

Title	過負荷筋における骨格筋幹細胞の活性化・増殖メカニズム解明
Author(s)	福田, 純明
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76493
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

令和 元年度 博士学位論文

過負荷筋における骨格筋幹細胞の活性化・増殖メカニズム解明

大阪大学大学院 薬学研究科

創成薬学専攻 博士後期課程 3 年 福田 純明

目次

緒論	3
本論	5
第 1 章 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化.....	5
第 1 節 実験材料および方法.....	5
第 2 節 Tenotomy によるサテライト細胞活性化の検討.....	9
第 3 節 単一筋線維法を用いたサテライト細胞活性化プロファイルの確認	10
第 4 節 Tenotomy によるサテライト細胞の増殖および新しい筋核の供給	14
第 5 節 小括.....	15
第 2 章 代償性筋肥大時のサテライト細胞活性化に関する Hey ファミリーの影響.....	16
第 1 節 実験材料および方法.....	16
第 2 節 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞活性化の解剖学的な位置解析	20
第 3 節 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞での mRNA 発現解析.....	20
第 4 節 代償性筋肥大時のサテライト細胞活性化に対する Hey1, HeyL KO の影響	22
第 5 節 筋傷害時における HeyL KO の影響.....	24
第 6 節 代償性筋肥大時における筋核供給に対する HeyL KO の影響.....	25
第 7 節 小括.....	27
第 3 章 代償性筋肥大時の筋重量に対する HeyL の影響	28
第 1 節 実験材料および方法.....	28
第 2 節 SA による代償性筋肥大時の筋重量に対する HeyL-KO の影響	28
第 3 節 小括.....	30
総括	31
結論	34
謝辞	35
参考文献	36

緒論

骨格筋は体重の約 40%を占める最大の器官であり、身体活動の原動力となるのみではなく、全身循環や代謝にも関与することが知られている。骨格筋はその多くが、多核の筋細胞である筋線維で構成されている。筋線維はコラーゲンやラミニンを主成分とする基底膜に包まれており、基底膜外の間隙には血管や免疫細胞、間葉系前駆細胞などが存在することから、骨格筋組織は多様な細胞集団から構成されていることが知られている[1]。骨格筋には筋衛星(幹)細胞(サテライト細胞, MuSC)と呼ばれる組織幹細胞が存在することも古くから知られており、解剖学的には筋線維の細胞膜と基底膜の間に存在する単核の細胞である[2]。サテライト細胞は、他の組織幹細胞と同様に、細胞周期としては G0 期(静止期)にあり、さらに未分化な状態に維持されている。サテライト細胞は、骨格筋が傷害を受けると、速やかに筋分化のマスター遺伝子である MyoD を発現させることで活性化する。その後、細胞周期に入り娘細胞(筋芽細胞)を生成する[3]。多核細胞である筋線維を形成するために、増殖した筋芽細胞は、融合に関連するタンパク質である「myomaker」と「myomixer (myomerger, minion)」の作用により、相互に、または既存の筋線維と融合する[4,5,6,7]。この一連の筋傷害時の筋再生過程におけるサテライト細胞の不可欠な役割と活性化/増殖メカニズムはこれまでに多面的に研究されており、サテライト細胞分化モデルの確立につながっている[8,9,10]。

一方、骨格筋には環境に応じてそのサイズを適応させるもう一つの能力がある。寝たきりをはじめとする廃用、癌悪液質や敗血症といった疾患、あるいは加齢といった様々な要因で筋量の減少(筋萎縮)が誘導される[11]。このように骨格筋量が低下し、筋力もしくは身体機能の低下を示すサルコペニアが 2016 年に ICD-10 に収載され疾患として定義された。サルコペニアは上述のように廃用や疾患を背景とする二次性サルコペニアと加齢を原因とする加齢性サルコペニアに分類されるが、サルコペニアが日常生活活動(ADL)の低下や死亡リスクの増大につながることや、我が国をはじめとする先進国では人口に対する高齢者の割合が増加していることから、加齢性サルコペニアへの注目が集まっている。2017 年に世界に先駆けて日本でサルコペニア診療ガイドラインが公表されたが、現状治療薬は存在せず栄養療法や運動療法が推奨されているもののそのエビデンスレベルは低い。また栄養療法や運動療法には摂取量や実行可能性の面で課題もあることから、筋量や筋力の改善効果を有する治療薬の開発が切望されている。また、骨格筋量はサルコペニアのように減少するのみではなく、レジスタンストレーニングなどによって増加(筋肥大)が引き起こされる。筋肥大に対するサテライト細胞の寄与については議論の渦中にあるが、近年、長期の筋肥大にサテライト細胞が必要という研究が複数報告されている[12,13,14,15]。さらに、サテライト細胞は過負荷による筋肥大過程において、新しい核を筋線維に供給するために不可欠である[12,15,16,17]。サテライト細胞に由来する新しい筋核の筋線維への供給が、融合タンパク質 myomaker 欠損マウスの筋肥大モデルで著しく妨げられたことから、筋傷害時の再生プロセスと同様に、筋肥大時におけるサテライト細胞の筋線維との融合にも myomaker が必要であることが報告されている[15]。通常サテライト細胞は静止期にあるため、この細胞融合の前に、活性化/増殖過程

が必要と考えられるが、筋傷害に伴う再生中のサテライト細胞の挙動と比較して、筋肥大時のサテライト細胞の活性化/増殖メカニズムに関する研究はほとんどない。この理由の一つに、レジスタンストレーニングによる筋肥大時には、骨格筋の損傷が伴っていると考えられていた背景がある[18,19,20]。したがって、これまでの研究では、筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化/増殖に筋傷害時と異なった特別なメカニズムが必要かどうかは検証されていない。

一部の運動(例えば、過度な収縮)は、筋原繊維構造の破壊と筋線維膜(筋細胞膜)の漏出を引き起こす可能性がある[21,22]。しかし、これらは運動の強度、持続時間および頻度に依存し、必ずしも筋線維の致命的/実質的な損傷および細胞死につながるものではない[22]。興味深いことに、DarrとSchultzによって行われた研究では、過度に運動させたラットのヒラメ筋および長指伸筋において、明らかな壊死筋線維が存在しない環境下においてもサテライト細胞が活性化され増殖することが示された[23]。また、筋増強剤として知られているテストステロンによる筋肥大時にも筋線維への損傷を伴うことなく、サテライト細胞が活性化/増殖することも知られている。これらの結果は、筋線維への致命的な損傷の存在が、過負荷筋におけるサテライト細胞の活性化と増殖に必要ではないことを示唆している。筋肥大時のサテライト細胞活性化のメカニズムは、筋傷害時とは異なる可能性があることを考えると、その挙動を解明することは、疾患や加齢といった筋傷害がない筋萎縮を示すサルコペニア患者のサテライト細胞の活性化および融合を介した筋量増加といった新しい治療戦略に寄与する可能性がある。

そこで、本研究では、過負荷筋におけるサテライト細胞の活性化/増殖メカニズムの解明を目的に、第1章では筋肥大モデルにおけるサテライト細胞の活性化/増殖を検討した。第2章以降では過負荷筋サテライト細胞の遺伝子発現解析による活性化/増殖関連因子の探索とその結果関与が示唆されたNotchシグナルのエフェクター分子HeyLの影響について検討した。

本論

第 1 章 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化

筋肥大時のサテライト細胞活性化のメカニズムを検証するにあたり、始めに筋肥大モデルの作製を行った。骨格筋は複数の筋が共働して機能する為、共働筋の一部を停止させると残った筋へ全ての力学的負荷が掛かり、その結果残った筋は過負荷により肥大する(代償性筋肥大)。このようなモデルとして、マウスの腓腹筋およびヒラメ筋につながるアキレス腱を切断して共働筋である足底筋(plantaris muscle)に代償性筋肥大を誘発する Tenotomy, 同様に腓腹筋およびヒラメ筋の外科的除去によって足底筋に代償性筋肥大を誘発する Synergist Ablation (SA) が報告されており、Tenotomy と比較して SA では足底筋重量の顕著な増加をもたらすことが知られている (Fig.1A)。しかし、SA は筋傷害を伴うことが報告されているため[16], 筋傷害に依らないサテライト細胞活性化/増殖のメカニズム解明を目的とする本研究では筋肥大モデルとして Tenotomy を使用した。

本章では、サテライト細胞が代償性筋肥大時に静止期から離脱し活性化/増殖するか検証するとともに、そのプロファイルについて解析し、筋傷害時との違いについても検証した。解析にあたり、サテライト細胞のマーカーとしてはその細胞特異性から汎用される転写因子 Pax7 を、増殖マーカーとしては細胞周期の G0 期以外で発現する Ki67 を、分化マーカーとしては筋分化のマスター遺伝子である MyoD を指標とした。また、その際に使用するサンプルとしては摘出した筋の凍結組織切片のみならず、サテライト細胞の全体像を観察できる単一筋線維法を用いた。

さらに代償性筋肥大時のサテライト細胞が筋線維に融合するかについても検証を実施した。

第 1 節 実験材料および方法

・実験動物

C57BL/6J マウスは Charles River Laboratories (Yokohama, Kanagawa, Japan) より購入し、9-12 週齢で実験に用いた。

・Tenotomy による筋肥大(代償性筋肥大)モデルの作製

骨格筋は複数の筋が共働して機能する為、一部の筋を切除すると残った筋へ全ての負荷が掛かり、その結果残った筋は肥大する。この過程を代償性筋肥大と呼ぶ。本研究では、下肢足底筋への過負荷による筋肥大を誘導する目的で、マウス右後肢足首の皮膚を一部切開し同筋の共働筋である腓腹筋およびヒラメ筋の遠位腱であるアキレス腱をイソフルラン麻酔下にて約 1 mm 切除した後に皮膚を縫合した。また、同マウス左後肢には Sham 処置として皮膚の切開および縫合のみを実施した。

・筋の凍結試料作製

約 3 mm厚に切ったコルク栓に、適量の水で練ったトラガカントゴム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) にて土台を作製し、マウスより摘出した足底筋を垂直に突き立てた後、ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) にて包埋した。それを液体窒素で冷却した 2-メチルブタン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) の中に 1 分間攪拌しながら浸し凍結した。その後、ドライアイス上で 1 時間冷却放置し、2-メチルブタンを気化させることで凍結試料を作製した。

・凍結切片の作製

作製した凍結試料を、クリオスタット (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて筋線維に対して垂直に 6-10 μm の厚さに薄切し、シランコーティングスライド (Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan) に張り付けた。その後 30 分間風乾させ、以降の H.E. 染色もしくは免疫組織化学染色に用いた。

・Hematoxilin and eosin (H.E.) 染色

風乾した薄切切片をマイヤーヘマトキシリン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) に 15 分浸した後、水道水で 2 分間洗浄した。その後、エオジン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) に 2 分間浸し、エタノールによる脱水作業を 4 度実施した後にキシレンで透徹した。透徹後 Mount-Quick (Daido Sangyo Co., Tokyo, Japan) を滴下し、カバーガラスをのせて封入した。サンプルはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE, Osaka, Japan) にて観察・撮影を実施した。

・免疫組織化学染色

風乾した薄切切片の周囲を Dako Pen (Dako Japan, Tokyo, Japan) で囲み、室温条件下にて 4% パラホルムアルデヒド (PFA) /PBS で 10 分間インキュベートし固定した。続いて、0.1% Triton-X (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) /PBS に 5 分間室温下にて浸すことによる洗浄作業を 3 回実施した。その後、M.O.M. kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) および 5% スキムミルク (Moninaga Milk Industry Co., Tokyo, Japan) /PBS を室温条件下にて 1 時間インキュベートすることでブロッキングを実施した後、一次抗体希釈液を滴下し 4°C 条件下にて一晩インキュベートした。

翌日 0.1% Triton-X/PBS に 5 分間室温下による洗浄作業を 3 回実施し二次抗体希釈液を滴下し、遮光室温条件下にて 1 時間インキュベートした。その後、0.1% Triton-X/PBS に 5 分間室温下による洗浄作業を 3 回実施し、Vectorshield with DAPI (Vector Laboratories Inc.) にて核の染色および封入を実施した。サンプルはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) にて観察・撮影を実施した。

本実験で使用した一次抗体および二次抗体はそれぞれ Table 1, Table 2 に示した。

Table 1 Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Dilution
anti-Pax7	Pax7	Mouse IgG1, κ	Unconjugated	DSHB	$\times 2$
anti-MyoD	Polyclonal	Rabbit IgG	Unconjugated	Santa cruz	$\times 200$
anti-Ki67	Polyclonal	Rabbit IgG	Unconjugated	Abcam	$\times 200$
anti-Laminin $\alpha 2$	4H8-2	Rat IgG1	Unconjugated	Enzo life science	$\times 200$

Table 2 Secondary antibodies

Antibodies	Ig type	Conjugate	Supplier	Application &Dilution
anti-mouse IgG	goat	Alexa Fluor 568	Invitrogen	IHC: $\times 500$
anti-rat IgG	chicken	Alexa Fluor 647	Invitrogen	IHC: $\times 500$
anti-rabbit IgG	goat	Alexa Fluor 488	Invitrogen	IHC: $\times 500$

・単一筋線維(Single myofiber:SMF)の調整

マウスより摘出した足底筋を 37°C に加温した 0.5% collagenase type I (Worthington Biochemical Corp.) / Low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG ; Sigma-Aldrich) に浸し、穏やかに 37°C 条件下にて 90 分間振盪した。その後, Horse serum (Sigma-Aldrich) でコート後に DMEM-LG (Sigma-Aldrich) を入れたペトリディッシュ (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Republik Österreich) に筋を移し、ピペッティングすることで SMF を得た。得られた SMF は単離直後に 4% PFA で固定して染色に供した。また、一部の SMF は Growth medium (20% FCS, 2.5 ng/mL Human basic fibroblast growth factors (bFGF ; PeproTech) , penicillin (100 U/mL) - streptomycin (100 μ g/mL) (Gibco BRL) を含む DMEM-HG (Sigma-Aldrich) にて 3 日間培養した後、4 % PFA により固定し染色に供した。

・SMF の免疫組織化学染色

固定した SMF に Permeabilization buffer (20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton-X/PBS) を添加し室温で 30 分間インキュベートした。続いて、PBS による洗浄作業を 3 回実施した。その後、Blocking buffer (5% FCS, 0.01% Triton-X/PBS) へ置換し室温で 1 時間インキュベートすることでブロッキングした後、Blocking buffer で希釈した一次抗体希釈液に置換し、4°C 条件下にて一晩インキュベートした。翌日、PBS による洗浄作業を 3 回実施し、PBS で希釈した二次抗体希釈液に置換し、遮光室温条件下にて 1 時間インキュベートした。PBS による洗浄作業を 3 回実施した後、スライドガラスに移し、Vectorshield with DAPI (Vector Laboratories Inc.) にて核の染色および封入を実施した。サンプルはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) にて観察・撮影を実施した。

本実験で使用した一次抗体および二次抗体はそれぞれ Table 3, Table 4 に示した。

Table 3 Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Dilution
anti-Pax7	Pax7	Mouse IgG1, κ	Unconjugated	DSHB	$\times 2$
anti-MyoD	Polyclonal	Rabbit IgG	Unconjugated	Santa cruz	$\times 200$
anti-Ki67	Polyclonal	Rat IgG2a	Unconjugated	Thermo Fisher Scientific	$\times 200$

Table 4 Secondary antibodies

Antibodies	Ig type	Conjugate	Supplier	Application &Dilution
anti-mouse IgG	goat	Alexa Fluor 568	Invitrogen	IHC: $\times 500$
anti-rat IgG	chicken	Alexa Fluor 647	Invitrogen	IHC: $\times 500$
anti-rabbit IgG	goat	Alexa Fluor 488	Invitrogen	IHC: $\times 500$

- In vivo EdU 投与

EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine ; Thermo Fisher Scientific)を 0.5 mg/mL となるよう PBS に溶解し、10 mL/kg の投与容量で一日一回解剖日まで腹腔内投与した。

- 凍結組織切片の EdU 染色を含む免疫組織化学染色

組織サンプルの作製および薄切切片の作製までは上記の方法に準じた。風乾した薄切切片の周囲を Dako Pen(Dako Japan)で囲み、室温条件下にて 4% PFA /PBS にて 10 分間インキュベートし固定した。続いて、0.1% Triton-X/PBS に 5 分間室温下にて浸すことによる洗浄作業を 2 回実施した。続いて細胞膜を可溶化するために、0.5% Triton-X/PBS にて 20 分間室温にてインキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、Click-iT EdU imaging kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) の添付文書に従い調整した Click-iT reaction cocktail を滴下し、遮光室温条件下にて 30 分間インキュベートした。0.1% Triton-X/PBS に 5 分間遮光室温下による洗浄作業を 3 回実施し、M.O.M. kit および 5% スキムミルク/PBS を遮光室温条件下にて 1 時間インキュベートすることでブロッキングを実施した後、一次抗体希釈液を滴下し遮光 4°C 条件下にて一晩インキュベートした。

翌日 0.1% Triton-X/PBS に 5 分間遮光室温下による洗浄作業を 3 回実施し二次抗体希釈液を滴下し、遮光室温条件下にて 1 時間インキュベートした。その後、0.1% Triton-X/PBS に 5 分間遮光室温下による洗浄作業を 3 回実施し、Vectorshield with DAPI にて核の染色および封入を実施した。サンプルはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 にて観察・撮影を実施した。

本実験で新たに使用した一次抗体を Table 5 に示した。

Table 5 Primary antibody

Antibody	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Dilution
anti-Dystrophin	Polyclonal	Rabbit IgG	Unconjugated	Abcam	×800

・統計解析

2 群間における統計処理としてまず F-test により等分散の検定を実施し、等分散であれば Student's t test, 等分散でなければ Welch's t test を実施した. 有意水準を 5% ($p < 0.05$) もしくは 1% ($p < 0.01$) とした.

第 2 節 Tenotomy によるサテライト細胞活性化の検討

代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化/増殖を検証する目的で, 正常マウスに Tenotomy 処置を行い, 処置 2, 4, 7, 14 日後に足底筋 (plantaris muscle) を摘出した. その結果, 足底筋重量は処置 2 日後以降有意に増加した (Fig.1B). 一方, その際に顕著な筋傷害が認められないことも H.E.染色による組織像から確認された (Fig.1C). また, Tenotomy 処置 7 日後 (Day 7) においてサテライト細胞のマーカである Pax7 陽性細胞の有意な増加が観察された (Fig.1D). 以上の結果より Tenotomy 処置による代償性筋肥大時において, サテライト細胞が静止期から離脱し, 増加することが示唆された.

実際, 細胞増殖マーカである Ki67 が陽性であるサテライト細胞の割合 (Fig.1E) および筋分化マーカである MyoD が陽性であるサテライト細胞の割合 (Fig.1F) の有意な増加が認められた. これらの結果より, 筋傷害のない Tenotomy 処置による代償性筋肥大時において, サテライト細胞が活性化/増殖することが示された. また Ki67 陽性のサテライト細胞割合は Day 4 では約 70% であったのに対し, MyoD 陽性のサテライト細胞割合は 35% ほどであったことから, 多くのサテライト細胞が MyoD を発現することなく増殖したことが示唆された.

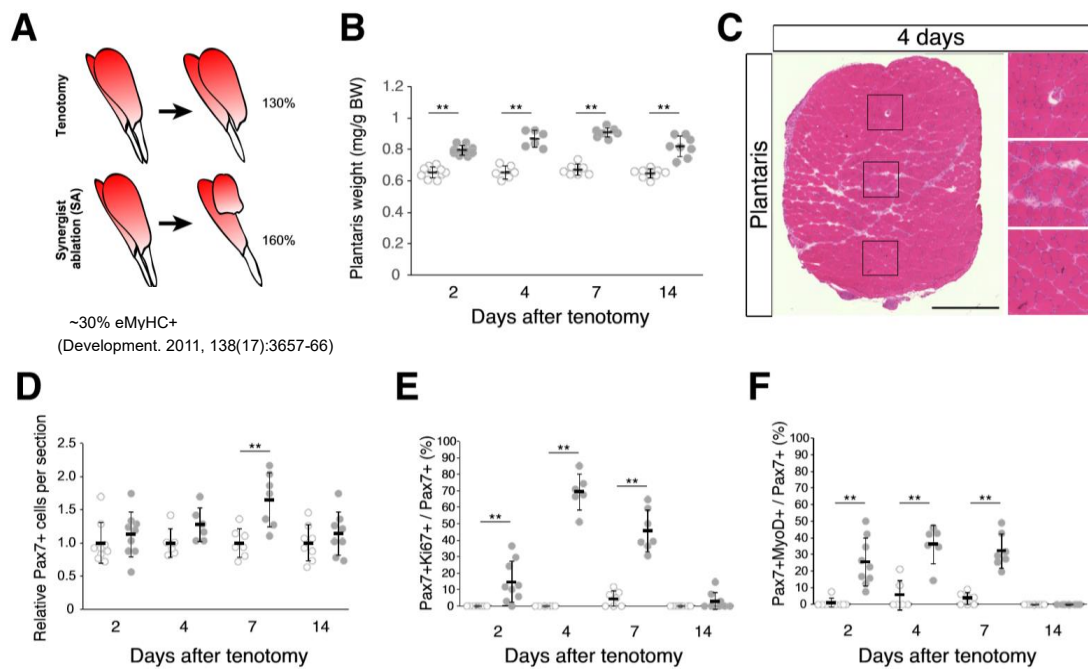


Fig. 1 Tenotomy induces activation and proliferation of muscle stem cells in the absence of substantial muscle damage.

(A) Two mouse models that induce muscle hypertrophy. (B) Plantaris muscle weight relative to body weight (mg/g) after tenotomy (gray circle) or the weight of contralateral shamoperated muscle (open circle). $**p < 0.01$. (C) H and E staining of plantaris muscle sections at 4 days after tenotomy. Scale bar: 500 μ m. Right three images in squares represent magnifications of the left image. (D) Relative number of MuSCs in plantaris muscle sections after tenotomy (gray circle) or in contralateral sham muscle sections (open circle). $**p < 0.01$. (E) Percentage of Ki67+ cells among Pax7+ cells in contralateral sham (open circle) or tenotomy induced plantaris muscle (gray circle). $**p < 0.01$. (F) Percentage of MyoD+ cells among Pax7+ cells in contralateral sham (open circle) or tenotomy induced plantaris muscle (gray circle). $**p < 0.01$. Data represent the means \pm standard deviation. A two-sided Student's t test or Welch's t test was performed.

第3節 単一筋線維法を用いたサテライト細胞活性化プロファイルの確認

過負荷筋の Pax7 陽性細胞における MyoD および Ki67 の発現パターンをさらに調べるために、正常マウスに Tenotomy 処置を行った。処置 4 日後、過負荷足底筋から単一の筋線維を分離し、それらを MyoD および Ki67 に対して同時に免疫染色を実施した。また無処置の足底筋から単一筋線維を分離し、3 日間培養したサンプルを抗体染色の陽性対照として使用した (Fig.2A)。

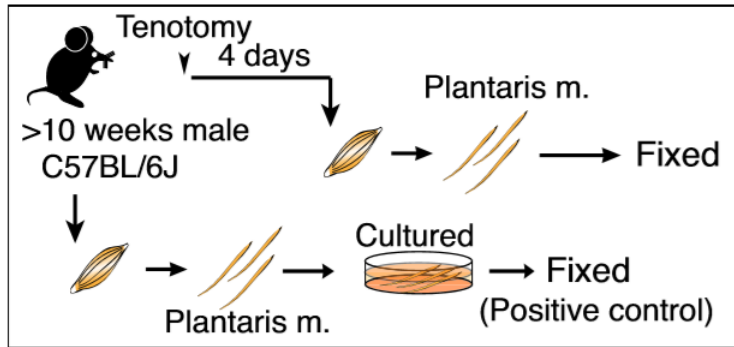
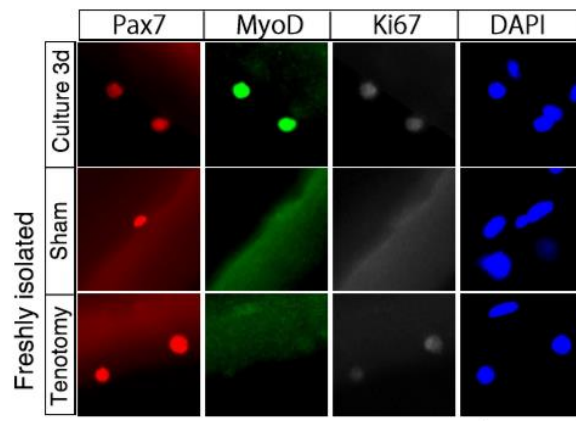
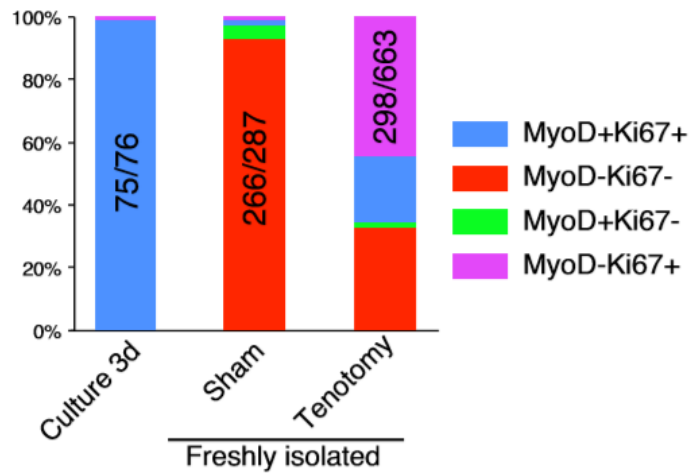
その結果、培養した単一筋線維上のほぼ全ての Pax7 陽性細胞で MyoD および Ki67 の発現が認められた (Fig.2B,C)。この結果は、in vitro 培養モデルおよび in vivo での筋再生の先行研究結果と合致したものであった[24,25]。対照的に、Tenotomy 処置を行った足底筋線維上の活性化

Pax7 陽性細胞の大部分(～70%)は Ki67 陽性であり (Fig.2B,C), 筋組織切片の免疫組織化学解析の結果と一致した (Fig.1E). Sham 処置足底筋では, 筋線維上の Pax7 陽性細胞の 93%が MyoD, Ki67 ともに陰性であり, 静止期にあることが確認された (Fig.2B,C).

第 2 節にて, Tenotomy による筋肥大モデルにおいて筋傷害がほとんど認められないことを示した (Fig.1C). しかし, 局所的に損傷した筋線維から放出された因子が, 過負荷筋サテライト細胞の活性化/増殖に影響を与えた可能性が懸念された. このような場合, 一部の制限された領域にある筋線維上でのみサテライト細胞は活性化/増殖すると考えられる. 逆に, サテライト細胞が他の刺激(機械的刺激など)に応答する場合は, ほとんど全ての筋線維上のサテライト細胞は静止期から離脱し, 損傷のない筋線維上で増殖すると考えられる. これを検証するために, 単一筋線維法を用いて各筋線維上の Pax7 陽性細胞の数とその活性化および増殖状態を評価した. 単一筋線維法では, 筋線維の単離過程で少しでも筋線維に傷が存在すると筋線維は過収縮により死滅する. そのため, 単一筋線維法は, その解析対象が全て損傷を受けていない生きた筋線維であることを保証できる点で本検討に有用であると考えられた. 解析の結果, 筋線維あたりの Pax7 陽性細胞の数は, 筋線維の限られた領域だけでなく, 過負荷筋で全体的に増加した (Fig.2D).

次に, 各筋線維上の Pax7 陽性細胞のプロファイルを解析した. この解析では, 筋線維に存在する Pax7 陽性細胞のうち静止期(MyoD 陰性 Ki67 陰性)サテライト細胞の保有率ごとの分布と (Fig.2E), MyoD 陰性 Ki67 陽性サテライト細胞の保有率ごとの分布を算出した (Fig.2F). ほとんどすべての Sham 処置足底筋由来筋線維は, 静止期のサテライト細胞(MyoD 陰性 Ki67 陰性)のみを保有していた. 対照的に, Tenotomy 処置による過負荷足底筋由来の筋線維では, 各筋線維あたり 80%以上が静止期のサテライト細胞であるような筋線維はほぼ認められず (Fig.2E), 筋線維のおよそ 60%が, 筋線維あたりに MyoD 陰性 Ki67 陽性細胞を 40%以上有していた (Fig.2F). これらの結果は, サテライト細胞の静止期からの離脱は, 過負荷筋の制限された領域でおこっている訳ではなく, ほぼ全ての筋線維上のサテライト細胞が過負荷に応答していることを示唆した.

筋傷害または *in vitro* 培養でのサテライト細胞の活性化過程においては, ほぼすべてのサテライト細胞が最初にタンパク質レベルで MyoD を発現し, その後 Ki67 の発現を伴うことが報告されている[24,25]. 一方で, 過負荷筋では, サテライト細胞の大部分が MyoDタンパク質の発現を伴わずに増殖することが明らかとなった. 以上から, 過負荷による筋肥大時のサテライト細胞は筋傷害時とは異なる機序で活性化/増殖することが示唆された.

A**B****C**

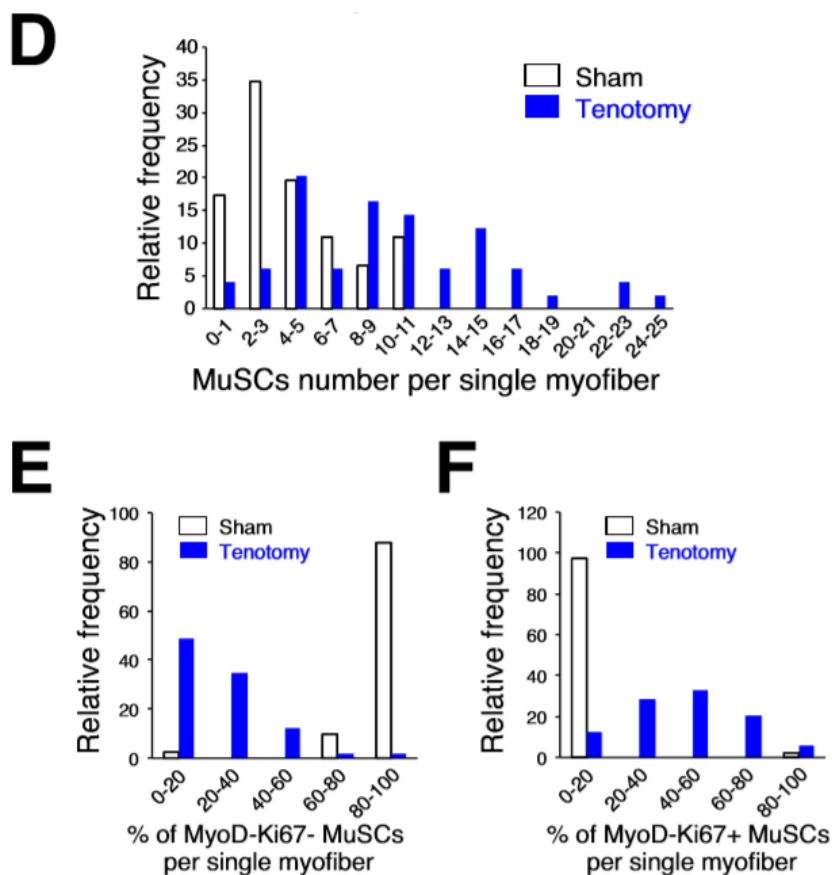


Fig. 2 Majority of muscle stem cells proliferate on undamaged overloaded myofibers in the absence of MyoD expression.

(A) Experimental scheme for analyzing the number and properties of MuSCs on isolated single myofibers. At 4 days after tenotomy, single myofibers were isolated and immediately fixed. Single myofibers cultured for 3 days were used as positive controls for immunostaining. (B) Immunostaining of Pax7 (red), MyoD (green), and Ki67 (white) in MuSCs on 3 days cultured myofibers (Culture 3d; positive control), freshly isolated myofibers of sham muscle (Sham), or freshly isolated myofibers at 4 days after tenotomy (Tenotomy). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 50 μ m. (C) Bar graph showing frequencies of MyoD+Ki67+ (blue column), MyoD-Ki67- (red column), MyoD+Ki67- (green column), and MyoD-Ki67+ (purple column) cells on 3 day cultured myofibers, sham myofibers, or myofibers at 4 days after tenotomy. The number associated with the majority phenotype in Pax7+ cells is indicated in the numerator of each bar. Total number of Pax7+ cells is indicated in the denominator of each bar. (D) Histogram showing the frequency of the listed number of MuSCs per myofiber in the case of sham myofibers (white bar, n = 46) or myofibers at 4 days after tenotomy (blue bar, n = 49). The X-axis indicates the number of MuSCs per myofiber, and the Y-axis shows the frequency of myofibers harboring the indicated number of MuSCs. (E, F) Frequency of MyoD-Ki67- (E) or MyoD-Ki67+ (F) MuSCs on single myofibers: sham control (white

bar, n = 41) versus 4 days after tenotomy (blue bar, n = 49). The X-axis indicates the percentage of MyoD-Ki67- or MyoD-Ki67+ MuSCs per myofiber. The Y-axis shows the frequency of myofibers with the indicated percentage of MyoD-Ki67- (E) or MyoD-Ki67+ (F) MuSCs per myofiber.

第 4 節 Tenotomy によるサテライト細胞の増殖および新しい筋核の供給

過負荷筋のサテライト細胞が静止期から離脱することが示されたことから、実際に増殖する時期および、その後筋線維に融合する過程の経時的な解析を実施した。正常マウスに Tenotomy 処置を行い、EdU を投与し処置 2, 4, 7, 14 日後に足底筋を摘出した。静止期から離脱したサテライト細胞は増殖期にあるため、分裂時にチミジンアナログである EdU を取り込むが、もともと筋線維にある核(筋核)は分裂をしないため EdU を取り込まない。そのため EdU 陽性の筋核はサテライト細胞が分裂し、筋線維に融合した新しい筋核として定量することが可能である。Tenotomy 処置 4 日後 (Day 4) より Pax7 陽性細胞における EdU 陽性割合は 50%ほどを示し、少なくとも Day 7 まで維持された (Fig.3A)。また、新しい筋核数は Day 4 以降 Day 14 まで徐々にその数の増加が認められた (Fig.3B)。以上から、Tenotomy 処置 4 日後以降、サテライト細胞の増殖および新しい筋核の筋線維への供給が維持されることが示された。

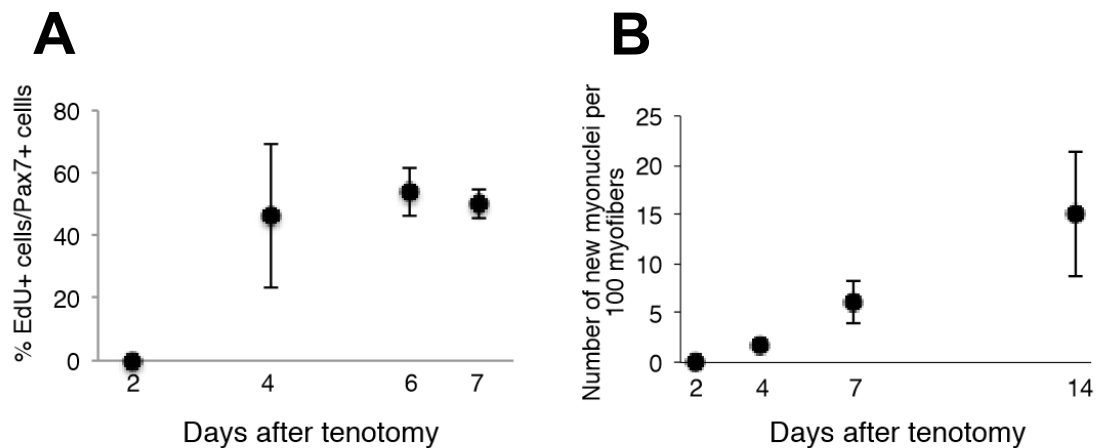


Fig. 3 Kinetics of MuSC behavior in overloaded muscle

(A) Frequency of EdU+Pax7+ cells among Pax7+ cells after tenotomy (n = 3-4). (B) Number of new MuSC-derived myonuclei up to 14 days after tenotomy (n = 3-4).

第5節 小括

Tenotomy 処置による代償性筋肥大時のサテライト細胞活性化について解析を実施した結果、以下の点が明らかとなった。

- ・顕著な筋傷害が認められない Tenotomy 処置による過負荷によって、増殖マーカーである Ki67 陽性割合の増加、分化マーカーである MyoD 陽性割合の増加を伴ったサテライト細胞数の優位な増加が認められた。
- ・その際 MyoD 陽性サテライト細胞の数に比べ、Ki67 陽性サテライト細胞数が多く認められた。
- ・上記活性化パターンは組織切片の免疫組織化学的解析のみならず単一筋線維法での解析によっても同様の結果が認められ、単一筋線維の *In vitro* 培養による活性化パターン(筋傷害時と同様の活性化を示す)とは異なることが示された。
- ・各単一筋線維上のサテライト細胞の数および活性化プロファイルの解析から、代償性筋肥大時のサテライト細胞の活性化は、局所的なものではなく全体的に過負荷に反応した結果であることが示唆された。
- ・Tenotomy 処置 4 日後以降、サテライト細胞の増殖が維持され、それに伴い新しい筋核が徐々に筋線維に供給されることが示された。
- ・以上より、代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化には筋傷害時とは異なるメカニズムが働く可能性があることが示された。

第2章 代償性筋肥大時のサテライト細胞活性化に関する

Hey ファミリーの影響

代償性筋肥大時のサテライト細胞における、筋傷害時とは異なる活性化メカニズムを解明することを目的にさらなる検証を実施した。通常、サテライト細胞は基底膜と筋線維の間(ニッチ)で未分化かつ静止期に維持されており[14], サテライト細胞を静止期に維持する分子メカニズムは近年明らかにされつつある[27,28]。筋線維が損傷し消失する筋傷害時とは異なり、代償性筋肥大時においてサテライト細胞は筋線維と基底膜のニッチに保持されることが想定されることから、単一筋線維法および組織切片を用いてその解剖学的な位置の検証を行った。

サテライト細胞の静止期維持に関与する経路のうち、Canonical Notch シグナル経路は MyoD 発現抑制に働く重要な経路である[29,30]。また、筋線維はサテライト細胞に対する Notch リガンドの供給源と考えられている。これらのことから、Canonical Notch シグナル経路が過負荷筋で増殖するサテライト細胞において MyoD 発現抑制の原因である可能性が考えられた。一般的に Canonical Notch シグナル経路の最も広く認識されている主要なターゲットは bHLH 転写抑制遺伝子である Hes (hairy and enhancer of split) ファミリー (Hes1, 3, 5) および Hey ファミリー (Hey1, 2 および HeyL) 分子である[31]。サテライト細胞における Canonical Notch シグナル経路の重要な主要ターゲットは各ファミリー分子の中で Hey1, HeyL, および Hes1 であり[32,33], Hey-Hes1 ヘテロダイマー複合体としてサテライト細胞の未分化性維持に働いている [34]。さらに、Hey1 と HeyL はどちらも静止期サテライト細胞で発現しているが、筋傷害によりサテライト細胞の活性化が誘発されると、その発現は大幅に減少する[30,32]。その為、Hey1, HeyL は筋傷害時のサテライト細胞の増殖・分化には必要ない事を我々のグループは報告している[32]。一方で、筋傷害を伴わない代償性筋肥大時における Hey1, HeyL の発現・機能の検証は存在しない。以上より、筋傷害時と異なる代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の特徴的な活性化パターン(MyoD 陰性 Ki67 陽性)には、筋線維の有無の違いが関与する可能性があることから、サテライト細胞における Notch 標的遺伝子の発現を解析するために、RNA-seq 解析および qRT-PCR での確認試験を実施した。

さらに Notch シグナル経路のサテライト細胞における重要なターゲット分子である HeyL 発現の意義について、Tenotomy による代償性筋肥大を誘導した HeyL KO マウスのサテライト細胞活性化および筋核供給への影響を検証した。

第1節 実験材料および方法

第1章で記載したものに関しては省略する。

・実験動物

Pax7CreERT2 マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。Rosa26EYFP/+ マウスは Jackson Laboratory の許可を得て国立精神神経センターから移転した。Pax7CreERT2+::RosaYFP (Rosa-YFP) はこれらを交配して得られた産仔に 20 mg/mL タモキシフェン (Sigma-Aldrich)/5% エタノール含有サンフラワーオイル (Sigma-Aldrich) を 2 度腹腔内投与することで作製した。

Hey1(-/-) 欠損マウスと HeyL(-/-) 欠損マウスは広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 心臓血管生理学教室の小久保博樹先生にご供与いただいた。

• SMF の免疫組織化学染色

第 1 章と同様の方法で実施した。

本実験で新たに使用した一次抗体および二次抗体はそれぞれ Table 6, Table 7 に示した。

Table 6 Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Dilution
anti-Laminin $\alpha 2$	4H8-2	Rat IgG1	Unconjugated	Enzo life science	$\times 200$
anti-GFP(YFP)	Polyclonal	Rabbit IgG	Unconjugated	MBL	$\times 1000$

Table 7 Secondary antibodies

Antibodies	Ig type	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Anti-rat IgG	goat	Alexa Fluor 568	Invitrogen	IHC: $\times 500$
anti-rabbit IgG	goat	Alexa Fluor 488	Invitrogen	IHC: $\times 500$

• 骨格筋からの単核細胞の単離

摘出したマウス骨格筋から腱や筋膜を丁寧に取り除いた後、2~3 mm 四方の大きさに細切した。細切した筋に 0.2% collagenase type II (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) / DMEM を 2.5 mL/g muscle weight となるように加え、37°C で 60 分間スターラーを用いて攪拌した。18G の注射針とシリンジを用いて筋サンプルをピペッティングによりほぐした。さらに 30 分間 37°C で攪拌した後に 37°C に加温した PBS でサンプルを希釈し、ナイロンメッシュ (40 μ m) を通すことで筋線維などのくずや取り残していた腱を除去した。得られた筋懸濁液を 380 g, 4°C で 10 分間遠心分離した後、上清を吸引除去した。得られた細胞ペレットに modified ACT 溶液 (Tris- buffered ammonium chloride) (17 mM Tris-HCl (pH7.65), 0.75% NH_4Cl) を加え、室温で 1 分間インキュベートすることで赤血球を除去した。2% FCS/PBS を加えて modified ACT 溶液を希釈し、380 g, 4°C で 5 分間遠心分離することで単核の細胞を得た。

得られた単核細胞を、抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Sca-1 抗体、biotin-SM/C-2.6 抗体を含む 2% FCS/PBS で 30 分間氷上にてインキュベートした。その後 allophycocyanin conjugated streptavidin (BD Biosciences, San Diego, CA) を含む 2% FCS/PBS で 30 分間氷上にてインキュ

ベートした. 抗体と反応させた細胞を 2% FCS/PBS に懸濁し 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう propidium iodide (P.I.) を加え, FACS AriaII™ flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) でソーティングを実施した. この時サテライト細胞は SM/C-2.6(+)/CD31(-)/CD45(-)/Sca-1(-)分画に濃縮される.

Rosa-YFP マウス骨格筋由来の単核細胞の場合は, 抗体処理を実施せず P.I.のみ添加して FACS AriaII™ flow cytometer (BD Immunocytometry Systems) でソーティングを実施した. この時サテライト細胞は YFP/FITC(+)分画に濃縮される.

本実験で使用した抗体の詳細は Table 8 に示した.

Table 8 Antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
anti-CD31	390	Rat IgG2a, κ	FITC	BD PharMingen	$\times 400$
anti-CD45	30-F11	Rat IgG2b, κ	FITC	BD PharMingen	$\times 800$
anti-Sca-1	D7	Rat IgG2a, κ	PE	BD PharMingen	$\times 400$
anti-Satellite cells	SM/C-2.6	Rat IgG	Biotin	[26]	$\times 200$
Streptavidin			APC	BD Pharmingen	$\times 400$

•RNA-seq

Rosa-YFP マウス骨格筋から単離したサテライト細胞を Lysis Buffer の入ったチューブに回収し, 共同研究者である九州大学生体防御医学研究所 附属トランスオミクス医学研究センター 生命医科学講座 大川 恭行先生に送付し, Illumina HiSeq 1500 system (Illumina, San Diego, CA) を用いた解析を実施していただいた.

•Total RNA の抽出および qRT-PCR

マウス骨格筋から FACS にて単離したサテライト細胞から, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) のマニュアルに従い Total RNA を取得した. 得られた Total RNA は QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) のマニュアルに従い逆転写を実施し cDNA を得た. これらと各遺伝子に特異的な primer セットを用いて定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)を実施した.

本実験で使用した各遺伝子に対する primer の詳細は Table9 に示した.

Table 9 Primer Sequences

Gene		Sequence
<i>Hey1</i>	Forward	5'-TGTGGATCACC TGAAAATGC
	Reverse	5'-ACCCCAAACCTCC GATAGTCC
<i>HeyL</i>	Forward	5'-CAGCCCTT CGCAGATGCAA
	Reverse	5'-CCAATCGT CGCAATTCAGAAAG
<i>Col5a1</i>	Forward	5'-GCTACTCCTG TTCCTGCTGC
	Reverse	5'-TGAGGGCAA ATTGTGAAAATC
<i>Col5a3</i>	Forward	5'-CCGGAGACTGG ATCAGCTT
	Reverse	5'-GCTTCCAGTAC GTCCACAGG
<i>Col6a1</i>	Forward	5'-TACTTCGGGAAA GGCACCTA
	Forward	5'-TCGGTCACC ACGATCAAGT

・筋傷害モデルの作製

10 μ M/PBS に調整した Cardiotoxin from *Naja pallida* (Latoxan, France) を 50 μ L の投与容量でマウス前脛骨筋に筋内注射した.

・筋傷害モデル由来筋組織の免疫組織化学染色

筋傷害を誘導した前脛骨筋を摘出した後から、組織サンプルの作製および薄切切片の作製までは第 1 章記載の方法に準じた。風乾した薄切切片の周囲を Dako Pen (Dako Japan, Tokyo, Japan) で囲み、室温条件下にて 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS にて 10 分間インキュベートし固定した。eMyHC 染色を行った際は、冷却したアセトンに浸し 10 分間インキュベートし固定した後に風乾し、薄切切片の周囲を Dako Pen (Dako Japan) で囲んだ。以下の洗浄操作からブロッキングおよび抗体処理は第 1 章記載の方法に準じた。

本実験で新たに使用した一次抗体を Table10 に示した。

Table 10 Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Dilution
anti-M-cadherin	Polyclonal	Rabbit IgG	Unconjugated	Gift from S.Takeda	$\times 1000$
Anti-eMyHC	F1.652	Mouse IgG	Unconjugated	DSHB	$\times 2$

・統計解析

多群間における統計処理は、One-way ANOVA の検定を実施した後に、Tukey-Kramer もしくは Bonferroni による検定を実施した。有意水準を 5% ($p < 0.05$) もしくは 1% ($p < 0.01$) とした。

第 2 節 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞活性化の解剖学的な位置解析

代償性筋肥大時のサテライト細胞活性化の解剖学的な位置の検証を実施した。タモキシフェンを投与することで Pax7 陽性細胞特異的に蛍光タンパクである YFP を発現する Pax7CreERT2+::RosaYFP (Rosa-YFP)マウスに Tenotomy 処置を行い, 4 日後に単一筋線維法での解析を行った。また, 正常マウスに Tenotomy 処置を行い, 同じく 4 日後に組織切片を用いた解析も行った。

その結果, 単一筋線維法では, laminin $\alpha 2$ で染色される基底膜の内側で YFP 陽性細胞の隣接した像が認められた。また, 組織切片では同じく基底膜の内側で分裂増殖したサテライト細胞を示す EdU 陽性かつ Pax7 陽性細胞が観察された(Fig.4A,B)。これらの結果から, 代償性筋肥大時にサテライト細胞は, 筋線維と基底膜の間隙で増殖することが示された。

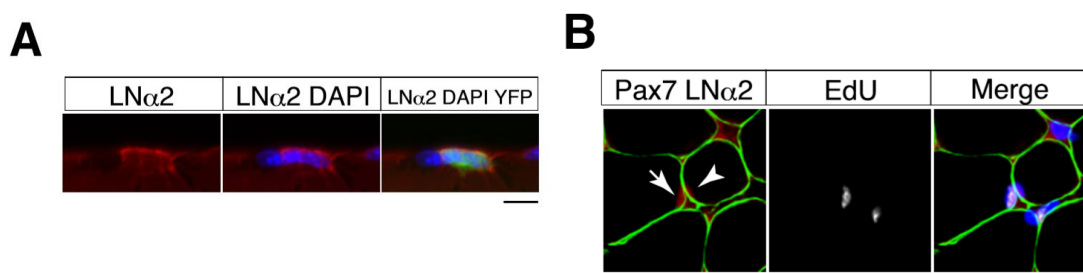


Fig. 4 Anatomical location of satellite cell activation in overloaded muscle.

(A) Immunostaining of laminin $\alpha 2$ (LN $\alpha 2$; red) and YFP (green) in isolated myofibers derived from Pax7CreERT2+::RosaYFP (Rosa-YFP) mice at 4 days after tenotomy. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (B) Immunostaining of Pax7 (red), laminin $\alpha 2$ (LN $\alpha 2$; green), and EdU (white) in sections from C57BL/6 mice at 4 days after tenotomy. Nuclei were counterstained with DAPI. Arrow or arrowhead indicate EdU+ or EdU- Pax7+ cells. Scale bar: 20 μ m.

第 3 節 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞での mRNA 発現解析

代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化が, 筋線維が消失した状態で活性化する筋傷害時とは異なり, 基底膜と筋線維間のニッチで起こることが示されたことから, 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の筋傷害時と異なる特徴的な活性化パターン(MyoD 陰性 Ki67 陽性)には, 筋線維の有無の違いが関与する可能性が考えられた。そのため, サテライト細胞において MyoD 発現抑制に働く重要な経路である Notch シグナルの標的遺伝子発現解析を RNA-seq 解析で実施し, qRT-PCR 法で遺伝子発現の確認を実施した。サテライト細胞の RNA-seq を実施するために

は骨格筋からフローサイトメーターを用いたサテライト細胞のソーティングが必要となるが、足底筋は小さな骨格筋であるために、蛍光標識抗体を用いたサテライト細胞の染色を実施すると洗浄操作時におこる細胞の量的損失の影響が大きいと、あらかじめサテライト細胞が蛍光標識された状態にできる Rosa-YFP マウスに Tenotomy 処置を行い 4 日後に足底筋からサテライト細胞を単離し、RNA-seq 解析を実施した。

RNA-seq 解析の結果、Tenotomy 処置 4 日後における足底筋由来サテライト細胞において、Notch 標的遺伝子の発現が全体的に持続していることが認められた (Fig.5A)。特筆すべき点として、筋傷害後の再生時サテライト細胞と比較して *HeyL* の発現が肥大時では維持されることが観察された[24]。

次に正常マウスに Tenotomy 処置を行い 2, 4 日後に足底筋からサテライト細胞を単離し、qRT-PCR 解析を RNA-seq 解析の確認試験の位置づけで実施した。その際、筋内注射により筋傷害を誘発することで知られる蛇毒カルジオトキシン (CTX) 投与後 2 日後(CTX 2d)に取得したサテライト細胞の遺伝子発現と比較した。その結果、*Hey1* ではなく *HeyL* の発現のみが Tenotomy による代償性筋肥大時に持続することが示された (Fig.5B)。

さらに、サテライト細胞で近年新たに同定された Rbp-J (Notch シグナルの主要な転写エフェクター) の直接標的遺伝子である、*Col5a1*, *Col5a3*, *Col6a1* の発現を測定したところ[27]、Tenotomy 処置 2 日後に一過的な発現低下が認められたものの、サテライト細胞が活発に増殖する処置 4 日後には静止期と同等の発現レベルであることが観察された (Fig.5C)。さらに、RNA-seq 解析では、代償性筋肥大時に細胞周期関連遺伝子の発現レベルの増加を示した (Fig.5A)。これらの結果から、Tenotomy による筋肥大モデルにおいては、Canonical Notch シグナルの活性化条件下でサテライト細胞が活性化すること、また持続的な *HeyL* 発現維持が過負荷筋におけるサテライト細胞活性化時の特徴であることが示唆された。

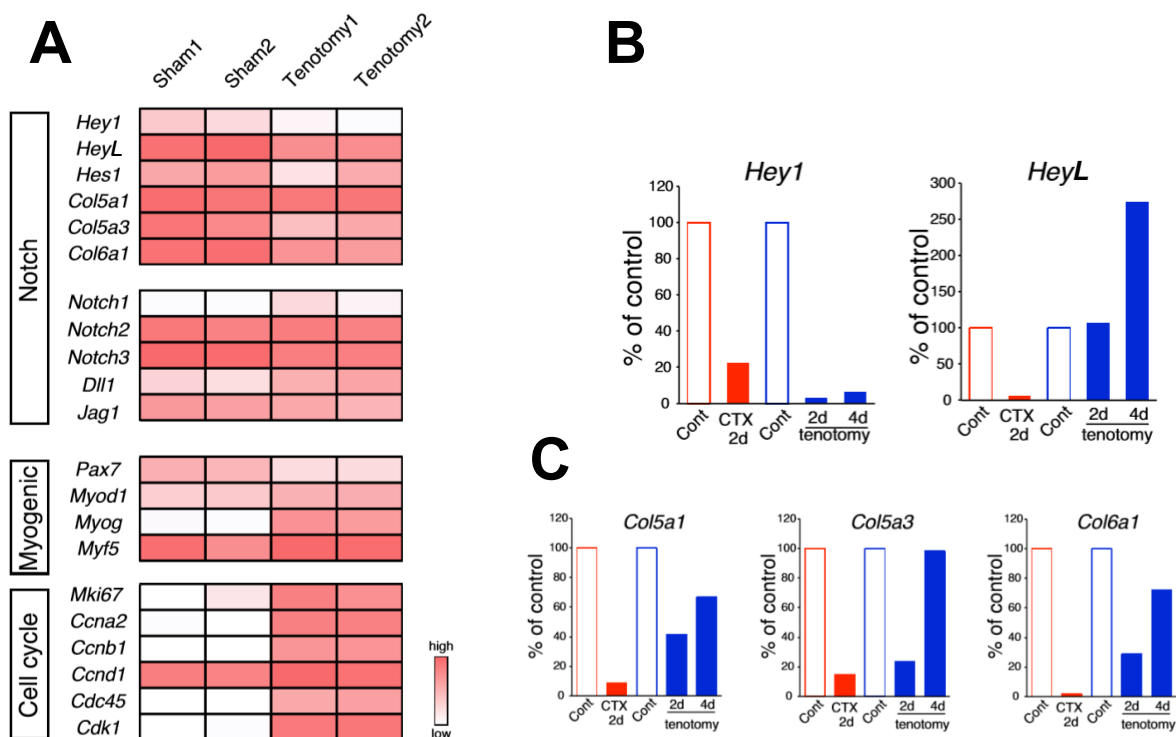


Fig. 5 Relative mRNA expression of Notch target genes in muscle stem cells in regenerating versus overloaded muscle.

(A) RNA-seq analyses of Notch, myogenic, and cell-proliferation-related genes in MuSCs from sham or overloaded plantaris muscle of Rosa-YFP at 4 days after tenotomy. (B, C) Mononuclear myogenic cells were isolated from intact muscle (Cont; red), damaged muscle at 2 days after cardiotoxin injection (CTX 2d), sham-operated muscle (Cont; blue), or overloaded plantaris muscle of C57BL/6. Relative expression of *Hey1* and *HeyL* (B) and three other canonical Notch target genes (*Col5a1*, *Col5a3*, and *Col6a1*) were compared between Cont and CTX/tenotomy samples (C).

第 4 節 代償性筋肥大時のサテライト細胞活性化に対する *Hey1*, *HeyL* KO の影響

Tenotomy 処置による筋肥大モデルにおける遺伝子発現解析の結果では、持続的な *HeyL* 発現維持がサテライト細胞活性化時の特徴であることが示唆された。筋傷害時と異なる *HeyL* 発現維持が実際に代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の特徴的な活性化に寄与することを検証した。*HeyL*(-/-)欠損マウス(*HeyL*-KO マウス)に Tenotomy 処置による代償性筋肥大を誘導し 4 日後に足底筋を採取した。また *HeyL*と同じく Notch シグナルのターゲット分子でありながら、Tenotomy 処置後において筋傷害時と同様に発現低下が認められた *Hey1* の欠損マウス(*Hey1*-KO)および正常マウス(コントロールマウス)と比較することにより、過負荷筋のサテライト細胞における持続的な *HeyL* 発現の意義を検証した (Fig.6A)。その結果、興味深いことに *HeyL*-KO マウスでは、*Pax7*

陽性細胞における Ki67 陽性 MyoD 陽性および Ki67 陽性 MyoD 陰性細胞の割合が, Tenotomy 処置 4 日後でそれぞれ増加および減少したが, その合算となる Ki67 陽性細胞割合 (MyoD 陽性 + MyoD 陰性) には差が認められなかった (Fig.6B,C). また, 増殖中のサテライト細胞 (Ki67 陽性 Pax7 陽性) 中の MyoD 陽性細胞と陰性細胞の比率は, コントロールおよび Hey1-KO マウスよりも HeyL-KO マウスで有意に高値を示した (Fig.6D). さらに, Sham 処置群における HeyL-KO マウスの Ki67 陽性細胞の割合はコントロールおよび Hey1-KO マウスにおける割合と差がなかったが (Fig.6C), Tenotomy 処置 4 日後における筋線維一本あたりの Pax7 陽性細胞数は, HeyL-KO マウスの方がコントロールマウスおよび Hey1-KO マウスよりも有意に低かった (Fig.6E). これらの結果は HeyL の欠損がサテライト細胞の増殖に影響したが, 静止期からの離脱には影響しなかったことを示唆している. また, Tenotomy 処置 7 日後の結果は, 処置 4 日後の結果と同様であった (Data 非表示). 以上の結果は, HeyL 発現の持続が過負荷筋サテライト細胞の MyoD 発現の抑制に重要であり, HeyL の欠損によってサテライト細胞がより分化 (MyoD 発現) 方向に傾くことで増殖能が低下することを示唆した.

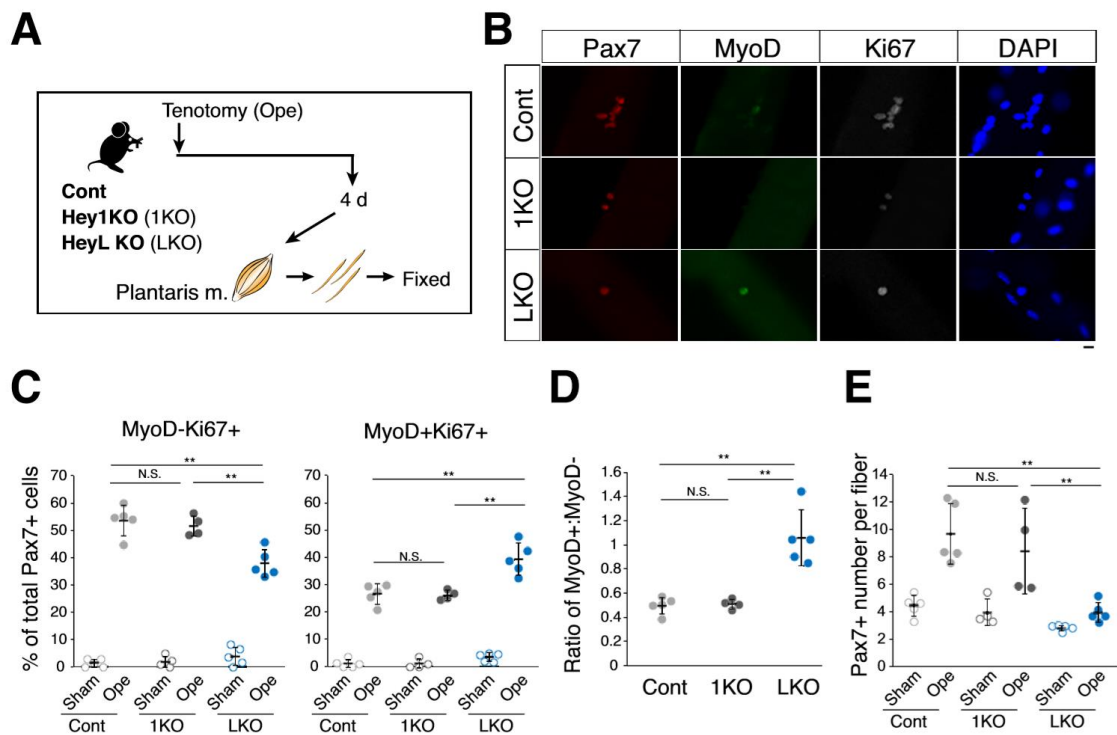


Fig. 6 Increased ratio of MyoD-expressing myogenic cells and decreased cell number in overloaded HeyL-KO mice.

(A) Experimental scheme for analyzing Pax7+ cells on plantaris myofibers derived from control (Cont), Hey1-KO (1KO), or HeyL-KO (LKO) mice at 4 days after tenotomy (Ope). (B) Immunostaining of Pax7 (red), MyoD (green), and Ki67 (white) in MuSCs on freshly isolated myofibers at 4 days after tenotomy

from Cont, 1KO, or LKO mice. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 20 μ m. (C) Frequency of MyoDKi67+ (left) or MyoD+Ki67+ (right) cells among Pax7+ cells on myofibers: sham (open circle) versus 4 days after tenotomy (closed circle), derived from Cont (light gray, n = 5), 1KO (black, n = 4), or LKO (blue, n = 5) mice. **p<0.01. N.S.: not significant. (D) Ratio of MyoD+ to MyoD cells among Ki67+Pax7+ cells on myofibers at 4 days after tenotomy, derived from Cont (light gray, n = 5), 1KO (black, n = 4), or LKO (blue, n = 5) mice. **p<0.01. N.S.: not significant. (E) Number of Pax7+ cells on myofibers: sham (open circle) versus 4 days after tenotomy (closed circle), derived from Cont (light gray, n = 5), 1KO (black, n = 4), or LKO (blue, n = 5) mice. **p<0.01. N.S.: not significant. Data represent the mean \pm standard deviation. One-way ANOVA, followed by the Tukey–Kramer test, was used for statistical analyses.

第 5 節 筋傷害時における HeyL KO の影響

HeyL-KO マウスでは代償性筋肥大時のサテライト細胞の増殖能が低下することが示されたが、筋傷害時における HeyL 欠損の影響を検証した。最終的な筋再生像（筋再生時の病理像）は HeyL-KO マウスとコントロールマウスとで違いがないことを、我々は既に報告している[32]。しかし、実際にサテライト細胞が活発に増殖する時期の検討は行っていない為、ここでは筋傷害時のサテライト細胞の数が最もピークを迎える時期での検討を実施した。HeyL-KO マウスもしくは正常マウスに蛇毒カルジオトキシン (CTX) 投与後 3 日目(CTX-3d) および 4 日目 (CTX-4d) のサンプルを用いて HeyL-KO マウスの筋再生能力を検討した。CTX-3d の筋組織はサテライト細胞の細胞表面マーカーである M-cadherin を指標にその数を検証した。その結果 HeyL-KO マウスとコントロールマウス間でサテライト細胞数の差は認められなかった (Fig.7A)。次にサテライト細胞が活性化した結果である筋再生時の幼若筋線維に発現する Myosin Heavy chain のサブタイプ embryonic MyHC を指標に CTX 投与 4 日後 (CTX-4d) の筋組織を評価した結果、同様に差は認められなかった (Fig.7B)。これらのことから HeyL の持続的な発現は、筋傷害時には影響がなく、代償性筋肥大時においてのみサテライト細胞の増殖に影響を及ぼすことが示された。

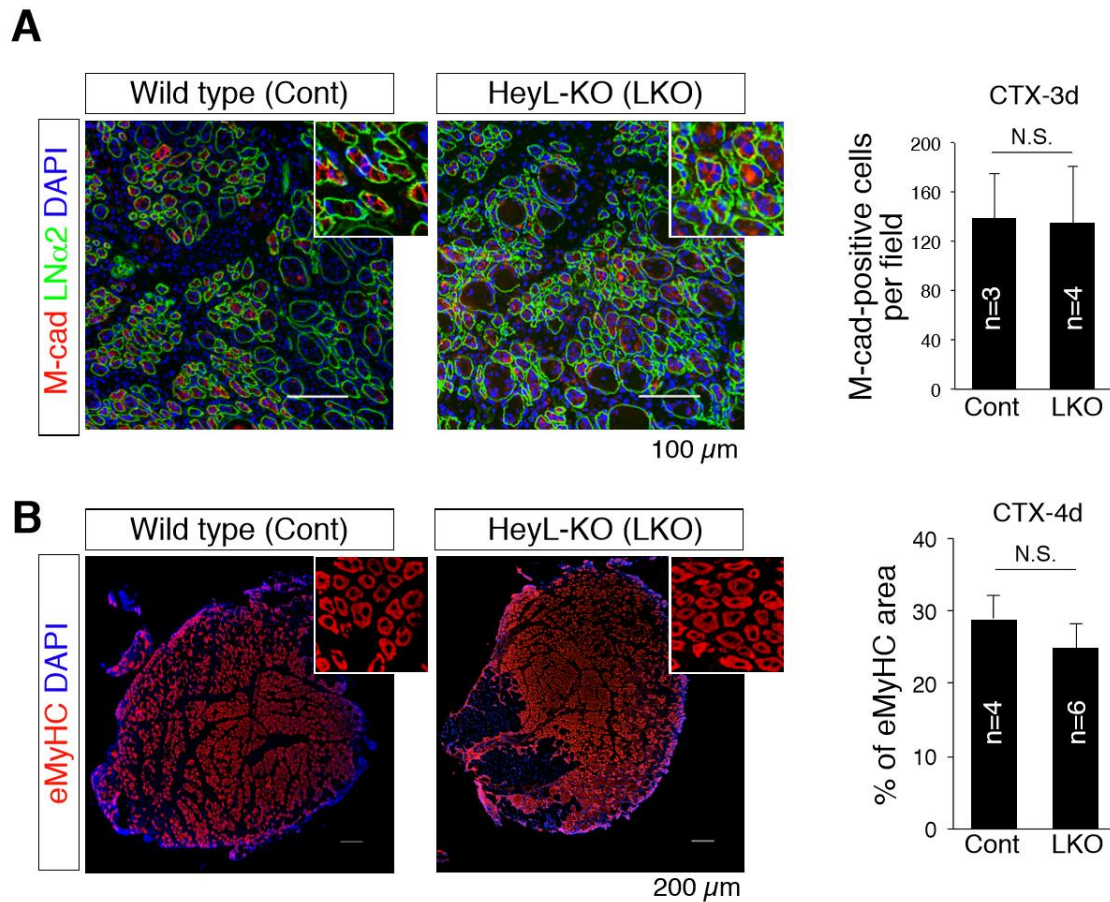


Fig. 7 Normal muscle-regenerative ability in HeyL-KO mice

(A) Immunostaining of M-cadherin (M-cad; red) and laminin $\alpha 2$ (LN $\alpha 2$; green) in sections of regenerating tibialis anterior muscle at 3 days after CTX injection (CTX-3d). Scale bar: 100 μ m. Bar graphs show the frequency of M-cadherin+ cells per field in wild-type (Cont; n = 3) and HeyL-KO (LKO; n = 4) mice. N.S.: not significant. (B) Immunostaining of embryonic myosin heavy chain (eMyHC; red) in sections of regenerating tibialis anterior muscle at 4 days after CTX injection (CTX-4d). Scale bar: 200 μ m. Bar graphs show percentages of eMyHC+ area in wild-type (Cont; n = 4) and LKO (n = 6) mice. N.S.: not significant. Data represent the mean \pm standard deviation. A two-sided Student's t test was performed.

第 6 節 代償性筋肥大時における筋核供給に対する HeyL KO の影響

次に、代償性筋肥大時において、サテライト細胞によって供給される新しい筋線維の核(筋核)の数に対する HeyL-KO の影響を検証した. コントロール, Hey1-KO および HeyL-KO マウスに Tenotomy 処置を行い, 4, 7 日後に足底筋を摘出した. 増殖中のサテライト細胞を EdU で標識し (Fig.8A), サテライト細胞由来の筋核 (EdU 陽性筋核) をジストロフィン染色により他の核と区別した

(ジストロフィンは筋細胞膜内に存在するタンパク質であり、その内側に存在する核は筋線維自身の核であることを示す[32]) (Fig.8B). Sham 処置群においては, EdU 陽性筋核がコントロール, Hey1-KO および HeyL-KO マウスいずれにもほとんど認められず差は認められなかった (Fig.8C). これは全てのマウスの Sham 処置群のサテライト細胞が静止期にあるため, EdU の取り込みおよび筋線維への融合がおきていない事を意味している. 一方, Tenotomy 処置後のコントロール, Hey1-KO マウスでは, 処置 4 日後で筋断面あたりに約 20 個の EdU 陽性筋核が, 処置 7 日後で約 60 個の EdU 陽性筋核が検出された (Fig.8C). すなわち, この期間中に増殖したサテライト細胞が筋線維と活発に融合したことが示唆された. HeyL-KO マウスでは, 筋断面あたりの新しい筋核はコントロールおよび Hey1-KO マウスで検出されたものと比較して低値を示し, 処置 7 日後においては有意な低値を示した (Fig.8C). また, サテライト細胞を枯渇させた先行研究と同様に[16], HeyL-KO マウスの新しい筋核数の減少は, この時点での筋重量とは相関が認められなかった (Fig.8D). 以上の結果は, 代償性筋肥大時の HeyL-KO マウスではサテライト細胞の MyoD 発現を増加することで, 増殖が十分に行われず, その結果新しい筋核の供給が減少したことを示唆する.

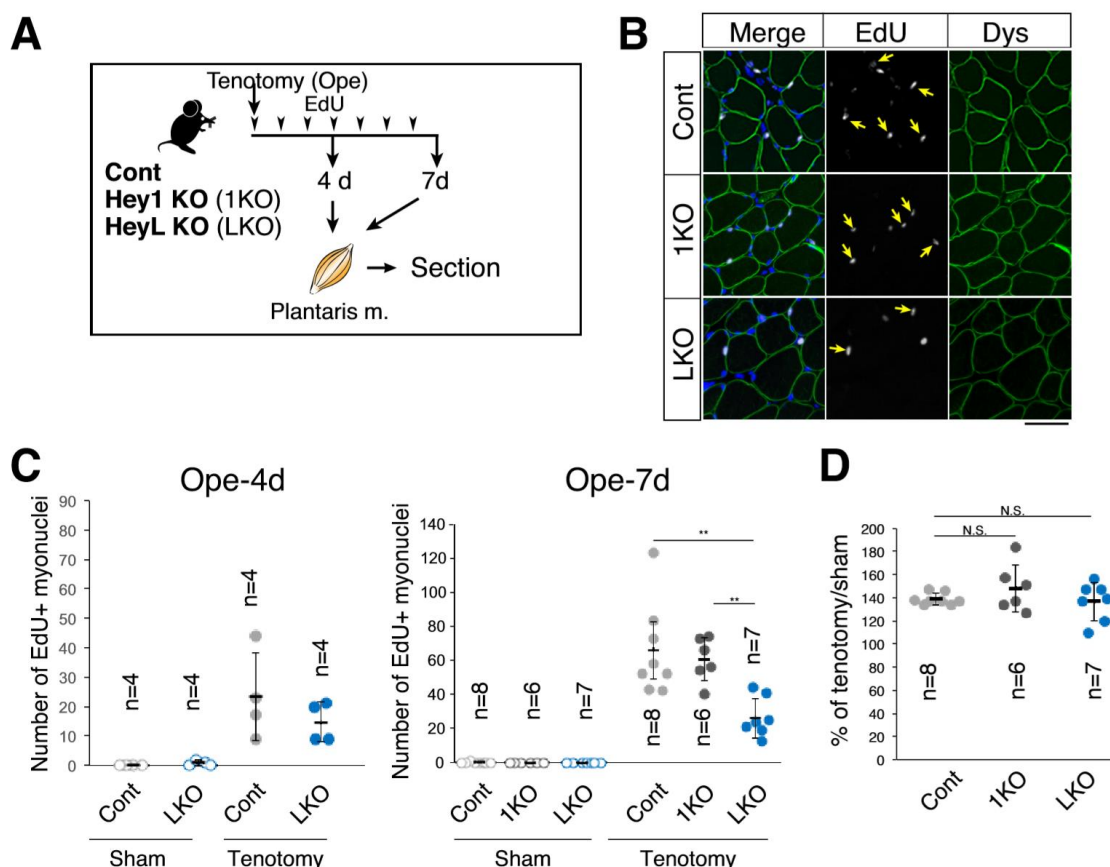


Fig. 8 Decreased number of new myonuclei supplied by muscle stem cells in overloaded HeyL-KO muscle.

(A) Experimental scheme for analyzing new MuSC-derived myonuclei in plantaris muscle of control (Cont),

Hey1-KO (1KO), or HeyL-KO (LKO) mice at 4 or 7 days after tenotomy. Arrowheads indicate the day of EdU injection. (B) Arrows indicate new myonuclei supplied by MuSCs in overloaded muscle of Cont, 1KO, or LKO mice. MuSC-derived myonuclei were labeled with EdU (white) and located inside the staining for dystrophin (Dys; green). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 50 μ m. (C) Number of EdU+ myonuclei in muscle: sham (open circle) versus tenotomy (closed circle). Left graph: results at 4 days after tenotomy (Ope-4d) (Cont: light gray, n = 4; LKO: blue, n = 4). Right graph: results at 7 days after tenotomy (Cont: light gray, n = 8; 1KO: black, n = 6; LKO: blue, n = 7). **p<0.01. N.S.: not significant. (D) Ratio of overloaded muscle weight to sham muscle weight in Cont (light gray, n = 8), 1KO (black, n = 6), or LKO (blue, n = 8) mice at 7 days after tenotomy. N.S.: not significant. Data represent the mean \pm standard deviation. One-way ANOVA, followed by the Tukey–Kramer or Bonferroni test, was used for statistical analyses.

第7節 小括

第1章において、代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化/増殖が筋傷害時とは異なることが示唆されたため、その活性化/増殖メカニズムに関する検証を実施した結果、以下の点が明らかとなった。

- 代償性筋肥大時にサテライト細胞は、筋線維と基底膜の間隙で増殖することが示された。
- Notch シグナルは維持された状態と考えられ、Hey1 の発現低下は認められたが HeyL の発現維持が認められた。
- HeyL-KO マウスはコントロールマウスと比較して、代償性筋肥大時のサテライト細胞数の増加が抑制され、Ki67 陽性 MyoD 陰性の表現型を示すサテライト細胞の割合も低値を示した。
- 筋傷害時におけるサテライト細胞の数、筋再生能についてはコントロール群と HeyL-KO マウスの間で差は認められなかった。
- HeyL-KO マウスでは、Tenotomy 処置後の筋線維への新しい筋核の供給がコントロールマウスと比べて低値を示した。
- 以上より、代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化および筋核の供給には HeyL の発現維持が重要な役割を果たしていることが示された。

第3章 代償性筋肥大時の筋重量に対する HeyL の影響

第2章で認められた HeyL-KO マウスのサテライト細胞に由来する新しい筋核数の減少が、骨格筋自体の肥大効率(筋重量と筋線維サイズ)に影響を与えるか検証した。本章では代償性筋肥大モデルとして Synergist Ablation (SA) 処置を用いた。SA は Tenotomy と同様に足底筋に代償的な筋肥大を誘発するモデルとして知られているが、Tenotomy 処置と比較して SA 処置後の足底筋の肥大効率は大きく、また長期的に肥大し続ける。近年、その代償的な筋肥大に対して、サテライト細胞を除去したマウスにおいて短期的には影響は認められなかったものの、長期的に観察することで肥大率が低下することが報告されており[13]、サテライト細胞による筋肥大への影響を検証するのに適したモデルであると考えられた。

第1節 実験材料および方法

第1章、第2章で記載したものに関しては省略する。

・Synergist Ablation (SA)による過負荷モデルの作製

下肢足底筋へより強い過負荷を与える目的で、マウス右後肢の皮膚を一部切開し足底筋の共働筋である腓腹筋およびヒラメ筋の遠位腱であるアキレス腱をイソフルラン麻酔下にて切断した。さらに切断した腱の端をつかみ上げ、腓腹筋およびヒラメ筋を約半分切除した後に皮膚を縫合した。また、同マウス左後肢には Sham 処置として皮膚の切開および縫合のみを実施した。

・筋線維断面積の算出

凍結組織薄切切片の免疫組織化学染色を実施した後にオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) にて観察・撮影を実施した。得られた Dystrophin 染色画像を BZ-X700 付属の画像解析ソフトであるハイブリッドセルカウントを用いて筋線維数および筋線維断面積の解析を実施した。

第2節 SA による代償性筋肥大時の筋重量に対する HeyL-KO の影響

コントロールマウスと HeyL-KO マウスに SA 処置による代償性筋肥大を誘発し、9週後に足底筋を摘出し、筋重量を測定した(Fig.9A)。その結果、コントロールマウスでは Sham 処置を実施した反対側の筋重量と比較して、既報と同様に 194%に増加した (Fig.9B) [13]。さらに、摘出した足底筋の組織学的解析を行った結果、コントロールマウスにおいて、筋線維断面積の増加も明らかとなった (Fig.9C,D)。一方、HeyL-KO マウスでは、足底筋の肥大は 170%であり、コントロールマウスよりも有意な低値を示した (Fig.9B)。さらに、筋線維断面積も HeyL-KO マウスでは、コントロールマ

ウスと比して有意な低値を示した (Fig.9C,D). また, SA 後の HeyL-KO マウスでは, コントロールマウスと比較して筋線維あたりの全筋線維核数においても低値を示す傾向が見られた (Fig.9E). これらの結果から, サテライト細胞における HeyL の欠損により, 長期的な筋肥大効率が低下することが明らかとなった.

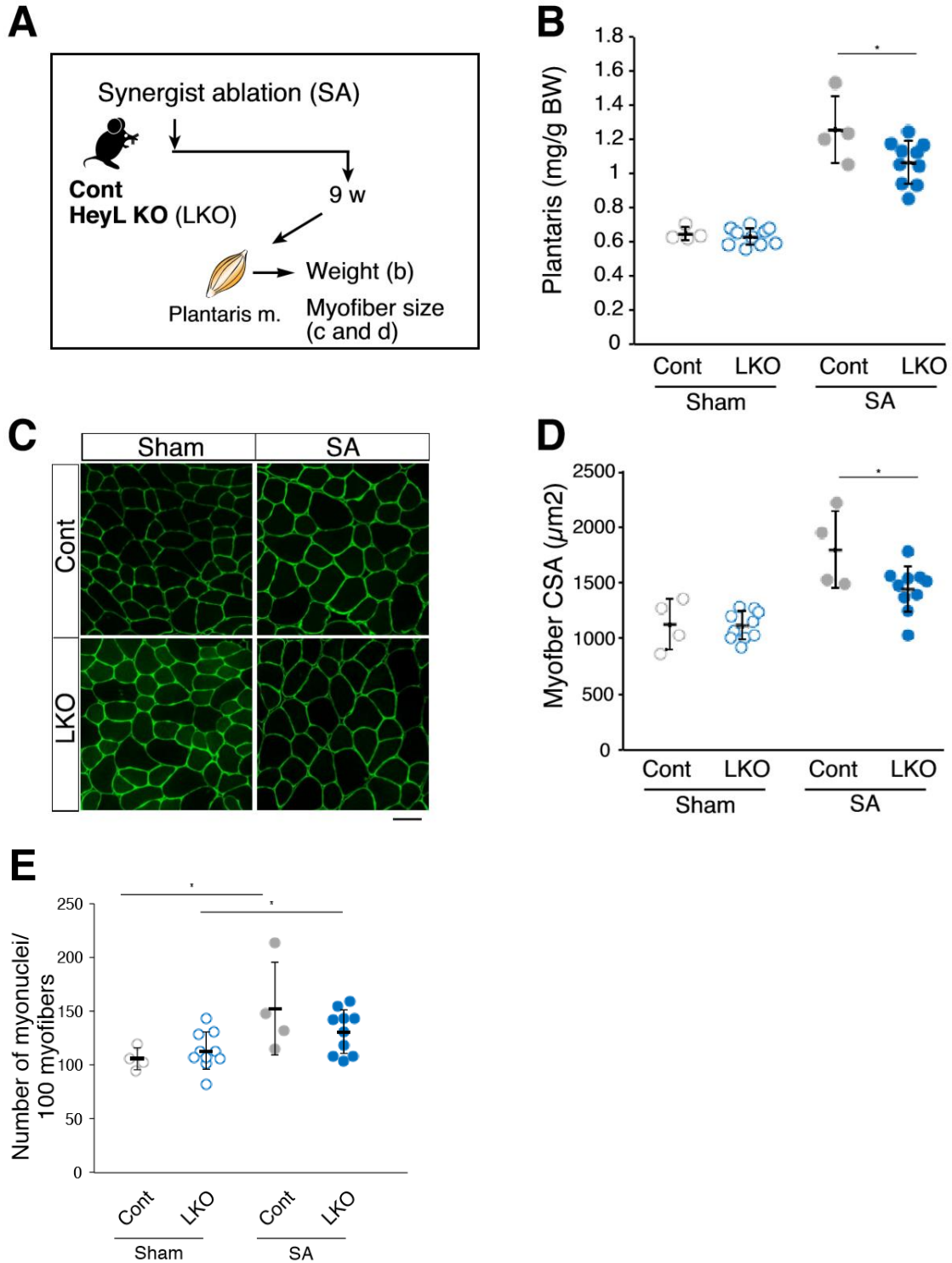


Fig. 9 Blunted hypertrophy in HeyL-KO mice at 9 weeks after synergist ablation (SA).

(A) Experimental scheme for analyzing the influence of HeyL-KO (LKO) on overloaded plantaris muscle at 9 weeks after SA. (B) Normalized plantaris muscle weight [muscle weight/body weight (BW)] from sham (open circle) or SA (closed circle) muscle derived from Cont (light gray, n = 4) or LKO mice (blue, n = 10). *p<0.05. N.S.: not significant. (C) Immunostaining of laminin α 2 (green) in sham or SA plantaris muscle derived from Cont or LKO mice. Scale bar: 50 μ m. (D) Average myofiber crosssectional area (CSA) values from sham (open circle) or SA (closed circle) plantaris muscle derived from Cont (light gray, n = 4) or LKO mice (blue, n = 10). *p<0.05. N.S.: not significant. (E) Normalized number of myonuclei [number of myonuclei/100 myofibers] from sham (open circle) or SA (closed circle) plantaris muscle derived from Cont (light gray, n = 4) or LKO mice (blue, n = 10). *p<0.05. N.S.: not significant.

第 3 節 小括

これまでに代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化および新たな筋核の供給には HeyL の発現維持が重要な役割を果たすことを示してきたが、第 3 章では長期的な影響について検証した結果、以下の点が明らかとなった。

- HeyL-KO マウスでは、SA による代償性筋肥大後の筋重量増加率の減少が認められた。
- その際、筋線維断面積の増加抑制および、筋線維当たりの筋核数の低下傾向も認められた。
- 以上より、代償性筋肥大時のサテライト細胞における HeyL の発現維持は、その活性化や筋核供給のみならず、長期的な筋肥大効率にも影響を及ぼすことが認められた。

総括

本研究を通じて、過負荷筋のサテライト細胞は、有名な筋分化モデルとは異なり、*HeyL* の発現を維持することにより *MyoD* 発現を伴わずに増殖することを示した。これは、過負荷筋におけるサテライト細胞の増殖メカニズムが、これまでに研究されてきた筋の傷害再生モデルおよび *in vitro* 培養システムにおけるメカニズムとは異なることを示す[14,25,35]。筋傷害再生時には、損傷した筋線維がマクロファージによって除去され、残存基底膜(「ゴーストファイバー」)の内側でサテライト細胞が増殖する[36]。また、単一筋線維培養時にはサテライト細胞は基底膜と筋線維の間(ニッチ)から脱出し、基底膜の外側で増殖するため、基底膜の内側でサテライト細胞を増殖させることはできない[37,38]。一方、過負荷筋ではサテライト細胞がニッチで増殖することを明らかにした。これらのことから、傷害再生時の筋と過負荷筋における、*MyoD* および *HeyL* 発現パターンが異なる原因は、サテライト細胞が活性化/増殖する環境にあることが示唆された。

過負荷筋におけるサテライト細胞の挙動は、筋再生時における動態とも異なることも明らかとなった。有名な筋傷害再生モデルであるカルジオトキシン誘発モデルでの再生時においては、サテライト細胞の活性化(*MyoD* 発現)が傷害後迅速に誘導される。また、少なくともサテライト細胞の50%が傷害後1日で *Ki67* 陽性になることも報告されている[24]。傷害後2~3日で、サテライト細胞は活発に増殖し、融合を促進するために *Myogenin* を発現し始める。一方、過負荷筋では、*Tenotomy* 処置の2日後にサテライト細胞の活性化(*Ki67* 発現)が開始された後、増殖が続く。重要なことに、筋肥大時においては、サテライト細胞の増殖と分化は長期間共存し、*Tenotomy* 処置14日後までサテライト細胞由来の筋核数の増加が徐々におこることが明らかとなった。過負荷筋由来サテライト細胞の *RNA-seq* 解析においても、細胞周期関連遺伝子と *Myogenin* 両者の発現上昇が認められることも上記結果と合致する。

Heyl と *HeyL* は、サテライト細胞における *Canonical Notch* シグナル経路のエフェクター遺伝子である。筋傷害時では、*Heyl*-KO および *HeyL*-KO マウスは正常な筋再生能力を示す[31]。しかし、代償性筋肥大時においては、*HeyL*-KO マウスのサテライト細胞の増殖は抑制され、その結果、新しい筋核数の減少につながった。これらの結果は、筋肥大モデルのサテライト細胞の増殖メカニズムが傷害モデルとは異なることを強く支持する。*Notch* シグナルのリアルタイムイメージングは困難であることから、本研究では、代償性筋肥大時のサテライト細胞でアクティブな *Notch* シグナルを示す直接的な結果は得られなかった。しかし、増殖中のサテライト細胞は *HeyL* に加えて *Notch* 関連遺伝子および *Canonical Notch* シグナル経路に関連する直接の標的遺伝子である *Col5a1*, *Col5a3*, *Col6a1* を発現すること、サテライト細胞の増殖が *Notch* リガンドを発現すると推定される筋線維上で認められたことを合わせて考えると、過負荷筋において増殖中のサテライト細胞では、*Notch* シグナル経路の活性化が維持されていたことが示唆される。その場合、アクティブな *Notch* シグナル経路が *Rbp-J* を介した *HeyL* の持続的発現に関与していると考えられるが、サテライト細胞における *Heyl* 発現を抑制する機序については現状分かっておらず、今後の解明が望まれる。

RNA-seq 解析の結果からも、過負荷筋のサテライト細胞でのアクティブな Notch シグナルが強く示唆されるが、過負荷筋で増殖中のサテライト細胞にて Notch シグナルが不活性である可能性や Notch に依存しないメカニズムで HeyL 発現が誘導されている可能性は排除できない。私の知る限り、この結果は Hey1 と HeyL という Notch エフェクター遺伝子の発現が異なる制御を受けていることを示す最初の報告であり、今後の詳細な検証によって筋肥大中のサテライト細胞増殖の包括的なメカニズム解明につながることを期待する。

運動による筋損傷は、骨格筋肥大に関与しているという報告がこれまでになされている[39,40]。サテライト細胞は損傷した筋線維の修復に不可欠であるため[3,8,9]、筋線維に実質的な損傷をもたらす運動を行った場合にはサテライト細胞の関与は必須と考えられる。本研究では代償性筋肥大モデルとしてより損傷が少ない Tenotomy 処置を用いた実験を実施した。さらに、損傷のない筋線維上でのサテライト細胞に関する検討のために単一筋線維法を組み合わせた解析を実施した。その結果、ほぼ全ての過負荷筋線維上で、静止期のサテライト細胞ではなく増殖期のサテライト細胞の存在が示された。この結果から、本モデルにおいては、もし局所的な筋損傷が発生していた場合でも、それがサテライト細胞の静止期からの離脱、増殖および筋核供給の要因とはならないことが示唆された。

HeyL-KO マウスにおける過負荷筋では、MyoD 発現増加を伴ってサテライト細胞が分化に向かうため、コントロールマウスよりもサテライト細胞の増殖が少ないことが示された。しかし、HeyL-KO マウスの Ki67 陽性サテライト細胞の割合は、コントロールマウスのそれと類似していたことから、サテライト細胞の静止期からの離脱には HeyL 欠損の影響を受けなかったことを示唆している。この結果は、サテライト細胞が静止期から離脱し、活性化/増殖するための因子が必要であることを示唆しているものの、その原因となるメカニズムは不明である。筋由来の一酸化窒素刺激による細胞外マトリックスからの肝細胞成長因子 (HGF) の分泌は、過負荷筋におけるサテライト細胞の活性化/増殖の潜在的な経路であることが報告されている[41,42,43]。一方で、HGF 受容体 (c-Met) をサテライト細胞で特異的に欠損させたマウスでは、筋傷害モデルでサテライト細胞の活性化/増殖に影響しなかったことが報告されている[44]。しかし、筋肥大モデルと比較すると、筋傷害モデルでは、サテライト細胞の活性化/増殖に寄与するいくつかの補完的な要因が含まれる可能性があるため、HGF の寄与が不明瞭になった可能性がある。サテライト細胞特異的な c-Met KO マウスにおいては、代償性筋肥大時のサテライト細胞の活性化と筋肥大自体に影響が見られる可能性があることから、c-Met KO を用いた筋肥大研究の結果が待たれる。

非ステロイド系抗炎症薬 (PGE2 を含むプロスタグランジンの合成の阻害剤) 投与によって、過負荷のヒト筋サテライト細胞活性を抑制したとの報告があることから[45]、炎症はサテライト細胞の活性化と増殖を誘導する候補と考えられる。さらに、PGE2 が筋傷害モデルでサテライト細胞の増殖を促進することも報告されている[46]。本研究では、一部のサテライト細胞がすでに活性化されている Tenotomy 処置 2 日後において、マクロファージ数の顕著な増加は観察されていないが、処置 4 日後で、マクロファージ数はわずかに増加した (Data 非表示)。マクロファージ枯渇モデルを用いた今後の研究により、損傷を受けていない過負荷筋でのサテライト細胞の活性化/増殖における炎症の

寄与が明らかとなることが望まれる。

さらに、機械的刺激は、過負荷筋におけるサテライト細胞の活性化/増殖に寄与する可能性がある。発生段階において、機械刺激依存性の Yap1 活性化は、Notch1 リガンド Jag2 の発現を誘導し、筋前駆細胞のプールを維持することが報告されている[47]。Yap1 が機械的刺激に応答して筋線維やサテライト細胞で活性化されるかどうかは現時点では不明であるが、機械的な過負荷は、サテライト細胞を静止状態から直接移行させ、その増殖を誘発する可能性がある。今後、これらの可能性について調査することは、過負荷筋におけるサテライト細胞の挙動の包括的な理解を助けるものになると考えられる。

筋線維における核数と細胞質の質量の比は、肥大前後で一定に保たれる (myonuclear domain theory) とされるため、サテライト細胞に由来する新しい筋核の供給は、筋量の増加に不可欠であると考えられている[48]。しかし、サテライト細胞欠損モデルにおいても、サテライト細胞は初期段階における筋肥大に必要なことが報告されている[16]。しかし、この報告に対して、足底筋がサテライト細胞の非存在下で過負荷誘発性筋肥大を起こさないことを示す反証論文の報告もなされている[12]。さらには、Tenotomy 処置による過負荷時には、筋線維内の nNOS が急速に活性化されること(3分以内)が最終的なタンパク質合成経路である mTOR の活性化を引き起こしたとする報告もある[49]。本研究では、筋線維のサイズの増加がすでに観察される Tenotomy 処置 1 週間後において[49]、HeyL-KO マウスはコントロールマウスと比較して筋重量の差を示さなかった。ただし、HeyL の欠損は、SA 処置 9 週間後で筋重量と筋線維サイズの両方に影響を与えることも明らかにした。この結果は、サテライト細胞の欠損が、SA 誘発性筋肥大の後期(8 週間)に影響を与えたという報告と合致する[13]。本研究の結果および既報をまとめて推測すると、「サテライト細胞の関与は筋肥大の初期段階では低いと考えられるが、サテライト細胞由来の新しい筋核の供給が筋線維および筋量の長期的増加の原因となる」と考えられる。

近年、我が国をはじめとする先進国での高齢化の進展に伴い大きな問題と考えられ注目が集まっている、加齢により“骨格筋量の低下”および“筋力もしくは身体機能の低下”を示すサルコペニアは、現状治療薬は存在せず栄養療法や運動療法が推奨されているもののそのエビデンスレベルは低いことから、筋量や筋力の改善効果を有する治療薬の開発が切望されている。筋ジストロフィーのような筋の傷害と再生を繰り返す疾患を想定適応症としたサテライト細胞の研究はこれまでも数多く報告されており、そのメカニズムは筋傷害モデルの実験結果からある程度明らかになってきている。一方で、サルコペニアにおいては顕著な筋傷害は認められないことから、これまでの先行研究で得られたサテライト細胞活性化メカニズムの知見が利用できるかという点には大きな疑問があった。今回私は、筋傷害の認められない筋肥大時のサテライト細胞の増殖の根底にある重要なメカニズムを明らかにした。今後、HeyL 発現下においてサテライト細胞の活性化/増殖を誘発する因子とメカニズムを解明する研究により、加齢性サルコペニア等の傷害を伴わない筋減少症に対するサテライト細胞を標的とした治療戦略が開発されることを期待する。

結論

本研究では、非傷害性の筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化/増殖メカニズムの解明を目的とした Tenotomy を中心とした代償性筋肥大モデルの解析を通し以下の結論を得た。

1. 代償性筋肥大時におけるサテライト細胞の活性化/増殖は、筋傷害を起点とした局所的なものではない。
2. 筋傷害時とは異なり、サテライト細胞の多くがKi67陽性MyoD陰性で増殖する。
3. 代償性筋肥大時のサテライト細胞の活性化は、筋線維と基底膜間でおこり、Notchシグナルの標的遺伝子であるHeyLの発現は維持される。
4. 代償性筋肥大時におけるHeyL欠損マウスではコントロールマウスに比べ、サテライト細胞のMyoD陽性比率の増加、サテライト細胞数増加の抑制、筋線維への筋核供給の抑制が認められる。
5. SAによる代償性筋肥大時におけるHeyL欠損マウスではコントロールマウスに比べ、筋線維断面積の増加抑制および、筋線維当たりの筋核数の低下傾向が認められる。

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、終始暖かい御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、辻川 和丈先生に心より謝意を表します。

また、本研究にあたり、種々の御指導、御指摘を頂きました大阪大学大学院薬学研究科准教授、深田 宗一郎先生に心より感謝いたします。

さらに本研究にあたり種々のご指導、ご協力を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科特任講師、神宮司 健太郎先生、上田 裕子先生、大阪大学大学院薬学研究科助教、長谷 拓明先生、そして北恵 郁緒里特任研究員に心より感謝します。

本研究の遂行にあたり、RNA-seq を実施いただきました九州大学生体防御医学研究所 附属トランスオミクス医学研究センター 大川 恭行先生、Hey1(-/-)と HeyL(-/-)を御供与頂きました広島大学大学院 医系科学研究科 小久保 博樹先生、ウサギ抗 M-Cadherin 抗体を御供与頂きました、国立精神・神経センター 武田 伸一先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、種々の実験に際しご協力を賜りました金重紀洋学士、梶貴志学士、野口裕太郎修士、竹本裕政修士、張礪丹修士を始めとする大阪大学薬学研究科 細胞生理学分野の皆様心より感謝致します。

参考文献

- [1] Judson R.N., Zhang R.H., Rossi F.M. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: Collaborators or saboteurs? *FEBS J.* 2013;280:4100–4108.
- [2] Fukada S, Ma Y, Ohtani T, Watanabe Y, Murakami S, Yamaguchi M. Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Frontiers in physiology.* 2013;4:317. Epub 2013/11/26.
- [3] Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 2012;139:2845–2856.
- [4] Bi P, Ramirez-Martinez A, Li H, Cannavino J, McAnally JR, Shelton JM, Sánchez-Ortiz E, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science.* 2017;356:323–327.
- [5] Millay DP, O'Rourke JR, Sutherland LB, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature.* 2013;499:301–305.
- [6] Quinn ME, Goh Q, Kurosaka M, Gamage DG, Petrany MJ, Prasad V, Millay DP. Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nature Communications.* 2017;8:15665.
- [7] Zhang Q, Vashisht AA, O'Rourke J, Corbel SY, Moran R, Romero A, Miraglia L, Zhang J, Durrant E, Schmedt C, Sampath SC, Sampath SC. The microprotein minion controls cell fusion and muscle formation. *Nature Communications.* 2017;8:15664.
- [8] Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development.* 2011;138:3639–3646.

- [9] Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*. 2011;138:3647–3656.
- [10] Wang YX, Rudnicki MA. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011;13:127–133.
- [11] Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European working group on sarcopenia in older people. *Age Ageing* 2010; 39: 412–23.
- [12] Egner IM, Bruusgaard JC, Gundersen K. Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development*. 2016;143:2898–2906.
- [13] Fry CS, Lee JD, Jackson JR, Kirby TJ, Stasko SA, Liu H, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. *The FASEB Journal*. 2014;28:1654–1665.
- [14] Fukada SI. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. *The Journal of Biochemistry*. 2018;163:353–358.
- [15] Goh Q, Millay DP. Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. *eLife*. 2017;6:e20007.
- [16] McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zant G, Campbell KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development*. 2011;138:3657–3666.
- [17] Schiaffino S, Bormioli SP, Aloisi M. The fate of newly formed satellite cells during

- compensatory muscle hypertrophy. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology*. 1976;21:113–118.
- [18] Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002;81:S52–S69.
- [19] Ebbeling CB, Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Medicine*. 1989;7:207–234.
- [20] Kuipers H. Exercise-induced muscle damage. *International Journal of Sports Medicine*. 1994;15:132–135.
- [21] Fridén J, Sjöström M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *International Journal of Sports Medicine*. 1983;4:170–176.
- [22] Grounds MD. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;854:78–91.
- [23] Darr KC, Schultz E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol*. 1987;63:1816–1821.
- [24] Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M, Ito T, Watanabe Y, Ohtani T, Murakami S, Uchida S, De Gaspari P, Uezumi A, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Hashimoto N, Braun T, Tanaka T, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development*. 2015;142:51–61.
- [25] Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of Cell Biology*. 2004;166:347–357.
- [26] 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. Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Experimental Cell Research*. 2004;296:245–255.
- [27] Baghdadi MB, Castel D, Machado L, Fukada SI, Birk DE, Relaix F, Tajbakhsh S, Mourikis P. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature*. 2018;557:714–718.
- [28] Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14:329–340.
- [29] Bjornson CR, Cheung TH, Liu L, Tripathi PV, Steeper KM, Rando TA. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells*. 2012;30:232–242.
- [30] Mourikis P, Sambasivan R, Castel D, Rocheteau P, Bizzarro V, Tajbakhsh S. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells*. 2012;30:243–252.
- [31] Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2003;194:237–255.
- [32] Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, Ogawa R, Uezumi A, Yoneda T, Matev MM, Motohashi N, Ito T, Zolkiewska A, Johnson RL, Saga Y, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H. Hes1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development*. 2011;138:4609–4619.
- [33] Lahmann I, Bröhl D, Zyrianova T, Isomura A, Czajkowski MT, Kapoor V, Griger J, Ruffault PL, Mademtzoglou D, Zammit PS, Wunderlich T, Spuler S, Kühn R, Preibisch S, Wolf J, Kageyama R, Birchmeier C. Oscillations of MyoD and Hes1 proteins regulate the maintenance

- of activated muscle stem cells. *Genes & Development*. 2019;33:524–535.
- [34] Noguchi YT, Nakamura M, Hino N, Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, Fukada SI. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: hey1 requires Hes1 to bind diverse DNA sites. *Development*. 2019;146:dev163618.
- [35] Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2006;54:1177–1191.
- [36] Webster MT, Manor U, Lippincott-Schwartz J, Fan CM. Intravital imaging reveals ghost fibers as architectural units guiding myogenic progenitors during regeneration. *Cell Stem Cell*. 2016;18:243–252.
- [37] Siegel AL, Atchison K, Fisher KE, Davis GE, Cornelison DD. 3d timelapse analysis of muscle satellite cell motility. *Stem Cells*. 2009;27:2527–2538.
- [38] Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. Calcitonin receptor signaling inhibits muscle stem cells from escaping the quiescent state and the niche. *Cell Reports*. 2015;13:302–314.
- [39] Damas F, Libardi CA, Ugrinowitsch C. The development of skeletal muscle hypertrophy through resistance training: the role of muscle damage and muscle protein synthesis. *European Journal of Applied Physiology*. 2018;118:485–500.
- [40] Schoenfeld BJ. Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy? *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2012;26:1441–1453.

- [41] Anderson J, Pilipowicz O. Activation of muscle satellite cells in single-fiber cultures. *Nitric Oxide*. 2002;7:36–41.
- [42] Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Developmental Biology*. 1998;194:114–128.
- [43] Yamada M, Sankoda Y, Tatsumi R, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Sunagawa K, Allen RE. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40:2183–2191.
- [44] Webster MT, Fan CM. c-MET regulates myoblast motility and myocyte fusion during adult skeletal muscle regeneration. *PLOS ONE*. 2013;8:e81757.
- [45] Mackey AL, Kjaer M, Dandanell S, Mikkelsen KH, Holm L, Døssing S, Kadi F, Koskinen SO, Jensen CH, Schrøder HD, Langberg H. The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103:425–431.
- [46] Ho ATV, Palla AR, Blake MR, Yucel ND, Wang YX, Magnusson KEG, Holbrook CA, Kraft PE, Delp SL, Blau HM. Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell

function, augmenting regeneration and strength. PNAS. 2017;114:6675–6684.

- [47] Esteves de Lima J, Bonnin MA, Birchmeier C, Duprez D. Muscle contraction is required to maintain the pool of muscle progenitors via YAP and NOTCH during fetal myogenesis. eLife. 2016;5:e15593.
- [48] Cheek DB, Powell GK, Scott RE. Growth of muscle mass and skeletal collagen in the rat. I. normal growth. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital. 1965;116:378–387.
- [49] Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. Nature Medicine. 2013;19:101–106.