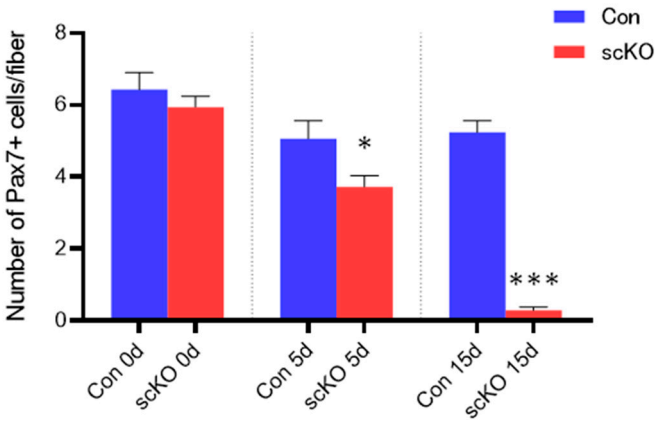
111　骨格筋幹細胞における老化機構の解明	北嶋　康雄

【目的】サルコペニア（加齢に伴う筋萎縮）に伴う運動機能低下が多くの要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。これにより、高齢化に伴う筋萎縮予防は喫緊の課題であり、筋萎縮の分子機構の解明が求められている。生体内の主要なタンパク分解系としては、ユビキチンープロテアソーム系が挙げられ、筋萎縮においても分解系の関わりは多く報告されている。最近、筆者らは、プロテアソーム機能に必須であると考えられる *Rpt3* 遺伝子欠損マウスの解析により、主のタンパク分解系であるプロテアソーム機構は、筋量の維持に必須であることを明らかにした。また、骨格筋幹細胞においては、高齢マウス由来の筋幹細胞では、プロテアソームコンポーネントの遺伝子発現が減少しており、幹細胞においても老化による機能低下が示唆された。そこで、本研究では、骨格筋幹細胞におけるプロテアソームの役割について骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスを用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスは、Rpt3 floxed マウスと $Pax7^{CreERT2/+}$ マウスとの交配により作出した。

【結果】プロテアソームを構成する *Rpt3* 遺伝子の欠損をサテライト細胞でのみ誘導できるマウスを作出した。この Rpt3 を欠損したマウスではプロテアソームによるタンパク分解が抑制され、*Rpt3* 欠損を誘導してから約 2 週間で筋幹細胞プールが減少し、筋再生不良を呈した。さらに、培養細胞を用いて解析した結果、*Rpt3* の欠損により筋幹細胞の増殖および筋分化が抑制され、細胞死が誘導されることが明らかになった。また、この増殖抑制や細胞死の際に、細胞増殖などに関わることが報告されている p53 タンパク質の過剰な活性化が起こっていることを見出した。そこで、p53 遺伝子を人為的に抑制すると、筋幹細胞の増殖抑制が軽減されたことから、プロテアソームによる分解系の抑制により引き起こされる筋幹細胞の機能不全に p53 が関与していることを突き止めた。これまでに、タンパク分解系の不全や p53 は老化との関連も指摘されており、本研究の知見は骨格筋幹細胞とタンパク分解系、さらには老化をつなぐ研究の端緒になり、更なる解析が必要である。

骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全では、筋幹細胞プールが減少する



111. 骨格筋幹細胞における老化機構の解明

北嶋　康雄

*長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科
硬組織疾患基盤研究センター 筋骨格分子生物学研究グループ

Key words：筋幹細胞，骨格筋，再生，タンパク分解，幹細胞プール

緒　言

サルコペニア（加齢に伴う筋萎縮）に伴う運動機能低下が多くの要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。これにより、高齢化に伴う筋萎縮予防は喫緊の課題であり、筋萎縮の分子機構の解明が求められている。生体内の主要なタンパク分解系としては、ユビキチンープロテアソーム系が挙げられ、筋萎縮においても分解系の関わりは多く報告されている。

プロテアソームは真核生物の細胞において細胞質および核内のいずれにも分布しており、ATP を必要とするエネルギー依存性のタンパク質分解である。プロテアソームは 26S プロテアソームとよばれ、66 のサブユニットから構成される巨大な複合体である［1］。26S プロテアソームはプロテアーゼ活性を有する 20S プロテアソームの両端に 19S 調節因子（19S regulatory particle）が会合したものである。19S の基部は Rpt1～6 と Rpn1～2 の 8 つの ATPase サブユニットで構成される。19S プロテアソームの構成分子である Rpt3 の全身欠損では胎生致死になるため［2］、プロテアソーム機構が正常に働くためには Rpt3 は必須の分子と考えられる。

最近、筆者らは、プロテアソーム機能に必須であると考えられる *Rpt3* 遺伝子欠損マウスの解析により、主のタンパク分解系であるプロテアソーム機構は、筋量の維持に必須であることを明らかにした［3］。また、骨格筋幹細胞においては、高齢マウス由来の筋幹細胞では、プロテアソームコンポーネントの遺伝子発現が減少しており、幹細胞においても老化による機能低下が示唆された。そこで、本研究では、骨格筋幹細胞におけるプロテアソームの役割について骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスを用いて明らかにすることを目的とする［4］。

方　法

1.　実験動物

骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム欠損マウスは、Rpt3 floxed マウス［3］と $Pax7^{CreERT2/+}$ マウス［5］との交配により作出した。すべての実験動物は、温度、湿度が通年一定に保たれた、12 時間ごとの照明管理の元で、水分、栄養を十分に与えられて飼育された。本実験は長崎大学遺伝子組み換え実験等安全委員会、動物実験委員会で承認を受け実施した。

2. タモキシフェンによるノックアウトの誘導

タモキシフェン（Sigma）は 20 mg/ml の濃度でコーンオイルに溶解し、1 匹あたり 150 μl を 5 日間連続で腹腔内に投与した。

3. プロテアソーム活性

プロテアソーム活性試薬は、Proteasome-GloTM Assay kit（Promega）を用いた。タンパク質の抽出には、20 mM Tris HCl（pH 7.2）、0.1 mM EDTA、5 mM ATP、1 mM β-mercaptoethanol、20% glycerol and 0.04% Nonidet P40 の抽出液を用い、Varioskan luminometer（Thermo Scientific）により発光強度を測定した。

4. 筋損傷の誘発

カルディオトキシン（Sigma）を 10 μM の濃度で作製し、100 μl を左前脛骨筋に筋注することで筋損傷を誘発した。また、右前脛骨筋はコントロールとした。

*現在の所属：熊本大学 発生医学研究所 筋発生再生分野

結果および考察

1. 遺伝子発現ノックアウト効率とプロテアソーム活性

本研究に用いた Pax7$^{CreERT2/+}$; Rpt3 floxed マウスはタモキシフェン誘導性に *Rpt3* がノックアウトできるモデルである。タモキシフェンを 5 日間連続で腹腔内に投与後、Cre 誘導によりノックアウトモデルを作製した。ノックアウト誘導後に骨格筋幹細胞のみを FACS (fluorescence activated cell sorter) を用いて単離し、*Rpt3* 遺伝子発現を定量 PCR により評価した。ノックアウトマウス（scKO）は、コントロールマウス（Con）と比較して有意な *Rpt3* 遺伝子発現の抑制を示した（図 1A)。さらに scKO マウスでは遺伝子抑制が確認できたため、同様のモデルを用いてプロテアソーム活性の評価を行った。scKO マウスでは、Con マウスに比べてキモトリプシン様およびトリプシン様プロテアソーム活性が有意に抑制されていることを確認した（図 1B)。以上により、骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム欠損マウスモデルは、筋幹細胞特異的に *Rpt3* 遺伝子欠損が起こり、プロテアソーム活性を抑制することを確認した。

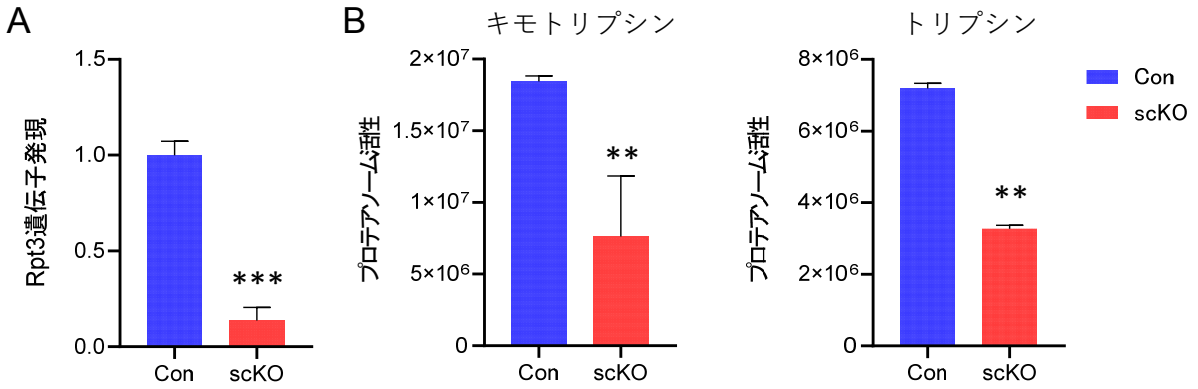


図 1. scKO マウスでは、筋幹細胞特異的に *Rpt3* 遺伝子およびプロテアソーム活性が抑制

A) scKO 由来の筋幹細胞において *Rpt3* 遺伝子が有意に抑制されていた（t test: ***p < 0.001)。

B) scKO 由来の筋幹細胞においてプロテアソーム活性が有意に抑制されていた (t test: **p < 0.01)。

2. 骨格筋幹細胞特異的な *Rpt3* 遺伝子欠損マウスは再生不良を呈する

scKO マウスは、筋幹細胞特異的にプロテアソーム機能不全を起こした。筋再生では筋幹細胞が大きく寄与するため、筋幹細胞への影響を調べるために筋再生実験を行った。タモキシフェンを 5 日間連続で腹腔内に投与し遺伝子欠損を起こし、前脛骨筋にカルディオトキシン（CTX）を筋注することで筋損傷を誘導した。再生過程の筋重量を定量したところ、再生 7、14 日目において scKO マウスでは、Con マウスと比較して有意に筋重量が減少していた。また、体重の影響を除くために、体重あたりの筋重量を定量したところ、上記と同様に再生 7、14 日目において scKO マウスでは、Con マウスと比較して有意に減少していた。scKO マウスでは、筋重量が回復してきていないことが明らかなったため、免疫組織化学染色による筋組織像の観察を行った。再生 14 日目に collagen I による筋横断面の染色を行ったところ、scKO マウスでは collagen I が顕著に染まっていることが確認でき、これらを定量すると scKO マウスにおいて Con マウスと比較して有意に collagen I が増加し、繊維化が進行していることが明らかになった。

3. 骨格筋幹細胞特異的な *Rpt3* 遺伝子欠損マウスにおける骨格筋幹細胞の解析

scKO マウスでは、顕著な筋再生不良を呈した。骨格筋の再生は、筋幹細胞が主に担っているため筋幹細胞の定量解析を行った。タモキシフェンを 5 日間連続で腹腔内に投与し遺伝子欠損を起こし、2 日間の回復期をおいた後に 0、5、15 日後にサンプリングを行った。長趾伸筋を単離しコラゲナーゼ処理を行い、Pax7 抗体を用いて免疫染色後に単一筋線維あたりの Pax7 陽性細胞（筋幹細胞）の数を定量した。タモキシフェン投与 0 日後では Con マウスと scKO マウスで Pax7 陽性の細胞数に差を認めなかったが、5、15 日後では scKO マウスにおいて、Pax7 陽性細胞である筋幹細胞の数が減少していることが分かった（図 2)。以上により、骨格筋幹細胞特異的な *Rpt3* 遺伝子欠損マウスでは、筋幹細胞プールが減少していることが示唆された。

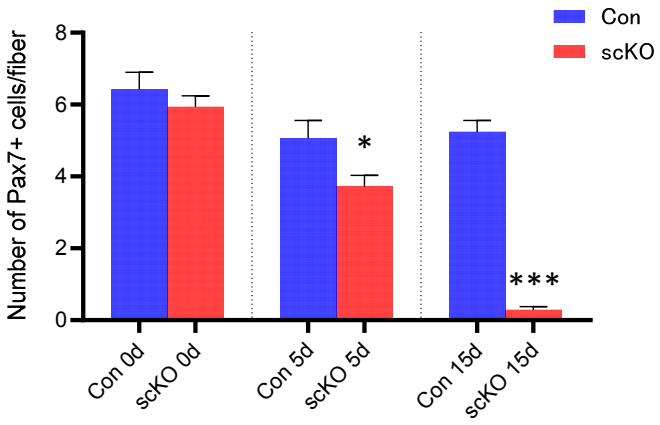


図 2. scKO マウスでは、筋幹細胞プールが減少する

タモキシフェン投与後、長趾伸筋を単離し、0、5、15 日後の Pax7 陽性細胞数を免疫染色により定量した。5、15 日後において、scKO 群では Con 群と比較して、筋幹細胞数が有意に減少していた（t test：*p < 0.05、***p < 0.001；more than 15 myofibers per animal）。

4. 骨格筋幹細胞特異的な *Rpt3* 遺伝子欠損マウスでは p53 経路が活性化

scKO マウスでは、筋幹細胞プールが減少していたため、細胞死および細胞増殖能を調べた。scKO マウスでは、Con マウスと比較して、TUNEL 陽性のアポトーシスを起こしている細胞が有意に増加していた。また、EdU 染色を行うと、scKO マウスは Con マウスと比較して有意に EdU 陽性の増殖細胞が減少していた。

このメカニズムをアンバイアスで調べるために、Con マウスと scKO マウス由来の筋幹細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、プロテアソーム経路および p53 シグナルが scKO マウスにおいて亢進していた。scKO マウスでは、老化遺伝子としても有名な p53 発現が有意に亢進していた。p53 は細胞内の多彩なイベントに関与しており、細胞周期の停止や細胞死の誘導などにも関わることが広く知られている。本研究でも、p53 の経路が活性化し、細胞周期を停止し細胞死を誘導し、その結果、幹細胞プールの減少に至っていると考えた。そこで、scKO マウス由来の筋幹細胞において、*p53* 遺伝子ノックダウンすることで、増殖能抑制がレスキューされるかどうかを検討した。scKO マウス由来の筋幹細胞において *p53* 遺伝子ノックダウンをすると、Con マウス由来の筋幹細胞まで増殖能がレスキューされた。

以上により、骨格筋幹細胞特異的なプロテアソーム機能不全は、筋幹細胞プールの減少および筋再生不良を呈した[4]。幹細胞プールの減少は、アポトーシスによる細胞死と細胞増殖抑制によりもたらされ、そのメカニズムの一端は p53 経路の亢進であることが示唆された。これまでに、タンパク分解系の不全や p53 は老化との関連も指摘されている。本研究の知見は骨格筋幹細胞とタンパク分解系、さらには老化をつなぐ研究の端緒になると考え、さらなる解析が必要である。

謝　辞

本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

1) Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. Cell. 2017;169(5):792-806. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.023. PubMed PMID: 28525752; PubMed Central PMCID: PMCPMC5609836.

2) Sakao Y, Kawai T, Takeuchi O, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Mouse proteasomal ATPases Psmc3 and Psmc4: Genomic organization and gene targeting. Genomics. 2000;67(1):1-7. doi: 10.1006/geno.2000.6231. PubMed PMID: WOS:000088195500001.

3) Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, et al. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. J Cell Sci. 2014;127(Pt 24):5204-17. doi: 10.1242/jcs.150961. PubMed PMID: 25380823; PubMed Central PMCID: PMC4265737.

4) Kitajima Y, Suzuki N, Nunomiya A, Osana S, Yoshioka K, Tashiro Y, et al. The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells. Stem Cell Reports. 2018;11(6):1523-38. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.009. PubMed PMID: 30416048; PubMed Central PMCID: PMCPMC6294073.

5) Lepper C, Conway SJ, Fan CM. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. Nature. 2009;460(7255):627-31. Epub 2009/06/26. doi: nature08209 [pii]10.1038/nature08209. PubMed PMID: 19554048; PubMed Central PMCID: PMC2767162.