

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17679

研究課題名（和文）骨格筋幹細胞間コミュニケーションを司る分子を応用した筋再生治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of Muscle Stem Cell Heterogeneity and Development of Regenerative Therapies

研究代表者

藤田 諒 (Fujita, Ryo)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60770435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋幹細胞は生体内で唯一骨格筋線維を再生できる幹細胞であることからサルコペニアや筋ジストロフィー等の筋疾患への再生治療が高く期待されている。本研究では、細胞不均質性（ヘテロジェネイティ）をキーワードに骨格筋幹細胞の幹細胞性維持に重要な分子を明らかにし、より生体内に近い、高い再生能（増殖能、分化能）を保持した骨格筋幹細胞の維持方法の確立を目指す。研究期間内に、骨格筋幹細胞のヘテロジェネイティを可視化するMyoDノックインマウスを作成し、未分化集団と活性化集団を識別することに成功した。またこのマウスの解析から、特定の細胞集団で活性化し、骨格筋幹細胞の不均質性を担う分子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨格筋幹細胞の多様性とその分子基盤を解明することを目的とした。骨格筋幹細胞は、骨格筋の再生に不可欠な細胞であり、その幹細胞性を維持しつつ効率的に増殖させることが求められている。本研究では、遺伝子改変マウス（MyoDノックインマウス）を作成し、骨格筋幹細胞の未分化集団と活性化集団の違いを解析する手法を開発した。この研究開発により、特定の遺伝子が幹細胞の未分化維持や活性化に関与していることが明らかになり、本研究成果は加齢や遺伝性疾患による筋肉の減少（サルコペニアや筋ジストロフィー）に対する新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Muscle stem cells (MuSCs) are the only stem cells in the body capable of regenerating muscle fibers, making them highly promising for regenerative treatments of muscle diseases such as sarcopenia and muscular dystrophy. This research aimed to identify key molecules essential for maintaining the stem cell properties of MuSCs, focusing on cell heterogeneity. We aimed to establish methods to maintain MuSCs with high regenerative potential (proliferation and differentiation) in a state closer to their in vivo condition. During the research period, we successfully created MyoD knock-in mice that visualize the heterogeneity of MuSCs, enabling us to distinguish between undifferentiated and activated cell populations. Additionally, from the analysis of these mice, we discovered molecules that are activated in specific cell populations and are responsible for the heterogeneity of MuSCs.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋幹細胞 幹細胞不均質性 筋再生 筋ジストロフィー MyoDノックインマウス サルコペニア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢とともに骨格筋の量と質は徐々に低下し、要介護の原因となるため、骨格筋の健康は健康寿命の鍵である。骨格筋を健康に保ち、種々の筋疾患の予防・治療には、**骨格幹細胞**による筋再生・形成機構の関わる包括的な分子基盤の解明が重要である。骨格筋は多核の筋線維から構成され、筋線維の細胞膜と基底膜との間には単核の骨格筋幹細胞が存在する (Mauro, A. J Biophys Biochem Cytol. 1961)。骨格筋の強靱な可塑性はこの骨格筋幹細胞によって担われている (von Maltzahn J. et al. PNAS. 2013)。骨格筋幹細胞は筋損傷等がない状態では眠った休止期で存在しているが、筋損傷等を感じると、細胞周期へ入り増殖を繰り返す。その後ほとんどの細胞は後期の筋分化へ移行し、互いに融合し、筋線維を形成する。一方、活性化した一部の細胞は、自己複製をすることによって幹細胞としての数の減少を防ぐ。この休止期と自己複製機構は一生涯において幹細胞の数と幹細胞性 (ステムネス) を維持する上で重要なメカニズムである。しかしながら、加齢や筋疾患等によって、この精密な制御機構は乱れ、次第に幹細胞数や機能低下が引き起こされ、結果として幹細胞恒常性が破綻し、組織再生能の低下が起きることが知られている。

一方で近年このようなストレスに対して抵抗性を持つ希少な骨格筋幹細胞集団がいることが報告された (Der Vartanian et al. Cell Stem Cell. 2019; Scaramozza et al. Cell Stem Cell. 2019)。この 2 つの論文で共通して同定された Pax3 は筋発生時に発現する転写因子として知られ、通常の成体の骨格筋幹細胞には発現しないと考えられてきた。Pax3 陽性の骨格筋幹細胞は大多数の Pax3 陰性骨格筋幹細胞に比べストレス耐性が高く、複製能力に長けていることが示された。さらに、シングルセル解析の発展に伴い、骨格筋幹細胞集団の中には刺激に対して反応しやすい細胞とそうでない細胞などが混在している非常にヘテロな幹細胞集団であることが示唆されている (Dell'Orso et al. Development. 2019)。しかし、再生時にこのような骨格筋幹細胞集団同士がどのように相互作用しているか、あるいはヘテロな細胞集団であることの筋再生におけるメリットは何か、については、前述した論文も含め明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では細胞不均質性 (ヘテロジェネイティ) をキーワードに骨格筋幹細胞の幹細胞性維持に重要な分子を明らかにし、より生体内に近い、高い再生能 (増殖能、分化能) を保持した骨格筋幹細胞の培養方法の確立を目指す。これらを目指す上で大きな障壁となっているのが、骨格筋幹細胞における非常にヘテロな細胞集団を解析する手法が欠如していることである。そこで、本研究では骨格筋幹細胞の不均質性を解析する手法を開発し、その不均質性を生み出す機構や、特定の細胞集団を特徴づける遺伝子を同定することを目的とする。それを骨格筋幹細胞の培養に応用することで筋肥大・筋萎縮や修復・再生研究の加速が期待できる。

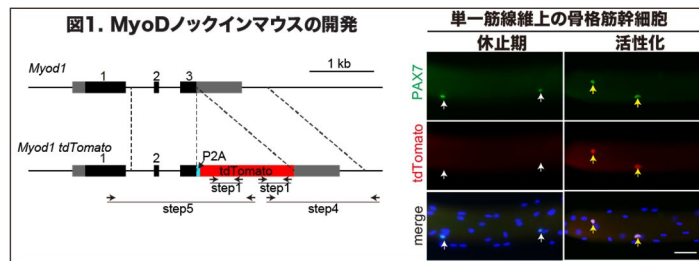
### 3. 研究の方法

骨格筋幹細胞の活性化マーカーである MyoD のノックインマウスを作製する (図 1)。

作製した MyoD ノックインマウスが内在性の MyoD 発現を模倣していることを証明し、骨格筋幹細胞の不均質性を解析できる有用なツールとなることを明らかにする。

MyoD ノックインマウスを使って、MyoD 発現が異なるそれぞれの細胞集団における特徴の解析を行う。

骨格筋幹細胞ヘテロな細胞集団を特徴づける遺伝子の同定と解析を行う。



#### 4. 研究成果

本研究では以下のような成果が得られた。骨格筋幹細胞のヘテロジェネティを解析できる MyoD ノックインマウスの開発に成功した (図 1)。MyoD ノックインマウスは内在性の MYOD タンパク質の発現をほぼ反映していることを証明した (図 2)。この MyoD ノックインマウスを使用することで、未分化集団と活性化集団を識別することが可能となり、網羅的遺伝子発現解析によりこれらのヘテロな細胞集団を特徴づける遺伝子を解析した(図 2)。今後、この成果をさらに発展させ、骨格筋幹細胞が休止期状態からどのように活性化し、筋分化へ移行するのか、そして活性化状態から休止期状態に戻ってくるのかなどの分子基盤を明らかにできる。

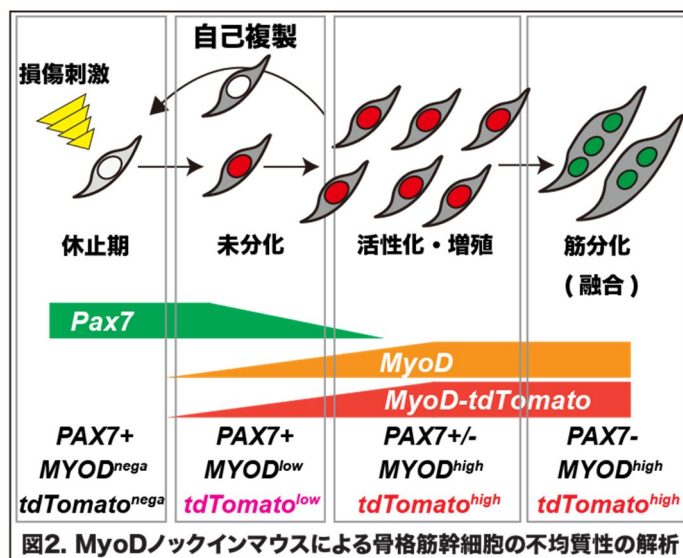


図2. MyoDノックインマウスによる骨格筋幹細胞の不均質性の解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujita Ryo, Mizuno Seiya, Sadahiro Taketaro, Hayashi Takuto, Sugasawa Takehito, Sugiyama Fumihiro, Ono Yusuke, Takahashi Satoru, Ieda Masaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Generation of a MyoD knock-in reporter mouse line to study muscle stem cell dynamics and heterogeneity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106592 ~ 106592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106592	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 Baker Nicole, Wade Steven, Triolo Matthew, Girgis John, Chwastek Damian, Larrigan Sarah, Feige Peter, Fujita Ryo, Crist Colin, Rudnicki Michael A., Burelle Yan, Khacho Mireille	4. 巻 29
2. 論文標題 The mitochondrial protein OPA1 regulates the quiescent state of adult muscle stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1332.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2022.07.010	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 Sadaki Shunya, Fujita Ryo, Hayashi Takuto, Nakamura Ayano, Okamura Yui, Fuseya Sayaka, Hamada Michito, Warabi Eiji, Kuno Akihiro, Ishii Akiko, Muratani Masafumi, Okada Risa, Shiba Dai, Kudo Takashi, Takeda Shin'ichi, Takahashi Satoru	4. 巻 42
2. 論文標題 Large Maf transcription factor family is a major regulator of fast type IIb myofiber determination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112289 ~ 112289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112289	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 Fujita Ryo	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of muscle stem cells in sarcopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sarcopenia: Molecular Mechanism and Treatment Strategies	6. 最初と最後の頁 109 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-822146-4.00009-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 藤田 諒; 定木 駿弥; 林 卓杜; 辻 諒介; 工藤 崇; 高橋 智
2. 発表標題 サルコペニア克服に向けた骨格筋線維タイプ制御機構の解明
3. 学会等名 第10回 日本サルコペニア・フレイル学会大会 / (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田 諒
2. 発表標題 MyoD ノックインマウスによる骨格筋幹細胞の運命制御機構の解明
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田 諒
2. 発表標題 これであなたもネズミのように走れる!? 肉質制御機構の解明
3. 学会等名 The 153rd Scienc-ome (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fujita Ryo; Sadaki Shunya; Takahashi Satoru
2. 発表標題 Large Maf transcription factor family is a major regulator of fast type IIb myofiber determination
3. 学会等名 1st Symposium on "Skeletal muscle cells in Growth and Disease" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 定木駿弥; 藤田 諒; 林 卓杜; 中村 綾乃; 岡村 結; 布施谷 清香; 濱田 理人; 蕨 栄治; 久野 朗広; 村谷匡史; 岡田 理沙; 芝 大; 工藤 崇; 高橋 智
2. 発表標題 速筋線維の形成に不可欠な新規制御因子である大Maf転写因子の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 HAYASHI, Takuto; Fujita, Ryo; Okada, Risa; Hamada, Michito; Suzuki, Riku; Fuseya, Sayaka; Leckey, James; Kanai, Maho; Inoue, Yuri; Sadaki, Shunya; Nakamura, Ayano; Okamura, Yui; Abe, Chikara; Morita, Hironobu; Muratani, Masafumi; Kudo, Takashi; Shiba, Dai; Takahashi, Satoru
2. 発表標題 Lunar Gravity Prevents Skeletal Muscle Atrophy, But Not Muscle Fiber Type Transition
3. 学会等名 15th Annual Wernher von Braun Memorial Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定木駿弥; 藤田, 諒; 林卓杜; 中村綾乃; 岡村結; 布施谷清香; 濱田理人; 蕨栄治; 久野朗広; 村谷匡史; 岡田理沙; 芝大; 工藤崇; 高橋, 智
2. 発表標題 大Maf転写因子は速筋線維を制御する主要な因子である
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田諒、水野聖哉、貞廣威太郎、杉山文博、高橋智、家田真樹
2. 発表標題 新規遺伝子改変マウスによる骨格筋幹細胞の運命制御機構の解明
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高橋智、工藤崇、林卓杜、藤田諒
2. 発表標題 宇宙環境を用いた骨格筋重力応答の解析
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Taketaro Sadahiro, Yu Yamada, Fujita Ryo, Yuto Abe, Tatsuya Akiyama, Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct In Vivo Reprogramming of Fibroblasts into Cardiomyocytes as a Therapeutic Strategy for Heart Failure
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤田諒	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 医学のあゆみ(骨格筋幹細胞の幹細胞性維持機構-休止期維持メカニズムを中心に-)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>筋肉を速筋タイプにする転写因子を同定 - 加齢や病気で低下した筋機能の改善方法開発に期待-</p> <p><a href="https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20230324143000.html">https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20230324143000.html</a></p>
---

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

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