

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20500367

研究課題名(和文) ノックアウトマウスを用いた筋再生の分子機構の解明

課題名(英文) Functional analysis of muscle regeneration using gene-targeting and transgenic technologies

研究代表者

花岡 和則 (HANAOKA KAZUNORI)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：40189577

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィー等の難治性筋疾患の治療法を考える上で、筋再生の分子機構を理解する事は非常に重要であるにも関わらず、筋再生の分子メカニズムについては、不明な点が多く残されている。我々は、ホメオボックス型転写因子 Lbx1 および Notch 受容体の1つである Notch3 が、筋再生を担う幹細胞であるサテライト(筋衛星)細胞で発現していることを発見し、これらの遺伝子が筋再生に重要な機能をもつことを明らかにしてきた。本研究は、これらの遺伝子の作用機構と生理機能をノックアウトマウスを用いて明らかにしたものである。本研究の結果を基盤に新しい視点から筋再生・筋発生のメカニズムを解明し、幹細胞治療への応用の可能性を探ることが可能になった。

研究成果の概要(英文)：The results of present study demonstrate Notch3 as an important regulator for muscle repair. The data indicate Notch3 negatively regulate both proliferation and self-renewal of activated satellite cells after muscle injury. These results provide insight into the mechanisms of self-renewal and homeostatic regulation of satellite cells during muscle regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経筋肉生理学

キーワード：筋再生、サテライト細胞、Lbx1、Notch3、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

筋肉の幹細胞であるサテライト(筋衛星)細胞は通常は不活性な状態にあるが、筋傷害等がおこると、外部からシグナルを受

け、活性化すると考えられている。活性化されたサテライト細胞は、増殖、筋傷害部位への移動を経て、互いに融合し、新たな筋繊維を形成する。一部の細胞は分化への

経路を辿らず幹細胞に戻る。一方、発生過程では、胎児の体筋に由来する筋芽細胞が融合して筋組織を形成する。従来、胎児期の筋発生と成体での筋再生は同じ分子機構で進行すると考えられていた。しかし、Pax7 や MyoD のノックアウトマウスでは胎児期の筋発生は正常に進行するのに対し、生後の筋成長、筋再生には大きな異常が生じることから、筋発生と筋再生は異なる分子メカニズムで制御されていると考えられている。本研究は、今まで申請者らが行ってきたデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) についての研究を背景に、成体の筋肉における発現が報告されていなかった *Lbx1* および *Notch3* 遺伝子がサテライト細胞で発現し筋再生に重要な機能をもつことに気付いたことから、これらの遺伝子の機能を解明することにより、幹細胞治療へ応用することを着想したものである。

(1)Notch3 遺伝子 家族性脳血管性認知障害 (CADASIL) のモデルマウスとして作成された *Notch3* KO マウスにおいてごく僅かな筋肥大が認められたことを端緒に、筋組織特に筋再生における *Notch3* の機能に着目した。

(2)*Lbx1* 遺伝子 胎児期における四肢骨格筋の形成に重要な働きをすることが知られていたホメオボックス型転写因子である *Lbx1* 遺伝子が、活性化サテライト細胞で強く発現しており、サテライト細胞由来の細胞株である C2C12 細胞を用いた *Lbx1* の強制発現実験の結果から、*Lbx1* の発現により筋分化が阻害されること、および筋分化に伴い発現が低下する *Pax7* 遺伝子が分化誘導後も高いレベルでその発現が維持されてことが明らかになった(Watanabe S. et al, J.Cell Sci. 120, 4178-4187, 2007)。

*Lbx1* ノックアウトマウスは生後すぐ

に死亡するため詳細な解析にはコンディショナルノックアウトマウスの作成が不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の研究を基盤に、*Lbx1* および *Notch3* の機能をノックアウトマウスの解析により解明し、幹細胞治療への応用の可能性を探ることを目指すものである。

## 3. 研究の方法

### (1)ノックアウトマウスの作成

*Lbx1* コンディショナルターゲティングベクターおよび *Notch3* ターゲティングベクターを作成し、TT2-F ES細胞株に導入した。相同組み換えが生じたES細胞を8-細胞期マウス胚に導入しキメラマウスを作成し、通常の方法を用いてノックアウトマウスを作成した。

### (2) サテライト細胞の分離・培養

サテライト細胞の調製には以下の方法を用いた。10~15週齢のC57BL/6、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスから長指伸筋(EDL)を採取し、コラゲナーゼ処理によって筋繊維を分離し、マトリゲルコートしたディッシュ上で培養した。

### (3) 免疫組織化学

通常免疫組織学的手法を用いた。

使用した一次抗体：ウサギ抗*Lbx1*抗体(カン研究所小野雄一博士より拝受)、ヒツジ抗-*Notch3*抗体(R&D Systems Inc).ウサギ抗-laminin抗体(Chemicon)、マウス抗-M cadherin抗体(Abcam)、マウス抗-Pax7抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank)、マウス抗-myosin heavy chain (DSHB)、マウス抗-myogenin抗体(DSHB)、ウサギ抗-MyoD抗体(Santa Cruz)。

## 4. 研究成果

(1)サテライト細胞における*Notch3*遺伝子の機能解析

*Notch3* 遺伝子がサテライト細胞で強く発現していることをRT-PCR, Western blot, 免疫組織化学的解析により確認した。成体筋組織における*Notch3*の機能を探るために、*Notch3*ノックアウトマウスを作製しその表現系を詳しく調べた。その結果、筋崩壊が繰り返された場合に限り全身の筋肉で顕著な筋肥大(重量比で約1.3-1.5倍)を生じることを発見した(図1)。この結果から、*Notch3*が筋再生過程で抑制的に機能していることが強く示唆された。また、筋再生後のサテライト細胞の数を算定した結果、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に増加していることがわかった。このことは、*Notch3*がサテライト細胞の自己複製を抑制していることを強く示唆する。サテライト細胞における*Notch3*の作用点を明らかにするために以下の実験を行った。最初に、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスと対照マウスの骨格筋の組織切片上で静止状態のサテライト細胞 (Pax7陽性) の数を算定した。その結果、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウス骨格筋では、静止状態のサテライト細胞の数が有意に増加していることが判った。また、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスおよび対照マウス骨格筋よりサテライト細胞を分離し、培養条件下でその増殖能を比較した結果、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスサテライト細胞の増殖能が有意に亢進していることが判った。一方、骨格筋より単一の筋繊維を分離

し、浮遊培養すると、筋繊維に付着したサテライト細胞が筋繊維上で増殖し細胞塊を形成する。*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスでは、この細胞塊中のPax7陽性MyoD陰性のサテライト細胞の数が有意に増加していることが判った。以上の結果から、*Notch3*は、1)静止期のサテライト細胞の増殖、2)活性化期のサテライト細胞の細胞分裂および3)サテライト細胞の自己複製のいずれにおいても抑制的に作用し、その結果、*Notch3*<sup>-/-</sup>マウスでは筋再生後に筋肉の過形成が生じるということが明らかになった (Kitamoto, T&Hanaoka, K. Stem Cells, 2010)。

## (2)サテライト細胞における*Lbx1*遺伝子の機能解析のためのコンディショナルノックアウトマウスの作成

著者らによる以前の研究により、*Lbx1*がPax7を調節することにより幹細胞の維持に関与しているという興味深い可能性が示唆された(Watanabe S. et al, J. Cell Sci. 120, 4178-4187, 2007)。成体骨格筋における*Lbx1*の作用点や作用機序を解明するために、*Lbx1* floxed マウスを作成し、筋組織特異的及び Tamoxifen 投与によりコンディショナルに *Lbx1* をノックアウトする実験系を確立した(Watanabe.S et al, Genesis, in press, 図 2)。このマウスの解析により、筋

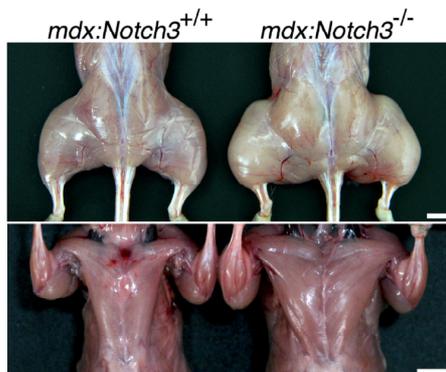


図1 *Notch3*の欠失による筋肥大

mdxマウスと同じ遺伝的背景での*Notch3*遺伝子の筋再生への影響を調べた。DMDモデルマウスであるmdxマウスでは、筋変性と筋再生が繰り返される。左、mdx:*Notch3*<sup>+/+</sup>マウス(対照) ; 右、mdx:*Notch3*<sup>-/-</sup>マウス

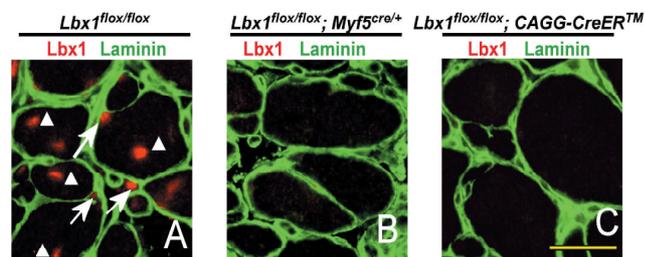


図2 マウス再生筋での*Lbx1* conditional knockout

成体マウス骨格筋の抗ラミニン抗体(緑)と抗*Lbx1*抗体(赤)を用いた二重免疫染色像(横断面)。対照マウス(A)のサテライト細胞(矢印)および再生筋の中心核(△)で見られる*Lbx1*のシグナルがB,Cでは完全に消失している。

A, *Lbx1* floxed マウス. B, 筋組織特異的ノックアウトマウス. C, コンディショナルノックアウトマウス(Tamoxifen投与後24時間)

再生過程において Lbx1 が重要な機能を果たしていることを示唆する結果が得られており、現在その解析を進めている。

本研究により、Lbx1 および Notch3 が筋再生過程におけるサテライト細胞の制御に重要な機能を有すること強く示唆された。

DMD 患者では、筋再生が筋崩壊に追いつかず、進行性に筋萎縮が生じる。従って、筋再生の分子メカニズムを解明することは、遺伝性筋疾患の治療法を考える上でも極めて重要であり、本研究を遂行することにより再生医療(幹細胞治療)の開発に貢献できると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Takatoh J, Kudo H, Kondo S, Hanaoka K: Involvement of Short Dystrophin Isoform Dp71 in Organization of Mouse Vomeronasal Nerve. *Exp. Neurol.* 213(1), 36-47, 2008

②S..Miura, K.Hanaoka, S.Togashi:

Skeletogenesis in *Xenopus tropicalis*:

Characteristic bone development in an anuran amphibian. *Bone*. 43,(5)901-909, 2008

③Y. Shibasaki, N. Etoh, M. Hayasaka, M. Takahashi, M. Kakitani, T. Yamashita, Tomizuka, K.Hanaoka Y. Targeted deletion of the tybe IIb Na<sup>+</sup>-dependent Pi-co-transporter, NaPi-IIb, results in early embryonic lethality *Biochem.Biophys.ResCommuni*, 381, 482-486, 2009

④Takatoh J & Hanaoka K Spatially and temporally regulated expression of specific heparan sulfate epitopes in the developing mouse olfactory system. *Dev Growth Diff*, 52, 169-80. 2010

⑤Kitamoto T & Hanaoka K. *Notch3* null mutation in mice causes muscle hyperplasia by

repetitive muscle regeneration. *Stem Cells* 28: 2205-2216, 2010

⑥Watanabe S, Matsushita S, Hayasaka M. and Hanaoka K. Generation of a conditional null allele of Lbx1. *Genesis*, In press

[学会発表] (計 6 件)

①北本 武郎, 花岡 和則 (2009) Notch3 regulates satellite cell proliferation in adult skeletal muscle. 第32回日本分子生物学会 横浜

②梅原芳恵, 坂本祐基, 花岡和則, 渡邊大介 (2009) Specific expressions of mouse de novo methyltransferases during stem cell differentiation.

第32回日本分子生物学会 (横浜)

③内山孝司, 渡邊大介, 早坂美智子, 花岡和則 (2009) Expression dynamics of the imprinted transgenes during mouse germ cell development 第32回日本分子生物学会 年会 (横浜)

④北本 武郎, 花岡 和則 Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration 第33回日本分子生物学会年会 (神戸) 2010

⑤塩崎、伏見、来栖、花岡、渡邊 機能的な inv 遺伝子に対する RNAi ノックダウンマウスの作成とその表現型解析 第33回日本分子生物学会年会 (神戸) 2010

⑥Watanabe S, Matsushita S, Hayasaka M & Hanaoka K Generation of mice with conditional null allele of Lbx1 gene 第33回日本分子生物学会年会 (神戸) 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：  
○取得状況（計0件）  
名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花岡 和則 (HANAOKAKAZUNORI)  
北里大学・理学部・教授  
研究者番号：40189577

### (2) 研究分担者

渡邊 大介 (Watanabe Daisuke)  
北里大学・理学部・講師  
研究者番号：02601750

北本 武郎 (KITAMOTO Takero)  
北里大学・理学部・助教  
研究者番号：20453516