

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19749

研究課題名(和文)骨格筋構築・再構築を可視化する

研究課題名(英文) Visualization of skeletal muscle reconstruction using the Pax7-YFP knock-in-mouse line

研究代表者

小野 悠介 (Ono, Yusuke)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：60601119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋線維周囲に存在する骨格筋幹細胞(サテライト細胞)は、骨格筋の成長、肥大、修復・再生など筋構築・再構築に重要な役割を担っている。本研究ではサテライト細胞研究を加速させるツールを開発するため、サテライト細胞を生細胞のまま運命決定や筋再構築を可視化できる遺伝子改変マウスを作成し評価した。Pax7-YFPノックインマウスとAnkrd1-tdTomatoノックインマウスを組み合わせることで、休止期細胞および自己複製細胞をYFP high、活性化した未分化細胞をYFP low/tdTomato low、筋分化した細胞をtdTomato highに分類することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋線維周囲に存在する骨格筋幹細胞(サテライト細胞)は、骨格筋の成長、肥大、修復・再生など筋構築・再構築に重要な役割を担っている。近年、サテライト細胞の機能異常は、スポーツ障害、筋ジストロフィー、サルコペニア、廃用性筋萎縮、がんカヘキシア、2型糖尿病などに関連することが明らかになってきた。そのため、サテライト細胞に着目した研究は近年爆発的に増えており、筋脆弱症の予防や治療法の確立を急ぐためにも研究を加速させる必要がある。本研究では、サテライト細胞による筋構築・再構築の様相を生きた細胞の状態で見ることができたマウスツールの開発を行い、骨格筋研究を加速する技術基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle stem cells named satellite cells play important roles in muscle growth, hypertrophy, repair, and regeneration. Recent studies revealed that dysfunction of satellite cells is involved in muscle weakness such as sarcopenia. To develop a novel tool for accelerating the satellite cell research, here we generated and evaluated knock-in mice that allow us to visualize the fate determination of satellite cells under the living conditions. By combining Pax7-YFP knock-in line with Ankrd1-tdTomato knock-in line, we showed that quiescent and self-renewing cells, activated and proliferating cells, and differentiating cells are visualized as YFP high, YFP low / tdTomato low, and tdTomato high populations, individually.

研究分野：筋生物学

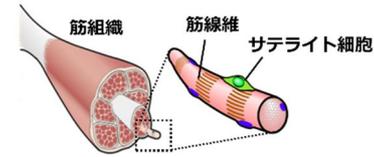
キーワード：Pax7 Ankrd1 筋再生 骨格筋 サテライト細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋線維周囲に存在する骨格筋幹細胞 (サテライト細胞) は、骨格筋の成長、肥大、修復・再生など筋構築・再構築に重要な役割を担っている (図 1)。サテライト細胞は、通常、休止期の状態で存在するが、筋損傷等の刺激が入ると速やかに活性化し、増殖を繰り返した後、筋分化に運命が決定され、互いに融合して横紋構造をもつ筋線維へと成熟する。近年、サテライト細胞の機能異常は、スポーツ障害、筋ジストロフィー、サルコペニア、廃用性筋萎縮、がんカヘキシア、2 型糖尿病などに関連することが明らかになってきた。そのためサテライト細胞に着目した研究は近年爆発的に増えており、また今後も増加の一途を辿ると予想される。筋脆弱症の予防や治療法の確立を急ぐためにもサテライト細胞研究を加速させる必要がある。

図1 骨格筋幹細胞 (サテライト細胞)



サテライト細胞の役割

骨格筋の成長、肥大、修復、再生に必須

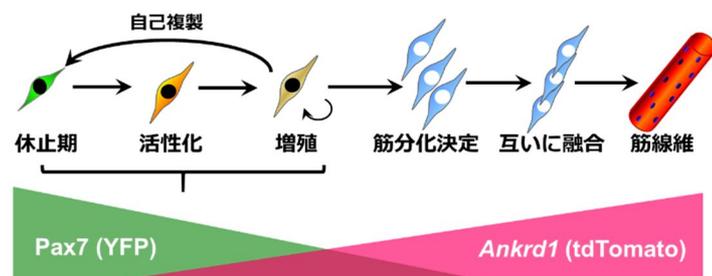
2. 研究の目的

本研究計画では、様々なステージのサテライト細胞を蛍光ラベルすることで骨格筋の構築・再構築の様相を可視化する技術基盤を構築する。

3. 研究の方法

未分化サテライト細胞を生細胞で可視化するために、サテライト細胞マーカーである核内転写因子 Pax7 を緑蛍光タンパク質 YFP で標識した Pax7-YFP ノックインマウスを作成した。また、Ankrd1 遺

図2 骨格筋の運命決定・筋再構築を可視化するストラテジー



伝子に着目し、活性化、筋分化したサテライト細胞を赤蛍光タンパク質 tdTomato でラベルするために、Ankrd1-tdTomato ノックインマウスを作成した。さらに Pax7-YFP マウスと Ankrd1-tdTomato マウスを掛け合わせ、Pax7-YFP;Ankrd1-tdTomato ダブルノックインマウスを作成した。

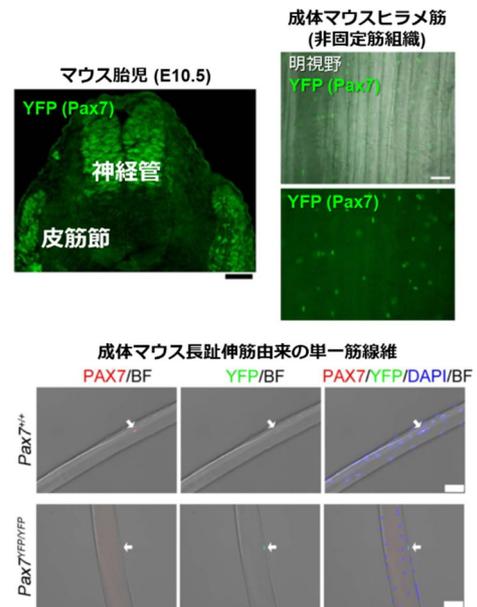
4. 研究成果

サテライト細胞を生細胞で可視化するために、サテライト細胞の特異的なマーカーである核内転写因子 Pax7 を緑蛍光タンパク質 YFP で標識できる Pax7-YFP ノックインマウスを評価した。まず、サテライト細胞の運命決定における Pax7-YFP タンパク質の発現動態解析を行った。Pax7-YFP の発現は、休止期状態および自己複製細胞で高く (YFP^{high})、活性化・増殖中に低下し (YFP^{low})、筋分化では失う (YFP^{negative}) ことを確認した。また、YFP タンパク質は E10.5 胎児の神経管と皮筋節に検出されること、成体筋組織のサテライト細胞に強く検出された (図 3. Kitajima and Ono, Skelet Muscle 2018)。したがって YFP は内因性 Pax7 タンパク質の発現動態を正確に反映しており、生きた未分化のサテライト細胞を直

接可視化できると考えられる。当該マウスは内在 Pax7 タンパク質に YFP を融合発現させているため、YFP が Pax7 の機能を阻害する可能性がある。仮に Pax7 の機能阻害が生じる場合、サテライト細胞は増殖が低下し、細胞死が誘導されることが先行研究により報告されている。そこで Pax7-YFP ホモノックインマウス (Pax7^{YFP/YFP}) を用いて YFP による Pax7 機能干渉を検証した。その結果、サテライト細胞の増殖、分化、自己複製能の *in vitro* 機能評価および *in vivo* での筋再生能評価から、Pax7^{YFP/YFP} サテライト細胞の機能は野生型サテライト細胞と全く差がないことが分かった。すなわち Pax7-YFP の融合タンパク質は内在 Pax7 の機能には干渉しないと考えられる。

骨格筋と心筋に発現することが知られている Ankrd1 に着目した。サテライト細胞は、活性化すると Ankrd1 遺伝子を発現し、筋分化にコミットするとさらに発現量が増加することを定量 PCR により確認した。続いて Ankrd1 遺伝子発現レベルを赤色蛍光 (tdTomato) でモニターできる Ankrd1-tdTomato ノックインマウスを評価したところ、サテライト細胞における tdTomato 蛍光強度は、内因性の Ankrd1 遺伝子発現動態を正確に反映していることを観察した。さらに、Ankrd1-tdTomato マウスと Pax7-YFP マウスと掛け合わせ、休止期細胞および自己複製細胞を YFP^{high}、活性化した未分化細胞を YFP^{low}/tdTomato^{low}、筋分化した細胞を tdTomato^{high} と蛍光ラベルできるダブルノックインマウスを作成した。本研究成果により、生きたサテライト細胞を用いて骨格筋の構築・再構築を可視化することができると考えられる。

図3 Pax7-YFPノックインマウス



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitajima Y and Ono Y	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Visualization of PAX7 protein dynamics in muscle satellite cells in a YFP-knock-in-mouse line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Skelet Muscle	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s13395-018-0174-x	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 Yoshioka K, Fujita R, Seko D, Suematsu T, Miura S, Ono Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Distinct roles of Zmynd17 and PGC1 in mitochondrial quality control and biogenesis in skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2019.00330	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8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 ステムネス制御による骨格筋再生治療法の基盤構築
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 骨格筋幹細胞における機能的不均一性の分子基盤
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 筋サテライト細胞による骨格筋の修復・再生制御
3. 学会等名 レドックス・ライフィノベーション第170委員会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 発生起源に則した骨格筋幹細胞のポジショナルメモリーとその機能
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 骨格筋におけるポジショナルメモリーの解明に向けて
3. 学会等名 第90回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 骨格筋幹細胞におけるポジショナルメモリー
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 ポジショナルメモリーから捉える骨格筋の修復・再生メカニズム
3. 学会等名 第74日本体力医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 Positional memory governs satellite cell function in adult muscles
3. 学会等名 Frontiers in Myogenesis Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学発生医学研究所 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/muscle_development_and_regeneration/</p>

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