

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K10730

研究課題名(和文) 老化幹細胞ニッチにおける筋再生制御に関わる因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors involved in the regulation of muscle regeneration in the senescent stem cell niche.

研究代表者

祐實 泰子 (Sukezane, Taiko)

畿央大学・健康科学部・准教授

研究者番号：80425454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの分子が骨格筋の再生修復制御に関与することが明らかになっているが、老化に伴う骨格筋の線維化や筋量の減少(サルコペニア)などの問題を解決するには至っていない。そこで、本研究では骨格筋細胞の分化に影響を与える可能性のあるものとして、周りの環境からの影響に着目した。中でも、骨格筋の低酸素状態や骨格筋が存在する環境にいる線維芽細胞の影響を重要だと考え、構築した細胞培養系を用いて、筋細胞の分化に低酸素や線維芽細胞が影響を与える可能性を示す事が出来た。また、新しく筋細胞の分化に影響を与える分子を明らかにするため、全トランスクリプトーム発現プロファイリングを実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、老化に伴う骨格筋の線維化や筋量の減少(サルコペニア)に着目して、どのようなメカニズムで加齢による筋の萎縮や減弱が起こるのか明らかにしようと考えた。結果、骨格筋の再生修復制御には、骨格筋の周りの環境も重要であることを細胞レベルで示すことができた。さらに、その影響を遺伝子レベルで解析できたので、骨格筋の再生修復制御に関わるメカニズムの解明、さらに検査や治療の標的になる分子の同定の可能性も示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although numerous molecules have been demonstrated to be involved in the regulation of skeletal muscle regeneration and repair, they have yet to address issues such as skeletal muscle fibrosis and loss of muscle mass (sarcopenia) associated with aging. Therefore, in this study, we focused on the potential influences of the surrounding environment as possible factors affecting skeletal muscle cell differentiation. We postulated that the effects of hypoxia in skeletal muscle and fibroblasts in the environment where skeletal muscle exists are particularly important. We were able to demonstrate the possibility that hypoxia and fibroblasts influence myoblast differentiation using a cell culture system that we constructed. Furthermore, we performed whole transcriptome expression profiling to identify new molecules that affect myoblast differentiation.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 再生修復制御 筋芽細胞 微小環境

1. 研究開始当初の背景

筋の再生で中心的な役割を担うのは、「サテライト細胞」と呼ばれる骨格筋の幹細胞である。サテライト細胞の性質を維持するために必要な Stem Cell Niche (幹細胞ニッチ) とは、様々な細胞外マトリックス (ECM) の成分と線維芽細胞やペリサイトなどの細胞群を含む微小環境のことである (図 1. a)。この幹細胞ニッチは運動負荷や加齢によってその成分が変化する。運動負荷では、ECM の再構築およびサテライト細胞の集積が occur (図 1. b)、加齢では ECM の層が厚く密集し、サテライト細胞の喪失が生じる (図 1c) (1)。ECM は骨格筋の発生、構造のサポート、収縮機能において不可欠な役割を持つ基質で、様々なタイプのコラーゲンやプロテオグリカン、糖タンパクなどで構成される。主にこれらの幹細胞ニッチの ECM 分子を合成・分泌するのが線維芽細胞であり、骨格筋の再生制御にも関わっている (2)。例えば、傷害により損傷した筋組織では、マクロファージなどの細胞が侵入・食後、フィブリンとフィブロネクチンがクロスリンクして primary matrix が形成される。次いで、線維芽細胞が成長因子や ECM を産生していき、サテライト細胞による筋線維の再構築が促される (3)。すなわち、幹細胞ニッチにおいて、活性化された線維芽細胞がサテライト細胞の再生や筋芽細胞の増殖・分化に影響を与えているとも考えられる。このような知見から、線維芽細胞や筋芽細胞の老化が、お互いの増殖、分化能に影響を与えている可能と考えられるが、それぞれの細胞がどう影響し合っているかはほとんど報告がない。そこで老化した幹細胞ニッチにおける、両細胞の相互関係に関わる分子を同定し、その分子メカニズムを明らかにすることができれば、不適切な筋修復に伴う問題の解決や、その修復過程を制御する治療の開発につながれると考えられる。

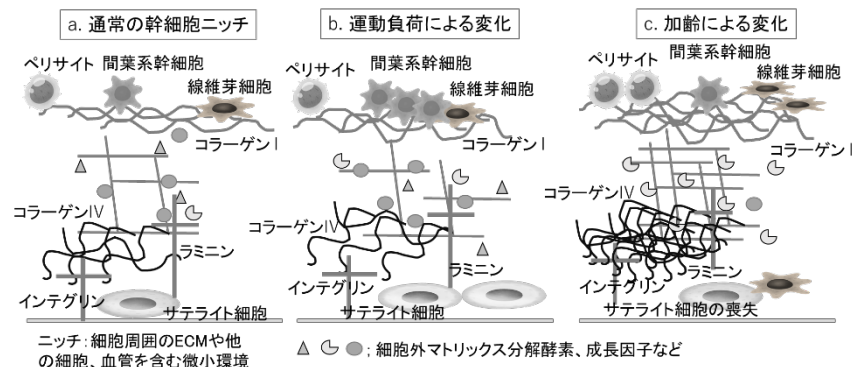


図1: 運動負荷や加齢による骨格筋の幹細胞ニッチ変化

2. 研究の目的

本研究では、老化

に伴う幹細胞ニッチの変化に注目し、線維芽細胞および筋芽細胞において、人工的に細胞老化を誘導する *in vitro* 細胞培養系を構築する。そして老化により誘導されるもしくは抑制される分子から、細胞の増殖や分化に影響を与える分子を同定する。さらに、ラットの加齢モデルおよび筋損傷モデルを使用し、同定された分子の生体内、細胞内での機能を明らかにすることを目的とする。

これまで、多くの分子が骨格筋の再生修復制御に関与することが明らかになっているにもかかわらず、老化に伴う線維化やサルコペニアなどの問題を解決するには至っていない。そこで本研究では、あまり報告の無い老化した線維芽細胞と筋芽細胞がお互いにどう影響し合うのかを検証し、影響を与える分子を同定することで筋細胞の再生制御に関わる新しいメカニズムを見出すことができると考え計画を立案した (図 2)。計画を実行するにあたり、新規分子を同定するには *in vitro* で老化を再現する必要がある。そこで申請者は老化研究の細胞老化という概念を応用し、人工的に細胞老化を誘導する細胞培養系の構築を思いついた。細胞老化とは、人の体細胞を継代培養する際に存在する分裂限界 (4) に向かって細胞の変化を指す (5)。そして、細胞老化を起こした細胞からは、炎症作用を有する炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素などの因子が分泌され Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる現象を起こす。この現象は、加齢とともに生体内に増える老化細胞が、SASP 因子を分泌して周囲の微小環境に慢性炎症を引き起こすためと考えられている (6)。従って、老化した幹細胞ニッチでも同様な現象が起こっている可能性が高いことから、細胞老化の概念を応用するのは有意義で独自性があると考えられる。また、細胞老化は、テロメアの短小化以外の様々な細胞内外のストレスによっても誘導されることが知られており、がん遺伝子を正常な細胞に発現させる発癌ストレスでも、細胞分裂を繰り返すことなく速やかに細胞老化と類似の

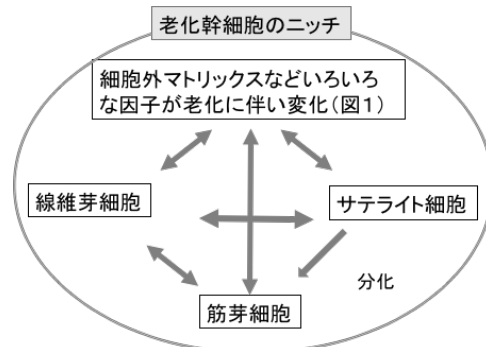


図2: 老化した幹細胞ニッチ内の相互関係

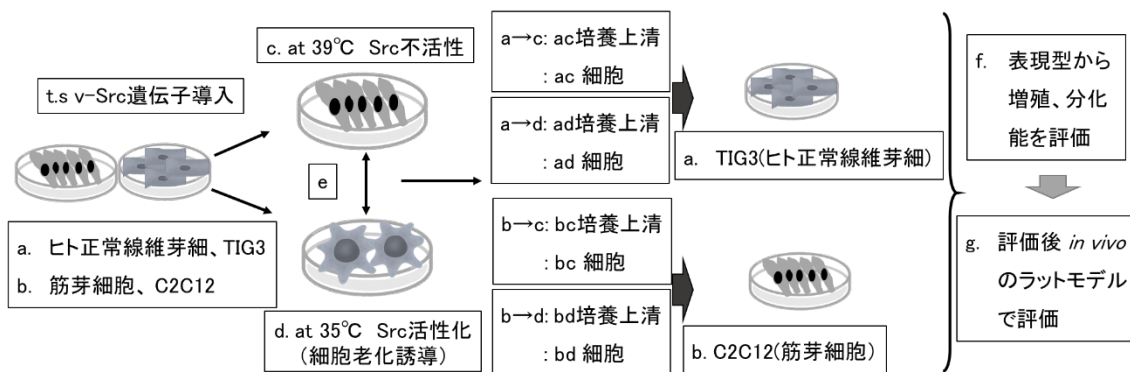
可逆的な増殖停止を起こすことができる (Oncogene-induced senescence ; OIS)。 *in vitro* の細胞培養系では、この OIS を利用し温度依存的にがん遺伝子を活性化することで、細胞を老化させる (図 3) (7)。この手法はがん遺伝子のたんぱく質が温度依存的に構造変化することで、活性化または不活性化する性質を利用したもので、申請者はすでにこのシステムで線維芽細胞をガン化させる技術を獲得している (業績 2, 3, 24)。このシステムでは同じ細胞で老化を誘導するため、その前後の変化をより正確に比較でき、影響を与える分子を同定するのに優れた方法と思われる。

3. 研究の方法

本研究の実施計画としては、以下の実験を遂行する。

- (1) 細胞老化誘導できる細胞培養系及び表現型を評価できる細胞培養系を構築する。
 - (2) 加齢により誘導された骨格筋の再生分化制御に関わる新規分子の同定を行う。
 - (3) 新規同定分子の生体での関与をラットモデルで検証し、その分子メカニズムの解析を行う。
 - ① 細胞老化誘導できる細胞培養系及び表現型を評価できる細胞培養系を構築する。
- 計画実施にあたっては、まず図 3 で示すように、温度依存的に活性化するガン遺伝子の変

図3：温度感受性活性化Srcによる細胞老化誘導と表現型の評価



異体である t. s. (温度感受性) v-src (NY72 株) をそれぞれの細胞に導入することにより、温度依存的に細胞の老化 (OIS) を誘導する細胞培養系を構築する (図 3e) (7)。遺伝子の導入は、一過性に retrovirus の受容体を発現させた正常線維芽細胞 (TIG3) と横紋筋芽細胞 C2C12 に、retrovirus vector に入れた t. s. v-src を導入する (図 3a, 業績 1, 2, 3, 15, 24)。細胞老化の誘導は、老化にともない誘導される細胞の形態変化と p16 や p21 など遺伝子発現で確認する。老化により発現亢進もしくは減弱された分子の影響は、図 3f で示すように上清を細胞に添加する方法 (パラクリン) と老化誘導した細胞と共培養することで変化する細胞形態や増殖速度で評価する。C2C12 の分化は細胞の免疫染色やウェスタンブロット等で myogenin (MyoG) や MyoD などの分化マーカー発現で評価する。この手法については、申請者は経験済みで実施可能である (8) (9) (10)。

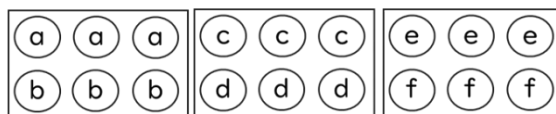
- ② 加齢により誘導され骨格筋の再生分化制御に関わる新規分子の同定を行う①の結果をもとに、老化誘導前後の細胞 (図 3c と d の間) で、DNA マイクロアレイやメタボロームを行い網羅的に解析することで、再生や分化制御に関わる分子を同定する。
- ③ 新規同定分子の生体での関与をラットモデルで検証し、その分子メカニズムの解析を行う。新規同定分子に関しては、研究分担者である、今北英高教授の筋損傷ラットモデルもしくは加齢ラットモデルの腓腹筋およびヒラメ筋に新規同定分子を含む上清の濃縮、または老化誘導した細胞を直接移植する (1)。解析は免疫組織化学染色で、筋組織の再生亢進、間質の線維化などの変化をマーカー因子や組織の形態変化から効果を検証する。

4. 研究成果

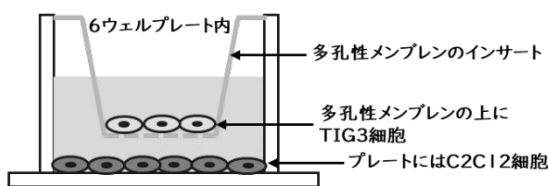
- (1) 細胞老化誘導できる細胞培養系及び表現型を評価できる細胞培養系を構築した。図 3 で示したように、まず温度依存的に活性化するガン遺伝子の変異体である t. s. (温度感受性) v-src (NY72 株) をそれぞれの細胞に導入することにより、温度依存的に細胞の老化 (OIS) を誘導する細胞培養システムを構築した。遺伝子の導入は、一過性に retrovirus の受容体を発現させた正常線維芽細胞 (TIG3) と横紋筋芽細胞 C2C12 に、retrovirus vector に入れた t. s. v-src を導入した。しかし、作成した細胞を検証した結果、分化マーカーの発現等から細胞老化の誘導前後で予測していた結果が得られなかったため、筋線維への分化誘導系として知られている C2C12 の分化誘導に影響を与える培養細胞系を構築することに方法を修正した。次に、再度 retrovirus vector を利用して、蛍光タンパク質を恒常的に発現させた C2C12 細胞を作成した。異なった色の蛍光タンパク質を発現させることで、C2C12 細胞分化誘導が可視化できる細胞培養系の構築を試みた。また、分化誘導に影響を与える可能性がある細胞として TIG3 を用いるため、同様に蛍光たんぱくを恒常的に発現させた。これらの細胞を用いて、共培養や様々な組み合わせで C2C12 の分化誘導を行い、分化誘導を可視化しようと試みたが、C2C12 が癒合する際にうまく違う色の蛍光たんぱくを発現した細胞

が癒合せず、予測していたような可視化には至らなかった。これらの結果をもとに、横紋（骨格）筋の再生分化制御に関わる新規分子の同定をするためには、再現性の高いシンプルな培養系でアッセイをする必要があると考え、アッセイの培養細胞系を最終的に決定した。C2C12の分化誘導に影響を与える可能性として①低酸素環境による影響（骨格筋の収縮にはATPを必要とするために、運動時には酸素消費が促進されるため、低酸素環境になると予測したため）②骨格筋の微小環境である間質に存在する線維芽細胞の影響（幹細胞ニッチにおいて活性化された線維芽細胞の影響）に絞りアッセイ系を構築した。アッセイは図4に示したように6ウェルプレート内の3ウェルを1セットとして、各条件下で実施した。アッセイの結果、①と②の条件下とコントロールを比較したところ、C2C12の分化誘導に影響がみられることが明らかになった。このことから、低酸素や間質に存在する線維芽細胞が、生体内でも筋線維の分化や再生に影響を与えている可能性が示唆された。

図4: マルチウェルを用いたC2C12分化誘導アッセイ系

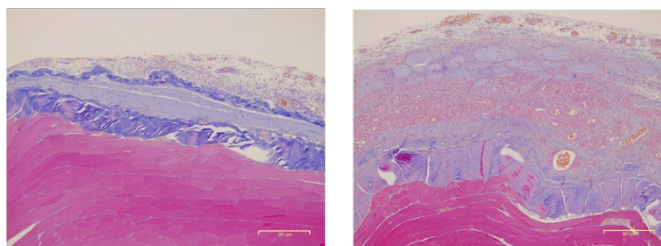


a: C2C12(10% Fetal Bovine Serum DMEM)
b: C2C12(2% Horse Serum DMEM/分化誘導培地)
c: C2C12+TIG3 co-culture (10% Fetal Bovine Serum DMEM)
d: C2C12 +TIG3 co-culture (2% Horse Serum DMEM/分化誘導培地)
e: C2C12(10% Fetal Bovine Serum DMEM)/5% O₂ incubator
f: C2C12(2% Horse Serum DMEM/分化誘導培地)/5% O₂ incubator



(2) ラットのモデル系の作成に関しては、研究分担者である今北英高教授の筋損傷ラットモデルをもとに筋再生や増加を検証できるモデル系を樹立できた。生体における微小環境の理解のため、ラットの皮下組織構造を把握するために間質や筋膜の組織染色を実施した。また、筋膜の炎症をエコーで検知できるのかなど非侵襲的な評価方法の検証も行った。結果、間質である結合組織の構造は、膠原線維を染色することが可能なマッソントリクローム染色で観察ができることが分かった(図5)。また、エコーではARIETTA Prologue（日立社製）を用い、超音波画像は、Bモード、6-15MHz リニア型プローブにて取得できることが確認できた(11)(12)。

図5: マッソントリクローム染色観察したラットの結合組織の肥厚



a: コントロール

b: 炎症により肥厚したラットの皮下

(3) 構築してきた培養細胞系を用いて、C2C12の分化に影響を与える分子やパスウェイを明らかにするため、遺伝子レベルでの全トランスクリプトーム発現プロファイリングを実施した。プロファイリングはクラボウマイクロアレイ受託解析サービス Clarion S Mouse Array を依頼し、図4で示した a, b, d, f の組み合わせで実施した。現在アレイの結果を解析中で、今後得られたデータから、筋細胞の再生修復制御に関わる新しい分子やシグナル伝達系の関連を明らかにしていく予定である。得られた結果を今回構築した細胞培養系やラットモデル系で検証していくことで、筋細胞の再生修復制御に関わる新しいメカニズムを提唱できると考えられる。

<引用文献>

1. Garg K, Boppart MD. Influence of exercise and aging on extracellular matrix composition in the skeletal muscle stem cell niche. J Appl Physiol (1985). 2016;121(5):1053-8.
2. Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. Exerc Sport Sci Rev. 2002;30(1):20-5.
3. Serrano AL, Munoz-Canoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. Exp Cell Res. 2010;316(18):3050-8.

4. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
5. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):859-67.
6. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-56.
7. Martins TJ, Sugimoto Y, Erikson RL. Dissociation of inositol trisphosphate from diacylglycerol production in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *J Cell Biol.* 1989;108(2):683-91.
8. Sukezane T, Oneyama C, Kakumoto K, Shibutani K, Hanafusa H, Akagi T. Human diploid fibroblasts are resistant to MEK/ERK-mediated disruption of the actin cytoskeleton and invasiveness stimulated by Ras. *Oncogene.* 2005;24(36):5648-55.
9. Kakumoto K, Sasai K, Sukezane T, Oneyama C, Ishimaru S, Shibutani K, et al. FRA1 is a determinant for the difference in RAS-induced transformation between human and rat fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(14):5490-5.
10. Sasai K, Sukezane T, Yanagita E, Nakagawa H, Hotta A, Itoh T, et al. Oncogene-mediated human lung epithelial cell transformation produces adenocarcinoma phenotypes in vivo. *Cancer Res.* 2011;71(7):2541-9.
11. Pirri C, Fede C, Petrelli L, Guidolin D, Fan C, De Caro R, et al. An anatomical comparison of the fasciae of the thigh: A macroscopic, microscopic and ultrasound imaging study. *J Anat.* 2021;238(4):999-1009.
12. 富安聡ら、迅速 Masson trichrome 染色法の検討 *医学検査* Vol. 69 No. 4 pp. 562-569, (2020)

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 0件）

1. 著者名 IMAGITA Hidetaka, NISHII Yasue, FUJITA Naoto, SUKEDZANE Taiko, KAWATA Shinnosuke	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of appropriate-intensity treadmill exercise on skeletal muscle and respiratory functions in a rat model of emphysema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 13~22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今北 英高, 祐貴 泰子	4. 巻 37
2. 論文標題 【Fasciaを考える-基礎から臨床応用まで-】Fasciaとは 各分野での捉え方 Fasciaとは 解剖生理学的意義の見地から	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床スポーツ医学	6. 最初と最後の頁 134-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寺山 奨, 白波瀬, 嘉摩尻, 岡田, 今北, 祐貴 泰子
2. 発表標題 マトリゲルを用いたFascia重積モデルラット作成に関する検討
3. 学会等名 第5回JNOS学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺山奨悟、後藤淳、岡田圭佑、嘉摩尻伸、白波瀬末萌、西田亮一、祐貴泰子、今北英高
2. 発表標題 新しいFascia異常モデルの開発に向けて
3. 学会等名 第3回JNOS学術集会・第1回日本ファシア会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今北英高、峯和矢、西谷光優稀、奥野稜太、津守佑紀、村上博子、祐實泰子、峯松亮、西井康恵、森拓也
2. 発表標題 肺炎症モデルラットにおける分岐酸アミノ酸摂取の影響
3. 学会等名 基礎理学療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐實泰子
2. 発表標題 癒痕癒着モデルにおけるハイドロリリースの効果および新しいFasciaモデルの開発
3. 学会等名 2019年度JNOS研究助成制度 受賞者による指定演題（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidetaka Imagita, Taiko Sukezane
2. 発表標題 Influence of adhesion-related fascial gliding restrictions on dermal and articular movement
3. 学会等名 Fascia Research Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 今北英高	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 14
3. 書名 Fasciaのみかた・とらえかた	

〔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
研究 分担者	今北 英高 (Imagita Hidetaka) (00412148)	埼玉県立大学・理学療法学科・教授 (34605)	

	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
研究 協力者	寺山 奨悟 (Shogo Terayama)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関