

## 骨格筋幹細胞の機能維持に係わる遺伝子の同定

深田宗一郎

## Molecular Regulation of Muscle Stem Cells by ‘Quiescence Genes’

So-ichiro FUKADA

*Department of Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,  
1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan*

(Received May 23, 2011)

Skeletal muscle has great regenerative potential that depends on muscle stem cells, called satellite cells. In uninjured muscle, satellite cells reside beneath the basal lamina and are maintained in quiescent and undifferentiated state. This state is considered a requisite for sustaining the satellite cell pool, but the molecular mechanism is still unknown. In our previous study, we developed a novel monoclonal antibody that specifically recognized muscle satellite cells in skeletal muscle. Using this monoclonal antibody, we purified satellite cells and performed genome-wide transcriptome analysis. In these analyses, we found that satellite cells expressed *Hesr1/Hey1* and *Hesr3/HeyL* genes known as down stream target of Notch signaling. Although each single knock out mice did not indicate obvious phenotype in skeletal muscle, *Hesr1/Hesr3* double knock out mice showed remarkably decreased number of satellite cells. Intriguingly, dKO satellite cells were not kept in quiescent and differentiated state in adult skeletal muscle. This dysregulated state of satellite cells lead to gradually decreased number of satellite cells and age-dependent regeneration defect. These results indicate that *Hesr1/3* is essential for muscle stem cell biology and will facilitate this research field.

**Key words**—muscle stem cell; undifferentiated and quiescent state; notch

骨格筋はわれわれの体重の約半分を占め、日常の行動・動作に必須の組織であるが、わが国の薬学・医学領域において骨格筋を取り扱う研究は非常に稀である。しかし、骨格筋はわれわれの体の中で糖・エネルギー代謝を行う主たる組織であり、糖尿病・メタボリックシンドローム等の疾患の治療標的になり得る。また、すべてのヒトが避けて通ることのできない加齢においても骨格筋は深く係わっている。

加齢によりヒトの骨格筋重量はピーク時と比べて3–4割減少すると言われている。骨格筋重量が低下すれば基礎代謝は低下し、また、日常生活動作に支障を来すようになる。そのため、超高齢化社会が予想されるわが国においても、いかに骨格筋の量・質を維持して、活動可能な体を維持するかは重要な課題である。骨格筋研究は筋ジストロフィーなどの遺

伝性筋疾患の基礎研究を基に発展してきた。しかしながら、なぜ加齢に伴い筋重量が減少するのかについてはほとんど理解されていないため、その解明並びに創薬標的の同定が望まれている。

あまり周知されていないが、骨格筋はわれわれの体の中で最も優れた再生能力をもつ組織の1つである。骨格筋を構成する筋線維は最終分化した成熟細胞であり、筋線維自身が新たな筋線維を作ることではない。それではどこから新しい骨格筋はできてくるのか？ その答えは、筋衛星細胞と呼ばれる骨格筋固有の幹細胞である。筋衛星細胞は1961年にMauro博士が、カエルの骨格筋線維に付随する単核の細胞として発見した。<sup>1)</sup> 驚くことにMauro博士はこの論文の中で、筋衛星細胞が骨格筋再生に必須の細胞であることを予測していた。実際、筋衛星細胞が存在しないと新しく筋線維を作ることができない。<sup>2)</sup> 筋線維が作れないと骨格筋重量・筋力は低下し、日常生活に支障を来す。実際、ヒトの加齢において骨格筋重量が減少する理由の1つに筋衛星細胞の数・質的低下が指摘されている。<sup>3)</sup> そのため

大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

e-mail: fukada@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会近畿支部奨励賞(生物系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

に、骨格筋機能を保持するためにはいかに筋衛星細胞を維持するのが骨格筋の恒常性の維持には必須であると考えられている。しかしながら筋衛星細胞を生体内での性質を維持したまま解析することが困難だったこともあり、どのような分子機構により筋衛星細胞が維持されているかについてはほとんど分かっていない。そこで、私は筋衛星細胞の静止期・未分化性維持機構を明らかにする目的で、筋衛星細胞を骨格筋組織から直接単離可能な抗体の作製を行い報告した。<sup>4)</sup> 具体的には、筋芽細胞株であるC2C12のsubclone C2/4細胞をラットに免疫し、フローサイトメーターによるスクリーニングを行い、骨格筋組織から筋衛星細胞のみを特異的に分取可能な抗体を樹立し、SM/C-2.6と命名した。現在までにこの抗体を用いることで、骨格筋研究にいくつかのブレイクスルーを生み出している。例えば、骨格筋内の脂肪化の原因細胞の同定、ES・iPS細胞からの筋系譜細胞の誘導等が挙げられる。<sup>5,6)</sup> 私はこのモノクローナル抗体を用いて分取した筋衛星細胞の網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、これまで筋衛星細胞での発現が全く報告のない分子を数多く同定することができた。<sup>7)</sup> 現在いくつかの分子に関しても機能解析等を行っているが、その中でNotchシグナルの直接の標的遺伝子として報告されているHesr3に関して注目した。Notchシグナルとは個体の発生時の細胞の運命決定等に必須の分子であり、進化の過程でもよく保存されている。<sup>8)</sup> Hesr3を含むHesr familyとHes familyがNotchシグナルの直接の標的遺伝子として報告されている。<sup>9)</sup> 私は骨格筋内で筋衛星細胞にのみ発現しているHesr3の役割を調べるために、まず初めにHesr3欠損マウスの解析を行った。しかしながらHesr3欠損マウスにおいては、再生能力や筋衛星細胞の数・質の異常は観察されなかった。筋衛星細胞にはHesr family遺伝子の中でHesr1も発現していたが、Hesr3のように特異性はなく、Hesr1は毛細血管にも発現していた。また、Hesr3欠損マウス同様、Hesr1に関しても筋再生能力を検討したが異常は認められなかった。Hesr family分子はお互いに機能を補完することが心臓・血管の発生で報告されている。<sup>10)</sup> そこで、Hesr1とHesr3が同時に筋衛星細胞に発現していることから、Hesr1/3をとともに欠損した二重欠損マウスを作製・解析を行った。その結果、Hesr1や

Hesr3単独欠損マウスでは観察されなかった、筋重量減少・筋再生異常が観察できた。前述の通り、筋線維を作るのは筋衛星細胞が主であるため、次に二重欠損マウスでの筋衛星細胞数を調べた。非常に驚くことに、二重欠損マウスでは筋衛星細胞数がコントロールマウスの約2割にまで減少していることも明らかとなった (Fig. 1)。このような筋衛星細胞数の異常はHesr1、Hesr3の単独欠損マウスでは認められないので、Hesr1/3が補完的に働くことで筋衛星細胞数を制御していると考えられた。ではなぜ、二重欠損マウスでは筋衛星細胞数が減少するのか？筋衛星細胞が減少するメカニズムとして3つの可能性が考えられた。1つ目は発生の段階から“筋衛星細胞集団”ができてこない可能性。実際にNotchシグナルの下流で働くRBP-Jの欠損マウスでは胎仔期の段階で筋衛星細胞が完全にいなくなると報告されている。<sup>11)</sup> 2つ目の可能性としてHesr1/3がないことで筋衛星細胞が細胞死を受けている可能性。3つ目が二重欠損マウスの筋衛星細胞は静止期・未分化状態を維持できずに筋線維に分化したという可能性。そこで、まず経時的に二重欠損マウスにおける筋衛星細胞数の検討を行った。その結果、生後7日目の時点ではコントロールの約8割の筋衛星細胞が存在しており、週齢が進むことで筋衛星細胞の数が減少していくことがわかった。次に2つ目の可能性について検討を行ったところ、二重欠損マウスの筋衛星細胞で特に細胞死が進行しているよう

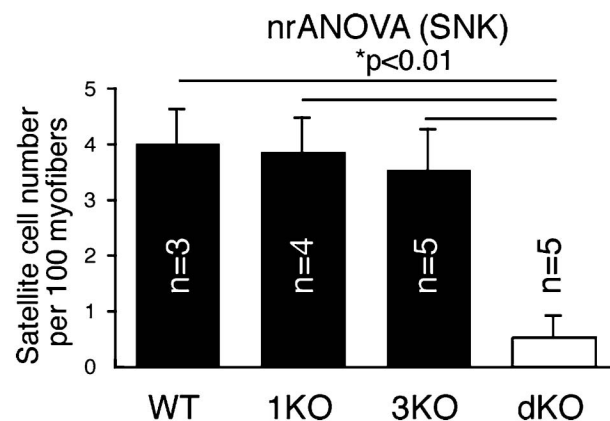


Fig. 1. Decrease of Satellite Cell Number in dKO Mice

Cross section of tibialis anterior muscle was stained with anti-Pax7 (satellite cell marker) and laminin  $\alpha 2$  (basal lamina). Pax7-positive cells beneath the basal lamina were counted. The y axis shows the mean number of satellite cells per 100 myofibers. WT: wild type, 1KO: Hesr1-null, 3KO: Hesr3-null. dKO: Hesr1/Hesr3-null mice.

な像を観察することはできなかった。そこで、最後の可能性についても検討を行った。通常の筋衛星細胞は静止期・未分化状態で維持されているために MyoD や myogenin といった筋分化マーカーはほとんど発現していない。しかしながら、驚いたことに二重欠損マウスの筋衛星細胞ではこれからのマーカーが高頻度に発現していた (Fig. 2)。MyoD は筋決定因子としてよく知られている bHLH 型の転写因子で、線維芽細胞に MyoD を発現させると線維芽細胞が筋系譜の細胞になることから、その発現が筋系譜細胞への運命付けに必須であることが知られている。<sup>12)</sup> 一方、筋衛星細胞は成体の骨格筋においては MyoD タンパクを発現していないが、筋線維が壊れた際に筋衛星細胞が活性化すると MyoD は数時間で検出できるようになる。また、MyoD を欠損したマウスでは、筋衛星細胞由来の筋芽細胞の増殖が顕著に低下するため、うまく再生が進行しないと報告されている。<sup>13)</sup> このように MyoD の発現は筋系列にコミットするためや筋再生に必須であり、逆に言えば、筋衛星細胞の状態において MyoD の発現を抑制する機構は筋衛星細胞を維持する上で必要不可欠なものと考えられる。これまで、*in vitro* の環境下においては MyoD の発現を抑制する分子は数多く報告されている。しかしながら、*in vivo* において生理的に MyoD の発現制御を担っている分子はこれまで報告がない。非常に興味深い結果として、Hesr1/3 の二重欠損マウスでは筋衛星細胞の数が週齢とともに徐々に減少していく。この結果は Hesr1/3 を欠損したことで筋衛星細胞の静止

期・未分化状態が維持できずに、筋衛星細胞数が減少していったと予想された。

今回私は筋衛星細胞の静止期・未分化性に寄与する分子として Hesr1 と Hesr3 を同定することができた。しかしながら、今後、解明すべき問題点もいくつか浮上してきた。1つ目の課題として、筋衛星細胞の維持における Hesr1/3 の役割をはっきりとさせるためには成体時期に特異的に Hesr1/3 を欠損させるコンディショナルな条件での検討が必要であること。2つ目の課題は Notch と Hesr1/3 の関係である。初代培養筋芽細胞を Notch リガンドの1つである DLL-1 で刺激すると、Hesr1 と Hesr3 の発現が特異的に誘導され Hesr2 や Hes1 の発現誘導はほとんど起きない。また、*in vitro* 環境下で筋芽細胞に Notch シグナルを誘導すると MyoD の発現低下や筋分化抑制が観察される。また、Notch シグナルの活性化に必要な  $\gamma$ -secretase を阻害すると Pax7 陽性 MyoD 陰性といった、未分化状態の筋系譜細胞の出現が *in vitro* で抑制される。しかし、成体内において、Hesr1/3 を誘導しているのが本当に Notch であるのか？ その場合リガンドの発現は？ など解明すべき問題が残されている。この点が明らかになれば、筋衛星細胞が発生過程でできる機構を解明できる。3つ目の課題として、Hesr1/3 を介した静止期・未分化性の獲得、特に、MyoD の発現抑制機構についてである。筋芽細胞に Hesr1 を強制発現させると MyoD の発現抑制がみられる。一方 Hesr3 を発現させても、そのような MyoD 発現抑制は観察できない。この結果は *in vivo* の結果と矛盾する。*In vivo* においては MyoD の発現がみられるのは二重欠損マウスにおいてのみであり、Hesr1, Hesr3 の単独欠損ではみられない。つまり、Hesr1 と Hesr3 が補完的に働くことで、単独欠損マウスでは異常がみられないと考えられる。それではなぜ、Hesr3 を筋芽細胞に強制発現した場合には MyoD の発現抑制が起きないのか？ いまのところその機構に関しては明らかではないが、*in vitro* の環境下で Hesr3 が MyoD を抑制するために別のシグナル経路が必要である可能性が考えられる。現在、Hesr3 を介した MyoD 発現抑制機構について詳細な検討を進めている。この機構を明らかにすることで筋衛星細胞がどのようにその未分化性を維持しているかという概要が明らかになると期待される。

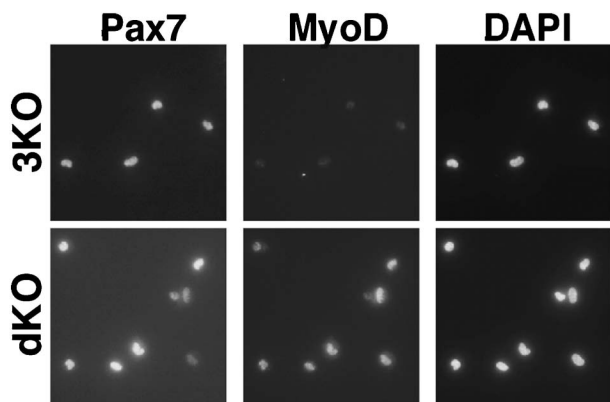


Fig. 2. MyoD Expression in dKO Adult Satellite Cells  
Adult satellite cells were stained with anti-Pax7 (satellite cell marker), anti-MyoD (myogenic marker), and DAPI (nuclei). Most of dKO satellite cells express MyoD.

骨格筋の再生研究は世界中の優れた研究者により、活発に行われているがまだまだ未知の部分が多い。その中で最も重要な課題の1つである、「筋衛星細胞の維持機構や自己複製機構」を明らかにすることで、加齢性筋萎縮や筋ジストロフィーなどの遺伝性筋疾患治療に向けて、新たな治療戦略を提言できると期待されている。私は、今回の成果を基に、筋衛星細胞がどのような分子機構で維持されているかを明らかにし、さらに加齢との関係を明らかにすることでこの研究領域や治療法開発に貢献していきたい。

**謝辞** Hesr1, Hesr3 欠損マウスをご供与下さった国立遺伝学研究所小久保博樹先生, Hesr1, Hesr3 の cDNA をご供与下さった京都大学ウイルス学研究所影山龍一郎先生, 多大なご支援を頂いた国立精神・神経研究所鈴木友子先生, 武田伸一先生, 大阪大学大学院薬学研究科辻川和丈先生, 山元弘先生, 最後に実験をともに行った樋口才飛君, 瀬川将司君, 山口賢彦君, 小川 遼君に感謝致します。

#### REFERENCES

- 1) Mauro A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 493–495 (1961).
- 2) Seale P., Sabourin L. A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M. A., *Cell*, **102**, 777–786 (2000).
- 3) Collins C. A., Zammit P. S., Ruiz A. P., Morgan J. E., Partridge T. A., *Stem Cells*, **25**, 885–894 (2007).
- 4) Fukada S., Higuchi S., Segawa M., Koda K., Yamamoto Y., Tsujikawa K., Kohama Y., Uezumi A., Imamura M., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., Yamamoto H., *Exp. Cell Res.*, **296**, 245–255 (2004).
- 5) Uezumi A., Fukada S., Yamamoto N., Takeda S., Tsuchida K., *Nat. Cell Biol.*, **12**, 143–152 (2010).
- 6) Mizuno Y., Chang H., Umeda K., Niwa A., Iwasa T., Awaya T., Fukada S., Yamamoto H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T., *FASEB J.*, **24**, 2245–2253 (2010).
- 7) Fukada S., Uezumi A., Ikemoto M., Masuda S., Segawa M., Tanimura N., Yamamoto H., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., *Stem Cells*, **25**, 2448–2459 (2007).
- 8) Lai E. C., *Development*, **131**, 965–973 (2004).
- 9) Kokubo H., Lun Y., Johnson R. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 459–465 (1999).
- 10) Kokubo H., Miyagawa-Tomita S., Nakazawa M., Saga Y., Johnson R. L., *Dev. Biol.*, **278**, 301–309 (2005).
- 11) Vasyutina E., Lenhard D. C., Wende H., Erdmann B., Epstein J. A., Birchmeier C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4443–4448 (2007).
- 12) Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B., *Cell*, **51**, 987–1000 (1987).
- 13) Megeney L. A., Kablar B., Garrett K., Anderson J. E., Rudnicki M. A., *Genes Dev.*, **10**, 1173–1183 (1996).