



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

令和元年度 博士学位論文

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

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

細胞生理学分野

張 礫丹

目次

緒論.....	3
本論.....	5
第一章 筋衛星細胞の自発的な活性化における PKA の機能解析.....	5
第 1 節 実験材料および方法.....	5
第 2 節 PKA-tg マウス由来の筋衛星細胞における PKAC [α]タンパク質の発現量....	8
第 3 節 筋衛星細胞の自発的な活性化における PKA の検討.....	9
第 4 節 筋衛星細胞の自発的な活性化における Elcatonin の効果.....	11
第 5 節 小括.....	12
第二章 CalcR 欠損筋衛星細胞の静止期異常における PKA の in vivo での検討.....	13
第 1 節 実験材料および方法.....	13
第 2 節 Single myofiber での CalcR 欠損筋衛星細胞の静止期異常の確認.....	17
第 3 節 PKA により cKO でみられる活性化筋衛星細胞数の検討.....	18
第 4 節 PKA により cKO で筋衛星細胞数の検討.....	19
第 5 節 小括.....	21
第三章 CalcR-PKA シグナルを介した Yap1 の局在制御の検討.....	22
第 1 節 実験材料および方法.....	22
第 2 節 CalcR シグナルの PKA 依存的な Hippo 経路抑制.....	27
第 3 節 CalcR シグナル伝達は Yap1 の核局在を抑制する.....	29
第 4 節 筋衛星細胞において PKA-Lats-Yap1 経路が存在する可能性の検討.....	31
第 5 節 Yap1 の局在制御が、CalcR-PKA で制御されている可能性の検討.....	32
第 6 節 CalcR-cKO 筋衛星細胞における Yap1 標的遺伝子の発現検討.....	34
第 7 節 小括.....	35
第四章 Yap1 の欠損により、CalcR-cKO 筋衛星細胞の静止状態の検討.....	37
第 1 節 実験材料および方法.....	37
第 2 節 CalcR 欠損かつ Yap1 欠損マウスの解析.....	38
第 3 節 小括.....	39
総括.....	40
結論.....	42
謝辞.....	43
略語一覧.....	44
参考文献.....	45

緒論

骨格筋は、我々の体重の中で 30-40%を占める器官であり、筋の成り立ちは筋系譜細胞のダイナミックな増殖・分化・遊走・融合過程を伴う。Paired Box の転写因子である Pax7 を発現する筋衛星細胞 (MuSC: Muscle Satellite Cell) は、出生後の骨格筋の発達または成体での再生過程において新しい筋線維を生成する骨格筋固有の幹細胞である

(Charge and Rudnicki, 2004)。損傷していない成体の骨格筋では、筋衛星細胞は筋線維を囲む基底膜と筋線維の細胞膜の間に存在し、有糸分裂の G0 期 (静止期) で維持されている (Mauro, 1961)。筋衛星細胞は、筋再生・筋の恒常性維持に必要なため、その静止期維持機構解明は骨格筋研究において最重要課題の一つである。他の成体幹細胞と同様に、筋衛星細胞の静止期維持に必要な分子群は徐々に明らかになってきているが

(Baghdadi et al, 2018; Cheung and Rando, 2013; Yamaguchi et al, 2015)、その一つが、我々が同定したカルシトニン受容体 (CalcR: Calcitonin Receptor) である。しかし、その下流シグナルの全容はまだ明らかにされていない (Dumont et al, 2015)。

酵母を用いた先駆的研究により、「G0 期」の本質的かつ基本的な概念とシグナル伝達経路は明らかにされている (Dhawan and Laxman, 2015)。静止状態への移行には TORC1 (Target of rapamycin complex 1) と PKA (Protein Kinase A) の抑制が必要であり、逆に静止期から細胞周期への再進行には TORC1 と PKA の活性化を必要とする (Gray et al, 2004)。哺乳類細胞においても、哺乳類 TORC1 (mTORC1) の細胞の成長や増殖における役割は確立されている。また、成体幹細胞において mTORC1 の活性化は G0 期の造血幹細胞や筋衛星細胞を Galert と呼ばれる G0 期と G1 期の中間の状態に移行させる。つまり、酵母同様、成体幹細胞の G0 期維持においても mTORC1 の抑制が必要であると考えられる (Gan and DePinho, 2009; Rodgers et al, 2014)。一方、Gs GTP 結合タンパク質 α サブユニット (G α s) をコードする遺伝子の機能獲得変異は、ヒトの悪性腫瘍で頻繁に観察される (O'Hayre et al, 2013)。G α s の代表的な機能は、PKA を活性化することである。つまり、細胞を G0 期に保ち、細胞周期の進行を抑制するために酵母同様 G α s-PKA 軸を抑制する必要性が示唆されている。しかし、我々の以前の研究では、CalcR の下流の PKA の「活性化」が、筋衛星細胞の静止状態を維持する可能性を報告している (Yamaguchi et al, 2015)。そのため、酵母や哺乳動物細胞での PKA の役割と筋衛星細胞の静止期維持における PKA の結果には、矛盾がある。

G タンパク質共役受容体 (GPCR) である CalcR は、筋衛星細胞の静止期状態で特異的に発現され、筋衛星細胞の活性化に伴い CalcR 発現は顕著に減少する (Yamaguchi et al, 2015)。筋衛星細胞での CalcR 遺伝子の欠損により、1) 筋衛星細胞数の減少、2) 細胞周期関連遺伝子の発現を増加、3) ニッチから逃れた筋衛星細胞数の増加などが観察される (Yamaguchi et al, 2015)。最近、我々はフランスのグループとの共同研究により CalcR リガンドとしてコラーゲン V (ColIV) を同定し、筋衛星細胞の静止期維持経路として ColIV-CalcR シグナルの重要性を示した (Baghdadi et al, 2018)。CalcR は G α s を結合するため、G α s 依存性 cAMP を介した PKA の活性化は、ColIV-CalcR シグナルの潜在的な下流シグナル経路でもある。PKA の最も一般的なターゲットである cAMP 応答要素結合タンパク質 (CREB) は、筋衛星細胞の静止期維持に大きな役割を果たさない事が報告されている。これは、PKA が真の静止期シグナルとして働いている場合には、PKA は CREB 以外の分子を標的にしている可能性を示唆している (Li and Fan, 2017)。

Hippo シグナル伝達経路は、臓器サイズの制御、細胞増殖、腫瘍形成において重要な役割を果たしている (Yu et al, 2015)。哺乳類の Hippo 経路では、mammalian Ste20-like kinases (Mst1/2) と large tumor-suppressor kinases (Lats1/2) が、発癌性タンパク質として作用する転写コアクチベーターである Yes-associated protein 1 (Yap1) を調節する (von Gise et al, 2012)。Hippo 経路は、GPCR、機械的刺激、ホルモンシグナルなど、さまざまなシグナルによって制御されている (Meng et al, 2016)。いくつかの研究は、Yap1 の活性化が分化細胞の細胞周期停止を解除することを示し (Benham-Pyle et al, 2015; Xin et al, 2013; Zhou et al, 2009)、Yap1 活性が細胞周期の進行に直接関与していることを示唆している。さらに、Judson らは筋細胞の増殖における Yap1 の重要な役割を報告している (Judson et al, 2012)。

そこで、申請者は筋衛星細胞における CalcR の下流シグナル解明を目的に、1) PKA が真の静止期シグナルとして CalcR の下流で働いているのか？ 2) Lats1/2-Yap1 経路が PKA の標的であるかを検証することを目的に研究を行った。その結果、CalcR-PKA-Lats1/2-Yap1 経路が筋衛星細胞における静止期シグナルの本質である証拠が得られたため、学位論文としてここにまとめる。

本論

第一章 筋衛星細胞の自発的な活性化における PKA の機能解析

CalcR は Gαs と共役する GPCR であり、PKA がその下流として機能する事で筋衛星細胞の静止期を維持する結果を 2015 年に報告した (Yamaguchi et al, 2015)。しかし、これらの結果は全て阻害剤・誘導剤を用いた *in vitro* の結果であった為、*in vivo* での決定的な証拠が必要であった。

そこで、まず始めに PKA が筋衛星細胞の静止期維持に重要な役割を果たすかどうかを検討した。タモキシフェン依存性かつ筋衛星細胞特異的に CreERT2 を発現する Pax7CreERT2 と PKA の触媒サブユニット (PKAC[α]) を発現するトランスジェニックマウスを交配し、筋衛星細胞特異性かつタモキシフェン依存性な PKA-tg マウスを作製した (Figure 1A)。PKA の触媒サブユニットの増加は、制御サブユニットによる cAMP 依存的活性化をバイパスし、PKA の下流を活性化する事が報告されている (Antos et al, 2001)。PKA-tg マウスにさらに、ROSA-YFP レポーターマウスを交配することで、筋衛星細胞を YFP で標識しかつ PKA を発現するマウスを作製した。

本実験では主に単離 Single myofiber 法を用いた検討を行った。組織学的解析と比較した、単離 Single myofiber 法のメリットは、筋衛星細胞の全体像を観察でき、マウス組織学的解析には不向きな抗体 (発現性の弱さ、マウス抗体など) においても、信頼性の高いデータを得ることができる。また、組織学的解析より、コントロールの数値のバラツキが少ないため、定量性においても優れている。

本章では自発的な筋衛星細胞の静止期から活動期への移行に、PKA が機能するかを検証した。

第 1 節 実験材料と方法

試薬

Elcatonin (Eel calcitonin) は旭化成ファーマ (Tokyo, Japan) から、EdU は Thermo Fisher Scientific からそれぞれ購入した。

マウス

Pax7-CreERT² mice、ROSA-YFP mice は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。C57BL/6J mice は日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) から購入した。PKAC[α]を Cre 依存性に発現するトランスジェニックマウスは大阪大学臨床薬効解析学分野藤尾慈先生と中山博之先生らが作製したマウスを使用させて頂いた。

ジェノタイピング

PKA-tg mice のジェノタイピングは尻尾由来の genome DNA を用いた PCR 法にて行った。PKA typing FW (GAGCGTGAAAGAGTTCCTAG) と PKA typing RV (CAAGTTTGACCAGGAACGG) の primer ペア、あるいは Pax7CreERT² forward primer

(5'-ACTAGGCTCCACTCTGTCCTTC-3') と Pax7CreER^{T2} reverse primer (5'-GCAGATGTAGGGACATTCCAGTG-3') の primer、ROSA-YFP に対しては Common (5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT)、Mutant (5'-AAGACCGCGAAGAGTTTGTGTC)、WT (5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG) primer ペアを用いて PCR を行い、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

Tamoxifen 投与による Cre recombinase の発現誘導

Sunflower seed oil (Sigma-Aldrich) を用いて、終濃度 20 mg/mL の tamoxifen (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) を調整した。調整した溶液を adult mice に 300 µg/g body weight の量で 24 時間毎に 2 回腹腔内投与した。

マウス骨格筋からの単一筋線維の単離及び培養、染色法

マウスから長指伸筋を単離し、37°C に保温した 0.5% collagenase type I (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ) 中で穏やかにほぐしながら 90 分間インキュベートした。その後、horse serum (Sigma-Aldrich) でコート後 DMEM-low glucose (Sigma-Aldrich) を入れたペトリディッシュ (Greiner Bio-One) に移しピペッティングすることで単一筋線維を得た。単離直後の単一筋線維を染色する場合はすぐに 4% PFA (paraformaldehyde) で 10 分インキュベートした。培養する場合は horse serum でコート後、増殖培地 (第一章、第一節に記した) を入れた non-treated dish (IWAKI) に移し 37°C CO₂ インキュベーターで培養した。単一筋線維を阻害剤で処理する場合は all free の high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) を用いて阻害剤を希釈した培地で 2 時間培養後に上記方法で培養を行った。培養終了後 4% PFA (paraformaldehyde) で 10 分インキュベートした。染色は Permeabilization buffer (20 mM HEPES、300 mM sucrose、50 mM Na Cl、3 mM MgCl₂、0.5% Triton-X) で 30 分、Blocking buffer (5% FCS、0.01% Triton-X/PBS) で 1 時間室温でインキュベートした後 Blocking buffer で希釈した 1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。以降は前項に準じて行った。用いた 1、2 次抗体は Table 1、2 に示した。検体は蛍光顕微鏡の BX-X710 (Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。

Table 1; Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Goat anti-GFP	Polyclonal		Unconjugated	SICGEN(AB0020-200)	IHC: x1000, ICC: x1000
Rat anti-Ki67	SolA15	IgG2a.K	Unconjugated	Thermo Fisher Scientific (14-5698-82)	IHC: x200 ICC (SMF): x200

Table 2; Secondary antibodies

Antibodies	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Chicken anti-rat IgG	Alexa Fluor 647	ThermoFisher Scientific	IHC: x1000

Donkey anti-goat IgG	Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	ICC: x1000
----------------------	-----------------	-------------------------	------------

Capillary-based immunoassay

細胞を 10 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1% sodium deoxycholate、1% TritonX-100、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche, Basel, Switzerland)、およびホスファターゼ阻害剤カクテル (Roche) 溶液にて溶解した。タンパク質濃度は、Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) を使用し測定した。0.1X sample buffer 2 (Proteinsimple, sample buffer) を用いて、各サンプルのタンパク質濃度を 0.5 mg/ml に調整した。キャピラリーを備えた自動キャピラリー電気泳動システム Wes (Proteinsimple) を使用して、タンパク質の分離と検出を行った。Compass software (Proteinsimple) を用いて、シグナルの定量解析を行った。用いた試薬は Table 3 に示した。

Table 3; Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Mouse anti-PKA[C α] subunit(clone 5B)	5B	IgG2b	Unconjugated	BDTransducyion Laboratories™(610980)	IHC: x1000, ICC: x1000

統計解析

有意差検定は Student's t test で行った。3 群以上の比較の場合、non-repeated measures analysis of variance (ANOVA) の Bonferroni test (vs control) を用いた。有意水準を 5% ($p < 0.05$) もしくは 1% ($p < 0.01$) とした。

第2節 PKA-tg マウス由来の筋衛星細胞における PKAC [α]タンパク質の発現量

PKA-tg (Pax7CreERT2::PKA-tg::Rosa-YFP) マウスと Control (Cont: Pax7CreERT2::Rosa-YFP) マウスに tamoxifen を投与し、1週間後に筋衛星細胞を単離し解析を行った。Capillary-based immunoassay により解析をおこなった結果、Cont マウス由来筋衛星細胞より PKA-tg マウス筋衛星細胞は約2倍の PKAC [α]のタンパク質発現をしていることが確認できた (Figure 1)。以降、このマウスを用いて実験を行った。

A

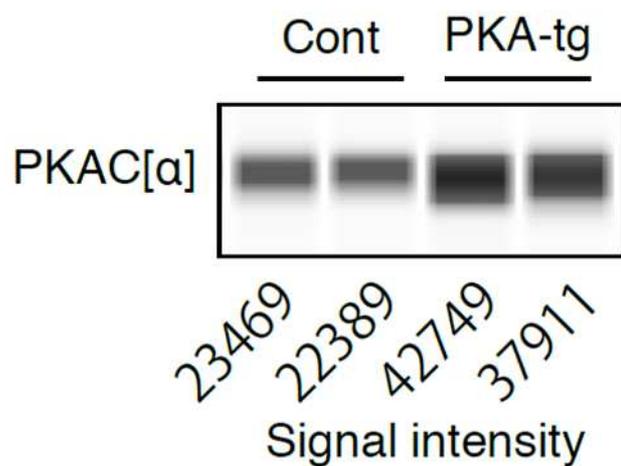


Figure 1

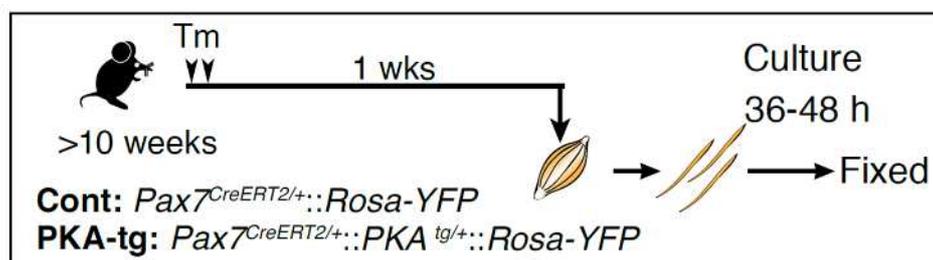
(A): Expression level of PKA catalytic subunit α (PKAC[α]) in freshly isolated MuSCs derived from Cont or PKA-tg hind limb muscles. An equal amount of total protein was loaded for each sample ($n=2$). The values indicate signal intensity.

第3節 筋衛星細胞の自発的な活性化における PKA の検討

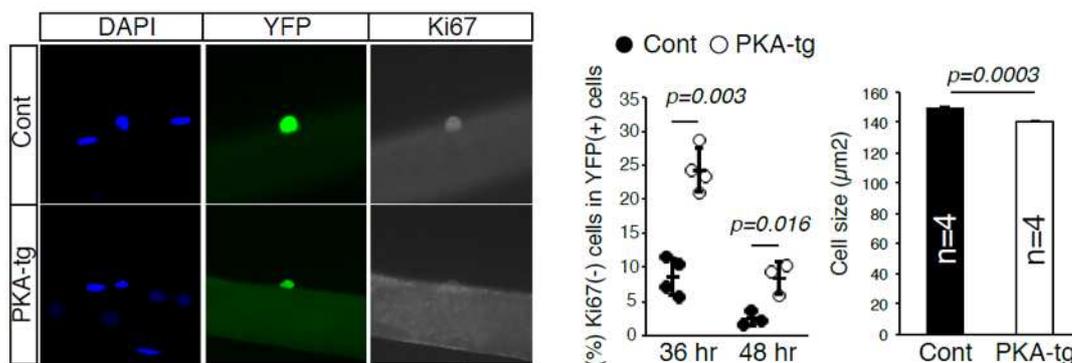
次に筋衛星細胞の自発的な活性化における PKA の作用を検討した。PKA-tg (Pax7CreERT2::PKA-tg::Rosa-YFP) マウスと Control (Cont: Pax7CreERT2::Rosa-YFP) マウスに tamoxifen を投与し、1週間後に培養 single myofiber 法で Ki67 の発現および EdU 取り込みの解析を行った (Figure 2A)。Ki67 は細胞周期 G0 期以外に発現する増殖マーカーであり、EdU は DNA の複製時に取り込まれるチミジンアナログである。つまり、Ki67 陰性は G0 期の静止期細胞であり、EdU 陰性は細胞増殖を開始していない細胞である。経時変化を観察する目的で、培養後 36 時間と 48 時間で検討をおこなった。その結果、Cont では単離した筋線維を 36 時間培養するとほぼすべての筋衛星細胞が Ki67 陽性 (Figure 2B) または EdU 陽性 (Figure 2C) になるのに対して、PKA-tg では、Ki67 陰性または EdU 陰性の割合が有意に高いことが分かった (Figure 2B, 2C)。しかし、PKA-tg を発現させても、48 時間では Control の 36 時間の結果と同様に 90% の筋衛星細胞が Ki67、EdU 陽性になった。

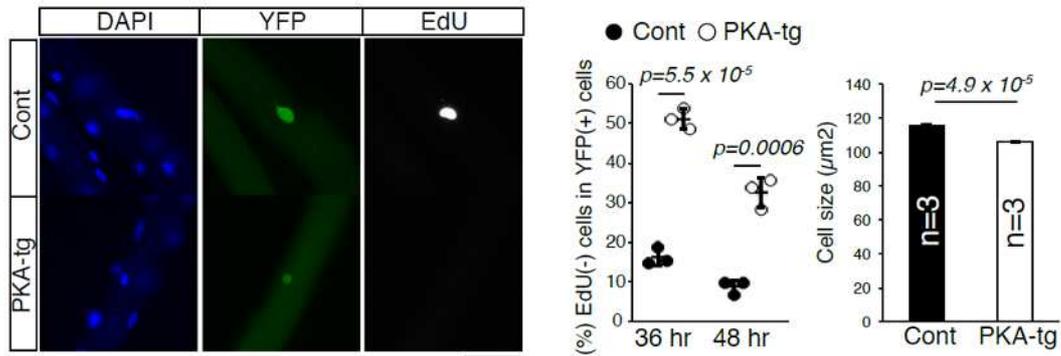
筋衛星細胞は活性化に伴い、その細胞サイズが増大する事が報告されている。そこで、培養 36 時間後の筋衛星細胞のサイズを定量した結果、PKA-tg マウス筋衛星細胞のサイズは、Control 筋衛星細胞と比較して有意に小さいままであった。以上の結果は、PKA は筋衛星細胞の自発的な活性化を阻害しているわけではなく、遅延させる事が明らかになった。

A



B



C**Figure 2**

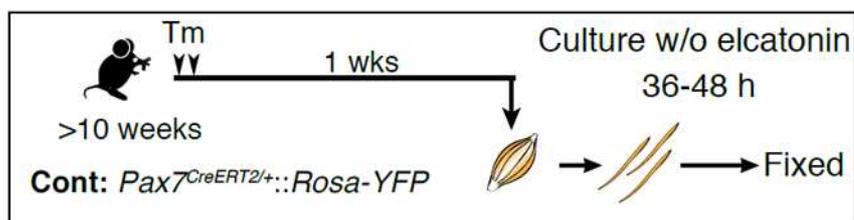
(A): Experimental scheme for analysis of PKA effects in MuSCs on cultured single myofibers derived from Control (Cont) or PKA-tg EDL muscles 1 week after Tamoxifen (Tm) injection.

(B,C): Immunostaining of MuSCs on cultured single myofibers with anti-YFP and -Ki67 471 antibodies (B), or with anti-YFP antibody and EdU (C). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 50 μm. Dot graph shows the frequency of Ki67- or EdU- cells in YFP+ MuSCs on myofibers from Cont or PKA-tg mice after 36 or 48 hours of culture. Bar graph indicates the average cell size of YFP+ MuSCs on myofibers from Control or PKA-tg mice 36 hours after culture.

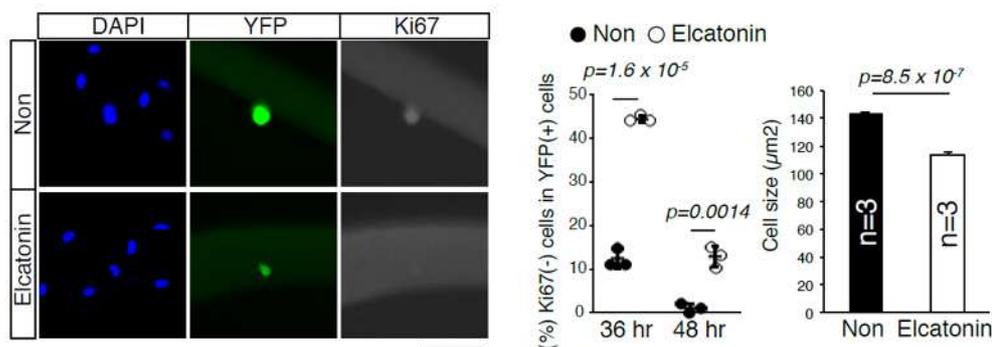
第4節 筋衛星細胞の自発的な活性化における Elcatonin の効果

同様の実験を single myofiber 法により単離した Control (Cont; Pax7CreERT2::Rosa-YFP) 筋線維を用いて、CalcR ligand である Elcatonin を用いて検証した。Elcatonin を含む培地で培養 36、48 時間後の単一の筋線維上筋衛星細胞の Ki67 または EdU 取り込みの試験を行った結果、Elcatonin も PKA-tg と同様の効果を発揮する事が明らかとなった (Figure 3A-C)。以上の結果より、PKA が CalcR の下流として、筋衛星細胞の自発的な活性化を抑制する可能性が強く示唆された。

A



B



C

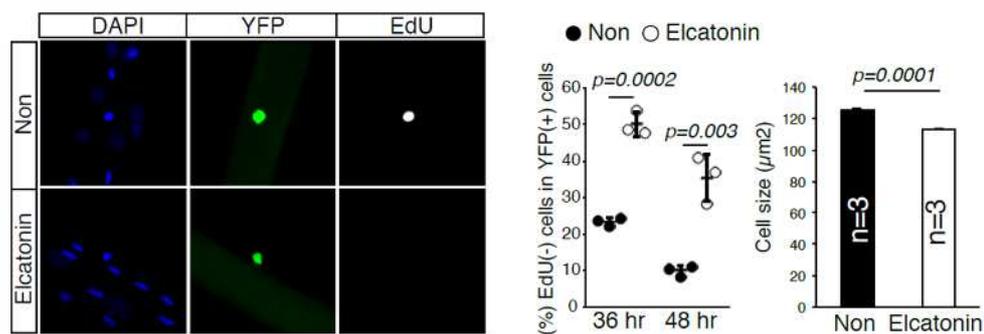


Figure 3

(A): Experimental scheme for analysis of elcatonin effects in MuSCs on a cultured single myofiber from Control mice 1 week after Tm injection. Freshly isolated myofibers were cultured with or without elcatonin for 36 or 48 hours before fixation. (B,C): Immunostaining of MuSCs on cultured single myofibers with anti-YFP and -Ki67

antibodies (B) or with anti-YFP antibody and EdU (C). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 50 μm . Dot graph shows the frequency of Ki67- or EdU- cells in YFP+ MuSCs on Non- or Elcatonin-treated myofibers after 36 or 48 hours of culture. Bar graph indicates the average cell size of YFP+ MuSCs on non- or elcatonin-treated myofibers 36 hours after culture.

第 5 節 小括

- 筋衛星細胞特異的かつ誘導型の PKA-tg マウスを作製した。
- PKA の活性化は、CalcR シグナル同様に筋衛星細胞の自発的な活性化を遅延させた。

第二章 CalcR 欠損筋衛星細胞の静止期異常における PKA の in vivo での検討

CalcR シグナル伝達における PKA の役割をさらに実証するために、PKA-tg と CalcR-cKO (cKO; Pax7CreERT2/+::CalcR flox/flox) マウスを交配させて、CalcR-cKO::PKA-tg (cKO-PKA) マウスを作製した。このマウスに tamoxifen を投与し、2 週間後に single myofiber 法、免疫組織染色、フローサイトメトリー法、Real-time PCR などを用いて解析を行った。

第 1 節 実験材料と方法

マウス

C57BL/6J mice は日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) から購入した。CalcR-floxed mice は我々が作製した系統を用いた。PKA-tg mice、Pax7CreERT² mice、および ROSA-YFP mice は第一章、第 1 節に記した mice を用いた。

ジェノタイピング

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。CalcR-floxed mice に対して loxp forward primer (5' -CAACTATACTCTGTGCAACGC-3') と loxp reverse primer (5' -TAATACGCTTCAGAAACC-3') の primer セットを用いた。

Tamoxifen 投与による Cre recombinase 作用の発現誘導

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。

マウス骨格筋からの単一筋線維の単離及び培養、染色法

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。この章で新たに用いた二次抗体は Table4 に記した。

Table4 Secondary antibodies

Antibodies	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Donkey anti-rat IgG	Alexa Fluor 568	Molecular Probes	IHC: x1000

マウス骨格筋由来単核細胞の調製法及び flow cytometry 法による単離・解析

マウス骨格筋を摘出し腱や付着組織を取り除いた後、2~3 mm 四方になるようにハサミでミンチした。ミンチした筋を 0.2% collagenase type II (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) に 3 mL/g muscle weight となるように懸濁した。37°C で 60 分間、スターラーで攪拌した後、18 G の注射針とシリンジを用いてピペティングした。さらに 30 分間攪拌した後、PBS を加えて希釈しナイロンメッシュに通した。1700 rpm、4°C、10 分間遠心した後、上清を捨て modified ACT 溶液 (Tris-buffered ammonium chloride) (17 mM Tris-HCl (pH7.65)、0.75% NH₄Cl) を 1 mL 加え、室温で 1 分間インキュベートした。

2% FCS/PBS を加えて modified ACT 溶液を希釈して 1500 rpm、4°C、5 分間遠心した。単核の細胞を抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体、S 抗 ca-1 抗体、抗 SM/C-2.6 抗体と氷上で 30 分間反応させた。その後 allophycocyanin conjugated streptavidin (BD Biosciences, San Diego, CA) と氷上で 30 分間反応させた。用いた抗体の詳細は Table 5 に示した。抗体と反応させた細胞を 2% FCS/PBS に懸濁し 2 µg/mL になるよう propidium iodide を加えた。細胞は FACS Aria II™ flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) でソーティングした。解析は FACSDiva™ software (BD Biosciences) で行った。Satellite cells は SM/C-2.6(+)/CD31(-)/CD45(-)/Sca-1(-) 分画に濃縮されている。ROSA-YFP::cKO mice 及びそのコントロールマウスの場合、細胞懸濁液を ACT 溶液で処理した後に 2% FCS/PBS に懸濁し 2 µg/mL になるよう propidium iodide を加え、上記の flow cytometer、software を用いて FITC 陽性の細胞分画をソーティングした。

Table 5; Primary antibodies and reagents

Antigen	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Application
CD31	390	Rat IgG2a, κ	FITC	BD PharMingen	FACS: x400
CD45	30-F11	Rat IgG2b, κ	FITC	BD PharMingen	FACS: x800
Sca-1	D7	Rat IgG2a, κ	PE	BD PharMingen	FACS: x400
Satellite cells	SM/C-2.6	Rat IgG2a	Biotin	Ref) Fukada et al. ECR, 296,245-255	FACS: x200

Real-time PCR

専用の LightCycler 8 連チューブ(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) に適当に希釈した cDNA 溶液を 1 µL、2x SYBR Premix Ex Taq (Takara) を 5 µL、10 µM プライマー (Forward 鎖, Reverse 鎖) を各 0.2 µL (終濃度; 0.2 µM) ずつ、DNase-free water を 2.6 µL 添加した後、Applied Biosystems Step plus qPCR cyclers (Thermo Fisher Scientific) を用いて目的遺伝子を定量解析した。内部標準遺伝子として、Gapdh (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子もしくは Hprt (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) を用いた。定量に用いたプライマーは Table 1 に示した。また定量に必要な検量線用の PCR 産物を得るため、次項に記載した RT-PCR 法に準じて目的産物の増幅を行い、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp.) を用いて、添付書に従い精製した。検量線用のプライマーは Table 2 に示した。

RT-PCR

Total RNA は Qiagen RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。cDNA 合成は QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN) を用いた。いずれも添付書に従い操作を行った。PCR は合成した cDNA と各遺伝子に特異的な primer を用いて行った。用いたプライマーは Table 6, 7 に示した。

Table 6; Primer Sequences for real-time PCR

Gene		Sequence	Size
<i>Gapdh</i>	Forward	5'-TGTCAAGCTCATTTCCTGG	156
	Reverse	5'-TTGGGGGCCGAGTTGGGATA	
<i>Calcr</i>	Forward	5'-TCATCATCCACCTGGTTGAG	288
	Reverse	5'-GCTCGTCCGGTAAACACAGC	
<i>Ccna2</i>	Forward	5'-GAGTTTGATAGATGCTGACC	129
	Reverse	5'-TATCCAGTCTGTTGTGCC	
<i>Ccnd1</i>	Forward	5'-CAGAGTCATCAAGTGTGACCC	196
	Reverse	5'-GGTGGCCCTCAGATGTCC	
<i>Ki67</i>	Forward	5'-TTCAGTGAAGATCTGTCAGG	328
	Reverse	5'-AGACAAATTCGCTGAATTGG	
<i>Ccnb1</i>	Forward	5'-CTTGACAACGGTGAATGG	131
	Reverse	5'-GTCATGTGCTTTGTGAGG	
<i>Cdk4</i>	Forward	5'-CACCTCCAGAGCTCTTAGCC	110
	Reverse	5'-TTGTACACCGTCCCATAGGC	

Table 7; Primer Sequences for standard

Gene		Sequence	Size
<i>Gapdh</i>	Forward	5'-GAAGGTGGTGAAGCAGGCATCT	365
	Reverse	5'-GTATTCAAGAGAGTAGGGAGGG	
<i>Calcr</i>	Forward	5'-GTCGATTGCTGCTTTGTTGCTTCC	365
	Reverse	5'-GTGATGGCGTGGATAATGGTTGGC	
<i>Ccna2</i>	Forward	5'-CGAAGTTTGAAGAAATATACCCC	355
	Reverse	5'-GTATATCCAGTCTGTTGTGCC	
<i>Ccnd1</i>	Forward	5'-CAGATGTGAAGTTCATTTC	423
	Reverse	5'-CTGGTAACAACATGTCCC	
<i>Ki67</i>	Forward	5'-GCTGATGTTGTAATAACTTGG	379
	Reverse	5'-AGACAAATTCGCTGAATTGG	

免疫組織化学染色

骨格筋凍結試料は液体窒素で冷却した isopentane (Wako Pure Chemical Industries) 中で凍結させて作製した。マウス前脛骨筋の凍結試料を筋線維に対して垂直に 6 μ m に薄切し、4% PFA (paraformaldehyde) 中で 10 分間インキュベートした。インキュベート後 5% skim milk で 1 時間ブロッキングを行い、1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。用いた 1 次抗体は Table 8 に示した。1 次抗体と反応させた後 Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 568 コンジュゲートの 2 次抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) を室温で 1 時

間反応させた。用いた 2 次抗体は Table 9 に示した。封入には Vectashield (Vector Laboratories Inc) を用いた。染色像は蛍光顕微鏡の fluorescence microscope BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) 付属の DP70 CCD camera (Olympus) で観察・撮影した。

Table 8; Primary antibodies

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Mouse anti-Pax7	PAX7	IgG1, κ	Unconjugated	DSHB	ICC:x2 (supernatant)
Rat anti-laminin α 2	4H8-2	IgG1	Unconjugated	Alexis	IHC: x200

Table 9; Secondary antibodies

Antibodies	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Donkey anti-rat IgG	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	IHC: x1000
Donkey anti-mouse IgG	Alexa Fluor 568	Molecular Probes	ICC: x1000

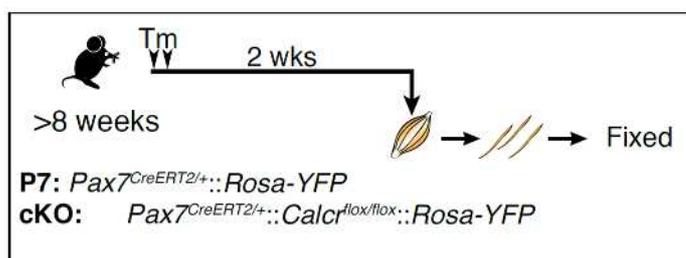
統計解析

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。

第2節 Single myofiber での CalcR 欠損筋衛星細胞の静止期異常の確認

我々は CalcR 欠損により、筋衛星細胞の静止期異常 (Ki67 陽性細胞の増加) が見られることを組織学的な免疫組織化学染色により観察している。そこで、本研究において主に用いる単離 Single myofiber 法においてもこれまでの結果の再現が取れるかについて検討を行った (Figure 3A)。Figure 3B に示すように、コントロール(P7)では YFP 陽性細胞の内、約 1%が Ki67 陽性あり、逆に 99%が静止期の細胞であった。一方、CalcR 欠損筋衛星細胞では、約 15%の筋衛星細胞が Ki67 を発現していた (Figure 3B)。つまり、これまでの報告通り CalcR が筋衛星細胞の静止期維持に必須であることを確認できた。

A



B

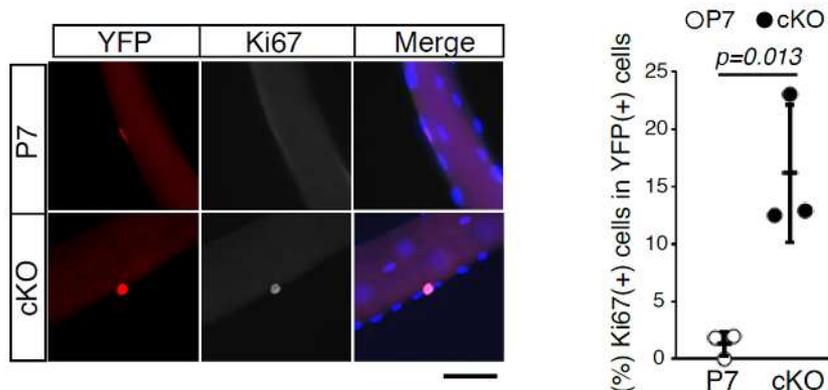


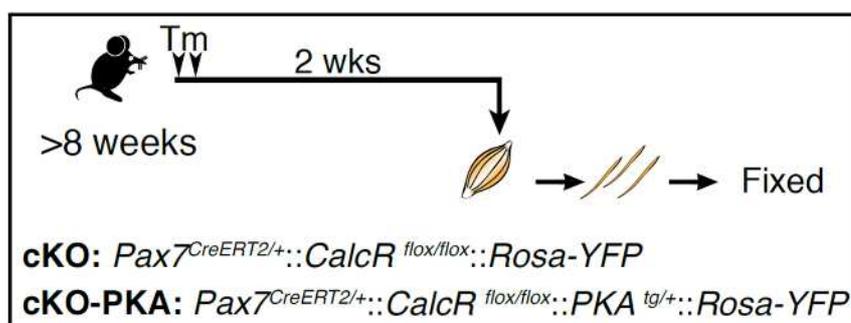
Figure 3

(A): Experimental scheme for quantification of non-quiescent MuSCs in P7 and cKO mice 2 weeks after Tm injections. Freshly isolated myofibers were fixed without cell culture.
 (B): Immunostaining of isolated single myofibers with anti-YFP and Ki67 antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars, 50 μ m. Graph shows the frequency of Ki67+ cells in YFP+ MuSCs on myofibers from P7 or cKO mice.

第3節 cKO 筋衛星細胞の静止期異常への PKA 発現の影響

次に CalcR 欠損筋衛星細胞で観察された静止期異常 (Ki67 陽性細胞の増加) が PKA の発現によりレスキューできるかについて検討を行った。PKA-tg と CalcR cKO マウスを交配し、CalcR 欠損かつ PKA を筋衛星細胞特的に発現するマウス cKO-PKA ($Pax7^{CreERT2/+}::CalcR^{flox/flox}::PKA^{tg/+}::Rosa-YFP$) を作製し、同腹の cKO と比較した (Figure 4A)。その結果、Ki67 の発現が cKO-PKA マウスで有意に減少した (Figure 4B,C)。この結果より PKA の発現により cKO で見られる筋衛星細胞の静止期異常が改善できる事が示唆された。我々の解析をふくめて、PKA を活性化しうる受容体は静止期の筋衛星細胞には強く発現していないため、CalcR が PKA を活性化する主な経路であると考えられる。

A



B

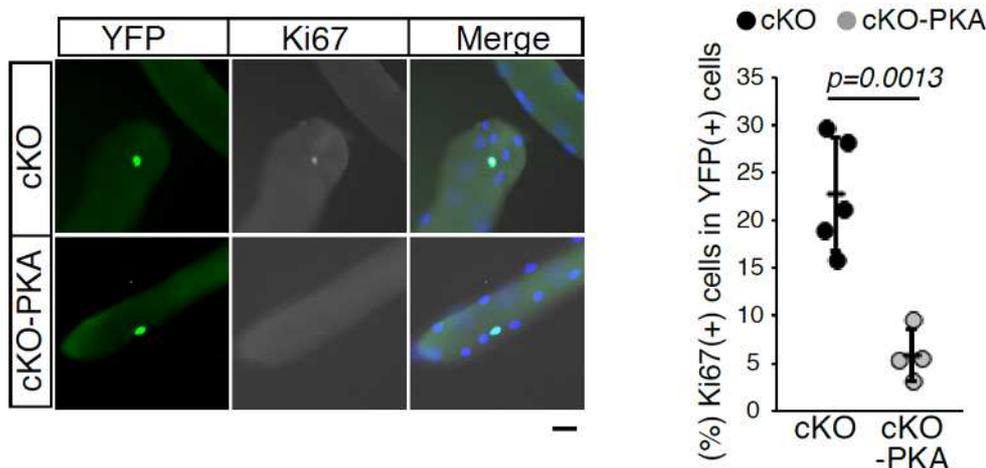


Figure 4

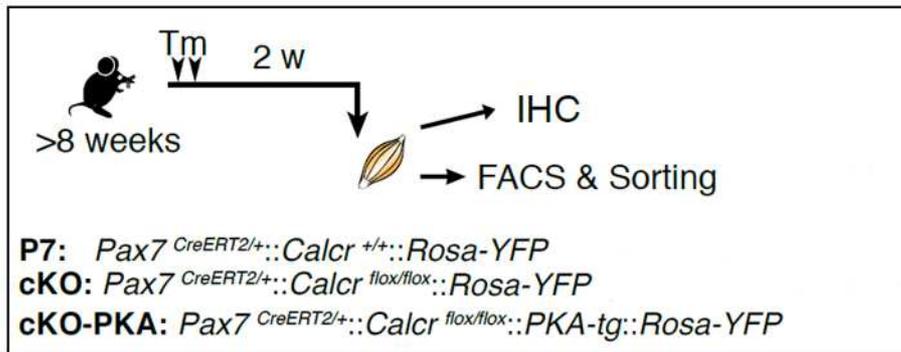
(A): Experimental scheme for quantification of non-quiescent MuSCs in cKO and cKO-PKA mice 2 weeks after Tm injections. Freshly isolated myofibers were fixed without cell culture.

(B): Immunostaining of MuSCs on isolated single myofibers using anti-YFP and -Ki67 antibodies. Scale bar: 20 μ m. Graph shows the frequency of Ki67+ cells in YFP+ MuSCs on myofibers from cKO or cKO-PKA mice.

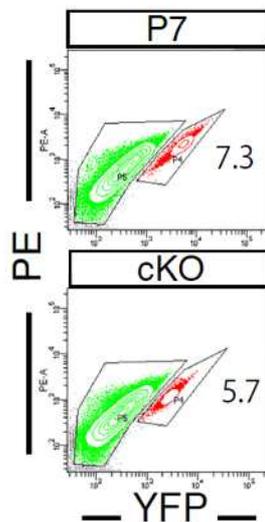
第4節 PKA の活性化による cKO 筋衛星細胞数への影響

Control (P7 : Pax7^{CreERT2/+}::Calcr^{+/+}::Rosa-YFP)、cKO、および cKO-PKA マウスから FACS を用いて筋衛星細胞を単離し、細胞周期関連遺伝子の発現を比較検討した。FACS 解析により (Figure 5B)、これまで同様 Calcr 欠損により筋衛星細胞数は減少したが (Figure 5C)、PKA の発現により Control レベルまで回復することが明らかになった (Figure 5D)。この結果は、免疫組織化学染色を用いた解析においても再現する事ができた (Figure 5E)。

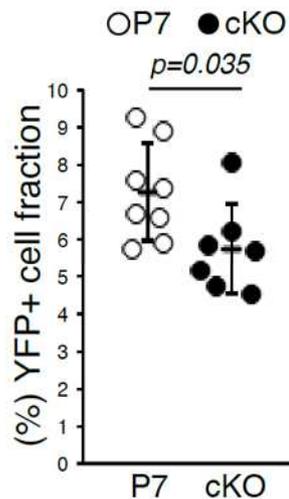
A



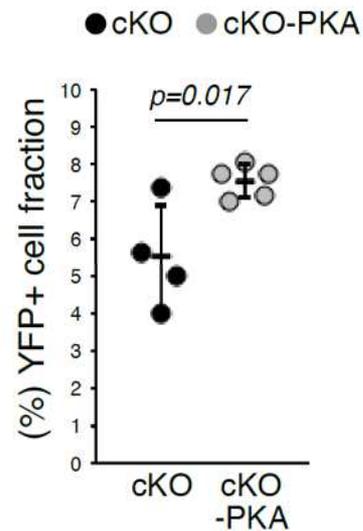
B



C



D



次に、単離した筋衛星細胞から RNA を採取し、Real-time PCR により細胞周期関連遺伝子の発現を検討した。その結果、cKO マウスでは Control マウスと比較して Ki67 の他にも Cell cycle を促進する分子 (Ccnb1、Ccnd1、および Cdk4) の発現が有意に増加していた。またこれら遺伝子の増加は cKO マウスに PKA を発現させる事で、その発現が有意に減少した。以上の結果より、CalcR 欠損筋衛星細胞で観察される静止期異常やそれに伴う筋衛星細胞数の減少は、PKA を発現させる事でレスキューできる事が明らかとなった。

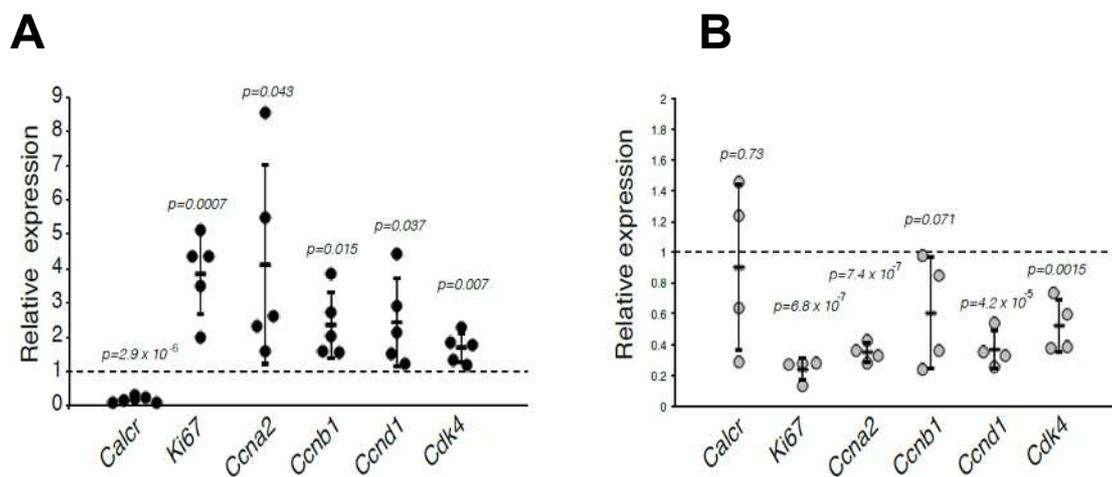


Figure 6

(A):Relative mRNA expression levels in cKO MuSCs compared to P7 MuSCs. The y-axis indicates the fold change of indicated genes \pm SD.

(B):Relative mRNA expression levels in cKO-PKA MuSCs compared to cKO MuSCs. The y-axis indicates the fold change of indicated genes \pm SD.

第5節 小括

- PKA 発現により CalcR 欠損筋衛星細胞で見られる静止期異常を抑制できる。
- PKA の発現により CalcR 欠損による筋衛星細胞の減少も抑制できる。

第三章 CalcR-PKA シグナルを介した Yap1 の局在制御の検討

CREB は PKA によってリン酸化される最も代表的な標的分子である。しかし、筋系譜細胞内で CREB により直接制御される遺伝子、Mpp7 (Li and Fan, 2017) および Nr4a2 (Nurr1) (Ho et al, 2017) の発現は、コントロール筋衛星細胞と比較して cKO および cKO-PKA 筋衛星細胞では変化していなかった (Figure7)。つまり、この結果は CREB が筋衛星細胞維持における CalcR-PKA の重要な標的ではないことを示唆している。

そこで、CalcR-PKA シグナルの下流として筋衛星細胞の静止期維持に働く可能性のある PKA の標的タンパク質として、Hippo 経路に着目した (Isobe et al., 2017)。主に培養細胞を用いた検討から、PKA が Hippo 経路の主要な構成分子である Lats1/2 をリン酸化する事が報告されている (Isobe et al., 2017)。しかし、PKA-Lats1/2 経路の生理学的意義や、幹細胞維持における PKA-Lats1/2 の重要性はこれまで報告がない (Kim et al., 2013; Yu et al., 2013; Yu et al., 2012)。そこで、本章では CalcR シグナルを介した PKA による Lats1/2 の制御及び、Lats1/2 により局在制御を受ける Yap1 について検討を行った。

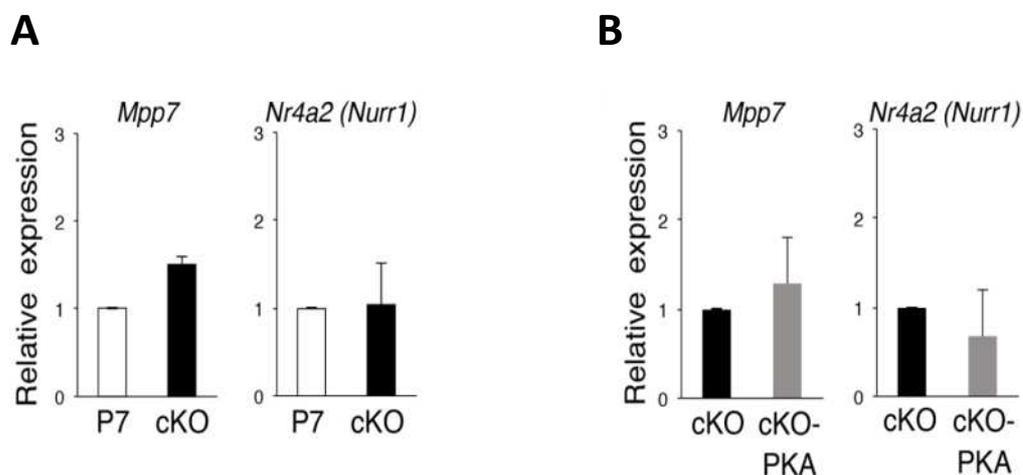


Figure 7 Expression of CREB-target genes in MuSCs

(A, B) The graphs indicate the relative gene expression of CREB target genes, Mpp7 and Nr4a2 (Nurr1) in MuSCs derived from P7 (white), cKO (black), or cKO-PKA (gray) mice. The y-axis indicates means from four independent experiments with \pm SE.

第 1 節 実験材料と方法

試薬

Table 10 に記入した場所からそれぞれ購入した。

Table 10

REAGENT or RESOURCE	SOURCE
H-89	Cayman Chemical
PKA14-22	Calbiochem
Elcatonin	Asahi Kasei Pharma Corp.
IBMX	Cayman Chemical

筋芽細胞株

筋芽細胞株 C2C12 cells は大日本住友製薬 (Osaka, Japan) から購入した。筋芽細胞株 CalcR-expressing C2C12 は以前報告した細胞を用いた (Yamaguchi et al,2015)。

細胞培養培地

C2C12 cells を培養する際には以下の培地を用いた。
増殖培地; 5% Fetal Bovine Serum (industrial laboratories, Wheat Ridge, CO)、penicillin (100 U/mL)-streptomycin (100 μ g/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) を含む high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-HG; Sigma-Aldrich)

マウス

第一、二章、第 1,2 節に記した mice を用いた。

ジェノタイピング

第一、二章、第 1,2 節に記した方法に準じて行った。

Tamoxifen 投与による Cre recombinase 作用の発現誘導

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。

Western blot

3×10^5 cells (C2C12-IG or C2C12-CalcR)を冷却 PBS で 3 回 wash したのちに 6 \times SDS sample buffer (2-ME+)を 50 μ L 滴下し、1 mL チップを用いて細胞を溶解・回収し、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後、氷冷したサンプルを細胞ライセートとして使用した。つぎに、アクリルアミドゲルを用いて 20 mA 定電流下でサンプルの SDS-PAGE を行った。メタノールで処理した PVDF 膜を Trans-Blot $^{\circ}$ SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD) もしくは Trans-Blot $^{\circ}$ Turbo $^{\text{TM}}$ Transfer System (BIO-RAD) を用いて 12 V、90 分のトランスファーを行った。その後メンブレンを 5% スキムミルク溶液を用いて 15 min のブロッッキングを行い、一次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。翌日メンブレンを TBS-T で 15 min 洗浄する操作を 3 回行い、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。再び TBS-T による洗浄を行った後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare)あるいは Amersham Imager 680 (GE Healthcare) によるバンドの撮影を行った。Densitometry の定量には ImageJ あるいは Amersham Imager 680 Analysis software (GE Healthcare)を使用した。なお使用した buffer 等の組成は以下の通り。

6 \times SDS sample buffer

0.5 M Tris-HCl (pH6.8)	3.0 mL
Glycerol	2.4 mL
10% SDS	4.8 mL
2-mercaptoethanol	1.2 mL
MilliQ	1.6 mL
Bromo phenol blue	少々

Total	13 mL
-------	-------

SDS-PAGE 泳動 buffer

Tris base	15.1 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g
MilliQ	up to 1L
Total	1 L

MilliQ 水で 5 倍に希釈し使用した。

Transfer buffer

Tris base	14.4 g
Glycine	3.03 g
MilliQ	up to 1L
Total	1 L

TBS-T

1M Tris-HCl (pH7.4)	10 mL
5 M NaCl	30 mL
Tween 20	1.0 mL
MilliQ	up to 1L
Total	1 L

Blocking buffer

2.5 g のスキムミルク(森永乳業)を 50 mL の TBS-T に溶解した。

Capillary-based immunoassay

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。

Proximity ligation assays (PLA)

分離または培養した筋衛星細胞を 4%PFA で固定し、0.25% Triton-X で透過処理した。MuSC を mouse anti-PKA[C] (PKA 触媒サブユニット)、rabbit anti-Lats1,Lats2 と反応させた後、PLA probe を使用して近接ライゲーションアッセイ (PLA) を実行した。使用した試薬 Table 11 に示した。

Table 11

REAGENT or RESOURCE	SOURCE
PLA probe MINUS for mouse antibody	Sigma-Aldrich
PLA probe PLUS for Rabbit antibody	Sigma-Aldrich

ChIP-PCR

3x10⁶ 初代培養筋芽細胞または 1x10⁶ CalcR-C2C12 を使用して、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験した。2 mM グルタミン酸ジスクシンイミジル (DSG, Thermo Fisher Scientific, 20593) および 1%ホルムアルデヒドで二重架橋した。架橋後、クロマチンを truChIP Chromatin Shearing Reagent Kit (Covaris, Boston, MA, 520127) を使用してせん断した。超音波処理後、細胞溶解物を抗体とともに 4°Cで一晩インキュベートした。抗体と DNA 断片の複合体は、Magna ChIP™ Protein A+G Magnetic Beads (Merck Millipore, Burlington, MA) または Dynabeads (Invitrogen, Waltham, MA) を用いて免疫沈降した。最後に、Qiaquick PCR DNA 精製キット (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, 740579) を使用して、免疫沈降した DNA 断片を精製した。Applied Biosystems Step One plus™ qPCR サイ클ラー (Thermo Fisher Scientific) と KAPASYBR® FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, KM4104) を使用して、定量 PCR 分析を実施した。qPCR 分析用のプライマー-DNA 配列は各遺伝子に特異的な primer を用いて行った。用いたプライマーは Table 12 に示した。

Table 12; Primer for ChIP-PCR

Gene	Primer ID	Sequence
<i>Cyr61</i>	Forward	5'- GTTGCAGTGACGTAGCTCTG
	Reverse	5'- CTGATGGATCTGAGAAGAGG
<i>Raf1</i>	Forward	5'- CGGCAGTCCGCTTAAACTC
	Reverse	5'- GCCTCCAACCAGAAACAGTC
<i>Neg16</i>	Forward	5'- CTCCCTGCTGAAAAAGAACG
	Reverse	5'- CTCCCTGCTGAAAAAGAACG
<i>Birc5</i>	Forward	5'- ATTCTCGGGAACCTCTTTGG
	Reverse	5'- AGGTCCTGTGGTGGTGAGTC
<i>Cdk4</i>	Forward	5'- AGTTGCAGGTTTGCAAAAGG
	Reverse	5'- AACAGATGACAGGGTAAGCA

マウス骨格筋からの単一筋線維の単離及び培養、染色法

第一章、第 1 節に記した方法に準じて行った。この章で新たに用いた一次抗体は table に記した。

Real-time PCR

第二章、第 1 節に記した方法に準じて行った。

RT-PCR

第二章、第 1 節に記した方法に準じて行った。この章で新たに用いた Primer は Table 13 に記した。

Table 13; Primer Sequences for real-time PCR

Gene		Sequence	Size
<i>Areg</i>	Forward	5'- CTGCTGGTCTTAGGCTCAGG	145
	Reverse	5'- TTTCGCTTATGGTGGAAACC	
<i>Aurka</i>	Forward	5'- GTGTTCCCTAGGCCTGTGTCC	110
	Reverse	5'- GTCTTCGGTCTTCTGCAAGG	
<i>Birc5</i>	Forward	5'- GCTTCATCCACTGCCCTACC	123
	Reverse	5'- CAGGGGAGTGCTTTCTATGC	
<i>Skp2</i>	Forward	5'- GCACGTGCAAGCGGCTGTGG	134
	Reverse	5'- AGTCGAGGCGGATGAGGTTGGG	
<i>Mpp7</i>	Forward	5'- AGGATCGGCTTGCGACATG	107
	Reverse	5'- ACACGTCCCAGAGGAAGGTC	
<i>Nr4a2</i>	Forward	5'- GGCTGGATTCCCAATAGCTC	136
	Reverse	5'- ATACTGCGCCTGAACACAAG	

マウス骨格筋からの単核の細胞の調製法及び flow cytometry 法による単離・解析
第二章、第1節に記した方法に準じて行った。

今章で使用した抗体は Table 14 に記した。

Table 14

Antibodies	Clone	Ig type	Conjugate	Supplier	Application & Dilution
Yap1	2F12	Mouse IgG2a, k	Unconjugated	Abnova (H00010413-M01)	WB: 1µg/mL ICC(SMF):x200 ICC(C2C12):x400 CBI: x20
Phospho-YAP (Ser127)	polyclonal	Rabbit	Unconjugated	CST (#4911S)	WB: x1000 CBI: x50
Phospho-YAP (Ser397)	D1E7Y	Rabbit IgG	Unconjugated	CST (#13619S)	WB: x1000
Lats1	polyclonal	Rabbit	Unconjugated	Bethyl Laboratories (A300-477A)	WB: x10000
Phospho-Lats 1 (S909)	polyclonal	Rabbit	Unconjugated	CST (#9157S)	WB: x1000
Lats2	polyclonal	Rabbit	Unconjugated	Proteintech (20276-1-AP)	WB: x1000 PLA: x50
Lamin A/C	14/Lamin AC	Mouse IgG1	Unconjugated	Proteintech (20276-1-AP)	WB: x1000

α -tubulin	TUB2.1	Mouse IgG1	Unconjugated	BD Biosciences (612162)	WB: x1000
Phospho-Lats 2 (S872)	polyclonal	Rabbit	Unconjugated	Signaling Antibody (12875-1)	WB: x1000

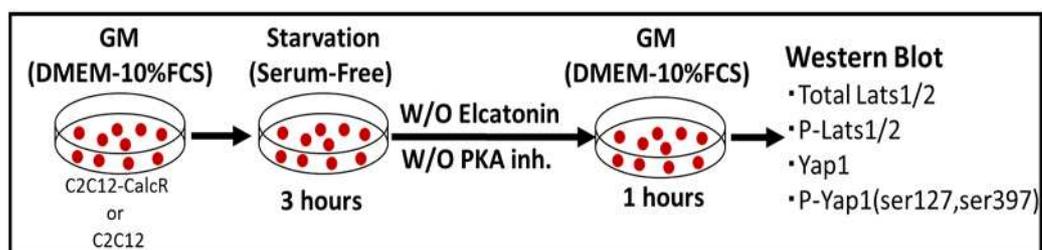
統計解析

第一章、第1節に記した方法に準じて行った。

第2節 CalcR シグナルの PKA 依存的な Hippo 経路抑制

レトロウイルスを用いて CalcR 発現を強制発現させた C2C12 (C2C12-CalcR)、またはコントロールウイルスにより GFP のみ発現させた C2C12 を CalcR のリガンドである Elcatonin により刺激し、Lats1 / 2 のリン酸化を調べた (Figure 8A)。CalcR 発現 C2C12 を、Elcatonin で刺激をすると、顕著な Lats1/2 のリン酸化が観察された (Figure 8B)。CalcR を発現していない C2C12 ではこのようなリン酸化は見られないことから、CalcR シグナル特異的に Lats1/2 のリン酸化が起きていることが分かった。Lats1 / 2 による Yap1 の Ser127 または Ser397 のリン酸化は、核移行阻害または分解にそれぞれ働いていることが知られている。Yap1 における Ser127 のリン酸化は、Elcatonin によって増強されたが、PKA 阻害剤によりこのリン酸化は抑制された。一方、Ser397 については、Elcatonin によるリン酸化増強作用は認められなかった。つまり、Elcatonin による Yap1 の制御は分解ではなく、核移行制御であるが示唆された。

A



B

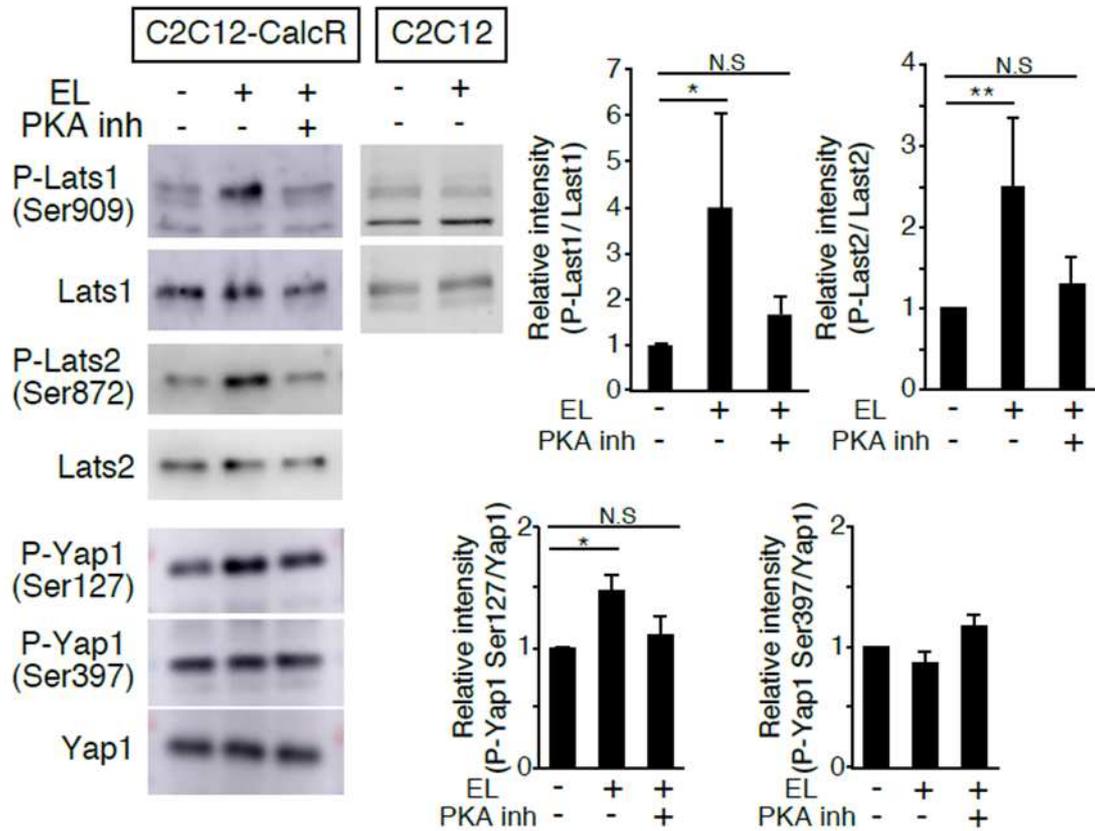


Figure 8

(A.B): Western blotting analysis of total Lats1/2, phosphorylated Lats1/2 (P-Lats1/2), P-Yap1 at Ser127, P-Yap1 at Ser397, or total Yap1 in CalcR-expressing C2C12 517 (C2C12-CalcR). EL: elcatonin (0.1U/mL), PKA inh: PKA inhibitor (H-89, 20 μ M). Graph indicates the relative intensity of phosphorylated/total protein with \pm SE.

第3節 CalcR シグナル伝達は Yap1 の核局在を抑制する

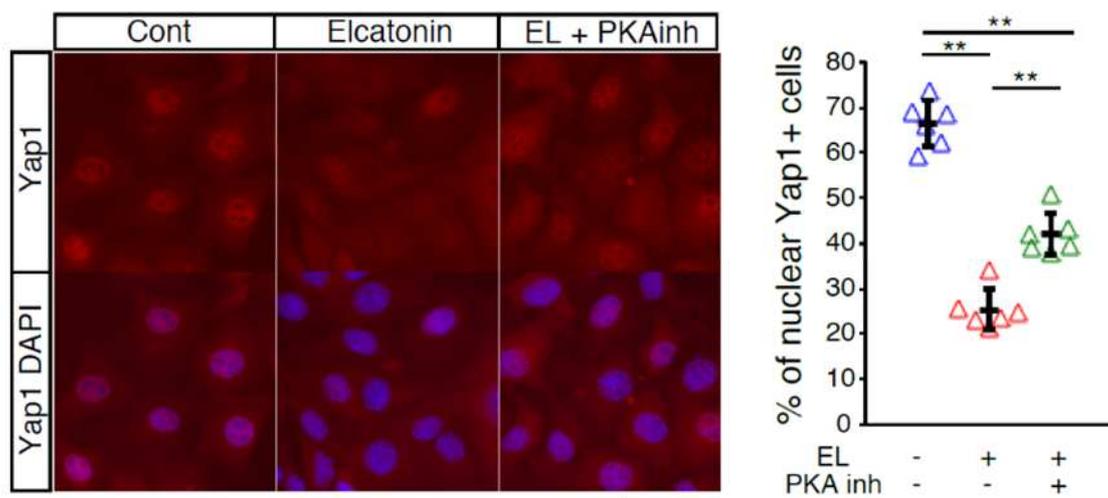
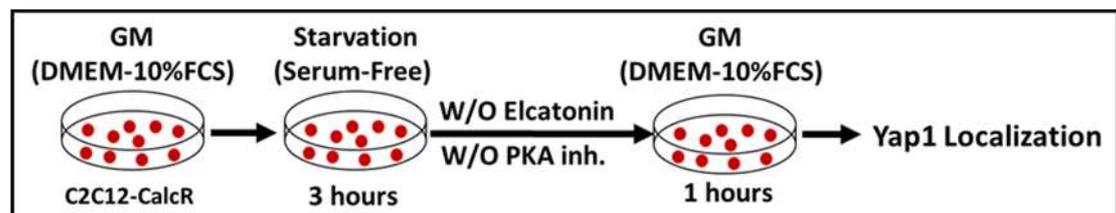
本節では Yap1 の局在に与える CalcR のシグナルの影響を検討した。まず始めに、Starvation 状態にすると Yap1 は細胞質に局在し、血清で再刺激すると Yap1 は再び核に移行する。しかし、血清再刺激時に CalcR のリガンドである Elcatonin で処理すると、Yap1 の核移行が顕著に抑制された (Figure 9A)。また、この CalcR リガンドの作用は、PKA inhibitor の前処理により消失した (Figure 9A)。

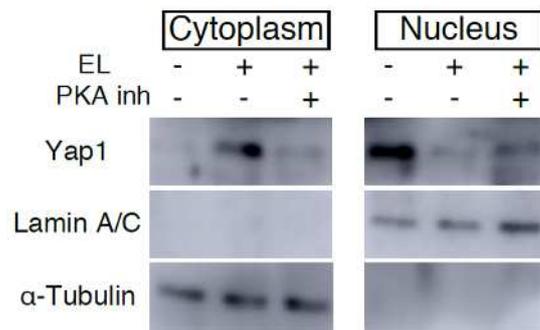
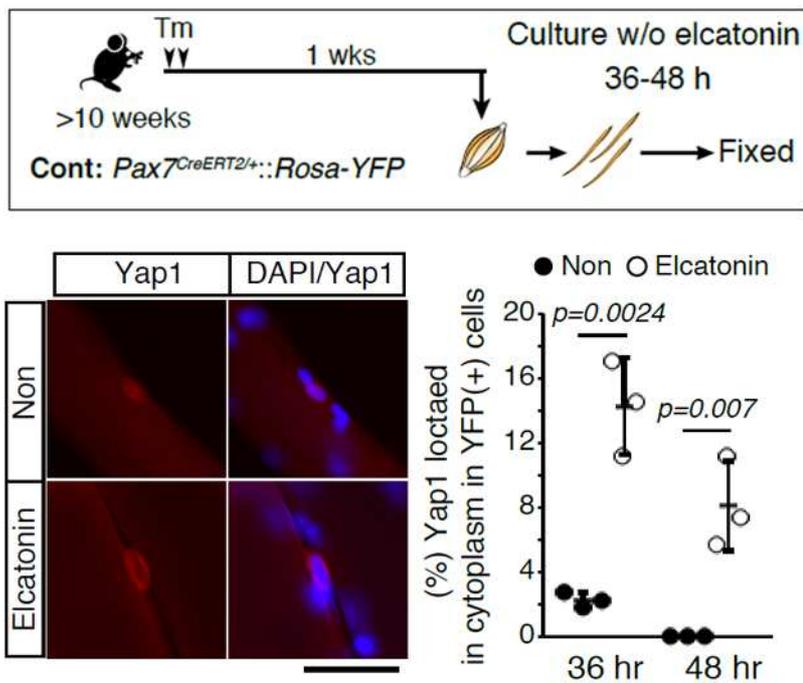
同様のサンプルを用いて、細胞質と核分離における Yap1 のタンパク量を次に調べた。その結果、上記の細胞染色の結果同様 Elcatonin で処理すると、核内 Yap1 の発現量が減少した。一方で、PKA inhibitor の前処理により、細胞質における Yap1 の発現量が顕著に減少したことから、PKA 依存的に Yap1 の局在制御が起きていることが明らかになった (Figure 9B)。

次に C2C12 ではなく単離した筋衛星細胞においても CalcR-シグナルが Yap1 の局在を制御するかについて検討した。単離した筋線維を 36、48 時間培養するとほぼすべて Yap1 は核内に局在したが、Elcatonin で処理すると、Yap1 の核移行が顕著に抑制された

(Figure 9C)。以上の結果より、CalcR-PKA シグナルが Yap1 の局在を制御することが示唆された。

A



B**C****Figure 9**

(A): Immunostaining of Yap1 in C2C12-CalcR re-stimulated with serum-containing 520 medium. Nuclei were stained with DAPI. Representative data are shown. Scale bar: 50 μ m. Graph shows the percentage of Yap 1-positive nuclei relative to all nuclei.

(B): Western blotting analysis of total Yap1 in cytoplasmic or nuclear fraction. Expression of α -tubulin or lamin A/C was used as a positive control for the cytoplasmic or nuclear fraction, respectively.

(C): Immunostaining of Yap1 in MuSCs on freshly isolated single myofibers cultured with or without elcatonin. Graph shows the frequency of cytoplasmic Yap1+ cells in YFP+ MuSCs on cultured myofibers. Scale bar: 50 μ m.

第4節 筋衛星細胞における PKA-Lats-Yap1 経路が存在する可能性の検討

In vivo でのさらなる検討をするために、Capillary-based immunoassay をもちいて単離筋衛星細胞における Ser127 リン酸化 Yap1 の存在を検討した。その結果、実際に単離直後の筋衛星細胞においても Ser127 がリン酸化された Yap1 を確認できた (Figure 10A)。次に、筋衛星細胞で PKA と Lats の関係性を調べるために PLA assay で解析した。PLA assay は細胞内の二つの異なるタンパク質の直接的な相互作用をみる方法である。Figure 10B で示すように、単離直後の筋衛星細胞では PKA-Lats の直接的な相互作用が確認された。一方、増殖筋衛星細胞 (myoblasts) では PKA-Lats の相互作用は確認できなかった (Figure 10B)。これらの結果より、in vivo の筋衛星細胞においても PKA-Lats-Yap1 経路が存在する可能性が示された。

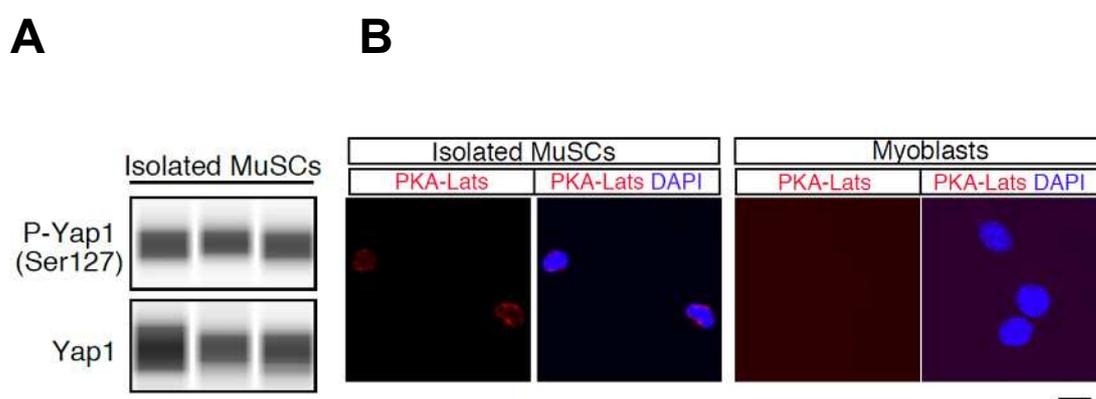


Figure 10

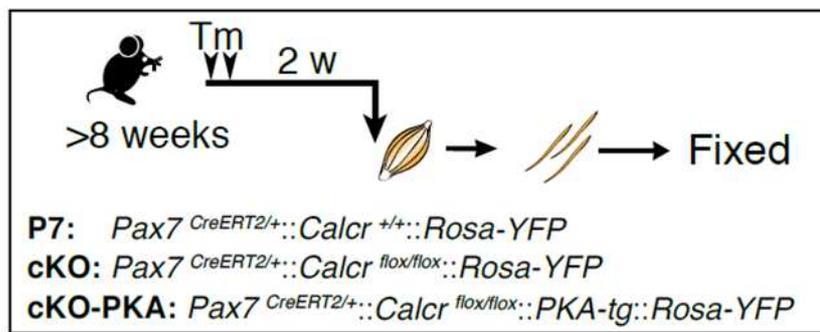
(A): Expression of P-Yap1 and Yap1 in freshly isolated MuSCs from 3 normal mice.

(B): Proximity ligation assays of PKA and Lats in freshly isolated MuSCs or proliferating myoblasts. Scale bar: 10 μ m.

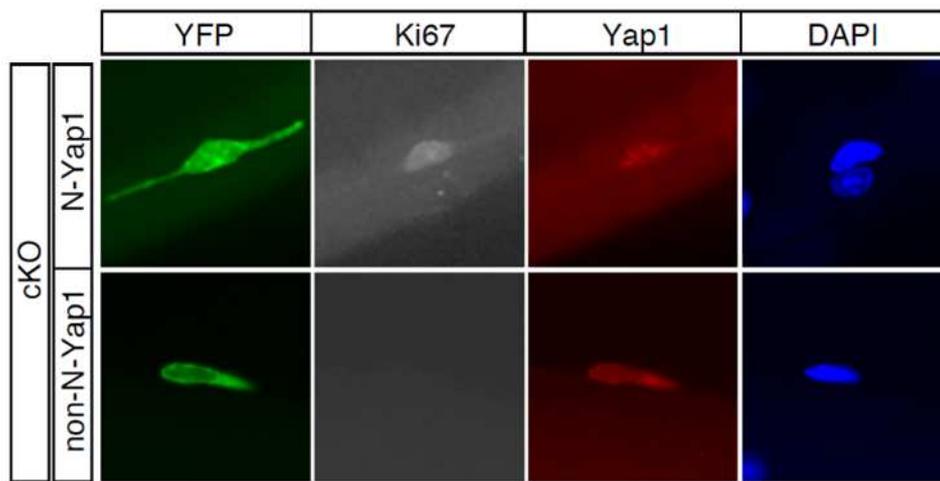
第5節 Yap1の局在制御が、CalcR-PKAで制御されている可能性の検討

次に CalcR 欠損による Yap1 の局在を検討した。Control (P7)マウスの筋衛星細胞では、その静止期状態において Yap1 は核に集積していなかった。しかし、cKO マウス筋衛星細胞では、Yap1 の核局在数が顕著に増加し、PKA を発現することで Yap1 が核局在する細胞数が減少した (Figure 11 B,C)、さらに、cKO マウス筋衛星細胞では Yap1 が核に局在する細胞の内、約 70%は Ki67 陽性細胞であった事から (Figure 11D)、in vivo の筋衛星細胞においても、Yap1 の局在が CalcR-PKA で制御されており、Yap1 の核局在と cKO マウスの静止期異常に正の相関がある可能性が示された

A



B



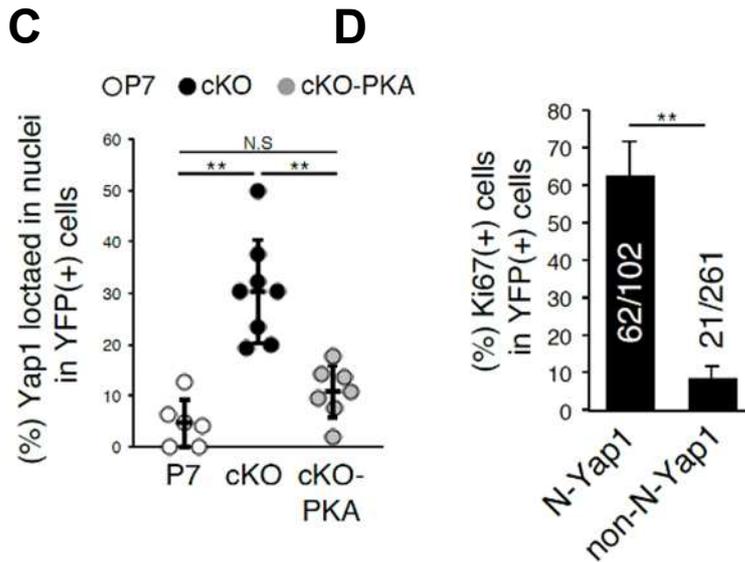


Figure 11

(A):Experimental scheme for analysing Yap1 localization in MuSC derived from P7, cKO, or cKO-PKA mice.

(B):Immunostaining of YFP, Ki67, and Yap1 in MuSCs on freshly isolated single myofibers derived from cKO mice. Nuclei were stained with DAPI. N-Yap1: Yap1 is accumulated in nuclei, non-Yap1: Yap1 is not accumulated in nuclei. Scale bar:10 μ m.

(C):Percentage of accumulated Yap1 nuclear cells in YFP+ MuSCs of P7, cKO, or cKO-PKA.

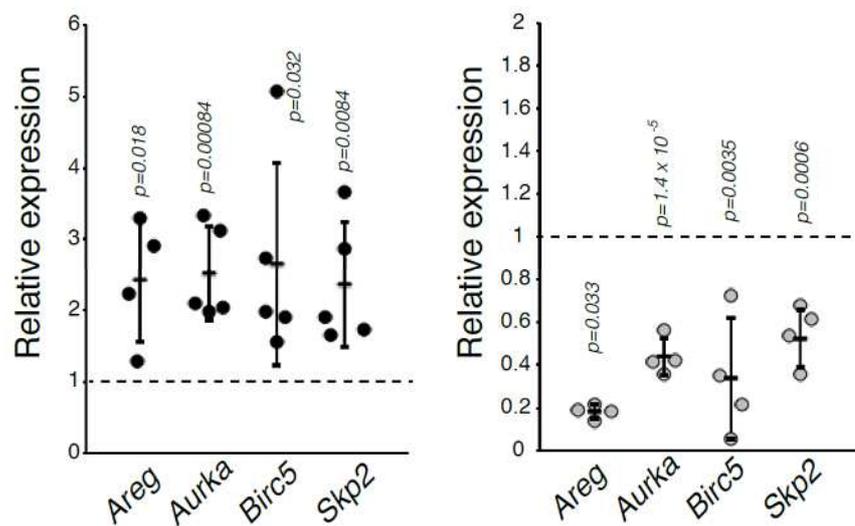
(D):Percentage of Ki67+ cells per N-Yap1 (Yap1-positive nuclei) or non-N-Yap1 (Yap1 539 negative nuclei) in YFP+ cKO MuSCs. Graph shows the average of 6 mice in each group with SD. The number of Ki67+ cells is indicated in the numerator of each bar.Total numbers of N-Yap1 YFP+ or non-N-Yap1 YFP+ cells counted are indicated in the denominator of each bar.

第6節 CalcR-cKO 筋衛星細胞における Yap1 標的遺伝子の発現検討

Yap1 は癌関連遺伝子であり、増殖および細胞分裂関連遺伝子の転写を促進する。そこで、Yap1 標的遺伝子として報告されている遺伝子の発現量を調べた。その結果、cKO マウスにおいて、全ての Yap1 標的遺伝子(Areg,Aurka,Birc5,Skp2)の発現が有意に増加していた (Figure 12A)。そして cKO に PKA を発現することで、これらの発現は抑制された。

実際に Yap1 が筋系譜細胞においても細胞増殖の制御に重要な標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、それら遺伝子の転写を活性化しているかどうかを調べるために、初代培養筋芽細胞を用いて、ChIP-qPCR assay を行った (Figure 12B)。その結果、Yap1 が Birc5、Raf1、Cdk4 などの遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。以上の結果より、CalcR シグナルは PKA を介して Yap1 の核移行を阻害することで、その転写活性を抑制していることが明らかになった (Figure 13)。

A



B

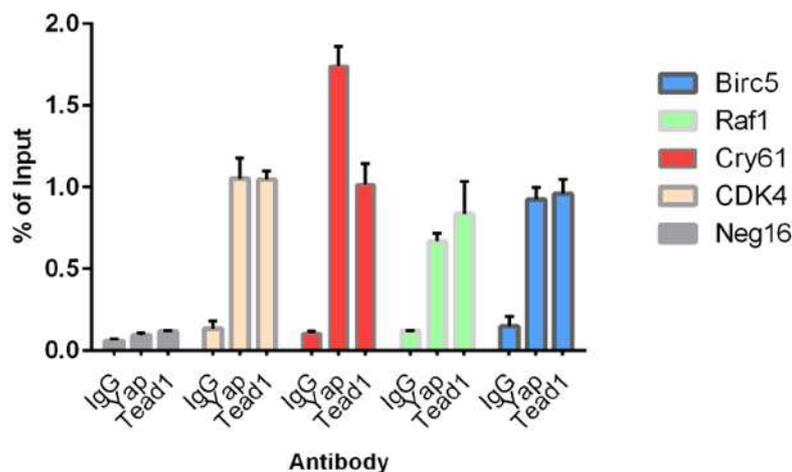
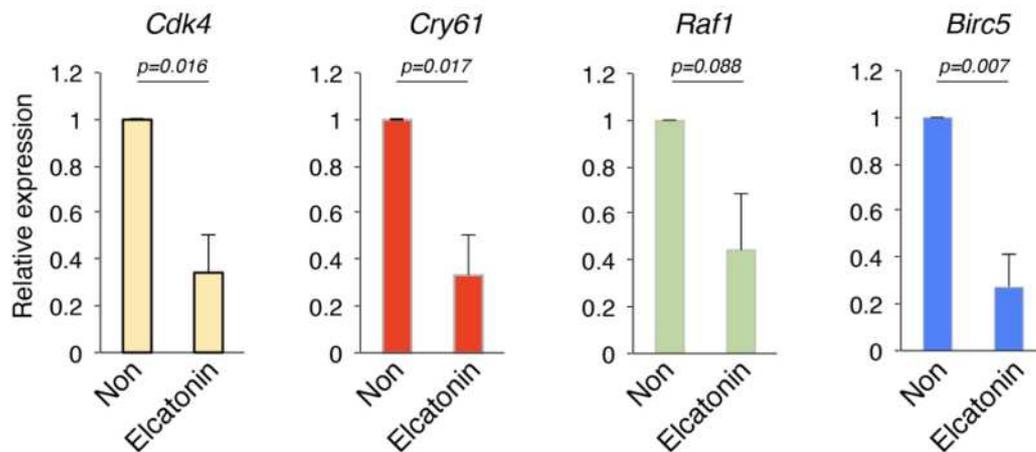


Figure 12

(A):Relative gene expressions of Yap1 target genes, Areg, Aurka, Birc5, and Skp2 in MuSCs derived from P7, cKO, or cKO-PKA mice. The data of littermate P7 and cKO MuSCs (Left panel), or cKO and cKO-PKA (Right panel) MuSCs were compared.
(B): Chip-PCR analyses of Birc5, Raf1, and Cdk4 promoters. Neg16 or Cry 61 was used as negative and positive controls, respectively. Rabbit control IgG (IgG), anti-Yap1 IgG(Yap), or anti-Tead1 IgG (Tead1) antibodies were used for each immunoprecipitation assay.

C



(c): Chip-PCR analyses of Cdk4, Raf1, and Birc5 promoters in CalcR-expressing C2C12 treated with or without elcatonin. Cry 61 was used as positive control. Graphs indicate the average of three independent experiments with \pm SE. Related to Figure 12B.

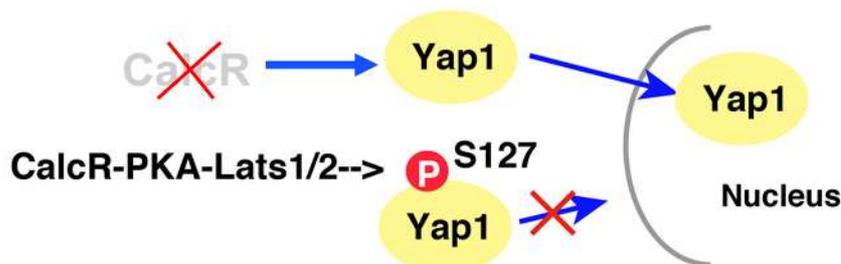


Figure 13 CalcR signaling inhibits the nuclear translocation of Yap1 by PKA-Lats1/2 pathway

第7節 小括

- CalcR シグナルは PKA 依存的に Hippo 経路を抑制する
- CalcR シグナル伝達は Yap1 の核局在を抑制する
- In vivo 筋衛星細胞においても、Yap1 の核局在は CalcR-PKA シグナルにより制御される
- CalcR シグナル伝達は PKA-Lats1 / 2 経路を介した Yap S127 のリン酸化により Yap1 核移行を阻害する(Figure 13)。

第四章 Yap1 の欠損により、CalcR-cKO 筋衛星細胞の静止状態の検討

本章では、第一、二、三章の結果をふまえて、CalcR 欠損筋衛星細胞の静止期異常を Yap1 の欠損でレスキューできるかについて検討を行った。

第1節 実験材料と方法

マウス

第一、二章、第1,2節に記した mice を用いた。Yap1-floxed mice は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。

ジェノタイピング

第一章、第1節に記した方法に準じて行った。Yap1-floxed mice に対しては Yap1Fwd-29878(5'-AGG ACA GCC AGG ACT ACA CAG)、Yap1Rev-29879(5'-CAC CAG CCT TTA AAT TGA GAA C)の primer セットを用いた。

Tamoxifen 投与による Cre recombinase 作用の発現誘導

第一章、第1節に記した方法に準じて行った。

マウス骨格筋からの単一筋線維の単離及び培養、染色法

第一章、第1節に記した方法に準じて行った。

Real-time PCR

第二章、第1節に記した方法に準じて行った。

RT-PCR

第二章、第1節に記した方法に準じて行った。この章で新たに用いた Primer は table15 に記した。

Table 15; Primer Sequences for real-time PCR

Gene		Sequence	Size
Yap1	Forward	5'- GCTGCAGCAGTTACAGATGG	141
	Reverse	5'- ATCCAGGAGAAGACACTGC	

マウス骨格筋からの単核細胞の調製法及び flow cytometry 法による分離・解析

第二章、第1節に記した方法に準じて行った。

免疫組織化学染色

第二章、第1節に記した方法に準じて行った。

統計解析

第一章、第1節に記した方法に準じて行った。

第2節 Calcr 欠損かつ Yap1 欠損マウスの解析

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 (Figure 14A)。

まず始めに co-dKO 筋衛星細胞で Yap1 タンパク質がタモキシフェン投与により欠損できる事を確認できた (Figure 14B)。cKO、co-dKO 筋衛星細胞を single myofiber 法により比較した結果、重要なことに Ki67+ 筋衛星細胞の数は、cKO 筋衛星細胞と比較して co-dKO で有意に減少した (Figure 14B,C)。

次に FACS 及び免疫組織化学染色により、筋衛星細胞の数を検討した結果、Yap1 の欠損により Calcr 欠損による筋衛星細胞数の減少も抑制できる事が明らかとなった (Figure 14D,E)。

最後に、cKO および co-dKO マウス骨格筋から調整した単離直後の筋衛星細胞を Real-time PCR により検討した結果、co-dKO マウスでは cKO マウスと比較して Ki67 の他にも Cell cycle を促進するような分子(Ki67、Ccnd1、Cdk4、Birc5、および Skp2)の発現が減少することが明らかとなった (Figure 14F)。つまり、以上の結果は Yap1 活性の亢進が Calcr 欠損筋衛星細胞の静止状態異常の原因であることを示している。

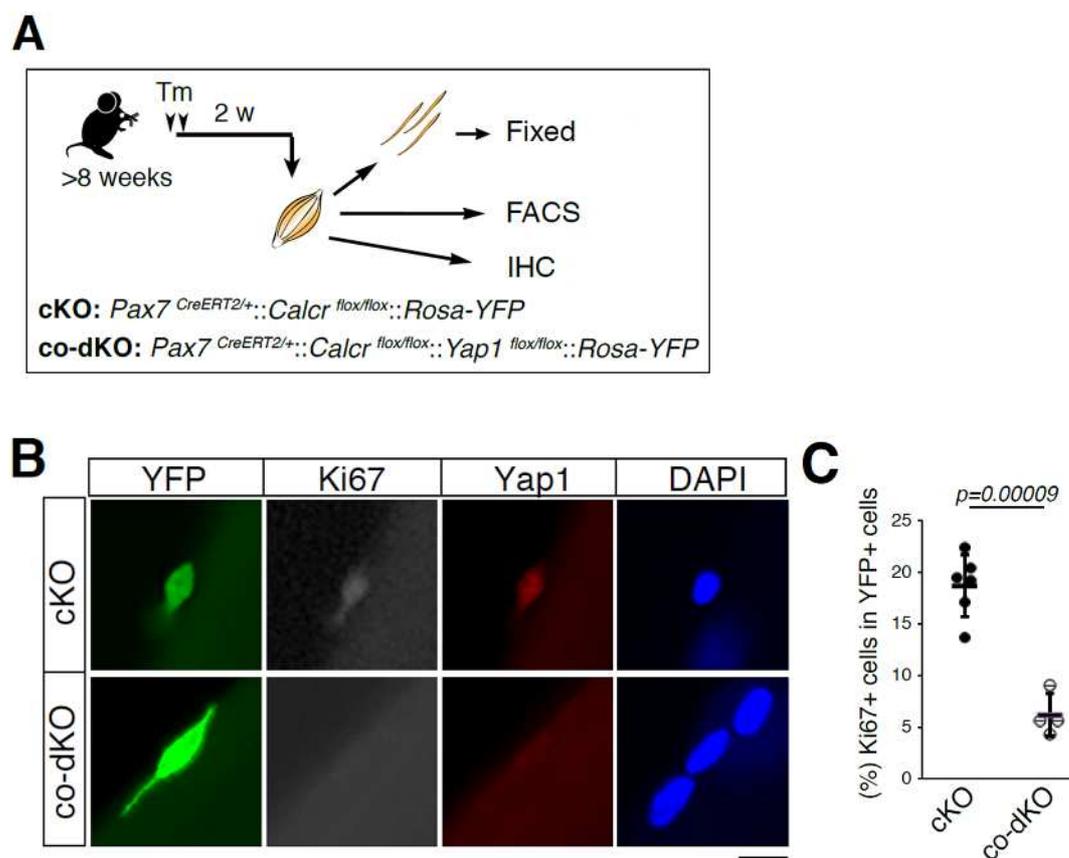


Figure 14

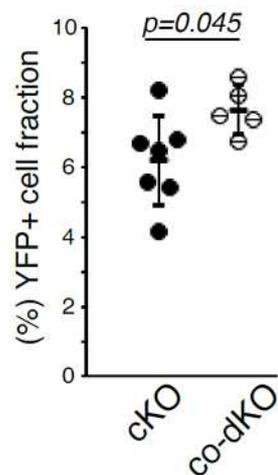
(A):Experimental scheme for quantification of non-quiescent MuSCs number in cKO and co-dKO mice 2 weeks after Tm injections. IHC: immunohistochemistry.

(B):Immunostaining of YFP, Ki67, and Yap1 in MuSCs on freshly isolated single

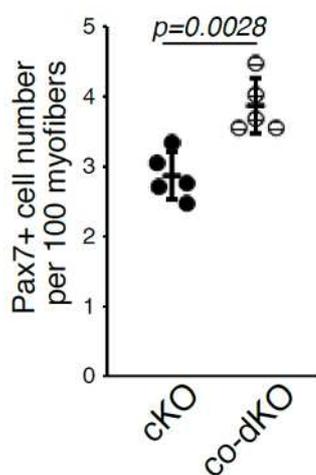
myofibers. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m.

(C): Frequency of Ki67+ MuSCs in YFP+ MuSCs on myofibers from cKO or co-dKO mice.

D



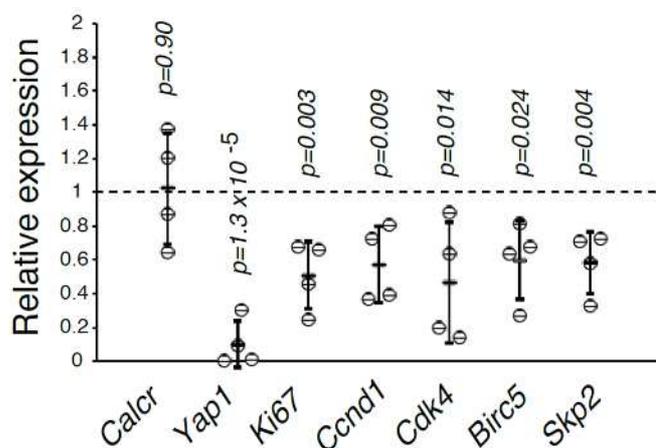
E



(D): Percentage of YFP+ cells in cKO or co-dKO by FACS.

(E): Numbers of Pax7+ cells per 100 cross-sectional TA myofibers in cKO and co-dKO.

F



(F): Relative mRNA expression in co-dKO MuSCs compared to cKO MuSCs. The y axis indicates the fold change of the indicated gene \pm SD.

第3節 小括

- 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。

総括

本研究では CalcR-PKA 経路が Hippo 経路の主要分子である Lats1 / 2-Yap1 を制御し、それにより筋衛星細胞を静止状態に維持している事を明らかにした。PKA の最もよく知られている標的タンパク質である CREB は、筋衛星細胞の増殖を促進する事が報告されている。例えばプロスタグランジン E2 (PGE2) -EP4-cAMP-CREB 経路は、Nurr1 / Nr4a2 発現を誘導することで筋衛星細胞の増殖を引き起こす (Ho et al, 2017)。また、CREB 機能の欠損は筋衛星細胞の静止期に影響を与えない事も報告されている (Li and Fan, 2017)。本研究で示した通り、CREB の筋系譜細胞における標的遺伝子である Mpp7 および Nurr1 / Nr4a2 の発現レベルは、CalcR-CKO 筋衛星細胞では変化していない事から、CalcR の欠損は CREB 活性に影響を与えないことが示唆された。また PKA は、A kinase 固定タンパク質 (AKAP) の種類に応じて細胞内の特定の場所限定される (Carnegie et al, 2009)。詳細なメカニズムは不明であるが、異なる AKAP または GPCR による PKA の細胞内での場所が、PKA の増殖と静止期維持という相反する効果を示す原因である可能性がある。筋系譜細胞における PKA のさまざまな役割とその標的分子の同定は、今後取り組む必要がある課題である。また、酵母と筋衛星細胞での PKA の働きの矛盾についても今後のさらなる検討が必要である。

一部の細胞では、Yap1 の活性化が細胞周期への再突入を誘発する。たとえば、Mst1 / 2 の欠損による Yap1 の活性化は、非分裂肝細胞の増殖を誘発する。(Zhou et al, 2009)。また、Yap1 の恒常的な活性化型 (Ser112 は Ala に置換した変異体) は、同じく非分裂細胞である心筋細胞の増殖を開始する (Xin et al, 2013)。上皮幹細胞においては、G α s-タンパク質-PKA 軸は、Sonic Hedgehog 経路の刺激と Hippo 経路の阻害を介して、自己再生と分化の調整異常によるがん化に中心的な役割を果たすことが報告されている (Iglesias-Bartolome et al, 2015)。これらの結果は、定常状態条件下では有糸分裂後の分化細胞で Yap1 活性が強く制限される必要があることを示唆している。対照的に、Yap1 の可逆的な調節により、成体幹細胞は G0 期から細胞周期に再進入することができる。これは、不可逆的な細胞周期停止状態である「静止期」を調節するための基本的なメカニズムになりうる。実際に、Drosophila の神経幹細胞を用いた検討においても Lats1/2 や Mst1/2 の欠損が Yap の核局在を誘導し、神経幹細胞の増殖を開始する事が報告されている (Ding et al, 2016)。つまり、Drosophila の研究と今回の申請者の成果を合わせて考えると、Yap1 活性の抑制は、種を超えた成体幹細胞の静止期の調節の基本的な経路と言える。さらに、本研究により CalcR などの GPCR が成体幹細胞の Yap1 活性を生理的に調節することを示した、世界初の例である。

Taz は Yap といくつかの機能を共有している。筋系譜細胞では、Taz は増殖関連遺伝子の発現に関して Yap1 と共有する機能を持っている。一方で Yap1 とは対照的に、Taz は Pax7、Myf5、Myod1 などの筋分化遺伝子を制御する (Sun et al, 2017)。我々の解析では、CalcR 欠損筋衛星細胞ではこれらの筋分化遺伝子の発現変化を示さなかった

(Yamaguchi et al, 2015)。さらに、Yap1 の損失のみで CalcR 欠損筋衛星細胞の静止期異常が回復し、筋衛星細胞の活性化が遅延した為、Taz は CalcR を介した筋衛星細胞の静止期制御に関与していないと考えられる。

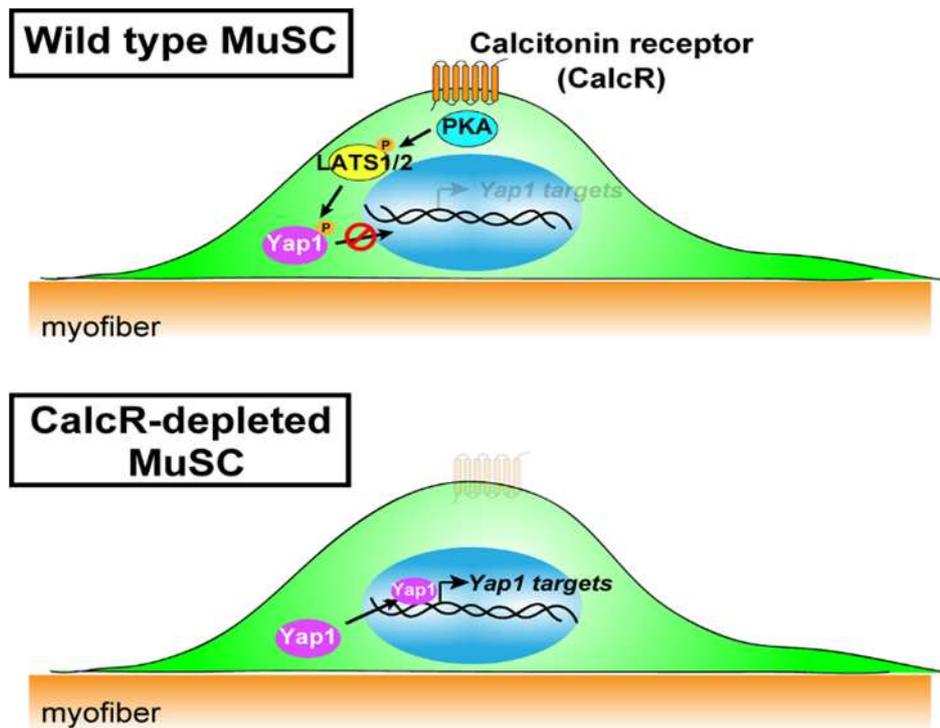
一般に、細胞間接触は、Yap1 の核移行を阻害する (Zhao et al, 2007)。最近の研究により、M-および N-カドヘリンが筋衛星細胞の静止期を維持するために不可欠な役割を果たすことが示された (Goel et al, 2017)。したがって、M / N-カドヘリンの欠損は Hippo

経路に影響を与える可能性がある。反対に、機械的な力は Yap1 の核移行を促進する (Aragona et al、2013; Dupont et al、2011)。骨格筋の発生過程において、機械的刺激によって筋線維内で Yap1 の核移行が誘導され、Notch リガンドの発現を Yap1 が亢進する事で筋前駆細胞の効率的な増殖が可能となる (Esteves de Lima et al、2016)。筋衛星細胞が機械的な力を直接感知するかどうかは解明されていないが、我々の結果は、筋収縮によって生じる機械的刺激に対する Yap1 の核移行を完全に抑制するために、筋衛星細胞は細胞間接触に加えて、CalcR-PKA 軸を併せ持つ必要があると考察した。

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。

結論

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。



謝辞

本稿を終えるにあたり、貴重な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。

本研究を学位としてまとめるにあたり、終止暖かい御指導御鞭撻を賜りました恩師、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致します。

研究および私生活の両方で親身に相談に乗ってくださり、鋭い指摘、また的確な助言を賜り、そして実験・ディスカッションの楽しさをご教示いただきました日本たばこ産業(株)医薬総合研究所福田純明様と金重紀洋様に格別の感謝を申し上げます。

本研究を行うにあたり、*Calcr*-floxed mice を作製して頂いた大阪大学微生物病研究所教授伊川正人先生、*PKA*-tg mice を作製して頂いた大阪大学臨床薬効解析学分野教授藤尾慈先生と中山博之先生、*Western blot* にご協力いただきました東京都健康長寿医療センター上住聡芳先生と上住円先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、未発表の *Yap1* の *Chip-seq* のデータを共有させていただきました *Max-Planck Institute Thomas Braun* 先生と *Shuichi Watanabe* 博士に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、未熟な私に終始熱心な指導および数多くの技術・知識を授けてくださいました大谷拓史学士、馬焜然修士、村上聡修士、広野(中村)美紀修士、野口裕太郎修士、内藤拓也修士に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、種々の実験に際し御協力を賜りました竹本裕政修士、梶貴志学士、稲葉翔也学士に謹んで感謝致します。さらに大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野の皆様に深謝致します。

最後に、在学中に経済的援助を賜りました、小林国際奨学財団に感謝致します。

略語一覽

MuSC	: Muscle satellite cells
Pax7	: Paired box 7
FACS	: Fluorescence activated cell sorting
TA	: Tibialis anterior
KO	: Knock out
SMF	: Single Myofiber
MyoD	: Myogenic differentiation 1
Chip-seq	: Chromatin immunoprecipitation-sequencing
MyoD	: Myogenic differentiation 1
CalcR	: Muscle satellite cells
PKA	: Protein kinase A
Yap1	: Yes-associated protein 1
Mpp7	: Membrane palmitoylated protein 7
Nurr1	: Nuclear receptor related-1 protein
Nr4a2	: Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
CREB	: cAMP response element binding protein
PGE2	: Prostaglandin E2
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
EP4	: Prostaglandin E2 receptor 4
RT-PCR	: Reverse Transcription polymerase chain reaction
cDNA	: Complementary DNA
FCS	: Fetal calf serum
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TBS-T	: Tris-buffered saline with Tween 20

参考文献

1. Antos, C.L., Frey, N., Marx, S.O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J.A., Marks, A.R., and Olson, E.N. (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase α . *Circ Res* **89**, 997-1004.
2. Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* **154**, 1047-1059.
3. Baghdadi, M.B., Castel, D., Machado, L., Fukada, S.I., Birk, D.E., Relaix, F., Tajbakhsh, S., and Mourikis, P. (2018). Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature* **557**, 714-718.
4. Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Cell adhesion. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and beta-catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* **348**, 1024-1027.
5. Carnegie, G.K., Means, C.K., and Scott, J.D. (2009). A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life* **61**, 394-406.
6. Charge, S.B., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews* **84**, 209-238.
7. Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 329-340.
8. Dhawan, J., and Laxman, S. (2015). Decoding the stem cell quiescence cycle—lessons from yeast for regenerative biology. *J Cell Sci* **128**, 4467-4474.
9. Ding, R., Weynans, K., Bossing, T., Barros, C.S., and Berger, C. (2016). The Hippo signalling pathway maintains quiescence in *Drosophila* neural stem cells. *Nature Communications* **7**, 10510.
10. Dumont, N.A., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* **142**, 1572-1581.
11. Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M.,

- Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179-183.
12. Esteves de Lima, J., Bonnin, M.A., Birchmeier, C., and Duprez, D. (2016). Muscle contraction is required to maintain the pool of muscle progenitors via YAP and NOTCH during fetal myogenesis. *eLife* *5*. 2016; 5:e15593 doi: 10.7554/eLife.15593
 13. Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells* *25*, 2448-2459.
 14. Gan, B., and DePinho, R.A. (2009). mTORC1 signaling governs hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Cycle* *8*, 1003-1006.
 15. Goel, A.J., Rieder, M.K., Arnold, H.H., Radice, G.L., and Krauss, R.S. (2017). Niche cadherins control the quiescence-to-activation transition in muscle stem cells. *Cell Reports* *21*, 2236-2250.
 16. Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., and Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 187-206.
 17. Ho, A.T.V., Palla, A.R., Blake, M.R., Yucel, N.D., Wang, Y.X., Magnusson, K.E.G., Holbrook, C.A., Kraft, P.E., Delp, S.L., and Blau, H.M. (2017). Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength. *Proc Natl Acad Sci USA* *114*, 6675-6684.
 18. Iglesias-Bartolome, R., Torres, D., Marone, R., Feng, X., Martin, D., Simaan, M., Chen, M., Weinstein, L.S., Taylor, S.S., Molinolo, A.A., *et al.* (2015). Inactivation of a G α (s)-PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis. *Nat Cell Biol* *17*, 793-803.
 19. Imaeda, A., Tanaka, S., Tonegawa, K., Fuchigami, S., Obana, M., Maeda, M., Kihara, M., Kiyonari, H., Conway, S.J., Fujio, Y., *et al.* (2019). Myofibroblast beta2 adrenergic signaling amplifies cardiac hypertrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun* *510*, 149-155.
 20. Isobe, K., Jung, H.J., Yang, C.R., Claxton, J., Sandoval, P., Burg, M.B., Raghuram, V., and Knepper, M.A. (2017). Systems-level identification of PKA-dependent signaling in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *114*,

E8875-E8884.

21. Jang, W., Kim, T., Koo, J.S., Kim, S.K., and Lim, D.S. (2017). Mechanical cue-induced YAP instructs Skp2-dependent cell cycle exit and oncogenic signaling. *EMBO J* 36, 2510-2528.
22. Judson, R.N., Tremblay, A.M., Knopp, P., White, R.B., Urcia, R., De Bari, C., Zammit, P.S., Camargo, F.D., and Wackerhage, H. (2012). The Hippo pathway member Yap plays a key role in influencing fate decisions in muscle satellite cells. *J Cell Sci* 125, 6009-6019.
23. Kim, M., Kim, M., Lee, S., Kuninaka, S., Saya, H., Lee, H., Lee, S., and Lim, D.S. (2013). cAMP / PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *EMBO J* 32, 1543-1555.
24. Li, L., and Fan, C.M. (2017). A CREB-MPP7-AMOT regulatory axis controls muscle stem cell expansion and self-renewal competence. *Cell Reports* 21, 1253-1266.
25. Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493-495.
26. Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 30, 1-17.
27. O'Hayre, M., Vazquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E.W., Handel, T.M., Seshagiri, S., and Gutkind, J.S. (2013). The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 412-424.
28. Rodgers, J.T., King, K.Y., Brett, J.O., Cromie, M.J., Charville, G.W., Maguire, K.K., Brunson, C., Mastey, N., Liu, L., Tsai, C.R., *et al.* (2014). mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* 510, 393-396.
29. Shinin, V., Gayraud-Morel, B., and Tajbakhsh, S. (2009). Template DNA-strand co-segregation and asymmetric cell division in skeletal muscle stem cells. *Methods Mol Biol* 482, 295-317.
30. Sun, C., De Mello, V., Mohamed, A., Ortuste Quiroga, H.P., Garcia-Munoz, A., Al Bloshi, A., Tremblay, A.M., von Kriegsheim, A., Collie-Duguid, E., Vargesson, N., *et al.* (2017). Common and distinctive functions of the Hippo effectors Taz and Yap in skeletal muscle stem cell function.

Stem Cells 35, 1958-1972.

31. Varelas, X. (2014). The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* 141, 1614-1626.
32. von Gise, A., Lin, Z., Schlegelmilch, K., Honor, L.B., Pan, G.M., Buck, J.N., Ma, Q., Ishiwata, T., Zhou, B., Camargo, F.D., *et al.* (2012). YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2394-2399.
33. Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L.B., Murakami, M., Qi, X., McAnally, J., Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Tan, W., Shelton, J.M., *et al.* (2013). Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13839-13844.
34. Yamaguchi, M., Watanabe, Y., Ohtani, T., Uezumi, A., Mikami, N., Nakamura, M., Sato, T., Ikawa, M., Hoshino, M., Tsuchida, K., *et al.* (2015). Calcitonin receptor signaling inhibits muscle stem cells from escaping the quiescent G0 state and the niche. *Cell Reports* 13, 302-314.
35. Yu, F.X., Zhang, Y., Park, H.W., Jewell, J.L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S.S., Lai, Z.C., and Guan, K.L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev* 27, 1223-1232.
36. Yu, F.X., Zhao, B., and Guan, K.L. (2015). Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell* 163, 811-828.
37. Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., *et al.* (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 150, 780-791.
38. Zhang, J., Ji, J.Y., Yu, M., Overholtzer, M., Smolen, G.A., Wang, R., Brugge, J.S., Dyson, N.J., and Haber, D.A. (2009). YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nat Cell Biol* 11, 1444-1450.
39. Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., *et al.* (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21, 2747-2761.
40. Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J.D., Wang, C.Y.,

Chinnaiyan, A.M., *et al.* (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22, 1962-1971.

41. Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., *et al.* (2009). Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* 16, 425-438.