

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告

骨格筋の老化機序解明を目的とした筋幹細胞維持機構に関する研究（29-47）

主任研究者 細山 徹 国立長寿医療研究センター 細山 徹（室長）

研究要旨

加齢に伴う骨格筋減弱症であるサルコペニアの本態解明は超高齢社会を迎えた我が国において喫緊の課題であるが、サルコペニアの発症機序や増悪の機構に関する基礎的な情報は少ない。近年行われた複数の基礎研究において、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の一要因となる可能性が示されており、サルコペニアの予防や治療に対する標的として骨格筋幹細胞が注目されている。昨年度から我々は、マウス遺伝学的手法、不死化ヒト筋細胞株、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）、の三つの手法を組み合わせた研究を開始し、謎に包まれた骨格筋幹細胞の維持制御機構の解明とその加齢性変化について検討している。二年目となる本年度は、昨年度までの研究で同定した MAPK 経路関連因子を骨格筋幹細胞特異的に欠損したマウスの作出、ヒト iPS 細胞由来骨格筋幹・前駆細胞（SMPC）を用いた未分化性維持機構の詳細な解析、老齢マウスを用いた解析、等を行い、特に、骨格筋幹細胞の未分化性維持における MAPK 経路の重要性と老齢マウス骨格筋幹細胞における MAPK 活性の低下を明らかにした。次年度には、骨格筋幹細胞特異的な MAPK 関連因子欠損マウスの表現型解析、MAPK 活性の低下とサルコペニアとの関連性に関する老齢マウスを用いた詳細な解析を進め、更に不死化ヒト筋細胞やヒト iPS 細胞由来 SMPC を用いた解析へと落とし込むことで、ヒトへの応用へとつなげていく。

主任研究者

細山 徹 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部（室長）

## A. 研究目的

超高齢社会を迎えた我が国の長寿医療において、サルコペニア等の加齢性筋疾患の治療法や予防法の開発は極めて重要な課題である。しかし、加齢性筋疾患の発症機序は未だ解明されておらず早期解決が望まれている。近年の研究では、個体老化に伴う骨格筋幹細胞の減少や機能低下がサルコペニア等の加齢性筋疾患の一要因となる可能性が示されており、骨格筋幹細胞を標的とした新たな治療戦略の開発が期待されている。しかし、骨格筋幹細胞維持機構の破綻と高齢者における骨格筋幹細胞の減少や筋萎縮との関連性が推察されているにもかかわらず、現在までのところ両者を結びつける明確な証拠はない。それどころか、「骨格筋幹細胞が成体骨格筋内でどのように維持制御されているのか？」というより根本的な疑問が明らかになっていない。言い換えると、骨格筋幹細胞の維持制御機構に関する基礎的理解を深め、個体老化による影響やその関連性を明らかにすることが出来れば、加齢性筋疾患の本態解明や対処法の開発につながると言える。

本研究課題の最終目標は、「骨格筋の老化機序を解明し、加齢性筋疾患に対する新たな予防法・治療法を開発すること」であり、本研究期間においては、マウス遺伝学的手法、iPS細胞およびヒト筋細胞株、等を用いて、「骨格筋幹細胞の維持制御と骨格筋老化との関連性」を明らかにする。具体的には、ヒト iPS 細胞由来骨格筋幹・前駆細胞 (SMPC) を用いて独自に開発した“幹細胞未分化維持モデル”での骨格筋幹細胞維持関連因子の探索、Cre ドライバーによる骨格筋幹細胞特異的遺伝子欠損マウスの作出とその表現型解析、ヒト筋細胞株による検証、等を行い、将来的なヒトへの応用へ向けた研究を目指す。二年目にあたる本年度には、①骨格筋幹細胞の維持と MAPK 経路との関連性に関する検討 (iPS 細胞モデルによる解析)、②骨格筋幹細胞特異的 MAPK 経路関連因子欠損マウスの作出、③老齢マウスを用いた幹細胞維持制御に関する研究、等を行い、次年度以降の足掛かりとすることを目標とする。

## B. 研究方法

### (1) ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 (201B7 株) は理研バイオリソースセンター (理研 BRC) より購入し、マウス胎児線維芽細胞 (MEF: フィーダー細胞) との共培養により未分化性を維持した。この際、10ng/ml の bFGF (リプロセル社) を添加したリプロステム (リプロセル社) を培地として用いた。培地交換を毎日行い、4~5 日の培養期間中に iPS 細胞コロニーが適切な大きさになったところで継代を行った。

### (2) EZ スフィア法によるヒト骨格筋幹・前駆細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞からの骨格筋幹・前駆細胞 (SMPC) の分化誘導には、EZ スフィア法を採用した (Hosoyama *et al.*, Stem Cell Transl Med. 2014)。本法は、iPS 細胞コロニーを

浮遊状態で培養する方法であり、6週間の培養によりおよそ60%の誘導効率でスフィア内にSMPCが誘導される。また昨年度までの検討により、本法により誘導したSMPCスフィアは、分化誘導後2週間はスフィア内に幹細胞集団を安定維持できることが明らかとなった為、骨格筋幹細胞未分化維持モデルとして種々の研究に用いた。

#### (2) ヒト骨格筋幹細胞未分化維持モデルへの低分子化合物の添加

ヒトiPS細胞由来SMPCスフィアへMEKインヒビターやAktインヒビター等の種々の低分子化合物を添加し、1週間培養した。培養終了後、スフィアの凍結切片での免疫組織化学およびウエスタンブロッティングなどにより、骨格筋幹細胞マーカーであるPax7および分化マーカーであるMyoD、Myogeninの発現解析を行った。

#### (3) 骨格筋幹細胞特異的MAPK経路関連遺伝子欠損マウスの作出

骨格筋幹細胞特異的Creドライバーマウス(Pax7CreER : Nishijo, Hosoyama *et al.*, FASEB J. 2009)と東京都健康長寿医療センター(遠藤昌吾先生)から導入したMAPK経路関連遺伝子のfloxedマウスを交配することで、タモキシフェン誘導性に骨格筋幹細胞特異的にMAPK経路関連遺伝子を欠損するマウスを作出した。なお本マウス系統は、2種類のMAPK経路関連遺伝子を同時に欠損させたマウスである。

#### (4) 老齢マウスを用いた解析

国立長寿医療研究センター内のエイジングファームより26~27ヶ月齢の雄マウスを提供して頂き、骨格筋幹細胞におけるMAPK経路関連因子の発現解析等を行った。具体的な方法としては、マウス骨格筋(長趾伸筋)から筋線維を単離し(single myofiber culture法 : Hosoyama *et al.*, Differentiation. 2009)、骨格筋幹細胞におけるMAPK経路関連因子の発現を若齢マウス(4ヶ月齢)と比較しながら経時的に観察した。また、若齢マウスと老齢マウスの骨格筋から磁気ビーズ法(Motohashi *et al.*, J Vis Exp. 2014)を用いて骨格筋幹細胞を単離した後、MAPK活性化候補因子であるbFGF(10ng/ml)を添加し、老齢マウス由来骨格筋幹細胞における反応性について検討した。

#### (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従って行われ、適切な拡散防止措置が取られる。動物実験に際して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従い行う。特に動物実験時の苦痛軽減措置には十分な配慮をもって行った。

## C. 研究結果

### (1) MAPK 関連経路の阻害による骨格筋幹細胞未分化性維持への影響

昨年度同様にヒト iPS 細胞を用いて独自開発した“骨格筋幹細胞未分化維持モデル”を用いて、FGFR インヒビター添加実験等を行った。本検討は、昨年度までに明らかになった骨格筋幹細胞維持における MAPK 経路の関与に関する解析であり、MAPK 経路の上流因子を同定する目的で行った。その結果、FGFR のリン酸化阻害により iPS 細胞由来骨格筋幹細胞においてたしかに MAPK 経路が阻害されたことが確認された。このことは、骨格筋幹細胞における MAPK 経路の上流に FGF-FGFR 経路が関与している可能性を示している。しかし同時に、FGFR のリン酸化阻害によりヒト骨格筋幹細胞でアポトーシスが誘導され、結果的に幹細胞およびその progeny である筋芽細胞数が減少した。一方、幹細胞維持における MAPK 経路以外のシグナル経路の関与を明らかにする目的で、Akt インヒビターを未分化維持モデルに用いたところ、FGFR インヒビターと同様に骨格筋幹細胞の細胞死が亢進し、細胞数の著しい減少が生じた。FGFR シグナリングは MAPK 経路と Akt 経路の両方を活性化することから、先の FGFR インヒビターを用いた検討で観察された骨格筋幹細胞でのアポトーシスの誘導は、Akt 経路が阻害されたことによって引き起こされたと推察される。

### (2) 骨格筋特異的 MAPK 経路関連遺伝子欠損マウスの作出

本年度開始時までには、国外からの骨格筋幹細胞特異的な Cre ドライバーマウス (Pax7CreER マウス) の導入とその維持繁殖が完了し、本年度は実際に本マウス系統を用いて、標的因子を骨格筋特異的に欠損させたマウスの作出に取り組んだ。欠損させる因子には、前年度までの *in vitro* の検討で同定された MAPK 経路関連因子を用いた。2 系統の MAPK 経路関連遺伝子 floxed マウスを Pax7CreER マウスと交配し、3 元交配 (CreER ホモ : floxed ホモ : floxed ホモ) のコンディショナルマウスを作出した。一方、floxed マウスの 2 元交配マウス (floxed ホモ : floxed ホモ) も作出し、3 元交配ホモマウスと 2 元交配ホモマウスとの交配により、ヘテロ : ホモ : ホモマウスを実験時に安定供給できる体制を整えた。次年度に、タモキシフェンを投与した骨格筋幹細胞特異的ノックアウトマウスの表現型解析を進める。

### (3) 老齢マウス由来骨格筋幹細胞における MAPK 経路の活性化

国立長寿医療研究センター内にあるエイジングファームより 26~27 ヶ月齢のマウスを提供してもらい、若齢マウス (4 ヶ月齢) と老齢マウスの骨格筋幹細胞における MAPK 活性を single myofiber culture 条件下で比較検討した。その結果、若齢マウスでは培養開始 20 時間後に約 90% の骨格筋幹細胞において MAPK 活性が上昇していたのに対し、老齢マウスではその割合が有意に減少していた。このことは、老齢マウス由来の骨格筋幹細胞では何らかの理由により MAPK 活性低下が誘導されることを示唆している。一方、老齢マウスから

単離した骨格筋幹細胞に bFGF を添加し MAPK 活性を測定したところ、若齢マウス由来骨格筋幹細胞に比べて明らかな活性低下が認められた。これらの結果は、先の single myofiber culture 実験で認められた老齢マウス由来骨格筋幹細胞での MAPK 活性の低下が bFGF に対する反応性の低下によって引き起こされていることを示唆している。

#### D. 考察と結論

昨年度と本年度の研究結果から、骨格筋幹細胞の未分化維持において MAPK 経路が重要な役割を果たしていることが示された。本年度はさらに、骨格筋幹細胞特異的に MAPK シグナルが阻害されるマウスの作出に取り組み、研究使用時にマウスを安定供給できるコンディショナルマウスの交配スキームを確立した。次年度には実際にコンディショナルノックアウトマウスを用いて、骨格筋幹細胞における MAPK シグナルの重要性について *in vivo* で検討する。さらに本年度は、老齢マウスを用いた検討を行い、老齢マウスに由来する骨格筋幹細胞において MAPK 活性が低下していること、老齢マウス由来の骨格筋幹細胞において MAPK 経路の上流因子と目される bFGF に対する反応性が低下していることなどを明らかにした。これらの結果は、老齢動物における骨格筋幹細胞の維持制御の破綻メカニズムの一端を示す重要な知見と言える。過去の報告では、老齢マウス（20-23 ヶ月齢）の筋線維において bFGF 発現が亢進していることが示されているが（Chakkalakal *et al.*, *Nature*. 2012）、本研究の結果を考え合わせると、この発現亢進が幹細胞における応答性の低下によって引き起こされている可能性が考えられ、bFGF-FGFR-MAPK シグナルと骨格筋幹細胞維持との関連性および加齢に伴う本経路の応答性の変化が今後注目される。

一方、iPS 細胞を用いて独自開発した“ヒト骨格筋幹細胞未分化維持モデル”と低分子化合物を用いた検討により、Akt シグナル経路が骨格筋幹細胞の生存に必須である可能性が示された。こちらの経路は、我々が本課題で目標としている「骨格筋幹細胞の未分化性の維持制御の解明」とは異なるものであるが、幹細胞の生存維持に重要であるという点で興味深い。次年度には、コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析に加えて、骨格筋幹細胞における MAPK 経路や Akt 経路の活性化に寄与する上流因子の同定を不死化ヒト筋細胞株などで検討する予定である。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K.  
Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells.  
**Cell Physiol Biochem.** 47: 201-211. 2018.
- 2) Fujita A, Mikamo A, Hamano K, Hosoyama T.  
Cardiac Stem and Progenitor Cells for Treating Heart Diseases.  
**Reference Module in Biomedical Sciences** (Online book, DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.65514-9), 2018.
- 3) 細山 徹  
老年性筋疾患研究における iPS 細胞の利用とその有用性  
**基礎老化研究** 42 号 3 巻:23-30 頁, 2018 年
- 4) 細山 徹, 深田宗一郎  
誘導型 Cre 発現マウスの利用と選択方法  
**実験医学増刊** (超高齢社会に挑む骨格筋のメディカルサイエンス) 36 号 7 巻:215-219 頁, 2018 年

2. 学会発表

- 1) 細山 徹, 橋本有弘 ERK plays a crucial role in maintaining muscle stem/progenitor cell pool. 第 41 回基礎老化学会大会, 2018 年 6 月 1 日, 東京
- 2) Tohru Hosoyama, Minako Kawai, Naohiro Hashimoto. ERKs maintain muscle stem/progenitor cell pool. FASEB SRC “Skeletal Muscle Satellite Cells and regeneration”, July 10, 2018, Steamboat Springs, CO, USA.
- 3) Tohru Hosoyama. Aging and Muscle. The Chinese Academy of Agricultural Science International Seminar Series, Nov 5, 2018, Beijing, China. (招待発表)
- 4) 細山 徹, 河合美菜子, 橋本有弘 骨格筋幹細胞維持における古典的 MAPK 経路の重要性 第 5 回日本サルコペニア・フレイル学会大会, 2018 年 11 月 11 日, 東京
- 5) 細山 徹, 河合美菜子 Possible applications of muscle specific conditional mouse-derived iPS cells for muscle research. 第 6 回若手による骨格筋細胞研究会, 2018 年 11 月 12 日, 大阪
- 6) 細山 徹 骨格筋幹細胞維持における古典的 MAPK の役割と骨格筋老化との関連性 第 3 回 TMIG-NCGG 合同セミナー, 2018 年 11 月 26 日, 東京
- 7) 細山 徹, 河合美菜子, 橋本有弘 古典的 MAP キナーゼの骨格筋幹・前駆細胞の維持制御への関与 精神・神経疾患研究開発費・平成 30 年度研究班会議 (武田班),

2018年12月3日, 東京 (招待発表)

- 8) 細山 徹 ビタミンが骨格筋内細胞に与える影響 第7回骨格筋生物学研究会, 2019年3月3日, 愛知

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