

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07519

研究課題名(和文) Notchシグナルによるヒト骨格筋前駆細胞の増殖・分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms by which Notch regulates proliferation and differentiation of human muscle progenitors

研究代表者

鈴木 友子 (Miyagoe-Suzuki, Yuko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：00342931

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)：ヒトiPS細胞由来筋前駆細胞の分化をNOTCH 阻害剤が促進することから、我々はNotch阻害剤により発現が変化する遺伝子の探索を行い、プロスタグランジンE2のレセプターの一つであるEP2遺伝子の発現がNOTCHによって誘導されることを明らかにした。EP2を活性化すると筋前駆細胞の分化が抑制された。さらにタモキシフェン投与により生後の骨格筋幹細胞である筋衛星細胞においてEP2遺伝子が不活化されるマウスを作出し、EP2が筋衛星細胞の維持に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋幹細胞においてNotchシグナルがそのcell fateを決める分子メカニズムはあまり明らかになっていなかった。我々はプロスタグランジンE2のレセプターの一つEP2がNotchシグナルの下流で働き、筋前駆細胞の分化を抑制していることを明らかにした。さらにEP2のコンディショナルノックアウトマウスを作出し、EP2が筋衛星細胞の維持に必須であることを明らかにした。この所見は筋衛星細胞の機能低下が報告されている筋ジストロフィーやサルコペニアなどの治療法の開発に大いに貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Since Notch inhibition promotes differentiation of human iPS cell-derived muscle progenitor cells, we searched for genes whose expression is altered by Notch inhibition, and revealed that the expression of the EP2 gene, one of the prostaglandin E2 receptors, is up-regulated by Notch signaling. Furthermore, activation of EP2 suppressed the differentiation of muscle progenitor cells. Interestingly, inactivation of the EP2 gene in muscle satellite cells by administering tamoxifen in mice, significantly reduced the numbers of muscle satellite cells, indicating that EP2 is indispensable for the maintenance of muscle satellite cells.

研究分野：筋ジストロフィーの再生医療

キーワード：筋衛星細胞 骨格筋幹細胞 プロスタグランジンE2 EP2 Notch 筋ジストロフィー 筋再生

1. 研究開始当初の背景

HLA が適合するヒト iPS 細胞から骨格筋前駆細胞を誘導し、遺伝的にジストロフィンが欠損する Duchenne 型筋ジストロフィー患者の骨格筋に移植する細胞移植療法は、ジストロフィンを補い、同時に筋再生を促す理想的な治療法である。我々は再現性の高い骨格筋誘導法を開発したが (Sakai-Takemura et al., *Sci Rep.* 8, 6555, 2018)、誘導効率は十分ではなかった。また、誘導した細胞をフローサイトメトリーで純化し、培養して細胞数を増やすと移植効率が低下し、移植治療法の実用化を妨げていた。そこで骨格筋前駆細胞の増殖・分化・自己複製を制御するシグナルを明らかにすることが、ヒト iPS 細胞から再生能の高い筋前駆細胞を誘導し、患者筋に移植する技術の開発につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

Notch は骨格筋の発生や恒常性維持に中心的な役割を果たすシグナル分子である。我々はヒト iPS 細胞から誘導した骨格筋前駆細胞において Notch シグナルを阻害すると筋分化が促進され、筋ジストロフィーマウスへ移植すると、より多くのジストロフィン陽性線維が形成されることを見出している。そこで骨格筋前駆細胞における Notch シグナルの標的遺伝子を同定し、その骨格筋前駆細胞における役割を明らかにすることで、骨格筋前駆細胞の分化がどのように制御されているかを解析することにした。

3. 研究の方法

(1) ヒト筋前駆細胞の Notch 阻害剤投与後の遺伝子発現解析、EP2 アゴニストの添加実験

分化誘導培地で培養したヒト筋前駆細胞 (Hu5/KD3) に Notch 阻害剤 (DAPT) を添加し、遺伝子発現の変化を RNA-seq 解析を用いて解析した。DAPT 添加により EP2 の発現が著しく下がっていたことから、プロスタグランジン E2 (PGE2) や EP2 選択的アゴニスト (Butaprost) を、Hu5/KD3 に作用させ、筋分化に対する効果を検討した。EP2 下流のシグナル経路として知られる Protein kinase A の阻害剤 (H-89) や活性化剤 (Dibutyryl-cAMP, Forskolin 等) の効果を検討した。

(2) ヒト iPS 細胞からの骨格筋誘導実験と PGE2 と TGF- β 阻害剤 (SB431542) の添加実験

我々が開発したヒト iPS 細胞から筋前駆細胞を誘導する浮遊培養系 (Sakai-Takemura et al., *Sci Rep.* 8, 6555, 2018) へ PGE2 と SB431542 を添加し、骨格筋前駆細胞の誘導効率への影響を検討した。

(3) 成体骨格筋幹細胞である骨格筋衛星細胞特異的な EP2 遺伝子不活化実験

Pax7^{CreERT2} マウス (Murphy et al., *Development* 138, 3625-3637, 2011) と EP2 flox マウス (Johansson et al., *J Neurosci.* 33, 16016-16032, 2013) を交配し、Pax7^{CreERT2/+};EP2^{flox/flox} と Pax7^{CreERT2/+};EP2^{+/+} マウスを得た。これらのマウスにタモキシフェン (Tm) を 5 日間腹腔内に連続投与し、筋衛星細胞特異的に EP2 遺伝子を不活化したマウス (EP2-cKO) とコントロールマウスを作出した。筋衛星細胞の単離には BD FACSAriaTM Fusion を用いた。

(4) 単離筋線維を用いた筋衛星細胞活性化の評価

コントロールマウス と EP2-cKO マウスの長趾伸筋(EDL)を 0.2% コラゲネースで消化し、得られた単一筋線維を培養し、筋線維に付着している筋衛星細胞の活性化を抗 Ki67 抗体による免疫染色で検討した。

(5) EP2 欠損筋衛星細胞の増殖能の評価

コントロールマウス と EP2-cKO マウスからセルソーターを用いて単離した筋衛星細胞を 20% 牛胎児血清と 2.5 ng/ml bFGF を含む DMEM 培地で培養し、ErdU の取り込みを測定することで増殖能を検討した。また分化培地を用いて筋衛星細胞の分化を誘導し、fusion index(筋管中の核/全核×100%)を調べた。

4. 研究成果

(1) プロスタグランジン E2 受容体 EP2 は Notch シグナルの下流でヒト骨格筋前駆細胞の分化を抑制した。

ヒト筋前駆細胞を分化誘導培地で培養すると多くの細胞が融合して多核の筋管(myotube)を形成するが、筋管を形成しない単核細胞において EP2 が高発現することを明らかにした。プロスタグランジン E2(PGE2)や EP2 選択的アゴニスト(Butaprost)はヒト筋前駆細胞の筋分化を抑制した。cAMP/PKA 経路の活性化剤や阻害剤はヒト筋前駆細胞の分化には影響を与えなかった。EP2 は Notchシグナルの下流で cAMP/PKA-independent に筋前駆細胞の分化を抑制すると考えられた(Sakai-Takemura et al., *Commu Biol*, 3,182, 2020)。EP2 下流のシグナル伝達経路の解析は今後の課題である。

(2) プロスタグランジン E2 はヒト iPS 細胞からの前駆細胞誘導効率を上げない。

TGF- 阻害剤(SB431542)は浮遊培養法によるヒト iPS 細胞からの筋前駆細胞の誘導効率を向上させたが、PGE2 にはその効果は認められなかった。

(3) EP2 は筋衛星細胞の維持に必須である。

Tm 投与 1 カ月後、EP2-cKO マウスの骨格筋から単核細胞を調整し、フローサイトメトリーで解析したところ、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞の数がコントロール(Pax7^{CreERT2/+};EP2^{+/+})の約 3 分の 2 以下に減少していた。1.2% 塩化バリウム溶液を前脛骨筋に注射し筋壊死を引き起こすと、その再生過程において EP2-cKO の骨格筋では、コントロール筋と比較して小径の筋線維が多数認められた。筋衛星細胞が減少しているため、筋再生過程が障害されていると考えられた。

単一筋線維を 36 時間培養した後に解析すると、EP2 遺伝子が欠損した筋衛星細胞では、G0 期を抜け出した Ki67 陽性の筋衛星細胞の割合がコントロールと比較して増えており、EP2 を介したシグナルがブロックされた状態では、筋衛星細胞の活性化が亢進すると考えられた。すなわち、PGE2 は EP2 を介して筋衛星細胞の活性化を抑制することにより、筋衛星細胞を維持していることが示唆された。今後は EP2 の下流シグナルの解析が課題である。

(4) EP2 は筋衛星細胞の増殖には影響しないが、筋分化を抑制する

PGE2 は EP4 を介して骨格筋前駆細胞の増殖と未分化性の維持に関与するという先行研究がある(Ho et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, 6675-6684, 2017)。EP2 と EP4 はともに cAMP 濃度を増加させることが知られているが、EP2 を欠損する筋衛星細胞の増殖能はコントロールと同程度であった。分化培地に移すと、cKO マウスの筋

衛星細胞では fusion index が高く、自己複製した細胞と考えられる reserve cells (多くの筋前駆細胞が分化培地中で筋管形成するなか、細胞周期を抜け、未分化状態に留まる単核細胞) (Yoshida et al., *J Cell Sci.* 111, 769-779. 1998) の割合が減少していた。EP2 は筋前駆細胞の増殖には影響を与えないが、自己複製を促進している可能性が示唆された。

以上の結果から、プロスタグランジン E₂ のレセプターの一つ、EP2 が Notch シグナルの下流で発現が増強し、ヒト筋前駆細胞の分化を抑制することが明らかになった。骨格筋幹細胞である筋衛星細胞特異的に EP2 遺伝子を不活化したマウスでは、骨格筋衛星細胞の数が有意に減少しており、EP2 が、筋衛星細胞の維持に必須であることが明らかになった。EP2 を欠損した筋衛星細胞はコントロールと比較して、筋線維単離後早期に Ki67 陽性となった。EP2 は筋衛星細胞の活性化を抑制することで静止期の維持に寄与していると考えられた。

<引用文献>

Sakai-Takemura, F., Narita, A., Masuda, S., Wakamatsu, T., Watanabe, N., Nishiyama, T., Nogami, K., Blanc, M., Takeda, S., and Miyagoe-Suzuki, Y. (2018). Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci Rep.* 8, 6555.

Sakai-Takemura, F., Nogami, K., Elhussieny, A., Kawabata, K., Maruyama, Y., Hashimoto, N., Takeda, S., and Miyagoe-Suzuki, Y. (2020). Prostaglandin EP2 receptor downstream of Notch signaling inhibits differentiation of human skeletal muscle progenitors in differentiation conditions. *Commu Biol.* 3,182.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138, 3625-3637.

Johansson, J.U., Pradhan, S., Lokteva, L.A., Woodling, N.S., Ko, N., Brown, H.D., Wang, Q., Loh, C., Cekanaviciute, E., Buckwalter, M., Manning-Bog, A.B., Andreasson, K.I. (2013) Suppression of inflammation with conditional deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor in macrophages and brain microglia. *J Neurosci.* 33, 16016-16032.

Ho, A.T.V., Palla, A.R., Blake, M.R., Yucel, N.D., Wang, Y.X., Magnusson, K.E.G., Holbrook, C.A., Kraft, P.E., Delp, S.L., and Blau, H.M. (2017). Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 6675-6684.

Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K., and Nabeshima, Y. (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci.* 111, 769-779.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sakai-Takemura F, Nogami K, Elhussieny A, Kawabata K, Maruyama Y, Hashimoto N, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y	4. 巻 3
2. 論文標題 Prostaglandin EP2 receptor downstream of Notch signaling inhibits differentiation of human skeletal muscle progenitors in differentiation conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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） 10.1038/s42003-020-0904-6	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木 友子
2. 発表標題 筋幹・前駆細胞の移植効率を上げる因子の探索
3. 学会等名 2020年再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村 英子、野上 健一郎、丸山 友輔、エルフセイニー アフメド、橋本 有弘、武田 伸一、鈴木 友子
2. 発表標題 プロスタグランジンE2を介したヒト骨格筋前駆細胞の分化制御機構の解明
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹村 英子、丸山 友輔、野上 健一郎、エルフセイニー アフメド、川端 康太、武田 伸一、鈴木 友子
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞から誘導した骨格筋前駆細胞の成熟メカニズムの解析
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 友子
2. 発表標題 筋幹・前駆細胞の移植効率を上げる因子の探索
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 友輔、野上 健一郎、本橋 紀夫、竹村 英子、青木 吉嗣、内海 文彰、鈴木 友子
2. 発表標題 プロスタグランジンE2受容体EP2は骨格筋幹細胞の維持に重要である
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maruyama Y, Nogami K, Motohashi N, Sakai-Takemura F, Aoki Y, Takeda S, Uchiyama F & Miyagoe-Suzuki Y
2. 発表標題 PROSTAGLANDIN E2 RECEPTOR EP2 IS IMPORTANT FOR THE SELF-RENEWAL AND MAINTENANCE OF SKELETAL MUSCLE STEM CELLS
3. 学会等名 ISSCR/JSRM International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 友輔、野上 健一郎、本橋 紀夫、竹村 英子、内海 文彰、鈴木 友子、青木 吉嗣
2. 発表標題 プロスタグランジンE2受容体は筋衛星細胞の維持と自己複製を制御する
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ahmed Elhussieny, Ken ' ichiro Nogami, Fusako Sakai-Takemura, Yusuke Maruyama, AbdElraouf Omar Abdelbakey, Wael Abou El-kheir, Shin ' ichi Takeda, & Yuko Miyagoe-Suzuki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 17
3. 書名 Muscular Dystrophy: Research Updates and Therapeutic Strategy	

〔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	竹村 英子 (Takemura Fusako) (80790485)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研 究所 遺伝子疾患治療研究部・科研費研究員 (82611)	

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