

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790190

研究課題名(和文)骨格筋の発生・再生におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文)Analysis of autophagy in myogenesis and skeletal muscle regeneration

研究代表者

上野 仁之(Ueno, Hitoshi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30586251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の再生・形成におけるオートファジーの役割を解析した。再生の実験では、骨格筋の損傷後すぐにLC3などオートファジーに必要な蛋白質の発現量が増え、小さな小胞を形成した。再生後は損傷前と同じくらいに発現量は減少した。骨格筋形成時は筋芽細胞の時はほとんどオートファゴソームが見られなかったが、分化誘導後オートファゴソームが見られるようになり、筋管細胞を形成するときにはオートリソソームの形成が目立っていた。これらのことより骨格筋の再生・形成にオートファジーは重要な役割をしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the autophagy in the regeneration and the formation of the skeletal muscle. By the experiment of the regeneration, expression of LC3 increased after the damage of the skeletal muscle immediately and LC3 formed a small vesicle. Autophagosome was few in a myoblasts at the time of the skeletal muscle formation, but autophagosome was increased after differentiation, and autophagosome were become autolysosome when myoblasts differentiated into myotubes. These results suggested that the autophagy played an important role in the regeneration and the formation of the skeletal muscle.

研究分野：骨格筋の細胞生物学

キーワード：オートファジー 骨格筋形成 骨格筋再生

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の形成は、筋芽細胞が増殖、移動、融合し多核細胞である筋管細胞を形成することからはじまる。その後、骨格筋の成熟過程でミオシン、アクチンを主成分とする筋原線維を発達させ、収縮能を獲得する。そのため筋の成熟過程においては転写因子の制御とタンパク質分解により、細胞内のタンパク質構成が大きく変化する(図1)。このような細胞内のタンパク質構成の大きな変化には選択的かつ大規模なタンパク質の分解機構が関与していると予想できる。実際、受精直後や出生直後の大きな細胞内物質構成の変化が起こる場合や外部からの栄養の供給ができない時には、細胞の内部で材料を賄うために大規模なタンパク質と膜小器官の分解を行うオートファジーの機構が必須であることが知られている。

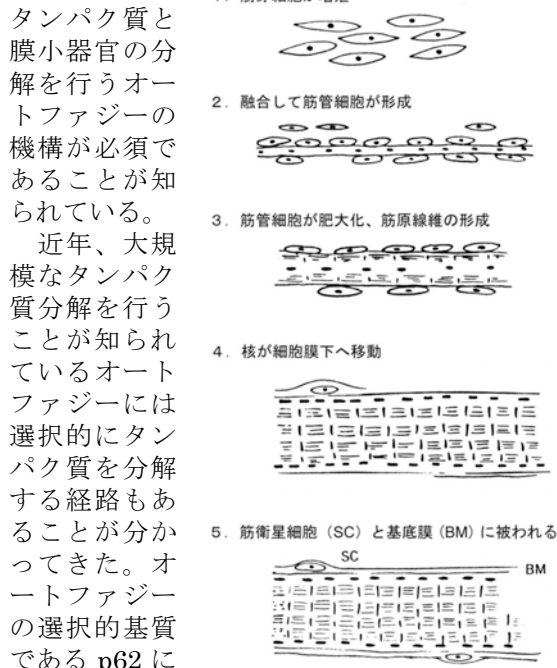


図1 筋発生の概念図 (新筋肉病学 南光堂 1995 より改変)

近年、大規模なタンパク質分解を行うことが知られているオートファジーには選択的にタンパク質を分解する経路もあることが分かってきた。オートファジーの選択的基質である p62 にはユビキチンを認識・結合

し凝集体を形成する機能がある。オートファゴソームはこの凝集体を認識することにより効率よく、必要がなくなりユビキチン化されたタンパク質だけを選択的に取り込むことができる。骨格筋特異的にオートファジーの形成を阻害したマウスではユビキチン化タンパク質と p62 が凝集体を作り、筋が萎縮することが分かっている。しかしその分子メカニズムと標的分子は未だ解明されていない。一方、飢餓時にも骨格筋は萎縮する。これはオートファジーが活性化され筋原線維を分解することによるものなので、オートファジーの阻害による筋萎縮とは違う分子メカニズムで起こっていることが考えられる。

MuRF(Muscle RING-Finger Protein)と呼ばれるリング・フィンガー・タンパク質群は筋に特異的に発現している。このタンパク質は標的となるタンパク質にユビキチンを付加する事で分解を促している。特に MuRF2、MuRF3 は筋形成時に発現量を変

える。実際、MuRF2、MuRF3 のノックアウトマウスでは筋の形成の遅れや成熟の阻害が起こる。さらに MuRF は p62 に結合することからオートファジーによる分解にも大きく関わっていることが推測されるが詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

研究目的は、骨格筋の発生及び再生におけるオートファジーの役割を解析することによって、骨格筋の形成及び維持の仕組みを解明することである。一般に初期発生や細胞の分化過程においてオートファジーが重要な役割を果たしていることが知られているが、骨格筋の形成過程におけるその役割は未だ明らかにされていない。本研究では骨格筋形成過程におけるオートファジーの活性化時期と細胞内局在を明確にする。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋形成の実験には主に筋芽細胞株 C2C12 を用いた。C2C12 は通常の培地から分化専用の培地に置換することにより筋芽細胞から筋管細胞への分化が誘導できる。おおよそ3日目まではアポトーシスをしながら少しずつ細胞が増殖し4日目あたりから融合し多核の細胞へ分化をし、6-8日目まで融合を続けて長大な筋管細胞に成熟していく。この性質を利用してウエスタンブロッティング、蛍光抗体や蛍光タンパクを付加した LC3 を用いてオートファジーの変化を観察した。

(2) 骨格筋再生の実験にはマウスの前脛骨筋(TA)を用いた。カルジオトキシン (CTX) は骨格筋の細胞膜を破壊することが知られている。これを前脛骨筋に注入し骨格筋荷損傷をあたえ、その再生過程における LC3 及び p53 の局在を蛍光抗体法を用いて 1-4 週目で観察した。

4. 研究成果

(1) まず出生後の筋細胞内のオートファジーの働きを見るため、出生後 3, 5, 10 日におけるオートファジーのマーカール C3 及びオートファジーの基質 p62 の発現と局在をウエスタンブロット及び蛍光抗体で観測した。ウエスタンブロッティングにより出生後の LC3 の発現量は緩やかに減少することが分かつ

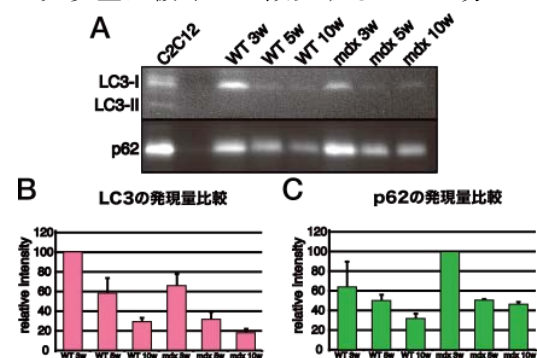


図2 LC3及びp62の発現量の変化

た。また定常状態では LC3 の活性型のバンドはいずれの時期もほとんどオートファジーが働いていなかった (図 2)。細胞内の局在もあまり目立ったシグナルは得られなかった。このことにより出生後の筋形成が落ち着いた後の定常状態の筋細胞内ではほとんどオートファジーが働いていないことが分かった (図 3)。

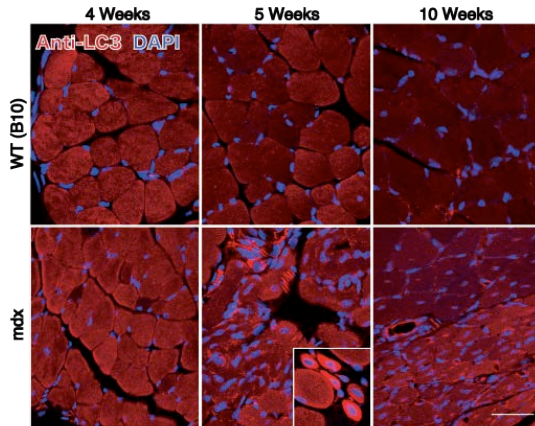


図 3 LC3 及び p62 の骨格筋細胞内の局在変化
 (2)次に骨格筋損傷時にオートファジーが活性化しているかどうか CTX を用い検証した。CTX を前脛骨筋に注入して 1-4 週目の修復過程におけるオートファジーの動態を抗 LC3 及び p63 を用いて観察した。まず、注入前の筋では特に LC3 の集積、p63 の発現増加などはほとんど観察されなかった。次に CTX 注入後の再生初期に当たる 1-2 週目において損傷を受け再生途中の中心核になっている骨格筋に LC3 が細胞質全体に強く染色され、さらに核の周りにきわめて強いドット状のシグナルを観察することが出来た。また、p63 に関しては中心核になっている骨格筋がすべて強く染色される訳ではなく、中心核になっている骨格筋の中のごく一部だけが強く染色されることが分かった。また、再生後期に当たる 3-4 週目においては LC3 と p63 の動態は CTX 注入前と特に変化は見られなかった。このことにより骨格筋の損傷によりオートファジーが活性化され、再生初期において骨格筋修復に必要な事が示唆された (図 4)。

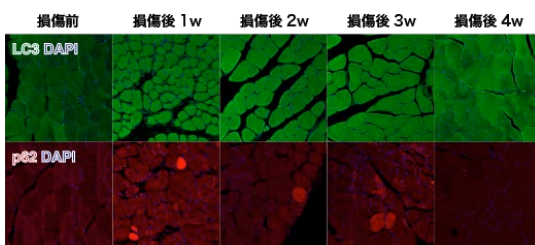


図 4 前脛骨筋の損傷後のオートファジーの変化
 (3)筋分化時のオートファジーの働きを観察するためにマウス筋芽細胞株 C2C12 を用い、筋線維の形成途中の LC3 及び p62 の発現量と局在をウエスタンブロッティングと蛍光抗体方で観察した。ウエスタンブロッティングにより分化前に比べ分化誘導後は LC3 の発現量は増え p62 は減ることが分かった。筋分化

の指標になるデスミンは分化誘導後徐々に増えたものの、LC3 活性型及び不活性型の誘導後の発現量は特に変化は見られなかった (図 5)。

蛍光抗体法により分化誘導後すべての培養細胞でオートファジーが活性化されているわけではないことが分かった。特に多角化した物や長細く伸びた細胞の両極の端に LC3 は局在していた。このことにより筋芽細胞の融合時または筋管細胞の形態形成などにオートファジーが重要な働きをしているのではないかと考えることが考えられた (図 6)。

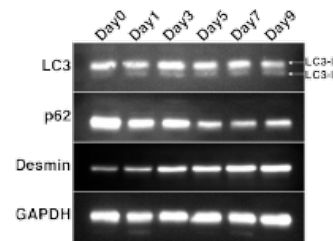


図 5 C2C12 分化過程におけるオートファジー関連分子の発現変化

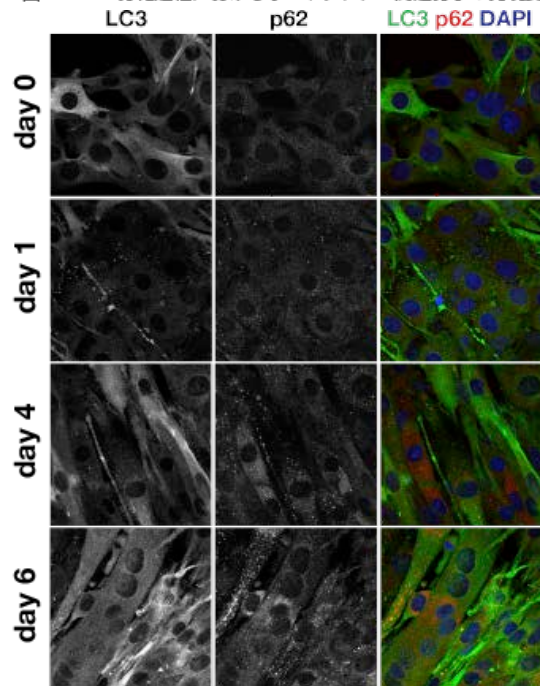


図 6 C2C12 分化過程におけるオートファジー関連分子の局在変化
 (4)そこでさらに詳しく調べるために筋芽細胞株 C2C12 を用いてオートファジーの阻害剤である 3-メチルアデニン (3-MA) を添加して筋管細胞への分化の影響を調べた。まず 1-3 日目まで 3-MA を添加したもの 4-6 日まで 3MA を添加したもの、何も添加しないもので比較した。3-MA を添加したものではいずれも筋管細胞への分化が阻害されていた。さらに詳しく調べるために、分化 1-5 日それぞれで 3-MA を加えてそれぞれ分化の違いを比較した。1-5 日目いずれの時に 3-MA を添加したときでも分化が阻害されることが分かった (図 7)。このことによりオートファジーは筋芽細胞から筋管細胞への分化いずれの段階においても重要な役割をしていることが示唆された。

(5)次にオートファジーの促進剤でもあるラ

パマイシンを添加したもの、何も添加しないものを用い筋管細胞への分化の影響を調べた。まず1-3日目までラパマイシンを添加したもの4-6日までラパマイシンを添加したもの、何も添加しないもので比較した。ラパマイシンを添加したものではいずれも筋管細胞への分化が阻害されていた。さらに詳しく調べるために、分化1-5日それぞれでラパマイシンを加えてそれぞれ分化の違いを比較した。1-5日目いずれの時にラパマイシンを添加したときでも分化が阻害されることが分かった(図7)。これらの実験によりオートファジーを妨害しても促進しても筋芽細胞から筋管細胞に分化がうまく出来ないことから、骨格筋の分化過程においてオートファジーは厳密に制御されている可能性が示唆された。

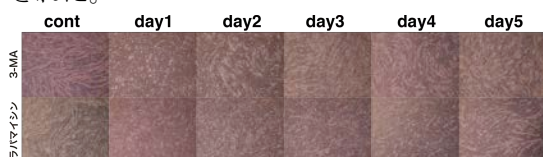


図7 オートファジー促進剤及び阻害剤による骨格筋分化の影響

(6) さらに筋分化過程におけるオートファジーの活性を見るために筋線維芽細胞株C2C12を用い、GFP及びRFPのついたLC3を遺伝子導入した。RFPはライソゾームなどpHの低い場所では蛍光を発さないことからオートファゴソームがライソソームと融合しているかを調べることが出来る。分化前の観察では特にオートファゴソームのような小胞状のLC3は観察されず細胞質全体にGFP-RFP-LC3が存在していた。分化開始1-3日ではLC3は核近傍に小胞状にオートファゴソームとして集まって存在していた。分化開始5-7日では筋管細胞も筋管細胞になっていない細胞もLC3の多くがオートリソソームに存在しており、少しオートファゴソームも観察できた(図8)。いずれも核近傍に集まっていた。

このことにより分化初期からオートファジーは活性化しているようだが、蛋白質分解は筋管細胞になってからのの方が活性化していることが示唆された。



図8 C2C12分化過程におけるLC3の局在変化

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5件)

- ① Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: Organization of organelles and VAMP-associated vesicular transport systems in differentiating skeletal muscle cells. *Anatomical*

Science International, 査読有 90(1), 2015, 33-9.

DOI: 10.1007/s12565-014-0266-6.

- ② Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, Arifin Soenggono, & Hiroshi Yorifuji: Filamentous structures in skeletal muscle: anchors for the subsarcolemmal space. *Medical Molecular Morphology*, 査読有 e-published 2014.

DOI 10.1007/s00795-014-0070-3

- ③ Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Astrid Feinisa Khairani, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: Vesicular transport system in myotubes: ultrastructural study and signposting with vesicle-associated membrane proteins. *Histochemistry and Cell Biology*, 査読有, 141, 2014, 441-454.

DOI 10.1007/s00418-013-1164-z

- ④ Tohru Murakami, Yuki Tajika, Hitoshi Ueno, Sachiko Awata, Satoshi Hirasawa, Maki Sugimoto, Yoshihiko Kominato, Yoshito Tsushima, Keigo Endo, & Hiroshi Yorifuji: An Integrated Teaching Method of Gross Anatomy and Computed Tomography Radiology, *Anatomical Sciences Education*, 査読, e-published 2013.

DOI 10.1002/ase.1430

- ⑤ Maiko Takahashi, Yuki Tajika, Astrid Feinisa Khairani, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami & Hiroshi Yorifuji: The localization of VAMP5 in skeletal and cardiac muscle. *Histochemistry and Cell Biology*, 査読有, 139, 2013, 573-582.

DOI 10.1007/s00418-012-1050-0

[学会発表] (計15件)

- ① 上野 仁之、佐藤 真人、高橋 麻衣子、多鹿 友喜、村上 徹、依藤 宏: タイプIV 中間径フィラメント synemin の分子遺伝学的解析. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会. 2015年3月21日~23日. 兵庫県神戸市.
- ② 高橋 麻衣子、多鹿 友喜、上野 仁之、村上 徹、依藤 宏: 腎臓におけるVAMP5の発現と分布. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会. 2015年3月21日~23日. 兵庫県神戸市.
- ③ 多鹿 友喜、村上 徹、高橋 麻衣子、上野 仁之、依藤 宏: ゼブラフィッシュ成魚の3Dアトラス作成. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会. 2015年3月21日~23日.

- 兵庫県神戸市
- ④ 村上 徹、多鹿 友喜、上野 仁之、依藤 宏：3D 解剖映像配信システムによる解剖学実習支援. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会. 2015 年 3 月 21 日～23 日. 兵庫県神戸市.
 - ⑤ 上野 仁之、佐藤 真人、高橋 麻衣子、Astrid F. Khairani、多鹿 友喜、村上 徹、依藤 宏：骨格筋における中間径フィラメント synemin の役割. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 27 日～29 日、栃木県下野市.
 - ⑥ 多鹿 友喜、高橋 麻衣子、Astrid F. Khairani、上野 仁之、村上 徹、依藤 宏：筋管細胞に発現する VAMP 分布と発達過程 T 管との比較. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 27 日～29 日、栃木県下野市.
 - ⑦ 村上 徹、多鹿 友喜、上野 仁之、依藤 宏、Deanna Clause 小材：Anatomy in Clay® - 塑像による解剖学英语教育. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 27 日～29 日、栃木県下野市.
 - ⑧ 依藤 宏、村上 徹、多鹿 友喜、上野 仁之、鹿田 光明、森村 吉博：群馬大学における画像教育の基礎との統合による解剖実習. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 27 日～29 日、栃木県下野市.
 - ⑨ 栗田 さち子、依藤 宏、村上 徹、多鹿 友喜、上野 仁之、小湊 慶彦、平澤 聡、小林 進、島田 健裕、徳江 浩、対馬 義人：群馬大学における CT を用いた解剖学教育体制と放射線科診断医としての取り組み. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 27 日～29 日、栃木県下野市.
 - ⑩ Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: The morphological study of transverse anchoring system between myofibril and sarcolemma. The 2013 Annual Meeting of American Society for Cell Biology. 2013 年 12 月 14 日～18 日. New Orleans, Indiana, USA.
 - ⑪ Maiko Takahashi, Yuki Tajika, Astrid Feinisa Khairani, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: The localization of VAMP5 in skeletal and cardiac muscle. The 2013 Annual Meeting of American Society for Cell Biology. 2013 年 12 月 14 日～18 日. New Orleans, Indiana, USA.
 - ⑫ 上野 仁之、佐藤 真人、高橋 麻衣子、Astrid F. Khairani、多鹿 友喜、村上 徹、依藤 宏：中間径フィラメント synemin の分子遺伝学的解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013 年 03

月 28 日～30 日. 高松

- ⑬ Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami & Hiroshi Yorifuji: The morphological study of cytoskeletal organization of skeletal muscle. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013 年 03 月 28 日～30 日. 高松.
- ⑭ 多鹿 友喜、高橋 麻衣子、Astrid F Khairani、上野 仁之、村上 徹、依藤 宏：骨格筋形成過程における細胞内膜系の電子顕微鏡観察. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013 年 03 月 28 日～30 日. 高松.
- ⑮ 高橋 麻衣子、多鹿 友喜、Astrid F Khairani、上野 仁之、村上 徹、依藤 宏：心筋における VAMP アイソフォームの発現と分布. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013 年 03 月 28 日～30 日. 高松.

〔その他〕

ホームページ

群馬大学大学院医学系研究科機能形態学ホームページ

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/bioreg-function/125.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 仁之 (UENO, Hitoshi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30586251

(2) 研究協力者

森村 吉博 (MORIMURA, Yoshihiro)

松田 春子 (MATSUDA, Haruko)

春原 幸子 (SUNOHARA, Yukiko)