

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19018

研究課題名(和文)細胞内代謝に基づいた骨格筋幹細胞制御機構およびその移植能を向上させる因子の解明

研究課題名(英文) Identification of novel molecules that improve the transplantation efficiency of muscle stem cells based on their intracellular metabolic state

研究代表者

伊藤 尚基 (Ito, Naoki)

東京大学・医科学研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：50746534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー等の重篤な進行性筋ジストロフィー患者の失われた骨格筋組織を再生させ、筋収縮力を回復させる再生医療に有望な移植元と考えられている。しかし、筋衛星細胞は機能的に不均一な集団であり、細胞移植後に生着するのは、筋衛星細胞のごく一部の集団だけである。申請者は細胞内の代謝酵素に注目することで、不均一な筋衛星細胞からその一部の上位位位の幹細胞を単離/同定する手法を確立している。本研究はより上位位位の幹細胞の分子的な背景を元に、筋衛星細胞の移植能を向上させる分子を同定・解析することで、筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の発展を目指した。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of muscle stem cell is one of the promising therapy for several muscle diseases, including Duchenne muscular dystrophy. Satellite cells are the tissue-specific stem cells in skeletal muscle that provide an important cell source for transplantation therapy. However, because satellite cells are composed of functionally heterogeneous population, only a small proportion of satellite cells are engraftable in transplanted muscle, which limit the potential of cell transplantation therapy. We developed the novel technology to separate functionally heterogeneous populations based on their intracellular metabolic state. In this study, we aim to identify novel molecules that improve the transplantation efficiency of satellite cells based on the molecular background of more undifferentiated stem cells. Our study will contribute to the development of new approach for cell transplantation therapy.

研究分野：骨格筋

キーワード：骨格筋 幹細胞 筋衛星細胞 細胞移植治療

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞は、筋の修復/再生、成長/肥大、萎縮、老化など、様々な適応現象に関与する。しかし、筋衛星細胞は均一的な幹細胞として振舞うわけではなく、一部の集団のみが自己複製能を持ち、移植可能なより上位の幹細胞として働くことが示唆されている (Zammit *et al.*, *J Cell Sci*, 2008)。

筋ジストロフィーなどの遺伝性筋疾患に対する治療法の一つとして細胞移植治療は考えられている。しかし、細胞移植時に生着する筋衛星細胞の割合が非常に低いことが問題となっている。不均一な集団から移植可能なより上位の幹細胞を単離/同定し、その分子的背景を明らかにすることは、筋衛星細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の発展に必要不可欠である。しかし、不均一な集団を分離し、より未分化な筋衛星細胞を標識するマーカーは同定されていない。

2. 研究の目的

筋衛星細胞は通常は静止期にあり、静止期筋衛星細胞および活性化筋衛星細胞における網羅的遺伝子発現解析の結果が示されている (Fukada *et al.*, *Stem Cells*, 2007. Pallafacchina *et al.*, *Stem Cell Res*, 2010)。

これらの過去のデータベースに加え、本研究では、筋衛星細胞の不均一性と関連のある代謝酵素の探索によって得られた網羅的遺伝子発現解析の結果、およびマイクロ RNA 発現解析の結果を元に、より未分化な筋衛星細胞で高発現・低発現する分子を同定・解析することを目的とした。特に、筋衛星細胞の細胞移植元としての機能を向上させる成長因子およびその受容体を明らかにすることにより、将来的な筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の発展へと繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

既に得られている網羅的遺伝子発現解析、およびマイクロ RNA 発現解析のデータベースを元に、より未分化な筋衛星細胞に高発現もしくは低発現している遺伝子を *in silico* において解析し、得られた候補分子を *in vitro* において解析し、筋衛星細胞の細胞移植元としての機能を向上させる候補分子を同定した。

また、*in vitro* において同定した候補分子を元に、主に *in vivo* での細胞移植系を用いることで、筋衛星細胞の移植能を向上させる因子を同定した。

4. 研究成果

筋衛星細胞の細胞移植元としての機能を向上させる候補分子を探索した結果、Leukemia inhibitory factor (LIF) 受容体が未分化な筋衛星細胞に高発現しているこ

とに注目した。筋衛星細胞を *in vitro* において LIF 処理した結果、未分化マーカーである Pax7 の発現が上昇し、分化マーカーである Myogenin の発現低下傾向が認められた。

LIF の細胞移植能向上効果を *in vivo* において検証するため、LIF 処理した筋衛星細胞を移植した。免疫不全である NOD-Scid マウス、もしくはデュシェンヌ筋ジストロフィーの原因遺伝子であり、ジストロフィンを欠損している *mdx* マウスをレシピエントとした結果、LIF 処理により、より多くの GFP 陽性筋線維およびジストロフィン陽性筋線維を形成することが明らかとなった。また、この移植筋線維数の増加は、移植筋内における移植細胞のアポトーシスが抑制されたためと考えられた。

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6件)

Noriaki Shimizu, Takako Maruyama, Noritada Yoshikawa, Ryo Matsumiya, Yanxia Ma, Naoki Ito, Yuki Tasaka, Akiko Kuribara-Souta, Keishi Miyata, Yuichi Oike, Stefan Berger, Gunther Schutz, Shin'ichi Takeda, Hirotohi Tanaka. A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodeling. *Nature Communications*. 査読有、6. 2015. Article6693.

DOI: 10.1038/ncomms7693

Nozomi Hayashiji, Shinsuke Yuasa, Yuko Miyagoe-Suzuki, Mie Hara, Naoki Ito, Hisayuki Hashimoto, Dai Kusumoto, Tomohisa Seki, Shugo Tohyama, Masaki Kodaira, Akira Kunitomi, Shin Kashimura, Makoto Takei, Yuki Saito, Shinichiro Okata, Toru Egashira, Jin Endo, Toshikuni Sasaoka, Shin'ichi Takeda, Keiichi Fukuda. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy *Nature Communications*. 査読有、6. 2015. Article6745.

DOI: 10.1038/ncomms7745

Ishii Kana, Nobuharu Suzuki, Yo Mabuchi, Naoki Ito, So-ichiro Fukada, Hideyuki Okano, Shin'ichi Takeda, Chihiro Akazawa. Muscle Satellite Cell Protein Teneurin-4 Regulates Differentiation during Muscle Regeneration. *Stem Cells*. 査読有、33. 2015. 3017-27.

DOI: 10.1002/stem.2058

Miki Shimbo, Takashi Kudo, Michito Hamada, Hyojung Jeon, Yuki Imamura, Keigo Asano, Risa Okada, Yuki Tsunakawa, Seiya Mizuno, Ken-ichi Yagami, Chihiro Ishikawa, Haiyan Li, Takashi Shiga, Junji Ishida, Juri Hamada, Kazuya Murata, Tomohiro

Ishimaru, Misuzu Hashimoto, Akiyoshi Fukamizu, Mutsumi Yamane, Masahito Ikawa, Hironobu Morita, Masahiro Shinohara, Hiroshi Asahara, Taishin Akiyama, Nobuko Akiyama, Hiroki Sasanuma, Nobuaki Yoshida, Rui Zhou, Ying-Ying Wang, Taito Ito, Yuko Kokubu, Taka-aki K. Noguchi, Hisako Ishimine, Akira Kurisaki, Dai Shiba, Hiroyasu Mizuno, Masaki Shirakawa, Naoki Ito, Shin'ichi Takeda, and Satoru Takahashi. Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. *Experimental Animals*. 査読有、 **65**. 2016. 175-187.

DOI: 10.1538/expanim.15-0077

Naoki Ito, Shimizu Noriaki, Hirotohi Tanaka, Shin'ichi Takeda. Enhancement of satellite cell transplantation efficiency by leukemia inhibitory factor. *Journal of Neuromuscular Diseases*. 査読有、 **3**. 2016. 201-207.

DOI: 10.3233/JND-160156

Yoshitsugu Aoki, Raquel Manzano, Yi Lee, Ruxandra Dafinca, Misako Aoki, Andrew G. L. Douglas, Miguel A. Varela, Chaitra Sathyaprakash, Jakub Scaber, Paola Barbagallo, Pieter Vader, Imre Mäger, Kariem Ezzat, Martin R. Turner, Naoki Ito, Samanta Gasco, Norihiko Ohbayashi, Samir El Andaloussi, Shin'ichi Takeda, Mitsunori Fukuda, Kevin Talbot, Matthew J. A. Wood. C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain*. 査読有、 **140**. 2017. 887-897.

DOI: 10.1093/brain/awx024

〔学会発表〕(計9件)

伊藤 尚基、清水 宣明、田中 廣壽、武田 伸一、Ca²⁺シグナルによって誘起される mTOR の活性化が筋肥大を促進する。第 33 回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会企画シンポジウム 筋・腱・靭帯シンポジウム(招待講演)、2015 年 7 月 25 日、新宿京王プラザホテル(東京都・新宿区)

吉川 賢忠、細野 治、上原 昌晃、小田 彩、小林 弘、松宮 遼、松原 絵里佳、清水 宣明、栗原 明子、丸山 崇子、田坂 有希、馬場 洋行、伊藤 尚基、村上 努夢、桐生 茂、田中 廣壽、リウマチ膠原病患者におけるステロイド誘発性筋萎縮の定量的解析、第 1 回日本筋学会学術集会、2015 年 8 月 8 日、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

清水 宣明、丸山 崇子、栗原 明子、田坂 有希、伊藤 尚基、吉川 賢忠、田中 廣壽、エネルギー代謝制御における骨格筋-肝臓-脂肪組織間シグナル、第 1 回日本筋学会学術集会、2015 年 8 月 8 日、国立研究開発法人 国

立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

伊藤 尚基、清水 宣明、田中 廣壽、武田 伸一、負荷依存的な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇および mTOR の活性化が筋肥大を促進する、第 29 回宇宙生物科学大会(招待講演)、2015 年 9 月 28 日、帝京大学(東京都板橋区)

Shimizu N, Tasaka Y, Ito N, Yoshikawa N, Tanaka H, Adaptive Adipose Remodeling via Muscle-Liver-Fat Signaling Axis. Keystone Symposia 2016 "Metabolism, Transcription and Disease" (国際学会)、2016 年 1 月 13 日、Snowbird, Utah(アメリカ合衆国)

清水 宣明、伊藤 尚基、武田 伸一、田中 廣壽、骨格筋量調節機構に肥満が及ぼす影響の解析、東京大学医科学研究所-千葉大学真菌医学研究センター 共同利用・共同研究所点事業 平成 27 年度成果報告会、2016 年 3 月 15 日、東京大学医科学研究所(東京都・港区)

谷端 淳、永田 哲也、伊藤 尚基、齋藤 崇、青木 吉嗣、中村 昭則、南沢 亨、Ruegg T Urs、武田 伸一、Sarcoplipin deletion ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by increasing SERCA activity、第 2 回日本筋学会学術集会、2016 年 8 月 5 日、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

伊藤 尚基、清水 宣明、田中 廣壽、武田 伸一、筋衛星細胞の不均一性の解析に基づいた骨格筋前駆細胞誘導法の開発、第 2 回日本筋学会学術集会(招待講演)、2016 年 8 月 6 日、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

福岡 聖之、伊藤 尚基、武田 伸一、北條 浩彦、若齢および老齢マウスの血中 miRNA 解析：若齢マウスで見いだされた高発現 miRNA が C2C12 細胞およびマウス初代筋芽細胞に与える筋分化誘導効果、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

〔図書〕(計2件)

伊藤 尚基、武田 伸一、医歯薬出版株式会社、メカノバイオロジーからメカノメディスンへ(メカニカルストレスと骨格筋肥大・筋萎縮)、2016、1326(979-984)

伊藤 尚基、谷端 淳、武田 伸一、羊土社、マウス表現型解析スタンダード(骨格筋の表現型解析)、2016、347(169-176)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

アレルギー免疫科・免疫学治療学分野 東京大学 医科学研究所 附属病院

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp//rheumatol/allergy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 尚基 (ITO, Naoki)

東京大学 医科学研究所 附属病院 アレルギー
免疫科 学術振興会特別研究員 PD

研究者番号：5 0 7 4 6 5 3 4