

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03262

研究課題名(和文)骨格筋幹細胞の維持基盤に基づいた、運命決定機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cell fate determination mechanism of skeletal muscle stem cells

研究代表者

深田 宗一郎 (FUKADA, So-ichiro)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：20432445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋サテライト細胞の運命決定に働く、分子の検討を行った。カルシトニン受容体に関しては下流のが本質的なシグナル経路を明らかにした(論文投稿中)。Hey1/Lは、別のNotchシグナルのeffector分子であるHes1とそれぞれヘテロダイマーを形成し筋サテライト細胞の未分化維持に働いていることを証明した(Development 2019)。Nrf2に関する細胞外マトリックスを構成する基底膜からのシグナルと共にNrf2を介した経路が筋サテライト細胞の生存維持に働いている可能性を示した(J. Cell. Physiol., 2019)

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋幹細胞である、筋サテライト細胞は筋発生・再生に必須の細胞であり、成体においては、休止期・未分化状態で維持されている。我々はこれまでにカルシトニン受容体(CalcR)が休止期の維持に働き、Hey1/L(古典的Notchシグナルのエフェクター分子)が未分化状態の維持に必須であることを明らかにしてきた。本申請課題においては、申請者のこれまでの成果をさらに発展させることで、筋サテライト細胞の運命を制御するシグナル経路が見えてきた。これらの成果はiPS細胞などからの筋幹細胞分化系に応用ができ、筋ジストロフィーや筋萎縮疾患などの発症解明、治療法開発にやくにたつ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined three molecules regulating the cell fate decision of muscle satellite cells. We clarified the downstream signaling pathway of calcitonin receptor (in revision). We also demonstrated that Hey1/HeyL forms heterodimers with Hes1, an effector molecule of Notch signaling, which functions to maintain undifferentiated state of muscle satellite cells (Development 2019). Regarding Nrf2, we showed Nrf2-mediated pathway allow muscle satellite cells to survive without basal lamina-mediated signaling (J. Cell. Physiol., 2019).

研究分野：筋生理学、幹細胞生物学

キーワード：筋サテライト細胞 カルシトニン受容体 Notch Nrf2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、骨格筋幹細胞 (MuSC: Muscle stem cells) の単離・特徴付け・特異遺伝子の同定・機能解析を通して、MuSC の二つの維持機構を明らかにしてきた。1 つが Notch-Hey 経路の未分化性維持機構であり、2 つ目がカルシトニン受容体シグナルによる静止期・局在維持である。

これまでの成果により、新しく解明すべき 3 つの課題が出てきた。一つ目の課題は、MuSC の未分化性に関する課題である。古典的 Notch シグナルの下流として Hey1 と HeyL の必須であることは MuSC 特異的な Hey1/HeyL 二重欠損マウスの解析から明らかである。しかし、in vitro における MyoD (筋分化決定因子) の強い発現抑制作用は Hey1 にしかない。また、抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 の発現誘導作用も Hey1 にしかないが、in vivo MuSC においては、Hey1 と HeyL が同時に欠損した時にのみ Nrf2 の発現抑制が観察される。なぜ in vivo と in vitro での違いが生まれるのか今のところ明確な答えは持っていなかった。

二つ目の新たな課題として Nrf2 欠損マウスの表現型が挙げられる。申請者は Notch-Hey1/L の下流に Nrf2 が存在することを明らかにした。Nrf2 は抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターであり、数多くの抗酸化遺伝子の発現制御に働いている。実際、MuSC においても、Nrf2 欠損マウスでは、Nrf2 の標的に抗酸化遺伝子群の発現低下が観察された。しかし、MuSC の維持や筋再生には全く影響がなかった。これらの結果は、MuSC や筋再生において Nrf2 は必要でない結果を示唆したが、Nrf2 欠損 MuSC を採取し、培養を行ったところ、全く細胞が増えて来なかった。この結果は、Nrf2 が in vitro で生存・増殖する際には必須であるのに対して、in vivo での生存・増殖には関係ない矛盾した結果となった。興味深いことに Hey1/HeyL 二重欠損 MuSC も in vitro での生存がわるいが、in vivo では細胞死は誘導されない。

三つ目が MuSC のカルシトニン受容体を介した静止期・局在を制御する分子スイッチについてである。申請者は MuSC の静止期・局在維持においてカルシトニン受容体が生理的に働いていることを明らかにした。MuSC 特異的にカルシトニン受容体を欠損させると細胞周期関連遺伝子の発現が亢進する。しかしこれらの中で静止期と活動期状態を決定している「分子スイッチ」が何であるかは不明である。本申請課題では、これら疑問に答える為に研究計画を立案し、実施した。

## 2. 研究の目的

本申請課題では加齢性筋萎縮等の筋疾患治療法開発を最終目的として、下記の 3 つの MuSC の運命決定機構の解明を目的に検討を行った。

- ① MuSC の「未分化性」における Notch シグナル effector 遺伝子 (Hey1/L) の in vivo と in vitro での表現型の違い。
- ② Notch-Hey1/L により制御される Nrf2 の欠損 MuSC の in vivo と in vitro での「生存」の劇的な違い。
- ③ MuSC の静止期から活動期への移行を抑制しているカルシトニン受容体下流の「活性化ブレーキ」の正体で。

## 3. 研究の方法

①の目的達成のために、ドキシサイクリン誘導性の Hey1、HeyL、Hes1 単独、または Hey1-Hes1、HeyL-Hes1 同時に発現する C2C12 細胞を作成し、ChIP-seq を行い・解析を行った。さらに研究分担者の光クロスリンク技術を用いて、Hey1、HeyL、Hes1 間のヘテロダイマー形成能力について検討を行った。

②の目的達成のために、In vitro における Nrf2 欠損 MuSC の低生存率の原因及び、Nrf2 欠損筋ジスマウスの作成・解析を行った。単一筋線維培養法、単離 MuSC を用いた実験を行い、Nrf2 欠損 MuSC の低生存率の原因が基底膜の存在であると予想されたため、基底膜を破壊する筋再生モデルを確立し、検討を行った。

③の目的達成のために、タモキシフェン誘導型の PKA-tg と MuSC 特異的なカルシトニン受容体欠損マウスを交配し、PKA によるレスキュー実験を行った。さらに、PKA の標的がもっとも有名な CREB ではないことが明らかとなったため、PKA の CREB 以外の標的に関する検討も進めた。

## 4. 研究成果

本申請課題においては、休止期の維持に働く CalcR の下流経路についての検討を行い、カルシトニン受容体-Protein Kinase A (PKA) が MuSC の休止期維持の本質的なシグナル経路であることを条件付き遺伝子改変動物の複数の組み合わせにより明らかにした。本成果は現在、論文投稿中である。また加齢とカルシトニン受容体の発現についても

Hey1/L に関しても条件付き遺伝子改変動物の複数の組み合わせにより Hey1 と HeyL が MuSC に置いて cell autonomous かつ redundant に働いていることを明らかにし、別の Notch シグナ

ルの effector 分子である Hes1 とそれぞれヘテロダマーを形成し MuSC の維持に働いていることを証明した。特に HeyL に関しては Hes1 とのヘテロダイマー形成により、広範囲かつ強力に DNA に結合できるようになることが明らかとなった。これら成果は本年度に論文発表することができた (Development 2019)。

抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 を欠損したマウスでは、*in vivo* での筋再生能力に異常が見られない。しかし、成体から単離した MuSC は培養系において生存することができない。この *in vivo* と *in vitro* の表現型の矛盾を解明すべく、本課題において実施したところ、細胞外マトリックスを構成する基底膜からのシグナルと共に Nrf2 を介した経路が MuSC の生存維持に働いており、基底膜を除去する筋再生モデルでは、Nrf2 欠損は重篤な筋再生不全を示すことが明らかになった。本成果も、本年度論文として発表した (J. Cell. Physiol., 2019)

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Zhang L, Zhou H, Hashimoto H, Okamura K, **Fukada S\***  
Reduced expression of calcitonin receptor is closely associated with age-related loss of the muscle stem cell pool  
**J. Cachexia. Sarcop. Muscle. Rapid Commun 2019** in press

Noguchi YT, Nakamura M, Hino N, Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, **Fukada S\***. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites.  
**Development.** 146(4). pii: dev163618. 2019

Takemoto Y, Inaba S, Zhang L, Tsujikawa K, Uezumi A, **Fukada S\***. Implication of basal lamina dependency in survival of Nrf2-null muscle stem cells via an anti-oxidative-independent mechanism.  
**J. Cell. Physiol.** 2019, 234(2):1689-1698

Inaba S, Hinohara A, Tachibana M, Tsujikawa K, **Fukada S\***.  
**PLoS One.** 2018; 13(10):e0205467

Baghdadi MB, Castel D, Machado L, **Fukada S**, Birk DE, Relaix F, Tajbakhsh S, Mourikis P. Reciprocal signalling by Notch–Collagen V–CALCR retains muscle stem cells in their niche  
**Nature.** 2018; 557:714-718

**Fukada S\*** ; The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy, and hypertrophy  
**Journal of Biochemistry,** 2018, 5:353-8

Sakai H<sup>#</sup>, Fukuda S<sup>#</sup>, Nakamura M, Uezumi A, Noguchi Y, Sato T, Morita M, Yamada H, Tsuchida K, Tajbakhsh S\*, **Fukada S\***. Notch ligands regulate the muscle stem-like state *ex vivo* but are not sufficient for retaining regenerative capacity  
**PLoS One** 2017, 12(5):e0177516.

〔学会発表〕(計18件)

6<sup>th</sup> Myology 2019, Plenary session, 「Translational Myology」 Expression and functional analyses of Dlk1 in muscle stem cells and mesenchymal progenitors during muscle regeneration, **So-ichiro Fukada**, Bordeaux, France 2019年3月26日

第18回日本再生医療学会総会 シンポジウム34 「骨格筋再生を制御する細胞間ネットワークの解明と筋疾患に対する細胞移植治療への応用」骨格筋幹細胞の制御機構、**深田宗一朗**, 神戸国際会議場、神戸 2019年3月23日

愛媛大学医学部 PROSセミナー **深田宗一朗**, 松山、愛媛 2019年1月30日

- 第41回日本分子生物学会 ワークショップ3AW-11筋骨格系組織のジャンクション形成と維持における分子メカニズム「Notchとカルシトニン受容体による筋幹細胞維持メカニズム」深田宗一郎, パシフィコ横浜、神奈川 2018年11月30日
- 第60回歯科基礎医学会学術大会 シンポジウム「骨格筋幹細胞維持の基盤メカニズム」深田宗一郎, 九州大学 2018年9月5日
- 第4回日本筋学会学術集会 シンポジウム2 骨格筋の可塑性と再生能を支える筋衛星細胞とエピジェネティック制御「筋肥大時における骨格筋幹細胞の増殖メカニズム」深田宗一郎, 川崎医科大学, 倉敷, 2018年8月10日
- FASEB Science Research Conferences, So-ichiro Fukada, Sumiaki Fukada, 「Calcitonin receptor signaling maintains muscle stem cells in quiescent state through PKA-dependent Hippo pathway regulation」 **Oral presentation**, Colorado, USA, 2018年7月9日
- 11th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy' 「Muscle stem cells and muscle hypertrophy」So-ichiro Fukada, NCNP、Tokyo、2018年6月16日
- Muscle 2018, So-ichiro Fukada, Lidan Zhang, Yu-taro Noguchi. 「Calcitonin receptor signaling maintains muscle stem cells in quiescent state through PKA-dependent Hippo pathway regulation」 **Oral presentation**, Berlin, Germany, 2018年4月24日
- 第17回日本再生医療学会総会 シンポジウム15「骨格筋維持・再生メカニズムの解明と、筋疾患に対する再生医療への応用ー骨格筋幹細胞の静止期と活性化ー」深田宗一郎, パシフィコ横浜、神奈川 2018年3月21日
- AMED-Crest 招待講演「筋幹細胞と筋肥大 メカノバイロロジー研究との接点」深田宗一郎, 緑の風 リゾート北湯沢、北海道 2017年9月11日
- 第35回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会シンポジウム3 筋・腱・靭帯シンポジウム「筋肥大時における骨格筋幹細胞の活性化・増殖メカニズム」深田宗一郎, 博多, ホテル日航福岡, 2017年7月28日
- 九州大学医学部 第9回筋生理研究会 招待講演「筋幹細胞維持メカニズム研究と筋肥大」深田宗一郎, 博多, 福岡, 2017年5月11日
- 神戸大学医学部 シグナル伝達医学研究展開センター主催セミナー 「骨格筋幹細胞の維持メカニズムと筋肥大」深田宗一郎, 神戸, 兵庫 2017年4月21日
- 第62回日本宇宙航空環境医学会大会・日本宇宙生物科学会第30回大会 合同ワークショップ3, 「筋幹細胞は筋線維の質・量維持に貢献できるのか？」 深田宗一郎, 愛知医科大学, 愛知, 2016年10月15日
- 東京大学 医科学研究所, 学友会セミナー、「骨格筋幹細胞と筋の恒常性維持」東京大学 医科学研究所, 東京, 2016年9月30日
- FASEB Science Research Conferences, So-ichiro Fukada, Miki Nakamura, Masanobu Hino, Yu-taro Noguchi 「The undifferentiated state of muscle stem cells by Notch effector genes」 Poster presentation、Colorado, USA, 2016年7月26日
- 第34回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会シンポジウム5 筋・腱・靭帯シンポジウム 「骨格筋の量・質と幹細胞」深田宗一郎, 大阪国際会議場, 大阪 2016年7月23日

〔図書〕(計6件)

細山 徹, 深田宗一郎: 「骨格筋特異的Creドライバーマウスの特徴と

骨格筋研究への利用」

**実験医学**、増刊号、2018;36(7):215-219

吾郷由紀夫, **深田宗一郎**:「骨格筋活動と精神疾患」

**実験医学**、増刊号、2018;36(7):138-142

竹本裕政, **深田宗一郎**:「筋幹細胞の維持機構解明から制御へ」

**実験医学**、増刊号、2018;36(7):96-101

**深田宗一郎**:「Over view 筋発生・再生研究のめざす先」

**実験医学**、増刊号、2018;36(7):79-81

野口裕太郎, **深田宗一郎**:「筋の発生と再生メカニズムの解明」

**Clinical Calcium** 2018;28(3):329-333.

竹本裕政, **深田宗一郎**:「筋衛星細胞の維持機構及び加齢性筋萎縮への関与」

**Clinical Calcium** 2017;27(3):339-344

〔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 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<https://fukada88.wixsite.com/mysite>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 : 樋野 展正

ローマ字氏名 : Hino Nobumasa

所属研究機関名 : 大阪大学

部局名 : 薬学研究科

職名 : 助教

研究者番号 ( 8 桁 ) : 90469916

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。