

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870285

研究課題名(和文) 骨格筋幹細胞中で起こる転写後制御機構の解明

研究課題名(英文) post-transcriptional regulation in skeletal muscle stem cells

研究代表者

佐藤 貴彦 (Sato, Takahiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30570775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の筋衛星細胞は、骨格筋損傷や疾患により再生が起こる際に増殖分化しはじめる組織幹細胞であるが、その発生機序や制御機構は不明な点が多い。マウス生体内における骨格筋細胞を蛍光可視化する遺伝子導入したマウスを用いて、骨格筋細胞の系譜を探る中で筋細胞中でmiR-195/miR-497を介した転写後制御機構が存在することを見出した。

本研究では時期特異的なmiR-195/miR-497欠損マウスを作成し、生体内における骨格筋への影響を調査した。

研究成果の概要(英文)：Adult muscle satellite cells, which are skeletal muscle tissue-specific stem cells for skeletal muscle growth and repair by activating muscle regulatory factors as MyoD and execute the myogenic program following to restore muscle structure and function. It has been reported that adult skeletal muscle stem cells, derived from Pax3-expressing dermomyotome, are maintained quiescent state through miRNA pathways, by miR-195/497.

In this study, We created miR-195/497 mutated mice for the gain-of function or loss-of function analyses to investigate effects to skeletal muscle cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：miRNA 骨格筋 筋衛星細胞

1. 研究開始当初の背景

< 既往の骨格筋幹細胞研究と未解決点 >

骨格筋組織には筋衛星細胞と呼ばれる骨格筋組織幹細胞が存在し、通常は細胞分裂せず静止期にあると考えられている。骨格筋再生は骨格筋幹細胞が増殖開始することにより始まり、骨格筋細胞が発生分化する過程と共通する因子が発現する。骨格筋発生・再生においては、(1)転写因子 Pax3 を発現する骨格筋前駆/幹細胞で、(2)骨格筋への運命決定を担う転写因子 MyoD の発現が誘導活性化され、骨格筋へと運命決定された筋芽細胞へと分化する。さらに(3)転写因子 Myogenin を発現し、最終分化過程へと入る(図1)。



図1 骨格筋分化系譜と転写因子発現

前年度までの研究進展により、Pax3 と MyoD 発現細胞系譜を蛍光発現により追跡可能な遺伝子導入マウスを作製し、胚発生時期から成体にかけて骨格筋幹細胞の運命決定に関する転写カスケードについて研究してきた(Lagha and Sato et al., *BMC Genomics* 2010)。その結果、Pax3 と共発現する転写因子 Dmrt2 を同定し、両者が骨格筋制御因子 MyoD を制御する機構を解明し(Sato et al., *PLoS Genet.* 2010)。胚発生中から MyoD 発現細胞群が、成体における骨格筋繊維だけでなく骨格筋幹細胞になることを明らかにしてきた(Sakai et al., *PLoS One* 2013)。しかしどのようにして、骨格筋幹細胞が最終分化系譜から分岐し産生され、生体内で未分化性を維持しているのかは不明である。

また骨格筋発生時には miRNA が関与する転写後制御機構が存在し、より多様な遺伝子発現制御が行われていることが示唆されてきたが、骨格筋幹細胞中においては報告がなかった。申請者は成体マウス骨格筋幹細胞中で miRNA 修飾酵素である Dicer を時期特異的に欠損させることを試みた。結果、通常は細胞周期から外れ静止期に位置する骨格筋幹細胞が、静止期に入らず増殖状態で認められた。さらに同欠損体では骨格筋再生が正常に行われず、骨格筋幹細胞からの再生過程に影響を及ぼした。

< miR-195/497 による骨格筋幹細胞制御機構 >

これらの要因として細胞周期関連遺伝子の発現変化が考えられた為、同遺伝子の発現制御を行う miRNA の発現スクリーニングを行ってきた。その結果、成体マウス骨格筋幹細胞中で高発現する miR-15 family である miR-195/497 を同定した。試験管レベルにおいて miR-195/497 が *Ccnd* と *Cdc25* を抑制制御し、骨格筋幹細胞の増殖さらに分化抑制

に影響を示した(図2)。miR-195/497 の一過的導入により、成体マウスの骨格筋幹細胞型へ導かれることを突き止めた(図2、Sato et al., *Nat Commun* 2014)。

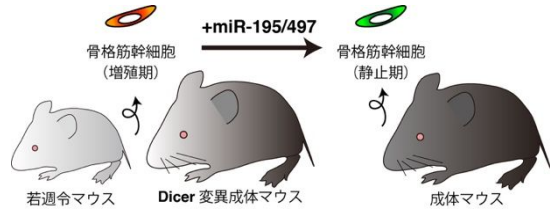


図2 骨格筋幹細胞における miR-195/497 発現の変化

2. 研究の目的

< 骨格筋幹細胞の増殖分化に關与する miR-195/497 の生体内機能調査 >

骨格筋幹細胞が成長と共にその増殖状態を変化させて成体では静止状態に入るが、その機構として miR-195/497 による細胞周期制御が考えられる。今後の計画として、(1)成長とともに骨格筋幹細胞中で発現が上昇する miR-195/497 のマウス生体内での詳細な役割と機能について全く分かっていない。生体での遺伝子機能喪失あるいは強制発現実験を行った場合、骨格筋以外にも影響が出る可能性があるため、遺伝学的に時期組織特異的に変化させることが可能なマウスを樹立することによって検証する。(2)骨格筋再生時に、骨格筋幹細胞からの増殖分化が miR-195/497 の影響をどれくらいけるのか miR-195/497 発現変異マウスの骨格筋損傷実験を行い、生体内評価を行う。さらに、(3)加齢により骨格筋再生能は減少するが、同時に骨格筋幹細胞の増殖能も低下することが報告されており、これは Dicer 欠損変異による表現系と合致する。そこで、骨格筋幹細胞中における miR-195/497 と加齢との関係を調査する為に、老齡 miR-195/497 発現変異マウスを用いての骨格筋解析を行う。

3. 研究の方法

試験管レベルで細胞周期関連遺伝子阻害に働いた miR-195/497 の骨格筋幹細胞特異的な強制発現マウスあるいは発現欠損マウスを作製し、骨格筋形成時の増殖分化の挙動を調べる。

上記遺伝子変異マウスを用いて骨格筋再生時における骨格筋幹細胞からの増殖分化変化を追跡する。さらに老齡上記遺伝子変異マウスより骨格筋幹細胞を単離し、加齢と共にあるいは Dicer 欠損体のトランスクリプトーム解析、そして骨格筋再生実験を行い miR-195/497 と加齢の関係を調査する。

4. 研究成果

< 骨格筋幹細胞中で時期特異的に miR-195/497 発現変異可能な遺伝子導入マ

ウス飼育繁殖 >

現在まで骨格筋幹細胞で発現する Pax3 そして Pax7 を指標に、それぞれ GFP あるいは RFP 発現細胞として同定単離、特に Pax7 に関しては時期特異的な骨格筋幹細胞を検出することが可能であることを調査済である (**Pax7^{CreER/+}; R26^{LSL-RFP/+}**)。そこで、Pax7 発現下にある骨格筋幹細胞中で時期特異的に miR-195/497 発現変化マウスの樹立と生体内における miR-195/497 の機能を評価解析することにつなげた。

Cre recombinase 発現下で miR-195/497 を強制発現させるトランスジェニックマウス (**CAG-fz-miR-195/497**) また欠損可能なマウス (**miR-195/497^{loxP/loxP}**) 共に樹立することが出来た (図 3、図 4)。

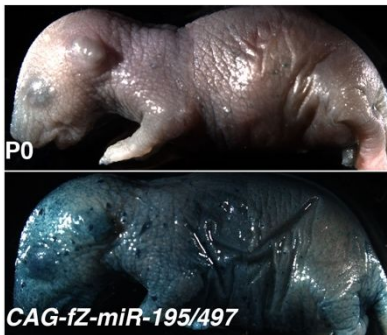
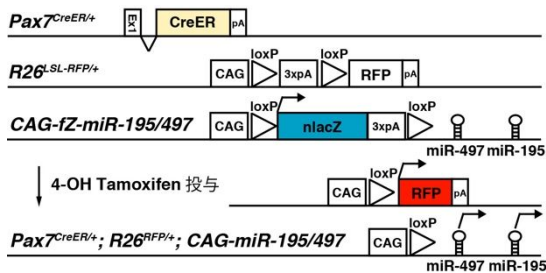


図 3 時期特異的 miR-195/497 強制発現マウス

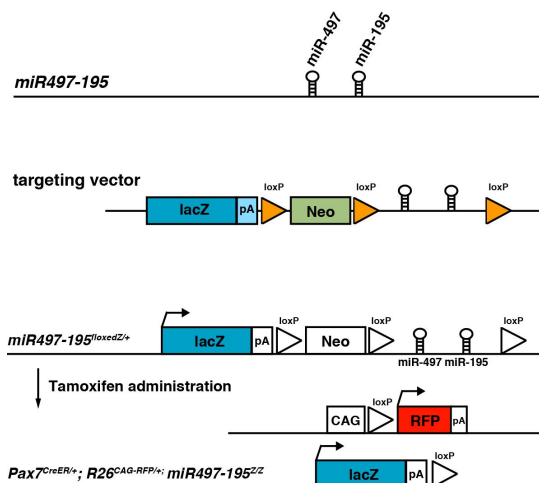


図 4 Cre リコンビナーゼによる時期特異的な miR-195/497 欠損マウス遺伝子座

しかしながら、現在までのところ、上記

miRNA 強制発現ならびに機能欠損マウスを観察したところ、骨格筋の発生成長、筋幹細胞の挙動ならびに筋再生において有意な変化は認められていないので、更なる調査が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yosuke Hiramuki, Takahiko Sato*, Yasuhide Furuta, Azim Surani and Atsuko Sehara, Mest but miR-335 affects skeletal muscle growth and regeneration. PLoS One, 査読有、10 巻, e0130436 (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0130436.

〔学会発表〕(計 2 件)

堀切 智子、佐藤 貴彦
「骨格筋細胞の形成に關与する新規転写後調節機構」
日本分子生物学会 (2015 年 12 月)、神戸

佐藤 貴彦

「成体骨格筋幹細胞の形成に關与する転写後調節機構」
第 1 回日本筋学会 (2015 年 8 月)、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔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

佐藤 貴彦 (SATO, Takahiko)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30570775

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：