

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19770189

研究課題名 (和文) 骨格筋幹細胞の自己複製機構の解明

研究課題名 (英文) Studies of molecular mechanisms in satellite cell self-renewal

研究代表者

長田 洋輔 (NAGATA YOSUKE)

東京大学・教養学部・特任助教

研究者番号：50401211

研究成果の概要 (和文)：骨格筋の修復・再生は骨格筋幹細胞によって行われる。骨格筋幹細胞の自己複製は個体の生涯にわたって骨格筋を維持するために必須の現象である。本研究では骨格筋幹細胞由来の株細胞 C2C12 を用いて、未分化かつ休眠状態を維持するリザーブ細胞がアダプタータンパク質 Grb2, グアニンヌクレオチド交換因子 Sos, 低分子量 G タンパク質 Ras を介する情報伝達系によって形成されることを明らかにした。このことから、筋再生の過程で活性化した骨格筋幹細胞が Grb2-Sos-Ras 依存的に休眠状態へと移行することによって、骨格筋幹細胞の自己複製が行われることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Skeletal muscle stem cells, usually called satellite cells, play central roles in skeletal muscle repair and regeneration. The self-renewal of satellite cells supports a remarkable regenerative potential of skeletal muscle. In this research, it was demonstrated that formation of reserve cells, which are quiescent and undifferentiated C2C12 myogenic cells, were controlled by Grb2-Sos-Ras mediated signaling pathways, suggesting that skeletal muscle satellite cells are maintained as a result of quiescence of activated satellite cells via those signaling pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	510,000	3,210,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：細胞・組織, 移植・再生医療, 再生医学, 発生・分化, シグナル伝達, 筋衛星細胞, 自己複製

1. 研究開始当初の背景

われわれの体を構成するほぼ全ての組織・器官には体性幹細胞が存在し、成長や細

胞の入れ替わり、損傷修復のために働いている。個体の生涯にわたって組織の再生能を維持するためには、体性幹細胞は厳密な管理の

下で維持されていると考えられる。つまり、平穏時には休止状態にある幹細胞は必要時に過不足なく活性化され、必要な数の前駆細胞を産生すると同時に自身をも複製する必要がある。体性幹細胞の活性化や自己複製の制御に関わる分子機構の解明は、生命を支える再生現象を理解するためにはもちろんのこと、再生医療への応用の上でも極めて重要な課題となっている。本研究課題では体性幹細胞の自己複製機構の解明を目指し、その解析系として骨格筋に注目する。筋衛星細胞とも呼ばれる骨格筋幹細胞は最近その自己複製能が *in vitro* および *in vivo* で証明された。筋衛星細胞は特別な装置なしに高純度の単離が可能であることに加え、通常条件では骨格筋にしか分化しないことから多分化能を示す他の体性幹細胞に比べて扱いが容易である。また、幹細胞を休止状態のまま単離することが可能であるため、幹細胞の活性化・不活性化の遷移過程の解明に適している。さらに、筋衛星細胞は他の体性幹細胞に先駆けて老化に伴う再生能低下の分子機構が示されたこともあり、再生医療や老化研究において中心的な対象となることが予想される。

2. 研究の目的

骨格筋幹細胞の自己複製機構として、1) 環境の非対称性に起因する分化運命の決定、2) 細胞内因子の発現に起因する分化運命の決定、3) 細胞内因子の局在に起因する非対称分裂、4) 活性化した骨格筋幹細胞の休眠状態への移行、5) 骨格筋以外の幹細胞（血球系幹細胞や血液血管前駆細胞）から骨格筋幹細胞への分化、といったモデルが提唱されている。これらは排他的なモデルではなく、現実には複数の機構が関与していると想像されている。マウス筋芽細胞株 C2C12 は骨格筋研究において一般的に用いられている細胞であり、分化形質を示す筋管と休眠状態の骨格筋幹細胞と同様の形質を示すリザーブ細胞の 2 種類の細胞が均一な細胞集団から形成される。そこで本研究では骨格筋幹細胞自己複製機構として 4) 活性化した骨格筋幹細胞の休眠状態への移行、に注目し、C2C12 培養系を用いてリザーブ細胞形成に関与する刺激・情報伝達系を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス筋芽細胞株 C2C12 は 20% 胎児ウシ血清を含む DMEM 中で継代培養し、分化誘導を行う際には細胞播種の 24 時間後にインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ウシ血清アルブミンを含む DMEM に培養液交換した。各種阻害剤の添加あるいは siRNA のトランスフェクションは培養液交換

と同時にいった。72 時間後に細胞をホルマリン固定し、筋分化調節因子 MyoD および抗アポトーシス因子 Bcl-2 の免疫染色を行った。筋分化した細胞は MyoD 陽性/Bcl-2 陰性、リザーブ細胞は MyoD 陰性/Bcl-2 陽性として判定し、全核数に占める各種細胞の割合を算出した。

4. 研究成果

マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 を用いて骨格筋幹細胞の休眠状態への移行または休眠状態の維持に関与する因子を探索した。増殖状態、筋分化状態、休眠状態となるように培養した C2C12 細胞から RNA あるいはタンパク質を抽出し、RT-PCR 法やウェスタンブロッティング法によって解析を行った。先行研究に照らし合わせて休眠状態の誘導または維持に関与していると予想される分子に注目したところ、Klf-4 と Tie-2 について興味深い結果が得られた。Klf-4 は休眠状態の細胞、つまりリザーブ細胞において、増殖中の細胞や筋分化した細胞に比べて有意に高い発現が認められた。一方、Tie-2 は mRNA レベルでは細胞の状態にかかわらず一定の発現が認められたものの、タンパク質レベルでは増殖細胞の培養上清のみに可溶性 Tie-2 と思われるバンドが検出されることがわかった。Klf-4 および Tie-2 の役割についてはさらなる研究の発展が期待される。

また、特定の遺伝子産物の機能を調査するためにジーンサイレンシング法が有効と考え、C2C12 細胞に対する siRNA トランスフェクションの最適化を試みた。特に、休眠状態の維持に関わる分子の機能を明らかにするために、休眠状態の細胞に対するジーンサイレンシング法の確立が必須と考えた。そして、トランスフェクションの直前に適切な前処理を行うことで休眠状態の細胞にも効率的なトランスフェクションが可能であること、実際に Grb2 アダプタータンパク質のノックダウンが可能であることを証明した (Nagata et al 2010)。この方法を利用することにより、骨格筋幹細胞の休眠状態の維持および活性化を制御する分子機構の解明が大きく進展すると期待している。

C2C12 細胞を用いて骨格筋幹細胞の休眠状態への移行または休眠状態の維持に関与する因子を探索する中で、情報伝達系からのアプローチを試みた。ERK, JNK, p38 MAPK, PI3K, Akt の阻害を行ってもリザーブ細胞形成に変化は生じなかったが、Grb2 のノックダウンによりリザーブ細胞が顕著に減少した。MEK 阻害剤, Raf-1 阻害剤, Rb/Raf-1 相互作用阻害剤, Ras 阻害剤を用いた実験により、Raf-MEK-ERK シグナルの阻害はリザーブ細胞化に関与しないこと、低分子量 G タンパク質 Ras の阻害は Grb2 ノックダウンと同等の結果

をもたらすことを明らかにした。これらの結果から、Grb2-Sos 複合体によって活性化された Ras が Raf-MEK-ERK 以外の情報伝達系を介してリザーブ細胞化を引き起こすことが考えられる。

さらに、筋分化調節因子 MyoD をノックダウンすることで、ほぼすべての細胞がリザーブ細胞化することを明らかにした。MyoD の機能が Ras によって抑制されることから、リザーブ細胞形成においては Grb2-Sos 複合体による Ras の活性化とそれに引き続いて起こる MyoD の機能抑制が重要な役割を担っていると考えられる。

本研究により、活性化された骨格筋幹細胞が再び休眠状態に戻る過程の一端を解明することに成功した。骨格筋幹細胞の自己複製は個体の生涯にわたって骨格筋再生能を維持するために必要な過程であり、その解明は筋疾患や老化による筋再生能の低下を克服するために役立つものと期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yosuke Nagata, Yusuke Honda, Ryoichi Matsuda, “FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation”, Cell Structure and Function, 査読有り, 2010 [Epub ahead of print]

② Namiko Kikkawa, Tomohisa Ohno, Yosuke Nagata, Masataka Shiozuka, Toshihiro Kogure, Ryoichi Matsuda, “Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice” Cell Structure and Function, 査読有り, 2009, Vol. 34, pp. 77-88

[学会発表] (計 6 件)

① 長田洋輔, 本田悠介, 松田良一「筋衛星細胞のモデルであるリザーブ細胞培養系を用いた筋衛星細胞活性化の研究」, 日本動物学会第 80 回大会, 静岡, 2009 年 9 月, ポスター発表

② 本田悠介, 長田洋輔, 松田良一「筋衛星細胞の休眠化機構に関する研究」, 日本動物学会第 80 回大会, 静岡, 2009 年 9 月, 口頭発表

③ 吉川奈美子, 長田洋輔, 松田良一「高濃度リン酸培養は骨格筋細胞に骨分化を誘導

する」, 日本動物学会第 80 回大会, 静岡, 2009 年 9 月, 口頭発表

④ 長田洋輔, 松田良一「スフィンゴシン-1-リン酸によって媒介される筋衛星細胞活性化」, 第 17 回運動生理学会大会, 慈恵医科大学, 2009 年 7 月, シンポジウム

⑤ 長田洋輔, 目黒区生涯学習シンポジウム「教育機関との連携・協力により生涯学習を広げていくために」, 目黒区総合庁舎, 2008 年 11 月, シンポジウム

⑥ 長田洋輔, 松田良一「スフィンゴ脂質によって媒介される筋衛星細胞活性化の制御機構」日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 2007 年 9 月, ポスター発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 洋輔 (NAGATA YOSUKE)
東京大学・教養学部・特任助教
研究者番号：50401211

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：