

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10835

研究課題名(和文) 加齢による骨格筋幹細胞の機能低下メカニズムにおけるEgr3分子の役割解明

研究課題名(英文) The role of the Egr3 in the mechanism of age-related functional decline of skeletal muscle stem cells

研究代表者

小倉 裕司 (Ogura, Yuji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90509952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、Egr3は筋サテライト細胞のPax7との関連が老齢期で認められるが、若齢マウスの個体を用いた検討ではEgr3と筋サテライト細胞機能との間に顕著な関連は見られなかった。それ故、筋サテライト細胞のEgr3とサルコペニアとの関係を解明するには、老齢期あるいは両者の関係が重要となる臨界期を特定した後でEgr3を消去し、筋再生介入等の実験を行っていく必要があると考えらえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢期における筋力などの筋機能の低下は、サルコペニアと呼ばれており、サルコペニアの抑制や軽減は、健康長寿に寄与すると考えられる。Egr3が筋衛星細胞の働きに関与する可能性を示唆した本研究の報告は、Egr3の機能を制御することでサルコペニアの対抗策を開発できる可能性を示唆しており、上記問題の克服の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The results of this study showed that Egr3 is associated with Pax7 of muscle satellite cells in old age. However, there was no relationship between Egr3 and muscle satellite cell function in the study using individual young mice. Therefore, to elucidate the relationship between Egr3 and sarcopenia, it may be necessary to eliminate Egr3 in old age or after identifying the critical period when the relationship between Egr3 and sarcopenia becomes important.

研究分野：生理学

キーワード：サルコペニア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢による骨格筋の量や機能の低下はサルコペニアと呼ばれる。サルコペニアは健康寿命を縮めるため、超高齢社会を迎えた我が国の社会的な問題となっている。サルコペニアの発症には、骨格筋の幹細胞である筋サテライト細胞の機能低下が関与していると推察されているが、そのメカニズムは明らかではない。申請者らは、これまで骨格筋量の制御機構における、NF- κ Bシグナルの役割についての検討を行っており、近年では Egr3 分子の関連に着目し研究している。Egr3 は神経や免疫細胞の発生・分化などに関わるが、骨格筋量の変化における役割は知られていなかった。しかし、申請者らの研究の結果、Egr3 は NF- κ Bシグナルを介して筋芽細胞（活性化筋サテライト細胞）の増殖を促進することで、骨格筋の形成に関与することが分かっていた。

2. 研究の目的

本研究では「サルコペニア発症における Egr3 の役割とその作用メカニズムを解明し、今後さらに求められるサルコペニア対策の開発基盤となる知見を得ること」を最終目標とし、本計画内では、特に高齢動物における筋サテライト細胞の Egr3 発現の様子と、筋形成・再生との役割を、高齢モデル動物および筋サテライト細胞特異的な Egr3 ノックアウトマウスを用いて検討することであった。

3. 研究の方法

(1) 高齢マウスを用いた検討

3カ月齢および約 17 - 8カ月齢のマウスから、筋サテライト細胞を細胞をセルソータによって単離した。また、各動物から骨格筋を摘出し、以下の検討を実施した。

遺伝子発現：細胞サンプルをホモジェナイズした後にクロロホルムで処置し、市販の RNA 単離キット (Favorgen 社) を用いて total RNA を得た。Total RNA はゲノム DNA を除いた後に逆転写され、定量 PCR 法によって遺伝子発現を評価した。対象遺伝子は、Egr3、Pax7 とし、内因性コントロールには β -アクチン遺伝子を用いた。

筋損傷：マウス骨格筋の筋サテライト細胞機能の評価するために、左の前脛骨筋に 100 μ l のカルディオトキシン (10 μ M) を注射した。これにより、骨格筋に壊死が惹起され、筋サテライト細胞の活性化と筋の再生を引き起こすことが出来る。右足には生理食塩水を注射し、コントロールとした。2週間後に筋を摘出した。

免疫組織化学的分析：再生骨格筋の様子を調べるために、免疫組織化学的染色を実施した。前脛骨筋から凍結切片を作成した。4%パラホルムアルデヒドで固定したのち、5%ウマ血清、5% Blocking Hist One (ナカライ) で 30分ブロッキングした。続いて、ブロッキング溶液に Pax7、ラミニンに対する抗体を溶解して、一晚4度でインキュベートした。洗浄後、2次抗体で反応させ、筋線維上の筋サテライト細胞を可視化した。切片上に見られる核は DAPI により可視化した。一定面積あたりの筋サテライト細胞数、筋線維数を顕微鏡画像で計測した。

(2) 遺伝子組み換え動物を用いた検討

サルコペニアの発症には、老齢期では筋損傷からの回復が悪化することで、恒常的な筋量維持に視床を来すこと一つの原因と推察される。そこで、Egr3 を筋サテライト細胞特異的に除去し、筋損傷とその後の再生を惹起することで、Egr3 の筋再生能への関与を検討した。モデル動物の作成にかかる時間を考慮し、まずは若齢動物で実験を実施した。

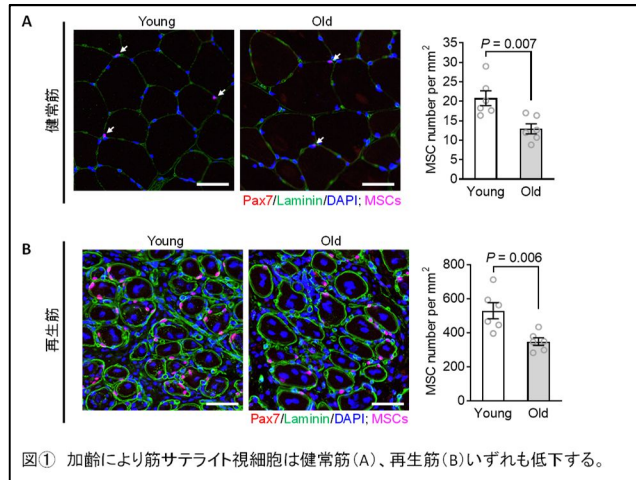
マウスモデルの作成：本研究では、C57BL/6 を背景に持つ以下のマウスを利用して、筋サテライト細胞に特異的な Egr3-ノックアウト (KO) マウスを作成した。まず、筋サテライト細胞マーカーである Pax7 と Cre リコンビナーゼが接続したマウス B6.Cg-Pax7^{tm1}(cre/ERT2)Gata/J を米国ジャクソン研究所より導入した。そして、Egr3 を LoxP 配列で挟んだトランスジェニックマウス (Egr3-floxed マウス) を藤尾圭司博士 (東京大学医学部) より譲渡を受け (Sumitomo et al., 2013)、両者を交配し、筋サテライト細胞に特異的な Egr3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。そのコントロールとしては、Egr3-floxed (f/f) マウスを用いた。遺伝子型の確認は、マウスのゲノムを筋サテライト細胞から市販キットにより抽出し、PCR によって確認した。

マウスのタモキシフェン処理：純エタノールで溶解したタモキシフェン (Sigma 社) をコーンオイル (Sigma 社) を用いて 10 mg/mL へ調整した。その後、動物に個体あたり 1.5mg を腹腔内投与した。投与は4日間連続して行い、その後1週間は組み換え期間として通常飼育した。その後、マウスに上述のように筋損傷介入を実施し、Egr3 欠如における筋再生能を評価した。また、動物の筋サテライト細胞を単離培養し、培養皿上で Egr3 を消去した後、Egr3 および Pax7 のタンパク質発現を解析した。

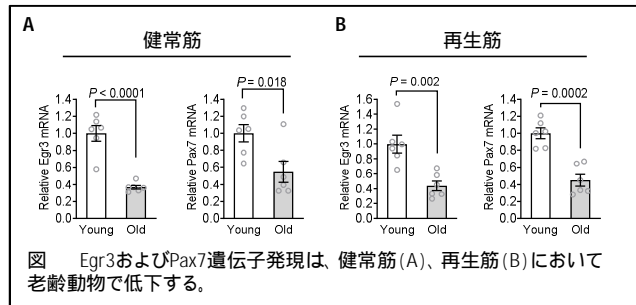
4. 研究成果

(1) 3 カ月齢および 17 カ月齢のマウスの健常および損傷筋から、筋サテライト細胞を単離し、組織化学的な筋サテライト細胞数および Egr3 および筋サテライト細胞機能に重要な Pax7 の遺伝子発現量を分析した。組織化学的検討の結果、老齢動物の筋サテライト細胞数は損傷の有無に関係なく老齢動物で有意に低下した(図)。そのような筋サテライト細胞における遺伝子発現を検討した結果、Egr3 および Pax7 の発現量はいずれも、損傷の有無にかかわらず、高年齢動物で有意に低下した(図)。また、培養細胞における結果では、培養筋が細胞において Egr3 抑制すると、Pax7 のタンパク発現量が低下することを見出した。以上の結果は、Egr3 が老齢期の筋サテライト細胞低下し、これが Pax7 の働きを介して筋サテライト細胞の機能に影響している可能性が示唆された。

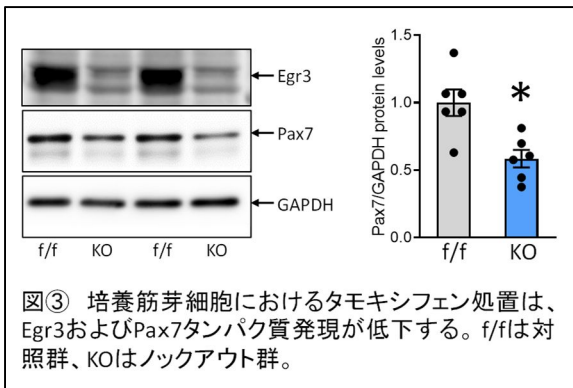
(2) Egr3-KO マウスの Egr3 をタモキシフェンによって除去したのちに、左足の前頸骨筋を損傷させた。また、右足は非損傷脚として評価した。損傷後 2 週間の回復期間を置き、骨格筋を評価した。しかしながら、筋の再生を反映する筋重量には Egr3 除去による影響が見られなかった(図 4 B-D)。次に、前脛骨筋の凍結切片を作成し、免疫組織化学的な検討を実施した。図 5A に示すように、損傷から 2 週間が経過すると、筋線維はほぼ元通りの形態を取り戻す。分析の結果、筋線維サイズの間接的な指標となる単位面積当たりの筋線維数は、f/f マウスと KO マウスの間で差がなかった(図 5B)。また、筋サテライト細胞数についても、損傷脚および非損傷脚共に f/f マウスと KO マウスの間に差は無かった(図 5B、5D)。



図① 加齢により筋サテライト細胞は健康筋(A)、再生筋(B)いずれも低下する。

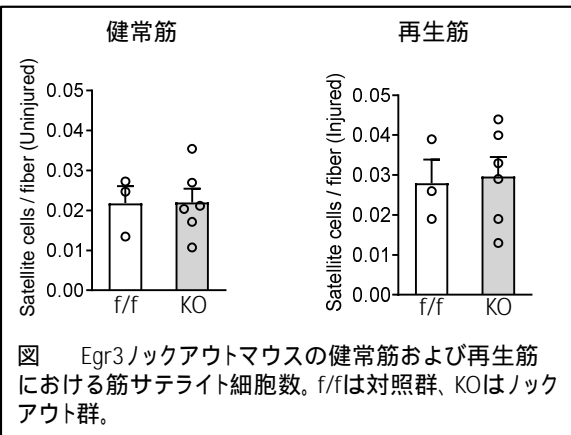


図② Egr3およびPax7遺伝子発現は、健康筋(A)、再生筋(B)において老齢動物で低下する。



図③ 培養筋芽細胞におけるタモキシフェン処置は、Egr3およびPax7タンパク質発現が低下する。f/fは対照群、KOはノックアウト群。

これらの結果は、仮説とは異なっており、Egr3 が筋サテライト細胞になくとも、筋再生は正常に行われることを示している。この点だけを見れば、Egr3 は筋サテライト細胞機能における生理的意義は高くないという解釈が可能である。しかしながら、今回の実験では、時間的問題から 8~10 週齢のマウスを用いた。しかしながら、筋サテライト細胞の周囲環境および筋サテライト細胞自体の特徴は、若齢と老齢動物で大きく異なっていることが予想される。また、老齢に至るまでの時間が徐々に筋サテライト細胞に作用して、Egr3 の機能に影響する可能性もある。実際、上述した我々の研究では、老齢動物から単離した筋サテライト細胞においては、Pax7 の遺伝子発現と Egr3 の遺伝子発現が共に低下していた。これらの点を考えると、Egr3 のサルコペニア進行における役割を明らかとするには、老齢動物モデルに特異的な生理的变化を考慮する必要があるのではないかと考えられた。



図④ Egr3ノックアウトマウスの健康筋および再生筋における筋サテライト細胞数。f/fは対照群、KOはノックアウト群。

まとめると、本研究の結果、Egr3 は筋サテライト細胞の Pax7 との関連が老齢期で認められるが、若齢マウスの個体を用いた検討では Egr3 と筋サテライト細胞機能との間に顕著な関連は見られなかった。それ故、筋サテライト細胞の Egr3 とサルコペニアとの関係を解明するには、老齢期あるいは両者の関係が重要となる臨界期を特定した後で Egr3 を消去し、筋再生介入等の実験を行っていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogura Y., Sato S., Kurosaka M., Kotani T., Fujiya H., Funabashi T.	4. 巻 47
2. 論文標題 Age-related decrease in muscle satellite cells is accompanied with diminished expression of early growth response 3 in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Rep.	6. 最初と最後の頁 977-986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-019-05189-5	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 該当する

〔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 Ogura Y, Kurosaka M, Sato S, Kotani T, Fujiya H, Funabashi T
2. 発表標題 Possible involvement of early growth response 3 in age-related reduction of muscle satellite cells
3. 学会等名 2018 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Ogura Y, Kurosaka M, Akema T, Funabashi T
2. 発表標題 Involvement of early growth response 3 in myoblast proliferation
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小倉裕司
2. 発表標題 Egr3 が筋再生に及ぼす影響
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Muscle research group St. Marianna University
https://yujigura.wixsite.com/physiologymrg
医局トップ 聖マリアンナ医科大学
http://www.marianna-u.ac.jp/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
研究分担者	黒坂 光寿 (Kurosaka Mitsutoshi) (40553970)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教 (32713)	

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