

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702044

研究課題名(和文) 静止期遺伝子による骨格筋幹細胞維持の分子基盤の解明

研究課題名(英文) The roles of dormant genes in muscle stem cells

## 研究代表者

深田 宗一郎 (Fukada, So-ichiro)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20432445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は静止期骨格筋幹細胞で発現しているカルシトニン受容体とHey1-HeyL遺伝子の幹細胞特異的コンディショナル欠損マウスを作成し、解析を行った。その結果、両モデルマウスにおいて、筋幹細胞数の減少が観察され、Hey1-HeyLコンディショナル欠損マウスにおいては、ectopicな筋分化マーカーの発現が観察された。また、Nrf2を筋系譜細胞における、Notch、Hey1-HeyLの下流分子として着目し、Nrf2欠損マウスの解析もを行い、実際に筋幹細胞においてもNrf2が抗酸化遺伝子群を制御している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Muscle stem cells express calcitonin receptor, but its physiological role was unclear. We generated Calcr conditional KO mice and analyzed muscle stem cell and muscle regeneration ability. Intriguingly, the mice exhibited the decreased number of MuSC and impaired regenerative potential. We also generated Hey1-HeyL conditional KO mice, and found the ectopic expression of myogenic genes, which suggests the cell-autonomous role of Hey1-HeyL in muscle stem cells. Using microarray analyses, Nrf2 was identified as the down stream target of Notch and Hey1-HeyL. Nrf2 target genes were downregulated in Nrf2-KO mice, but the KO mice showed no abnormality in muscle stem cells and acute muscle injury model.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 筋衛星細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋再生において中心的な役割を担う骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)は通常静止期・未分化状態で維持されている。生体内において筋線維を新たに作る事のできる唯一の生理的な細胞が筋衛星細胞である。そのため筋衛星細胞の減少は骨格筋重量や筋力低下につながると考えられている。しかし、筋衛星細胞の数がどのような分子で制御されているのかはこれまで謎に包まれていた。

申請者は世界に先駆けて筋衛星細胞を特異的に分取可能な抗体を作製し、骨格筋内で筋衛星細胞に特異的かつ筋芽細胞(増殖状態の筋衛星細胞)には発現していない遺伝子(Hey1, HeyL, カルシトニン受容体 (Calcrc: Calcitonin receptor)等)を同定・報告してきた。さらに申請者は Hey1 と HeyL が重複した機能により、Notch シグナルの直接の標的遺伝子として筋衛星細胞の未分化性獲得に働くことを提唱した。Notch 結合因子 Rbp-J コンディショナル欠損マウスでも同様の結果が報告された (Stem Cells: 30(2), 232-42, 243-52, 2012)事から、筋衛星細胞の未分化性獲得機構として Notch/Rbp-J/ Hey1/ HeyL の経路が示唆されていた。

#### 2. 研究の目的

本申請課題では、申請者が同定した静止期筋衛星細胞に高発現している遺伝子(カルシトニン受容体と Hey1/L)の機能解析を筋衛星細胞特異的なコンディショナル欠損マウスを作成することで、全身欠損マウスでは明らかに出来ていない、成体筋衛星細胞における Hey1/HeyL の機能およびカルシトニン受容体の生理的な働きを明らかにする事を目的に行った。また、Hey1/L やカルシトニン受容体シグナルの標的遺伝子や、加齢との関連を明らかにし、創薬標的となる候補分子を同定する事を目的とした。

#### 3. 研究の方法

Pax7CreERT2::Calcr(floxed/foxed)マウスにタモキシフェンを投与することで、筋衛星細胞特異的なカルシトニン受容体欠損マウスを作成した。組織染色・FACS・単一筋線維培養法・細胞培養などにより筋衛星細胞の性質・性状を検討した。

Hey1 floxed マウスをドイツの Gessler 博士にご供与頂き、Pax7-CreERT2、Hey1 欠損、HeyL 欠損マウスと交配することで、Pax7-CreERT2::Hey1(flox/-)::HeyL(-/-)マウスを作成し、上記同様の研究手法により検討を行った。

カルシトニン受容体、Hey1/L の標的遺伝子の解析については、それぞれの欠損筋衛星細胞や強制発現細胞の遺伝子発現解析を行い、発現変動する遺伝子を同定した。

発表論文5で使用したサンプルを用いて、高齢マウスにおけるカルシトニン受容体の発現を検討した。

#### 4. 研究成果

カルシトニン受容体欠損により筋衛星細胞数の減少が観察され、それに伴う再生不全が観察された。また、カルシトニン受容体は、cAMP-PKA 経路により筋衛星細胞の一過性の静止期維持に寄与しており、cAMP-PKA/Epac 経路がそのニッチへの局在に働いていることを明らかにした。(発表論文1)

HeyL コンディショナル欠損マウスの代わりに、Hey1 コンディショナル欠損マウスを Prof. Gessler から供与頂き、Pax7-CreERT2、Hey1 欠損、HeyL 欠損マウスと交配を重ね Pax7-CreERT2::Hey1(flox/-)::HeyL(-/-)を作成し、解析を行った。その結果、申請者が以前報告した Hey1(-/-)::HeyL(-/-)の結果と同様、筋衛星細胞数の減少・早期分化が観察された。また、筋系譜細胞においても Notch シグナルの下流に抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 が存在し、Hey1/L の下流にも Nrf2 が存在する証拠を示した。さらに、Nrf2 欠損マウスを解析した結果、Nrf2 欠損によりその標的遺伝子の発現低下が Nrf2 欠損筋衛星細胞において観察された。(発表論文2, 論文準備中)

高齢マウスの筋衛星細胞においては、カルシトニン受容体の発現が減少していることを国立長寿医療研究センターのグループと共に明らかにした。(論文準備中)

#### 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9件)(\*corresponding author)

1. Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S\*, Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Reports* 2015, 13(2):302-14
2. Yamaguchi M, Murakami S, Yoneda T, Nakamura M, Zhang L, Uezumi A, Fukuda S, Kokubo H, Tsujikawa K, Fukada S\*. Evidence of Notch-Hesr-Nrf2 Axis in Muscle Stem Cells, but Absence of Nrf2 Has No Effect on Their Quiescent and Undifferentiated State. *PLoS One*. 2015, 10(9):e0138517.
3. Ishii K, Suzuki N, Mabichi Y, Ito N, Fukada S, Okano H, Takeda S, Akazawa C: Muscle Satellite Cell Protein Teneurin-4 Regulates Differentiation during Muscle Regeneration. *Stem Cells*, 2015, 33: 3017-27
4. Pessina P, Kharras Y, Jardi M, Fukada S, Serrano S, Perdiguero E, Munoz-Canovas P: Fibrogenic cell plasticity blunts tissue regeneration and aggravates muscular dystrophy *Stem Cell Reports*, 2015, 4: 1046-60
5. Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N: Pro-IGF-II ameliorates

age-related inefficient regenerative response by orchestrating self-reinforcement mechanism of muscle regeneration. *Stem Cells*, 2015, 33: 2456-68

6. Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M, Ito T, Watanabe Y, Ohtani T, Murakami S, Uchida S, De Gaspari P, Uezumi A, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Hashimoto N, Braun T, Tanaka T, Takeda S, Yamamoto H, **Fukada S\***: Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development*, 2015, 142: 51-61

7. Uezumi A, **Fukada S**, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K: Identification and characterization of PDGFR + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death & Disease*, 2014, 5:e1186.

8. Doi R, Endo M, Yamakoshi K, Yamanashi Y, Nishita M, **Fukada S**, Minami Y: Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ $\beta$ -catenin signal in myogenic cells during differentiation. *Genes to Cells*, 2014, 19(4): 287-96

9. Mikami N, Sueda K, Ogitani Y, Otani I, Takatsuji M, Wada Y, Watanabe K, Yoshikawa R, Nishioka S, Hashimoto N, Miyagi Y, **Fukada S\***, Yamamoto H, Tsujikawa K: Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Type IV Hypersensitivity through Dendritic Cell Function *PLoS One*. 2014, 9(1):e86367

〔学会発表〕(計10件)

国際学会

1. 10th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy' 「Cell Therapy for Muscular Dystrophy」So-ichiro Fukada, Paris, France 2015年7月4日 Oral presentation

2. FASEB Science Research Conferences, 「Calcitonin receptor regulates quiescence and location in adult satellite cell」So-ichiro Fukada, Masahiko Yamaguchi, Yoko Watanabe, Takuji Ohtani Colorado, USA, 2014年7月22日 Poster presentation

3. EMBO workshop, 「Roles of calcitonin receptor for maintaining muscle satellite cells」So-ichiro Fukada, Takuji Ohtani, Yoko Watanabe, Masahiko Yamaguchi, Acaya, Italy, 2014年5月17日 Poster presentation

4. EMBO workshop, 「Maturation of myofiber is mediated by transit doublecortin-expressing myogenic cells during regeneration」So-ichiro Fukada, Ryo Ogawa, Ma Yuran, Masahiko Yamaguchi Ascona, Switzerland, 2013年9月16日 Oral presentation

国内学会

5. 第55回 原研研究集会・大学院セミナー

「骨格筋幹細胞の休止期・未分化性の維持メカニズム」深田宗一郎，長崎大学医学部 永井隆記念研修室、2016年3月23日

6. 第38回日本分子生物学会 ワークショップ 4W19-p 筋生物学の最前線～疾患克服に向けた統合的理解，「骨格筋幹細胞の維持メカニズム」深田宗一郎，神戸国際会議場、2015年12月4日

7. 第14回 CMBR、基調講演、「骨格筋幹細胞の基礎研究から 応用研究にむけて」、深田宗一郎、静岡、ラフォーレ修善寺ホテル、2014年11月22日

8. 第29回 日本整形外科学会基礎学術集会、シンポジウム 「筋肉のエイジング・アンチエイジング」、「筋骨格系の共通制御因子としてのカルシトニン受容体の可能性」深田宗一郎、鹿児島 城山観光ホテル 2014年10月10日

9. 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 研究所セミナー、「骨格筋幹細胞維持に働く二つの分子メカニズム」深田宗一郎、埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 2014年4月18日

10. スポーツ医科学コアセンター特別セミナー 骨格筋について考える、「骨格筋維持に必要な筋幹細胞発現遺伝子の解析」深田宗一郎、東北大学医学部、2014年2月21日

〔図書〕(計1件)

Uezumi A and **Fukada S**

Toward regenerative medicine for muscular dystrophies-Lessons from regeneration processes-Springer, ISBN 978-94-007-5957-2, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(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

深田 宗一郎 (FUKADA So-ichiro)  
大阪大学・薬学研究科・招聘准教授  
研究者番号：20432445

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：