

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告（総合報告）

骨格筋幹細胞の維持制御を基盤とするサルコペニア治療法の開発（20-2）

主任研究者 細山 徹 国立長寿医療研究センター 副部長

研究要旨

サルコペニアの病態生理メカニズムは複雑でありその詳細は不明であるが、近年の報告では加齢に伴う「骨格筋幹細胞の質的・量的な変化」と「サルコペニア」との関連性が指摘されている。これまでに我々は、iPS細胞や株化細胞などを駆使した独自の *in vitro* スクリーニングシステムを用いて、骨格筋幹細胞の維持制御と ERK シグナルとの関連について研究してきた。本課題では、骨格筋幹細胞特異的に *Erk* を欠損させた *Erk^{scKO}* マウスを用いて、骨格筋幹細胞における ERK シグナルの役割を明らかにすることを目的とし、さらにサルコペニアと ERK シグナルとの関連性について検討した。*Erk^{scKO}* マウスでは、骨格筋幹細胞の細胞周期進行の遅れと、幹細胞数の有意な減少が認められた。また筋損傷や筋肥大モデルにおいて、*Erk^{scKO}* マウスにおける再生不良や筋肥大抑制などの表現型を示した。これらの結果は、ERK シグナルが細胞周期制御を介して骨格筋幹細胞の量的な制御を行っているばかりでなく、質的（機能的）な制御も行っている可能性を示している。また *in vitro* 実験系により、老齢マウスで認められた骨格筋幹細胞における ERK 活性の低下を説明し得る新規の分子機構を見出した。本研究で得られた成果は、骨格筋幹細胞維持の分子機構ばかりでなく、加齢に伴う骨格筋幹細胞の質的・量的変化の機構を明らかにする上で重要なものであり、サルコペニアの本態解明に重要な示唆を与える。今後、ERK シグナルを標的とした新しいサルコペニア対処法が開発されると期待される。

主任研究者

細山 徹 国立長寿医療研究センター 副部長

分担研究者

深田 宗一郎 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究期間 2020年4月1日～2021年3月31日

A. 研究目的

加齢に伴う骨格筋減弱症（サルコペニア）の発症や増悪化のメカニズムは明らかではなく、その予防法や治療法の開発は進んでいない。しかし近年、個体老化に伴う骨格筋幹細胞数の減少や機能変化がサルコペニア発症や増悪化の一要因となる可能性が主に実験動物を用いて示されており（Sousa-Victor and Munoz-Canoves. 2016）、骨格筋幹細胞を標的とした予防法・治療法の実験の開発が期待されている。

これまでに主任研究者は、iPS 細胞を応用して独自開発したスクリーニング系（EZ スフィア法）やマウス遺伝学などを用いて「加齢に伴う骨格筋幹細胞の量的・質的变化と ERK 活性低下との関連性の可能性」を示してきた。しかし ERK シグナル経路は、細胞特異性が低く、また癌細胞の増殖促進作用などもあり、癌有病率の高い高齢者で生じるサルコペニアの治療標的とするためには、骨格筋幹細胞により特異性の高い ERK シグナル経路を同定する必要がある。そこで本研究では、ERK を軸とした骨格筋幹細胞維持制御機構の解明と幹細胞特異的 ERK シグナルの同定などを通じて、「骨格筋幹細胞特異的な ERK 経路を標的としたサルコペニア治療法の実験の開発」を目指した研究を行った。なお当初 3 年間の研究計画であったが、期間を短縮し 1 年間のみとなった。

B. 研究方法

(1) *Erk*^{scKO} マウスの作出

Erk1-KO マウス（Page et al., Science. 1999）と *Erk2*-floxed マウス（Satoh et al., J Neurosci. 2007）を Pax7-CreER マウス（Nishijo et al., FASEB J. 2009）と交配し、タモキシフェン投与により骨格筋幹細胞特異的に *Erk* を欠損した *Erk*^{scKO} マウスを得た。5 週齢マウスにタモキシフェンを投与して *Erk1/2* 欠損を誘導し、その 2 週間後に種々の実験に用いた。実験では、single myofiber culture 法（Hosoyama et al., Differentiation. 2009）を主要な手法として用い、細胞に取り込まれた EdU やアセチル化ヒストン H4K27 の検出には蛍光免疫染色を採用した。

Erk^{scKO} マウスに人為的な筋損傷を誘導するために、生理食塩水で溶解したカルジオトキシン溶液をマウス前脛骨筋に投与した。カルジオトキシン投与 2 週間後にマウスを安楽殺し、損傷筋を回収・解析した。回収した損傷筋の筋横断面積を測定し、横断面積による筋線維径分布および横断面積平均値についてコントロールマウスと比較し、筋再生の指標の一つとした。また足底筋の代償性肥大を誘導する為に、腓腹筋の腱を切除するテノトミー術を施した（Fukuda et al., eLife. 2020）。2 週間後に筋重量および筋横断面積を測定した。

(2) 老齢マウス骨格筋幹細胞の解析

26ヶ月齢以上のマウスから、 $\alpha 7$ -Integrin 抗体を用いた磁気ビーズ法を用いて骨格筋幹細胞を単離した (Motohashi et al., J Vis Exp. 2014)。単離した骨格筋幹細胞は 20%FBS を含む DMEM 中で培養・維持し、bFGF 添加実験時には血清を含まない培地に置換する。無血清培地で 1 時間培養した後、bFGF (10ng/ml もしくは 100ng/ml) を含む培地で 24 時間培養し、ウエスタンブロット解析と qPCR 解析により目的のタンパク質および遺伝子の発現について検証した。ウエスタンブロット解析では pERK、ERK に加え Sprouty1 の発現、qPCR 解析では *pax7*、*sprouty1*、*myoD*、*mKi67*、*cyclinD1* などの発現を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の遂行にあたっては、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターにおける遺伝子組換え実験安全規程に則り、遺伝子組換え実験は適切な拡散防止措置が取られた実験室および動物飼育室で行った。また動物実験は、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験規則に則り適切に行った。特に動物実験時の苦痛軽減には十分配慮した。

C. 研究結果

これまでの研究では、iPS 細胞由来骨格筋幹・前駆細胞や株化筋細胞などの実験系を用いて骨格筋幹細胞の維持制御における ERK シグナルの重要性を示してきたが、成体骨格筋幹細胞における ERK シグナルの役割は明らかではない。そこで本研究では、骨格筋幹細胞において *Erk1/2* を欠損したマウス (*Erk^{scKO}* マウス) の表現型解析を行うことで、骨格筋幹細胞の維持制御における ERK シグナルの役割を明らかにしようと考えた。また、骨格筋幹細胞における ERK シグナル制御について、老齢マウスや *in vitro* 実験系を用いて検証した。

(1) *Erk^{scKO}* マウスの表現型解析

Erk 遺伝子を骨格筋幹細胞特異的に欠損させた *Erk^{scKO}* マウスの骨格筋線維上の休止期幹細胞数をコントロールマウスと比較したところ、cKO マウスにおいて休止期幹細胞数がおよそ半分まで減少していた。この結果は、本課題分担研究者が休止期骨格筋幹細胞特異的な表面抗原 SM/C2.6 を用いて行った FACS 解析の結果と同様であり、ERK シグナルが骨格筋幹細胞数を制御していることを強く示唆している。次に、この幹細胞数減少がどのようにして引き起こされたかを明らかにする為に、EdU やアセチル化ヒストン H4K27 を指標とした細胞周期解析を行った。その結果、cKO マウス骨格筋幹細胞では細胞周期進行の遅れが生じていることが明らかとなった。これらの結果は、ERK シグ

ナルが細胞周期制御を介して骨格筋幹細胞の数を調節している可能性を示している。

次に、カルジオトキシン投与による筋損傷・再生モデルとテノトミー処理（腱切除）による筋肥大・萎縮モデルの二つのモデル系を用いて、骨格筋幹細胞における *Erk* 欠損の影響について検討した。カルジオトキシン投与 2 週間後に筋再生能について検証したところ、*Erk^{scKO}* マウスでは著しい筋再生不良が生じ、また、2 週間のテノトミー処理（腓腹筋の腱を切除し、周囲筋である足底筋を肥大筋として解析した）によって引き起こされる筋肥大の抑制が生じていた。筋再生および筋肥大への寄与は骨格筋幹細胞の主要な役割であることから（Fukada, et al., BBA. 2020）、これらの結果は、*Erk* 欠損による骨格筋幹細胞の機能的変化の可能性を示している。

（2）老齢マウス骨格筋幹細胞における ERK 活性

これまでに我々は、老齢マウス骨格筋幹細胞において ERK 活性が低下している可能性を見出しているが、その詳しい機構は不明であった。本研究では、「なぜ老齢マウス骨格筋幹細胞では ERK 活性が低下しているのか」を明らかにする為、*in vitro* 実験系を用いた検討を行った。本研究では、老齢マウスと若齢マウスからそれぞれ単離した骨格筋幹細胞に ERK シグナルの刺激因子の一つである bFGF を添加し、ERK シグナルの反応について検討した。その結果、老齢マウス由来骨格筋幹細胞では bFGF 添加後の ERK 活性化の鈍化が生じていることが明らかとなった。このことは、老齢マウス骨格筋幹細胞における bFGF への応答性の低下を示唆している。次に我々は、老齢マウスにおける ERK シグナル阻害因子の発現を検証したところ、老齢マウス骨格筋幹細胞での *Sprouty1* 発現の亢進を認めた。*Sprouty1* は ERK の上流基質である Raf の活性化を阻害することから、老齢マウス骨格筋幹細胞における「bFGF への応答性の低下」や「ERK 活性の低下」が *Sprouty1* の発現亢進によって引き起こされていることが予想される。

次に、「老齢マウス骨格筋幹細胞での *Sprouty1* の発現亢進が何故生じたのか」を明らかにする目的で、若齢マウス由来骨格筋幹細胞への bFGF 添加実験を行った。本実験では、生理的濃度（10ng/ml）と高濃度（100ng/ml）の異なる濃度の bFGF で骨格筋幹細胞を処理し、それに対する ERK シグナルの応答や *sprouty1* 発現などを検証した。結果として、生理的濃度の bFGF 添加では直ちに ERK シグナルの活性化が生じたのに対して、高濃度 bFGF 添加群では活性化が生じず、また *sprouty1* と *pax7* の発現亢進が認められた。これらの結果は、高濃度 bFGF が ERK シグナルの負のフィードバックを誘導し、骨格筋幹細胞の休止化や減少を導く可能性を示している。

D. 考察と結論

本研究では、成体骨格筋幹細胞における ERK シグナルの役割を明らかにする目的で、タモキシフェン投与により骨格筋幹細胞特異的に *Erk* 欠損を誘導した「*Erk^{scKO}* マ

ウス」を用いた表現型解析を行った。結果として、*Erk* 欠損により骨格筋幹細胞の細胞周期進行が阻害され、幹細胞数がおよそ半分まで減少した。このことは、ERK シグナルが骨格筋幹細胞の数的維持に関与していることを示している。また興味深いことに、実験的に *Erk*^{scKO} マウスに筋損傷や筋肥大を誘導すると、顕著な筋再生不良や筋肥大抑制が生じた。筋再生と筋肥大への寄与は骨格筋幹細胞の主要な役割であることから、幹細胞における *Erk* 欠損が数的減退のみならず質的（機能的）な減退をも誘発する可能性が考えられる。これまでの研究で我々は、老齢マウス骨格筋幹細胞における恒常的な ERK 活性の低下を認めていることから、今回の *Erk*^{scKO} マウスの解析で得られた結果と考え合わせると、加齢に伴う ERK 活性の低下は幹細胞の質的・量的減退を導き、結果としてサルコペニアの発症や増悪化を引き起こすと予想される。ここでの疑問点は、老齢マウス骨格筋幹細胞で何故 ERK 活性が低下するのかであるが、本研究では、老齢マウス骨格筋幹細胞における *Sprouty1* 発現の亢進と、それに伴う bFGF への応答性の低下の可能性を示す結果が得られている。過去には、骨格筋で産生される bFGF が加齢に伴って増加することが報告されており (Chakkalakal et al., Nature. 2012)、老齢マウス骨格筋幹細胞を取り巻く周囲環境（ニッチ）では高濃度の bFGF が存在していると予想される。すなわち、老齢マウス骨格筋幹細胞での ERK 活性の低下は、加齢に伴って幹細胞周囲に蓄積した bFGF によって引き起こされた可能性があり、ヒトを含む老齢動物における骨格筋幹細胞の質的・量的減退の一端を示していると思われる。先に述べたように、加齢に伴う骨格筋幹細胞の質的・量的減退は、サルコペニアに密接に関連していると考えられており、本課題で得られた成果は、サルコペニアの発症や増悪化の一端を解明する上で極めて重要なものである。今後、本機構とサルコペニアとの関連性についてさらに詳細に検討することで、bFGF-ERK シグナル系を軸とした新しいサルコペニア対処法の開発に結び付くと期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2020 年度

- 1) Tohru Hosoyama, Hiroki Iida, Minako Kawai-Takaishi, Ken Watanabe.
Vitamin D inhibits Myogenic Cell Fusion and Expression of Fusogenic Genes.
Nutrients. 12(8): 2192. 2020.

2. 学会発表

2020 年度

- 1) 細山 徹 骨格筋幹細胞の維持制御と老化との関連性 第 19 回日本再生医療学会総会 シンポジウム「加齢や病的変化をもたらす筋幹細胞と幹細胞ニッチの質的・量的変化に注目した筋疾患の新しい再生医療」 2020 年 5 月 18-29 日、オンライン開催 (シンポジスト)
- 2) 細山 徹 骨格筋に対するビタミン D の作用に関する臨床・非臨床解析 第 5 回 NCGG サマリーサーチセミナー 2020 年 8 月 28 日 大府市
- 3) 細山 徹、高石美菜子、飯田浩貴、渡辺 剛、松井康素、渡辺 研 ビタミン D の骨格筋への作用に関する臨床・非臨床データ解析 第 7 回日本サルコペニア・フレイル学会大会 2020 年 12 月 1-15 日 オンライン開催
- 4) 宮川良博、高石美菜子、本田 健、乾 誠、細山 徹 成熟筋線維における PDZRN3 の機能解析 第 6 回日本筋学会学術集会 2020 年 12 月 18-20 日 オンライン開催

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし