

人工的筋幹細胞増幅技術を目指した基盤研究

大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野

深田 宗一郎

研究目的:

加齢に伴い発症する疾患の予防・治療法開発は超高齢化社会の喫緊の課題であり、その実現が望まれている。また、我が国の死亡のリスクファクターの3位(H26年版厚生労働省白書より)は運動不足であり、運動は健康を維持するための健全で効果的な現存する唯一の方法である。この二つの鍵を握る臓器が骨格筋である。加齢に伴う骨格筋量の減少はサルコペニアとして知られており、骨格筋を構成する主たる細胞「筋線維」のサイズが小さくなる事で骨格筋量・力低下を示す。一方で「筋線維」サイズの変化は可逆的であり、運動により筋線維サイズは増大(筋肥大)する。筋肥大時には筋サテライト細胞と呼ばれる骨格筋固有の組織幹細胞が筋線維に核を供給することで、効率的な筋肥大を可能にしている(Fukada and Ito, 2021)。筋サテライト細胞を人工的に増幅させ、筋線維に健康な核を供給することができれば、筋線維の老化予防や、萎縮予防になる事が期待されている。そこで、本申請課題では、申請者がこれまで行ってきた筋サテライト細胞の維持メカニズム研究と運動生理学研究を組み合わせることで、運動依存的に筋サテライト細胞が活性化・増殖する分子メカニズムを明らかにし、人工的に筋サテライト細胞を増幅させ、筋線維の核数増加・若返りを目的とした。

研究方法と結果:

1. 運動刺激とCalcRの発現

申請者はこれまでに、筋サテライト細胞特異的なカルシトニン受容体(CalcR)欠損マウス(CalcR-cKO)を作製し、CalcRが筋サテライト細胞の維持に必要な事を報告した(Yamaguchi et al., 2015)。また、そのリガンドはCollagen Vであり、Protein Kinase A(PKA)によるHippo経路の制御(YAP1の核移行抑制)が筋サテライト細胞の静止期維持メカニズムであることを証明してきた(Baghdadi et al., 2018; Zhang et al., 2019)。更に、CalcR-cKOマウスを自発的な運動負荷環境(回転かご存在環境)で飼育すると、運動負荷の弱い長趾伸筋内の筋サテライト細胞が増殖し、筋線維に核を供給することを見出していた(未発表データ)。この現象はコントロールマウスや野生型マウスではみられない。つまり、筋サテライト細胞におけるCalcRの有無が、運動刺激依存的な筋サテライト細胞の増殖に寄与していることを示唆している。そこで、自発運動モデルおよび代償性筋肥大モデル(ヒトの筋力トレーニングモデル)による運動刺激に対するCalcRの発現を検証した。

C57BL/6マウスに自発運動モデルを4または7日間実施し、運動負荷のかかる筋としてヒラメ筋・足底筋を、運動負荷のかからない筋として長趾伸筋を摘出し、組織学的に筋サテライト細胞におけるCalcRの発現を検討した。その結果、ヒラメ筋・足底筋ではCalcRの発現低下が観察されたのに対して、長趾伸筋の筋サテライト細胞ではCalcRの発現は低下していなかった(図1)。同様に、代償性筋肥大モデルにより足底筋に機械的刺激を誘導後、足底筋を摘出し組織学的に筋サテライト細胞におけるCalcRの発現を検討した。その結果、足底筋内の筋サテライト細胞におけるCalcRの発現も低下していた。つまり、筋サテライト細胞上のCalcRの発現は運動刺激により、その発現が低下し、さらに、運動刺激依存的な筋サテライト細胞の増殖にその発現低下が必要であることが示唆された。

2. 運動依存的因子の同定

申請者の独自の解析により骨格筋の間質細胞が特異的かつ運動負荷依存的に分泌する因子として同定したトロンボスポンジン1 (THBS1)は、ヒトにおいて、運動依存的に骨格筋内で発現が誘導される因子として報告されていた。しかし、THBS1は血管新生抑制作用を持つ事が知られていたが、運動時には逆に血管新生が亢進することから、

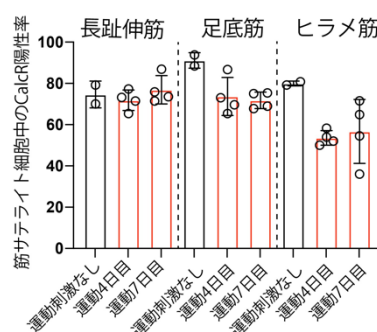


図1: 自発運動がCalcRの発現に与える影響
回転ケージを用いた自発運動により負荷の掛かる骨格筋(ヒラメ筋・足底筋)および運動負荷のかからない骨格筋(長趾伸筋)におけるCalcR発現筋サテライト細胞の割合

その生理的な意義は理解されていなかった。そこで、筋サテライト細胞に与えるTHBS1の影響を、コントロールおよびTHBS1欠損マウスから単離した間葉系前駆細胞の培養上清を用いて検討を行った。その結果、in vitroでの筋サテライト細胞の増殖への作用は、THBS1欠損により有意に減少する事が明らかとなった。THBS1はインテグリン、CD36など複数の受容体と結合することが知られている。そこで、筋サテライト細胞におけるTHBS1の受容体候補の発現を、これまで取得していたRNA-seqデータにより解析した結果、CD47がサテライト細胞におけるTHBS1の受容体候補であった。そこで、THBS1の構造の中で、CD47に結合するC末ペプチド(PKHB1)を用いて、サテライト細胞の増殖に与える影響を検証した結果、PKHB1は濃度依存的にサテライト細胞の増殖を促進する事が明らかとなった。

3. 運動依存的因子の in vivoでの作用

THBS1は運動依存的に発現され、CD47を介して筋サテライト細胞の増殖に機能することから、PKHB1をC57BL/6マウスに投与し、静止期の筋サテライト細胞の増殖を誘導できるかを検討した。しかし、C57BL/6マウスにおいては、PKHB1の投与により筋サテライト細胞の増殖を誘導することはできなかった(図2)。つまり、

THBS1-CD47の経路を活性化するだけでは、運動依存的な筋サテライト細胞の増殖を模倣する事ができないことを意味している。

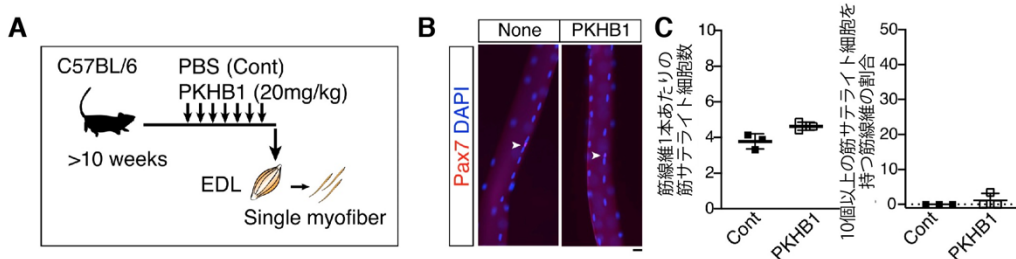


図2: PKHB1がC57BL/6マウスの筋サテライト細胞に与える影響

- A: PKHB1の投与スケジュール
- B: 単離筋線維上の筋サテライト細胞(矢頭)
- C: 筋線維1本あたりの筋サテライト細胞数(左グラフ)および10個以上の筋サテライト細胞をもつ筋線維の割合。

そこで、1.で検討したCalcRの発現に着目し、PKHB1を筋サテライト細胞特異的なCalcR欠損マウスに投与し、1)筋サテライト細胞数、2)筋サテライト細胞由来の筋

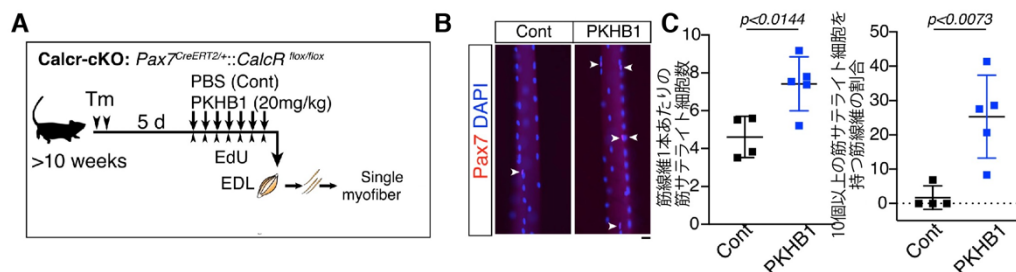


図3: PKHB1が筋サテライト細胞特異的なCalcR欠損マウスの筋サテライト細胞に与える影響

- A: CalcRを欠損させるためのタモキシフェン(Tm)およびPKHB1の投与スケジュール
- B: 単離筋線維上の筋サテライト細胞(矢頭)
- C: 筋線維1本あたりの筋サテライト細胞数(左グラフ)および10個以上の筋サテライト細胞をもつ筋線維の割合。

線維核数を検証した。その結果、PKHB1投与により、筋サテライト細胞数は増加し(図3)、実際に増殖していることをEdU投与による増殖細胞ラベリング法により確認することができた。さらに、通常コントロールマウスやCalcR欠損マウスでは観察することができない、筋サテライト細胞由来の筋線維核が、運動負荷をかけていない定常状態のマウスにおいて観察することができた。以上の結果は、CD47とCalcRのシグナルを制御することで、運動も損傷もない状態で人工的に筋サテライト細胞の増殖を制御できることを示した。

考察:

本研究により、運動刺激に反応する筋サテライト細胞ではCalcRの発現が低下し、運動依存性因子であるTHBS1とCalcRシグナルの抑制が同時におきれば、運動も損傷もない条件下で、人工的に筋サテライト細胞の増殖を誘導できることがあきらかとなった。筋損傷実験を用いた実験により、損傷部位から分泌される因子が損傷させていない骨格筋に到達し、その筋における筋サテライト細胞をG0期(静止期)とG1期間の状態(G_{Alert})にすることが報告されている(Rodgers et al., 2014)。CalcR欠損の筋サテライト細胞はそれだけでは増殖できないが、Ki67な

どいくつかの増殖関連遺伝子の増加を示す。しかし、 G_{Alert} とは異なり、細胞周期への侵入が早いなどの特徴はCalcR欠損筋サテライト細胞にはみられない。さら言えば、 G_{Alert} でCalcRの発現が低下しているなどの知見はえられていない。逆に、長期的なCalcR欠損は筋サテライト細胞に細胞死を誘導し、結果的に筋サテライト細胞数は減少する。以上のことから、CalcR欠損筋サテライト細胞と G_{Alert} は異なる状態であり、運動レスポンス状態であることから、 G_{Ex} (Exercise)と呼ぶことのできるあらたな細胞周期状態にいと考察できる。

今後の展望:

今回CD47とCalcRシグナルと調節することで、人工的に筋サテライト細胞の増殖を誘導出来ることを証明した。様々な遺伝性の筋疾患治療において、遺伝子を効率的に筋サテライト細胞に導入できる技術開発が切望されている。人工的に筋サテライト細胞を一時的に増やす技術開発は、遺伝子治療との併用においても有用なツールになる可能性がある。

一方で、現状として人工的に増加できた筋サテライト細胞の数は、コントロールの2倍程度であり、また筋線維への融合により、増えた筋線維核数は1%程度である。代償性筋肥大モデルでは、1週間で10%程度筋線維核数が増加する。筋線維核はヒトでも筋線維サイズと相関している。また、マッスルメモリーと呼ばれる現象では、筋線維核数が多い方が、筋肥大しやすいことが知られている。より効率的に筋線維核数を増加することができれば、「筋線維核補充療法」による筋肥大や、筋萎縮の予防法開発につながる可能性が期待できる。

今後の一番の課題は、如何にしてCalcRの発現を低下させるかである。そのためには筋サテライト細胞におけるCalcRの発現制御機構を追究する必要がある。別の方法としては、筋サテライト細胞内におけるYAP1の活性化である。申請者は、CalcRの下流でPKAが活性化し、LATS1/2をリン酸化することで、YAPを細胞質に留めていることを明らかにしている (Zhang et al., 2019)。LATS1/2を阻害し、YAP1の核移行を誘導できる化合物などを用いることで、CD47とCalcRシグナルを介した人工的な筋サテライト細胞の増幅に今後挑戦する予定である。最後に、本研究に対する多大な助成に心より感謝いたします。

成果の発表:

Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load.

Kaneshige A, Kaji T, Zhang L, Saito H, Nakamura A, Kurosawa T, Ikemoto-Uezumi M, Tsujikawa K, Seno S, Hori M, Saito Y, Matozaki T, Maehara K, Ohkawa Y, Potente M, Watanabe S, Braun T, Uezumi A, Fukada SI. *Cell Stem Cell*. 2022 Feb 3;29(2):265-280.e6. doi: 10.1016/j.stem.2021.11.003. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34856120

Exercise-dependent circulating factor induce muscle stem cell proliferation

Zhang L, Iwamori K, Nakamura A, Kaji T, Akimoto T, Fukada SI

論文準備中

参考文献:

Baghdadi, M. B., Castel, D., Machado, L., Fukada, S. I., Birk, D. E., Relaix, F., Tajbakhsh, S., and Mourikis, P. (2018). Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature* **557**, 714-718.

Fukada, S. I., and Ito, N. (2021). Regulation of muscle hypertrophy: Involvement of the Akt-independent pathway and satellite cells in muscle hypertrophy. *Exp Cell Res* **409**, 112907.

Rodgers, J. T., King, K. Y., Brett, J. O., Cromie, M. J., Charville, G. W., Maguire, K. K., Brunson, C., Mastey, N., Liu, L., Tsai, C. R., et al. (2014). mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* **510**, 393-396.

Yamaguchi, M., Watanabe, Y., Ohtani, T., Uezumi, A., Mikami, N., Nakamura, M., Sato, T., Ikawa, M., Hoshino, M., Tsuchida, K., et al. (2015). Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell reports* **13**, 302-314.

Zhang, L., Noguchi, Y. T., Nakayama, H., Kaji, T., Tsujikawa, K., Ikemoto-Uezumi, M., Uezumi, A., Okada, Y., Doi, T., Watanabe, S., et al. (2019). The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells. *Cell reports* **29**, 2154-2163 e2155.