

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03179

研究課題名(和文)骨格筋再生における機械受容イオンチャネルPIEZ01の役割

研究課題名(英文)Role of a mechanosensitive ion channel PIEZO1 in regeneration of skeletal muscle

研究代表者

原 雄二 (Hara, Yuji)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：60362456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋を構成する筋線維は高い再生能を有しており、筋収縮・弛緩に伴い発生する筋損傷に応じて筋線維を再生・修復することで、筋恒常性の維持に重要な役割を果たす。筋再生過程の中心として機能する骨格筋幹細胞について、物理的な力を感じる機構(機械受容)の関与が示唆されてきたが、その分子機構は未だ明らかではない。本研究では、筋幹細胞にて高発現する機械受容イオンチャネルPIEZ01に着目した。Piezo1遺伝子欠損マウスの解析等により、PIEZ01は筋衛星細胞における増殖、細胞分裂、細胞遊走にて重要な役割を果たすことを見出し、Life Science Alliance誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて、PIEZ01は細胞分裂期に分裂溝に集積すること、Piezo1欠損筋幹細胞では分裂期の遅延等を介した筋再生不良が認められたことから、PIEZ01は筋再生の最上流にて機能する因子であることが示された。一方で、一般的な培養細胞株にてPIEZ01を欠損させても明確な分裂不全の表現型は見られないことから、幹細胞特異的かつPIEZ01依存的な新規分裂過程が存在する可能性を示している。さらに、本研究で明らかにされたPIEZ01が機械刺激を感じる機構は、筋幹細胞による筋再生能の解明のみならず、骨格筋における多様な病態発症に対して重要な知見をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle is composed of thousands of multinucleated cells called myofibers, which possesses regenerative capacity after muscle injuries. Muscle-resident stem cells, called muscle satellite cells (MuSCs), play a fundamental role in regeneration of myofibers to maintain skeletal muscle homeostasis. Mechanosensation is thought to be involved in myofiber regeneration, but the molecular mechanisms underlying myofiber regeneration remains to be elucidated. In this study, we focused on PIEZO1, a mechanosensitive ion channel that is activated by membrane tension. Using a series of mouse models such as MuSC-specific Piezo1-deficient mice, we showed that PIEZO1 acts as a critical determinant for cell division, cell proliferation, and migration of MuSCs, and reported these findings in Life Science Alliance.

研究分野：薬系衛生および生物化学関連

キーワード：骨格筋再生 骨格筋幹細胞 機械受容イオンチャネル PIEZO1 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動器官としての特性上、絶え間ない筋収縮・弛緩に伴い絶えず物理的な刺激を受けている。過剰な負荷がかかり、損傷を受けると骨格筋は最終的に壊死し、ひいては骨格筋そのものの機能が破綻する。一方、骨格筋は高い再生能を有しており、生体恒常性を維持している。この筋恒常性維持をもたらす機構の一つに、骨格筋線維の再生機構が挙げられる。筋線維の形成過程では、骨格筋に内在する幹細胞（筋衛星細胞）が損傷を感知し、筋幹細胞から派生した筋芽細胞同士が融合し筋管と呼ばれる長大な管状の構造体が形成され、さらに筋線維へと成熟する（Wang et al., 2011）。この筋再生の端緒の現象として、筋損傷時に発生する液性因子などが注目されてきた。

幹細胞が周囲の環境を感知することで、幹細胞の運命が決定されるという報告がなされて以降、物理的な力を感じ取る機構が脚光を浴びつつある。また 2021 年度のノーベル生理学・医学賞の受賞対象である PIEZO イオンチャネルは、細胞膜に掛かる物理的な力を感じ取り、触覚感知に関与することが報告されている。PIEZO チャネルは PIEZO1 およびそのホモログ PIEZO2 からなり、触覚に限らず、血流・軟骨・心臓・神経系など、生体内における種々の物理的な力を感じ取り、細胞・生命現象をもたらすことが明らかにされつつある（Coste et al., Science 2010）。

以上の背景のもと、骨格筋再生過程における各素過程の解明を試みてきた。まず筋芽細胞同士の融合について特に脂質分子の局在決定機構の役割解明を試みた。細胞膜は脂質分子よりなるが、親水性の脂質頭部、疎水性のアシル鎖からなるため、脂質二重層を形成する。興味深いことに、哺乳動物細胞において、外葉、内葉を構成するリン脂質の組成は不均一である。我々は膜張力を感じ取る（いわゆる機械受容イオンチャネル）PIEZO1 は、脂質二重層の外葉から内葉に輸送するリン脂質フリッパーゼにより、イオンチャネル活性が制御されること、さらに PIEZO1 を介して秩序だった筋管形態をもたらすことを明らかにした（Tsuchiya et al., 2018）。

2. 研究の目的

我々の結果（Tsuchiya et al., Nature Commun. 2018）に着想を得て、骨格筋再生過程における PIEZO チャネルの発現解析を行った。その予備検討の結果、骨格筋幹細胞にて PIEZO1 は高発現することを見出した。すなわち膜張力により活性化されるイオンチャネルが、骨格筋幹細胞の最上流に位置して機能する可能性が示唆された。そこで本研究では「PIEZO1 が骨格筋幹細胞の機能を統御することで、筋再生に重要な役割を果たす」という作業仮説のもと、その分子機構および役割解明を試みた。

3. 研究の方法

1) 実験動物： *Piezo1* 欠損マウス (*Piezo1^{tm1c(KOMP)Wtsi}*) を UC Davis マウスリソースセンターより入手した。筋衛星細胞特異的に Cre レコンビナーゼを発現する Pax7-Cre^{ERT2}（小野悠介教授・熊本大学より供与）と掛け合わせを行った。内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato タグを付加するマウスについては、野々村恵子准教授（東京工業大学）より供与いただいた。

2) 筋再生能評価： 6~12 週令のマウスを用い、Cre レコンビナーゼの誘導のためタモキシフェンを腹腔内に 5 回（1 日 1 回）注入し、さらに 5 日後に筋線維融解作用を持つヘビ毒（カルジオトキシン）を前脛骨筋に注入し、再生筋についてヘマトキシリン・エオジン染色等を用いることで、筋再生能を評価した。

3) 骨格筋幹細胞の単離： マウス骨格筋をミンチ状に切り刻んだのち、0.2% Collagenase TypeII を添加し、筋組織を溶解した。その後、通常方法にて溶血などを行い、セルソーターを用いて、CD31、CD45、Scal 陰性、NCAM 陽性細胞群を分取し、各種検討を行った。また一部実験では、筋線維を単離し、筋線維上にて筋幹細胞を培養する実験系を併用した。

4. 研究成果

1) 機械受容イオンチャネル PIEZO1 の筋衛星細胞での発現・局在解析：
これまでの申請者の研究（Tsuchiya et al., 2018）をもとに、骨格筋線維の再生過程全般での PIEZO1 の機能解明を試みた。タンパク質レベルでの PIEZO1 の発現を検討するため、mRNA レベルでの発現を検討したところ、既知発現データベースでの解析により、PIEZO1 は筋衛星細胞にて高発現すること、一方で成熟筋線維ではその発現は低いことを見出した。そこでタンパク質レベルでの発現解析を行うため、内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato が融合した形で発現する *Piezo1*-tdTomato マウスを用いて、PIEZO1 の骨格筋での発現を検討した。筋線維を単離し、tdTomato の発現を検出した。筋幹細胞のマーカー分子 Pax7 との共染色を行ったところ、Pax7 陽性細胞に限局して PIEZO1-tdTomato の発現が認められた。

2) 骨格筋幹細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの解析 :

幹細胞での役割解明のため、遺伝子欠損マウスの作出を試みた。*Piezo1* の全身性欠損マウスは胎生致死を示すことから、*Pax7-CreERT2/loxP* システムを用いてタモキシフェン誘導型の筋衛星細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの作出・解析を行った。タモキシフェン投与（腹腔内注射、5日間）した後、タンパク質レベルでの発現減少を検討するため、カルシウムイオン指示薬 *Fura-2* を用いて筋衛星細胞でのカルシウム動態を検討した。その結果コントロール細胞と比較して *Piezo1* 欠損筋幹細胞では微細なカルシウム振動が有意に減弱したことから、*PIEZO1* は筋幹細胞にてカルシウムイオン透過型イオンチャネルとして機能することが示された。

続いて、*Piezo1* 欠損マウスを用いて、骨格筋再生能を評価した。筋線維融解作用を有する蛇毒（カルジオトキシン）を筋注することで筋線維の壊死を誘導した。筋線維と比較して筋幹細胞はカルジオトキシンに耐性を示すことから、筋再生能を評価することができる。カルジオトキシン注入後7日目の筋組織を評価したところ、野生型では再生過程の筋線維が見られたが、*Piezo1* 欠損マウスでは筋組織の線維化や免疫細胞の浸潤が認められたことから、筋再生能が著しく遅延することを示された。

PIEZO1 が関わる筋再生機構を明らかにするために、単離骨格筋を用いた実験を行った。筋線維を単離後、筋幹細胞を単離筋線維上で培養し、活性化された筋幹細胞の増殖能を検討した。*Pax7* 陽性細胞を検出したところ、*Piezo1* 欠損筋衛星細胞では増殖能の低下が認められたことから、*PIEZO1* は幹細胞の増殖に関わることが示された。

PIEZO1 がいかに骨格筋幹細胞の増殖にかかわるか解明するため、*PIEZO1-tdTomato* マウス由来の筋衛星細胞の性状解析を試みた。単離筋衛星細胞での *PIEZO1-tdTomato* の局在変動を検討したところ、興味深いことに静止状態時に幹細胞の形質膜に一樣に存在していた *PIEZO1-tdTomato* タンパク質が、細胞分裂時には分裂溝付近に限局して存在することが示された。また *PIEZO1* の発現は未分化の筋幹細胞で高く、分化過程で徐々に減少したことから、*PIEZO1* が骨格筋幹細胞の分裂時に寄与する可能性が示唆された。実際、*Piezo1* 欠損マウス由来の幹細胞において、タイムラプス撮影を行ったところ、幹細胞の分裂過程にて分裂能の低下とともに、分裂後の細胞核の構造異常（クロモソームブリッジの形成、微小核の出現）がみられた。以上の結果より、*PIEZO1* は幹細胞の適切な分裂に寄与することが示された。

筋幹細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの解析

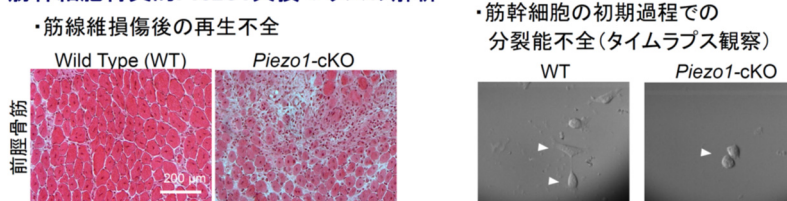


図:筋幹細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの表現型

3) *PIEZO1* の機能調節機構の解明 :

PIEZO1 が筋幹細胞にてその局在を同定に変化させる機能を明らかにするため、現在検討を進めている。まず *Piezo1* 欠損筋衛星細胞での遺伝子発現変動の解明を行っている。新宅博文博士（理研）との共同研究により、トランスクリプトーム解析を行ったところ、*PIEZO1* の下流経路として細胞骨格の再編成が *Gene Ontology* 解析にてエンリッチされた。この結果は上記研究結果と合致するものであり、*PIEZO1* が細胞骨格の再編成に関与することを支持するものである。また、*Rho* 活性化剤 *CN03* を添加することで、*Piezo1* 欠損時に見られた表現型（幹細胞性の減少、細胞分裂異常、細胞増殖能の減少）がレスキューされたことから、*PIEZO1* は低分子量 *G* タンパク質 *Rho* の上流に位置し、細胞骨格の再編成をもたらすことで骨格筋幹細胞の機能を制御することを明らかにした。以上の結果は、国際誌に公表した (Hirano K et al., *Life Science Alliance*, 2022)。

4) *in vivo* イメージングによる骨格筋幹細胞の動態解析 :

骨格筋幹細胞は、周囲の硬さなどの微小環境の変化を感知することから、生体レベルでの幹細胞の挙動解析が必要不可欠である。そこで *ABiS* (松田道行教授・京都大学) のご支援のもと二光子顕微鏡を用いた解析を行った。*Rosa26* 遺伝子座に *YFP cDNA* が挿入され、*Cre* レコンビナーゼ依存的な *YFP* 発現をもたらすマウス (*Rosa26-YFP*) を用いた。

生体内における骨格筋幹細胞の遊走能評価のため、多光子蛍光顕微鏡を使用した *in vivo* イメージングを行った。多光子蛍光顕微鏡は従来の蛍光顕微鏡と比較して低侵襲性の近赤外光を用いるため、生体内での観察が可能であることから、本研究に用いた。*Pax7CreERT2; Rosa26-YFP* マウスの *in vivo* イメージングを行った。その結果、2光子励起により *YFP* で標識された骨格筋幹細胞を、また第二高調波発生光 (Second Harmonics Generation) により *Collagen fibril* を撮影できたことから、骨格筋幹細胞の3Dイメージング系の構築に成功した。*Piezo1* 欠損マウスにおける生体内での骨格筋幹細胞の遊走能評価を行なったところ、遊走速度の低下が認められたことから、*PIEZO1* は幹細胞の遊走過程にも関与することが示唆された。

<引用文献>

Wang et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Dec 21;13(2):127-33.

Coste B et al., *Science*, 330, 55-60 (2010)

Tsuchiya et al., *Nature Communications*, 9, 2049 (2018)

Hirano K et al., *Life Science Alliance*, e202201783 (2022)

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 Hirano Kotaro, Tsuchiya Masaki, Shiomi Akifumi, Takabayashi Seiji, Suzuki Miki, Ishikawa Yudai, Kawano Yuya, Takabayashi Yutaka, Nishikawa Kaori, Nagao Kohjiro, Umemoto Eiji, Kitajima Yasuo, Ono Yusuke, Nonomura Keiko, Shintaku Hirofumi, Mori Yasuo, Umeda Masato, Hara Yuji	4. 巻 6
2. 論文標題 The mechanosensitive ion channel PIEZO1 promotes satellite cell function in muscle regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202201783	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5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原雄二、平野航太郎、小畑裕次郎、森泰生、梅田真郷
2. 発表標題 骨格筋再生における膜張力感知機構の役割
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野航太郎、北嶋康雄、小野悠介、森泰生、原雄二
2. 発表標題 骨格筋幹細胞活性化における機械受容イオンチャネルによる制御機構
3. 学会等名 第7回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原雄二、平野航太郎、土谷正樹、高林征史、梅田真郷
2. 発表標題 細胞力覚を基軸とした骨格筋線維再生機構
3. 学会等名 19.第92回日本生化学会大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Hara, Kotaro Hirano, Masaki Tsuchiya, Masaki Tsuchiya, Masato Umeda
2. 発表標題 Role of a mechanosensitive cation channel PIEZO1 in skeletal muscle regeneration
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Hara, Kotaro Hirano, Masaki Tsuchiya, Masaki Tsuchiya, Masato Umeda
2. 発表標題 Role of mechanosensing machinery in skeletal muscle regeneration
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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