

機関番号 : 82611

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~ 2010

課題番号 : 20590418

研究課題名 (和文) 骨格筋間葉系細胞による筋再生促進機構の解明

研究課題名 (英文) Study on molecular regulation of muscle regeneration by mesenchymal cells

研究代表者

鈴木 友子 (Suzuki Yuko)

独) 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

研究成果の概要 (和文) :

骨格筋由来間葉系細胞である CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞が、筋傷害時に活性化され、増殖し、筋再生を促進している事を明らかにした。特異的マーカーである CD248 遺伝子上流領域に DTR-EGFP をつないだトランスジェニックマウスを作成したが、GFP の発現が得られなかった。転写調節領域が不十分であった可能性がある。ジストロフィン欠損 mdx マウス由来の細胞を調べたところ、老齢のものは、細胞老化の状態にあり、細胞増殖関連遺伝子の発現が下がり、生体防御や免疫反応関連の遺伝子群が上昇していた。加齢に伴う間葉系細胞の機能変化により筋再生能が低下すると考えられた。

研究成果の概要(英文): We found that CD31(-) CD45(-) side population (SP) cells in skeletal muscle are activated during muscle regeneration and promote the proliferation and the migration of grafted myoblasts. To further clarify the roles for CD31(-) CD45(-) SP cells, we generated CD248-sDTR-EGFP transgenic mice. However, the mice did not express sDTR-EGFP. This could be because the 1.0 kb upstream sequences of the CD248 gene were not enough to drive the expression of the reporter gene. We next analyzed the genome-wide gene expression pattern of mesenchymal cells (a descendent of CD31(-) CD45(-) SP cells) from dystrophin-deficient mice of different age. We found that mesenchymal cells in mdx mice experience cell senescence and immune response- and defense-related genes. These findings suggest that impaired muscle regeneration seen in advanced dystrophic muscle can be partly explained by exhausted mesenchymal cells, which otherwise promote muscle regeneration.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学・実験病理学

キーワード: (1)骨格筋 (2)筋再生 (3)筋ジストロフィー (4)細胞移植 (5)幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) では間質の線維化や脂肪化を抑制し、骨格筋の再生能を回復させる治療法の併用が骨格筋幹細胞移植治療に有効であると期待される。Side population (SP) 細胞はベラパミル感受性の ABC トランスポーターによってヘキスト色素を細胞外へ排出する細胞である。我々はマウス骨格筋単核細胞をヘキスト 33342、CD31、CD45 で染色し、FACS で解析すると、骨格筋 SP 細胞は更に 3 つの細胞集団に分画できる事を報告した (Uezumi *et al.*, 2006)。骨格筋中の SP 細胞の 90% 以上は CD31 陽性 Bcrp1 陽性で増殖能・分化能に乏しかった。CD45 陽性 CD31 陰性 SP 細胞は SP 分画の 5-6% を占め、骨髄由来であったが、その筋分化能は低かった。CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞は全 SP 分画の 5-6% を占め、筋再生時に活発に増殖し、誘導により脂肪細胞や骨細胞へと分化した。この分画を筋芽細胞とともにジストロフィン欠損 mdx マウスの筋へ移植すると移植した筋芽細胞の増殖と移動を促進した。

2. 研究の目的

骨格筋再生のメカニズムの解明は、筋ジストロフィー再生医療の基盤となる。従来、筋再生研究は筋衛星細胞に注目して行なわれており、進行した筋ジストロフィーや老化に伴う筋再生能の低下の原因は主に筋衛星細胞の増殖能、分化能の低下に求められてきた。またマクロファージや好中球の機能に注目して研究を行っている研究者もいる。本研究では、研究が遅れていた間葉系細胞の分子マーカーと純化方法を確立し、その骨格筋再生過程に於ける役割を明らかにし、再生医療へ応用する事である。

3. 研究の方法

(1) CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞に特異的に発現する CD248 (endosialin, tumor endothelial marker 1 (TEM1)) に対する抗体を作製し、筋再生過程と筋ジストロフィーでの動態を明らかにする。

(2) CD248 遺伝子のプロモーター領域に DTR (サル由来ジフテリア毒素受容体) -EGFP をつないだ construct を作成し、トランスジェニックマウスを作成し、CD248 陽性細胞の動態を解析し、ジフテリア毒素によって細胞の ablation 実験を行い、その機能を明らかにする。

(3) SP 細胞に由来する筋組織由来線維芽細胞を正常マウス、筋ジストロフィーマウス、老化したマウスの骨格筋から純化し、1. 遺伝子発現、2. 分化能、3. 筋再生促進効果を

解析し、CD31(-)CD45(-)SP 細胞の機能の低下や性質の変化が筋再生能の低下、骨格筋組織の脂肪化、線維化と関係があるかを検討する

4. 研究成果

(1) CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞の機能
骨格筋組織中に存在するヘキスト色素を排出する能力が高い side population (SP) 細胞は、ジストロフィン欠損 mdx マウス骨格筋に筋芽細胞と共移植すると移植効率を著しく上げる事、CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞は、多くの細胞外マトリックスタンパク質や、サイトカイン、プロテアーゼを産生し、CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞による移植効率の促進には、MMP-2 等を分泌し、細胞外マトリックスの再構築を促進し、筋芽細胞の移動を促進することが重要であることを明らかにした (*Am J Pathol*, 173: 781-791, 2008) を報告した。

(2) CD248 (endosialin, tumor endothelial marker 1 (TEM1)) の GST-Fusion タンパク質に対するウサギポリクローナル抗体を作出したが、十分な特異性は得られなかった。そこで CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞の筋再生過程における動態を別のマーカーである FAP 抗体とペリオスチン抗体で組織化学的に調べたところ、筋再生が盛んな時期に骨格筋の間質に多く陽性細胞が認められ、筋再生が完了するとその数が減少していた。

(3) 筋再生時に増殖する骨格筋間質の細胞は、筋ジストロフィーなどの病的な筋では、骨格筋の線維化や脂肪化に関与していると考えられている。そこで、いろいろな週齢 (6 週、6 ヶ月、14 ヶ月) のジストロフィン欠損 mdx マウスの骨格筋から細胞を調整し、増殖能を胎児線維芽細胞 (MEF) と比較したところ、14 ヶ月のものは、増殖能が低く、SA- β -gal 陽性であった (細胞老化)。

次に 14 ヶ月齢 mdx マウスの骨格筋から線維芽細胞様の細胞と MEF の RNA を調整し、網羅的遺伝子解析を行った。Mdx 細胞は FACS で分離した CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞と類似の遺伝子発現パターンを示し、その関連性が確かめられたが、加えて細胞増殖に関与する遺伝子発現が下がり、生体防御や免疫反応に関与する遺伝子群が上昇していた。この細胞の機能低下により筋ジストロフィーの筋再生能が低下し、筋ジストロフィーの進行に伴う線維化や脂肪化に直接関与すると考えられた。

(4) CD248-DTR-EGFP トランスジェニックマ

ウスの作製

網羅的遺伝子発現解析により、マクロファージや筋芽細胞に比較して、CD248

(Endosialin; TEM1) という膜タンパク質が CD31 陰性 CD45 陰性 SP 細胞に特異的に発現することを見出したので、約 1.0kb の CD248 遺伝子のプロモーター領域に DTR (ジフテリア毒素受容体) -EGFP をつないだ construct を作成し、トランスジェニックマウスを作成したが、GFP の発現が見られなかった。転写調節領域の長さが不十分であった可能性があるため、BAC クローンを用いた construct の作製を現在行っている。

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 18 件)

Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C and Tanaka H (2011) Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle (2011) *Cell Metabolism*, Feb 2;13(2):170-82. 査読有

Takahashi H, Kanesaki H, Igarashi T, Kameya S, Yamaki K, Mizota A, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Takahashi H. Reactive gliosis of astrocytes and Muller glial cells in retina of POMGnT1-deficient mice (2011) *Molecular and Cellular Neuroscience*, Jun;47(2):119-30. 査読有

Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H (2010) Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes *Am J Pathol.* 2010 May;176(5):2414-24. 査読有

Miyagoe-Suzuki Y & Takeda S (2010) Gene therapy for muscle disease. Mini-review, *Exp. Cell Res.* Nov 1;316(18):3087-92. Epub 2010 May 24. Review. 査読有

Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K (2010) Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells.

Exp. Cell Res. Oct 15;316(17):2932-44. 査読有

Kanagawa M, Omori Y, Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, and Toda T (2010) Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. *J Biol Chem*, Oct 8;285(41):31208-16. 査読有

Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Manya H, Endo T, Takeda S. (2009) Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mech Dev.* 2009 Mar-Apr;126(3-4):107-16. 査読有

Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. (2009) Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet.* 18(4):621-31. 査読有

Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T. (2009) Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* Jun;23(6):1907-19. 査読有

Fukada S, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. (2008) CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin $\alpha 2$ upon transplantation to dy3k/dy3k mice. *Exp. Cell Res.* 314:193-203. 査読有

Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S. (2008) Recombinant Adeno-associated Virus Type 8-Mediated

Extensive Therapeutic Gene Delivery into Skeletal Muscle of alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice. *Hum Gene Ther.* 19:719-30. 査読有

Tanihata J, Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Imaizumi K, Takeda S. (2008) Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle. *J Gene Med.* 10:702-13. 査読有

Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2008) Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol.* 173:781-91. 査読有

Segawa M, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H (2008) Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp. Cell Res.* Oct 15;314(17):3232-44. 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

第 17 回 日本運動生理学会大会 シンポジウム V 「骨格筋の可塑性」 鈴木友子、伊藤尚基、武田伸一、鈴木直輝 「神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は骨格筋の可塑性の制御因子である 2009年7月26日 東京慈恵会医科大学西新橋校

第 8 回 仏日筋ジストロフィーシンポジウム—病態から生物学的治療法へ—
Yuko Suzuki, Norio Motohashi, Erica Yada, Makoto Segawa, Wang Bo, Chika Harano, Satoru Masuda, Mikiharu Yoshida, Shin'ichi Takeda
Making muscle from induced pluripotent stem (iPS) cells. Institute de Myologie, Hopital de la Salpetriere, Paris 3-4 July 2009

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム 6 臨床への橋渡し研究の現状—3 腱・靭帯・筋肉 鈴木友子 「遺伝性筋疾患への幹細胞移植治療の基盤研究」 2010年10月15日京都

〔図書〕 (計 6 件)

Miyagoe-Suzuki Y, Uezumi A and Takeda S: Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation. **Recent Advances of Skeletal muscle Differentiation**, 2008: Editors: Kunihiro Tsuchida and Shin'ichi Takeda Research Signpost 378/661(2) Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India

Ito N & Miyagoe-Suzuki Y. "Neuronal NOS as a regulator of muscle mass": Editor: Yoshinobu Ohira. **Muscle Cell Physiology**, edited by Yoshinobu Ohira, Osaka University Press, (2009) p97-107.

Miyagoe-Suzuki Y & Takeda S: Mechanobiology in skeletal muscle: conversion of mechanical information into molecular signal. **Mechanosensing Biology** (ed. Masaki Noda), pp51-62. Springer Japan, 2010 ISBN 978-4-431-89756-9

炎症・再生医学事典 松島綱治・西脇 徹編集 朝倉書店 「5. 骨格筋」 鈴木友子, 武田伸一, p453-456. 2009年6月15日初版

鈴木友子, 武田伸一: 「マウス・ラット疾患モデル活用 ハンドブック」 秋山徹・奥平隆平・河府和義編 羊土社 第 23 章: 筋ジストロフィーモデルマウス、p 378-393

鈴木友子、遠藤玉夫: 第 II 部 生物機能モデルの作製と利用、第 3 章 糖鎖関連遺伝子ノックアウトマウス、第 12 節 **POMGnT1**: 「モデル動物利用マニュアル」エル・アイ・シー、p368-374.

〔その他〕

研究部 Home Page
http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna2/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 鈴木友子 (Suzuki Yuko)
独) 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

(2) 研究分担者: 武田伸一 (Takeda Shin'ichi)
独) 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・部長
研究者番号: 90171644