

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04078

研究課題名（和文）骨格筋再生における筋幹細胞の新たなダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Elucidation of a new role of muscle stem cells in skeletal muscle regeneration

研究代表者

北嶋 康雄（Kitajima, Yasuo）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：70734416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者の作出した筋幹細胞を可視化できるマウスを用いて、筋幹細胞の維持機構を明らかにすることを目的とした。Pax7の標的因子として新規に同定したTob1が、筋幹細胞の未分化維持に重要な因子であることが分かった。また、Tob1の働きを抑制したマウスでは細胞増殖能が亢進し、筋再生が促進することを突き止めた。以上により、筋幹細胞の増殖能を保つ上で、Tob1の働きが必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な骨格筋機能を維持するためには筋幹細胞の働きは欠かせない。筋幹細胞では、Pax7という転写因子が特異的に発現している。筋幹細胞においてPax7遺伝子欠損させると、筋幹細胞を維持できないことが報告されており、幹細胞維持に必須の因子である。しかし、Pax7を介してどのようなメカニズムで筋幹細胞が維持されているのかは知られていない。本研究は、従来知られていなかったPax7の調節因子を新規に明らかにした。筋幹細胞を維持するためにはPax7の発現機構の理解は重要であり、本研究を手掛かりに更なる研究の発展が必要である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of muscle stem cell maintenance using mice that can visualize muscle stem cells generated by the applicant. Tob1, which was newly identified as a target factor of Pax7, was found to be an important factor for the maintenance of undifferentiated muscle stem cells. We also found that inhibition of Tob1 enhanced cell proliferative capacity and promoted muscle regeneration in mice. These findings suggest that Tob1 is required for the maintenance of proliferative potential of muscle stem cells.

研究分野：骨格筋生物学

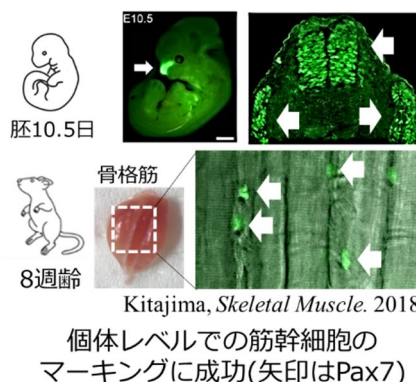
キーワード：骨格筋 筋再生 筋幹細胞 Pax7 筋線維 サテライト細胞

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会をむかえた我が国では、サルコペニアに代表する筋萎縮の予防は重要な課題である。近年、加齢による筋萎縮の原因として、筋幹細胞数の減少による再生能の低下が指摘されている。筋幹細胞の数はプロテアソーム系をはじめとする緻密な制御機構により調節されており、例えば加齢などに伴ってこれらが破綻すると、サルコペニアなどにつながると予想される。そのため、骨格筋機能を保持するためには、いかに筋幹細胞を維持するかが重要であると考えられる。しかし、これまでに筋幹細胞の生体内での性質の解析は困難であったことから、筋幹細胞の維持機構については不明な点が多い。本研究は、Pax7-YFP ノックインマウスを用いて筋幹細胞の維持機構を明らかにし、骨格筋再生の一端を解明することをめざす。

### 2. 研究の目的

筋幹細胞では、Pax7 という転写因子が特異的に発現している。筋幹細胞において Pax7 遺伝子欠損させると、筋幹細胞を維持できないことが報告されている(Nature 2005; JCB 2006)。しかし、Pax7 を介してどのようなメカニズムで筋幹細胞が維持されているのかは不明である。申請者は、筋幹細胞をマーキングできる Pax7YFP マウスを新たに作出し(図)、Pax7 が Tob1(transducer of ErbB-2.1)により筋幹細胞性を維持していることを見出した。そこで、本研究では筋幹細胞の維持機構において Pax7 の介する Tob1 の働きを明らかにし、筋再生の分子メカニズムを解明することが、本研究課題の核心である。本研究の目的は、申請者の作出した筋幹細胞をマーキングできるマウスを用いて、筋幹細胞の維持機構の一端を明らかにすることである。



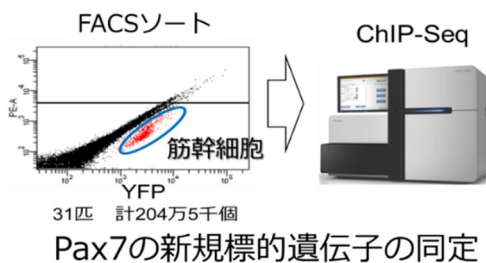
### 3. 研究の方法

筋幹細胞では、Pax7 という転写因子が特異的に発現している。筋幹細胞の動態を詳細に調べるために、Pax7 の最終エクソンのストップコドン削って、YFP を挿入した Pax7-YFP ノックインマウスを作成した。当該マウスを用いて、筋幹細胞の維持機構を調べる中で、下記の研究成果を得た。

### 4. 研究成果

#### (1). Pax7 の新規標的遺伝子の網羅解析

Pax7 が標的にしている遺伝子を探索するために、ChIP-seq 解析(図; クロマチン免疫沈降)を行った。Pax7-YFP ノックインマウスから骨格筋を酵素処理し、筋幹細胞を FACS (細胞分取装置) により単離した。得られた筋幹細胞から GFP 抗体を用いて免疫沈降を行い、DNA 精製後に GFP 抗体と結合のあった DNA 領域を特定した。エンリッチされている領域に関して、転写開始地点から  $\pm 2$  kbp の領域を調べたところ、1067 遺伝子を特定した。特定された領域に関して、モチーフ解析を行ったところ



る、先行研究で株化筋細胞の ChIP-seq 解析を行っていた報告とモチーフ配列が類似していたため、本研究データの妥当性が確認できた。

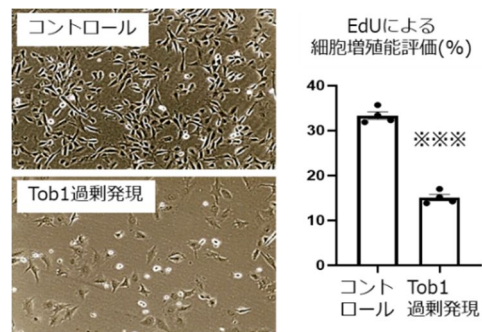
#### (2). RNA 代謝に関連する Tob1 遺伝子の同定

上記の ChIP-seq 解析により特定した 1067 遺伝子から Pax7 調節に関わる因子の絞り込みを行った。候補遺伝子で GO 解析を行い、RNA 代謝に関わる遺伝子群を抽出した。Pax7 は筋幹細胞の休止期から活性化期で発現が減少することが分かっているため、RNA 代謝に関わる遺伝子から休止期において活性化期より遺伝子発現が高い遺伝子を注目したところ Tob1 遺伝子が抽出された。筋幹細胞を対象に Pax7 との関連を調べるために、筋幹細胞において Pax7 を過剰発現させると、Tob1 発現が有意に増加した。さらに Pax7 の過剰発現系によってレポーターアッセイを行ったところ、Tob1 のプロモーター領域に Pax7 が結合することを確認した。以上の結果により Pax7 の調節因子として Tob1 遺伝子を同定し、さらに機能解析を進めることとした。

#### (3). Tob1 遺伝子の細胞周期の解析

筋幹細胞における Tob1 遺伝子の機能解析を進めるために Tob1 遺伝子欠損 (Tob1 KO) マウスを導入し、解析した。Tob1 KO マウス由来の筋幹細胞を単離し、EdU を用いて増殖能を調べた。その結果、Tob1 KO マウス由来の筋幹細胞ではコントロールと比較して細胞増殖能が有意に増加していることが分かった。また、細胞周期に関連する Cyclin D1 の発現が、Tob1 KO マウス由来の筋幹細胞において亢進していた。

逆に、筋幹細胞において Tob1 を過剰発現させると、Pax7 発現が増加し、EdU 陽性細胞が有意に減少した (図)。このことから、Tob1 は Pax7 と関連して筋幹細胞の幹細胞性を保つ(筋幹細胞の数を保つ)ことに関連していることを示唆した。



Tob1過剰発現は細胞増殖能抑制

#### (4). 筋再生への影響

上記の結果をもとに、Tob1 KO マウスを用いて筋再生実験を行った。まず初めに Tob1 KO マウスの定常状態を調べたところ、コントロールマウスと比較して筋幹細胞の数には有意な差は認められなかった。筋幹細胞の数に差はなかったため筋再生実験を試みたところ、再生 7 日目の筋切片を作製し Laminin 染色を行い筋横断面積の定量を行った。Tob1 KO マウスはコントロールマウスと比較して、筋横断面積が大きいことが分かった。これにより、Tob1 KO マウスは筋再生が早いのではないかと考え、再生初期である再生 3 日目の筋切片を作成し、eMyHC 染色で定量した。それにより、Tob1 KO マウスはコントロールマウスに比べて、eMyHC のタンパク量が有意に多かった。以上により、Tob1 遺伝子は骨格筋の再生時において、筋再生を促す機能を担っていることを示した。

以上により、Pax7 の標的因子として新規に同定した Tob1 が、筋幹細胞の未分化維持に重要な因子であり、Tob1 KO マウスでは細胞増殖因子の抑制により筋再生を促進することを突き止めた。本研究は、これまでに知られていなかった Pax7 の調節因子を新規に明らかにした。筋幹細胞を維持するためには Pax7 の発現機構は重要であり、本研究を手掛かりに更なる研究の発展が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Naoki Suzuki, Murayama Kazutaka, Takada Hiroaki, Tabuchi Ayaka, Kano Yutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 238
2. 論文標題 The aminopeptidase LAP3 suppression accelerates myogenic differentiation via the AKT TFE3 pathway in C2C12 myoblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2103 ~ 2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.31070	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 Shitaoka Kiyomi, Higashiura Akifumi, Kawano Yohei, Yamamoto Akima, Mizoguchi Yoko, Hashiguchi Takao, Nishimichi Norihisa, Huang Shiyu, Ito Ayano, Ohki Shun, Kanda Miyuki, Taniguchi Tomohiro, Yoshizato Rin, Azuma Hitoshi, Kitajima Yasuo, Yokosaki Yasuyuki, Okada Satoshi, Sakaguchi Takemasa, Yasuda Tomoharu	4. 巻 6
2. 論文標題 Structural basis of spike RBM-specific human antibodies counteracting broad SARS-CoV-2 variants	5. 発行年 2023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/s42003-023-04782-6	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 -

1. 著者名 Kitajima Yasuo, Tsukahara Ryoka, Nakamoto Shohei, Yasuda Tomoharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient Isolation of Lymphocytes and Myogenic Cells from the Tissue of Muscle Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1754 ~ 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11111754	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 Tamura Yumi, Yamane Keita, Kawano Yohei, Bullinger Lars, Wirtz Tristan, Weber Timm, Sander Sandrine, Ohki Shun, Kitajima Yasuo, Okada Satoshi, Rajewsky Klaus, Yasuda Tomoharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Concomitant Cytotoxic Effector Differentiation of CD4+ and CD8+ T Cells in Response to EBV-Infected B Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4118 ~ 4118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14174118	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 該当する

1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Naoki Suzuki, Takada Hiroaki, Murayama Kazutaka, Kano Yutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 634
2. 論文標題 Little involvement of recycled-amino acids from proteasomal proteolysis in de novo protein synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.113	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 Azuma Hitoshi, Kawano Yohei, Shitaoka Kiyomi, Kawahara Takahiro, Ito Ayano, Higashiura Akifumi, Kitajima Yasuo, Ohki Shun, Yasuda Tomoharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Vaccination with the Omicron spike RBD boosts broadly neutralizing antibody levels and confers sustained protection even after acquiring immunity to the original antigen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	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) 10.1093/intimm/dxac055	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 Hirano Kotaro, Tsuchiya Masaki, Shiomi Akifumi, Takabayashi Seiji, Suzuki Miki, Ishikawa Yudai, Kawano Yuya, Takabayashi Yutaka, Nishikawa Kaori, Nagao Kohjiro, Umemoto Eiji, Kitajima Yasuo, Ono Yusuke, Nonomura Keiko, Shintaku Hirofumi, Mori Yasuo, Umeda Masato, Hara Yuji	4. 巻 6
2. 論文標題 The mechanosensitive ion channel PIEZO1 promotes satellite cell function in muscle regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	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) 10.26508/lsa.202201783	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 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Takada Hiroaki, Kubota Takahiro, Murayama Kazutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 236
2. 論文標題 Puromycin sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 5293 ~ 5305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30237	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 Yoshioka Kiyoshi, Nagahisa Hiroshi, Miura Fumihito, Araki Hiromitsu, Kamei Yasutomi, Kitajima Yasuo, Seko Daiki, Nogami Jumpei, Tsuchiya Yoshifumi, Okazaki Narihiro, Yonekura Akihiko, Ohba Seigo, Sumita Yoshinori, Chiba Ko, Ito Kosei, Asahina Izumi, Ogawa Yoshihiro, Ito Takashi, Ohkawa Yasuyuki, Ono Yusuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Hoxa10 mediates positional memory to govern stem cell function in adult skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.abd7924	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 北嶋康雄	4. 巻 44
2. 論文標題 骨格筋および骨格筋幹細胞におけるプロテアソーム機構の役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 39-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ono Hiroya, Suzuki Naoki, Kanno Shin-ichiro, Kawahara Genri, Izumi Rumiko, Takahashi Toshiaki, Kitajima Yasuo, Osana Shion, Nakamura Naoko, Akiyama Tetsuya, Ikeda Kensuke, Shijo Tomomi, Mitsuzawa Shio, Nagatomi Ryoichi, Araki Nobukazu, Yasui Akira, Warita Hitoshi, Hayashi Yukiko K., Miyake Katsuya, Aoki Masashi	4. 巻 28
2. 論文標題 AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1133 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.02.006	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 Yoshioka Kiyoshi, Kitajima Yasuo, Okazaki Narihiro, Chiba Ko, Yonekura Akihiko, Ono Yusuke	4. 巻 8
2. 論文標題 A Modified Pre-plating Method for High-Yield and High-Purity Muscle Stem Cell Isolation From Human/Mouse Skeletal Muscle Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental 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) 10.3389/fcell.2020.00793	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 Tsuchiya Yoshifumi、Kitajima Yasuo、Masumoto Hiroshi、Ono Yusuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Damaged Myofiber-Derived Metabolic Enzymes Act as Activators of Muscle Satellite Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 926 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.08.002	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 Kitajima Yasuo、Suzuki Naoki、Yoshioka Kiyoshi、Izumi Rumiko、Tateyama Maki、Tashiro Yoshitaka、Takahashi Ryosuke、Aoki Masashi、Ono Yusuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Inducible Rpt3, a Proteasome Component, Knockout in Adult Skeletal Muscle Results in Muscle Atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental 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) 10.3389/fcell.2020.00859	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 Yoshioka Kiyoshi、Kitajima Yasuo、Seko Daiki、Tsuchiya Yoshifumi、Ono Yusuke	4. 巻 231
2. 論文標題 The body region specificity in murine models of muscle regeneration and atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	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) 10.1111/apha.13553	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 Kitajima Yasuo、Yoshioka Kiyoshi、Suzuki Naoki	4. 巻 70
2. 論文標題 The ubiquitin-proteasome system in regulation of the skeletal muscle homeostasis and atrophy: from basic science to disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	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) 10.1186/s12576-020-00768-9	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4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋恒常性の維持のための プロテアソーム系の役割
3. 学会等名 第76回日本体力医学会（シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 新しい骨格筋幹細胞解析ツールによる 新規Pax7標的遺伝子の同定
3. 学会等名 第76回日本体力医学会（シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋幹細胞の維持と 免疫細胞による筋再生機構
3. 学会等名 第38回筋肉の会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北嶋康雄
2. 発表標題 骨格筋再生におけるB細胞の役割解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 北嶋 康雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 227
3. 書名 健康寿命の鍵を握る骨格筋	

〔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	小野 悠介  (Ono Yusuke)  (60601119)	熊本大学・発生医学研究所・准教授   (17401)	

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