

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460250

研究課題名(和文) Six遺伝子群による骨格筋再生と発生の制御

研究課題名(英文) Regulation of regeneration and development of skeletal muscle by Six family genes

研究代表者

川上 潔 (Kawakami, Kiyoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10161283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は私たちの体をささえ、動くために必須の器官です。筋ジストロフィーなど筋力が低下する筋疾患は私たちの命や生活の質をおびやかします。本研究では、骨格筋の発生を担う転写調節因子群をコードするSix遺伝子が、骨格筋再生に重要な役割を果たすことが明らかにされました。筋ジストロフィーのモデルマウスであるmdxマウスのSix4とSix5遺伝子の機能を低下させると、筋ジスの全身症状が改善し、筋繊維の断面積が大きくなり、さらに運動負荷による筋力低下がなくなりました。mdxマウスの寿命も30%ほど長くなりました。このことはSix4とSix5遺伝子が筋ジストロフィー治療の新たな標的になることを示しています。

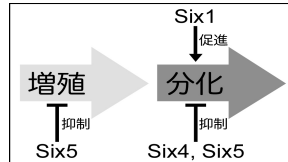
研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle is the essential organ that supports our posture and locomotion. Muscle disease such as muscular dystrophy threatens our existence and quality of life. In this study, we revealed that the Six family genes encoding for transcription factors which are responsible for the development of skeletal muscle, are involved in the regeneration of skeletal muscle. When we lowered the gene dosages of Six4 and Six5 in mdx mice, which is a model mouse of Duchenne Muscular Dystrophy, the index of systemic symptoms of the mice were improved, myofibers became thick, and the mice was resistant to the muscle weakness induced by treadmill exercise. The mean-age at death was prolonged around 30%. These results indicate that Six4 and Six5 are possible candidates for therapeutic targets of muscle dystrophy.

研究分野：病態生化学

キーワード：筋ジストロフィー 筋再生 筋衛星細胞 Six遺伝子 mdxマウス 筋力低下 寿命

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋は外傷や反復運動または病気による傷害を受けると再生される。骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞には、*Pax7*に加えて *Six1*, *Six4*, *Six5* の3種類の *Six* ファミリー遺伝子が発現する。*Six1* と *Six4* は骨格筋の発生に必須であり、速筋と遅筋への分化も司る。*Six5* は骨格筋発生に関する特異的な機能は見つかっていない。私たちは、単離した筋衛星細胞に *Six* 遺伝子を過剰発現及びノックダウンをすることにより、*Six1*, *Six4* および *Six5* が筋衛星細胞の増殖と分化を制御している事を初めて明らかにした(文献1)(図1)。特に、*Six5* は筋衛星細胞の増殖を強く抑制しており、再生医療の実現のためにはその作用を是非解明する必要がある。



(2) *mdx* マウスは筋の変性と継続的な筋再生が同時に起きており、筋再生の効率を評価するには極めて好都合な筋ジストロフィーのモデルマウスである。*mdx* マウスと *Six4/Six5* の二重欠損マウスを交配し、筋再生にどのような影響があるのかを解析することが、有力な方法であると考えられた。

(3) *Six1* と *Six4* とは対照的に、*Six5* の骨格筋発生における機能は不明であった。私たちは *Six4/Six5* の二重欠損マウスの胚発生において肝臓ヘルニアを観察した。これは腹壁筋の異常に由来すると考えられる。

2. 研究の目的

(1) *Six1*, *Six4* および *Six5* が個体レベルでの筋再生の制御に関わるかどうかを検証するために、*mdx* マウスに *Six4* および *Six5* の変異を導入し、骨格筋の属性を比較する。

(2) *Six4/Six5* の二重欠損マウスにおいて腹壁筋の異常に至る機序を解析し、*Six5* の骨格筋発生における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *mdx* マウスの筋再生の様相や効率、及び筋衛星細胞の増殖や分化が、*Six4/Six5* 二重変異によってどう変化するかを検証する。具体的には、骨格筋の組織切片を作成し、筋繊維の数、筋繊維の断面積、中心核の割合等の筋再生の指標となる属性を *mdx* マウスおよび *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスとで比較する。

(2) 筋ジストロフィーの全身症状の改善が

見られるかどうかを検証するために、血清中のクレアチンキナーゼや乳酸脱水素酵素のレベルを *mdx* マウスおよび *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスとで比較する。

(3) 筋再生の効率の変化の有無を検証するために、運動負荷後の筋力低下の様相を *mdx* マウスおよび *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスとで比較する。

(4) *Six5* の骨格筋発生における役割を、明らかにするために、*Six1^{-/-}/Six5^{-/-}* および *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}* 二重変異マウスの胚発生における筋発生異常の有無を調べることで明確にする。骨格筋の異常の観察された部位で、異常の開始時期を特定し、筋分化のキーとなる遺伝子群の発現を精査することで、*Six5* の骨格筋発生における機能を推論する。

4. 研究成果

(1) 筋ジストロフィーの全身症状の指標である血清中のクレアチンキナーゼおよび乳酸脱水素酵素のレベルは、生後50週において *mdx* マウスに比べて *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスは有意に低く、筋ジストロフィーの症状が改善していることが示された。

(2) 前脛骨筋の筋繊維数、中心核の数に変化はなかったが、生後50週において筋断面積が *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスでは、*mdx* マウスに比べて有意に大きく、筋の成長または筋管細胞の融合効率の上昇が示唆された。

(3) 筋芽細胞の数を比較するために、MyoD および Myogenin 陽性細胞の数を生後50週と比較したところ、*mdx* マウスと *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスとの間に有意差はなかった。これに対し12週では、*Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスの陽性細胞数は有意に増加していた。この結果から、*Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* では、筋再生の効率が上昇していることが考えられた。

(4) 生後12週においては、前脛骨筋の筋繊維数、断面積および中心核の数に変化はなかった。

(5) 運動負荷後、握力を測定すると、*mdx* マウスにおいては、1日後、2日後に有意な筋力低下がみられた。同様の測定を *Six4^{-/-}/Six5^{-/-}mdx* マウスで行うと、筋力低下がほとんど見られず、筋再生が効率的に行われていることが示唆された。(図2)

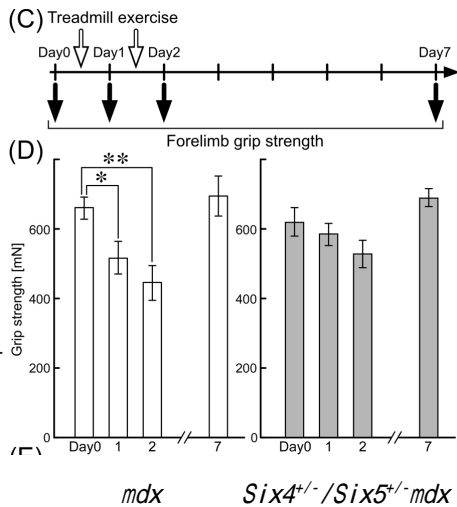


図 2

(6) *mdx* マウスと *Six4^{+/-}/Six5^{+/-}mdx* マウスとの生存曲線を比較したところ、*Six4^{+/-}/Six5^{+/-}mdx* マウスでは、有意に寿命の伸長が見られた。この結果は、筋ジストロフィーの症状の改善が、寿命にも影響を与えると考えられ、興味深い結果である。(図 3)

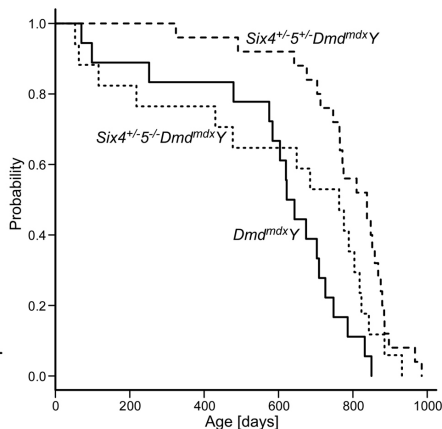


図 3

(7) *Six4^{+/-}/Six5^{+/-}* 二重欠損マウスの腹壁筋の発生を精査したところ、筋分化マーカーの発現や筋管細胞の分布は野生型とほとんど差がなく、正常に発生していることが示唆された。

引用文献

1 Yajima et al. *Six* family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp. Cell Res.* 316, 2932-2944. 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Yamamura, K., Ogino, H., Ueno, N., Kawakami, K. (2014) *Six1* is a key

regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC Biology*, 12:40

Sato, S., Yajima, H., Furuta, Y, Ikeda, K and Kawakami, K. (2015) Activation of *Six1* expression in vertebrate sensory neurons. *PLoS One*, 10, e0136666.

Yajima, H. and Kawakami, K. (2016) Low *Six4* and *Six5* gene dosage improves dystrophic phenotype and prolongs life span of *mdx* mice. *Dev. Growth Differ.* doi: 10.1111/dgd.12290.

Kawasaki, T., Takahashi, M., Yajima, H. Mori, Y. and Kawakami, K. (2016) *Six1* is required for mouse dental follicle cell and human periodontal ligament-derived adult stem cell proliferation. *Dev. Growth Differ.* doi: 10.1111/dgd.12291.

〔学会発表〕(計 2 件)

Takahashi, M., Kawakami, K. : *Six4* and *Six5* are required for ventral body wall closure and morphogenesis of the primary body wall. 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba, June 2-5, 2015. (Program Book: p.55)

川上 潔、矢嶋 浩 : *Six4/Six5* 二重変異は骨格筋再生を促進し *mdx* マウスの寿命をのばす. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2015 年 12 月 1 日-4 日.

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

なし

取得状況 (計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ : <http://www.jichi.ac.jp/biol/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 潔 (KAWAKAMI Kiyoshi)

自治医科大学医学部・教授

研究者番号 : 10161283

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

矢嶋 浩 (YAJIMA Hiroshi)

自治医科大学医学部・講師

研究者番号：10433583

高橋将文 (TAKAHASHI Masanori)

自治医科大学医学部・講師

研究者番号：20361074