

平成 22 年 3 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20700358  
 研究課題名 (和文) 筋衛星細胞の維持・自己複製機構の解明  
 研究課題名 (英文) Maintenance and self-renewal mechanism of muscle satellite cells  
 研究代表者  
 深田 宗一郎 (FUKADA SO-ICHIRO)  
 大阪大学・薬学研究科・助教  
 研究者番号：20432445

研究成果の概要 (和文)：申請者がこれまでに報告してきた静止期筋衛星細胞に強く発現している遺伝子の *in vitro* や *in vivo* の解析を行った。その結果カルシトニン受容体からのシグナルは静止状態の筋衛星細胞を部分的に再現出来た。また Notch シグナルのエフェクター遺伝子 *hesr family* のうち、筋衛星細胞で発現している *hesr1* と *hesr3* の二重欠損マウスを作製したところ、筋衛星細胞数が顕著に減少していることが分かった。また筋衛星細胞の自己複製能力がマウスの系統間で大きく異なり、筋重量の維持との直接的な関連が示唆された。

研究成果の概要 (英文)： I investigated the roles of quiescent satellite cell-specific genes *in vitro* and *in vivo*. One of specific genes, calcitonin receptor suppressed proliferation and migration of satellite cells *in vitro*. In addition, *hesr1* and *hesr3* double knock mice exhibited the decreased number of muscle satellite cells *in vivo*. Furthermore self-renewal potential of muscle satellite cells were different among mouse strain, and the potential were directly related to muscle weight.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経筋肉・生理学

キーワード：骨格筋生理・病態学, 筋衛星細胞, 維持機構, カルシトニン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、*in vivo* の性質を維持した静止期筋衛星細胞は、その単離の困難さから研

究材料にはならなかった。しかし申請者は、静止期筋衛星細胞を純化可能な抗体、SM/C-2.6モノクローナル抗体を作製し報

告してきた (Exp. Cell Res. 10: 864-73, 2004)。

2005年、フランスのグループにより CD34、CD45、Sca-1 抗体を用いた静止期筋衛星細胞の単離方法も報告された (Science, 309: 2064-7, 2005)。今後はこのいずれかの二つの手法を用いた静止期筋衛星細胞の研究が活発に行われると予想される。更に、静止期筋衛星細胞の遺伝子発現プロファイルを作成しているのは現時点で申請者のグループのみである (Stem Cells. 25(10): 2448-2459, 2007)。また、活動期筋衛星細胞には発現がなく、静止期筋衛星細胞でのみ発現している分子 (カルシトニン受容体, *hesr3* など) を同定しているのも、申請者のグループ以外に報告はない。更に静止期筋衛星細胞に発現しているカルシトニン受容体は筋衛星細胞の活性化をリガンド依存的に抑制する機能分子であることも明らかにしている。本申請課題はこれまでほとんど明らかでない、筋衛星細胞の維持機構を分子レベルで明きからにすることを目標としており、その中で申請者らは世界をリードしている。更に研究成果は新しい遺伝性筋疾患・加齢性筋萎縮の治療標的を含んでいる可能性もある。

## 2. 研究の目的

骨格筋は日常生活動作 (ADL) に必須の組織であり、本来優れた再生能力を備えている。しかし遺伝性筋疾患や加齢性筋肉減弱症などでは、骨格筋再生能力の低下が病気進行の要因の一つとしてあげられている。更に病気の進行により筋重量が低下することにいられている。

骨格筋再生能に関与する細胞として筋衛星細胞は古くからその存在は知られていたが (J. Biophys Biochem. Cytol. 9: 439-5, 1961)、2005年に少なくとも筋衛星細胞の一部は分化能と自己複製能をもつ幹細胞集団である事が証明され、筋再生における筋衛星細胞の重要性が再認識された (Cell. 122(2): 289-301, 2005)。しかし、「筋衛星細胞が生体内でどのようなメカニズムにより維持されているのか?」「自己複製能はどのように調節されるのか?」「一個の筋衛星細胞が分化能と自己複製能を持っているのか?」など、筋衛星細胞に関する本質的な問題はほとんど解決されていない。これら筋衛星細胞の維持・自己複製機構に関する解析が進めば、新たな遺伝性筋疾患の治療法や、筋萎縮の予防法の確立につながると期待される。

本申請課題では、申請者がこれまで明らかにしている静止期筋衛星細胞特異的な遺伝子の解析結果を元に、筋衛星細胞の維持ならびに筋重量維持に関わる因子を同定する。

## 3. 研究の方法

○ カルシトニンシグナルと筋衛星細胞  
筋衛星細胞からクローニングしたカルシトニン受容体を初代培養筋芽細胞及び筋芽細胞に発現させた。この細胞とリガンドとしてエルカトニンを用いて、カルシトニン受容体からのシグナルが筋芽細胞に与える影響を調べた。カルシトニンシグナルで変動する遺伝子の網羅的解析は TORAY 3D-Gene を用いて行った。

### ○ *hesr1/3* と筋衛星細胞維持

国立遺伝学研究所の小久保博士より、供与して頂いたそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて、二重欠損マウスを作製し、筋再生実験を行った。筋衛星細胞数に関しては抗 Pax7, M-cadherin, calcitonin receptor 抗体を用いて定量的な解析を行った。

### ○ マウス strain と筋衛星細胞維持

日本チャールズリバーより、C57BL/6, BALB/c, C3H/HeN, DBA/2 マウスを購入し、カルジオトキシンの頻回投与により、繰り返しの筋再生能力を評価した。また、Duchenne型筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx マウスの遺伝背景を戻し交配により DBA/2 にし DBA/2-mdx を用いた解析を行った。筋衛星細胞の定量は抗 Pax7, M-cadherin 抗体を用いて定量的に行った。

## 4. 研究成果

○ カルシトニンシグナルが筋芽細胞に与える影響

レトロウイルスを用いて筋芽細胞株 C2C12 に CTR を発現させた場合のみ、リガンド依存的な運動抑制がおきることをこれまで見ていた (若手スタートアップ業績)。一般にカルシトニン受容体は PKA もしくは PKC の活性化により、その効果を発揮するとされているが、この運動能力はそれぞれの activator もしくは阻害剤を用いた場合でもカルシトニンシグナルによる運動抑制を再現出来なかった。これらの結果は筋芽細胞においては PKA、PKC 非依存的な経路によると推測された。また、カルシトニンのシグナルは細胞骨格、特に lamellipodia の形成を抑制することも明らかとなった。

カルシトニン受容体発現筋芽細胞をリガンド刺激した時と静止期筋衛星細胞に強く発現している共通遺伝子の解析を行った結果、細胞周期の進行に伴い増加する遺伝子が共通して低いことが明らかとなった。申請者は

カルシトニンシグナルがカルシトニン受容体発現筋芽細胞の細胞増殖を抑制していることを明らかにしているので、その作用メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。

○ hesr1/3 二重欠損マウスの表現型

申請者は静止期筋衛星細胞に発現している遺伝子として、CTR 以外にも多数同定している。その中で他の多くの幹細胞の制御因子として働く Notch シグナルのエフェクター遺伝子のうち hesr3 が特異的に発現していることを見いだしていた。しかしながら hesr3 単独の欠損マウスではこれまで、骨格筋に表現

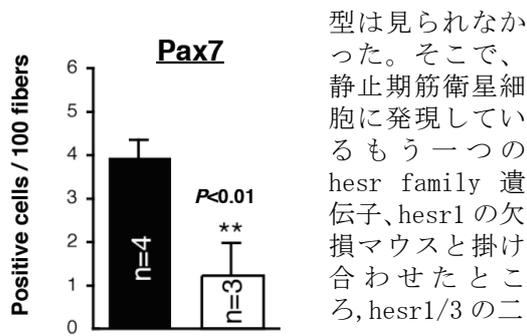


図. 1

型は見られなかった。そこで、静止期筋衛星細胞に発現しているもう一つの hesr family 遺伝子、hesr1 の欠損マウスと掛け合わせたところ、hesr1/3 の二重欠損にした場合に筋衛星細胞の数が減少することが明らかとなった (図1)。現在なぜ筋衛星細胞数が減少するのかを検討中である。

○ 骨格筋重量と筋衛星細胞の関係

マウス系統の中で C57BL/6 や C57BL/10 が筋再生実験によく用いられている。申請者は繰り返しの再生能力や筋衛星細胞の自己複製

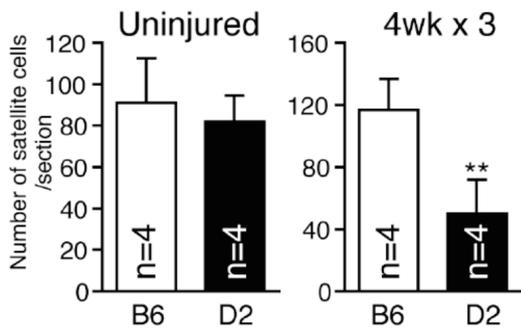


図. 2

能を調べる目的で、C57BL/6, BALB/c, C3H/HeN, DBA/2 の 4 系統のマウスにカルジオトキシンを 6 回投与した。その結果、DBA/2 系統のマウスは筋衛星細胞の自己複製の低下とともに著しい筋重量低下を示すことを明らかにした。さらに慢性的に筋傷害と筋再生を繰り返し起こす mdx(C57BL/10 背景) マウスの遺伝背景を DBA/2 にしたと

ころ、mdx マウスでは見られない筋重量低下や繊維化、脂肪化といった、人の病態に近くなることが明らかとなった。

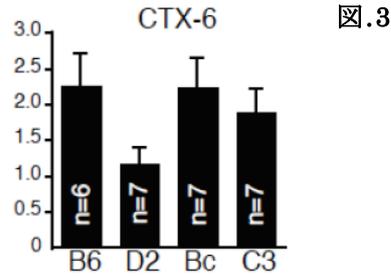


図. 3

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 7 件)

1. Fukada S\*, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H

Genetic background affects properties of satellite cells and *mdx* phenotypes (\*corresponding author).

*American Journal of Pathology*, 2010. in press, 査読有り

2 Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukada S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T

Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells

*FASEB J* 2010. in press, 査読有り

3. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K

Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle.

*Nature Cell Biology* 2010; 12(2): 143-52. 査読有り

4. 骨格筋重量維持機構と筋衛星細胞

深田宗一郎, 山元 弘

基礎老化学会誌 33(4); 13-15, 2009. 査読有り

5. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada S, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, Nakahata T.

Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells.

*FASEB J*. 2009; 23(6):1907-19. 査読有り

6. Segawa M, Fukada S\*, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, and Yamamoto H

Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis.

(\*corresponding author)

**Exp. Cell Res.** 2008; 314: 3232-3244 査読有り

7. Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S.

Muscle CD31(-)CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts.

**American Journal of Pathology** 2008; 173: 781-91. 査読有り

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. 第 7 回国際幹細胞学会 (2009 年 7 月 バルセロナ・スペイン) Properties of satellite cells and mdx phenotype are influenced by genetic backgrounds. So-ichiro Fukada, Daisuke Morikawa, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda, Kazutake Tsujikawa, Hiroshi Yamamoto

〔図書〕 (計 1 件)

1. Macrophages and skeletal muscle regeneration. So-ichiro Fukada, Hiroshi Yamamoto  
Muscle cell physiology (Edited by Yoshinobu Ohira) 85-96, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深田 宗一郎 (FUKADA SO-ICHIRO)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20432445

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書