

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15615

研究課題名(和文)新規デスミンリン酸化不全遺伝子改変マウスにおける筋組織形成・機能の解析

研究課題名(英文)Histological and functional analysis of phosphodesmin-deficient mice

研究代表者

山川 大史(Yamakawa, Daishi)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20631097

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)：筋組織特異的な中間径フィラメントであるデスミンのリン酸化の生理的意義を明らかにするため、デスミンリン酸化不全マウスを作製した。デスミンリン酸化不全マウスは野生型マウスと比べ、外觀の差は認められなかった。一方で、心筋のデスミン発現が経時的に減少することが分かり、心機能の評価が今後の課題となった。また、骨格筋に関しては、グリセロール投与による急性骨格筋障害を誘導すると、デスミンリン酸化不全マウスは野生型マウスに比べ、障害範囲が広く、筋再生の遅延がみられた。今後、既存筋組織の恒常性について、そして筋肉幹細胞である筋衛星細胞からの分化異常について詳細な機能解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デスミンリン酸化の生理的意義を明らかにすることで、細胞同士の融合で多核となる筋組織の形成メカニズムの詳細を知ることができる。これを元に筋組織の老化や障害に対する効率の良い筋肉再生法の開発に貢献することが期待できる。またヒトにおいてもデスミンは遺伝的変異が原因によるミオパチーが存在し、リン酸化部位の変異もいくつか知られている。そのため、デスミンの遺伝子変異によるミオパチーの治療法の開発にも本研究で獲られる知見が役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：To understand the physiological significance of mitotic phosphorylation of muscle specific intermediate filament desmin, we generated mitotic desmin phosphorylation defective mice (DES SA/SA mice). Compare to wild type mice, DES SA/SA mice were no difference of appearance. However, in heart muscle tissue, DES SA/SA mice showed decrease of desmin expression in Z band area except intercalated disc. Therefore, we need to clarify heart function in the future. In skeletal muscle tissue, when we induced acute muscle injury by glycerol injection, DES SA/SA mice were injured broadly and delayed muscle regeneration. In future, we will work on solution of detail mechanism with regards to pre-existing muscle tissue homeostasis and abnormal cell division of muscle stem cell which is called satellite cell.

研究分野：病態生理学

キーワード：中間径フィラメント 筋肉 心筋 骨格筋 筋再生 デスミン

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

## 1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の一つである中間径フィラメントは、細胞外力から細胞を保護するために必要である。当研究室では、中間径フィラメントのもう一つの重要な機能として、細胞分裂時にキナーゼによって中間径フィラメントがリン酸化し、脱重合することが、正常な細胞分裂に必要な現象であることを明らかにしてきた。そのため、中間径フィラメントのリン酸化不全は細胞分裂障害を誘導した。中間径フィラメントのリン酸化の意義を個体レベルで明らかにするため、間葉系細胞に特異的なビメンチンの分裂期リン酸化不全マウス ( $VIM^{SA/SA}$  マウス) を作製したところ、ビメンチンを高発現する間葉系組織の早期老化症状 (白内障、脊柱湾曲、皮膚創傷治癒の遅延、皮下脂肪の減少など) が見られた。そして、その原因として、ビメンチンの分裂期リン酸化不全による細胞質分裂障害が、細胞の多核化や染色体異常性を誘導し、細胞老化に陥ることを明らかにした。しかし、中間径フィラメントは、細胞特異性が高く、種々の細胞で異なる中間径フィラメントを発現している。本研究では、筋肉特異的な中間径フィラメントであるデスミンに着目し、細胞融合により多核となる筋組織における中間径フィラメントのリン酸化の意義についてデスミンリン酸化不全マウスを用いて個体レベルで明らかにするという着想に至った。

## 2. 研究の目的

デスミンは筋組織に特異的な中間径フィラメント蛋白質であり、その変異が拡張型心筋症や骨格筋萎縮などの原因となる。本研究では、我々が新たに作製したデスミンリン酸化不全マウスの解析を行う。具体的には、デスミンリン酸化不全マウスの心筋や骨格筋の異常を組織・細胞レベルで解析し、デスミンリン酸化の筋組織形成やその機能維持に果たす役割とその破綻の解析からその生理機能の全容解明にせまることを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、筋細胞におけるデスミンのリン酸化の生理的意義を明らかにするため、デスミンリン酸化不全マウスを活用し、筋組織に現れる表現型解析を形態学的・組織学的に解析した。骨格筋については構造異常を、心筋については線維化などの老化現象にも注目して解析を行った。また、筋組織幹細胞の維持と分化の観点から筋細胞の産生能への影響を検討する予備実験を行った。以上の研究から、デスミンリン酸化の筋組織の形成 - 維持に果たす役割の解明を進めた。具体的に以下①～③に研究の実施例をまとめた。

デスミンリン酸化不全マウスの表現型解析・・・骨格筋・心筋について、胎児期から出生後の経時的変化の観察を形態学的・組織学的手法を用いて実施した。

筋疾患・筋再生モデルの解析・・・骨格筋損傷モデルによる筋再生能力の評価を組織学的解析により実施した。

筋繊維分化と分裂異常の解析・・・筋組織幹細胞から成熟した筋繊維となる分化過程の異常を組織レベルで解析し、細胞レベルでの解析のための予備実験を実施した。

## 4. 研究成果

### Desmin<sup>SA/SA</sup> マウスの作製

既に作製済みの Desmin<sup>WT/SA</sup> マウス同士の交配から Desmin<sup>SA/SA</sup> マウスを作製した。当該マウスは、Desmin 欠損マウスと同様に個体サイズの縮小化、そして心臓の石灰化などの外観の変化が確認された。心臓や骨格筋について詳細な組織学的解析を実施すると、筋繊維の断裂や Vimentin 陽性の線維芽細胞の増生が確認できた。

そこで Desmin の発現を確認すると筋組織で完全に Desmin の発現が消失していた。つまり、Desmin 欠損マウスの表現型と類似していたのは、Desmin の発現が消失していたことが原因と推測された。そこで、筋組織形成のどの段階から Desmin が欠損しているかを確認するため、胎児期の心臓形成が始まる E8.5 日の胎児から経時的に心臓をサンプリングし、Desmin の発現を確認したところ、心臓形成の開始から Desmin の発現はなかった。グリア細胞特異的な中間径フィラメント GFAP のリン酸化不全マウスは出生後少しずつ GFAP 発現が減少していくことが知られていたが、Desmin のように最初から発現しないことは何らかのアーチファクトである可能性が示唆された。実際、Desmin<sup>SA/SA</sup> マウスの作製には薬剤耐性遺伝子 Neomycin も同時に挿入したターゲティングベクターを使用しており、当該マウスには Neomycin もそのまま発現していることとなる。原因は分かっていないようだが、この Neomycin がその近傍にある Desmin 遺伝子に作用して発現抑制に繋がっている可能性が示唆された。Neomycin の両端には loxP 配列があるため、Cre リコンビナーゼによって切断することが可能であった。そこで全身性に Cre を発現できる CAG-Cre マウスと Desmin<sup>SA/SA</sup> マウスを交配させて、Neomycin の除去を行った。本マウスを Desmin<sup>SA/SA</sup>・Neo-マウスとする。Desmin<sup>SA/SA</sup>・Neo-マウスは Desmin の変異があるとともに Desmin 発現も有しており、Desmin<sup>SA/SA</sup>・Neo-マウスが真の Desmin<sup>SA/SA</sup> マウスとして使用できる (以後 Desmin<sup>SA/SA</sup>・Neo-マウスを DES<sup>SA/SA</sup> マウスとする)。一方で、最初に作製されたマウスは Desmin 遺伝子前後近傍の遺伝子の発現には全く影響がないことを確認した。そのた

め、Desmin 欠損マウスとして使用できることが判明した（以後 DES KO マウスとする）。

### Desmin<sup>SA/SA</sup> マウスの表現型解析

DES KO マウスは筋繊維の耐久性が低下することにより、心筋や骨格筋で筋繊維の断裂が生じ、炎症が惹起され、線維化が亢進することが知られている。これが筋繊維の構造に影響を及ぼすためか本研究で作製された DES KO マウスも 4 週齢頃から体格が野生型マウスに比べ小さいという外観でも分かる差が出現した。また、DES KO は線維化が亢進し、心臓の局所で石灰化が生じることも知られている。本研究で作製された DES KO マウスについても、前述のように同様の外観、そして組織像が観察された。そのため、半年齢ごろから突然死する個体もいた。一方で、DES<sup>SA/SA</sup> マウスは野生型マウスとほぼ同等に成長し、1 年経過しても突然死するような個体は現在のところ認められていない。そこで、組織学的に野生型とは異なる変化がないかを検討した。特に Desmin 発現の強い骨格筋・心筋に着目して、出生後の経時的变化を組織学的に評価した。ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色では変化が確認できなかった。そこでまず Desmin 発現について調べた。Desmin は心筋では細胞同士を区切る介在板や横紋に見える Z 板で局在している。興味深いことに、DES<sup>SA/SA</sup> マウスでは、8 週齢の心筋組織で介在板の領域では Desmin の発現があるものの、横紋状に見えるはずの Z 板の構造がほとんど確認できなかった（**図 1**）。出生後の経時的な解析から、4 週ごろまでは正常な Desmin の発現パターンを示すことから、何らかの理由により徐々に Desmin 発現が減少していることが考えられた。一方で、骨格筋組織では、Desmin 発現を元にした Z 板由来の横紋は確認できた。以上のことから、心筋組織では、出生後、何らかの原因で心筋細胞内の Desmin 発現が減少していくことが示唆され、今後 Desmin リン酸化との関与を解明するとともに、心機能への影響を明らかにする必要がある。

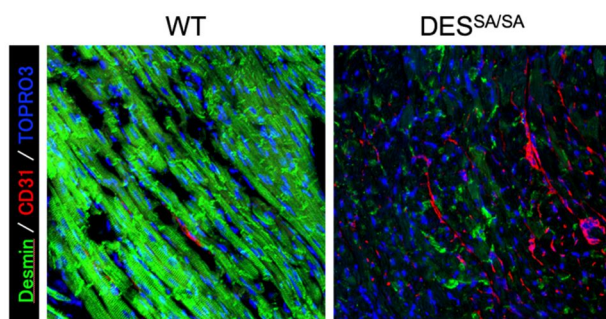


図 1. DES<sup>SA/SA</sup> マウスの心臓の Desmin 発現の減少

### 筋障害あるいは筋再生過程におけるデスミンのリン酸化の意義の解析

ピメンチンと同様に、細胞レベルでデスミンのリン酸化制御が細胞質分裂のデスミンフィラメントの娘細胞への分配に必須であることをこれまでに明らかにしている。さらに、マウス胎児や新生児組織、ヒトの横紋筋肉腫組織においてデスミンのリン酸化反応が生じていることも観察している（Kawajiri *et al.*, Mol Biol Cell, 2003; Makihara *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2016）。そのため、デスミンのリン酸化不全についても個体レベルで分裂障害の表現型が得られる可能性があり、当該マウスを用いた種々の実験により、筋肉細胞の増殖障害による病態解明が期待できる。筋損傷モデルによる筋再生能力の評価を行うため、前脛骨筋に 50%グリセロールを注射することで筋障害を誘導させ、修復過程の筋肉の再生を組織学的に評価した。DES<sup>SA/SA</sup> マウスは、骨格筋障害刺激に対して、極めて強い障害反応が観察された（**図 2**）。障害部位の筋肉は細胞死が誘導され間質に線維芽細胞の増生や血球細胞の浸潤がみられる。DES<sup>SA/SA</sup> マウスの筋組織は、間質領域が拡大し、さらに正常な筋繊維がほとんど消失していた。また経時的な組織評価の結果、DES<sup>SA/SA</sup> マウスの筋組織は、障害初期のダメージが大きいこと、それに伴う筋再生の遅延、がみられた。この表現型の詳細を解析することで、まだ不明な点が多い筋肉修復や筋老化の理解が進展すると考えられる。

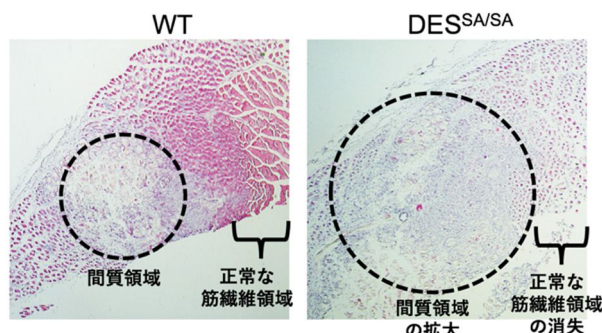


図 2. 骨格筋障害後 7 日目の H&E 染色像

### 筋繊維分化と分裂異常の評価系の構築

骨格筋障害後の筋組織について、分裂の盛んな増殖している筋肉細胞と Desmin の発現との関係を明らかにするため、Pax7 陽性の筋組織幹細胞である筋衛星細胞、そして Desmin と増殖マーカーの Ki67 の染色を行った。その結果、Pax7 陰性となったある程度幹細胞から分化した Desmin 陽性の筋肉細胞が Ki67 陽性でよく増殖していることが明らかとなった。しかし、多核化した筋組織中では、分裂異常の判別が困難であった。そこで筋組織幹細胞を分取し、培養し、分化を誘導することにより、成熟した筋繊維への分化過程の細胞分裂異常を培養系で明らかにできると考えた。始めにマウス筋組織から筋衛星細胞の分取を試みた。CD31、CD45、Ter119 といった Lineage マーカー陰性の分画で PDGFR 陰性 VCAM1 陽性の分画に筋衛星細胞が濃縮されることが知られているため、同様の染色を行い、フローサイトメトリーで分画化した。本研究課題進行中には、分化誘導まで実施できなかったが、分画化できることを確認でき、またソーターを用いて採取することにも成功しているため、今後この手法を利用して、筋繊維への分化誘導実験を進めることで、DES<sup>SA/SA</sup> マウス由来の筋衛星細胞の分化異常を明らかにできると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inaba H, Yamakawa D, Tomono Y, Enomoto A, Mii S, Kasahara K, Goto H, Inagaki M.	4. 巻 498
2. 論文標題 Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 544-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamakawa D, Jia W, Kidoya H, Hosojima S, Torigata M, Zhang L, Takakura N.	4. 巻 188
2. 論文標題 Visualization of Proliferative Vascular Endothelial Cells in Tumors in Vivo by Imaging Their Partner of Sld5-1 Promoter Activity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1300-1314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村有平、山川大史、白水崇、稲垣昌樹
2. 発表標題 一次線毛を介した脂肪細胞分化制御
3. 学会等名 第49回日本心臓血管作動物質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣昌樹、山川大史、笠原広介、加藤大祐、渡邊昌俊
2. 発表標題 一次線毛と細胞増殖・分化～発がん研究の新しい視点～
3. 学会等名 第34回発癌病理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daishi Yamakawa, Kousuke Kasahara, Masaki Ingaki
2. 発表標題 The keratin filament-binding protein Trichoplein regulates production of intradermal adipocytes
3. 学会等名 Gordon Research Conference Intermediate Filaments (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daishi Yamakawa, Kousuke Kasahara, Makoto Matsuyama, Masaki Ingaki
2. 発表標題 The primary cilia-related trichoplein regulates proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山川大史、稲葉弘哲、笠原広介、榎本篤、友野靖子、後藤英仁、稲垣昌樹
2. 発表標題 CDK1によるケラチン5のリン酸化が皮膚基底層上皮細胞の細胞分裂に必要である
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kousuke Kasahara, Hiromasa Aoki, Tohru Kiyono, Daishi Yamakawa, Naoki Goshima, Masaki Inagaki
2. 発表標題 EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis by activating Usp8 deubiquitinase
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

三重大学大学院医学系研究科分子生理学分野  
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/physiology/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----