペニア発症との関連性を明らかにすること、である。

これまでの研究では、若齢動物と老齢動物の比較による所謂レトロスペクティブな研究が主流であった。しかし、個体老化に伴う複雑な背景因子の存在により骨格筋幹細胞の老化誘導機序の本質が見逃されてしまう可能性がある。対して本研究では、癌研究領域で開発された「トランスポゾンを利用した標的細胞ゲノム特異的な無作為変異挿入法」を用いて、細胞表現型 (細胞老化) とゲノム上の変異挿入部から「骨格筋幹細胞老化誘導遺伝子」を同定する。すなわち、これまでサルコペニア研究で汎用されてきた方法とは一線を画す“順遺伝学的な方法”により、骨格筋幹細胞老化の誘導機構の解明に迫る。本法では若齢動物を用いた解析が可能で、老齢動物で見られる複雑な背景因子を除いた条件で骨格筋幹細胞老化誘導機構に迫ることができ、また、「老齢検体を用いた同定因子の発現解析」を組みあわせることで、サルコペニア発症との関連性についても明らかにすることが可能である。

3. 研究の方法

マウスの準備

本研究では、タモキシフェン誘導性の骨格筋幹細胞または筋線維特異的な Cre ドライバーマウスである Pax7-CreER マウス (Nishijo *et al.*, FASEB J. 2009) と Myf6-CreERT2 マウス (Southard *et al.*, Genesis. 2014)、細胞特異的なスリーピングビューティーの発動の為に Rosa-LSL-SBBase マウス (Starr *et al.*, Science. 2009) および T2-Onc マウス (Collier *et al.*, Nature. 2004)、p16-Luc マウス (Burd *et al.*, Cell. 2013) を National Cancer Institute mouse repository または The Jackson Laboratory から導入した。Pax7-CreER マウス、Rosa-LSL-SBBase マウス、T2-Onc マウスおよび p16-Luc マウスは、凍結胚の状態で購入し、国立長寿医療研究センター・実験動物管理室の協力の下、個体復元を行った。p16-Luc マウスの凍結胚の保存状態が悪く個体を得られなかったが、それ以外の 3 系統については個体復元に成功した為、種々の Cre ドライバーマウスとの交配に用いた。全てのマウス系統は、カルタヘナ法に定められた拡散防止措置の取られた国立長寿医療研究センター・実験動物飼育施設棟にて、同機関の定める動物実験手順書に則り適切に飼育した。また、これらのマウスの使用に際しては、同機関内に設置された遺伝子組換え安全委員会の承認を受けた遺伝子組換え実験計画書に従って実施した。

iPS 細胞の作出

筋細胞特異的なスリーピングビューティー (SB) マウスから iPS 細胞を樹立する為、Myf6-CreER:EGFP マウス (筋細胞での相同組換え効率や iPS 細胞からの筋分化能を検証する為のコン

トロール細胞として使用する)および Pax7-CreER:SB マウスの尻尾から線維芽細胞を採取した (Khan *et al.*, J Vis Exp. 2016)。採取した線維芽細胞は、適切な細胞数に達するまで 60mm 径コーゲンコートディッシュ上で培養し、2 継代目の線維芽細胞を iPS 細胞の樹立に用いた。iPS 細胞の樹立には山中 4 因子を含むセンダイウイルスベクター (CytoTune2.0; ID Pharma 社)を用い、キット付属のマニュアルに従って操作した。

マウス iPS 細胞からの筋細胞分化

樹立した筋特異的 Cre マウス由来 iPS 細胞 (Myf6CreER:EGFP, Pax7CreER:SB) は、GS2-M 培地 (Takara 社) で未分化状態を維持し、筋分化誘導時には培地を serum-free differentiation medium に置換し、10 日 ~ 14 日間かけて分化誘導した (Shelton *et al.*, Stem Cell Rep. 2014)。筋幹細胞特異的に SB、筋管細胞特異的に EGFP を発現させる為に、それぞれ分化誘導 5 日目および 10 日目にタモキシフェン (4OHT: 100 μ M; 2 日間) を添加した。

免疫蛍光染色

マウス iPS 細胞から分化した筋細胞の同定には特異抗体による免疫蛍光染色を用いた。実験に用いた抗体は、抗 Pax7 抗体 (マウスモノクローナル: DSHB)、抗 MyoD 抗体 (マウスモノクローナル 5.1A: Santa Cruz)、抗 Myogenin 抗体 (マウスモノクローナル F5D: DSHB)、抗ミオシン重鎖抗体 (マウスモノクローナル: DSHB) である。また GFP 発現の検出には、抗 GFP 抗体 (ウサギポリクローナル: MBP 社) を用いた。それぞれの筋細胞マーカー発現については、PCR 法による経時的遺伝子発現解析も同時に行った。

細胞老化アッセイ

細胞老化に陥った細胞の検出には、SA- β -Gal アッセイを用いた (BioVision 社)。クローニングリングを用いて iPS 細胞由来骨格筋幹細胞を単クローン化し、タモキシフェン添加後に細胞老化アッセイを行った。

4. 研究成果

4 - 1 : 骨格筋幹細胞特異的な無作為変異導入を誘導するマウスの作出

スリーピングビューティー (SB) マウスは、トランスポゾンとトランスポゼースを発現させることで標的となる細胞特異的にゲノム変異を挿入し得るマウスであり、近年では、がん研究領域で汎用されている。本研究では、本マウスと筋幹細胞特異的 Cre ドライバーマウスを用いて、骨格筋幹細胞特異的に SB システムを発動させ、タモキシフェン投与により幹細胞ゲノム上に無作為変異を挿入し、幹細胞老化に関連する新たな遺伝子群を同定しようと試みた。本研究を行う上で重要なことは、用いるドライバーマウスの選定と SB システムの導入に加え、老化細胞を可視化するシステムの導入である。本研究では、老化細胞マーカーである p16 の発現を *in vivo* で可視化し得る p16-Luc マウスを筋幹細胞特異的 SB マウスに組み合わせることとした。しかし、NCI (米国がん研究所) から導入した p16-Luc マウス凍結胚の状態が悪く、個体復元には至らなかった。当初計画では、p16-Luc シグナルを指標に老化幹細胞を *in vivo* で可視化し、単離した幹細胞上のゲノム変異を同定するという流れを想定していたが、レポーターマウス復元に至らなかったため、計画を変更することとした。変更点は、p16-Luc レポーターマウスを組み合わせずに筋幹細胞特異的 SB マウスを作出し、そのマウスから樹立した iPS 細胞を利用した解析を行うというものである。

Pax7-CreER マウスに SB マウスを交配して作出した筋幹細胞特異的 SB マウスから皮膚細胞を採取し、センダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子を導入した (Takahashi *et al.*, Cell. 2006)。導入約 1 ヶ月後に線維芽細胞からマウス iPS 細胞様コロニーが得られ、多能性幹細胞マーカーである Nanog の発現をもってマウス iPS 細胞の樹立成功と判断した。また本研究では、筋特異的 Cre ドライバーマウス由来 iPS 細胞の骨格筋研究におけるアプリケーションについて検討する為に、同様の方法を用いて、Myf6-CreER:EGFP マウスの皮膚細胞から iPS 細胞を作出した。本マウスは、筋特異的 Cre ドライバーマウス由来 iPS 細胞の有用性を示すばかりでなく、本研究においては、筋分化効率等を検討するコントロール細胞として使用した (Hosoyama. Biochem Biophys Rep. 2020)。

4 - 2 : 骨格筋細胞特異的 Cre ドライバーマウスからの iPS 細胞の樹立

骨格筋特異的 Cre ドライバーマウスは、近年の骨格筋研究に必須の研究ツールである。しかし、これまでに筋特異的 Cre ドライバーマウスからの iPS 細胞の樹立は行われておらず、本研究で樹立した筋特異的 Cre ドライバーマウス由来 iPS 細胞の筋分化効率や筋研究における有用性については明らかではない。そこでまず、筋線維特異的 Cre ドライバーマウス由来 iPS 細胞 (Myf6:EGFP-iPS) をモデルとして、その筋分化能や分化誘導法について検討した。

マウス iPS 細胞からの筋細胞分化は、既存法 (Shelton *et al.*, Stem Cell Rep. 2014) を参考に基礎培地の変更など若干の修正を加えて行った。その結果、分化誘導効率は高いとは言えないが、本法により Myf6:EGFP-iPS から筋細胞を分化誘導することが出来た (図 1A: 筋分化誘導後の筋細胞分化マーカーの経時的発現変動)。本研究では、タモキシフェン誘導性に筋幹細胞において無

作為ゲノム変異を誘導する為、タモキシフェンによる筋細胞特異的な標的遺伝子の相同組換えを誘導する。それ故に、培養筋細胞で *myf6* 遺伝子発現が上昇する培養 10 日目にタモキシフェンを添加した。タモキシフェンによる標的細胞での相同組換えの有無については、GFP 発現を指標とした。結果として GFP 発現は、筋芽細胞が融合し形成された多核の筋管細胞のみで確認され、単核の筋芽細胞や他の細胞種

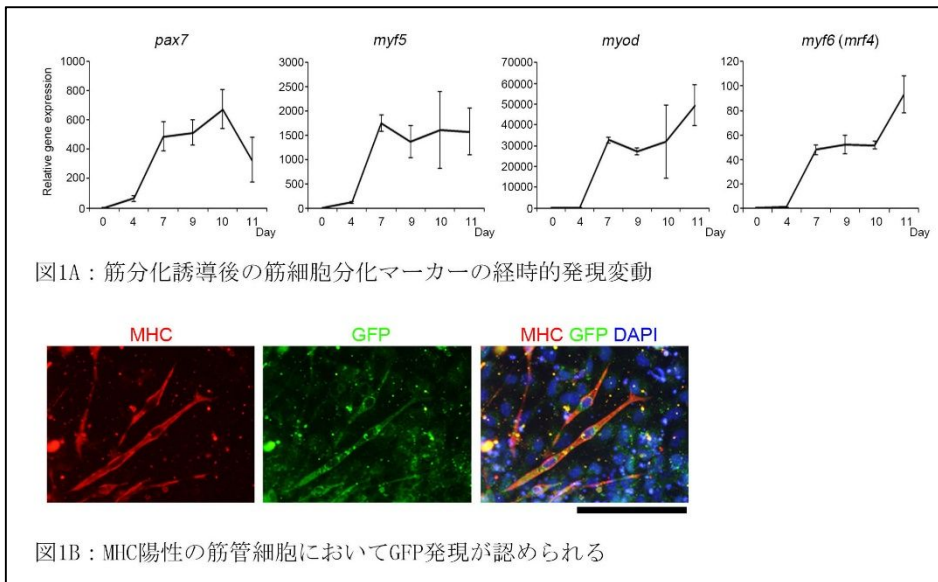


図1A：筋分化誘導後の筋細胞分化マーカーの経時的発現変動

図1B：MHC陽性の筋管細胞においてGFP発現が認められる

では GFP 発現を認めなかった(図 1B : MHC 陽性の筋管細胞において GFP 発現が認められる)。このことは、筋特異的 Cre ドライバーマウス由来 iPS 細胞から分化した筋細胞系譜において、タモキシフェン誘導性の相同組換えが生じることを意味し、後に行う筋幹細胞特異的な相同組換えに期待を抱かせるものである。

一方、Myf6:EGFP-iPS 細胞由来筋細胞を用いて、分化初期 (分化 5-6 日) でのタモキシフェン添加を行った。興味深いことに、筋分化初期でのタモキシフェン添加によっても、結果として形成される多核筋管細胞での GFP 発現が認められた。このことは、筋分化初期において *myf6* を発現する筋系譜細胞が存在することを意味している。Sambasivan らは、マウス筋発生において、筋系譜細胞における *myf6* 発現の二峰性を報告している (Dev Biol. 2013)。すなわち *myf6* は、最終分化形態である多核筋管細胞のみならず筋前駆細胞においても発現し、2 段階で筋形成に関わっている。しかし、この *myf6* 発現の二峰性について *in vitro* 系で証明した報告は過去に無く、本研究で Myf6:EGFP-iPS 細胞由来筋細胞で観察された結果は、先の論文で示された *myf6* 発現二峰性仮説を強く支持するものと言える。Myf6:EGFP-iPS 細胞は、本研究課題の本来の目的とは異なる、あくまでもコントロールとして作出した細胞であるが、結果的には、マウス筋発生の謎を解き明かす新しい研究ツールとして、今後の研究で汎用されることが期待される (Hosoyama. Biochem Biophys Rep. 2020)。

4 - 3 : SB システムによる筋幹細胞老化関連因子の同定

本研究課題では、骨格筋幹細胞の幹細胞老化を導く新しい因子を同定する為、筋幹細胞特異的 Cre ドライバーマウスと SB システムを組み合わせた手法を用いた。先に述べたように、*in vivo* レポーター系 (p16-Luc マウス) が使えなかったことから、iPS 細胞を利用した方法に方針転換して研究を遂行した。Pax7-CreER:SB マウス由来 iPS 細胞は、Myf6-CreER:EGFP マウス由来 iPS 細胞と同様の方法による筋細胞分化誘導後に、分化 3-4 日の時点でマイクロビーズによる筋幹細胞の濃縮を施した。濃縮した幹細胞は、クローニングリングによるクローン化後にタモキシフェンを添加した。理論上は、本操作により筋幹細胞ゲノムに無作為に変異を挿入したことになり、引き続きの培養期間中に明らかに形態が変化したクローンを選抜し、細胞老化アッセイを行うこととした。しかしながら、少なくとも本研究で得られた 100 に上る筋幹細胞クローンの中で、明らかな細胞老化様形態 (細胞の扁平化や核肥大など) を示したものは無く、実際、SA-β-Gal 陽性の筋幹細胞の出現も認めなかった。今後はさらにクローン化筋幹細胞数を増やした状態で、細胞老化に陥った細胞の同定を目指す。ただし、本法による老化細胞の選抜は極めて効率が悪く、p16-Luc に変わる新たなレポーター系の導入についても、ゲノム編集技術などを用いて検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tohru Hosoyama	4. 巻 21
2. 論文標題 Possible Application of Muscle Specific Conditional Mouse-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Muscle Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100744	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tohru Hosoyama, Minako Kawai
2. 発表標題 Possible applications of muscle specific conditional mouse-derived iPS cells for muscle research
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018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
研究分担者	松井 康素 (Matsui Yasumoto) (50501623)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・ロコモフレイルセンター・センター長 (83903)	

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