

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03233

研究課題名(和文) 骨格筋が異種細胞集団をインテグレートして機能的臓器を形成する仕組み

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms how skeletal muscle integrates different cell types to form a functional organ.

研究代表者

瀬原 淳子 (Sehara, Atsuko)

京都大学・医生物学研究所・連携教授

研究者番号：60209038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：臓器の発達を、骨格筋を中心とする異種細胞・組織のインテグレーション/統合という視点で捉え、細胞増殖・分化制御の観点からの解明に取り組んだ。ゼブラフィッシュ・マウスを用いて、骨格筋 腱接合部で発現する新たな転写因子Ebf3の同定に成功し、Ebf3が未分化結合組織細胞の分化を制御し、胸骨形成に関わる転写因子の一つであることを示した。一方、骨格筋や心臓神経堤細胞などで発現する膜型メタロプロテアーゼADAM19について、これがBMPレセプターALK2の細胞外ドメイン切断によりBMPシグナリングを抑制することにより腱形成に関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋には腱細胞や多くの結合組織細胞が隣接し、骨とともに運動器を形作るが、それらの細胞の発生や細胞系譜・統合機構についてはほとんど解明されていない。腱や結合組織細胞分化におけるEbf3やADAM19の同定とその役割はそれぞれ非常にユニークなもので、学術的に重要である。

また、Ebf3欠損による胸骨形成不全に加え、ADAM19欠損による腱分化不全がそれらの細胞の軟骨化を引き起こし、心室中隔欠損を生ずるといった心室中隔欠損の細胞基盤を明らかにしたこと、ヒトADAM19によりヒトALK2が切断されることも示し、ヒトにおける同様のメカニズムの存在を示唆できたことには、大きな医学的価値がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we asked how muscle cells integrate other cell types and tissues such as embryonic tenocytes and connective tissues to form skeletal muscles as organs. We could identify EBF3 as a novel transcription factor expressed at the myo-tendon junction using zebrafish and mice. EBF3 regulates differentiation of immature connective tissue cells, and it is essential for the sternum formation in mice. We could also elucidate roles of ADAM19, one of transmembrane metalloproteases, in differentiation of tenocytes. ADAM19 mediates the attenuation of BMP signaling critical for the tenocyte differentiation through the ectodomain shedding of ALK2.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：骨格筋発生 増殖因子 転写因子 プロテアーゼ 臓器形成 筋腱接合部形成 骨形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、骨格筋を中心に、そこに他の細胞や組織がどのようにインテグレートされて臓器としての運動器を形成するのか、という問題の解明を目指した。世界的にみて近年の骨格筋発生・再生の研究は、それらに關与する幹細胞系譜やその分化の研究を中心に進められてきている。しかし、それら幹細胞から形成される骨格筋が骨とどのように協調的に統合されて運動器を形成するのか、その肝心なところはほとんど未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、その問題を解決するためには、まず骨と骨格筋の間に介在する腱・結合組織の発生や細胞分化機構の理解が必要である、という問題意識を持って、研究を進めることとした。換言すると、これら腱細胞や結合組織細胞はその発生・細胞系譜があまりよくわかっておらず、そのことが運動器形成機構の解明を遅らせている、という認識から、主に、腱前駆細胞とその分化に着目した研究に取り組むことにした。

3. 研究の方法

(1) EBF3 の同定とその役割の解明に関する研究方法

まず GAL4/UAS エンハンサートラップにより、ゼブラフィッシュ胚の腱・結合組織で発現する遺伝子をスクリーニングし、そのひとつとして Ebf3 という転写因子を同定した。Ebf3 の腱・結合組織における発現はマウス胚においても確認されたことから、Ebf3^{flx/flx} マウスを作製し運動器発生における Ebf3 の役割を検討した。

(2) 腱細胞分化における Adam19 の役割と機能に関する研究方法

所属研究室において単離された Adam19 は、骨格筋やその幹細胞に加えて、心臓神経堤細胞において顕著に高い発現を示すことに着目した。神経堤細胞は、頭部において多分化能を持つが、心臓では大動脈周囲の平滑筋に分化する以外にどのような細胞分化を行うのか、筋組織を中心とする臓器形成にどのように關与するのか未解明であることから、その臓器形成における Adam19 の役割に焦点を当て、細胞特異的な Adam19 欠損マウスを作成とその解析を行った。

4. 研究成果

(1) EBF3 の同定とその役割の解明

中胚葉に分類される間葉組織の発生起源には、体節と側板中胚葉(LPM)の2つがあり、体節からは椎骨や肋骨などの体幹の組織が、LPM からは四肢の骨や胸骨が発生する。Ebf1,Ebf2,Ebf4 とその発現を比較すると、胸骨と周辺結合組織の起源となる胸部 LPM では Ebf3 のみが強く発現していた。それに対応して、全身(CAG-Cre)Ebf3 ノックアウト(KO)マウスでは椎骨と肋骨が正常に形成されたのに対し、LPM 由来の胸骨で骨化不全がみられた。胸骨の表現型は LPM (Prx1-Cre)・腱 (Scx-Cre) 特異的 Ebf3 KO マウスにおいても再現され、Ebf3 が LPM 自律的にその骨化に関わることがわかった。

LPM 特異的 Ebf3 KO マウスの胸部 LPM では、既に胸骨形成前の E12.5 前後で、Runx2+骨芽前駆細胞の減少が見られ、Ebf3 が LPM 間葉細胞からの Runx2+骨芽前駆細胞の産生という、早期の骨芽細胞系譜の分化を制御していることが示唆された。さらに、タモキシフェン誘導性 (Ubc-CreER^{T2}) 時期特異的 Ebf3 KO マウスの表現型評価により、Ebf3 の骨芽細胞系譜での機能時期が、E10.5 前後であることを特定した。この時期は、LPM での Ebf3 発現の開始時期と一致する。そこで、LPM に

おける Runx2+骨芽前駆細胞の産生機構を探るため、LPM 特異的 Ebf3 KO 胚と Control 胚それぞれから、E10.5 胚の胸部 LPM 由来細胞をフローサイトメトリーで採取し、RNA-seq 解析による遺伝子発現比較を行った。その結果、KO マウスでは Runx2 の上流制御因子として報告されている Shox2 の発現低下、未分化線維芽細胞マーカー(Egr1/2, Osr1)の発現上昇などが見られた。また種々の未分化細胞の分化に関わる転写因子 Islet1 の発現上昇が見られ、Ebf3KO E10.5 胚の LPM では Islet1⁺細胞の増加も見出された。これらの解析から、Ebf3 が未分化 LPM 細胞からの線維芽細胞分化を抑制し、骨芽前駆細胞の産生を促進することが示唆された。

これらの結果は、発生学上あるいは進化上、興味深い位置付けにある胸骨発生における Ebf3 の役割を明らかにし、結合組織・腱・骨芽前駆細胞分化の新たな機構を示唆したものである。興味深いことに、結合組織・骨芽前駆細胞分化において EBF3 が必要とされる時期は、体節から四肢や胸骨側板へと骨格筋前駆細胞が移動する時期に一致している。その時期の EBF3 は、LPM と体節の境界領域で発現がみられることから、この領域が、体節から移動してくる骨格筋前駆細胞と側板中胚葉からなる運動器形成の開始部位と考えられる。

(この研究の意義)

骨格筋-腱接合部位の形成は、運動器形成において極めて重要な位置づけを有する。また、骨格筋組織内には、多くの結合組織細胞があり、またそれらの heterogeneity について多くの報告がある。しかし、それにもかかわらず、それらの細胞の発生や細胞系譜についてはほとんど解明されていない。本研究において、ゼブラフィッシュのエンハンサートラップスクリーニングからスタートして同定に成功した Ebf3 とその役割の解明は、その疑問を解く鍵となるもので、骨格筋・軟骨・腱・骨の統合機構解明への糸口を与えるものである。

(2) 腱細胞分化における Adam19 の役割と機能の解明

まず、細胞系譜特異的 Adam19 欠損マウスを作成すると、神経堤細胞特異的欠損マウスでは心臓組織内に異所性の軟骨を形成しており、さらに神経堤細胞を可視化した Adam19 欠損マウスを用いて、この異所性軟骨細胞が全て神経堤細胞由来であることを見出した。軟骨に分化した細胞が本来野生型でどのような細胞へと分化するのかを調べ、腱細胞マーカーである Scx、Col1 二重陽性の腱様細胞に分化することを発見した。

そこで、Adam19 欠損マウスにおける異所性軟骨形成の原因を探るために、野生型と Adam19 欠損型の心臓神経堤細胞をそれぞれ回収し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、Adam19 欠損型では軟骨細胞分化に重要な役割を果たす Sox9 遺伝子の発現が高いことが明らかとなった。Adam19 欠損マウスの神経堤細胞において Sox9 の発現を半減させると、異所性軟骨の形成が消失し、逆に、神経堤細胞で Sox9 を過剰発現させたマウスは Adam19 欠損マウスと同様に心臓に異所性軟骨を形成したことから、Adam19 欠損による異所性軟骨形成は、Sox9 遺伝子の発現上昇に起因することが示唆された。

Adam19 欠損マウスで Sox9 の発現が上昇する原因として、すでに Sox9 の上流シグナルとして報告のある BMP シグナル伝達系の異常な活性化が考えられた。BMP シグナル活性化の指標である Smad1/5/9 のリン酸化が Adam19 欠損型の心臓神経堤細胞で強く認められたこと、BMP シグナル下流遺伝子の Hand1 と Has2 の発現が Adam19 欠損型で上昇していたことから、Adam19 は BMP シグナル伝達を抑制していると考えられた。

Adam19 は一回膜貫通型のメタロプロテアーゼで、膜型増殖因子等を切断すると考えられてきたが、これまでその生理的基質は不明であった。異所性軟骨形成は、神経堤細胞特異的 Adam19 欠損マウスでも再現されたことから、Adam19 が心臓神経堤細胞で BMP 受容体を

切断し BMP シグナル伝達を抑制・減弱する、という仮説を検証した。まず培養細胞実験より、Adam19 が BMP 受容体の一つである Alk2 (Acvr1) を切断しうることを見出した。また、この機能はマウスと同様ヒト ADAM19 とヒト ALK2 においても観察された。さらに、この結果を生体マウスで検証するため Alk2/Alk3 のインヒビターである LDN-193189 を Adam19 欠損マウスに投与すると、異所性軟骨の形成が阻害された。一方、神経堤細胞特異的 Sox9 過剰発現マウスへの LDN-193189 の投与では異所性軟骨形成は阻害されず、仮説を裏付けることができた。

以上、本研究は心臓神経堤細胞で発現する Adam19 が Alk2 の切断を介した BMP-Sox9 のシグナル経路の抑制により、軟骨細胞分化を制限するという神経堤細胞分化の新たなメカニズムを示唆した。したがって、心臓神経堤細胞に軟骨分化を抑制し腱様組織を形成する機構が存在することが支持された。

(この研究の意義)

まず、その分化能についての知見が乏しかった心臓神経堤細胞が、胎児期に腱様組織に分化し、心室中隔形成に関与していることを示したことは、学術的にみて画期的である。心室中隔は筋性中隔、すなわち心筋由来であるが、そこに、見出された腱様組織が接着することにより、メカニカルストレスに耐えうる中隔が形成されることがわかったことにも、大きな学術的価値がある。このような機構が、より一般的な筋—腱接合部を形作る腱分化にも関与している可能性についても、今後検討する必要がある。

ADAM19 欠損による腱分化不全は同時にそれらの細胞の軟骨化を引き起こし、その結果心室中隔欠損を生ずる。このような心室中隔欠損の細胞基盤を明らかにしたことには、大きな医学的価値がある。さらに本研究ではヒト ADAM19 によりヒト ALK2 が切断されることも示しており、ヒトにおいても同様のメカニズムがする可能性も示すことができた。それぞれ ADAM19 と ALK2 の遺伝子変異が心疾患患者で高い頻度で観察されることもわかっている。これらのことから、今後、本研究で得られた基礎的知見が、遺伝性心疾患や神経堤細胞関連遺伝子疾患の病態解明や治療に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Konagaya Yumi, Takakura Kanako, Sogabe Maina, Bisaria Anjali, Liu Chad, Meyer Tobias, Sehara-Fujisawa Atsuko, Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻 19
2. 論文標題 Intravital imaging reveals cell cycle-dependent myogenic cell migration during muscle regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 3167 ~ 3181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384101.2020.1838779	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 Kuriki Mao, Sato Fuminori, Arai Hiroyuki N., Sogabe Maina, Kaneko Mari, Kiyonari Hiroshi, Kawakami Koichi, Yoshimoto Yuki, Shukunami Chisa, Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 147
2. 論文標題 Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev186239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.186239	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 Sogabe Maina, Ohzeki Masayuki, Fujimoto Koji, Sehara Fujisawa Atsuko, Nishimura Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Restored interlaced volumetric imaging increases image quality and scanning speed during intravital imaging in living mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biophotonics	6. 最初と最後の頁 e201960204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbio.201960204	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 Arai Hiroyuki N., Sato Fuminori, Yamamoto Takuya, Woltjen Knut, Kiyonari Hiroshi, Yoshimoto Yuki, Shukunami Chisa, Akiyama Haruhiko, Kist Ralf, Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 29
2. 論文標題 Metalloprotease-Dependent Attenuation of BMP Signaling Restricts Cardiac Neural Crest Cell Fate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 603 ~ 616.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/J.celrep.2019.09.019	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 Hori Shimpei、Hiramuki Yosuke、Nishimura Daigo、Sato Fuminori、Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 33
2. 論文標題 PDH mediated metabolic flow is critical for skeletal muscle stem cell differentiation and myotube formation during regeneration in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8094 ~ 8109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802479R	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8件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 佐藤文規、瀬原淳子
2. 発表標題 骨格筋の重力/無重力応答に関する研究
3. 学会等名 第59回生体医工学会大会 シンポジウム「宇宙に生き、地上で活かす」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬原淳子
2. 発表標題 骨格筋の抗重力について考える
3. 学会等名 分子生物学会 フォーラム「骨格筋細胞研究がリードする新しい健康科学の分子生物学新機軸」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sogabe M, Ohzeki M, Sehara-Fujisawa A
2. 発表標題 Improving under-sampled imaging data quality in live tissue imaging.
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuriki M, Sato F, Sumiyama K, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A.
2. 発表標題 Roles of a transcription factor 19A in the osteoblast development of sternum
3. 学会等名 ECTS (European Calcified Tissue Society)2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hori S, Hiramuki Y, Nishimura D, Sato F, Sehara-Fujisawa A
2. 発表標題 Metabolic flow from glycolysis to TCA cycle is critical for skeletal muscle stem cell differentiation and myotube formation during regeneration in mice
3. 学会等名 2019 Myogenesis Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬原淳子、堀新平、平向洋介、西邨大吾、佐藤文規
2. 発表標題 骨格筋衛星細胞の維持・分化における糖代謝制御の重要性
3. 学会等名 日本筋学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬原淳子
2. 発表標題 宇宙滞在の骨格筋維持への影響を探る
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴谷雅文、佐藤文規、田淵麻衣、川上浩一、瀬原淳子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ運動神経におけるBACE1活性の可視化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ALK2の変異を有する疾患の治療または予防用医薬組成物	発明者 荒井 宏行・瀬原淳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/027186	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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		
英国	Newcastle University		