

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590363

研究課題名(和文) 骨格筋由来幹細胞の多分化能の制御機構と筋疾患治療への応用

研究課題名(英文) Regulation of pluripotency of skeletal muscle-derived stem cells and application to muscular diseases

研究代表者

土田 邦博 (TSUCHIDA, Kunihiro)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：30281091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋組織は、生体の40%もの重量を占める最重量臓器である。約50年前の電顕観察から筋基底膜直下に存在する筋衛星細胞が筋分化に寄与する細胞として解析が推進されてきた。一方、骨格筋内に新たな間葉系前駆・幹細胞が同定され、脂肪化、繊維化、異所性骨化への寄与が証明された。さらに、われわれは、筋肥大経路で作用するmiRNAを同定しAkt/mTOR系、PTEN系とのクロストーク分子機構を解明した。筋分化調節転写因子の上流に新たな長鎖非翻訳RNAを発見した。本研究は、ヒトの筋萎縮の抑制法につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Muscle atrophies are observed both in genetic and non-genetic muscular disorders. Satellite cells play an important role in muscle repair, regeneration and muscle mass. Recently, non-myogenic mesenchymal progenitors/stem cells have been identified in muscles. They do not adopt a myogenic fate, however, they differentiate to adipocytes, fibroblasts and osteogenic cells. We have established an elegant method to purify myogenic cells and mesenchymal stem cells. Myostatin, a muscle-specific TGF-beta superfamily, is a pivotal negative regulator of muscle mass. Using myostatin knockout mice, we investigated the global microRNA expression profile. miR486, a positive regulator of IGF-1/Akt pathway, was identified as a target of myostatin signaling. Overexpression of miR486 induced myotube hypertrophy. miR486 is one of the intermediate molecules linking myostatin signaling and the IGF-1/Akt/mTOR pathway in the regulation of skeletal muscle size.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：筋分化 筋衛星細胞 間葉系前駆細胞 脂肪分化 筋萎縮 miRNA lncRNA 筋疾患

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、生体の20-40%を占める最重量の組織であり、筋収縮、体の動きや姿勢の維持、運動機能に関与する。さらに、肝臓と共に、インスリンの血糖降下作用の主たる標的臓器である。生体の代謝を中心とした恒常性維持に重要な役割を持っている。骨格筋を形成する細胞としては、筋基底膜の直下に存在する筋衛星細胞が myogenic な細胞として解析されてきた。骨格筋は、筋線維、筋衛星細胞、間質組織等からなるが、体性幹細胞としては、筋衛星細胞以外の細胞の解析はほとんど行われていないのが現状であった。そこで、我々の研究室で、マウスの骨格筋を材料として、単核細胞を網羅的にそして予知的に解析することとした。細胞の単離、各種分化培養、分化マーカーの推移等を詳細に解析することとした。また、ヒト骨格筋細胞を解析可能なシステムを構築し、マウスに存在する細胞がヒトにも存在するのか、そして、動物種による差異の検討も行った。

骨格筋には収縮機能のみならず、内分泌臓器として種々のサイトカイン産生の場合としての機能があることが、近年の解析から明らかにされている。インターロイキン類やケモカイン、TGF-ファミリー等が骨格筋から産生され、骨格筋自体への作用に加えて、他臓器との相互作用を担っている。中でも、TGF-ファミリーに属するマイオスタチンは、骨格筋が主たる産生臓器であり、筋量を負に制御している。マイオスタチンの産生や機能が阻害されると、内臓脂肪や皮下脂肪量が低下する事が知られていた。しかしながら、その詳細な分子機構や、マイオスタチンが織りなす、骨格筋と脂肪組織や肝臓との相互作用に関する解析は十分とは言えない状況である。そこで、マイオスタチンあるいは TGF-ファミリーの下流で作用する小分子 RNA の解析を行うこととした。

2. 研究の目的

近年、再生医学の医学応用である再生医療が大きく進展している。骨格筋システムにおいても、筋変性疾患や老化に伴う筋萎縮が高齢化社会で重要視されており、骨格筋の幹細胞医学・生物学の研究は骨格筋の再生医療の発展に重要な情報をもたらすことが大いに期待される。骨格筋の体性幹細胞としては、筋分化の担い手として重要な筋衛星細胞(サテライト細胞)の研究が推進されてきた。一方、筋は障害を受けたり、遺伝性筋疾患・肥満等で、脂肪変性・脂肪沈着、繊維化、炎症細胞の浸潤などが惹起される。脂肪細胞や繊維芽細胞の出現については、筋衛星細胞が分化する可能性を示唆する研究もなされてきたが、私たちの結果では、筋衛星細胞は筋芽細胞への分化が最重要であり、脂肪細胞や纖

維芽細胞への分化はほとんど認められないため、他の前駆細胞・幹細胞システムの存在が想定されていた。そして、その研究を大きく推進させて、筋の間質に筋衛星細胞や周皮細胞とは異なった細胞が存在し、強力な脂肪分化能を持つことを示してきた。本研究では、筋由来の幹細胞の多分化能の検討、制御機構を明らかにすると共に、筋疾患治療への基盤作りとなる研究を展開させることとした。

さらに、筋由来の細胞増殖因子であるマイオスタチンについては、筋量を制御することは明らかであったが、その詳細な分子機構については、不明点が多いのが現状である。そこで、マイオスタチンシグナルと小分子 RNA (マイクロ RNA, miRNA) との相関を明らかにする事で、その機構を解析する事とした。

3. 研究の方法

実験動物のマウスを実験に用いる際には、採取する筋量を確保するため、前頸骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋を含めたほぼ全身の筋を採取する。大学の疫学倫理審査で許可されているため、手術の際に不用となる廃棄予定のヒト筋試料を用いることも可能な体制にある。実態顕微鏡下で脂肪組織、血管、付随神経、腱、結合組織等を注意深く除去する。細切しコラゲナーゼ酵素処理を行い、注射針に数回通す。酵素処理を終了させて、フィルター処理を2回行う。低張処理を施しマトリゲルでコーティングした培養皿で培養する。分化培地に交換し、分化能を観察したり、セルソータを用いてさらに単離処理を行う。骨格筋の染色は、通常研究室で行っている手法を用いる。液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結後、クリオスタットで薄切標本を作製し、蛍光抗体で染色を行う。核との共染色のために DAPI 染色を行う。脂肪細胞の同定にはオイルレッド O 染色を行う。繊維化の解析としては、TGF- で刺激し、細胞外基質分子や MMP, TIMP の変動を PCR や western 法で精査した。

マイオスタチンの遺伝子ノックアウトマウスを開発元より入手し、大腿四頭筋や前頸骨筋から小分子 RNA を抽出し、発現変動を示す miRNA の同定を試みた。定量 PCR 解析で発現変動を精査を行った。データベース解析を行ない、miRNA の標的となる候補分子検索を行なった。筋芽細胞分化系や初代筋芽細胞系で、同定した miRNA が筋肥大関連分子の制御や分化に関与する機構の解明を目的とした研究を行なった。筋芽細胞モデルとして使用されている C2C12 細胞分化系としては、2%程ウマ血清培地に交換することで筋分化を促進させた。抽出された miRNA について、生理活性を評価するために、筋芽細胞に遺伝子導入し、筋管径の変化を測定した。実験動物への小分子 RNA の導入に関しては、

Tough decoy RNA と呼ばれるベクターシステムを導入し、比較的穏やかに筋へ遺伝子導入可能な条件を検討し取り入れた。

4. 研究成果

ヒト筋での筋衛星細胞の局在を染色で確認したところ、M-カドヘリンや Pax7 と局在を共にする表面マーカーとして CD56 が適切であることが示された。一方、我々グループが解析を推進させている血小板由来増殖因子受容体 (P)陽性細胞は筋間質に存在し、衛星細胞とは局在が異なっていた。血管周囲での局在がより顕著であった。血小板由来増殖因子受容体 以外に CD90, CD166 も陽性であり、骨髄間質細胞との類似性が示された。CD56 陽性細胞が筋分化能が旺盛であるのに対して、P 陽性細胞は脂肪細胞に容易に分化した。白色脂肪マーカー、褐色脂肪マーカー共に発現が見られた。間葉系前駆細胞は繊維芽細胞にも分化を示すが、TGF- 刺激でコラーゲン 1A, 3A, -SMA 等の分子の上昇が見られた。PDGF 刺激では、PI3 キナーゼ、MAPK 経路で細胞増殖が刺激された。なお、マウスの間葉系前駆細胞を用いた研究から、脂肪細胞分化以外に、骨形成因子の刺激や骨分化培地では、骨形成能を示し、至適条件下では、軟骨分化能も有していた。そして、骨芽細胞分化系において新たな小分子 RNA がその分化経路に関与することを示した。

マイオスタチンが阻害され筋量が増加したモデルマウスは、高脂肪食負荷時においても、野生型に比較して、脂肪量の増加が抑制されており、筋量が増加傾向にある。さらに、野生型では、脂肪肝の形成が誘導されるが、マイオスタチン阻害では、脂肪肝は全く形成されない。マイオスタチン阻害に筋肥大には、IGF-1/mTOR 系の関与が示唆されていたが、詳細な機構は不明点が多かった。本研究では、マイオスタチン阻害で発現変動する 13 種類に及ぶ複数の miRNA を捉える事が出来た。その中で、miRNA486 は、C2C12 細胞及びマウスの前頸骨筋への導入により、筋管径の増加作用を有していた。標的分子と考えられる PTEN の発現低下や、S6 キナーゼのリン酸化変化が観察された。

骨格筋と脂肪細胞の相互作用を担う分泌因子の探索のために、血清や骨格筋から希少分子を濃縮し、解析する手法を開発した。

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 11 件)

Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N. Pro-IGF-II ameliorates age-related inefficient regenerative response by orchestrating self-reinforcement mechanism of muscle regeneration. *Stem Cells*. 査読有 (2015)

(in press)

Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K. Identification and characterization of PDGFR mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Disease* 査読有 5, e1186 (2014)

Tsuchida K. Myokines and signal crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue. *Austin J Endo Metab* 査読有 1(3), 2(2014)

Hitachi K, Tsuchida K. Role of microRNAs in muscle hypertrophy. *Frontiers in Physiology*. 査読有 408,1-7 (2014)

Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Role for nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Frontiers in Physiology*. 査読有 5,1-11 (2014)

Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K. Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 査読有 47,93-103 (2014)

Ikeda D, Ageta H, Tsuchida K, Yamada H. iTRAQ-based proteomics reveals novel biomarkers of osteoarthritis. *Biomarkers* 査読有 18(7), 565-72 (2013)

Tsuchida K, Oishi T, Uezumi A, Yamada H. Origin and therapeutic strategies for ectopic bone formation in skeletal muscle. *Human Genet Embryol* 査読有 3, 110 (2013)

Murakami T, Nakatani M, Kokubo M, Nakatsuji H, Inada M, Imahori H, Yudasaka M, Iijima S, Tsuchida K. Mechanism of cell interactions with water-dispersed carbon nanohorns. *Nanosci Nanotech Lett* 査読有 5(3), 402-7 (2013)

Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, Yamamoto N, Yamaguchi A, Yamada H, Tsuchida K. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *Plos One* 査読有 8(2), e56641 (2013)

Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu S, Ishizaki M, Suga T, Fujino M, Murakami T, Uchino M, Tsuchida K, Noji S, Hinohara A, Shimizu T, Shimizu K, Sunada Y. An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy. *Lab Invest* 査読有 92(8), 1100-14 (2012)

[学会発表](計 26 件)

Ageta H, Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K. Establishment of an in vivo exosomal transfection as a new gene therapy. ISEV (International Society for Extracellular Vesicles), April 23-26 (2015), Washington DC, USA

上住円, 上住聡芳, 深田宗一郎, 土田邦

博, 橋本有・Pro-IGF-II 補充による老化骨格筋再生不良改善効果の検討、第14回日本再生医療学会総会、3月20日(2015)、横浜

上住聡芳, 上住円, 深田宗一郎, 土田邦博・骨格筋の変性および再生そして恒常性維持に関わる間葉系前駆細胞の機能、第14回日本再生医療学会総会、3月20日(2015)、横浜、

中村美紀, 村上聡, 上住聡芳, 佐藤貴彦, 土田邦博, 辻川和丈, 深田宗一郎・ヒト筋幹細胞移植を目指した基礎的研究、第14回日本再生医療学会総会横浜、3月20日(2015)、横浜

中谷直史, 上田洋司, 土田邦博・骨格筋分泌因子の探索、第35回日本肥満学会、10月24-25日(2014)、宮崎

日野純, 中谷直史, 荒井勇二, 土田邦博, 宮里幹也, 寒川賢治・BMP-3b の新たなアディポカインとしての脂肪細胞機能制御と抗肥満作用、第35回日本肥満学会、10月24-25日(2014)、宮崎

上住聡芳, 深田宗一郎, 上住円, 土田邦博・次世代型筋研究の夜明けー筋疾患や筋再生における骨格筋内在性の間葉系前駆細胞の役割、第87回日本生化学会大会、10月15-18日(2014)、京都

日野純, 中谷直史, 荒井勇二, 土田邦博, 宮里幹也, 寒川賢治・抗肥満作用を有するBMP-3b 過剰発現マウスにおける脂肪細胞機能の解析、第87回日本生化学会大会、10月15-18日(2014)、京都

Hino J, Nakatani M, Arai Y, Tsuchida K, Miyazato M, Kangawa K. Overexpression of BMP-3b in adipose tissue prevents high-fat diet induced obesity with alteration of energy metabolism. 10th International BMP Conference, 9月16-20日(2014), Berlin Germany

上田洋司, 常陸圭介, 中谷直史, 土田邦博・新規遺伝子治療を目的としたエクソソームを介した遺伝子導入の技術確立、第6回日本RNAi学会、8月29日(2014)、広島

常陸圭介, 土田邦博・マイオスタチン欠損骨格筋肥大に関わる新規因子の探索と機能解析、第6回日本RNAi学会、8月29日(2014)、広島

Hitachi K, Tsuchida K. miR-486 is the intermediary molecule connecting myostatin signaling and the IGF-1/Akt/mTOR pathway in skeletal muscle. FASEB Science Research Conferences, Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. 7月20-25日(2014), Steamboat Springs, CO, U.S.A.

上住円, 上住聡芳, 土田邦博, 深田宗一郎, 橋本有弘・老化骨格筋再生能力低下を引き起こす環境因子の同定。第13回日本再生医療学会総会、3月4-6日(2014)、京都

上住聡芳, 深田宗一郎, 土田邦博・骨格筋内在性間葉系前駆細胞による筋再生促進機構の解析、第13回日本再生医療学会総会、3月4-6日(2014)、京都

日野純, 中谷直史, 荒井勇二, 宮澤崇, 吉本光佐, 白井幹康, 土田邦博, 宮里幹也, 寒川賢治・BMP-3b の新規アディポカインとしての機能: 過剰発現マウスによる抗肥満作用および代謝解析、第34回日本肥満学会、10月11-12日(2013)、東京

日野純, 中谷直史, 荒井勇二, 宮澤崇, 吉本光佐, 白井幹康, 土田邦博, 宮里幹也, 寒川賢治・抗肥満作用を示す BMP-3b 過剰発現マウスの機能解析及び脂肪細胞における BMP-3b の遺伝子発現調節、第86回日本生化学会大会、9月11-13日(2013)、横浜

土田邦博・脂肪蓄積を担う脂肪幹細胞の動態解析とマイオスタチンによる脂肪組織・骨格筋相互作用、新学術領域研究会議、8月22-23日(2013)、大阪

Ikeda D, Ageta H, Tsuchida K, Yamada H. iTRAQ identification of three novel diagnostic markers of osteoarthritis. World Congress on Osteoarthritis (OARS2013) 4月18-21日(2013), PA, U.S.A.

常陸圭介, 土田邦博・マイオスタチン欠損骨格筋肥大とmicroRNAs の関係、第35回日本分子生物学会年会、12月11-14日(2012)、福岡

土田邦博・ナノテクノロジーとDDS、第14回 snns 研究会学術集会、11月17日(2012)、愛知

⑲ 土田邦博・マイオスタチンの機能制御による骨格筋量増加と筋力増強、第27回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム 筋損傷を科学する、10月27日(2012)、愛知

⑳ 土田邦博・幹細胞の動態から見た骨格筋の脂肪化と線維化の分子機構。第29回小児神経筋疾患懇話会 東京 8月25日(2012)

㉑ Uezumi A, Fukada S, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration. FASEB Science Research Conference. 8月12-17日(2012), Lucca, Italy

㉒ Tsuchida K. Prevention of fat mass increase and hepatic steatosis by myostatin inhibition. BIT Life Sciences 2nd World Congress of Endocrinology. 6月26日(2012), Beijing, China

㉓ Hino J, Nakatani M, Arai Y, Miyazawa T, Otsuka F, Makino H, Tsuchida K, Nakazato M, Kangawa K. BMP-3b acts as a novel adipocytokine that inhibits adipogenesis and BMP-3b transgenic mice are resistant to high-fat diet induced obesity. 9th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins (BMP), 6月19-23日(2012), California, U.S.A.

㉔ 土田邦博・骨格筋(白筋)を増加させる方法、第12回日本抗加齢医学会、6月16日(2012)、横浜

〔図書〕(計7件)

土田邦博, 上住聡芳, 中谷直史, 上田洋司, 常陸圭介・整形・災害外科 サルコペニアに

おける筋内脂肪変性の関与、金原出版株式会社、整形・災害外科、サルコペニアの病態と治療 58(2), 155-61 (2015)

土田邦博・サルコペニア病態における筋内脂肪沈着とマイオスタチンの役割、最新医学 The Medical Frontline サルコペニアの基礎と臨床 査読無 70(1), 64-8 (2015)

土田邦博・サルコペニアの新規治療法、医学のあゆみ サルコペニア-成因と対策 査読無 248(9), 753-7 (2014)

土田邦博・マイオスタチンの機能制御による骨格筋量増加と筋力増強、日本整形外科学会雑誌 筋損傷を科学する 88(1), 29-33 (2014)

上住聡芳, 土田邦博・再生医療の役者としての幹細胞、筋組織内間葉系幹細胞-その特徴と機能 再生医療の現状と最前線 整形・災害外科 2013 年 4 月臨時増刊号 (企画 戸口田淳也) 56(5), 493-9 (2013)

土田邦博, 上住聡芳. 幹細胞の動態から見た骨格筋の脂肪化と線維化の分子機構. 小児科診療. 76(4), 670 (2013)

上住聡芳, 土田邦博・骨格筋内在性間葉系前駆細胞の機能、生体の科学(医学書院) 特集 特殊な幹細胞としての骨格筋サテライト細胞 64 (2), 117-21 (2013)

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田 邦博 (TSUCHIDA, Kunihiro)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授
研究者番号：30281091

(2) 研究協力者

中谷 直史 (NAKATANI, Masashi)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号：00421264
常陸 圭介 (HITACHI, Keisuke)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号：10508469
上住 聡芳 (UEZUMI, Akiyoshi)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師
研究者番号：60434594