

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18968

研究課題名(和文) 衛星細胞と筋線維芽細胞の相互作用:HGFシグナルによる衛星細胞の活性化制御

研究課題名(英文) Interaction between satellite cells and myofibroblasts: Activation control of satellite cells by HGF signaling

研究代表者

林 真琴 (HAYASHI, Makoto)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：50722930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の組織幹細胞である衛星細胞は筋組織損傷修復時に重要な役割を担っている。しかしながら、筋損傷時における衛星細胞の制御機構には不明なことが多い。我々は、受容体型チロシンキナーゼRor1に着目し、損傷時の衛星細胞においてRor1の発現が誘導されることを見出した。さらに、この誘導機構について、炎症性サイトカインIL-1 およびTNF- α によって活性化された細胞内シグナル伝達因子NF- κ BがRor1プロモーターに直接的に作用していることを明らかにした。また、衛星細胞特異的なRor1ノックアウトマウスの解析によって、Ror1は筋損傷時における衛星細胞の増殖に必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Satellite cells, which are tissue stem cells of skeletal muscle, play crucial role in regeneration of skeletal muscle during injury. However, regulation mechanism of activation of satellite cells in injured muscles is not fully understood. We found that receptor tyrosine kinase Ror1 is selectively expressed in satellite cells, and its expression is enhanced during regeneration of injured muscles. Ror1 is transcriptionally regulated via NF- κ B activated by IL-1 and TNF- α . Analysis of satellite cell-specific Ror1 knockout mice reveals that Ror1 is crucial for proliferation of satellite cells during regeneration of injured muscles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Ror1 衛星細胞 組織損傷修復

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の損傷修復には、筋組織の幹細胞である衛星細胞が中心的な役割を担っている。衛星細胞は筋管と筋内膜の間に存在している単核の細胞であり、転写因子 Pax7 を恒常的に発現している。筋組織に損傷が生じると、まず筋芽細胞の細胞供給源の増加として重要なステップである衛星細胞の活性化(増殖促進、生存、運動能の亢進、分化誘導)が起こる。活性化された衛星細胞は増殖後、筋芽細胞に分化し、筋芽細胞が融合して筋管となり損傷部を修復する。この際に、衛星細胞では Pax7 の発現が消失し、Myf5、MyoD、Myogenin、Mrf4 等の筋芽細胞分化因子(MRFs: myogenic regulatory factors)の発現が誘導されることが知られている。

近年、組織特異的な幹細胞の活性化に対して周囲の微小環境(間質系細胞、免疫系細胞、細胞外マトリックス、サイトカイン等)の重要性が報告されている。骨格筋の損傷修復においては、転写因子 TCF4 を発現している筋線維芽細胞(MFBs: myofibroblasts)が、損傷部に衛星細胞とともに集積し、衛星細胞の増殖、および分化を支持している。この筋線維芽細胞による支持機構については、筋線維芽細胞から分泌されるサイトカインのひとつである HGF (hepatocyte growth factor) が衛星細胞の増殖促進を制御しているという報告があるが、衛星細胞内のシグナル伝達分子機構についての詳細な解析はまだ不十分である。

我々は、Wnt5a の受容体の一つである受容体型チロシンキナーゼ Ror1 が衛星細胞で発現していることを見出し、さらに、HGF による衛星細胞の増殖促進作用が Ror1 の発現に依存していることを見出した。また、胃がん細胞や肺がん細胞において、Ror1 が HGF の受容体である c-Met と物理的に結合しヘテロ複合体を形成して、細胞内シグナル伝達因子である Src を介して細胞増殖、生存、および運動能を制御しているという報告がされている。

また、衛星細胞における Ror1 の発現機構およびその役割の解析は不十分である。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋修復過程における Ror1 発現細胞を同定し、Ror1 の発現機構の解明およびその役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カルディオトキシン (CTX: cardiotoxin) をマウスの前脛骨筋に投与することにより骨格筋の損傷を誘導し、修復が起こる過程を解析するモデル (CTX 誘導骨格筋損傷修復モデル) を用いて、損傷した筋組織における Ror1 の発現を mRNA およびタンパク質レベルで解析した。また、CTX 誘導骨格筋損傷修復モデルマウスに炎症性サイトカイン IL-1 および TNF- α に対する中和抗体を投与し、炎症性サイトカインの阻害による Ror1 の発現に対する影響を mRNA レベルで解析した。

(2) Ror1 を発現している細胞を同定するために、SM/C-2.6 抗体(衛星細胞を特異的に認識する抗体)、抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Sca-1 抗体およびセル・ソーターを用いて、マウス前脛骨筋から衛星細胞 (SM/C-2.6 陽性、CD31 \cdot CD45 \cdot Sca-1 陰性細胞) およびそれ以外の細胞を単離し、Ror1 の発現を解析した。また、上記の方法によって、CTX 誘導骨格筋損傷修復モデルマウスから衛星細胞を単離し、損傷筋内の衛星細胞における Ror1 の発現についても解析した。

(3) (1)の結果から、衛星細胞における Ror1 の発現誘導には炎症性サイトカイン IL-1 および TNF- α が関与していることが示唆された。そのため、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた *in vitro* 実験によって検討した。IL-1 および TNF- α が Ror1 の発現を誘導できるかどうかを mRNA およびタンパク質レベルで解析した。さらに、IL-1 および TNF- α の下流シグナルである NF- κ B 経路が Ror1 の発現誘導機構に関わっているかについて検討を行った。具体的には、NF- κ B 経路の阻害剤 (PDTC) の投与した C2C12 細胞、および siRNA によって p65 (NF- κ B 複合体の構成タンパク質) をノックダウンした C2C12 細胞を用いて、炎症性サイトカイン誘導 Ror1 発現誘導の影響を解析した。

(4) (3)の結果から、NF- κ B が Ror1 の発現誘導に関与していることが示唆された。さらに、ヒトおよびマウス Ror1 プロモーターについて配列の比較を行った結果、NF- κ B 結合配列が種を超えて保存されていることを見出した。このことから、NF- κ B が Ror1 プロモーターに直接的に作用する可能性について、C2C12 細胞を用いた Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay によって検討した。また、マウス Ror1 プロモーター

(転写開始点から上流に1,000 bpまたは500 bp)を含む Luciferase reporter vector を用いた Luciferase assay を行い、NF- B による Ror1 プロモーターの転写活性制御について検討した。

(5) これまでの結果から、衛星細胞において Ror1 は炎症性サイトカインによって発現誘導されることが明らかになった。そこで、衛星細胞における炎症性サイトカインの役割を明らかにするために、CTX 誘導骨格筋損傷修復モデルマウスを用いた *in vivo* 実験を行った。具体的には、IL-1 および TNF- の中和抗体の投与に対する衛星細胞の増殖への影響について、Pax7 (衛星細胞のマーカー遺伝子) および Ki67 (増殖細胞のマーカー) 免疫蛍光染色を行い検討した。

(6) さらに、衛星細胞の Ror1 の役割を明らかにするために、siRNA による Ror1 ノックダウン C2C12 細胞を用いた *in vitro* 実験、および衛星細胞特異的な Ror1 ノックアウトマウス (*Ror1^{fllox/fllox}; Pax7-Cre^{+/ERT2}*) を用いた CTX 誘導骨格筋損傷修復実験の解析を行った。*in vitro* 実験では、TNF- による C2C12 細胞の増殖促進に対する Ror1 ノックダウンの効果について、Ki67 の免疫蛍光染色によって検討した。また、衛星細胞特異的な Ror1 ノックアウトマウスにおける筋損傷時の衛星細胞の増殖について、Pax7 の免疫蛍光染色によって検討した。

4. 研究成果

(1) 損傷筋における Ror1 の発現

CTX 誘導骨格筋損傷修復モデルマウスから損傷筋を採取し、損傷筋における Ror1 の発現を解析した結果、筋損傷1日後から発現誘導が認められ、3日後以降にピークを迎えることが分かった。また、炎症性サイトカイン IL-1 および TNF- の発現誘導は Ror1 のそれよりも早く、損傷1日後に認められた。また、筋損傷時に IL-1 および TNF- に対する中和抗体を投与してこれらの炎症性サイトカインを阻害した結果、Ror1 の発現誘導が減弱することが明らかになった。この結果から、筋損傷時において炎症性サイトカインは Ror1 の発現を誘導することが示唆された。

(2) 筋組織における Ror1 発現細胞の同定

筋組織においてどの細胞が Ror1 を発現しているかを明らかにするために、衛星細胞とそれ以外の細胞に単離し、Ror1 の発現を解析

した。その結果、intact な筋組織では、他の細胞と比較して、Pax7 陽性の衛星細胞において Ror1 の発現が亢進していることが明らかになった。さらに、筋損傷時には、衛星細胞において Ror1 の発現が増強されることも明らかになった。(1)の結果と合わせて、炎症性サイトカイン IL-1 および TNF- が衛星細胞における Ror1 の発現制御に関与している可能性が示唆された。

(3) Ror1 の発現制御の解明

炎症性サイトカインによる Ror1 の発現誘導制御の可能性を確かめるために、IL-1 および TNF- によって刺激をした C2C12 細胞について Ror1 の発現を解析した。その結果、IL-1 および TNF- 刺激によって Ror1 の発現が誘導されることが確かめられた。さらに、その発現誘導機構を明らかにするために、IL-1 および TNF- の細胞内シグナル伝達因子である NF- B 経路に着目した。NF- B 経路の阻害剤 PDTC の投与した C2C12 細胞、あるいは siRNA によって Ror1 をノックダウンした C2C12 細胞では、TNF- 刺激による Ror1 の発現誘導が阻害された。この結果から、Ror1 の発現は IL-1 および TNF- によって活性化された NF- B によって制御されていることが示唆された。

(4) NF- B による Ror1 の転写活性の解明

NF- B は遺伝子のプロモーター上に NF- B 結合サイトが存在するとこれに結合し、その遺伝子の転写制御を行うことが知られている。Ror1 の発現誘導についても、NF- B が Ror1 プロモーターに結合し、転写制御を行っている可能性が考えられる。そこで、ヒトおよびマウスの Ror1 プロモーターについて、NF- B 結合サイトの有無について比較検討した。その結果、putative な NF- B 結合サイトが Ror1 プロモーター上の転写開始付近および、転写開始点から上流に 1,000 bp 付近に存在していることが明らかとなった。さらに、これらの NF- B 結合サイトを含む領域は、ヒトおよびマウス間で高度に保存されていることも明らかになった。これをふまえて、C2C12 細胞を用いて、抗 p65 抗体による ChIP assay を行った。その結果、TNF- 刺激をした C2C12 細胞では、p65 が上記の Ror1 プロモーター上に存在する NF- B 結合サイトに結合していることが明らかになった。さらに、Ror1 プロモーターに結合した NF- B が転写活性化能を有しているかを調べるために、Ror1 プロモーターを含む

Luciferase reporter assay を行った。その結果、NF- B 結合サイトを含む Ror1 プロモーター領域(転写開始点から上流に1,000 bp)で TNF- 刺激にตอบสนองしシグナルが上昇すること、またそのサイトを含まない Ror1 プロモーター領域(転写開始点から上流に500 bp)では TNF- 刺激にตอบสนองしないことが明らかになった。以上の結果は、炎症性サイトカインによって活性化した NF- B が Ror1 プロモーターに直接的に結合して、その転写を活性化することを強く示唆している。

(5) 損傷した筋組織における炎症性サイトカインの役割

CTX 誘導骨格筋損傷モデルマウスに IL-1 および TNF- に対する中和抗体を投与し、炎症性サイトカインの作用を阻害したときの衛星細胞への効果を解析した。筋損傷時、衛星細胞は増殖することが知られており、本実験でもコントロール群における Pax7 陽性の衛星細胞の細胞数および Ki67 陽性の衛星細胞の細胞数が増加したことから確認できた。一方、中和抗体を投与された群においては Pax7 陽性および Ki67 陽性の衛星細胞の増殖は阻害されていた。この結果から、炎症性サイトカインは衛星細胞の増加に必要であることが示唆された。

(6) 損傷した筋組織における Ror1 の役割

炎症性サイトカイン誘導による衛星細胞の増殖に Ror1 が関与しているかを調べるために、Ror1 をノックダウンした C2C12 細胞を用いて TNF- 刺激時の細胞増殖について検討した。その結果、コントロールの細胞では、TNF- 刺激によって Ki67 陽性細胞の細胞数は増加することが確認できた。一方、Ror1 ノックダウン細胞では、Ki67 陽性細胞の細胞数増加は阻害されていた。この結果から、炎症性サイトカインによる筋芽細胞の増殖において Ror1 は必要であることが示唆された。さらに、衛星細胞特異的な Ror1 ノックアウトマウスを用いて筋損傷時における衛星細胞の増殖を検討した。その結果、Ror1 ノックアウト衛星細胞では、衛星細胞の増殖がコントロールマウスのそれと比較して減弱していることが明らかになった。

以上の結果から、骨格筋の損傷時に Ror1 は衛星細胞において炎症性サイトカイン・NF- B 経路により発現が誘導され、衛星細胞の増殖に重要な役割を担っていることが明らかになった。

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0件)

[学会発表](計3件)

Koki Kamizaki, Ryosuke Doi, Takeshi Saji, Mitsuharu Endo, Motoi Kanagawa, So-ichiro Fukada, Tatsushi Toda, Makoto Hayashi, Yasuhiro Minami 「Crucial role of the Ror-family receptor tyrosine kinases in regulating tissue stem cells」 Trans-Pacific Network for Drug Discovery and Identification of New Therapeutic Targets Kick-off Symposium, 2016年3月22日, 神戸

紙崎 孝基, 土井 亮助, 加藤 英, 佐事 武, 遠藤 光晴, 金川 基, 戸田 達史, 深田 宗一朗, 林 真琴, 南 康博 「TNF- によって誘導された Ror1 は筋芽細胞の増殖を促進する」 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月3日, 神戸

林 真琴, 南 康博 「筋再生における Ror1 の役割」 第16回運動器科学研究会, 2015年9月11日, 鹿児島

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 真琴 (HAYASHI, Makoto)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50722930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし