

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882020

研究課題名(和文)筋衛星細胞の恒常性を司る新規制御機構の解明

研究課題名(英文)Identification of a novel regulatory mechanism in satellite cell homeostasis

研究代表者

林 晋一郎 (Shinichiro, Hayashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10732381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋分化は様々な遺伝子発現ネットワークや転写メカニズムにより制御されている。Klf5はES細胞や組織幹細胞などの増殖や分化に関与している転写因子である。しかしながら、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞におけるKlf5の発現や機能については報告がない。そこで、本研究では骨格筋におけるKlf5の発現およびその機能を明らかにすることを目的とした。筋芽細胞株C2C12および筋衛星細胞特異的にKlf5を欠損させたマウスを用いた解析の結果、Klf5は筋分化と共に発現が上昇し、myogeninを含む筋特異的な遺伝子発現を直接制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle differentiation is a highly orchestrated process involving the gene regulatory networks and transcriptional mechanisms. Klf5 regulates cell proliferation, differentiation, and apoptosis during development and in certain disease states, such as cancer. Klf5 is also involved in self-renewal and differentiation of mouse embryonic stem cells. To determine whether Klf5 is involved in muscle cell differentiation, we assessed the function of Klf5 by using C2C12 myoblast cell line. Remarkably, Klf5 is up-regulated during myoblast differentiation and co-localized with Myogenin. Knockdown of Klf5 by si-Klf5 treatment led smaller myotube formation compared with the control. Additionally, myogenin expression was suppressed by si-Klf5 although MyoD level was not affected. Finally, we demonstrated that myogenin is a direct target of Klf5. Thus, Klf5 regulates muscle specific gene expression including myogenin.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：筋分化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は人体の約 40%を占める最大の組織であり、運動や糖・エネルギー代謝の制御を介したホメオスタシスの維持に重要な役割を果たす。運動不足や加齢による筋萎縮は運動機能の低下の原因となり、その後の生活の質に多大な影響を及ぼす。一方、骨格筋は再生能力の高い組織としても知られており、筋萎縮や筋損傷からの回復には、主として骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞が担う。筋衛星細胞は転写因子 Pax7 を発現し、通常は休止期にあるが、運動や外傷によって筋組織に損傷が起こると活性化し、MyoD 等の筋特異的転写因子を発現して増殖・分化し、新たな筋線維の形成に寄与する。この過程において一部の筋衛星細胞は活性化した後再び休止期に戻り、骨格筋の再生能を終始維持（自己複製）することが知られているが、その分子制御機構は未だ明らかではない。十分な骨格筋機能を保つことは、生活の質を維持するだけでなく、肥満や糖尿病等の生活習慣病の予防の観点からも重要であり、骨格筋の恒常性維持機構を理解し、如何に筋肉量・筋力の減少を阻止できるかは、超高齢化社会である我が国にとって非常に重要な課題である。

Krüppel-like factor 5 (Klf5) は転写制御因子群 KLF ファミリーの一つで、皮膚、胃、肺、乳腺、脂肪細胞や骨格筋など様々な組織で胚期から成体に至るまで発現し、胚の発生、脂肪生成や免疫細胞のストレス応答、癌を含む病態の形成に重要な役割を担う (*Vitam Horm* 87:381)。Klf5 は ES 細胞や癌細胞において、増殖・分化や幹細胞の性質 (stemness) を維持するのに重要な働きを担う (*Nat Rev Cancer* 13:701) ことが報告されていることから、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞においても、その質や機能の維持において Klf5 が重要な働きを担うことが強く示唆されるが、これまで筋衛星細胞における Klf5 の機能について解析されたものは無い。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋における Klf5 の発現様式およびその筋衛星細胞の未分化性、および分化に及ぼす作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋細胞における Klf5 の発現細胞の同定

骨格筋における Klf5 の発現解析

野生型マウスの長肢伸筋および前頸骨筋における Klf5 の発現を免疫蛍光染色により解析する。また、前頸骨筋にカルジオトキシンを投与し、筋再生を誘導する。筋損傷後 7 日目の筋組織を採取し、再生骨格筋における

Klf5 の発現を筋分化マーカー (Pax7, MyoD, myogenin) との二重染色により解析する。

筋衛星細胞分化過程における Klf5 の発現解析

マウス長肢伸筋より、初代筋衛星細胞培養系を調製する。増殖培地 (20%ウシ胎児血清 1%Chicken embryo extract-10 ng/ml basic FGF 添加 DMEM-GlutaMAX) および分化培地 (2%ウマ血清-DMEM-GlutaMAX) による分化誘導後の Klf5 の発現を免疫染色法により解析する。

(2) 筋芽細胞分化における Klf5 の機能解析

筋芽細胞株 C2C12 を用いて、si-Control あるいは si-Klf5 処理を行い、C2C12 の分化における Klf5 の作用を解析する。

さらに、CRISPR-Cas9 システムにより Klf5 ノックアウト C2C12 細胞を作製し、同様に筋分化における Klf5 の作用を解析する。

(3) 筋衛星細胞特異的 Klf5 ノックアウトマウスの解析

筋衛星細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス *Pax7^{CreERT2/+}* と *Klf5^{lox}* マウスを交配し、*Pax7^{CreERT2/+};Klf5^{lox/lox}* マウスを作製する。コントロールマウス (*Klf5^{lox/lox}*) および筋衛星細胞特異的 Klf5 ノックアウトマウス (*Pax7^{CreERT2/+};Klf5^{lox/lox}*) の前頸骨筋にカルジオトキシンにより筋再生を誘導し、7 日後および 28 日後に再生筋組織を採取する。得られた再生筋組織をヘマトキシリン・エオジン染色、embryonic ミオシン重鎖 (eMyHC) 抗体、あるいは Collagen type-I 抗体を用いた免疫染色により筋再生能を比較し、評価する。さらにラミニン抗体を用いた免疫染色で筋線維径を計測し、コントロールマウスとノックアウトマウスで比較する。

(4) Klf5 ノックダウン/ノックアウトによる、筋芽細胞での発現変動遺伝子の網羅的解析

3-(2) で si-Control あるいは si-Klf5 処理した C2C12 細胞を分化誘導後 0, 1, 2, 3 日後に回収し、RNA を抽出する。得られた RNA を RNA-sequence (RNA-seq) により網羅的に解析し、Klf5 のノックダウンにより発現変動した遺伝子を明らかにする。また、Klf5 抗体を用いた ChIP-sequence (ChIP-seq) を行い、Klf5 が筋分化過程で制御する因子を同定する。

4. 研究成果

(1) 骨格筋細胞における Klf5 の発現細胞の同定

骨格筋における Klf5 の発現解析

骨格筋における Klf5 の発現細胞を免疫組織化学的染色法により解析した結果、骨格筋幹細胞マーカーである Pax7 を発現する筋衛星細胞ではほとんど発現しておらず、正常骨格

筋組織では筋細胞での発現は見られなかった。カルジオトキシンにより筋再生を誘導後7日目の再生筋組織において、Klf5は同様にPax7陽性の筋衛星細胞では発現せず、筋分化マーカーであるmyogeninを発現する分化へと方向付けられた筋芽細胞の核や、新しく形成された筋線維の核でKlf5が発現していた。

筋衛星細胞分化過程における Klf5 の発現解析

野生型マウスの長肢伸筋より作製した培養筋衛星細胞において、Klf5の発現を解析したところ、(a)で得られた結果と同様にPax7を発現する筋衛星細胞ではKlf5が発現していない、あるいは非常に弱く発現しており、分化誘導により筋芽細胞同士が融合し、形成した筋管の核でKlf5陽性を示した。また、Klf5の発現はmyogeninと共同存在していた。分化誘導後4日目の成熟した筋管の核の一部ではKlf5の発現が減弱した。

(2)筋芽細胞分化における Klf5 の機能解析

C2C12筋芽細胞を用いて、si-Klf5処理を行ったところ、si-Control細胞と比較して筋管の形成など筋分化能が著しく低下した(図1)。

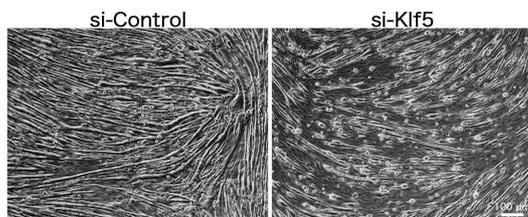


図1. si-Klf5処理により、C2C12細胞は筋管の形成異常を示す。

さらに、CRISPR-Cas9システムによりKlf5ノックアウトC2C12を作製した。Klf5抗体を用いた免疫染色、およびウェスタンブロット法、さらにDNAを抽出し、シーケンス解析によってKlf5が欠損していることを確認した。Klf5ノックアウト細胞を分化誘導したところ、si-Klf5処理したC2C12細胞と同様に、筋管の形成や、myogeninの発現量がコントロールと比較して著しく低下し、Klf5が筋芽細胞分化に必須の転写因子であることが明らかとなった。

(3)筋衛星細胞特異的 Klf5 ノックアウトマウスの解析

筋衛星細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウスPax7^{CreERT2/+}とKlf5^{lox}マウスを交配し、Pax7^{CreERT2/+};Klf5^{lox/lox}コンディショナルノックアウトマウスを作製した。タモキシフェンを腹腔内に5日間連続投与し、Creの発現を誘導後、筋組織を採取して解析したところ、コントロールとコンディショナルノックアウトとの間に顕著な違いは見られなかった。前頸骨筋にカルジオトキシンを投与して筋再生を誘導し、筋再生誘導後5日

目に再生筋組織を採取した。ヘマトキシリン・エオジン染色により解析したところ、コントロールマウスでは壊死した筋線維は残っており、中心核を持つ再生筋線維のみ確認された。一方、コンディショナルノックアウトマウスの再生筋では、多数の浸潤細胞が残存しており、壊死した筋線維も確認され、著しい筋再生不全が起こっていた(図2)。また、幼弱な筋線維が陽性を示すeMyHCの発現は、コントロールマウスでは再生7日目の筋組織では殆ど見られなかったが、コンディショナルノックアウトマウスの再生筋において、多数のeMyHC陽性の筋線維が確認された。筋再生誘導後、28日目の筋組織において、コントロールと比較してコンディショナルノックアウトマウスの再生筋では著しいコラーゲンの沈着が見られた。また、筋再生融合後、7日目、28日目の筋線維径を解析したところ、コンディショナルノックアウトマウスの再生筋ではコントロールマウスの再生筋と比較して、径の小さい筋線維径の割合が増加した。これらの結果から、Klf5はin vivoにおける筋再生に重要な因子であることが明らかとなった。

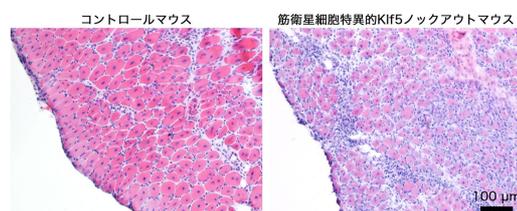


図2. 筋衛星細胞特異的Klf5ノックアウトマウスでは、筋再生不全が起こる。

(4) Klf5 ノックダウン/ノックアウトによる、筋芽細胞での発現変動遺伝子の網羅的解析

si-Controlおよびsi-Klf5処理したC2C12細胞を分化誘導後0, 1, 2, 3日後に回収し、遺伝子発現の変化をRNA-seqにより網羅的に解析した結果、myogeninを含む筋特異的遺伝子の発現がsi-Klf5処理により有意に低下していることが明らかとなった。さらにKlf5抗体を用いたChIP-seqにより解析したところ、これら筋特異的遺伝子の発現は、Klf5によって直接制御されていることが明らかとなった。

以上のことから、Klf5は筋分化とともにその発現が誘導され、筋特異的遺伝子の発現を直接制御することにより筋分化を正に制御する転写因子であることが明らかとなった(論文投稿中)。今後さらにKlf5の機能解析を進めることによって、筋ジストロフィーなどの難治性筋疾患や、加齢による筋量と筋力の低下を示すサルコペニアの治療法などに応用できる可能性があると考えられる。

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2件)

Chal J, Oginuma M, Tanoury ZA, Gobert B, Sumara L, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, Tassy O, Vincent S, Miyanari A, Bera A, Garnier JM, Guevara G, Hestin M, Kennedy L, Hayashi S, Drayton B, Cherrier T, Gayraud-Morel B, Gussoni E, Relaix F, Tajbakhsh S, Pourquie O. Differentiation of embryonic stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol* 33: 962-9, 2015 (査読有)

Zalc A¹, Hayashi S¹, Aurade F, Brohl D, Chang T, Mademtzoglou D, Mourikis P, Yao Z, Cao Y and Relaix F. Antagonistic regulation of p57kip2 by Hes/Hey downstream of Notch signaling and muscle regulatory factors regulates skeletal muscle growth arrest. *Development* 141: 2780-90, 2014 (¹: **Contributed equally to this work.**) (査読有)

[学会発表](計7件)

林 晋一郎. Klf5 regulates Muscle Differentiation and Development. 第4回骨格筋生物学研究会. 2016年3月4-5日. 松本大学 (長野県 松本市)

林 晋一郎, 真鍋 一郎, 大石 由美子. 筋衛星細胞の新規分化制御機構の解析. 第38回日本分子生物学会年会. 2015年12月1-4日. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)

林 晋一郎. 骨格筋の発生における、Pax遺伝子群の進化的な機能の変遷. 第三回若手による骨格筋細胞研究会. 2015年11月24-25日. 九州大学 (福岡県 福岡市)

林 晋一郎, 真鍋 一郎, 大石 由美子. 筋衛星細胞における新規筋分化制御機構の解析. 第6回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2015年9月4-5日. ヒルトン福岡シーホーク (福岡県 福岡市)

林 晋一郎, 真鍋 一郎, 大石 由美子. Klf5 による骨格筋分化制御機構の解析. 第一回日本筋学会学術集会. 2015年8月8日. 国立精神・神経医療研究センター (東京都 小平市)

Gordon Research Conference

“Myogenesis”. Shinichiro Hayashi, Ichiro Manabe, Yumiko Oishi. Klf5 regulates skeletal muscle differentiation by controlling Myogenin expression. 2015年6月21-26日. Renaissance Tuscany II Ciocco (Lucca, Italy)

林 晋一郎. 骨格筋細胞における Klf5 の機能解析. 第二回若手による骨格筋細胞研究会. 2014年11月4-5日. コーポイン京都 (京都府 京都市)

[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

林 晋一郎 (HAYASHI, Shinichiro)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号: 10732381

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: