

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17857

研究課題名（和文）骨格筋幹細胞における老化制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the aging mechanism in skeletal muscle stem cells

研究代表者

北嶋 康雄（Kitajima, Yasuo）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：70734416

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）：本研究では、主のタンパク分解系であるプロテアソームに着目して、筋幹細胞における老化とのかかわりについて明らかにすることであった。筋幹細胞でのプロテアソーム機能不全は、老化関連のp53タンパクの増加により筋幹細胞の減少をもたらした。筋幹細胞でのプロテアソーム機能不全マウスにp53遺伝子欠損を起こしたが、筋幹細胞の数はレスキューできなかった。以上により、老化関連のp53に関して、個体と細胞においては異なるメカニズムが存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋幹細胞におけるタンパク分解系の機能不全は、老化マーカーであるp53の増加をもたらした。これにより、筋幹細胞において、タンパク分解系と老化が関係していることが示された。これらの成果は、筋幹細胞と老化をつなぐ重要な知見を提供し、今後の老化研究の発展につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the proteasome, the main proteolytic system, to elucidate its relationship to aging in muscle stem cells. Proteasome dysfunction in muscle stem cells resulted in a decrease in muscle stem cells due to an increase in the aging-related p53 protein. The p53 gene deletion in muscle stem cell-specific proteasome dysfunction mice did not rescue the number of muscle stem cells. These results suggest that there are different mechanisms for aging-related p53 in vivo and vitro.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 筋再生 筋幹細胞 タンパク分解系 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は未体験の超高齢社会に突入している。ますます進行する超高齢社会においてサルコペニア(加齢に伴う筋萎縮)に伴う運動機能低下が多く、要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。そういった状況の中で、近年の疫学調査により、骨格筋量と健康寿命は正の相関があり、骨格筋量そのものを保つことが重要であることが示された。そのため、筋量調節の分子メカニズムが解明されれば、筋萎縮の予防や改善につながる可能性がある。

近年では、加齢によりタンパク分解系の機能が低下することが報告されている。そこで本研究では、骨格筋に着目し、筋幹細胞レベルでのタンパク分解系の役割を明らかにする。これにより、筋萎縮の予防・改善など骨格筋の恒常性維持につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、主のタンパク分解系であるプロテアソームに着目して、筋幹細胞における老化とのかかわりについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

筋幹細胞特異的な Pax7 プロモーター下流に Cre 組換え酵素を挿入したマウスに、Rpt3f/f マウスを交配し、筋幹細胞特異的なプロテアソーム不全マウス(cKO マウス)を作出した。さらに、p53 との関連を調べるために上記 cKO マウスに p53f/f マウスを交配し、Rpt3 と p53 のダブルノックアウトマウス(dKO マウス)を作出した。

4. 研究成果

本研究に用いた Pax7CreERT2+/- ;Rpt3 floxed マウスはタモキシフェン誘導性に Rpt3 がノックアウトできるモデルである。タモキシフェンを5日間連続で腹腔内に投与後、Cre 誘導によりノックアウトモデルを作出した。ノックアウト誘導後に骨格筋幹細胞のみを FACS (fluorescence activated cell sorter) を用いて単離し、Rpt3 遺伝子発現を定量 PCR により評価した。ノックアウト群(cKO)は、コントロール群(Con)と比較して有意な Rpt3 遺伝子発現の抑制を示した。さらに cKO 群では遺伝子抑制が確認できたため、同様のモデルを用いてプロテアソーム活性の評価を行った。タモキシフェンによりノックアウトを誘導後、FACS を用いて筋幹細胞のみを単離した。cKO 群では、Con 群に比べてキモトリプシン様およびトリプシン様プロテアソーム活性が有意に抑制されていることを確認した。以上により、骨格筋幹細胞特異的な Rpt3 遺伝子欠損マウスモデルは、筋幹細胞特異的に Rpt3 遺伝子欠損が起こり、プロテアソーム活性を抑制することがわかった。

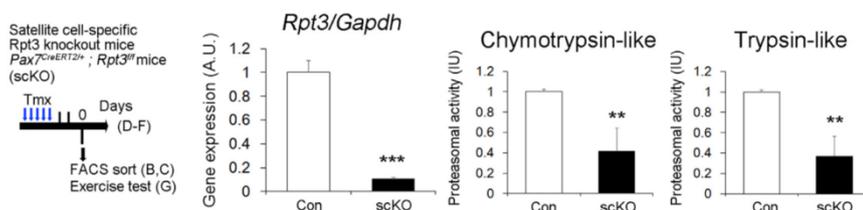


図. 遺伝子発現とプロテアソーム活性

骨格筋幹細胞特異的な Rpt3 遺伝子欠損マウスでは、顕著な筋再生不良を呈した。骨格筋の再生は、筋幹細胞が主に担っているため筋幹細胞の解析を行った。タモキシフェンを5日間連続で腹腔内に投与し遺伝子欠損を起こし、2日間の回復期をおいた後に2日および15日後にサンプリングを行った。後肢筋を単離しコラゲナーゼ処理を行い、FACSにより数を定量した。FACSによる筋幹細胞の集団は、2日後ではCon群とcKO群で細胞集団を確認できたが、15日後ではcKO群において、幹細胞プールが減少していることが分かった。これを定量すると、2日後では、Con群とcKO群では有意な差を認めなかったが、15日後ではcKO群はCon群に比較して有意に幹細胞プールが減少していた。以上により、骨格筋幹細胞特異的な Rpt3 遺伝子欠損マウスでは、筋幹細胞プールが減少しており、Rpt3 が関与するプロテアソーム機構は筋幹細胞の維持機構に必須であることが示唆された。

骨格筋を作り出す筋幹細胞でのプロテアソーム機能の不全は、細胞死による幹細胞数の減少を呈し、幹細胞の枯渇による筋再生不全など骨格筋の恒常性の破綻をもたらした。コントロールマウスとcKOマウス由来の筋幹細胞での遺伝子発現の違いを把握するためにRNAseqを行った。それによると、cKOマウス由来の筋幹細胞において、p53経路が亢進していることが分かった。それを裏付けるために、蛍光免疫染色でp53タンパクの発現を調べた。コントロールおよびcKOマウス由来の筋幹細胞を単離し、培養系で3日間培養した。その後、培養系で遺伝子欠損を誘導

するために 40H-タモキシフェンを培地に添加し遺伝子欠損を誘導した。タモキシフェン投与48 時間後に細胞を固定して、p53 抗体で免疫染色を行った。その結果、コントロールと比較して cKO マウス由来の筋幹細胞は、p53 陽性の筋幹細胞が 20 倍も増加していることが分かった。これにより RNAseq のデータとあわせて、筋幹細胞におけるプロテアソーム機能不全は p53 の亢進により、細胞死を誘導していることが示唆された。

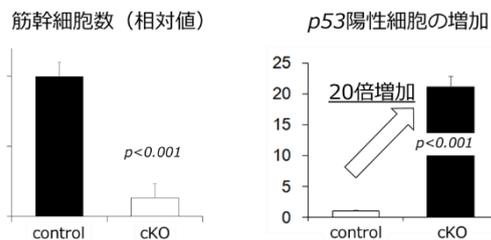


図. cKOでは筋幹細胞が少なく、p53(老化)が亢進

プロテアソーム機能不全の細胞死が主に p53 経路であれば、cKO マウスに p53 遺伝子欠損を起こすことで、筋幹細胞が減少する表現型をレスキューできないかと考えた。そこで、新たに p53 floxed マウスを導入し、cKO マウスと交配することでダブルノックアウトマウスを作出した (dKO マウス)。作出した dKO マウスに 5 日間連続でタモキシフェンを投与して、Cre 誘導により遺伝子欠損を誘導した。cKO マウスでは、遺伝子欠損の約 15 日後には筋幹細胞が減少することが分かっていたので、dKO マウスにおいてもタモキシフェン終了後の 15 日後に FACS を用いて筋幹細胞の定量を行った。その結果、コントロールと比べて、dKO マウスにおいては、筋幹細胞が減少していた。これにより、個体レベルでの筋幹細胞の数は p53 遺伝子欠損を起こしても、レスキューできなかった。培養系においては、cKO マウス由来の筋幹細胞は p53 の遺伝子ノックダウンによりレスキューできたため、in vitro と in vivo において、また別のメカニズムが存在する可能性を示唆した。

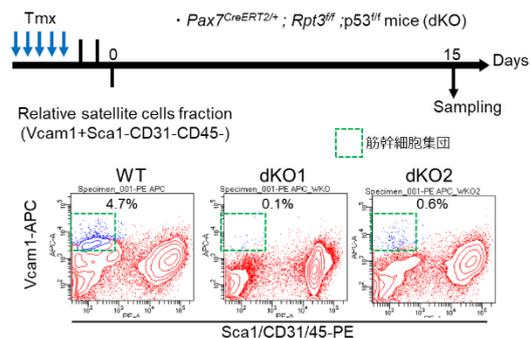


図. dKOでも筋幹細胞は減少した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Akiyama Tetsuya, Suzuki Naoki, Ishikawa Mitsuru, Fujimori Koki, Sone Takefumi, Kawada Jiro, Funayama Ryo, Fujishima Fumiyoshi, Mitsuzawa Shio, Ikeda Kensuke, Ono Hiroya, Shijo Tomomi, Osana Shion, Shirota Matsuyuki, Nakagawa Tadashi, Kitajima Yasuo, et al.	4. 巻 45
2. 論文標題 Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 362 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2019.06.013	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 北嶋康雄	4. 巻 44
2. 論文標題 骨格筋および骨格筋幹細胞におけるプロテアソーム機構の役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 39-41
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 -

1. 著者名 Shijo Tomomi, Warita Hitoshi, Suzuki Naoki, Ikeda Kensuke, Mitsuzawa Shio, Akiyama Tetsuya, Ono Hiroya, Nishiyama Ayumi, Izumi Rumiko, Kitajima Yasuo, Aoki Masashi	4. 巻 307
2. 論文標題 Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2018.06.009	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 Kitajima Yasuo, Ono Yusuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Visualization of PAX7 protein dynamics in muscle satellite cells in a YFP knock-in-mouse line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Skeletal Muscle	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13395-018-0174-x	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 Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Osana Shion, Yoshioka Kiyoshi, Tashiro Yoshitaka, Takahashi Ryosuke, Ono Yusuke, Aoki Masashi, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1523 ~ 1538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.10.009	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 Ono Hiroya, Suzuki Naoki, Kanno Shin-ichiro, Kawahara Genri, Izumi Rumiko, Takahashi Toshiaki, Kitajima Yasuo, Osana Shion, Nakamura Naoko, Akiyama Tetsuya, Ikeda Kensuke, Shijo Tomomi, Mitsuzawa Shio, Nagatomi Ryoichi, Araki Nobukazu, Yasui Akira, Warita Hitoshi, Hayashi Yukiko K., Miyake Katsuya, Aoki Masashi	4. 巻 28
2. 論文標題 AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1133 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.02.006	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋幹細胞におけるプロテアソーム系の役割およびサテライト細胞研究の新たなツールと応用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北嶋康雄、鈴木直輝、布宮亜樹、長名シオン、吉岡潔志、田代善崇、高橋良輔、小野悠介、青木正志、永富良一
2. 発表標題 ユビキチン-プロテアソーム系は筋幹細胞の恒常性維持に必須である
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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