The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	カルシトニン受容体を介した筋幹細胞の静止期維持メカニズムの解明
Author(s)	張, 礫丹
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76494
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　張　礫丹　　）	
論文題名	カルシトニン受容体を介した筋幹細胞の静止期維持メカニズムの解明

【背景・目的】

骨格筋は我々の日常動作に必要不可欠な組織であり、極めて優れた再生能力を有している。この再生能力を可能としているのが骨格筋幹細胞である筋衛星細胞である。他臓器・組織の幹細胞同様、骨格筋分野においても難治性筋疾患である筋ジストロフィーなどへの再生医療実現へ向け筋衛星細胞の利用が期待されている。本研究室では、細胞移植治療による筋ジストロフィー治療実現を目指して、筋衛星細胞の分子的な特徴付けとその再生医療への応用を目的に研究を行っている。これまでに、網羅的遺伝子発現解析によって静止期筋衛星細胞に特異的かつ高発現している遺伝子を数多く同定し、その機能解析を行ってきた。それら遺伝子の中で、静止期筋衛星細胞特異的かつ高発現していたCalcitonin receptor（Calcr）に着目し、筋衛星細胞におけるCalcrの生理的役割について検討をおこなった。その結果、筋衛星細胞特異的にCalcrを欠損させると、筋衛星細胞数の減少・静止期異常・局在異常が観察され、筋再生不全も観察された（1）。

また、我々はin vitroで活性化剤・阻害剤を用いることで、静止期維持経路としてCalcr-cAMP-Protein kinase A（PKA）経路を報告している。そこで、私は生体においても本経路が筋衛星細胞の静止期維持において本質的な経路か否かを、筋衛星細胞特異的かつ誘導型のPKA-tgマウスを用いて検討を行った。さらに、本経路の下流としてPKAがリン酸化するタンパクの候補としてHippo経路のLats1/2-Yap1について検証を行った(2)。

【実験方法・結果】

本研究ではまずCre-loxPシステムを用いてCalcrを筋衛星細胞特異的に欠損可能なPax7-CreERT2 :: Calcr flox/flox miceとレポーターマウスであるRosa-YFP（YFP）マウス交配したCalcr-cKOマウスを作成し、そこから単離した単一筋線維と免疫染色法により、Calcr-cKO筋衛星細胞でのKi67陽性率を検討した。その結果、これまでの組織学的な解析同様、Calcr-cKOの筋衛星細胞では、Ki67陽性率がコントロールマウスと比較して有意に高かった。

Calcrを介した静止期維持メカニズム解明の別のアプローチとして、PKAによりリン酸化される標的タンパク同定を試みた。その前提として、Calcr-cAMP-PKA経路が真の静止期維持経路であるかをはじめに検証した。方法としては、誘導型のcatalytic domain PKA 発現トランスジェニックマウス（caPKA-tg）を用いた。まず、in vitroにおける筋衛星細胞の自発的な活性化における作用を検討した結果、caPKA-tgは有意な筋衛星細胞の活性化抑制作用を示した。次に、CalcR-cKOかつcaPKAを発現するマウス作製し、Calcr-cKOと比較した。その結果、caPKA-tgによりCalcr-cKOマウスでみられる静止期異常の筋衛星細胞数は顕著に抑制されていた。

Calcr-cAMPーPKAが筋衛星細胞の静止期維持機構の本質であることがわかったため、PKAによりリン酸化される標的タンパクの検証を行った。その結果、PKAの最も有名な標的タンパクであるCREB（cAMP response element binding protein）ではなく、Hippo経路のメンバーであるLats1/2を強力にリン酸化することを、筋系譜細胞株を用いたウエスタンプロット法により観察することができた。さらに、Last1/2により核への局在が制御されるYap1においてもCalcr-PKA経路が関わっていることを筋系譜細胞株の細胞染色により明らかにした。

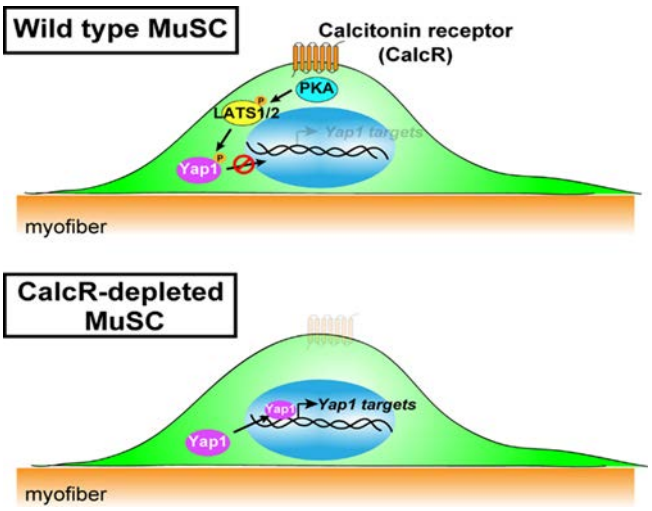
最後にCalcR欠損筋衛星細胞の静止期異常におけるYap1の役割を明確にするために、CalcR-Yap1二重欠損マウス（co-dKO:Pax7CreERT2 / + :: Calcr flox / flox :: Yap1 flox / flox :: Rosa-YFP）を作製した。Calcr-cKOマウス筋衛星細胞での静止期異常はYap1欠損により、レスキューできることが明らかとなった。

【結論・考察】

本研究では筋衛星細胞の、Calcitonin receptorは、cAMP→PKA経路によりLats1/2をリン酸化し、細胞周期関連

遺伝子の発現を制御するYap1の核移行を抑制することで、筋衛星細胞の静止期を維持していると考えられる。そのため、CalcR欠損でみられる静止期異常がPKAの発現やYap1の欠損でレスキューできたと考えた。このモデルは、機械的刺激により核移行が促進するYap1の抑制機構として、動く組織である骨格筋において筋衛星細胞が維持するためのモデルでもある。

結論として、我々はCalcR-PKAシグナルによるHippo経路の調節が筋衛星細胞の静止状態の維持に重要であり、静止状態の維持におけるPKAの役割を解明した。 GPCRを介したHippo経路の調節は、静止期維持にGPCRが重要な役割を果たす他の組織や臓器の幹細胞でも重要な機能を果たしている可能性がある。本成果を起点としたさらなる成体幹細胞の静止期調節するメカニズム解明が、成体幹細胞の年齢依存的低下を防ぐ手法開発や筋萎縮などの筋疾患治療開発に繋がる事を期待している。



【参考文献】

1. Yamaguchi M,et al. “Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche.” Cell Rep. 2015 Oct 13;13(2):302-14. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.083.

2. Yu FX,et al. “Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling.” Cell. 2012 Aug 17;150(4):780-91. doi: 10.1016/j.cell.2012

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（張　礫丹）	
論文審査担当者	（職）　氏　名 主 査　教授　辻川和丈 副 査　教授　土井健史 副 査　教授　藤尾　慈

論文審査の結果の要旨

骨格筋には筋サテライト細胞として知られている、骨格筋固有の幹細胞が存在する。他の組織幹細胞と同様に、筋サテライト細胞も成体において細胞周期G0期（静止期）かつ未分化状態で維持されている。筋サテライト細胞は、骨格筋の恒常性維持に必須なため、その維持機構解明は骨格筋研究において非常に重要な研究課題である。学位申請者は、筋サテライト細胞が静止期の状態の時にのみ特異的に発現しており、更に静止期状態の維持に必須の分子であるカルシトニン受容体（CalcR: Calcitonin receptor）に着目し、CalcRの下流シグナルに関する研究を行なった。複数の筋サテライト細胞特異的な遺伝子改変動物、単一筋線維培養法、ウエスタンブロット、ChIP-PCR、Real-time PCR、PLAアッセイ、Capillary-based immunoassay法、などを駆使して、筋サテライト細胞におけるCalcRの下流シグナルを明らかにした。

本論文の新規性は、
１．筋サテライト細胞におけるCalcRの下流として、Protein Kinase A (PKA)が働いていることのin vivoでの証明。
２．そのPKAの標的はHippo経路（組織サイズを決定するシグナル経路）の主要な構成分子であるLast1/2である。
３．CalcRシグナルがYap1の核移行が阻害する事。

以上より、CalcR-PKA-Lats1/2を介したYap1の制御が、筋サテライト細胞の静止期維持シグナルである事を証明し、GPCRを介した生理的なHippo経路の制御機構の世界初の証明であることより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。