

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16597

研究課題名(和文)サルコペニアにおける筋衛星細胞数の減少メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of the novel mechanism of satellite cell number reduction in sarcopenia

研究代表者

林 晋一郎 (Hayashi, Shinichiro)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第一部・室長

研究者番号：10732381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋中の幹細胞である筋衛星細胞は、加齢に伴ってその数や機能が低下する。Klf5は筋分化に必須の転写因子であるが、Klf5を恒常的に過剰発現させたC2C12は細胞増殖を停止し、老化細胞の特徴であるSA-Gal陽性を示した。Klf5の過剰発現細胞では、MyoDやMyHCなどの筋関連因子や細胞周期関連因子の発現が減弱した。一方、細胞増殖抑制因子であるp21の発現が上昇した。これらの結果から、骨格筋細胞において、Klf5は細胞増殖に対して抑制的に働き、加齢によるKlf5発現の制御異常はp21の発現上昇を介した細胞老化や線維芽細胞様細胞への形質転換を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Satellite cells, a stem cell population in skeletal muscle, are essential for muscle regeneration. It has been reported that the number of satellite cells and its regenerative capacity declines during aging. We have recently reported that Klf5 is induced during myoblast differentiation and promotes muscle specific gene expression during myogenesis. Here, we observed Klf5 is also weakly expressed in proliferating myoblasts. Klf5 overexpression in C2C12 myoblasts promoted cell cycle arrest and cellular senescence as demonstrated SA-Gal staining. RNA-seq and gene ontology analysis revealed that muscle related- and cell cycle related genes were downregulated by Klf5 overexpression. In addition, Klf5 overexpression induced upregulation of p21. Therefore, these results suggest regulation of KLF5 expression in muscle may be disrupted during aging, and which leads to cellular senescence or promotes a myogenic to fibrogenic fate conversion in satellite cell.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 筋衛星細胞 サルコペニア 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは、加齢に伴う筋量と筋機能の低下と定義される。サルコペニアでは、骨格筋を構成する細胞である筋線維の数および筋線維径が減少し、筋萎縮が起こる。筋線維は多核の最終分化した細胞であり、筋線維が細胞分裂を行うことは無いが、骨格筋中の幹細胞である筋衛星細胞がその役割を担う。筋組織が損傷を受けると、休止状態にあった筋衛星細胞が活性化し、増殖・分化してやがて新しい筋線維として置き換わる。また、筋衛星細胞は自己複製能を有し、骨格筋中の筋衛星細胞数を一定に保つことで次の損傷へと備える。サルコペニアでは、老化に伴う筋衛星細胞の数の減少と活性化率、および筋分化能が低下し、筋再生効率が低下することが報告されている(引用文献)。しかしながら、なぜ老化骨格筋では筋衛星細胞の数や機能低下が起こるのか、そのメカニズムの全容は明らかではない。我々は、筋分化・再生過程において、ストレスによって誘導される転写因子 Klf5 が骨格筋の分化を正に制御することを近年報告した(引用文献)。Klf5 は筋分化過程で一過性に発現した後、再び減弱する。このことから、Klf5 の発現が時空間的に厳密に制御されており、それによって骨格筋の分化や恒常性が保たれることが考えられた。筋芽細胞株 C2C12 に Klf5 を過剰発現させると、C2C12 は細胞増殖マーカーである Ki67 を発現する細胞割合が減少した。さらに、Klf5 過剰発現細胞は巨大・扁平化し、その多くは老化細胞の特徴である SA-βGal 陽性であった。以上の結果から、サルコペニアでは Klf5 の制御異常によって筋衛星細胞での Klf5 の発現が亢進し、持続的に Klf5 が発現した結果、細胞老化により筋衛星細胞数の減少や機能低下が起こるのではないかと仮説を立てた。これまでに、骨格筋中の Klf5 の発現量は加齢にともなって上昇することが報告されており(引用文献)。若齢および老齢マウス骨格筋から筋衛星細胞をフローサイトメーターにより単離し、Klf5 の発現を解析したところ、予想通り老齢マウスの筋衛星細胞では、若齢マウスと比べ Klf5 の発現が亢進している事を見出した。

2. 研究の目的

上記のような研究結果を踏まえ、本研究では Klf5 によって引き起こされる筋細胞の細胞老化機序を明らかにし、サルコペニアにおける筋衛星細胞減少メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋衛星細胞の分化過程における Klf5 の発現解析

8 週齢の野生型マウスより筋衛星細胞を単離し、増殖培地(20% ウシ胎児血清を含む

DMEM) で培養した。増殖培地で培養した筋衛星細胞と分化誘導培地(2% ウマ血清を含む DMEM) で 2 日間分化誘導処理を行った筋細胞について、免疫染色法を行い、筋衛星細胞の分化過程における Klf5 の発現を解析した。

(2) Klf5 による筋細胞の老化誘導機序の解析

Klf5 過剰発現筋芽細胞の細胞周期解析

C2C12 細胞にレトロウイルスベクターによって Klf5 を過剰発現させ、Klf5 導入後 4 日目の細胞における Ki67 の発現を免疫蛍光染色法によって解析した。また、同様に Klf5 を過剰発現した 4 日目の C2C12 細胞について、BrdU を処理後、フローサイトメーターによって Klf5 発現による細胞周期の変化を解析した。

Klf5 過剰発現筋芽細胞での発現変動遺伝子の網羅的解析

Klf5 を過剰発現した C2C12 細胞について、導入後 2 日目と 4 日目の細胞から RNA を抽出し、Klf5 の過剰発現によって発現変動した遺伝子を RNA-sequence 法(RNA-seq)によって網羅的に解析した。

(3) Klf5 過剰発現筋芽細胞の表現型解析

Klf5 導入後 8 日間培養した C2C12 細胞を分化培地で分化誘導し、筋特異的転写因子 MyoD1 の発現、ミオシン重鎖(MyHC)の発現 α-Smooth Muscle Actin (αSMA)の発現を免疫染色法によって解析した。

4. 研究成果

(1) 筋衛星細胞の分化過程における Klf5 の発現解析

筋衛星細胞を野生型マウスより単離し、初代培養を行った。Klf5 蛋白質の発現は分化誘導とともに上昇し、筋衛星細胞が融合した筋管細胞の成熟にともなって低下した。一方、増殖期の筋衛星細胞のうち、75%の細胞は弱く Klf5 を発現していた。このことから、Klf5 は分化融合後の筋芽細胞だけでなく、増殖期の筋衛星細胞や筋芽細胞でも何らかの機能を有することが示唆された。

(2) Klf5 による筋細胞の老化誘導機序の解析

Klf5 過剰発現筋芽細胞の細胞周期解析

そこで、Klf5-GFP を発現するレトロウイルスベクターを作成し、Klf5 を筋芽細胞株 C2C12 に過剰発現させた。Klf5 過剰発現 C2C12 は、コントロール細胞と比較してレトロウイルスの感染後 4 日目から扁平な形態を示すものが現れ、8 日目では約 50%の細胞が扁平で巨大な形態を示した。SA-βGal の染色を行ったところ、これらの形態異常を示した細胞は

SA-βGal 陽性を示し、細胞老化を起こしていた (図 1)。

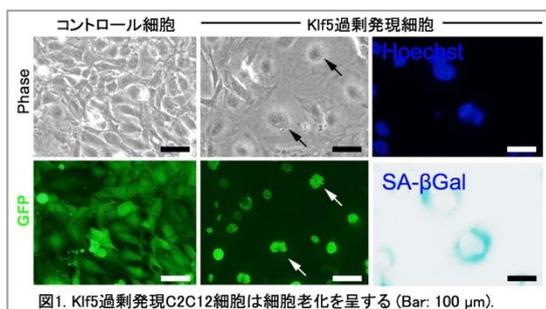


図1. Klf5過剰発現C2C12細胞は細胞老化を呈する (Bar: 100 μm)。

次に、これらの細胞における細胞増殖を解析するため、細胞増殖マーカーである Ki67 による染色を行った。その結果、感染後 4 日目の殆どの細胞において Ki67 が陰性となり、細胞増殖を停止していることが明らかとなった。そこで、コントロール/Klf5 ウィルスベクター感染後 4 日目の細胞に BrdU を取り込ませ、フローサイトメーターによって細胞周期の解析を行った。その結果、コントロールの細胞と比較して Klf5 過剰発現細胞は S 期の細胞数が減少し、G0/G1 期と G2/M 期の細胞の割合が増加した (図 2)。

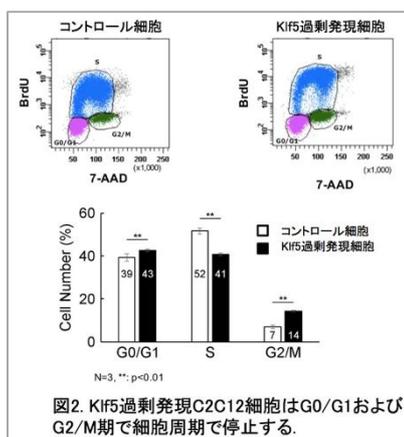


図2. Klf5過剰発現C2C12細胞はG0/G1およびG2/M期で細胞周期で停止する。

これらの結果から、Klf5 の過剰発現により、筋芽細胞は細胞周期を停止し、細胞老化を引き起こすことが明らかとなった。

Klf5 過剰発現筋芽細胞での発現変動遺伝子の網羅的解析

コントロールおよび Klf5 過剰発現 C2C12 細胞から RNA を抽出し、RNA-seq を行った。発現変動した遺伝子のうち、過剰発現後 2 日目に Klf5 によって 2 倍以上発現が低下した遺伝子を Gene ontology (GO) 解析したところ、Muscle system process や Muscle structure development, Muscle Cell development といった骨格筋の発生や構造に関する遺伝子群の発現が低下していることが明らかとなった。一方、Klf5 過剰発現後 4 日目の筋芽細胞において、Cell Cycle、Cell cycle phase transition、G2/M transition of mitotic cell cycle など細胞周期関連因子の発現が有意に低下した。

次に細胞老化誘導因子として知られる Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) である p21 (*Cdkn1a*) と p16 (*Cdkn2a*) の発現を定量的 PCR 法によって解析した。その結果、*Cdkn2a* の発現に変化は見られなかったが、*Cdkn1a* の発現量が Klf5 過剰発現細胞で増加していることが明らかとなった。

以上の結果から、Klf5 の過剰発現によって筋芽細胞における p21 の発現が上昇し、細胞周期の停止および細胞老化を起こすことが考えられた。一方、Klf5 は筋関連因子の発現を MyoD や Mef2 と協調して促進する重要な働きを担っているにもかかわらず、Klf5 過剰発現 C2C12 細胞では筋関連遺伝子群の発現が減少していた。そこで、次に Klf5 過剰発現筋衛星細胞の表現型を解析することとした。

(3) Klf5 過剰発現筋芽細胞の表現型解析

Klf5 導入後 8 日間培養した C2C12 細胞を分化培地で分化誘導し、MyoD、MyHC、さらに αSMA の発現を免疫染色法によって解析した。その結果、Klf5 過剰発現細胞では骨格筋細胞マーカーである MyoD の発現が消失した。コントロール細胞においては分化誘導後に筋芽細胞が融合した MyHC 陽性の筋管が見られるが、Klf5 過剰発現細胞においては殆ど筋管形成が見られず、MyHC 陽性細胞数も減少した。一方、ストレスファイバー構造を伴う αSMA を発現した線維芽細胞様の形質を有する細胞が Klf5 過剰発現細胞群のみ出現した。

以上の結果から、Klf5 を過剰発現した筋芽細胞は筋細胞としての特徴を失い、線維芽細胞様の形質を獲得することが示唆された。

本研究の結果から、Klf5 の発現が骨格筋細胞で上昇すると、p21 の発現上昇を介して細胞周期が停止し、細胞老化を起こすこと、また Klf5 の発現が上昇した骨格筋細胞では、MyoD や MyHC の発現など、筋細胞としての特徴を失い、線維芽細胞様の特徴を獲得することが示唆された。これまでに、ヒト骨格筋において加齢に伴い Klf5 の発現量は上昇することが報告されている (引用文献)。また、マウス筋衛星細胞における Klf5 の発現も発生期から加齢に伴うことが報告されている (引用文献)。本研究の結果、およびこれらの報告から、加齢に伴い筋衛星細胞における Klf5 の発現が上昇した結果、筋衛星細胞の細胞老化、および筋衛星細胞から線維芽細胞様細胞へと形質転換が起こることにより筋衛星細胞数の減少や、機能低下が起こると考えられた。

一方、Klf5 によって p21 の発現が直接制御されているのか、あるいはその他のシグナルを介しているのか、また、in vivo においても Klf5 発現の制御異常によって筋衛星細胞の老化が起こるのかなど、不明な点も多く残されている。これらについては今後老齢マウスおよび筋衛星細胞特異的 Klf5 欠損マウスを用いて解析する予定である。

引用文献

Sousa-Victor P and Muñoz-Cánoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med.* 50:109-17, 2016.

Hayashi S, Manabe I, Suzuki Y, Relaix F, Oishi Y. Klf5 regulates muscle differentiation by directly targeting muscle-specific genes in cooperation with MyoD in mice. *Elife.* 5. pii: e17462, 2016.

Phillips BE, Williams JP, Gustafsson T, Bouchard C, Rankinen T, Knudsen S, Smith K, Timmons JA, Atherton PJ. Molecular networks of human muscle adaptation to exercise and age. *PLoS Genet.* 9:e1003389, 2013.

Alonso-Martin S, Rochat A, Mademtzoglou D, Morais J, de Reyniès A, Auradé F, Chang TH, Zammit PS, Relaix F. Gene Expression Profiling of Muscle Stem Cells Identifies Novel Regulators of Postnatal Myogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 4:58.2016.

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 4 件)

Inoue M, Iida A, Hayashi S, Mori-Yoshimura M, Nagaoka A, Yoshimura S, Shiraiishi H, Tsujino A, Takahashi Y, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S, Nishino I. Two novel VCP missense variants identified in Japanese patients with multisystem proteinopathy. *Hum Genome Var.* 5:9, 2018, 査読有. DOI 10.1038/s41439-018-0009-7.

Vallecillo-García P, Orgeur M, Vom Hofe-Schneider S, Stumm J, Kappert V, Ibrahim DM, Börno ST, Hayashi S, Relaix F, Hildebrandt K, Sengle G, Koch M, Timmermann B, Marazzi G, Sassoon DA, Duprez D, Stricker S. Odd skipped-related 1 identifies a population of embryonic fibro-adipogenic progenitors regulating myogenesis during limb development. *Nat Commun.* 8:1218, 2017, 査読有. DOI: 10.1038/s41467-017-01120-3.

Oishi Y, Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S, Okamura H, Manabe I. Bmal1 regulates inflammatory responses in

macrophages by modulating enhancer RNA transcription. *Sci Rep.* 7:7086, 2017, 査読有. DOI: 10.1038/s41598-017-07100-3.

Hayashi S, Manabe I, Suzuki Y, Relaix F, Oishi Y. Klf5 regulates muscle differentiation by directly targeting muscle-specific genes in cooperation with MyoD in mice. *Elife.* 5. pii: e17462, 2016, 査読有. DOI: 10.7554/eLife.17462.

〔学会発表〕(計 13 件)

林晋一郎. 骨格筋幹細胞の新規分化制御機構と筋疾患治療への応用. 第 54 回お茶の水疾患研究会, 2018 年 1 月 31 日, 東京ガーデンパレス (東京都 文京区)

林晋一郎, 真鍋一郎, 西野一三, 大石由美子. 骨格筋細胞の新規老化メカニズム解析. *ConBio2017*, 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)

林晋一郎. 筋衛星細胞の未分化性維持機構の解明と細胞移植治療への応用. 平成 29 年度「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」西野班 班会議, 2017 年 12 月 3-3 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)

Liu L, Hayashi S, Oishi Y. Klf5 is involved in the pathogenesis of muscle atrophy. *ConBio2017*, 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)

林晋一郎. 第 5 回 若手による骨格筋細胞研究会, 2017 年 11 月 13-14 日, 神戸大学医学部 神緑会館 (兵庫県 神戸市)

林晋一郎. 骨格筋の再生・発生における新規分化制御機構. 第 3 回日本筋学会学術集会, 2017 年 8 月 4-5 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)

林晋一郎. Klf5 の発現制御機構の破綻は筋芽細胞の細胞周期の停止と細胞老化を誘導する. 第 5 回骨格筋生物学研究会, 2017 年 3 月 3-5 日, 東京大学駒場キャンパス (東京都 目黒区)

林晋一郎, 大塚千聖, 鈴木裕美, 真鍋一郎, 大石由美子. 骨格筋発生における Klf5 の機能解析. 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

林晋一郎. Klf5 regulates skeletal muscle

differentiation, regeneration and development. 第四回 若手による骨格筋細胞研究会, 2016年11月14-15日, ウィンクあいち (愛知県 名古屋市)

林晋一郎, 大塚千聖, 鈴木裕美, 真鍋一郎, 大石由美子. 骨格筋発生におけるKlf5の機能解析. 第7回 Molecular Cardiovascular Conference II, 2016年9月2-3日, 東京ドームホテル, (東京都文京区)

Hayashi S, Manabe I, Suzuki I and Oishi Y. "Klf5 regulates skeletal muscle differentiation by directly targeting muscle-specific genes. FASEB -Klf and SP Transcription Factors In Disease and Regenerative Medicine-, 2016年8月7-12日, base village conference center (Snowmass, CO)

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明. 第2回日本筋学会学術集会, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター, 2016年8月5-6日 (東京都小平市)

大塚千聖, 林晋一郎, 鈴木裕美, 大石由美子. 骨格筋発生におけるKlf5の機能解析. 第2回日本筋学会学術集会, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター, 2016年8月5-6日 (東京都小平市)

〔図書〕(計 1 件)

武田伸一, 林晋一郎 他, 羊土社, 超高齢社会に挑む骨格筋のメディカルサイエンス, 2018年, 220-224.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 筋サテライト細胞の培養方法
発明者: 大石 由美子, 林 晋一郎
権利者: 国立大学法人 東京医科歯科大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-121787
出願年月日: 2017年6月20日
国内外の別: 国内

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
<https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r1/shimin.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
林 晋一郎 (HAYASHI, Shinichiro)
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長
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:

(4) 研究協力者
()