

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790242

研究課題名(和文) 骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)の維持機構解明によるサルコペニアの原因究明

研究課題名(英文) Investigation into the cause of sarcopenia through elucidation of maintenance mechanism of satellite cells

研究代表者

上住 円 (UEZUMI MADOKA)

国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・細胞再生研究室長

研究者番号：70435866

研究成果の概要(和文)：サルコペニア(加齢に伴う筋量および筋機能の低下)の原因は解明されていないが、申請者はこれまでの研究によって、骨格筋特異的な組織幹細胞である筋衛星細胞数が老化筋組織で顕著に減少していることを見出した。筋衛星細胞数の減少は、筋再生能力を低下させ、さらには筋量の減少をもたらすことが予想される。そこで、本研究では、加齢に伴い筋衛星細胞で発現が低下し、筋衛星細胞の維持に関わると予想される遺伝子を同定し、その機能について検討を行った。この研究成果は、筋衛星細胞の維持促進によるサルコペニアの予防法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia is the loss of skeletal muscle mass and strength with age. The causes of sarcopenia are probably manifold and still remain to be completely elucidated. Satellite cells are muscle-specific stem cells and are responsible for the postnatal muscle maintenance, growth and regeneration. We previously showed that the number of satellite cells remarkably decreased with age. It is thought that a decrease in number of satellite cells causes decline of muscle regenerative potential and muscle mass. In this study, we identified a gene that decreased in the expression level in satellite cells with age and might relate to the maintenance of satellite cells, and examined the functions. This study results might lead to the development of preventive methods of sarcopenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：老化、骨格筋、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現代の高齢化社会において、加齢に伴う筋量および筋機能の低下（サルコペニア）は、高齢者の身体的自立能力を奪い、日常生活の質（QOL）を低下させるため、解決すべき重要課題であるが、その原因は解明されていない。

一方、骨格筋特異的な組織幹細胞である筋衛星細胞は、成体筋組織の再生を担っていることが知られている。筋衛星細胞とサルコペニアの関連性には不明な点が多いが、生涯を通じて骨格筋量を保つためには、幹細胞である筋衛星細胞の機能維持が必須であると考えられている。加齢が筋衛星細胞に及ぼす影響については、加齢に伴い筋衛星細胞数が減少するという報告がある一方で、変化しないという報告もあり、未だ結論が得られていない。これまで老化筋組織における筋衛星細胞数は、筋線維あたりや横断筋切片あたりに存在する細胞数を指標として定量されてきた。また、従来の単離方法では、線維芽細胞の混入が避けられないため、老化筋組織全体から筋衛星細胞を分離し、定量することは、困難であった。この問題点を克服するため、申請者はこれまでの研究において、筋衛星細胞特異的抗体とセルソーティング法を用いて、筋組織全体の筋衛星細胞数の高精度な定量解析を行い、老化マウスの筋組織で筋衛星細胞数が顕著に減少していることを見出した。筋衛星細胞数の減少は、筋再生能力を低下させ、さらには筋量の減少をもたらすことが予想される。

申請者は、これらの知見を基盤として「加齢に伴う筋衛星細胞維持機構の破綻が、サルコペニア発症の一因であり、サルコペニアの予防には、筋衛星細胞の維持が重要である」という着想に至った。

2. 研究の目的

筋衛星細胞の維持機構には不明な点が多く、分子機序解明の端緒を得るためには、筋衛星細胞維持機構に異常の生じた変異動物の解析が有効であると考えられる。骨格筋において、筋衛星細胞特異的に発現する転写因

子である Pax7 遺伝子を欠損したマウス (Pax7 KO マウス) では、1)筋衛星細胞が維持されず、生後 3 週間で筋衛星細胞が枯渇してしまうこと、2)筋衛星細胞の枯渇が原因となって、筋量の減少や脊椎の湾曲などの老化個体に似た表現型を示すことが知られている。また、老化マウスの筋衛星細胞では、Pax7 の発現が低下していることが明らかになっており、Pax7 KO マウスにおける筋衛星細胞維持機構の破綻と老化に伴う筋衛星細胞数の減少の背景には共通した分子機構が存在する可能性がある。

そこで、本研究では、Pax7 KO マウスと老化マウスを用いて、筋衛星細胞の維持に関わる分子機序を明らかにする。さらに、その成果を基盤として、加齢に伴う筋衛星細胞維持機構破綻の原因を明らかにし、サルコペニアに対する新しい予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Pax7 KOマウスからの筋衛星細胞単離条件の検討

Pax7 KO マウスでは、生後直後には筋衛星細胞が存在するが、生後 3 週間で筋衛星細胞がほとんど観察されなくなる。そのため、骨格筋から枯渇する前に筋衛星細胞を単離する必要があり、その単離時期の検討を行った。

① Pax7 ゲノム遺伝子に LacZ 遺伝子が組み込まれた Pax7-LacZ ノックインマウスを用いて、横断筋切片の LacZ 染色により、筋衛星細胞の存在状況の追跡を行い、筋衛星細胞の単離時期を検討した。

② ①で検討した時期の Pax7 KO マウスから、筋衛星細胞特異的表面抗原を認識する抗体とセルソーターを用いて筋衛星細胞の単離を試みた。

(2) 老化マウスの筋衛星細胞で発現変動する遺伝子の Pax7 KO マウスおよび若齢マウス筋衛星細胞における動態解析

申請者のこれまでの研究で明らかとなった、老化マウスの筋衛星細胞で発現が低下する遺伝子、すなわち、その発現低下が筋衛星細胞維持機構の破綻につながる可能性があ

る遺伝子に着目した。

① Pax7 KOマウスおよび若齢マウス筋衛星細胞での成長、筋再生過程における発現パターンを、real-time PCR法により mRNA レベルで解析した。

② Pax7 KOマウスおよび若齢マウスの横断筋切片の免疫染色やフローサイトメーターを用いて、タンパクレベルでの発現解析を行った。

(3) (2)で着目した遺伝子の機能解析

① in vitro での機能解析

若齢マウスの筋衛星細胞において、この遺伝子は、タンパクレベルで全ての筋衛星細胞に発現しているわけではなく、陽性と陰性の筋衛星細胞が存在していることが明らかとなった。さらに、老化マウスにおいては、陽性の筋衛星細胞の割合が顕著に低下していることがわかった。そこで、若齢マウスから陽性と陰性の筋衛星細胞を別々に単離し、培養を行い、それらの増殖能を比較した。また、阻害分子の添加による増殖、生存への影響を調べた。

② in vivo での機能解析

ヘビ毒注射によって筋再生を誘導した若齢マウスの骨格筋に、数種類の阻害分子を投与し、筋再生に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

老化マウスおよび Pax7 KO マウス、若齢マウスの筋衛星細胞を比較することにより、その発現低下が、加齢に伴う筋衛星細胞維持機構の破綻につながる可能性のある遺伝子を同定した。若齢マウスの筋衛星細胞において、この遺伝子は、タンパクレベルで全ての筋衛星細胞に発現しているわけではなく、陽性と陰性の筋衛星細胞が混在していることが明らかとなった。さらに、老化マウスにおいては、陽性の筋衛星細胞の割合が顕著に低下していることがわかった。また、若齢マウスから陽性と陰性の筋衛星細胞を別々に単離し、培養を行い、それらの増殖能を比較した結果、陽性の筋衛星細胞では増殖能が高く、陰性の筋衛星細胞では低いことが示された。培養下での阻害分子の添加は、増殖を顕著に抑制し

た。in vivo での機能解析において、若齢マウスの再生筋への阻害分子の投与では、投与量等の問題があり、現在検討中である。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

申請者は、筋衛星細胞特異的抗体を用いたセルソーティング法により、骨格筋から直接筋衛星細胞を単離する技術を確立し、その分離法を用いて筋衛星細胞の解析を行ってきた。この方法は、生体内における筋衛星細胞の動態を正確に理解する上で、強力な技術基盤となる。実際、申請者等は、この方法で単離した筋衛星細胞が、従来法で培養を介して得られた細胞に比べ、移植時の筋再生能力がはるかに高いなど、筋衛星細胞本来の性質をきわめてよく保持していることを報告している。本研究では、こうした独自の方法により、筋衛星細胞レベルで正確にその維持機構を解明することにより、加齢に伴う筋衛星細胞維持機構破綻の原因を明らかにし、サルコペニアの発症機序の解明および予防法の開発へとつながることが期待できる。

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1件)

① Shiomi K, Kiyono T, Okamura K, Uezumi M, Goto Y, Yasumoto S, Shimizu S, Hashimoto N. CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Ther.* 2011 Apr 14. [Epub ahead of print], 査読有

[学会発表] (計6件)

① 上住 円、Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells, *Keystone Symposia, Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease*, 2011年1月30日-2月4日, Santa Fe, New Mexico, USA

② 上住 円、Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite

cells, 16th International Conference of the International Society of Differentiation (From Stem Cells to Organisms), 2010 年 11 月 15 日-18 日、奈良

③ 上住 円、Age-related Changes in Prospectively Isolated Muscle Satellite Cells, Making Muscle in the Embryo and the Adult (A joint meeting of Frontier in Myogenesis and Skeletal Muscle Stem and Satellite Cells), 2009 年 5 月 28 日- 6 月 2 日、New York, NY, U.S.A

④ 上住 円、Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells, 第 7 回幹細胞シンポジウム、2009 年 5 月 15 日- 5 月 16 日、東京

⑤ 上住 円、Age-related changes of directly isolated muscle satellite cells by genome-wide gene expression analysis, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸

⑥ 上住 円、Age-related changes of directly isolated muscle satellite cells by genome-wide gene expression analysis, 第 23 回内藤コンファレンス、2008 年 11 月 11 日-14 日、神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上住 円 (UEZUMI MADOKA)

国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・細胞再生研究室長

研究者番号 : 70435866