

令和 4 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21757

研究課題名(和文)レジスタンストレーニングを模倣する筋幹細胞活性化分子の探索

研究課題名(英文)Identification of factor promoting MuSC expansion like a resistance training

研究代表者

深田 宗一郎(FUKADA, So-ichiro)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：20432445

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):本申請では,サテライト細胞の静止期シグナルであるカルシトニン受容体(CalcR)の欠損マウスで観察される非負荷筋内のMuSCが運動依存的に増殖するメカニズムは,CalcR-PKA-Yap1経路の破綻であることが明らかとなった。レジスタンストレーニング依存的に増加するThrombospondin-1は血液中で検出できないことから,別の因子による可能性が考えられた。逆に代表的なレジスタンストレーニング依存的因子であるIL-6は,レジスタンスモデルにおいてはそれほどMuSCの増殖に重要でない可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MuSCは骨格筋にかかる負荷の違いにより静止期と活動期を行き来する。その根底のメカニズムは,申請者が追究してきたCalcR-PKA-Yap1経路と運動依存的に血液中で増加する因子または,局所で発現するThrombospondin-1などの因子であることが明らかとなった。局所,全身性の因子を組み合わせることで効率よくMuSCを増殖させ,筋線維核を増加させることができれば,筋線維核の補充による新しい治療法につながることを提示できた。

研究成果の概要(英文):In this application, the mechanism of exercise-dependent proliferation of MuSCs in unloaded muscle observed in CalcR-mutant mice was found to be a disruption of the CalcR-PKA-Yap1 pathway. Thrombospondin-1, which increases in a resistance training-dependent manner, is not detectable in blood, suggesting that another factor may be responsible for the phenotypes of CalcR-mutant mice. Conversely, IL-6, a typical resistance training-dependent factor, may not be as important for MuSC proliferation in the resistance model.

研究分野:筋生物学

キーワード:カルシトニン受容体 静止期 自発運動 gp130 Thrombospondin-1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋サテライト細胞 (MuSC: Muscle Satellite Cell) は通常は、細胞周期 G0 期 (静止期) で維持されている。一方で、骨格筋への負荷が増大すると、MuSC は活性化・増殖後に筋線維へ新たな核を供給する事で筋肥大に働く。回転ケージを用いた足底屈筋ではヒラメ筋や足底筋では、MuSC の増殖がみられるが、背屈筋である前脛骨筋や長趾伸筋ではそのような MuSC の増殖は観察されない。しかし、筋サテライト細胞 (MuSC: Muscle Satellite Cell) の静止期維持シグナルの 1 つであるカルシトニン受容体 (CalcR: Calcitonin receptor) を MuSC 特異的に欠損させたマウスを回転ケージによる自発運動下で飼育すると、コントロールマウスでは何も変化がない長趾伸筋において、MuSC 数の増加を観察していた。しかし、CalcR 欠損 MuSC で、なぜ運動依存的に負荷のかからない筋で MuSC の増殖が起きるのかについては、その分子メカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

超高齢化社会において運動機能低下の予防・改善は喫緊の研究課題であり、その鍵を握るのが骨格筋である。加齢により骨格筋を構成する多核細胞 (筋線維) は萎縮し筋量・筋力低下につながる。骨格筋には筋サテライト細胞 (MuSC: Muscle Satellite Cell) と呼ばれる骨格筋固有の幹細胞が存在する。MuSC は筋線維がダメージを受けた場合の再生過程に必須であり、MuSC を傷害筋に移植することで新しい筋線維の生成に役立つ。一方で、筋傷害を伴わない萎縮筋への MuSC の利用に関してはその実例を示した報告はない。レジスタンストレーニング等の骨格筋への過負荷刺激により MuSC は活性化・増殖後に筋線維へ新たな核を供給する事で筋肥大に働く。一般的にレジスタンストレーニング時の MuSC の関与も「壊れた筋線維を修復するため」と考えられてきた。しかし、申請者らは「実質的な筋傷害 (筋線維の壊死) が存在しない筋肥大条件下でも MuSC は活性化・増殖し、核を供給すること」や「そのメカニズムは筋修復時とは異なること」を明らかにした (eLife 2019, selected in F1000Prime)。また MuSC の維持機構の一つ、カルシトニン受容体 (CalcR: Calcitonin receptor) の MuSC 特異的な欠損マウスを回転ケージによる自発運動下で飼育すると、コントロールマウスでは何も変化がない長趾伸筋において MuSC 数の増加を観察した。そこで、本申請課題では、「CalcR の下流シグナルと運動依存的な MuSC 非負荷筋での増殖の関係」と「運動依存的に CalcR 欠損 MuSC の増殖を誘導する因子の同定」を目的に研究を行なった。

### 3. 研究の方法

#### 実験計画①: CalcR・PKA 二重変異マウスの解析

MuSC 特異的な CalcR 欠損マウス (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox) と活性型 PKA 発現誘導マウスを交配し、MuSC 特異的な CalcR・PKA の二重変異マウスを作成した (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox::PKA-iTg)。同腹の CalcR 欠損マウスと比較することで、CalcR 欠損で見られる MuSC の数の増加や筋線維核への分化が PKA の発現によりレスキューできるかについて検討を行なった。

#### 実験計画 : CalcR・Yap1 二重欠損マウスの解析

MuSC 特異的な CalcR 欠損マウス (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox) と Yap1 のコンディショナル欠損マウスを交配し、MuSC 特異的な CalcR・Yap1 の二重欠損マウスを作成した (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox::Yap1flox/flox)。同腹の CalcR 欠損マウスと比較することで、CalcR 欠損で見られる MuSC の数の増加や筋線維核への分化が Yap1 欠損によりレスキューできるかについて検討を行なった。

#### 実験計画 : gp130 欠損マウスの解析

MuSC 特異的な gp130 欠損マウス (Pax7CreERT2::gp130flox/flox) を作成した (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox::Yap1flox/flox)。同腹のコントロールマウスと比較することで、レジスタンストレーニングモデルであるアキレス腱切除依存的な MuSC の筋線維核への分化を指標に、MuSC の増殖における IL-6 family 分子の重要性を検討した。

#### 実験計画 : CalcR・gp130 二重欠損マウスの解析

MuSC 特異的な CalcR 欠損マウス (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox) と gp130 のコンディショナル欠損マウスを交配し、MuSC 特異的な CalcR・gp130 の二重欠損マウスを作成した (Pax7CreERT2::Calcrflox/flox::gp130flox/flox)。同腹の CalcR 欠損マウスと比較することで、CalcR 欠損で見られる MuSC の数の増加や筋線維核への分化が gp130 欠損によりレスキューで

きるかについて検討を行なった

実験計画 : レジスタンストレーニング増加する因子が MuSC の増殖に与える影響  
基盤 B の成果より, レジスタンストレーニング時の MuSC の増殖には間葉系前駆細胞が必要であり, さらに Yap1/Taz 依存的に発現する Thrombospondin-1 が MuSC の増殖に関わっていることが予想された。そこで, Thrombospondin-1 欠損マウスとコントロールマウスから間葉系前駆細胞を単離・培養し, その培養上清を用いた MuSC の増殖に与える影響を直接評価した。さらに, 血液中で Thrombospondin-1 の発現増加が見られるかについての検討も行なった。

#### 4 . 研究成果

CalcR の下流で働く PKA や Yap1 との二重変異マウスにおいては, CalcR 欠損で見られる MuSC の数の増加や筋線維核への分化が抑制された。つまり, CalcR-PKA-Yap1 経路が働かないことで, 非負荷筋においても運動が MuSC の増殖を誘導できることがあきらかとなった。レジスタンストレーニングモデル増加する Thrombospondin-1 は血液中で検出できないことから, この運動依存的な CalcR-MuSC の増殖は, Thrombospondin-1 ではない別の因子によって起きることが推測された。そこで, 運動依存的に血液中に放出される代表的な因子である IL-6 や LIF に着目するために, 共通受容体である gp130 欠損マウスを用いた検討をおこなった。CalcR-gp130 二重欠損マウスで, CalcR 欠損の表現型は抑制される場合もあったが, 変化しない場合もあり結論を出すためには追加の実験が必要である。また, gp130 欠損マウスにレジスタンストレーニングモデルを施したところ, こちらも MuSC の増殖抑制傾向はみられたが, 顕著な抑制効果はみられなかった。IL-6 は MuSC の代表的な増殖因子として広く研究されているために, より慎重に検討をする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukada So-ichiro, Akimoto Takayuki, Sotiropoulos Athanassia	4. 巻 1867
2. 論文標題 Role of damage and management in muscle hypertrophy: Different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118742 ~ 118742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2020.118742	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 -

1. 著者名 Zhang Lidan, Kubota Manami, Nakamura Ayasa, Kaji Takayuki, Seno Shigeto, Uezumi Akiyoshi, Andersen Ditte Caroline, Jensen Charlotte Harken, Fukada So-ichiro	4. 巻 39
2. 論文標題 DK1 regulates quiescence in calcitonin receptor-mutant muscle stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 306 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3312	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 -

1. 著者名 Kaneshige Akihiro, Kaji Takayuki, Zhang Lidan, Saito Hayato, Nakamura Ayasa, Kurosawa Tamaki, Ikemoto-Uezumi Madoka, Tsujikawa Kazutake, Seno Shigeto, Hori Masatoshi, Saito Yasuyuki, Matozaki Takashi, Maehara Kazumitsu, Ohkawa Yasuyuki, Potente Michael, Watanabe Shuichi, Braun Thomas, Uezumi Akiyoshi, Fukada So-ichiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 265 ~ 280.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.11.003	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 Fukada So-ichiro, Ito Naoki	4. 巻 409
2. 論文標題 Regulation of muscle hypertrophy: Involvement of the Akt-independent pathway and satellite cells in muscle hypertrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112907 ~ 112907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112907	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukada So-ichiro, Nakamura Ayasa	4. 巻 36
2. 論文標題 Exercise/Resistance Training and Muscle Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 737 ~ 744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3803/EnM.2021.401	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 深田 宗一郎
2. 発表標題 運動負荷依存的に筋線維核が増加する機構
3. 学会等名 第94回日本薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田 宗一郎
2. 発表標題 Exercise and muscle stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 So-ichiro Fukada
2. 発表標題 Calcitonin receptor and muscle satellite cells
3. 学会等名 Berlin Muscle Club (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 So-ichiro Fukada
2. 発表標題 Resistance training and muscle stem cell
3. 学会等名 AOCE-SICEM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 So-ichiro Fukada
2. 発表標題 Molecular and Cellular regulation of MuSCs in loaded muscle
3. 学会等名 Muscle Science Talks (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 東元辰賢, 深田宗一朗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社, 細胞	5. 総ページ数 68
3. 書名 筋肉の老化のメカニズム「老化と筋サテライト細胞」	

1. 著者名 梶 貴志, 深田宗一朗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 135
3. 書名 実験医学2020年10月号「筋肥大時の筋サテライト細胞の動態・分化様式 多核細胞である筋線維がさらに核を増やす意義・機構」	

〔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
---------	---------