

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615006

研究課題名(和文)筋再生時における筋幹細胞分化制御の分子メカニズムについての発生工学的解析

研究課題名(英文)Studies on regulatory mechanisms of satellite cells during muscle regeneration and postnatal muscle growth.

研究代表者

花岡 和則 (Hanaoka, Kazunori)

北里大学・理学部・名誉教授

研究者番号：40189577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ホメオボックス型転写因子Lbx1およびNotch受容体の1つであるNotch3が、筋再生を担う幹細胞であるサテライト(筋衛星)細胞で発現していることを発見し、これらの遺伝子の筋再生における機能解析を行ってきた。本研究では、Notch3のターゲット遺伝子の探索とともにLbx1コンディショナルノックアウトマウスの筋再生および出生後の筋成長における表現型を詳細に解析した。その結果、1) Lbx1は筋再生だけでなく、出生後の筋成長にも重要な機能を持つこと、2) このLbx1の機能は、筋成長過程におけるサテライト細胞の増殖を活性化することによるものであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In previous studies, we have found that Lbx1, the homeo-box transcription factor, and Notch3, a member of notch gene family, are expressed in satellite cells of skeletal muscles in mice. To address the potential postnatal functions of Lbx1, we analyzed phenotypic alterations that occurred in skeletal muscles of Lbx1 conditional knockout mice. The data obtained indicate Lbx1 plays critical roles not only in muscle regeneration but also in postnatal muscle growth, probably through activating proliferation of satellite cells.

研究分野：時限 再生医学・医療

キーワード：筋肉 筋再生 筋成長 Lbx1 Notch3 ノックアウトマウス サテライト細胞 幹細胞

1. 研究の背景

骨格筋は分裂能を失った多核の細胞である筋線維（筋細胞）が集合した組織である。筋線維は、体節に由来する筋芽細胞が多数融合することにより胎児期に形成される。出生後の骨格の伸長に対応して、筋線維は、さらに肥大・成熟し、完成した筋肉組織が形成される。この過程は筋成長とよばれる。成体の筋肉組織は最も再生能力の高い組織の1つであり、様々な要因により損傷をうけても、速やかに修復することができる。筋再生と呼ばれるこの過程を担っているのが筋肉の幹細胞であるサテライト細胞である。サテライト細胞は通常は不活性な状態にあるが、筋肉が傷害されると、外部からシグナルを受け、活性化する。活性化したサテライト細胞は、増殖、筋傷害部位への移動を経て、互いに融合し、新たな筋線維を形成する。一部の細胞は分化への経路を辿らず幹細胞に戻る（自己再生）。難治性筋疾患の再生医療を考える上で、筋再生の分子機構を解明する事は非常に重要であるにも関わらず、筋再生の分子メカニズムについては、不明な点が多く残されている。我々はマウスを用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）についての研究の過程で、ホメオボックス型転写因子 *Lbx1* および Notch 受容体の1つである *Notch3* がサテライト細胞で発現していることを発見し、ノックアウトマウスを利用したこれらの遺伝子の機能解析を行ってきた。Notch3 ノックアウトマウスでは、筋再生を繰り返し誘導したときに限り筋肉の顕著な過形成が生じることが観察された。詳細な解析の結果、Notch3 は、静止期のサテライト細胞の増殖、活性化期のサテライト細胞の細胞分裂およびサテライト細胞の自己複製のいずれの過程をも抑制していることが明らかになった。

一方、*Lbx1* ノックアウトマウスは生後すぐに死亡するため出生後のマウスの筋肉組織における表現型解析にはコンディショナルノックアウト（CKO）マウスの作成が不可欠である。そこで、筋特異的プロモーターの作用及び Tamoxifen の投与によりコンディショナルに *Lbx1* をノックアウトする実験系を確立した。

2. 研究の目的

本研究は、上記の研究（平成 21-23 年度基盤研究(C) ノックアウトマウスを用いた筋再生の分子機構の解明、研究代表者花岡和則）を基盤に、*Lbx1* コンディショナルノックアウト（CKO）マウスの表現型を詳細に解析することにより筋形成・筋再生における *Lbx1* の作用機序を明らかにすること、Notch3 の機能解析の結果を踏まえ、Notch3 との機能的相関を解析することにより筋再生の分子メカニズムについての新たな知見を得ること、その結果をもとに新たな視点から幹細胞治療への応用の可能性を探ることを目指すものである。

3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウス

本研究には、Notch3 ノックアウトマウスおよび *Lbx1* コンディショナルノックアウト（CKO）マウスを用いた。

(2) 筋再生の誘導

人為的に筋再生を引き起こすために、麻酔下で 0.1 ml の Cardiotoxin (10 μ M, Sigma) をマウス前脛骨筋に 29G の注射針を用いて直接注入した。

(3) サテライト細胞の分離・培養

サテライト細胞の調製には以下の方法を用いた。10~15週齢の C57BL/6、Notch3^{-/-} マウスから長指伸筋(EDL)を採取し、コラゲナーゼ処理によって筋線維を分離し、マトリゲルコートしたディッシュ上で培養した。

(4) 免疫組織化学

通常の免疫組織学的手法を用いた。

使用した一次抗体：ウサギ抗Lbx1抗体（カン研究所小野雄一博士より拝受）、ヒツジ抗-Notch3抗体(R&D Systems Inc).ウサギ抗-laminin抗体(Chemicon)、マウス抗-M cadherin抗体(Abcam)、マウス抗-Pax7抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank)、マウス抗-myosin heavy chain(DSHB)、マウス抗-myogenin抗体(DSHB)、ウサギ抗-MyoD抗体(Santa Cruz).

(5) マイクロアレイ解析

RNeasy mini(Qiagen)を使用して再生筋または培養した筋繊維からtotal RNAを抽出した。RNAの品質確認はバイオアナライザ(Agilent Technologies)を用いて行った。アレイはSurePrint G3 Mouse GE Microarray 8×60K(Agilent Technologies)を使用した。解析はバイオマトリクス研究所に委託した。解析した遺伝子のリストと既知の遺伝子データとの照合は遺伝子解析ソフトGeneSpringを用いて行った。

4. 研究成果

1) 筋再生過程・筋成長過程におけるLbx1遺伝子の機能解析

始めに成体マウス骨格筋に Cardiotoxin (CTX)を投与して筋再生を誘導し、筋再生後の前脛骨筋についてCKOマウスと対照マウスを形態学的に比較した。再生筋の筋重量を比較したところ有意な差は見られなかったが、CKOマウスでは筋再生後に総筋線維数が増加し、平均筋繊維断面積が小さいことが明らかになった。再生筋におけるCKOマウスの表現型にサテライト細胞が関与しているという可能性を確かめる為に、筋再生中に増殖しているサテライト数を計測した。CTXを1回投与したマウスでは顕著な差は見られなかったが、CTXを3回投与し筋再生を繰り返し誘導したCKOマウスではサテライト細胞の数が対照マウスに較べて有意に減少していることが明らかになった(図1A)。さらに、骨格筋から分離し*in vitro*で培養したサテライト細胞の増殖能もCKOマウスは対照マウスに較べて低下していることが観察された。しかし*in vitro*

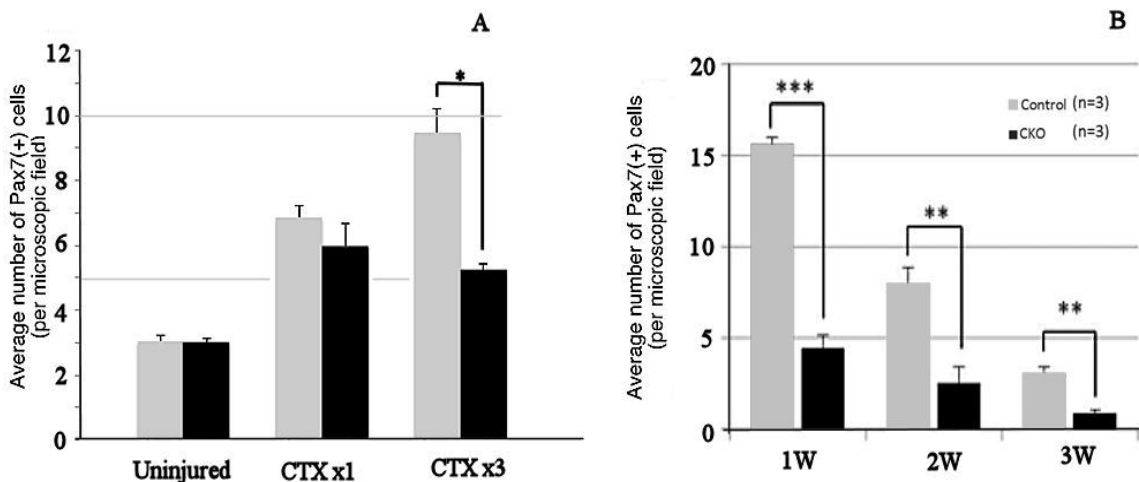


図1 骨格筋中のサテライト細胞に対するLbx1ノックアウトの影響。

A. 筋再生過程の解析。CTX投与により筋組織を壊した後の再生筋(前頸骨筋)に含まれるPax7陽性のサテライト細胞数を組織切片上で測定した。Lbx1CKOマウス(黒)ではCTXを3回投与後にPax7陽性サテライト細胞数が対照マウス(灰)に較べて有意に減少している。

B. 筋成長過程の解析。出生後24時間以内にtamoxifenを投与。Lbx1CKOマウス(黒)の骨格筋(前頸骨筋)中のPax7陽性サテライト細胞は、筋成長の全過程を通じて対照マウス(灰)に較べて有意に減少している。生後1~3週(w)の結果を示したが、生後4~7週でも同様の結果が得られている。

培養下でのサテライト細胞の分化やアポトーシスについては CKO マウスと対照マウスで違いは見られなかった。筋再生はサテライト細胞の活性化、増殖、融合、筋管への分化のステップからなるが、本研究結果から、Lbx1 は活性化したサテライト細胞の増殖を促進していることが強く示唆された。

次いで、筋成長過程における Lbx1 の機能について Lbx1CKO マウスを用いて解析した。出生後 24 時間以内の仔マウスに tamoxifen を投与し、そのまま生育させた。Lbx1CKO マウスおよび対照マウスの骨格筋を形態学的に比較した結果、4 週齢以降の CKO マウスの筋肉では細い筋線維が増加していることが観察され、平均筋線維断面積および筋重量が対照マウスに比べて顕著に減少していること、すなわち Lbx1 の KO により筋成長が阻害されていることが明らかになった。また、サテライト細胞特異的マーカーを用いて前脛骨筋におけるサテライト細胞数を測定した結果、CKO マウスの筋肉では対照マウスに比べてサテライト細胞が大きく減少していることが明らかになった。さらに、増殖中のサテライト細胞数を計測したところ、細胞増殖マーカー陽性のサテライト細胞が CKO マウスでは減少していることが判明した。また、サテライト細胞の減少に伴い、細胞分化・融合マーカー陽性の細胞数も減少していた。これらの結果から、1) Lbx1 は筋再生だけでなく、出生後の筋成長にも重要な機能を持つこと、2) この Lbx1 の機能は、筋成長過程におけるサテライト細胞の増殖を活性化することによるものであることが明らかになった。

2) Notch3 ターゲット遺伝子の探索

今までの研究で、Notch3 は、再生過程におけるサテライト細胞の制御に重要な機能を有しており、サテライト細胞の増殖や

自己再生 (self-renewal) を負に制御していることが明らかになっている。しかし、Notch3 のターゲット遺伝子についてはほとんど報告されていない。それを明らかにするために、Notch3 KO マウスマイクロアレイを用いた網羅的な発現解析を行い Notch3 のターゲット遺伝子を探索した。Notch3 KO マウスにおける再生中の骨格筋および培養下のサテライト細胞で共通して発現が低下している 10 種の遺伝子を同定した。次に、マイクロアレイによって得られたデータをリアルタイム PCR を用いて検証し、Notch3 KO マウスにおいて 6 種類の遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。これらの遺伝子が、Notch3 のターゲット遺伝子の候補と考えられる。今後さらにクロマチン免疫沈降などの方法によってダイレクトなターゲットかどうかについて検証していく必要がある。1) に記載したように、筋成長過程および筋再生過程では「Lbx1 がサテライト細胞の増殖を正に制御していることが明らかになっている。サテライト細胞の増殖や自己再生 (self-renewal) を負に制御している Notch3 と Lbx1 のサテライト細胞における機能的相関については今後の問題として残されている。

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 8 件)

H. Sakurai, Y. Sakaguchi, E. Shoji, T. Nishino, I. Maki, H. Sakai, K. Hanaoka, A. Kakizuka, A. Sehara-Fujisawa: In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 7(10):e47078. 2012. 査読有

A. Tanaka, K. Woltjen, K. Miyake, A. Hotta, M. Ikeya, T. Yamamoto, T. Nishino, E. Shoji, A. Sehara-Fujisawa, Y. Manabe, N. Fujii, K. Hanaoka, T. Era, S. Yamashita, K. Isobe, E. Kimura, H. Sakurai: Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One* 8(4):e61540. 2013. 査読有

H. Sakai, T. Sato, H. Sakurai, T. Yamamoto, K. Hanaoka, D. Montarras, A. Sehara-Fujisawa: Fetal skeletal muscle progenitors have regenerative capacity after intramuscular engraftment in dystrophin deficient mice..*PLoS One*. 8(5):e63016. 査読有

N.Masubuchi, Y. Shidoh, S. Kondo, J Takatoh, K. Hanaoka:Subcellular localization of dystrophin isoforms in cardiomyocytes and phenotypic analysis of dystrophin-deficient mice reveal cardiac myopathy is predominantly caused by a deficiency in full-length dystrophin *Exp Anim* 62(3):211-7, 2013 査読有

Y. Kamijho, Y. Shiozaki, E.Sakurai, K. Hanaoka, D. Watanabe: Multiple renal cyst development but not situs abnormalities in transgenic RNAi mice against *Inv::GFP* rescue gene. *PLoS One*, 9(2):e89652. 2014 査読有

Y. Fukawatase, M.Toyoda, K. Okamura, K. Nakamura, K. Nakabayashi, S. Takada, M.Yamazaki-Inoue, A. Masuda, M. Nasu, K. Hata, K. Hanaoka, A.Higuchi, K. Takubo, A. Umezawa : Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep* 27, 4:5421. 2014 査読有

K. Uchiyama, D. Watanabe, M.Hayasaka, K. Hanaoka : A novel imprinted transgene located near a repetitive element that exhibits allelic imbalance in DNA methylation during early development. *Dev. Growth Differ.* 56 (9), 653-68, 2014 査読有

A. Yamamoto, K. Uchiyama, T. Nara, N.Nishimura, M. Hayasaka, K. Hanaoka, T. Yamamoto: Structural abnormalities of corpus callosum and cortical axonal tracts accompanied by decreased anxiety-like behavior and lowered sociability in *spock3*-mutant mice. *Dev. Neurosci.* 36(5) 381-95 , 2014 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

秋丸響子、松下祥子、渡部秀一、花岡和則
(2013) 筋成長過程における Lbx1 ノックアウトマウスの表現型解析第 36 回日本分子生物学会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花岡和則 (HANAOKA KAZUNORI)
北里大学・理学部・名誉教授
研究者番号 : 01895770

北本武郎 (KITAMOTO Takero)
北里大学・理学部・助教
研究者番号 : 20453516