

138. 老化における筋衛星細胞数の減少メカニズムの解明

林 晋一郎

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 細胞分子医学分野

Key words : 骨格筋, Klf5, 筋衛星細胞, 細胞老化

緒 言

サルコペニアは加齢に伴う退行性の骨格筋量及び質の低下である。サルコペニアでは筋萎縮に加え、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞数の減少が見られるが、そのメカニズムは明らかではない。これまでに著者は、様々な細胞の増殖・分化制御に関わる転写因子 Klf5 が筋衛星細胞の分化においても深く関与し、筋分化・再生過程で転写因子 MyoD と協調して筋特異的な因子の発現を促進することを明らかにした¹⁾。また、Klf5 は筋分化過程で一過性に発現する一方で、その発現を強制的に持続させると細胞老化を引き起こすことを見出した。

骨格筋中の Klf5 の発現は加齢に伴って上昇することが報告されている²⁾。そこで著者は、筋衛星細胞における Klf5 の発現制御異常がサルコペニアにおける筋衛星細胞数の減少の原因となっているのではないかと仮説を立てた。本研究では、加齢に伴う Klf5 の制御異常が筋衛星細胞数の減少を引き起こす分子機構を解明することを試みた。

方法、結果および考察

骨格筋細胞株 C2C12 にレトロウイルスベクターによって Klf5 を強制発現させると、扁平な形態をもつ細胞が出現した (図 1)。

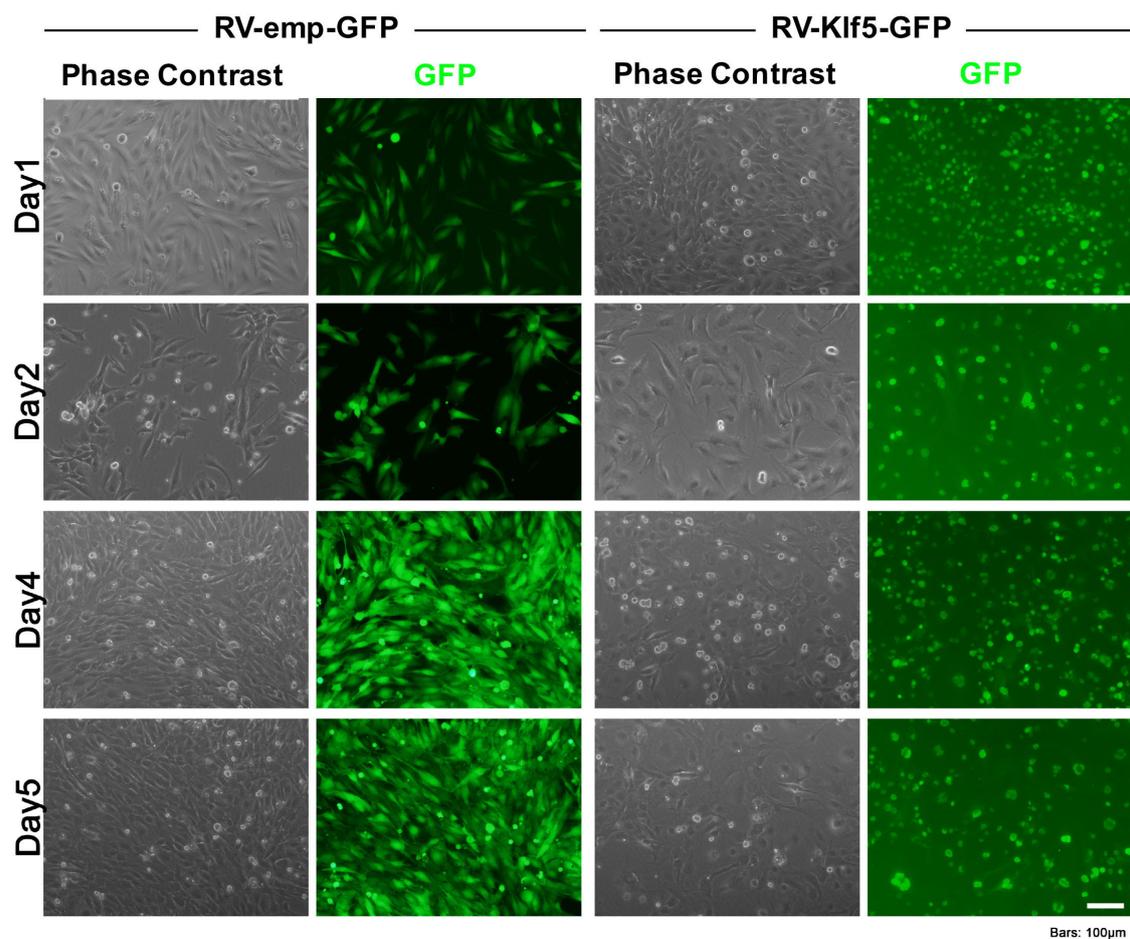


図1. Klf5 を過剰発現した C2C12 細胞

レトロウイルスベクターにより C2C12 に Klf5-GFP を過剰発現させた。感染後 4 日目頃から Klf5 過剰発現細胞 (RV-Klf5-GFP) で扁平な形態を持つ細胞が出現した。コントロール細胞 (RV-emp-GFP) ではそのような細胞は見られなかった。

細胞の巨大化・扁平化は細胞老化の特徴である。そこで、SA-Gal 染色によって細胞老化を検出したところ、Klf5 過剰発現細胞群のみ老化細胞が多数見られた (図 2)。

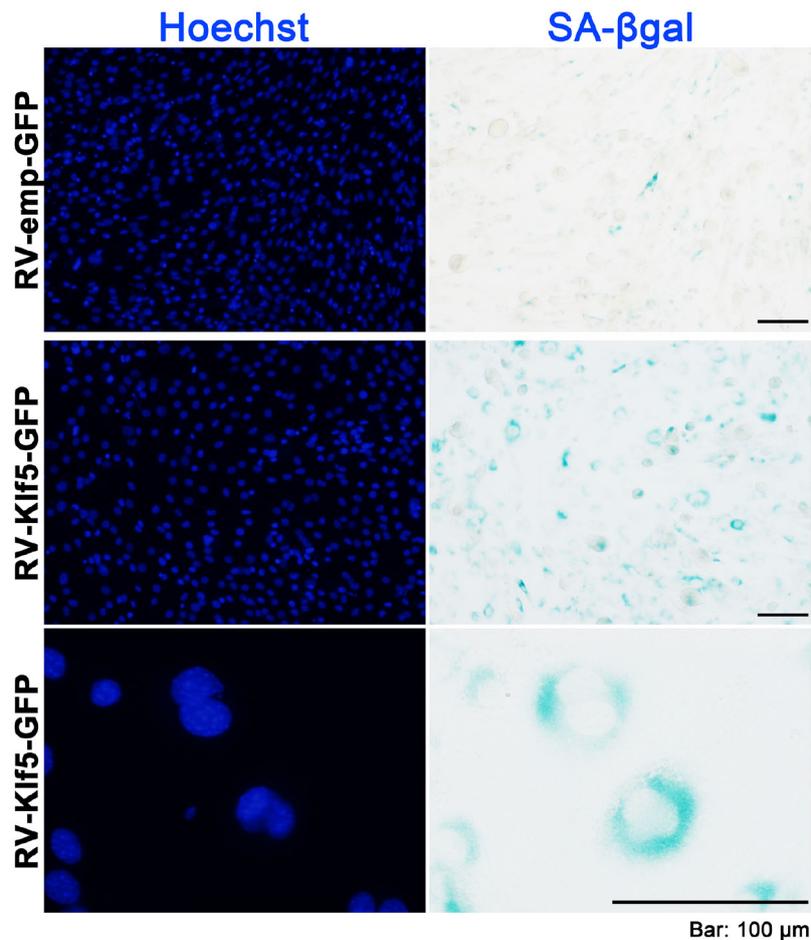


図 2. Klf5 を過剰発現した C2C12 細胞は細胞老化を起こす

Klf5-GFP を過剰発現させた C2C12 細胞およびコントロール細胞を SA-bGal 染色によって解析した。Klf5 過剰発現細胞 (RV-Klf5-GFP) で細胞老化マーカーである SA-bGal 陽性細胞が出現した。

次にこれらの細胞を免疫染色法によって解析した結果、Klf5 過剰発現 C2C12 細胞において、細胞増殖マーカーである Ki67 の発現が減少していることが明らかとなった (図 3)。

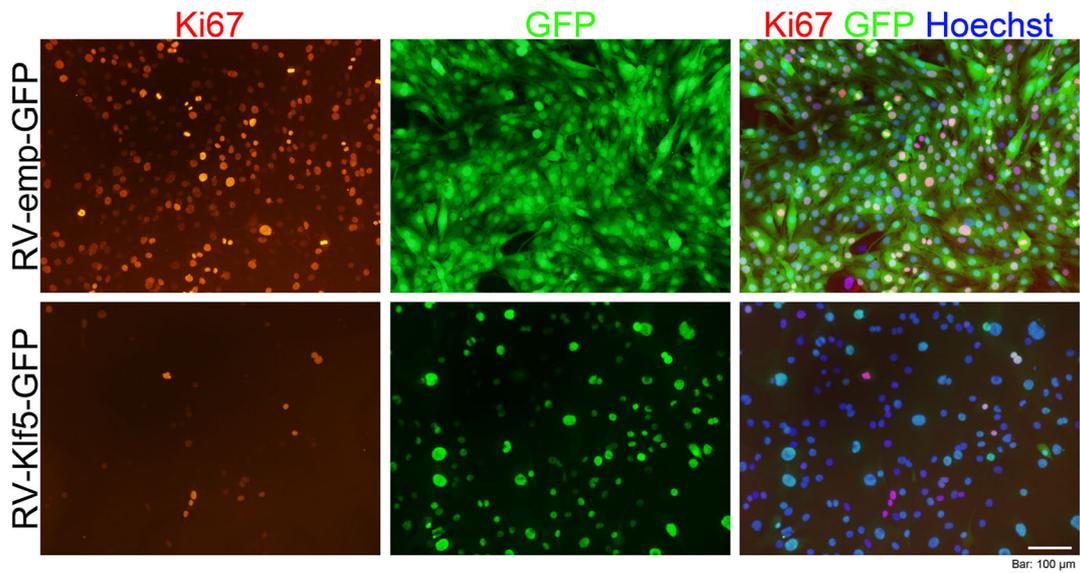


図 3. Klf5 を過剰発現した C2C12 細胞では細胞増殖が停止する
 Klf5-GFP を過剰発現させた C2C12 細胞では細胞増殖を停止し、増殖マーカーである Ki67 陽性細胞数が減少した。

そこで、どの時点で細胞周期が停止しているかをフローサイトメトリーにより解析した。その結果、S 期の細胞が減少し、主に G2/M 期の細胞数が有意に上昇していることが明らかとなった (図 4)。

C2C12 RV-emp-GFP

C2C12 RV-Klf5-GFP

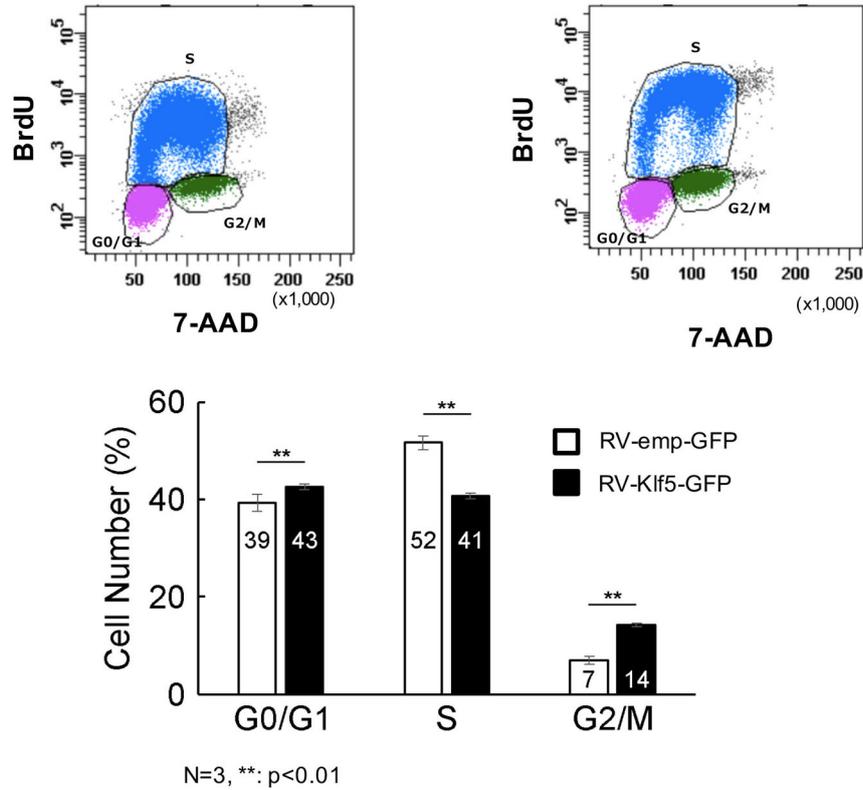


図4. Klf5を過剰発現したC2C12細胞ではG2/M期で細胞増殖が停止する
Klf5-GFPを過剰発現させたC2C12細胞をフローサイトメトリーによって解析した。Klf5過剰発現細胞は主にG2/M期で細胞増殖を停止した。

これらの細胞を、2%ウマ血清を含む分化誘導培地で培養した結果、コントロール細胞では分化した筋細胞の特徴である筋管の形成が見られたが、Klf5過剰発現細胞では筋管の形成が見られなかった。そこで、免疫染色法によって解析した結果、骨格筋細胞マーカーであるMyoDの発現が消失する一方、ストレスファイバーを伴う α -SMA(α -smooth muscle actin)の発現が確認された(図5)。

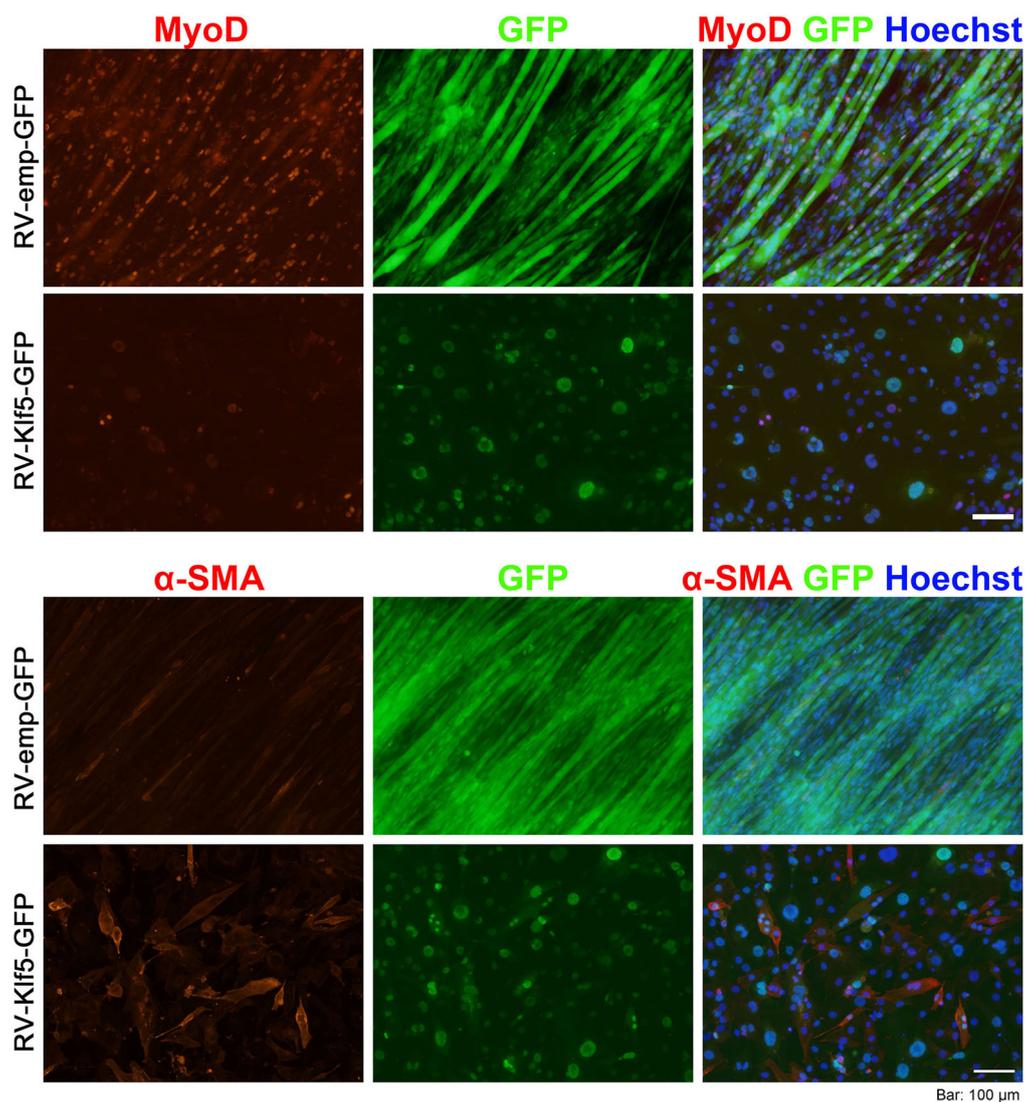


図 5. Klf5 を過剰発現した C2C12 細胞は骨格筋細胞としての特徴を失い、線維芽細胞様の特徴を獲得する

Klf5-GFP を過剰発現させた C2C12 細胞は MyoD の発現が消失し、ストレスファイバー構造を伴う α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) を発現した。

本研究の結果から、Klf5 の発現が骨格筋細胞で上昇すると、細胞周期を停止して細胞老化を起こすこと、あるいは筋細胞としての特徴を失い、線維芽細胞様の特徴を獲得することが明らかとなった。これまでにヒト骨格筋において加齢に伴い Klf5 の発現量は上昇することが報告されている。²⁾ また、マウス筋衛星細胞における Klf5 の発現も発生期から加齢に伴うことが報告されている。³⁾ 本研究の結果、およびこれらの報告から、加齢に伴い筋衛星細胞における Klf5 の発現が上昇した結果、筋衛星細胞の細胞老化、および線維芽細胞様の性質の獲得により筋衛星細胞数が減少すると考えられた。

現在は、トランスクリプトーム解析によって Klf5 による細胞周期停止・細胞老化の亢進メカニズムを解析している。また、*in vivo* においても Klf5 発現の制御異常によって筋衛星細胞の老化が起こるのかを老齢マウスおよび筋衛星細胞特異的 Klf5 欠損マウスを用いて解析する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は東京医科歯科大学難治疾患研究所の大石由美子、千葉大学大学院医学研究員の真鍋一郎である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hayashi S, Manabe I, Suzuki Y, Relaix F, Oishi Y. Klf5 regulates muscle differentiation by directly targeting muscle-specific genes in cooperation with MyoD in mice. *Elife*. 2016;5. pii: e17462. PMID: 27743478, doi: 10.7554/eLife.17462.
- 2) Phillips BE, Williams JP, Gustafsson T, Bouchard C, Rankinen T, Knudsen S, Smith K, Timmons JA, Atherton PJ. Molecular networks of human muscle adaptation to exercise and age. *PLoS Genet*. 2013;9(3): e1003389, PMID: 23555298, doi: 10.1371/annotation/0dd3671e-1460-48fa-9d6a-2865dce78c07.
- 3) Alonso-Martin S, Rochat A, Mademtzoglou D, Morais J, de Reyniès A, Auradé F, Chang TH, Zammit PS, Relaix F. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:58., PMID:27446912
doi: 10.3389/fcell.2016.00058.