

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年度～2009 年度
 課題番号：19592131
 研究課題名（和文） 筋機能再活性に関与する筋幹細胞分化過程解明のフロンティア
 研究課題名（英文） Frontiers in the clarification of the muscular stem cell differentiation process involved in restoring muscle function

研究代表者 阿部 伸一（ABE SHIN-ICHI）
 東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40256300

研究成果の概要（和文）：

高齢者の咀嚼機能、嚥下機能を含む摂食機能の衰えは、筋機能低下が有力な原因となる。その筋組織の機能再活性のメカニズムに関する2つのプロセスを追った。一つは、筋タンパク質合成（促進）が筋タンパク質分解（抑制）を上回る結果、筋線維の太さが増し、筋組織としての筋重量が増加し、筋機能も向上するという。他方として、筋特異的幹細胞が新たな筋線維を作り出し様々な因子の相互作用が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Decreased muscle function is a major cause of the deterioration of eating function including mastication and swallowing in the elderly. We evaluated two processes involved in the mechanism of restoring muscle function. In one process, muscle protein synthesis (promotion) exceeded its degradation (inhibition), and a resulting increase in muscle fiber thickness increases muscle tissue weight, and also improves muscle function. In the other process, muscle-specific stem cells produce new muscle fibers. Thus, the interaction of various factors is important.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,900	570	2,470
平成 20 年度	700	210	910
平成 21 年度	800	240	1,040
年度			
年度			
総計	3,400	1,020	4,420

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：筋線維、筋活性、成長因子、筋幹細胞

1. 研究開始当初の背景

筋機能再活性、すなわち筋肥大のメカニズムについて研究を進めていくためには、筋幹細胞であるサテライト細胞、筋S P細胞の分化の過程について様々な角度からアプローチを行う必要がある。

近年、筋の分化に関する研究で、筋肉の組織ができるときに、小胞体ストレスと呼ばれる細胞ストレスが必要であることが報告された (Nakanishi K et al., J Cell Biol, 2005)。小胞体ストレスは何らかの異常状態に発生し、細胞にダメージを与えたり、時には病気の原因にもなる患者とこれまで考えられてきた。しかし、正常なマウスの胚発生の時期に筋肉が作られる過程を調べ、小胞体ストレスが発生していることが確認された。正常な筋組織が作られるためには、筋芽細胞が分化していく過程の中で、筋小胞体に起こる小胞体ストレスを原因とするアポトーシスが生じることが必須で、不要な細胞にアポトーシスを起こさせて筋肉組織に含まれないようにする働きを持つことが証明された。再生研究の問題点のひとつとして、成長因子を導入し、筋芽細胞の分化を極端に促進させると、肉腫のような筋組織が出来る場合があることが指摘されていたが、この小胞体ストレスによるアポトーシスという現象が問題点を解決の方向へ向かわせる可能性が考えられる。以上の様な背景から、サテライト細胞、筋S P細胞の分化の過程でも小胞体ストレスによるアポトーシスが起り、細胞ストレスに強い細胞を選り分けている可能性がある。この詳細はいまだ報告がなく、筋の機能再活性、筋肥大のメカニズムの中で、今後重要な意味を持つてくると考えている。

そこで、筋機能再活性、すなわち筋肥大の機構に関与するメカニズムの一端を解明するため、いくつかの条件下でサテライト細胞、

筋S P細胞の分化を促進させ、その過程で起こるアポトーシス関連遺伝子について、時系列的に詳細に検討することを本申請課題の目的とする。

2. 研究の目的

筋細胞の分化の過程を初期から時系列的に多遺伝子の発現過程を検索する。その中で、特に、アポトーシス関連因子の検索については詳細に検討を行う。これまでの基礎的研究からアポトーシスが起こる過程を証明するステップは多方面にわたるため、本年度では、アポトーシスの際に発現するタンパク質分解酵素であるカスパーゼ群（特にカスパーゼ3, 9, 12）の遺伝子の発現を定量的に、そして時系列的に明らかにすることに的を絞って解析する。また、遺伝子の発現が時系列的に定量化され、その再現性が確認された後、タンパクレベルでの定量化を検証する。さらに成長因子および制御因子についても同様の検索を行う。

3. 研究の方法

(1) 筋分化と細胞死の関係

筋分化にはその過程で細胞死が必須であるとの報告が近年多数なされている。細胞死は、形態学および生化学的特徴により、ネクロシスとアポトーシスに分類される (Fink SL, et al. Infect Immun. 2005; 73: 1907-1916)。ネクロシスは、虚血や損傷といった細胞の恒常性を大きく逸脱した環境変化により引き起こされ細胞膜の破綻が生じる。一方アポトーシスは細胞内シグナルにより厳密に制御され、細胞膜の破綻は生じず炎症反応は少ない。したがって従来器官形成など生理的細胞死はアポトーシス、病態による細胞死がネクロシスにより進行すると考えられてきた。しかし近年、神経脱落疾患

にアポトーシスが関与することなどが証明され、ネクローシスの過程の中で生じるアポトーシスについて議論が盛んになっている (Graeber MB, et al., Brain Pathol. 2002; 12:385-390 ; Mattson MP. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000; 1: 120-129)。

アポトーシスの実行において、Caspase と呼ばれるプロテアーゼの連鎖的活性化が中心的役割を果たしている (Friedlander et al., 2003)。その活性化には細胞膜に存在する細胞死受容体、小胞体およびミトコンドリアを介するシグナル経路の関与が知られている。Caspase は哺乳動物では 1~14 まで同定されており (Shi Y. et al., 2002)、哺乳動物の Caspase はその機能からいくつかのグループに分けられる。炎症反応に関与するグループには Caspase-1, -5, -11 が含まれ、アポトーシスに関与するグループには Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 が含まれる。また、Caspase-12 は小胞体ストレスによるアポトーシスの関与が示唆されている (Nakagawa et al., 2000)。

以上のようにアポトーシスとカスパーゼについて様々な角度から検討がなされるようになってきたが、筋ジストロフィーの病態の中でのアポトーシスの発現については報告が十分ではなく、不明な点が多い。そこで本論文では、mdx マウス咬筋を研究対象とし、小胞体ストレス経路に関与する Caspase-12、ミトコンドリアを介する経路に関与する Caspase-9, -3 について検索をした。そして、筋線維の壊死の過程に生じるアポトーシスについて考察を試みた。

(2) 筋分化と成長因子の発現

外傷をうけた骨格筋は筋芽細胞前駆体として知られている静止性のサテライト細胞の活性化を誘導する (Grounds et al., 2002)。通常サテライト細胞は基底膜と筋形質膜の

間に存在している。サテライト細胞は筋細胞の幹細胞であり、筋再生過程で重要な役割を担う (Engel AG et al., 2004)。外傷後、壊死性線維にマクロファージが侵入することにより、デブリは除去される。サテライト細胞は活性化をうけて骨格筋前駆細胞(筋芽細胞)となる。それらは分裂を繰り返してやがてそれらが融合して筋管細胞となり、最終的に成熟して筋線維となる。その筋再生過程ではさまざまな成長因子が関与していることが報告されている (Hawke and Garry, 2001)。

これまで研究されてきた全ての成長因子の中で、肝細胞増殖因子 (HGF) が、静止性サテライト細胞を活性化させることが示されている (Allen et al., 1995 ; Tatsumi et al., 1998)。HGF は、組織発達や組織再生の過程において分裂促進的であり、形態形成活性を引き出す因子である。HGF は肝臓だけではなく様々な他の臓器、例えば、肺、腎臓、胸腺、脾臓そして骨格筋などに発現することが、今までに報告されている (Tashiro et al., 1990)。HGF のレセプターである c-met は正常筋組織において静止性サテライト細胞に存在し他の筋原性遺伝因子よりも先行して発現する (Cornelison and Wold, 1997; Tatsumi et al., 1998)。また、HGF は静止性サテライト細胞の細胞周期への進行を促進させ (Allen et al., 1995; Tatsumi et al., 1998)、細胞分化を抑制し、細胞増殖に対して促進的に働きかける (Miller et al., 2000)。これらの研究は、HGF が筋再生において重要な役割を果たすことを意味する。

また、その他の成長因子としては IGF-1 が頻繁に研究されてきた。IGF-1 は主として肝臓で産生され血中へと放出されるが、脳、肺、腎臓、生殖腺、骨格筋など多くの組織でも産生が確認され (W. H. Daughaday & P. Rotwein, 1989 ; R. E. Humbel, 1990)、胚性期と出生後

での成長には必須である (Le Roith 1997)。 *in vitro*において IGF-1 をラットの骨格筋筋芽細胞に投与すると初期では分化を抑制して細胞増殖を活発化し、後期では細胞の分化に対して促進的に働きかけるということが示されている (Rosenthal et al., 1995)。これらの研究は IGF-1 が筋芽細胞の細胞増殖と分化を調整するうえで重要な役割を果たすことを意味する。

(3) 筋分化と制御因子の発現

骨格筋形成抑制因子である myostatin と関連因子である follistatin, decorin についての報告があるが、筋再生時における報告は少なくそれらの因子の発現時期や相互作用については不明な点が多い。筋再生の研究に用いられる筋ジストロフィーモデルマウス (*mdx* マウス) 咬筋の筋変性は他の筋組織に比べ軽微であるとの報告がある。この筋変性の違いを利用して筋再生過程における骨格筋形成抑制因子および関連因子の発現について経時的な検索を行った。

4. 研究成果

(1) 筋分化と細胞死の関係

近年、筋ジストロフィーモデル動物である *mdx* マウスの筋線維にネクローシスだけではないアポトーシス類似の現象が生じている可能性が指摘された。この報告は、特にミトコンドリアを介したアポトーシス関連遺伝子である Caspase-3 の過剰発現について検索された (Mizutani et al. 2005)。しかし、ジストロフィン欠損による筋のネクローシスの過程で、小胞体を介した細胞内ストレスが発生したかについては検索がなされていない。本実験結果から、まだ細胞の正常な形態がほぼ維持され、ネクローシスに至っていない *Mdx* マウス咬筋の 2, 3 週齢に Caspase-12 が多く発現していた。Caspase-12 は、小胞体の細

胞質側に局在し、小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシス関連蛋白であるとされている (Nakagawa et al. 2000)。よって、ジストロフィンタンパクの欠損によって、筋線維内では、その構造を維持するために大きなストレスが生じている可能性が示唆された。また、*mdx* マウス咬筋の 4 週齢において、Caspase-12 の発現が減少していたことは、すでに細胞のネクローシスが開始し、それまでの小胞体ストレスが消失したのではないかと考えられた。

(2) 筋分化と成長因子、制御因子の発現

IGF-1 は筋再生初期では細胞分化を抑制して細胞増殖に働き、その後十分な細胞数になると、細胞分化に対して促進的に働きかけるという二相性の働きがあることが報告されている。免疫組織化学的染色において HGF が壊死巣の一部と幼若な再生筋の細胞質に局在していたことから、おそらく壊死を起こした細胞をマクロファージが除去した後、静止性サテライト細胞を活性化するために発現して、さらに細胞増殖に関与していたのではないかと考えられる。IGF-1 は再生筋の細胞質に限局していたことからおそらく筋細胞の分化を抑制しながら増殖に関与し、十分に細胞増殖がされると今度は細胞分化に対して促進的に働いていたのではないかと考えられる。Western blotting の結果では、HGF と IGF-1 は *mdx* マウス 3 週齢、4 週齢で B10 マウスと比較して特に強い発現を認めた。しかし 9 週齢では *mdx* マウスと B10 マウス共にほとんど発現が認められなかった。また、RT-PCR も同様の結果を示した。このことから、HGF と IGF-1 は筋線維に壊死と再生が活発に起こっている時期に特に多く発現し、筋再生の程度と相関性があることが明らかとなった。

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 13 件)

1. Abe, S., Nonami, K., Iwanuma, O., Hiroki, E., Yanagisawa, N., Sakiyama, K., Ide, Y. HGF and IGF-1 is present during the developmental process of murine masseter muscle. *J Hard Tissue Biol* (査読あり) 18, 2009, 1-6.
2. Abe, S., Hirose, D., Kado, S., Iwanuma, O., Saka, H., Yanagisawa, N., Ide, Y. Increased expression of decorin during regeneration stage of mdx mouse. *Anat Sci Int* (査読あり) 84, 2009, 305-311.
3. Abe, S., Rhee, S., Iwanuma, O., Hiroki, E., Yanagisawa, K., Sakiyama, K., Ide, Y. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and MRF4 in proliferated myoblasts. *Anat Histol Embryol* (査読あり) 38, 2009, 305-310.
4. Abe, S., Soejima, M., Iwanuma, O., Saka, H., Matsunaga, S., Sakiyama, K., Ide, Y. Expression of myostatin and follistatin in mdx mice, an animal model for muscular dystrophy. *Zool Sci* (査読あり) 26, 315-320, 2009.
5. Yoshii, M., Sakiyama, K., Abe, S., Agematsu, H., Mitarashi, S., Tamatsu, Y., Ide, Y. Changes in the myosin heavy chain 2a and 2b isoforms of the anterior belly of the digastric muscle before and after weaning in mice. *Anat Histol Embryol* (査読あり) 37, 2008, 147-152.
6. Iwanuma, O., Abe, S., Hiroki, E., Kado, S., Sakiyama, K., Usami, A., Ide, Y. Effect of mechanical stretching on caspase and IGF-1 expressions during proliferation process of myoblasts. *Zool Sci* (査読あり) 25, 2008, 242-247.
7. Abe, S., Hiroki, E., Iwanuma, O., Sakiyama, K., Shirakura, Y., Hirose, D., Shimoo, Y., Suzuki, M., Ikari, Y., Kikuchi, R., Ide, Y., Yoshinari, M. Relationship between function of masticatory muscle in mouse and properties of muscle fibers. *Bull Tokyo Dent Coll* (査読あり) 49, 2008, 53-58.
8. Kado, S., Abe, S., Hiroki, E., Iwanuma, O., Sakiyama, K., Kim, H., Ide, Y. Myofiber properties of mouse mylohyoid muscle in the growth period. *Zool Sci* (査読あり) 25, 2008, 806-810.
9. Abe, S. Localization of caspase 12 in masseter muscle of *mdx* mice during regeneration. *Anti-Aging Med* (査読あり) 5, 2008, 53-56.
10. Kurokawa, K., Sakiyama, K., Abe, S., Hiroki, E., Naito, K., Nakajima, K., Takeda, T., Inoue, T., Ide, Y., Ishigami, K. Expression of myosin heavy-chain mRNA in cultured myoblasts induced by centrifugal force. *Bull Tokyo Dent Coll* (査読あり) 49, 2008, 179-184.
11. Suzuki, K., Abe, S., Kim, H. J., Usami, A., Iwanuma, O., Okubo, H., Ide, Y. Changes in the muscle fibre properties of the mouse temporal muscle after

weaning. nat Histol Embryol (査読あり) 36, 2007, 103-106.

12. Kurokawa, K., Abe, S., Sakiyama, K., Takeda, T., Ide, Y., Ishigami, K. Effects of stretching stimulation with different rates on the expression of MyHC mRNA in mouse cultured myoblasts. Biomed Res (査読あり) 28, 2007, 25-31.
13. Honda, A., Abe, S., Hiroki, E., Honda, H., Iwanuma, O., Yanagisawa, N., Ide, Y. Activation of caspase 3, 9, 12 and Bax in masseter muscle of mdx mice during necrosis. J Muscle Res Cell Motil (査読あり) 29, 2007, 243-247.

[学会発表] (計5件)

1. 阿部伸一、岩沼 治、井出吉信、骨髄由来 SP 細胞の筋線維への分化、第 51 回歯科基礎医学会総会、2009 年 9 月 10 日、新潟市
2. 阿部伸一、監物 真、井出吉信、吉成正雄、骨髄由来 SP 細胞の筋線維への分化について、第 114 回日本解剖学会全国学術集会、2009 年 3 月 30 日、岡山市
3. 阿部伸一、廣木愛実、岩沼 治、本田敦郎、野波幹三、崎山浩司、井出吉信、*mdx* マウス咬筋の壊死過程における Caspase および Bax の活性化、第 113 回日本解剖学会全国学術集会、2008 年 3 月 29 日、大分県由布市
4. 阿部伸一、角 祥太郎、中村弘明、離乳前後におけるマウス顎二腹筋の筋線維特性の変化、日本動物学会第 78 回大会、2007 年 9 月 21 日、弘前市
5. 阿部伸一、岩沼 治、崎山浩司、井出吉信、筋線維再活性のための基礎的研究、第 49 回歯科基礎医学会総会、2007 年

8 月 30 日、札幌市

[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◇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

阿部 伸一
東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40256300

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：