

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22359

研究課題名(和文)比較動物学的見地からの筋発生学・筋再生学再構築への挑戦

研究課題名(英文)Challenges in reconstructing myogenesis and muscle regeneration from a comparative animal science perspective

研究代表者

山内 啓太郎(Yamanouchi, Keitaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：70272440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：MyoD欠損ラットおよびMyf-5欠損ラットの作成に成功した。両ラットともに出生後数時間以内に死亡するという共通した表現型を呈していた。さらにMyoDやMyf-5陽性細胞の追跡が可能なMyoD-GFPラットおよびMyf-5-mCherryラットをゲノム編集により作成した。これらの骨格筋から採取した細胞からFACSによりGFP、mCherry陽性細胞を分離できることが確認された。今回作成した各種遺伝子改変ラットは今後ラットにおける筋発生学や筋再生学の研究を遂行する上で有用なツールとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでに筋発生や筋再生の仕組みを研究する上で、マウスに比べラットがよりヒトのそれらを反映する可能性について報告してきた。そこで本研究では今後ラットを利用した筋発生や筋再生学研究を進めていく上で有用となるモデル動物の開発を目指した。その結果、MyoD欠損ラットおよびMyf-5欠損ラット、さらにはMyoDやMyf-5陽性細胞の追跡が可能なMyoD-GFPラットおよびMyf-5-mCherryラットの作成にそれぞれ成功した。今回作成した各種遺伝子改変ラットは今後ラットにおける筋発生学や筋再生学の研究を遂行する上で有用なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：MyoD-deficient and Myf-5-deficient rats were successfully generated. Both rats exhibited a common phenotype of death within hours of birth. In addition, MyoD-GFP rats and Myf-5-mCherry rats, in which MyoD- and Myf-5-positive cells can be traced, were generated by genome editing. It was confirmed that GFP- and mCherry-positive cells could be isolated from cells collected from the skeletal muscle of these rats by FACS. The various genetically engineered rats created in this study will be useful tools in future research on myogenesis and muscle regeneration in rats.

研究分野：獣医生理学

キーワード：ラット 筋発生 筋再生 ゲノム編集 MyoD Myf-5 ノックインラット

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 筋分化マスター因子 MyoD

転写因子 MyoD は、発生段階で筋細胞系譜の決定を担う因子(筋分化マスター因子)として、マウスで発見された。発生段階において多能性をもつ細胞集団の分化運命を決定する因子としては世界初の実見であった。その後、筋細胞の発生に関わる因子として MyoD と同様の構造をもつ Myf-5、Myogenin、MRF4 が相次いで同定され (MyoD ファミリー因子)、マウスを用いた解析により、発生段階では MyoD と Myf-5 が筋細胞への最初の決定 (筋芽細胞の決定) を、続いて Myogenin がその後の分化 (筋芽細胞同士の融合による筋管細胞の形成) を、そして MRF4 が最終的な筋線維の成熟を担う、という一連のカスケードの存在が提唱されている。ところが MyoD や Myf-5 を欠損したマウスではほぼ正常に筋発生がおこり、特に MyoD 欠損マウスでは出生後の成長も概ね正常であることから、これら 2 つの因子は互いの機能を代償的に補完していると考えられ、発生学や分子生物学の教科書をはじめとした多くの成書でも上記の筋分化カスケードが記載されている。

### (2) MyoD 欠損ラットの作出と予想外の早期致死

申請者は最近、ゲノム編集により MyoD 欠損ラットを作製したところ、正常に生まれてくるものの、マウスとは異なり、全てが離乳前に死亡することが判明した。興味深いことに、最近、ヒトで MyoD を欠損した例が報告され、その新生児はラットでみられたのと同様に、出生後に不動症 (akinesia) により死亡することが示されている (Watson et al., Deficiency of the myogenic factor MyoD causes a perinatally lethal fetal akinesia. J Mol Genet (2016))。

### (3) マウスで得られた筋分化カスケードの知見は普遍的か?

これらの知見は、従来、遺伝子改変技術の進んだマウスで得られてきた筋発生におけるマスター因子の機能や重要性が、必ずしも哺乳類全般に普遍的ではない可能性を示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、MyoD をはじめとする 4 つの筋分化マスター因子 (MyoD、Myf-5、Myogenin、MRF4) の欠損ラット、及びこれら 4 因子の発現を蛍光タンパク質で可視化することでモニターが可能なラットの作出を行い、これらの表現型解析を通じて、ラット筋発生における筋分化マスター因子の役割や機能について見直すとともに、将来は比較動物学的見地からの筋発生学や筋再生学の再構築へと繋がるような知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物

実験には全てウィスターイマミチラットを使用した。全てのラットは温度 23C で適切な湿度に維持された部屋 (12 時間点灯/12 時間消灯) で飼育し、水と餌は自由に摂取させた。遺伝子改変動物を用いる全ての動物実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」を遵守したうえで行った。また、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部遺伝子組換え生物等委員会により第二種使用等拡散防止措置 (区分 P1 および P1A) の機関承認と東京大学農学部実験動物委員会の承認を得た。

### (2) ゲノム編集による遺伝子改変ラットの作成

MyoD 欠損ラット、Myf-5 欠損ラット、MyoD-GFP ラット、Myf-5-mCherry ラットはいずれも CRISPR/Cas9 法を用いて作成した。MyoD 欠損ラットと Myf-5 欠損ラットの作成にあたっては gRNA による変異導入標的部位をエクソン 1 に設定した。MyoD-GFP ラットと Myf-5-mCherry ラットの作成にあたっては、MyoD、Myf-5 それぞれの終止コドン部位に GFP または mCherry をコードする塩基配列が挿入されるような一本鎖オリゴ DNA を設計し、Cas9 と gRNA とともに受精卵へ共注入した。得られた産子について、tail-genotype PCR により変異やノックイン配列挿入の有無を調べ、目的とする変異をもつラットを野生型ラットと交配し、F1 世代を作出した。以後、それぞれヘテロ個体同士を交配させることで欠損ラットやノックインラットを得て、解析に使用した。

## 4. 研究成果

### (1) MyoD 欠損ラット

最終的に 1 塩基挿入をもつ系統 (+1 bp 系統) と 344 塩基欠損をもつ系統 (-344 bp 系統) が確立された。いずれの系統でもホモ個体では MyoD タンパク質が欠損していることを Western blotting および免疫染色により確認した。以後の解析は主に -344 bp 系統を用いて行った。

離乳時 (生後 3 週間後) に genotype を行ったところ、ホモ個体が全くみられなかった。このことから妊娠中から離乳までの時期に MyoD 欠損胎子または新生子が失われている可能性が考

えられた。そこで出産直前の妊娠 21.5 日 (dpc 21.5) の時点で帝王切開を行って得られた胎子の genotype を調べたところ。野生型個体 : ヘテロ個体 : ホモ欠損個体の比はメンデルの法則に従っていた。帝王切開により得られた個体を 37C のホットプレート上に置き、刺激を与えながら観察したところ、ほぼ 1 時間以内に呼吸困難によりチアノーゼをおこして死亡する個体のみられた。これら死亡個体の genotype はすべてホモ欠損個体であった。これらの結果から、MyoD 欠損ラットは生後数時間以内にすべての個体が死亡することが明らかとなった。

Dpc 21.5 における MyoD 欠損ラットの体重は野生型ラットに比べて有意に低値を示した。この時、後肢筋 (前脛骨筋) および横隔膜の凍結切片を作成し、筋線維径を測定したところ、MyoD 欠損ラットで野生型ラットに比べて有意に低値を示した。一方、骨格標本を作成観察した限りでは骨格形成に顕著な異常はみられなかった。このことから MyoD 欠損ラットでは筋発生自体は正常におこるものの筋発達に異常があり、これが出生直後の呼吸困難の原因となっている可能性が示された。MyoD 欠損ラットにみられた呼吸不全の真の原因については現在もさらなる解析が進行中である。

興味深いことに dpc 21.5 の野生型ラットおよび MyoD 欠損ラット後肢筋由来の細胞を培養したところ、MyoD 欠損ラット由来の細胞では筋管形成がみられなかった。この時、bFGF 添加をすることにより MyoD 欠損ラット由来の細胞でも野生型ラット由来の細胞と同程度の筋管形成能を示した。現在、この観察結果の意義については検討を進めているところであるが、MyoD 欠損状況下でも FGF シグナルが存在することで MyoD 欠損を代償することがわかった。

## (2) Myf-5 欠損ラット

最終的に 17 塩基欠損をもつ系統が確立された。市販の Myf-5 抗体の中にラット Myf-5 を特異的に認識するものがないため、Myf-5 タンパク質が欠損していることの確認は間接的な方法により行った。野生型および Myf-5 欠損ラット骨格筋から抽出した RNA を逆転写反応に供し、それを鋳型に開始コドンから終止コドンまでを含む Myf-5 ORF 全長 cDNA を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を CMV-FLAG ベクターに挿入し、293 細胞にて過剰発現させた。293 細胞から調整した lysate を用いて FLAG 抗体による Western blotting を行った。その結果、野生型ラット骨格筋由来のサンプルでは FLAG-Myf-5 に相当する単一バンドが確認された一方、Myf-5 欠損ラット骨格筋由来のサンプルではバンドは検出されなかった。この結果から、Myf-5 欠損ラットが作出されたと判断した。

離乳時 (生後 3 週間後) に genotype を行ったところ、ホモ個体がほとんどみられなかった (現時点で野生型個体の 10% 程度)。このことから妊娠中から離乳までの時期にほとんどの Myf-5 欠損胎子または新生子が失われている可能性が考えられた。そこで出産直前の妊娠 21.5 日 (dpc 21.5) の時点で帝王切開を行って得られた胎子の genotype を調べたところ。野生型個体とホモ欠損個体の比はほぼ 1 : 1 であった。帝王切開により得られた個体を 37C のホットプレート上に置き、刺激を与えながら観察したところ、ほぼ 1 時間以内に呼吸困難によりチアノーゼをおこして死亡する個体のみられた。これら死亡個体の genotype はすべてホモ欠損個体であった。これらの結果から、Myf-5 欠損ラットは生後数時間以内にほとんどの個体が死亡することが明らかとなった。

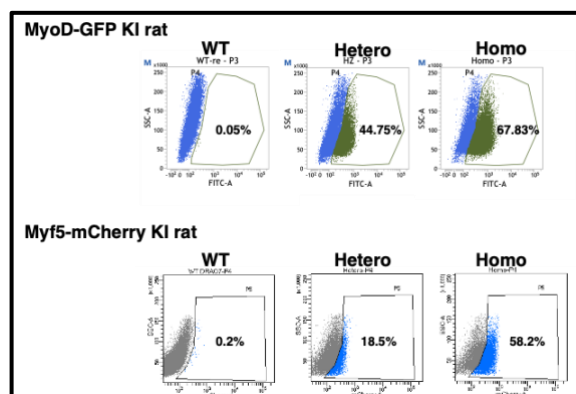
Myf-5 欠損ラットの骨格筋表現型や出生後の新生子の死亡原因については現在も解析が進行中である。

## (3) MyoD-GFP ノックインラット

予定通り、MyoD の終止コドン部位に GFP cDNA が挿入されたノックインラットが得られた。しかし、当初の期待に反して、少なくとも通常の蛍光顕微鏡下で GFP の蛍光を発する細胞を直接観察することはできなかった。そこで前脛骨切片もしくは骨格筋から単離した細胞を用いて MyoD および GFP に対する免疫染色を行ったところホモ個体ではそれぞれの陽性細胞はほぼ 100% 一致していた。また、再生筋、特に損傷後の再生初期では MyoD 陽性細胞が一過的に増加するが、GFP 陽性細胞の挙動も同様であった。さらに、骨格筋から採取した細胞を 2 日間培養後、GFP の蛍光を指標に FACS 解析したところ、図に示すように GFP 陽性細胞が分離できることが確認された。この結果から、MyoD-GFP ノックインラットが作出されたと判断した。

## (4) Myf-5-mCherry ノックインラット

予定通り、Myf-5 の終止コドン部位に mCherry cDNA が挿入されたノックインラットが得られた。しかし、当初の期待に反して、少なくとも通常の蛍光顕微鏡下で mCherry の蛍光を発する細胞を直接観察することはできなかった。市販の Myf-5 抗体の中にラット Myf-5 を特異的に認識するものがないこと、さらに市販の mCherry を認識



する抗体のほとんどは検出感度が極めて低いことから、免疫染色による Myf-5 や mCherry の検出は不首尾に終わった。そこで間接的な方法として、本ノックインラット骨格筋から抽出した RNA を逆転写反応に供し、それを鋳型に Myf-5 の開始コドンから mCherry の終止コドンまでを含む ORF 全長 cDNA を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を CMV-FLAG ベクターに挿入し、293 細胞にて過剰発現させた。その結果 293 細胞で mCherry の強い蛍光が観察された。同時に 293 細胞から調整した lysate を用いて FLAG 抗体による Western blotting を行ったところ、FLAG-Myf-5-mCherry 融合タンパク質に相当する単一バンドが確認された。また、骨格筋から採取した細胞を 2 日間培養後、mCherry の蛍光を指標に FACS 解析したところ、図に示すように mCherry 陽性細胞が分離できることが確認された。この結果から、Myf-5-mCherry ノックインラットが作出されたと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山内啓太郎、中村克行、竹内志帆、Linh-Chi DAM、池田優成、松脇貴志、西原真杉
2. 発表標題 MyoD欠損ラットは新生子致死を呈する (Unexpected perinatal death of MyoD-deficient rats)
3. 学会等名 第128回 日本畜産学会
4. 発表年 2021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	藤井 渉  (Fujii Wataru)  (40708161)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教    (12601)	

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