

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670157

研究課題名(和文)骨格筋損傷修復を制御する新たなシグナル伝達経路

研究課題名(英文) Novel signaling pathway which regulates skeletal muscle regeneration after injury

研究代表者

南 康博(MINAMI, YASUHIRO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70229772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は再生能の高い組織であり、その損傷修復過程においては、骨格筋における組織幹細胞である筋衛星細胞(SCs: satellite cells)が重要な役割を担っている。本研究において、我々は受容体型チロシンキナーゼRor1がSCsに選択的に発現しており、骨格筋損傷に伴い発現・産生される炎症性サイトカインがSCsに作用し、NF- $\kappa$ B経路を活性化することによりRor1の発現が増強されることを見出した。さらに、SCsにおいて発現増強されるRor1がSCsの機能制御において重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The skeletal muscle is a highly regenerative tissue and/or organ, and tissue stem cells of the skeletal muscle, designated as skeletal muscle satellite cells (SCs), play important roles during regeneration of the skeletal muscle after its injury. In this study, we found that the receptor tyrosine kinase Ror1 is expressed selectively in SCs, and that expression of Ror1 is further induced by activation of NF- $\kappa$ B pathway which can be elicited by inflammatory cytokines, induced and secreted by immune cells following injury of the skeletal muscle. In this study, we also show that expression of Ror1, induced in SCs, plays an important role in regulating the behavior and function of SCs during regeneration of the skeletal muscle.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Ror1チロシンキナーゼ 骨格筋損傷修復 筋衛星細胞 炎症性サイトカイン 遺伝子発現制御 細胞増殖 幹細胞性維持

### 1. 研究開始当初の背景

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼである Ror1 および Ror2 は、発生過程において液性因子である Wnt5a の受容体として機能し、平面内細胞極性 (PCP: planar cell polarity) や収斂伸長運動 (CE movements: convergent extension movements) を制御するとともに、例えば大脳皮質の形成においては、組織幹細胞である神経幹前駆細胞の幹細胞性維持や増殖を制御することによって、形態形成や組織・器官構築において重要な役割を担うことが知られていた。一方、成体においては、生理的状況下では Ror1、Ror2 の発現はあまり検出されず (間葉系幹細胞などでは低いレベルで発現が認められる) むしろ炎症 (DSS 誘導性腸炎モデル、片側尿管結紮による腎線維症モデル等) やがんの浸潤・転移などの増悪過程において、これらの発現が増強されることが見出され、Ror1 や Ror2 を介するシグナル伝達の異常と慢性炎症やがんの進展といった病態との関連がクローズアップされていた。

このような研究状況の中、マウス成体の大腸陰窩の損傷修復過程において、組織幹細胞における Ror2 の重要な役割が Science 誌に発表され、我々は損傷修復能 (再生能) が高い組織・器官である骨格筋に着目し、まずマウス骨格筋損傷修復モデル (片側前脛骨筋へのカルディオトキシン (Ctx) 投与による損傷修復モデル) を用いて、その損傷修復過程における Ror1、Ror2 の発現解析を行ったところ、Ctx 投与による骨格筋損傷に伴い、Ror1、Ror2 いずれもが早期に一過的に発現誘導されることを見出した。また、深田博士 (阪大) らが作製した骨格筋における組織幹細胞である筋衛星細胞 (SCs: satellite cells) に対する抗体である SM/C2.6 抗体等を用いてセル・ソーターにより SCs とそれ以外の骨格筋由来細胞を単離し、それらにおける Ror1、Ror2 の発現解析を行ったところ、Ror1 が SCs に選択的に発現していることを見出し、本研究において骨格筋損傷修復における Ror1 の役割、特に SCs におけるその役割を明らかにしようという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究においては、高い損傷修復能 (再生能) を持つ骨格筋に着目し、その損傷修復過程における受容体型チロシンキナーゼ Ror1 の役割について、個体レベル (片側前脛骨筋へのカルディオトキシン (Ctx) 投与による損傷修復モデルを用いた実験) および細胞レベル (筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた実験系) での解析により明らかにすることを目的とする。また、細胞レベルでの解析により、骨格筋損傷に伴う Ror1 遺伝子の発現誘導機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) まずマウスの片側前脛骨筋へのカル

ディオトキシン (Ctx) 投与による骨格筋損傷修復モデルを用いて、Ctx 投与後の各時点における Ror1 および炎症性サイトカイン遺伝子 *Tnf- $\alpha$* 、*Il-1 $\beta$*  の遺伝子発現解析を qRT-PCR 法を用いて行うとともに、Ror1 については免疫プロット法によりタンパク質発現動態を解析した。また、Ctx 投与後の各時点における骨格筋組織より、セル・ソーターを用いて筋衛星細胞 (SCs) とそれ以外の細胞画分 (UCs: unsorted cells) を単離し、それぞれにおける Ror1 の発現解析を行った。また、(後述するように) 骨格筋損傷後、Ror1 の一過的発現誘導に先行して *Tnf- $\alpha$* 、*Il-1 $\beta$*  の一過的発現誘導が観察されるため、Ror1 の発現誘導に免疫担当細胞 (マクロファージ等) により産生される TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  が重要な役割を担うことが考えられた。そこで、Ctx 投与後に TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  に対する中和抗体を投与し、Ror1 の発現誘導に与える影響を解析した。また、SCs 特異的な Ror1 遺伝子欠失マウス (Ror1 cKO マウス) を作製し、上述と同様の Ctx 投与実験を行い、骨格筋損傷修復過程における SCs に発現する Ror1 の機能解析を行った。

(2) 筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて、上記(1)で観察された知見を培養細胞レベルで検証した。まず C2C12 細胞を TNF- $\alpha$  または IL-1 $\beta$  により刺激した際の Ror1 の発現誘導を qRT-PCR 法、免疫プロット法により経時的に解析した。(後述するように) TNF- $\alpha$  または IL-1 $\beta$  により Ror1 の発現が誘導されることを見出されたため、C2C12 細胞を用いて TNF- $\alpha$  または IL-1 $\beta$  による Ror1 の発現誘導機構の解析を行った。具体的には、これらの炎症性サイトカインにより NF- $\kappa$ B が活性化されることが知られているため、NF- $\kappa$ B の関与を NF- $\kappa$ B 阻害剤等を用いて確認した。また、NF- $\kappa$ B が作用する Ror1 遺伝子のプロモーター領域を *luc*-レポーター解析により同定するとともに、NF- $\kappa$ B が直接に Ror1 遺伝子プロモーター領域に直接結合することを ChIP アッセイにより検討した。さらに、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  刺激に伴う C2C12 細胞の増殖を WST-8 アッセイにより測定した。

### 4. 研究成果

(1) 本研究における個体レベルの解析から、カルディオトキシン (Ctx) 投与による骨格筋損傷に伴い、(免疫担当細胞より) 産生される TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  により、骨格筋における Ror1 の発現が一過的に誘導されることを見出された (未発表)。筋衛星細胞 (SCs) をセル・ソーターにより単離したところ (SCs は 'SM/C2.6-陽性; CD31, CD45, Sca-1 陰性' 画分として単離される) SCs における Ror1 の発現の一過的増加および SCs 分画の割合の一過的増加が確認された。また、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  に対する中和抗体を投与することにより、骨格筋損傷による SCs での Ror1 の発現誘導が

阻害された。興味深いことに、中和抗体の投与により、骨格筋における SCs (Pax7 陽性) の増殖が抑制されることが見出された (未発表)。これらの成果から、骨格筋損傷に伴う炎症性サイトカインが SCs に作用することにより、SCs における Ror1 の発現が誘導されること、および発現誘導された Ror1 が SCs の増殖を制御することが示唆された。

(2) 次に、筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて、TNF- $\alpha$  または IL-1 $\beta$  刺激に伴う Ror1 の発現解析を行ったところ、これらの炎症性サイトカイン刺激により Ror1 の発現が誘導されることが示された (未発表)。TNF- $\alpha$  または IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B を活性化することが知られているので、これらの炎症性サイトカインによる Ror1 の発現誘導が NF- $\kappa$ B を介するか否かを NF- $\kappa$ B 阻害剤である BAY-11、PDTC を用いて検討した。その結果、C2C12 細胞を BAY-11、PDTC で処理することにより、炎症性サイトカインによる Ror1 の発現誘導が阻害されることから、Ror1 の発現誘導には NF- $\kappa$ B が関与することが示された (未発表)。また、Ror1 遺伝子プロモーター領域のレポーター解析および ChIP アッセイにより、NF- $\kappa$ B が直接に Ror1 遺伝子のプロモーター領域に結合することを明らかにした (未発表)。

(3) さらに、骨格筋損傷修復過程における SCs の細胞増殖における Ror1 の機能を明らかにするために、SCs 特異的な Ror1 遺伝子欠失マウス (Ror1 cKO マウス) を作製した (通常の Ror1 遺伝子ノックアウトマウスは新生児致死に至るため、骨格筋損傷修復実験には使用できない)。Ror1 cKO マウスの SCs においては、骨格筋損傷に伴う SCs の増殖は見られず、損傷修復が阻害されていることが示唆された (未発表)。C2C12 細胞を炎症性サイトカインで刺激すると C2C12 細胞の増殖が観察されるが、その細胞増殖は、siRNA を用いて Ror1 の発現を抑制することにより阻害されることが見出された (未発表)。これらの知見から、SCs において炎症性サイトカインにより発現誘導される Ror1 は、SCs の細胞増殖を促進することにより、骨格筋損傷修復に寄与することが示唆された。

(4) 超高齢社会を迎えた本邦においては、運動器症候群 (locomotive syndrome) は喫緊の課題である。筋萎縮 (sarcopenia) は骨格筋損傷修復能 (再生能) の低下と密接に関連すると考えられており、本研究により見出された成果は、将来 Ror1 が筋萎縮の治療標的となりうる可能性を示唆するものと期待される。

##### 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 10 件)

1 Diaz-Horta, O., Abad, C., Sennaroglu, L., Foster II, J., DeSmidt, A., Bademci, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Cengiz, F. B., Grati, M., Fitoz, S., Liu, X-Z., Farooq, A., Imtiaz, F., Currall, B. B., Morton, C. C., Nishita, M., Minami, Y., Lu, Z., Walz, K., Tekin, M. ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 査読有、印刷中、2016 (doi: 10.1073/pnas.1522512113).

2 Takiguchi, G., Nishita, M., Kurita, K., Kakeji, Y., Minami, Y. Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis. **Cancer Sci.**, 査読有、107、2016、pp. 290-297 (doi: 10.1111/cas.128711)

3 Sato, A., Kayama, H., Shojima, K., Matsumoto, S., Koyama, H., Minami, Y., Nojima, S., Morii, E., Honda, H., Takeda, K., Kikuchi, A. The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- $\gamma$  in colitis. **Scientific Rep.**, 査読有、5、2015、10536 (doi: 10.1038/srep10536)

4 Endo, M., Nishita, M., Fujii, M., Minami, Y. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, 査読無、314、2015、pp. 117-148 (doi: 10.1016/bs.ircmb)

5 Okamoto, M., Udagawa, N., Yamashita, T., Nakamichi, Y., Uehara, S., Kato, H., Saito, N., Minami, Y., Takahashi, N., Kobayashi, Y. Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during osteogenesis. **Scientific Rep.**, 査読有、4、2014、4493 (doi: 10.1038/srep04493)

6 Doi, R., Endo, M., Yamakoshi, K., Yamanashi, Y., Nishita, M., Fukada, S-I., Minami, Y. Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ $\beta$ -catenin

signal in myogenic cells during differentiation. **Genes Cells**, 査読有、19、2014、pp. 287-296 (doi: 10.1111/gtc.12132)

〔学会発表〕(計9件)

1 紙崎 孝基、土井 亮助、加藤 英、佐事 武、遠藤 光晴、金川 基、戸田 達史、深田 宗一郎、林 真琴、南 康博、TNF $\alpha$ によって誘導された Ror1 は筋芽細胞の増殖を促進する、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.3、神戸国際会議場(兵庫県)

2 紙崎 孝基、南 康博、筋芽細胞における Ror1 の NF- $\kappa$ B を介した発現誘導機構、第 7 回シグナルネットワーク研究会、2015.6.20、OIST(沖縄県)

3 加藤 英、土井 亮助、遠藤 光晴、深田 宗一郎、金川 基、戸田 達史、南 康博、受容体型チロシンキナーゼ Ror1 による骨格筋再生制御、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.27、国際会議場(神奈川県)

〔図書〕(計1件)

1 Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Hayashi, M., Minami, Y., **Springer**, Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies、2015、878 (pp. 593-640)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzoo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 康博(MINAMI, Yasuhiro)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70229772

(2)研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：