

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700484

研究課題名(和文)筋衛星細胞自己複製機構の解明およびRNA干渉による筋衛星細胞自己複製促進法の開発

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of self-renewal of muscle satellite cells and development of promotion of satellite cell self-renewal by RNAi

研究代表者

長田 洋輔(Nagata, Yosuke)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：50401211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の修復や再生は骨格筋幹細胞である筋衛星細胞によって行われる。本研究ではマウス筋衛星細胞由来の細胞株C2C12の培養によって生じるリザーブ細胞を休眠状態の筋衛星細胞のモデルとして使用し、リザーブ細胞形成に関与する因子を探索した。アダプタータンパク質Grb2, Sos1, Rasがリザーブ細胞形成に必要であること、Grb2の強制発現はリザーブ細胞形成を促進し、恒常活性型Sos1およびRasの強制発現はリザーブ細胞形成を抑制することを明らかにした。これらの結果はGrb2-Sos1-Rasはリザーブ細胞形成に必須であるが、過剰なシグナルはリザーブ細胞形成に対して抑制的に働くことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Regeneration and repair of the skeletal muscle are carried out by satellite cells which are stem cells specific for a skeletal muscle. In this study, reserve cells of C2C12 cells, which were derived from satellite cells of a mouse, were used for investigation of both intrinsic and extrinsic factors which participate in reserve cell formation. I found that adapter protein Grb2, guanine nucleotide exchange factor Sos1, and Ras are necessary for reserve cell formation. While forced expression of Grb2 promoted the formation of reserve cells, constitutively active forms of Sos1 and Ras resulted in loss of reserve cells. These results demonstrate that signaling of Grb2-Sos1-Ras is indispensable to reserve cell formation, but excessive signaling causes decline in reserve cell formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：骨格筋 骨格筋再生 筋衛星細胞 自己複製 Ras Grb2 siRNA

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は損傷を受けても短期間のうちに新たな筋線維を再生する。骨格筋の再生能を担うのは、筋衛星細胞と呼ばれる骨格筋幹細胞である。休止状態の筋衛星細胞が必要時に過不足なく活性化される過程や、再生能を維持するために自己複製する過程は、生命を支える再生現象の根源となるものである。しかし、筋衛星細胞を維持する過程に関しては大部分が未解明である。

これまでに筋衛星細胞自己複製機構に関する研究が進展しなかった理由の一つとして、通常の骨格筋初代培養法では筋衛星細胞の自己複製が極めて稀にしか起こらないことが挙げられる。近年、休眠状態の筋衛星細胞をインタクトな筋線維とともに培養する単一筋線維培養法が確立され、*in vitro*での筋衛星細胞の自己複製が報告された。申請者は単一筋線維培養法を習得し、筋衛星細胞活性化および自己複製機構に関する研究を行ってきた。

筋衛星細胞の自己複製能の低下は個筋再生能の低下に結びつくことが予想される。進行性筋疾患であるデュシャンヌ型筋ジストロフィー等では筋衛星細胞の機能低下と不十分な筋再生能との関係が想定されている。

2. 研究の目的

本研究では筋衛星細胞自己複製に関与する因子を明らかにすることを目的とする。さらに、RNA 干渉を用いた筋衛星細胞自己複製の促進方法を開発することができれば、筋衛星細胞の研究に役立つばかりでなく、デュシャンヌ型筋ジストロフィー等の進行性筋疾患の治療にも応用できると考えている。

本研究では筋衛星細胞の自己複製機構を明らかにするために、細胞外の刺激を細胞内に伝達する際に重要な役割を担うアダプタータンパク質 Grb2、グアニンヌクレオチド交換因子 Sos1、低分子量 G タンパク質 Ras およびその下流のタンパク質に注目し、これらが筋衛星細胞の自己複製に及ぼす影響を解明する。また、上記以外にも筋衛星細胞の自己複製を促進する因子の探索を行う。

3. 研究の方法

本研究では筋衛星細胞由来の細胞株である C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞は分化誘導によって筋分化形質を示す筋管ばかりでなく、未分化な状態にとどまるリザーブ細胞を形成する。リザーブ細胞は筋衛星細胞と同様の挙動を示すことから、筋衛星細胞のモデルとして使用できると考えられる。そ

こでまずリザーブ細胞のマーカーとなる遺伝子の探索を行った。

次に培養条件によってリザーブ細胞の形成がどのような影響を受けるのかを調べた。この目的のためには 24 時間増殖条件で培養した C2C12 細胞の培養液を成長因子含有無血清培地に交換した。成長因子としては、インスリン、IGF-1、EGF、FGF2、PDGF-BB を用いた。3 日間の培養後にリザーブ細胞形成に与える影響を観察した。また、細胞外基質の影響を調べるために、C2C12 細胞をゼラチン、コラーゲンタイプ I、フィブロネクチン、ラミニン-111、ラミニン-211、ラミニン-511 でコートした培養皿に播種し、ITS 培地で分化誘導した。この培養系でも 3 日後にリザーブ細胞形成に与える影響を観察した。

筋衛星細胞自己複製機構に関与する細胞内因子の探索のためには対象となるタンパク質の機能阻害あるいは強制発現を行った。機能阻害のためには PI3K 阻害剤 LY294002 および wortmannin、MEK 阻害剤 U0126、Raf1 阻害剤 GW5074、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 FTI-277、プロテインキナーゼ C 阻害剤 Gö6976、インテグリン阻害剤エキスタチン、Rac1 阻害剤 Rac1 Inhibitor を使用した。また、遺伝子特異的な発現抑制のために、Grb2、Hras、Kras、Nras、MyoD に対する siRNA を用いてノックダウンを行った。目的遺伝子の強制発現を行う際には Tet-ON システムによって人工的に目的遺伝子の発現を誘導できるようにした。そのためにはリバーストランスクリプクリン調節性トランス活性化因子を恒常的に発現する C2C12 細胞 (C2C12Tet 細胞) を樹立した後に、この細胞に TRE プロモーター制御下に目的遺伝子を組み込んだプラスミドを導入した。

単一筋線維培養法のためには約 2~3 ヶ月齢の C57BL/10 マウスから長趾伸筋を摘出し、0.2% コラゲナーゼによる消化後に広口パストールピペットで穏やかにピペッティングすることによって筋線維を単離した。その後、1 mg/ml BSA を含む DMEM 中で 24 時間の培養を行った。

4. 研究成果

(1) リザーブ細胞の同定法

マウス筋衛星細胞由来の細胞株である C2C12 細胞は分化誘導によって分化形質を示す筋管とともに未分化なリザーブ細胞を形成する。リザーブ細胞を休眠状態の筋衛星細胞のモデルと考え、本研究を行った。そのためにはリザーブ細胞の同定が必要となるため、休眠状態の筋衛星細胞が特異的に発現している可能性が報

告されている Pax7, Myf5, Bcl-2, p27^{Kip1}, pRb2, Id1, Id2, Id3 の発現を免疫染色法によって調べたところ、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 がリザーブ細胞特異的に発現することがわかった。Bcl-2 はリザーブ細胞においてミトコンドリアに局在する一方で、分化した筋管や増殖中の細胞には Bcl-2 のミトコンドリアへの局在は観察されなかった。

(2) 成長因子の影響

FGF2, PDGF-BB, EGF は筋芽細胞の増殖を促進するため、リザーブ細胞形成に対しても促進的な影響が考えられたが、C2C12 細胞に添加しても Bcl-2 発現レベルは低いままであった。このことはこれらの成長因子がリザーブ細胞決定化因子としては機能しないことを示していると考えた。一方で、インスリンおよび IGF-1 は筋分化を誘導するとともにリザーブ細胞化も促進した。インスリン・IGF シグナルを分析し、分化制御シグナルとリザーブ細胞形成シグナルを分離することができれば理解が進む可能性がある。

(3) 細胞外基質の影響

生体内において筋衛星細胞は細胞外基質と密着しており、その相互作用が筋衛星細胞の自己複製に重要な役割を担っている可能性に注目した。そこで、C2C12 細胞をゼラチン、コラーゲンタイプ I, フィブロネクチン, ラミニン-111, ラミニン-211, ラミニン-511 でコートした培養皿の上で培養したところ、ラミニン-111 およびラミニン-511 上で培養した場合にリザーブ細胞形成が促進されることを明らかにした。この効果はインテグリン阻害剤であるエキスタチンによって失われることから、ラミニン-インテグリンを介した情報伝達系によって筋衛星細胞の自己複製が促進されるものと考えている。

(4) アダプタータンパク質 Grb2 の関与

成長因子による情報伝達系およびラミニン-インテグリンによる情報伝達系に共通する細胞内因子としてアダプタータンパク質 Grb2 に注目した。Grb2 は活性化した成長因子受容体などのリン酸化チロシンとグアニンヌクレオチド交換因子 Sos1 などを結びつける役割を担っている。Grb2 に特異的な siRNA を用いてノックダウンを行ったところ、リザーブ細胞形成が顕著に抑制されることが明ら

かになった。その一方で、野生型 Grb2 の強制発現を行うとリザーブ細胞形成が促進され、Sos1 との結合能を失ったドミナントネガティブ型 Grb2 (Grb2 P49L) の強制発現はリザーブ細胞形成を抑制することを見いだした。なお、野生型 Grb2 あるいはドミナントネガティブ型 Grb2 と Sos1 の相互作用については共免疫沈降法によって確認した。

(5) Sos1, Ras の関与

Grb2 は Sos1 との結合によって情報伝達に関与する。そこで、Sos1 特異的な siRNA によって Sos1 のノックダウンを行ったところ、Grb2 ノックダウンと同様の結果が得られた。一方で、恒常的活性型となるように C 末端に Kras の CAAX モチーフを付加した cSos/CAAX を強制発現した場合には強い筋分化抑制と増殖促進が見られたものの、リザーブ細胞形成に関してはむしろ抑制されていた。

そこで次に Sos1 によって制御される Ras の関与について検討を行った。Ras の細胞膜への局在に必要となるファルネシルトランスフェラーゼを FTI-277 によって阻害すると筋分化には影響がないものの、リザーブ細胞形成が抑制されることがわかった。そこで Hras, Kras, Nras のノックダウンを試みたものの、使用する siRNA によって影響が異なり、統一的な結果を得ることができなかった。これは各 siRNA の特異性が不十分であったこと、あるいはノックダウンによって他の Ras が代償的に作用したことが考えられた。今後は特異性の高い siRNA を用いること、Hras, Kras, Nras の同時ノックダウンを行うことを検討している。一方で、各種 Ras の恒常活性型変異体 (G12V) を強制発現したところ、統一的に強い分化抑制、増殖促進とともに、リザーブ細胞形成の抑制が見られた。この現象は FGF2 などの成長因子や恒常活性型 Sos1 による影響と共通しており、過剰な Sos1/Ras 活性はリザーブ細胞形成に対して抑制的に働くことを示している。

(6) Raf1, Rac, PI3K プロテインキナーゼ C の関与

Ras は Raf, Rac, PI3K, RaIGDS などのエフェクタータンパク質を活性化することによって情報伝達を行う。そこで、Raf1, Rac1, PI3K 等の阻害剤を用いて、リザーブ細胞形成にこれらのエフェクタータンパク質が関

与する可能性を検証した。

Raf1 阻害剤として GW5074 を使用したところ、リザーブ細胞形成にも筋分化にも影響は見られなかった。さらに、Raf1 の下流で活性化される MEK/ERK を U0126 によって阻害した場合にもリザーブ細胞形成に影響は現れなかった。PI3K 阻害剤 LY294002 および wortmannin は筋分化を強く抑制した。これは PI3K/Akt シグナルが筋分化に関与しているためと考えられる。その一方でリザーブ細胞形成には影響がなかった。Rac1 阻害剤である Rac1 Inhibitor はリザーブ細胞形成を濃度依存的に抑制した。これらの結果は Ras エフェクターの中でも Rac1 が特異的にリザーブ細胞形成に関与していることを示している。

さらに、リザーブ細胞形成に関する情報伝達系タンパク質を探索する過程で、プロテインキナーゼ C 阻害剤 Go6976 によってリザーブ細胞形成が抑制されること、プロテインキナーゼ C を活性化するホルボールエステルによってリザーブ細胞形成が促進されることを発見した。これらの結果はプロテインキナーゼ C がリザーブ細胞形成を正に制御することを示している。

(7) MyoD の関与

筋分化には筋細胞特異的な転写因子である MyoD が重要な役割を担っている。MyoD は線維芽細胞に強制発現することによって筋芽細胞へと分化転換させることのできる筋分化マスター遺伝子である。そこで、MyoD のノックダウンを行ったところ、筋分化が完全に抑制され、ほぼすべての細胞がリザーブ細胞になることがわかった。

(8) 単一筋線維培養法の改善

単一筋線維培養法は筋衛星細胞をインタクトな筋繊維とともに培養するため、筋衛星細胞の挙動を生体内に近い環境で調べることができる。単一筋線維の単離に関しては問題がなかったものの、その後の培養で十分な筋繊維の生存率が確保できなかったため、培養条件の検討を行った。その結果、培養液中に 110 mg/l のピルビン酸ナトリウムを添加することによって大幅に筋繊維生存率が向上することを発見した。

(9) In vivo でのノックダウン

細胞培養系においては MyoD のノックダウンによってリザーブ細胞の割合がほぼ 100% になったことから、in

vivo でのノックダウンによって生体内の筋衛星細胞数にどのような影響が生じるかを検証しようとしたものの、技術的な問題によって結果を得ることができなかった。生体内の骨格筋に対して siRNA の導入を行う方法に関しては、アテロコラーゲンを担体として用いる方法、カチオンリポソームを用いる方法などが報告されているため、今後はこれらの報告を基に条件検討を行う。

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)

長田洋輔, 松田良一「筋サテライト細胞の活性化」生体の科学, 査読なし, 2013 年, 64(2):139-143 頁

[学会発表](計11件)

Kazuya Ohashi, Yosuke Nagata, Peter S. Zammit, Ryoichi Matsuda "Zinc has a role in activation and proliferation of myogenic cells through phosphorylation of Akt and ERK", 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2013 年 12 月 15 日, アメリカ合衆国

長田洋輔「筋衛星細胞の活性化と自己複製はアダプタータンパク質 Grb2 によって媒介される」, 第 1 回若手による骨格筋研究会, 2013 年 11 月 27 日, 京都

長田洋輔, 大橋和也, 松田良一「スフィンゴ脂質によって媒介される筋衛星細胞活性化機構の解明」, 日本動物学会第 84 回大会, 2013 年 9 月 27 日, 岡山

長田洋輔, 大橋和也, 松田良一「スフィンゴ脂質によって媒介される筋衛星細胞活性化機構の解明」, 精神・神経疾患研究開発費筋ジストロフィーに対するトランスレーショナルリサーチ平成 24 年度研究会議, 2012 年 12 月 6 日, 東京

Yosuke Nagata, Kazuya Ohashi, Ryoichi Matsuda "Sphingosine-1-phosphate mediates EGF-induced satellite cell activation", 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', 2012 年 9 月 7 日, 東京

Yosuke Nagata, Kazuya Ohashi, Ryoichi Matsuda "Sphingosine-1-phosphate mediates EGF-induced satellite cell activation", Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells (2012 FASEB Science Research

Conferences), 2012年8月13日, イタリア

Kazuya Ohashi, Yosuke Nagata, Ryoichi Matsuda "PI3K and Akt play an Essential Role for Quiescent Satellite Cell Activation", 2011 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2011年12月4日, アメリカ合衆国

大橋和也, 長田洋輔, 松田良一「筋衛星細胞活性化に関する情報伝達系と温熱刺激の影響」, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川

長田洋輔, 大橋和也, 松田良一「スフィンゴシン-1-リン酸は上皮細胞成長因子による筋衛星細胞活性化を媒介する」, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川

湯浅友貴, 長田洋輔, 松田良一「細胞外基質による筋衛星細胞の自己複製機構の解明」, 日本動物学会第82回大会 2011年9月21日, 旭川

大橋和也, 長田洋輔, 松田良一「筋衛星細胞活性化刺激の探索とその情報伝達系の研究」第11回東京大学生命科学シンポジウム 2011年6月4日, 東京

〔図書〕(計1件)

長田洋輔「ミクロの目で見る筋肉の世界 骨格筋は再生する」(東京大学教養学部編, 高校生のための東大授業ライブ ガクモンの宇宙, 東京大学出版会), 2012年, 209-222頁.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 洋輔 (NAGATA, Yosuke)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 50401211

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし