

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01859

研究課題名(和文)細胞外小胞を介した骨格筋制御機構解明

研究課題名(英文)the regulatory mechanism of muscle stem cells with exosomes

研究代表者

佐藤 貴彦 (Sato, Takahiko)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：30570775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソーム小胞と共培養した骨格筋幹細胞を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、その結果血清中エクソソーム添加により筋分化抑制を示した骨格筋細胞中で、顕著に発現変化する遺伝子群を同定できた。その中でTceal7遺伝子に注目した。骨格筋細胞におけるTceal7の機能は全く報告がないがその発現は非常に特徴的であり、筋分化と共に発現上昇する遺伝子で、胚発生時にはその発現は体節中の骨格筋前駆細胞中に認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋研究において老化時の影響を調査したものは数多く存在するが、幹細胞という点から研究を進めているものは実は曖昧なものが多い。加齢による転写後の遺伝子発現制御機構、そしてエクソソーム小胞をはじめとする細胞間相互作用による関係を知る事により、骨格筋幹細胞から骨格筋分化を決定する機構の全体像、組織幹細胞の未分化性維持の為の機構解明、そして骨格筋再生時の分子機構解明に役立つと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have identified the genes that are significantly changed in differentiated myocytes with or without exosomes of serum, and focused on Tceal family. Tceal7 expression is up-regulated in differentiated myotubes, and is detected in somites of developing mouse embryos.

研究分野：発生生物学

キーワード：エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

現在、高齢化社会へ進んでいる我が国において、いかに骨格筋を含めて活動可能な体を維持するかは重要な課題である。実際、加齢によって骨格筋の総量は大きく減少し基礎代謝の低下を伴い、日常生活に支障が起きる。この原因の一端を担う筋再生肥大の源となる骨格筋幹細胞は、年齢とともにその細胞数や活性分化能が低下することが知られているが、加齢時におこる細胞内分子機構について殆ど分かっていない。つまり加齢と骨格筋幹細胞の関係をきちんと知る事が、骨格筋維持において非常に重要となってくる。

一方、加齢などで起こる免疫応答変化による筋再生への影響についても興味深い研究結果が得られている。組織炎症時には好中球やマクロファージなどの早期免疫応答細胞が増加し、加齢や罹患時に筋組織でも炎症が頻繁に認められるようになる。さらにこれらの免疫応答細胞が筋組織に影響して筋再生を促進させることが知られているが、この時、免疫応答細胞から直接骨格筋へどのような作用があるのか不明な点が非常に多い。実際に老齢マウス筋組織を用いた調査により、骨格筋幹細胞の総数は減少するという報告はあるが、このように幹細胞の総数に影響を及ぼすのは、老化以外では筋損傷後の再生中に早期免疫応答異常が起こっている場合が挙げられる。

2. 研究の目的

現在まで、筋再生の源となる骨格筋幹細胞で、発生・成長時に機能し未分化性を制御するマイクロRNA (miRNA) を調査してきた。成長時に発現量が変化する miR-195/497 により骨格筋幹細胞の増殖分化に影響し未分化性の維持に関与すること (Nat Commun 2014)、そして筋発生再生過程において発現上昇する miR-335 がゲノムインプリンティング機構に関与していることを示してきた (PLoS One 2015)。しかし、これらの変化が成長や加齢により何故起こるのかは全く分かっていない。近年、好中球やマクロファージ、間葉系細胞などからのエクソソームと呼ばれる分泌小胞中に大量に miRNA が含まれることが明らかとなっており、骨格筋細胞内における miRNA の発現挙動変化は骨格筋細胞外からの細胞間相互作用も追跡し、それらの全容解明に向けて解析を進めた。

3. 研究の方法

筋細胞培養時の血清中より採取したエクソソーム小胞を、単離した骨格筋幹細胞に反応させると筋分化を抑制することが明らかとなったことから筋細胞内の miRNA 発現変化を引き起こす可能性の高い、エクソソームを介した骨格筋細胞内の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、標的遺伝子の同定を行った。

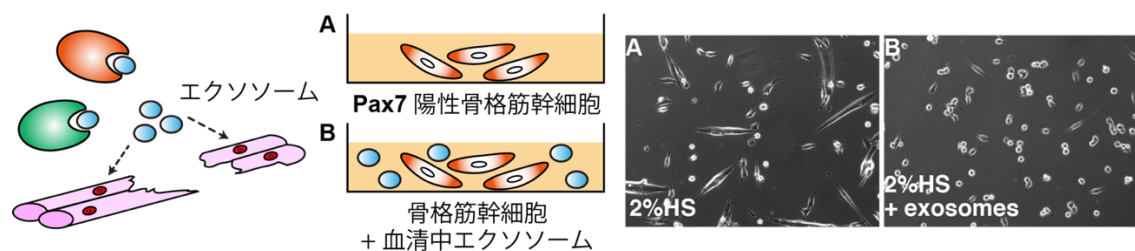


図 培養用血清中に含まれるエクソソーム小胞により骨格筋分化が抑制

筋損傷あるいは老化時には骨格筋組織で様々な炎症反応が誘起されることが知られている。このような炎症時には、早期免疫応答細胞であるマクロファージあるいは間葉系細胞から骨格筋との相互作用が存在すると考えられ、骨格筋幹細胞にも影響を及ぼす可能性が高い。miRNA の機能を調査する上では細胞自律的な制御だけでなく、前述の通り細胞外エクソソームの影響が存在することから、miRNA と mRNA が相互作用する複合体 (RNA induced-silencing complex: RISC) を標的として考える必要がある。そこでマクロファージ、間葉系細胞から分泌されるエクソソーム小胞に着目し、筋再生時にエクソソーム小胞が骨格筋幹細胞に影響を及ぼす転写産物の発現変化が認められるかを調査した。

4. 研究成果

<マウス骨格筋細胞内における Tceal 機能調査>

エクソソーム小胞と共培養した骨格筋幹細胞を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、その結果血清中エクソソーム添加により筋分化抑制を示した骨格筋細胞中で、顕著に発現変化する遺伝子群を同定できた。その中で Tceal7 遺伝子に注目した。骨格筋細胞における Tceal7 の機能は全く報告がないがその発現は非常に特徴的であり、①筋分化と共に発現上昇する遺伝子（下図 1B）で、②胚発生時にはその発現は体節中の骨格筋前駆細胞中に認められた（下図 A）。

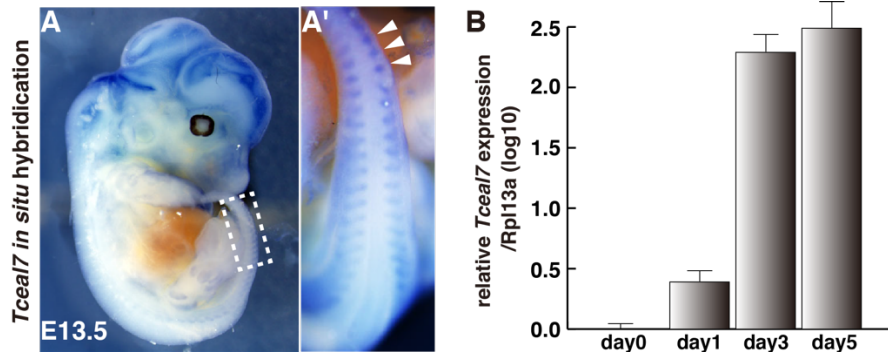


図 マウス胚発生時における体節中の Tceal7 遺伝子発現 (A) と筋幹細胞分化時の発現変化 (B)

ヒト筋細胞においても同様であり、Tceal7 と共にパラログである Tceal5 遺伝子も同様の発現挙動を示した。

<骨格筋分化時における Tceal5/7 遺伝子発現変化の検討>

筋分化時における Tceal5 と Tceal7 の役割を検討するため、遺伝子ノックダウン実験を行った。まず Tceal5 と Tceal7 の発現を特異的に抑制するための siRNA を合成し、分化中筋細胞への導入を試みた。リアルタイム PCR での解析結果、Tceal5、Tceal7 共に特異的に遺伝子発現を抑制可能な siRNA を同定することが出来た。これらの siRNA は増殖中の筋細胞に導入しても増殖ならびに筋形成初期には影響は認められなかったが、共抑制させることによっても筋管形成には影響は認められなかった。

また C2C12 細胞の増殖期では通常 Tceal5 の発現は認められず、分化開始後にその発現が上昇することから、筋細胞の初期分化に Tceal5 が何らかの影響を示す可能性があるかと判断し、細胞増殖期に Tceal5 遺伝子の強制発現実験を試みた。まず筋分化した C2C12 細胞由来 cDNA を逆転写合成し、Tceal5 遺伝子の翻訳部位を含む全長コーディング配列を PCR により増幅し、pcDNA3 強制発現ベクターの制限酵素認識部位に組み込み、クローニングした。この Tceal5 発現ベクターは DNA シーケンシングによって挿入遺伝子配列を確認した。このようにして作成した Tceal5 強制発現ベクターを増殖中 C2C12 細胞に導入し、筋分化への影響を観察したが、こちらも分化増殖ともに変化は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sato Takahiko
2. 発表標題 Core transcription factors promote induction from human iPS cells of functional Pax3-positive muscle stem cells
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤貴彦
2. 発表標題 主要転写因子を用いた骨格筋幹細胞への誘導研究
3. 学会等名 第91回日本組織培養学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato Takahiko
2. 発表標題 Core transcription factors promote induction of functional Pax3-positive muscle stem cells
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----