

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2012
 課題番号： 24657154
 研究課題名（和文） 筋分化において筋細胞とともに産生される筋形成支持細胞の同定とその役割
 研究課題名（英文） Identification of muscle support cells generated during muscle differentiation
 研究代表者
 瀬原 淳子（SEHARA ATSUKO）
 京都大学・再生医科学研究所・教授
 研究者番号： 60209038

研究成果の概要（和文）：筋芽細胞が分化し融合して筋管を形成する機構は未解明な点が多い。本研究では筋芽細胞C2C12が分化する際、筋管にはならないが筋形成に関与する細胞が生ずることを見いだした。その細胞で発現する遺伝子の中には筋ジストロフィーの原因遺伝子が含まれ、この遺伝子はゼブラフィッシュ胚においても骨格筋に隣接する細胞で発現し、筋形成に必要とされた。このような細胞が筋衛星細胞の分化に伴い生じてくるのかどうかを検討した。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms of myogenesis induced by myogenin have been elusive. We have succeeded to isolate myogenin-negative cells from differentiating myoblast C2C12 cells, and have found that those cells express sets of genes different from myogenin-positive cells by microarray. One of these genes is expressed in regions adjacent to muscle, and knockdown of this gene significantly affected myogenesis and enhanced apoptosis in zebrafish, supporting an idea that this gene and cells expressing this gene are involved in the maintenance or survival of muscle cells. Whether these cells are generated from muscle satellite cells was examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・発生生物学

キーワード： 筋形成、筋衛星細胞、幹細胞、細胞外基質、細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

骨格筋系列の細胞の運命決定・分化・筋形成には、いくつかの転写因子が必須であることが知られる。筋芽細胞を産生する筋前駆細胞で活性化されるPax7/Pax3、筋芽細胞への運命決定に必要なMyf5やMyoD、筋芽細胞から骨格筋への最終分化・筋管形成に必要なMyogeninがその代表的なものである。また、筋形成やその再生は、血管系や神経系など異種細胞集団との細胞間シグナリングにより制御されており、Wnt、FGF、EGFファミリーなどの細胞間シグナル分子により、筋前駆細胞や筋芽細胞の産生が制御されることが知られる

(Buckingham M. and Montarras D., Cur. Opin. Genet. Dev. 2008)。それに対して、このようにして生じた筋芽細胞が、myogenin依存的

に分化し、互いに融合して多核の筋管を形成するメカニズムには未解明なところが多く、筋形成が筋細胞に自立的なプロセスなのかどうか、現在のところ不明である。

2. 研究の目的

我々は、これまで様々な角度からの筋形成機構の研究を行い、その分子機構の解明に寄与してきた (Yagami-Hiromasa T. et al., Nature 1995; Sunadome K. et al., Dev. Cell 2010など)。そのひとつのアプローチとして、樹立筋芽細胞株C2C12細胞の分化によって生ずる、Myogeninを発現して筋管形成を担う細胞と、それを発現しない細胞における、発現遺伝子の網羅的な比較をおこなった (一部発表済みKurisaki T. et al.,

J. Muscle Res Cell Motil., 2011)。その結果、myogenin遺伝子が活性化されない細胞で特異的に発現する遺伝子群があり、その中に筋ジストロフィーの原因遺伝子が含まれること、さらにゼブラフィッシュを用いてその遺伝子が筋形成に関与することを見いだした。これらの結果は、筋形成には筋細胞自立的なプロセスに加えて非自立的 (non-cell-autonomous) なプロセスがあることを示唆する。成体筋組織から樹立され筋衛星細胞株と考えられてきたMyoD陽性のC2C12は、筋分化誘導時に不均一な細胞集団となることは以前から示唆され、一部は幹細胞様の性質をもつと考えられてきたが (Yoshida N. et al., J Cell Sci, 1998など)、このような筋形成をサポートする細胞の産生に関しては報告が無く、筋分化におけるこの細胞の産生を再生過程で実証することはきわめて重要であると考えた。

本研究は、C2C12細胞株を用いた上記発見に基づき、筋形成が、筋分化の過程で産生される支持細胞による筋細胞非自立的な制御を必要とすることを、マウスを用いた分子遺伝学的な手法を取り入れて証明する。さらに、それらの細胞で産生され筋形成に関与する分子群の同定を目指す。このような細胞集団の存在は未だ報告されておらず、筋形成とその再生機構、および関連疾患の発症機構解明への、ひとつの突破口となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス成体筋からのダブルラベル筋芽細胞の調製

まず、このような支持細胞の存在を個体レベルで明らかにするため、MyoD発現細胞でcre recombinaseを発現するマウスを作成した。このマウスとcre依存的に赤色蛍光 (TdTomato) を発現するマウス (ROSA-TdTomato) をかけ合わせ、骨格筋系譜の細胞を赤色蛍光でラベルできるマウス (MyoD-Cre;R26RRFP) を作成した (Sakai H. et al, PLoS ONE 2013)。MyoD-creERマウスを用いることにより、得られた支持細胞内でMyoDの発現が減退あるいは消失してもRFP発現は維持されるので、筋系譜由来であることが、より確実になる。このマウスから、セルソーターによりTdTomato陽性 (+)筋衛星細胞を採取した。一方、myogenin活性化細胞を核局在型緑色蛍光 (GFP) 発現細胞としてモニターできるマウス Tg(myogenin::GFP)マウス (Hiramuki Y. et al, 未発表)を作成し、これと上記マウスを掛け合わせ、得られたマウスから、セルソーターによりTdTomato陽性 (+)筋衛星細胞を採取した。

それらの細胞をディッシュ上で培養し、GFP, TdTomatoの経時的な発現、あるいは固定サンプルを用いてMyoD, myogeninの発現を調べ、またそれらの細胞の筋形成能を検討している。筋形成能がない細胞は、myogenin-GFPを発現しない細胞として産生されるはずである。

(2) 共培養による、筋支持細胞の筋形成促進能・筋維持能の証明

まず、C2C12細胞で、支持細胞が産生する筋ジストロフィー関連遺伝子の発現をsiRNAの導入によって抑制し、ゼブラフィッシュで盛られたと同

様に、この遺伝子が筋細胞の生存維持に関与するかどうかを調べた。同様のsiRNAを用いて、培養筋衛星細胞を処理し、同様の効果が見られるかどうか、control siRNA処理細胞と共培養することにより、筋形成支持能が回復するかどうかを検討する。

4. 研究成果

樹立筋芽細胞株C2C12細胞の分化によって生ずる、Myogeninを発現して筋管形成を担う細胞と、それを発現しない細胞における、発現遺伝子の網羅的な比較により (一部発表済みKurisaki T. et al., J. Muscle Res Cell Motil., 2011)筋芽細胞の分化に伴い、Myogeninを発現して筋管形成を担う細胞と発現しない細胞が生ずることがわかってきた (未発表)。この結果に基づき、後者の細胞の同定と役割の解明を目指した。両者の細胞内での発現遺伝子の網羅的な比較をおこない、myogenin遺伝子が活性化されない細胞で特異的に強く発現する遺伝子群を調べた。その中には筋ジストロフィーの原因遺伝子が含まれていた。ゼブラフィッシュ胚におけるこの遺伝子の発現をwhole mount in situ hybridizationにより調べたところ、これは骨格筋ではなくそれに隣接する細胞集団で強く発現することが確認できた。そこでこの遺伝子をアンチセンスモルフォリンによってノックダウンしたところ、筋形成は抑制され、さらにアポトーシスの亢進が見いだされた。一方、C2C12細胞においても、この遺伝子は筋芽細胞でも発現するが、筋分化を誘導すると発現が亢進する細胞と発現が低下する細胞があり、前者はmyogenin非発現細胞であった。さらに、C2C12細胞にsiRNAを導入し筋分化を誘導すると、細胞のアポトーシスが誘導された。これらのことから、個体においても培養細胞においても、この遺伝子が筋形成を行わない隣接する細胞において産生され、筋形成を行う細胞の生存維持に関与することが示唆された。この結果は、筋形成には筋細胞自立的なプロセスに加えて非自立的 (non-cell-autonomous) なプロセスがあることを示唆した。成体筋組織から樹立され筋衛星細胞株と考えられてきたMyoD陽性のC2C12が、分化に伴って異なる細胞を生ずることは以前から示唆され、一部は幹細胞様の性質をもつと考えられてきたが (Yoshida N. et al., J Cell Sci, 1998など)、このような筋形成をサポートする細胞の産生に関しては報告が無く、筋分化におけるこの細胞の産生を再生過程で実証することはきわめて重要であると考えた。

そこで、筋分化の過程で支持細胞が産生され、筋細胞非自立的な制御を行うことを証明するため、マウスを用いた分子遺伝学的な手法を取り入れた。具体的には、筋衛星細胞がMyoD遺伝子が発現した経歴をもつことを利用して、MyoD-Cre;R26RRFPマウスを作成した。このマウスでは、MyoDの発現経歴をもつ細胞がRFP (TdTomato) 陽性となる。これらの細胞集団を培養し、これを分化させた時に、上記のような性質を持つ細胞、すなわち、それ自体は筋形成を行わないが、筋形成を行う細胞の生存関与に関与する細胞が、産生されることを示そうとしている。そして、筋形成を行う細

胞を示す指標として、myogenin遺伝子のプロモーター下でGFPを発現するトランスジェニックマウス、Tg(myogenin::GFP)を作成した。まず、MyoD-Cre;R26RRFPマウスから、RFP(+)筋衛星細胞を採取した。それらを培養すると、興味深いことに、RFP(+)筋衛星細胞は最初の2日間は殆ど分裂しない。ところがそのあと、ほぼ同調的に数回分裂し、その後筋形成を行うことを確認した。また、単離したRFP(+)細胞の大部分は、myogenin陽性となることが確認された。現時点では、この細胞が筋衛星細胞由来なのか、骨格筋に隣接する間葉細胞由来なのか、結論は得られていない。もし、後者であるなら、それはRFP(-)細胞からRFP(+)細胞とともにRFP(-)細胞が産生されてくるはずで、このマウスを用いて、そのような可能性についても、検討していきたい。

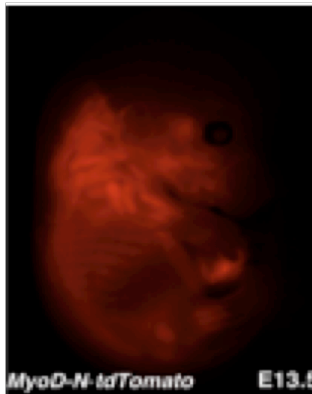


図 MyoD-creによって骨格筋系譜を可視化したマウス

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4件)

①Sakai, H., et al. Fetal Skeletal Muscle Progenitors Have Regenerative Capacity After Intramuscular Engraftment in Dystrophin Deficient Mice. PLoS ONE, in press

②Tanaka, A., et al. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. PLoS ONE, in press

③Suzuki, K., et al, Activity-dependent Proteolytic Cleavage of Neuroligin 1. Neuron, : 76(2): 410-22, 2012. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.10.003.

④Sakurai, H., et al. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. PLoS ONE, 7(10): e47048, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0047078.

[学会発表] (計14件)

①Atsuko Sehara : Exploring roles of ADAM proteases in development using zebrafish. 国際高等研究所研究プログラム「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」2012年度第1回研究会 (2013.2.23 京都)

②Atsuko Sehara-Fuissawa : Exploring Roles of ADAM Proteases in Development using Zebrafish. NUS/TLL/NIBB JOINT PRACTICAL WORKSHOP ON Genetics, Genomics & Imaging in Medaka and Zebrafish, (2012.7.26 Singapore, Singapore)

③瀬原淳子 : 生きたゼブラフィッシュを用いてADAMプロテアーゼの役割と機能に迫る、第12回日本抗加齢医学会総会 (2012.6.24 神奈川)

④瀬原淳子 : ヘビ毒出血因子のルーツを探る、平成24年度日本生化学会九州支部例会シンポジウム (2012.5.26 福岡)

⑤Atsuo Iida, Anna Tomosawa, Kazuya Sakaguchi, Sigenobu Yonemura, Atsuko Sehara-Fuissawa: The onset of primitive blood circulation regulates the timing of blood vessel. Joint Meeting of the British Societies for Cell Biology, Developmental Biology and the Japanese Society for Developmental Biology (2012.4.15 Coventry, UK)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○取得状況 (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

瀬原 淳子 (SEHARA ATSUKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：60209038

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：