

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03800

研究課題名（和文）細胞増殖制御に注目した筋損傷回復機構の解明-筋損傷治療のための基盤研究

研究課題名（英文）Mechanism of muscle injury recovery focusing on cell proliferation

研究代表者

猪瀬 弘之（Inose, Hiroyuki）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30615711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋傷害後の筋再生は、筋衛星細胞の増殖および分化によって制御されている。今回、我々は筋再生さらには筋肥大におけるCdk1の働きを解明するため、筋衛星細胞においてCdk1を特異的に欠損させ、その表現型を解析した。マウス前脛骨筋の筋再生の初期においてCdk1陽性であるPax7陽性細胞（筋衛星細胞）の増殖を認め、分化・再生が進むとCdk1の発現はほぼ消失していた。また、筋衛星細胞特異的Cdk1ノックアウトマウスにおいては正常の筋再生が障害されており、機能的な低下を認めた。また過負荷実験の結果、筋衛星細胞のCdk1の発現による増殖が正常な筋肥大において必須であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、筋衛星細胞の増殖と分化におけるCdk1の役割が明らかとなった。この知見は、将来的には筋障害や筋萎縮の治療法の開発に役立つ可能性がある。また、筋肥大における重要な因子としてCdk1の特定が行われ、新しい治療戦略やトレーニング方法の開発につながることを期待される。さらに、この研究は細胞周期制御の基本理解の進展にも寄与し、細胞増殖と分化のメカニズムの理解に対する貢献が期待される。これにより、癌や他の疾患の研究にも新たな示唆を与えることが可能である。以上より、本研究は筋再生および細胞周期制御に関する重要な知見を提供し、将来的な治療法や健康への応用に向けた基盤となる。

研究成果の概要（英文）：Muscle regeneration following skeletal muscle injury is regulated by the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. In this study, we specifically depleted Cdk1 in muscle satellite cells and examined their phenotypes to elucidate the role of Cdk1 in muscle regeneration and muscle hypertrophy. During the early stages of muscle regeneration in the mouse tibialis anterior muscle, Cdk1-positive Pax7-positive cells (muscle satellite cells) exhibited proliferation, while the expression of Cdk1 diminished as differentiation and regeneration progressed. Furthermore, muscle satellite cell-specific Cdk1 knockout mice displayed impaired muscle regeneration and a decline in function. Overload experiments demonstrated that Cdk1-induced proliferation of satellite cells is essential for normal muscle hypertrophy.

研究分野：整形外科

キーワード：筋代謝

1. 研究開始当初の背景

我が国の超高齢化に伴い、骨粗鬆症、変形性関節症といった運動器疾患に罹患する患者が昨今急増しており、これら運動器疾患の克服は喫緊の医療課題である。特に加齢に伴う骨格筋量の減少や筋機能の低下、すなわちサルコペニアは、高齢者における運動機能の低下、健康寿命の著しい短縮を招き、整形外科臨床的にも治療予後不良の因子である (Inose et al, Osteoporos Sarcopenia, 2018)。そのため、サルコペニアは超高齢社会の日本において、健康寿命の延伸を目指すうえで非常に重要な病態である。80 歳を超えると半数以上の割合でサルコペニアが存在するとする報告もある。筋肉の老化の過程においては、加齢により筋が衰弱していく 1 次性サルコペニアの過程と、筋が衰弱した結果として誘発される転倒などにより生じる筋障害からの回復の過程が存在する (Ikemoto-Uezumi et al, Stem Cells 2015)。そして、加齢に伴い筋再生能力が低下するため (Renault et al, Aging Cell 2002, Brack et al, Science 2007)、筋障害からの回復が障害され、さらに筋肉の老化が進行することになる。筋肉の老化を防ぐうえでは、これら二つの過程を治療する必要があるが、1 次性サルコペニアの原因は多岐に渡ることから、我々は筋障害からの回復の過程を促進することに注目した。骨格筋の再生は、主として筋衛星細胞が重要な役割を担っている。骨格筋を形成する多核細胞である筋繊維の細胞膜上に単核の筋衛星細胞が接着しており、これらは基底膜に包まれている。骨格筋が損傷を受けると筋衛星細胞は活性化され、増殖を開始する。筋芽細胞に分化し分裂・増殖を繰り返しながら、残存する筋繊維と融合して中心核をもつ筋管細胞を形成する。筋分化において Myf5、MyoD、Myogenin、Mrf4 などの転写因子が重要であるとされているが、筋衛星細胞の増殖メカニズムについての報告は少ない。さらに、過負荷による筋肥大が筋衛星細胞に依存しているかどうかについても議論が分かっている。

細胞増殖において重要な役割を果たしているタンパクとして、Cyclin、Cyclin-dependent kinase (Cdks) が存在する。Cyclin は Cdk と結合することで活性を持ち、細胞周期の移行を制御する。Cdk1 は最初に同定された Cdk ファミリーの遺伝子であり、細胞増殖においてエンジンの役割を果たしているが、その骨格筋再生における役割についての報告はない。ここで、今回我々は Cdk1 の骨格筋再生における働きを検討するため、骨格筋再生において必須である筋衛星細胞と Cdk1 との関連について解析した。また、さらに筋肥大と筋衛星細胞の増殖との関連についても検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は「細胞増殖の上流・下流シグナルの調節により、筋損傷の予後を改善しよう」という仮説を検証することである。これまでに MyoD、Myf5 といった転写因子が筋幹細胞・筋芽細胞の分化において必須であること、成長ホルモン、IGF-1 等が独立に筋肉量の増大に関与していることなどが報告されているなど、サイトカインやホルモン、あるいは転写因子による筋幹細胞・筋芽細胞に関する知見は次第に蓄積されつつある。しかしながら、今回我々が注目した細胞周期制御因子による筋代謝の調節機構については未だ不明な点が多い。

3. 研究の方法

In vitro モデルとして、骨格筋細胞分化に伴う Cdk1 の発現を時系列的に観察するため、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 (以下 C2C12 細胞) を分化培地で培養し、その RNA およびタンパク発現の経時的変化を qPCR 法および Western-blotting 法を用いて測定した。また、Cdk1 の筋芽細胞増殖に対する影響を検討するため、C2C12 細胞における Cdk1 の発現を CDK1 inhibitor である R03306 を投与し、細胞増殖能の変化および筋芽細胞分化マーカーの RNA およびタンパク発現の変化を qPCR 法と蛍光免疫細胞染色法を用いて解析した。

Cdk1 ノックアウトマウスは胎生致死に至るため、In Vivo モデルとして Pax7 をプロモーターとしたタモキシフェン誘導型 CreER システムを用いて筋衛星細胞特異的 Cdk1 ノックアウトマウス (以下 cK0 マウス) を作成し、その骨格筋における表現型について解析した。

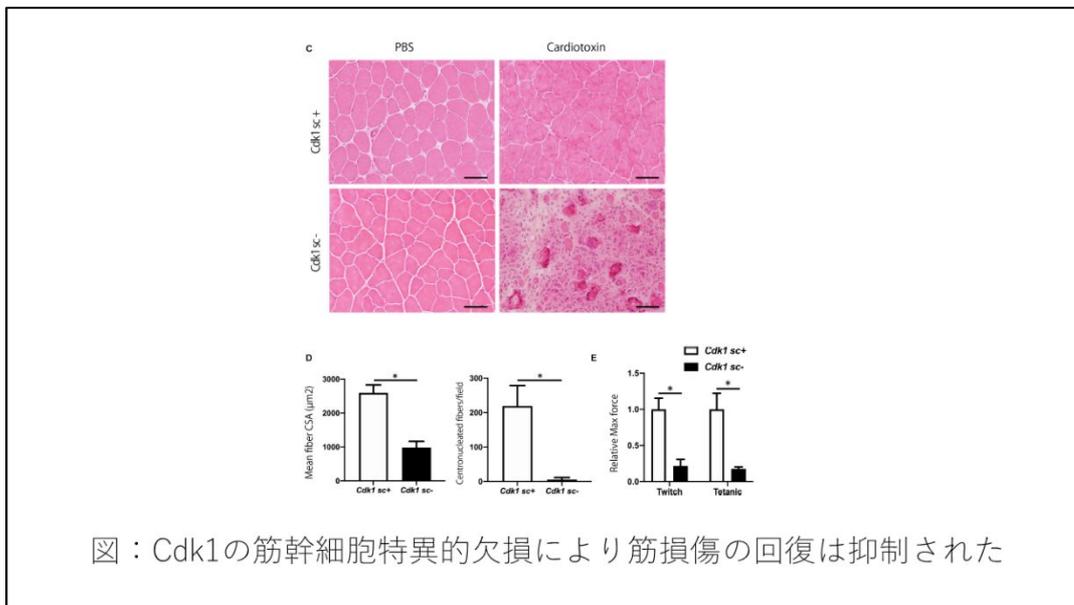
4. 研究成果

C2C12 細胞の分化誘導における細胞周期関連タンパクの発現を経時的に観察したところ、CDK1 タンパクは分化に伴い発現は低下した。また、RNA レベルにおいても、Cdk1 の発現は分化に伴って減少した。さらに蛍光細胞免疫染色でも、増殖から分化に転じると CDK1 の発現が著しく低下し、分化マーカーである MYOGENIN の発現が増加することが示された。

C2C12 細胞に Cdk1-inhibitor である R03306 を同時に投与することにより、その増殖は著しく阻害された。また一般的に増殖が抑制されると分化が促進されるが、qPCR の結果から R03306 を投与しても分化マーカーの発現に差はなく、蛍光細胞免疫染色での Fusion Index にも差はなかった。以上のことから CDK1 は筋芽細胞の増殖に重要であるが、分化への影響は少ないと考えられた。

In vivo モデルとして解析を行った cK0 マウス (生後 8 週でタモキシフェン投与、12 週で解

析)はコントロールマウスと比較し、定常状態では表現型の明らかな差は認めなかったが、カルディオトキシンによる前脛骨筋損傷後の筋再生が著しく阻害された(下図、引用文献より)。さらに Ex vivo モデルにおいて前脛骨筋損傷後の筋力を測定すると、cKO マウスで有意な低下を認めた。T A 損傷部の蛍光免疫組織染色を行ったところ、コントロールマウスでは CDK1 や Ki67 を発現する Pax7 陽性細胞の増加を認めた一方で、cKO マウスでは Pax7 陽性細胞の増殖はほとん



図：Cdk1の筋幹細胞特異的欠損により筋損傷の回復は抑制された

ど見られなかった。また TUNEL 染色においては両者で明らかな発現の差は認めなかった。以上より cKO マウスでの筋再生の障害は主に筋衛星細胞が増殖できないことによるものと考えられた。生後 12 週の時点でタモキシフェンを投与した cKO マウスを約 80 週で解析したところ、体重や平均筋横断面積(mean CSA)に明らかな差を認めなかったことから、老化における筋恒常性維持には CDK1 は必須ではないことが示唆された。

最後に筋肥大における CDK1 の重要性について検討した。前脛骨筋を近位部で切除して長趾伸筋に過負荷をかけるとコントロールマウスでは Pax7 陽性細胞数の増加と共に mean CSA の増加を認めたが、cKO マウスにおいては有意差を認めなかった。以上から筋肥大において CDK1 は必須であると考えられた。Cdk1 ノックアウトマウスは胚細胞の段階で細胞増殖を止めてしまい胎性致死となり出生しないことから、Cdk1 は細胞分裂において非常に重要な役割を果たしていることが知られている。但し、これまで細胞周期関連遺伝子を単独で筋組織においてノックアウトした報告はなく、本研究の結果により Cdk1 が正常な筋再生において必須であり筋肥大においても重要であることが判明した。

老化による筋衛星細胞の増殖能低下の要因の所在については議論が分かれており、近年では内因性因子としてサイトカインシグナル伝達に關与する Jak2/Stat3 シグナルの亢進や CDK 阻害因子である p16 INK4a の発現増加の關与が指摘されている。本研究の結果は筋衛星細胞の内因性因子の重要性を支持するものであった。

組織障害後の修復には細胞増殖が重要であるとされるが、肝臓では細胞増殖が出来ない状況下でも細胞肥大によって損傷部が代償されるという報告がある(Diril et al, PNAS 2012)。本実験により、筋幹細胞が存在するが増殖できない状況下では筋肥大などの代償機構は機能せず、筋損傷の回復には筋幹細胞の増殖が必須であることが分かった。

現段階では老化などによる筋再生能力の低下に対する有効な治療法は確立されていないが、今後筋組織において Cdk1 等の細胞周期制御因子が筋再生や筋肥大の低下に起因する疾患に対する治療標的となる可能性が考えられる。

以上より、Cdk1 は正常な筋再生や筋肥大において必須であり、サルコペニアなどに起因する筋再生能力の低下や筋萎縮に対する治療標的になりうる。

引用文献

Cyclin-Dependent Kinase 1 Is Essential for Muscle Regeneration and Overload Muscle Fiber Hypertrophy.

Kobayashi Y, Tanaka T, Mulati M, Ochi H, Sato S, Kaldis P, Yoshii T, Okawa A, Inose H. Front Cell Dev Biol. 2020 Oct 14;8:564581.

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka T, Takahashi A, Kobayashi Y, Saito M, Xiaolong S, Jingquan C, Ito Y, Kato T, Ochi H, Sato S, Yoshii T, Okawa A, Carlsson P, and Inose H	4. 巻 -
2. 論文標題 Foxf2 represses bone formation via Wnt2b/beta-catenin signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi Yutaka, Tanaka Tomoyuki, Mulati Mieradilli, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Kaldis Philipp, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Inose Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Cyclin-Dependent Kinase 1 Is Essential for Muscle Regeneration and Overload Muscle Fiber Hypertrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.564581	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 寛来、小林 裕、高橋 晃、斎藤 正徳、加藤 剛、佐藤 信吾、越智 広樹、佐藤 信吾、吉井 俊貴、大川 淳、猪瀬 弘之
2. 発表標題 Foxf2はWnt経路を介して骨芽細胞分化を調整する
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪瀬 弘之
2. 発表標題 骨格筋の再生において Cdk1 が必須である
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 裕、猪瀬 弘之、大川 淳
2. 発表標題 骨格筋の再生において Cdk1 が必須である
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
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
研究分担者	大川 淳 (Okawa Atsushi) (30251507)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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