

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292185

研究課題名(和文) 骨格筋内脂肪蓄積機序の解明とその病態生理学的意義に関する研究

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of fat accumulation in skeletal muscle and its pathophysiological significance.

研究代表者

山内 啓太郎 (Yamanouchi, Keitaro)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70272440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢による筋萎縮(骨格筋減弱症)や筋再生が正常に進行しない筋ジストロフィーなどの筋疾患では、骨格筋内に通常みられない脂肪細胞が出現する。この脂肪細胞は生体恒常性の維持を担う骨格筋機能に大きな影響を与えることから、本研究ではその出現機序や病態生理学的意義を明らかにすることを目指した。その結果、骨格筋内脂肪細胞の起源とされる間葉系前駆細胞の分化制御を担う新規分子としてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン4を同定することができた。また、ヒトの病態を極めて忠実に再現し、骨格筋内に脂肪蓄積を生じる新規筋ジストロフィーモデルラットの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In some pathologies such as sarcopenia and muscular dystrophy, fat accumulation (appearance of adipocytes) is seen in skeletal muscle. The accumulated adipocytes are considered to affect skeletal muscle function. The present study was undertaken to elucidate the mechanism of fat accumulation and its pathophysiological significance. We have identified chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) as a molecule involved in adipogenic and fibrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. In addition, we have succeeded in generating lines of novel muscular dystrophy model rats by genome editing.

研究分野：獣医生理学

キーワード：骨格筋 脂肪細胞 線維芽細胞 間葉系前駆細胞 CSPG4 ジストロフィン 筋分化 脂肪分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋に出現する脂肪細胞は筋分化を抑制する

骨格筋は生体の中でも最大のエネルギー代謝器官であり、その機能低下は生体恒常性の維持に重大な影響を及ぼす。加齢による筋萎縮(骨格筋減弱症)や筋再生が正常に進行しない筋ジストロフィーなどの筋疾患では、骨格筋内に通常みられない脂肪細胞が出現することが知られている。我々は骨格筋内に出現する脂肪細胞が筋細胞の分化に対して負に作用することを初めて示した[竹ヶ原ら第154回日本獣医学会で発表]。さらに、この脂肪細胞の存在がインスリン抵抗性など骨格筋の代謝機能低下を招く可能性も示されている。従って、骨格筋内に出現する脂肪細胞の起源やその動態および分化制御機構ならびに筋細胞への影響を明らかにすることは、骨格筋の運動機能・代謝機能を通じた生体恒常性の維持という観点から極めて重要である。

(2) 骨格筋脂肪前駆細胞のクローン化と特異的モノクローナル抗体の作成

我々はこれまでに、骨格筋には脂肪細胞への分化能をもつ前駆細胞(骨格筋脂肪前駆細胞)が存在することをラット[Yada et al., (2006) J Vet Med Sci]やシバヤギ[Yamanouchi et al., (2007) J Reprod Dev]を用いて明らかにしてきた。また、骨格筋を構成する筋線維の萎縮や変性がそれらの脂肪細胞への分化を誘導する一因となっていることを初めて示した[Yamanouchi et al., (2006) Exp Cell Res; Hosoyama et al., (2009) Differentiation; Yamanouchi et al., (2009) J Reprod Dev]。しかしながら、骨格筋脂肪前駆細胞の存在は培養系で脂肪細胞への分化誘導を行うことで初めて可視化できるものであり、その動態を prospective に観察することは不可能であった。この点を克服するために我々はラット骨格筋脂肪前駆細胞の単離とクローン化を行い[Murakami et al., (2011) Anim Sci J]、さらにそれを抗原とすることで骨格筋脂肪前駆細胞を prospective かつ特異的に同定することが可能なモノクローナル抗体 2 種の作成に成功した[中野ら 第 154 回日本獣医学会で発表]。

(3) 骨格筋脂肪前駆細胞独自の分化制御機構~FGF シグナルによるプライミング効果~

我々が取得した骨格筋脂肪前駆細胞クローン 2G11 細胞は、培養系だけでなく生体へ移植した場合でも脂肪細胞へと分化することが確認されており、骨格筋脂肪前駆細胞の分化制御機構を探る上で極めて有用なツールである。2G11 細胞を用いたこれまでの研究により、骨格筋脂肪前駆細胞が脂肪分化する際にはあらかじめ FGF(線維芽細胞成長因子)シグナルの活性化、すなわち FGF によるプライミングが必要であることを見いだ

している[中野ら 第 114 回日本畜産学会、第 152 回日本獣医学会で発表]。この知見は、骨格筋脂肪前駆細胞が生体の他の部位に存在する脂肪細胞とは異なり、骨格筋内という特殊な細胞外環境(ニッチ)に依存した独自の分化制御機構をもつことを示すものである。実際、生体内に見られる各種脂肪組織と骨格筋内にみられる脂肪組織とは多くの点で性質が異なることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、我々のこれまでの研究成果を基盤とし、骨格筋脂肪前駆細胞の動態解析や分化制御機構の解明を通じて骨格筋内脂肪蓄積という病態成立に至る過程を明らかにし、さらに脂肪細胞が筋分化を抑制する機序を解明することを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 間葉系前駆細胞表面抗原 CSPG4 の同定

2G11 細胞から調整したライセートを 5C12 抗体により免疫沈降し、得られた試料を LC/MS-MS 解析に供した。

(2) 2G11 細胞が間葉系前駆細胞クローンであることの発見

2G11 細胞を TGF- β 存在下で培養したのち、RNA 抽出、cDNA 合成をおこない、Col1a1、Col3a1、CTGF、 α -SMA の発現をリアルタイム PCR により調べた。

(3) CSPG4 の間葉系前駆細胞分化における機能解析

2G11 細胞に CSPG4 の発現を抑制する siRNA を導入し、FGF 依存性の脂肪分化能獲得、TGF- β 依存性の線維芽細胞分化に対する影響をリアルタイム PCR および免疫染色により調べた。

(4) 再生筋における CSPG4 陽性細胞の分布動態

ラット前頸骨筋に塩酸ブピバカイン(BPVC)を注射することで筋損傷とそれに引き続いておこる筋再生を誘導した。BPVC 注射後 14 日目にかけて経時的に採材し、凍結切片を作成、免疫染色により CSPG4 陽性細胞の分布動態を解析した。

(5) 筋芽細胞による脂肪分化抑制機構存在の可能性

ラット骨格筋から調整した骨格筋前駆細胞初代培養に MyoD の発現を抑制する siRNA を導入し、筋分化および脂肪分化をリアルタイム PCR および免疫染色により調べた。

(6) ゲノム編集技術を用いた新規筋ジストロフィーモデルラットの作出と系統化

ラット受精卵にマイクロインジェクションによりジストロフィン遺伝子に対するガ

イド RNA と Cas9 RNA を導入することで、ジストロフィン遺伝子の変異導入をおこなった。得られた産子 (F0) におけるジストロフィン遺伝子変異の状況をシーケンスにより調べ、変異をもつ個体の存在が確認された場合は次世代 (F1) 以降の作出をおこなった。各個体より前脛骨筋やヒラメ筋を採取し、組織学的解析に供した。

4. 研究成果

(1) 間葉系前駆細胞表面抗原 CSPG4 の同定

2G11 細胞を抗原として得られた単クローン抗体 5C12 が認識する分子を LC/MS-MS により同定した。その結果、本抗体が認識する抗原は Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) であることが判明した。

(2) 2G11 細胞が間葉系前駆細胞クローンであることの発見

これまでラット脂肪前駆細胞クローンとして扱ってきた 2G11 細胞では、TGF- β 刺激により Col1a1、Col3a1、CTGF、 α -SMA の発現がいずれも増加し、細胞内にストレスファイバー形成がみられた。これらはいずれも線維芽細胞分化の指標であることから、2G11 細胞は FGF 依存性に脂肪分化能を獲得するだけでなく、線維芽細胞への分化能をも併せもつ間葉系前駆細胞クローンであることが判明した。

(3) CSPG4 の間葉系前駆細胞分化における機能解析

2G11 細胞における CSPG4 の発現を siRNA で抑制した際の脂肪分化および線維芽細胞分化に対する影響を調べた。その結果、CSPG4 は FGF 依存性の脂肪分化能獲得に必要であるものの、脂肪分化そのものには関与しないことがわかった。また、TGF- β 依存性の線維芽細胞分化には関与しないものの、 α -SMA の発現やそれによるストレスファイバー形成過程に必要であることが判明した。

(4) 再生筋における CSPG4 陽性細胞の分布動態

CSPG4 を認識することが判明した単クローン抗体 5C12 を用いてラット再生筋における CSPG4 陽性細胞の分布動態を解析した。その結果、再生 3 日目までに CSPG4 陽性細胞数が一過的に増加し、以後減少することがわかった。また、興味深い結果として、再生 5 日目から 7 日目に形成される多核の筋管細胞膜周囲に CSPG4 が集積する像が観察された。

(5) 筋芽細胞による脂肪分化抑制機構存在の可能性

これまでに骨格筋に出現する脂肪細胞が筋芽細胞の分化・融合を阻害することを明らかにした。一方、筋芽細胞における MyoD の発現を抑制した場合に、共存する脂肪前駆細胞

の自発的な脂肪分化がおこることをみいだした。

(6) ゲノム編集技術を用いた新規筋ジストロフィーモデルラットの作出と系統化

CRISPR/Cas 法を用いてジストロフィン遺伝子に変異をもつラットの作出に成功した。さらに作出された複数のラットから、ジストロフィン遺伝子に out-of-frame (OF) および in-frame (IF) 変異をもつラットを系統化 (OF 系統および IF 系統) することができた。OF 系統はジストロフィンタンパク質を完全に欠損しており、ヒトデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) と非常によく似た症状を呈していた。一方、IF 系統はエクソン 3 から 16 に由来するアミノ酸配列を欠損した不完全長のジストロフィンタンパク質を発現しており、ヒトベッカー型筋ジストロフィー (BMD) と似た mild な症状を呈していた。いずれの系統も病態の進行に伴い、骨格筋内における線維化や脂肪細胞の出現がみられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Takeuchi S, Nakano S, Nakamura K, Ozoe A, Chien P, Yoshihara H, Hakuno F, Matsuwaki T, Saeki Y, Takahashi S, Yamanouchi K, Nishihara M. Roles of chondroitin sulfate proteoglycan 4 in fibrogenic/adipogenic differentiation in skeletal muscle tissues. *Exp Cell Res* 347: 367-377 (2016)
- ② Nakano SI, Nakamura K, Teramoto N, Yamanouchi K, Nishihara M. Basic fibroblast growth factor is pro-adipogenic in rat skeletal muscle progenitor clone, 2G11 cells. *Anim Sci J* 87: 99-108 (2016)
- ③ 中村克行、山内啓太郎、西原真杉 老化とサルコペニアの分子メカニズム ~ 骨格筋ニッチ構成因子 SPARC による筋分化および脂肪分化調節作用とその加齢性変化 ~ *CLINICAL CALCIUM* 24: 1471-1478 (2014)
- ④ Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci Rep* 4: 5635 (2014)
- ⑤ Takegahara Y, Yamanouchi K, Nakamura K, Nakano SI, Nishihara M. Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner. *Exp Cell Res* 324: 105-114 (2014)

- ⑥Nakamura K, Yamanouchi K, Nishihara M.
Secreted protein acidic and rich in cysteine internalization and its age-related alterations in skeletal muscle progenitor cells. *Aging Cell* 13: 175-184 (2014)
- ⑦山内啓太郎、竹ヶ原優希、中村克行、西原真杉
骨格筋に出現する脂肪細胞の起源とその蓄積機序 *食肉の科学* 54: 155-158 (2013)
- ⑧中村克行、山内啓太郎、西原真杉
サルコペニアにおける非構造的細胞外マトリクスタンパク質 SPARC の役割 *生体の科学* 64: 132-138 (2013)
- ⑨Yamanouchi K, Nakamura K, Takegahara Y, Nakano S, Nishihara M.
Ex vivo bupivacaine treatment results in increased adipogenesis of skeletal muscle cells in the rat. *Anim Sci J* 84: 757-763 (2013)
- ⑩Nakamura K, Nakano SI, Miyoshi T, Yamanouchi K, Nishihara M.
Loss of SPARC in mouse skeletal muscle causes myofiber atrophy. *Muscle Nerve* 48: 791-799 (2013)
- [学会発表] (計 30 件)
- ①Yamanouchi K
A novel rat model of muscular dystrophy and newly identified functional molecule in mesenchymal progenitor cells. The 8th Joint Symposium of Veterinary research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia, 2017, February 20, Taichung, Taiwan (招待講演)
- ②山内啓太郎
再生器官としての筋肉とその疾患 日本チャールズリバー株式会社 教育講演 2016年9月9日 つくば (招待講演)
- ③山内啓太郎
哺乳類骨格筋の発達と再生に関する研究 第159回日本獣医学会 学会賞記念講演 2016年9月7日 藤沢 (招待講演)
- ④杉原英俊、寺本奈保美、中村克行、志賀崇徳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
ジストロフィン遺伝子変異ラットの骨格筋病変に対する細胞老化の関与 第159回日本獣医学会 2016年9月6日 藤沢
- ⑤竹内志帆、中野真一、中村克行、尾添淳文、Peggie Chien、吉原英人、伯野史彦、松脇貴志、佐伯泰、高橋伸一郎、山内啓太郎、西原真杉

骨格筋間葉系前駆細胞の分化制御に関わる細胞表面分子の探索とその機能解析 第2回日本筋学会 2016年8月5日 東京

- ⑥山内啓太郎
ラット間葉系前駆細胞クローンの樹立とその性質に関する解析 第2回日本筋学会 骨格筋ステムセルバイオロジー 2016年8月6日 東京 (招待講演)
- ⑦Teramoto N, Sugihara H, Nakamura K, Shiga T, Tanihata J, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M
Pathological evaluation of rats carrying CRISPR/Cas-9-mediated in-frame mutation in dystrophin gene. FASEB summer research conference "Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration", 2016, July 25th, Keystone, CO, USA
- ⑧Takeuchi S, Nakano SI, Nakamura K, Ozoe A, Chien P, Yoshihara H, Hakuno F, Matsuwaki T, Saeki Y, Takahashi SI, Yamanouchi K, Nishihara M
Identification of chondroitin sulfate proteoglycan 4 as a marker for mesenchymal progenitor cells and its possible involvement in adipogenic/fibrogenic differentiation. FASEB summer research conference "Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration", 2016, July 26th, Keystone, CO, USA
- ⑨竹内志帆、山内啓太郎、松脇貴志、西原真杉
骨格筋間葉系前駆細胞の脂肪分化および線維芽細胞分化における CSPG4 の機能解析 第120回 日本畜産学会 2016年3月29日 東京
- ⑩山内啓太郎
ゲノム編集を用いた筋疾患モデルラットの作出とその病態解析 第91回 実験動物コンファレンス 2015年12月12日 東京 (招待講演)
- ⑪寺本奈保美、中村克行、杉原英俊、志賀崇徳、谷端淳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
Dystrophin 遺伝子に in frame 変異をもつラットの表現型解析 第158回 日本獣医学会 2015年9月8日 十和田
- ⑫寺本奈保美、中村克行、杉原英俊、志賀崇徳、谷端淳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
Dystrophin 遺伝子に in-frame 変異をもつラットの表現型の解析 第1回 日本筋学会 2015年8月8日 東京

- ⑬杉原英俊、中村克行、寺本奈保美、志賀崇徳、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
デュシェンヌ型筋ジストロフィーの病態悪化に細胞老化が関与する可能性 第1回 日本筋学会 2015年8月8日 東京
- ⑭近江早苗、山内啓太郎、松脇貴志、西原真杉
SPARC ノックアウトマウスの骨格筋における表現型解析 第119回 日本畜産学会 2015年3月29日 宇都宮
- ⑮竹内志帆、中村克行、中野真一、尾添淳文、吉原英人、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2G11 細胞膜表面抗原の同定と骨格筋における発現動態解析 第119回 日本畜産学会 2015年3月29日 宇都宮
- ⑯中村克行、山内啓太郎
CRISPR/Cas system を用いたジストロフィン遺伝子変異ラットの作製 第8回ラットリソースリサーチ研究会 2015年1月23日 京都 (招待講演)
- ⑰中村克行、山内啓太郎、藤井渉、寺本奈保美、谷端淳、武田伸一、西原真杉
ゲノム編集を用いた筋ジストロフィーモデルラットの作出 筋ジストロフィー合同班会議 2015年1月9日 東京 (招待講演)
- ⑱中村克行、山内啓太郎、藤井渉、寺本奈保美、谷端淳、西原真杉
ゲノム編集を用いた筋ジストロフィーモデルラットの作出 筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発研究班会議 2014年12月3日 東京 (招待講演)
- ⑲山内啓太郎、中村克行、松脇貴志、西原真杉
筋細胞による骨格筋脂肪前駆細胞の分化抑制 第157回 日本獣医学会 2014年9月9日 札幌
- ⑳竹内志帆、中村克行、中野真一、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
脂肪分化能/筋分化能を有する2G11様細胞の筋損傷モデルにおける動態 第157回 日本獣医学会 2014年9月9日 札幌
- ㉑中村克行、藤井渉、坪井誠也、谷端淳、寺本奈保美、竹内志帆、内藤邦彦、山内啓太郎、西原真杉
CRISPR/Cas 法を用いた筋ジストロフィーモデルラットの作出 第157回 日本獣医学会 2014年9月9日 札幌
- ㉒Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Yanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M
Generation of dystrophin mutated rats with a CRISPR/Cas system as a new animal model of muscular dystrophy. FASEB summer research conference "Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells", 2014, July 22nd, Steamboat Springs, CO, USA (Outstanding Poster Award)
- ㉓山内啓太郎
骨格筋における筋細胞と脂肪細胞の相互分化制御機構 日本学術会議シンポジウム「食肉をつくる細胞とその制御機構」-筋肥大と脂肪蓄積のメカニズム解明に向けた新展開- 2014年3月26日 つくば (招待講演)
- ㉔Yamanouchi K
Adipogenesis in Skeletal Muscle. The 13th International Symposium on Developmental Biotechnology, 2013, October 25, Chungju, Korea (招待講演)
- ㉕Yamanouchi K
Cross-regulation of adipogenesis and myogenesis. National Institute of Animal Science, 2013, October 24, Suwon, Korea (招待講演)
- ㉖Yamanouchi K
Cross-regulation of adipogenesis and myogenesis in skeletal muscle. "The Biology of Muscle Growth and Repair", 2013, September 27, Tucson, AZ (招待講演)
- ㉗中村克行、山内啓太郎、西原真杉
加齢に伴う骨格筋前駆細胞の SPARC 反応性低下に対する内在化の関与 第156回 日本獣医学会 2013年9月20日 岐阜)
- ㉘竹ヶ原優希、山内啓太郎、中村克行、西原真杉
骨格筋内脂肪細胞が筋前駆細胞の分化に与える影響 第117回 日本畜産学会 2013年9月9日 新潟
- ㉙中村克行、山内啓太郎、西原真杉
骨格筋における非構造的細胞外マトリクス因子 SPARC の役割 第117回 日本畜産学会 2013年9月9日 新潟
- ㉚中村克行、山内啓太郎、西原真杉
骨格筋前駆細胞におけるニッチ構成タンパク質 SPARC の内在化とその加齢性変化 第36回 日本基礎老化学会 2013年6月6日 大阪

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

〔その他〕

（研究成果の報道）

・東京大学プレスリリース（2014 年 07 月 09 日）「筋ジストロフィーの症状を再現したラットを作製 ―筋ジストロフィー研究に新たなモデル動物―」

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2014/20140710-1.html>

・マイナビニュース（2014 年 7 月 10 日）「東大、筋ジストロフィーの症状を再現したラットの作製に成功」（別紙 1）

<http://news.mynavi.jp/news/2014/07/10/343/>

・時事ドットコム（2014 年 7 月 13 日）「重い筋ジス症状のラット開発＝新治療法研究に期待―東大

・日経産業新聞（2014 年 11 月 28 日）「筋ジスの症状ラットで再現」

（ホームページ）

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 啓太郎 (YAMANOUCHI, Keitaro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：70272440

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし