

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16969

研究課題名（和文）骨格筋再生における毛細血管幹細胞の役割

研究課題名（英文）Role of capillary stem cells in skeletal muscle regeneration

研究代表者

鹿野 耕平（Kano, Kohei）

旭川医科大学・大学病院・診療助教

研究者番号：10835135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：毛細血管の周細胞(PCs)群の中から発見したEphA7陽性の多能性PCs(CapSCs)は、微小血管構築や末梢神経再生に加え、高い筋線維への分化能がある。これらに着目し、ユニークなPCs追跡マウスを利用して、生体での骨格筋再生における毛細血管PCsの動態を観察し、毛細血管PCsが骨格筋量の維持や再生に寄与することを明らかにした。

さらに、毛細血管形成やCapSCsの機能に関わる因子(Ninj1)に着目した。独自に作成したPCs特異的にNinj1の欠損誘導マウスなどを利用して、Ninj1が生体での骨格筋再生に関わる因子であると証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ninj1は「毛細血管の構築」や「毛細血管由来の骨格筋再生細胞」という視点から、骨格筋再生や筋量維持の機序解明に関わり、治療ターゲットとなりうる。高齢化社会でますます問題化するサルコペニアやこれに関連する様々な疾患の治療開発の糸口となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：EphA7-positive pluripotent PCs (CapSCs) found in the pericyte (PCs) group of capillaries have the ability to differentiate into high muscle fibers in addition to microvascularization and peripheral nerve regeneration.

Focusing on these, we observed the dynamics of capillary PCs in skeletal muscle regeneration in vivo using unique PCs tracking mice, and clarified that capillary PCs contribute to the maintenance and regeneration of skeletal muscle mass. . .

Furthermore, we focused on the factor (Ninj1) involved in the formation of capillaries and the function of CapSCs. We proved that Ninj1 is a factor involved in skeletal muscle regeneration in the living body by using PCs-specifically created mice that induce deficiency of Ninj1.

研究分野：神経内科

キーワード：骨格筋再生 毛細血管周細胞 Ninjurin1 サルコペニア 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 高齢化社会を背景にサルコペニアや、これに関連する病態が医療上、大きな問題になっているが、基本的な骨格筋維持や再生の機序について不明な点が多い。組織維持や再生に組織実質細胞を供給する幹細胞と微小血管網の構築は必要不可欠である。最近、骨格筋幹細胞として衛星細胞以外に毛細血管周細胞が注目されているが、多集団の周細胞のどれが筋再生に関わるのか、その生体における骨格筋再生への関与は不明である。
- (2) 周細胞集団の中から骨格筋分化能をもつ毛細血管幹細胞(CapSCs)を発見し、また、毛細血管形成に関わる周細胞の新規分子(Ninj1)を見出した。CapSCsのNinj1は、その多分化能にも影響することから、CapSCsを含む周細胞Ninj1は、毛細血管形成や骨格筋分化を介して骨格筋再生に寄与することが推測できる。
- (3) 周細胞特異的にNinj1欠損誘導マウスなどを利用して、CapSCを含めた周細胞の生体での骨格筋組織の維持・再生への役割を解明する。

2. 研究の目的

- 【目的1】PCsやCapSCsが骨格筋組織再生に寄与する程度を評価する。
- 【目的2】障害骨格筋の筋再生における周細胞Ninj1の役割を評価する。

3. 研究の方法

【方法1】

(1)各種遺伝子改変動物の準備

骨格筋由来PCsおよびCapSCsの調整 PCs特異的に赤蛍光蛋白の発現するNG2-DsRedマウスと普遍的に緑蛍光発光するGFPマウス、さらに両マウスを掛け合わせたNG2-DsRed/GFPマウスを用いて、骨格筋組織からNG2陽性PCs、さらにその中からEphA7陽性CapSCsをFluorescence activated cell sorting(FACS)あるいはMagnetic cell sorting (MACS)法で分離調整する。

PCs由来細胞の生体内追跡を可能にするNG2-CreERT/tdTomatoマウスを準備する。本マウスは、Tamoxifen(tam)処理でNG2陽性PCsに蛍光タンパクを発現させ、PCsが他細胞に形質変化(分化)しても蛍光しつづけ、PCs由来の細胞/組織を追跡することができる。

(2)骨格筋挫滅モデルの作成

マウスの腓腹筋・ヒラメ筋群(下腿)にcardiotoxinを筋注することで、局所的な筋傷害を引き起こし、筋挫滅モデルマウスを作成する。

(3)骨格筋組織の解析実験

組織学的解析としては通常の組織切片での評価に加え、CUBIC法で組織透明化処理を行い、三次元的に筋線維周囲の血管の成熟化・血管新生(Lectin、CD31による免疫染色)また筋線維周囲血管の周細胞やCapSCs(NG2、EphA7、Ninj1の発現性)について評価する。

【方法2】

(1)周細胞特異的Ninj1-欠損の効果

当研究室で作成したNG2-CreERT/Ninj1-FloxPマウスを用いて、tam処理を行い、NG2陽性周細胞特異的にNinj1-Knock Out(KO)させた後、上記のように骨格筋挫滅を誘導する。対照マウスとして、NG2-CreERマウスにtam処理を施した群とtam処理を行わない群を用いる。骨格筋挫滅後骨格筋再生について評価し、対照マウスと比較検討する。

4. 研究成果

【結果1】

(1)GFP発現マウスの皮下脂肪組織から分離調整したGFP蛍光細胞をCardiotoxinで挫滅した骨格筋組織に移植すると、CapSCsの場合、同細胞由来の再生筋線維と微小血管が観察された(図1)。一方、EphA7陰性ctPCの導入では障害骨格筋組織内に導入細胞由来の線維化を誘発させた。

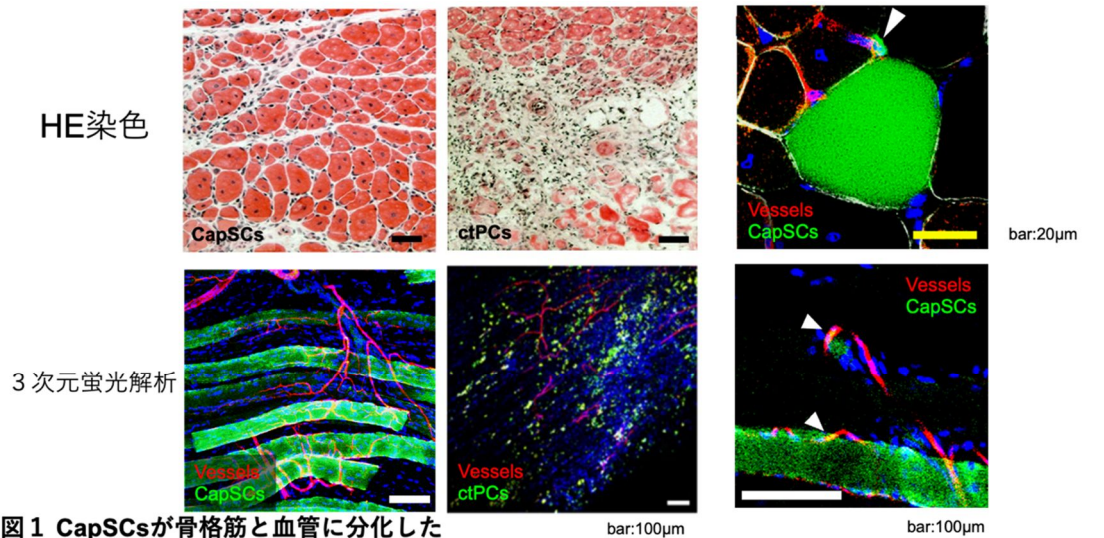


図1 CapSCsが骨格筋と血管に分化した
 上段の図は、移植3週間後の腓腹筋を短軸像でHE染色したものです。ctPCs移植群では、筋障害組織内の線維化が著明でした。それに対し、CapSCs移植群では中心核を伴う再生筋線維を多数認めました。また、下の段は組織透明化を行い、3次元解析したものです。緑蛍光で見えるものが移植細胞で赤は血管になります。ctPC群では移植細胞は一部残存するも、移植細胞由来の筋線維形成は認めませんでした。一方、CapSC群では移植細胞由来の筋線維形成を多数認めました。さらに拡大したものが隣の図になります。CapSCs由来の再生筋線維の近傍において、血管に一致するCapSC由来の細胞を認め、血管新生への寄与が推察されました。上段の図はその短軸切片の図になりますが、同様にCapSC由来の再生筋線維と血管を認めました。

(2)
 外因性細胞(移植細胞)による筋再生を結果(1)で示したが、内在性の周細胞による筋再生能を評価するために、内因性周細胞追跡モデルマウスを用いた。図2より、腓腹筋およびヒラメ筋内に NG2 陽性周細胞由来の筋線維を認めたことから、外因性のみならず内因性の周細胞の筋再生能も認めた。

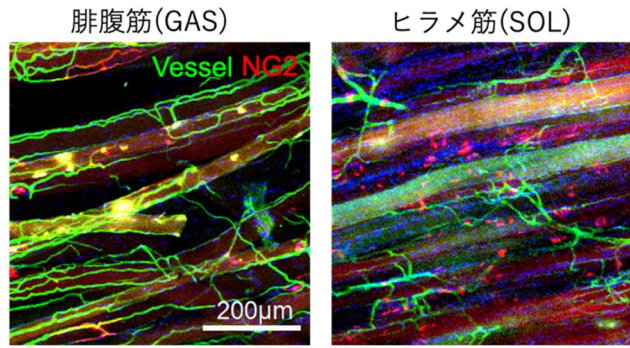


図2 内因性の周細胞による骨格筋再生を認めた
 成体NG2CreERT-tdTomatoマウス(内因性周細胞追跡マウス)にTamoxifenを投与し、4週間後に腓腹筋およびヒラメ筋を摘出し、透明化処理後に3次元画像解析を行った。腓腹筋およびヒラメ筋内にTomato陽性となった周細胞由来の骨格筋線維を認めた。

(3)
 筋再生時における Ninj1 の関係を調べるために、CTX による筋挫滅を行い、組織内の NG2 および Ninj1 の発現を経時的に評価した。NG2 および Ninj1 の発現は2週間にわたり亢進し、NG2 細胞に一致して Ninj1 の発現を認めた。

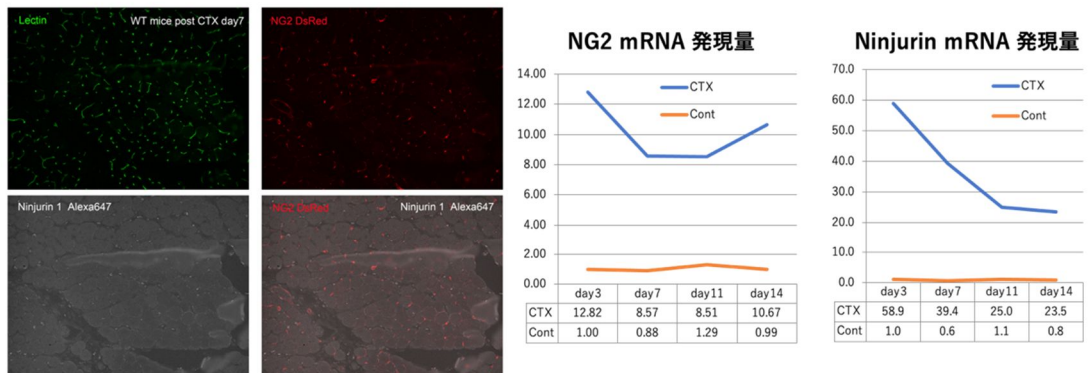


図3 筋障害時に周細胞が増加し、Ninj1の発現も増加した
 Cardiotoxin(CTX)により腓腹筋およびヒラメ筋を特異的に筋挫滅し、経時的に組織内のNG2・Ninj1の発現を解析した。CTX後2週間で挫滅組織内のNG2発現は持続的に亢進し、組織内のNinj1の発現も亢進した。またNinj1の発現は組織内のNG2陽性細胞(周細胞)に一致していた。

【結果 2】

NG2細胞特異的にNinj1を欠損させたマウスのヒラメ筋を挫滅し、単一筋線維の断面積を測定した。PBS投与による対象群とCTX群と比較し、Ninj1欠損群で優位に筋断面積の減少を認めた。

【総括】

(1)筋挫滅マウスモデルへの細胞導入実験では、CapSC群で高い組織残存性を示した。その細胞は骨格筋に分化し一部は血管新生し、高い組織再生能を示した。

(2)外因性のみならず内在性NG2陽性周細胞による筋再生能も認めた。

(3)筋再生時に内在性周細胞は増加し、Ninj1の発現も増加した。

(4)周細胞特異的にNinj1を欠損することにより、筋組織再生能が減少した。

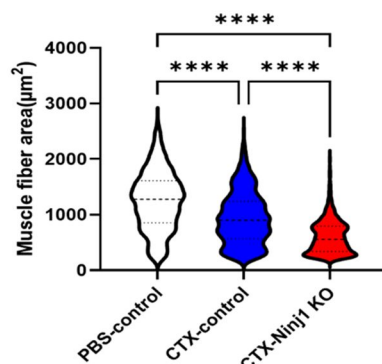


図4 NG2細胞においてNinj1欠損は筋再生能を低下させた

NG2細胞特異的にNinj1欠損マウスのヒラメ筋を筋挫滅(CTX)し、単一筋線維の断面積を計測した。Ninj1欠損CTX群で筋面積の減少を示した。

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 Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Yoshida Yuri, Hayasaka Taiki, Kabara Maki, Tomita Yui, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Sawada Jun, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 47
2. 論文標題 EphA7+ perivascular cells as myogenic and angiogenic precursors improving skeletal muscle regeneration in a muscular dystrophic mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101914 - 101914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101914	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鹿野耕平
2. 発表標題 EphA7陽性周細胞は、筋ジストロフィーモデルマウスの病態を改善する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿野耕平
2. 発表標題 Transplantation of capillary stem cells improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿野耕平
2. 発表標題 新規体性幹細胞 = 毛細血管幹細胞 (Capillary Stem Cells; CapSCs) による骨格筋再生能
3. 学会等名 第61回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿野耕平
2. 発表標題 新規血管周細胞は骨格筋再生に寄与する。
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 鹿野耕平
2. 発表標題 EphA7陽性周細胞は、筋ジストロフィーモデルマウスの病態を改善する
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鹿野耕平 川辺淳一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)シーエムシー出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 月刊『BIOINDUSTRY』12月号	

〔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