

＜研究課題＞ 人為的な運動療法開発を目指した運動模倣因子の同定

代表研究者 大阪大学大学院薬研究科 教授 深田 宗一郎

【抄録】 400 字

運動はサルコペニアの予防において最も安全で効果のある対処法であるが、高齢者や寝たきりの患者に対しては骨折などのリスクを伴うため、運動効果の科学的なメカニズム解明・応用が切望されている。筋常在性の間葉系前駆細胞は骨格筋の健全性維持においてが必須であり、サルコペニアの発症においても間葉系前駆細胞の機能低下が重要なリスクファクターとなる。申請者はこの間葉系前駆細胞が運動による物理的な負荷を、機械刺激センサーとして働く転写共役因子 YAP/TAZ を介して感知し、筋肥大に働く事を発見した。つまり間葉系前駆細胞が YAP/TAZ 依存的に発現する筋肥大誘導因子は運動の一部を模倣した作用を持っており、サルコペニアの予防・治療につながると期待できる。そこで、本課題により、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ の自発運動・筋再生における役割や、YAP/TAZ 依存的に発現する運動模倣因子の探索を目的に研究を行った。

1. 研究の目的

1-1 間葉系前駆細胞特異的な活性型 YAP1 発現マウスの解析

申請者は運動依存的な筋肥大で見られる筋線維核の増加に、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ の核移行が必須であることを見出している (Cell Stem Cell, 2022)。そこで、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ の活性化が、定常状態でも運動効果誘導するかを明らかにすることを目的として、間葉系前駆細胞特異的に活性型 YAP を発現するマウスの作製を計画した。

1-2 間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損が自発運動に与える影響

外科的な筋肥大モデルでは短期間で効率的な筋肥大・サテライト細胞依存的な筋線維核数の増加を観察できるため、ヒトのレジスタンストレーニング (筋トレ) モデルとして汎用されている。しかし、ヒトのレジスタンストレーニングと比較して、非生理的なモデルであり、より生理的なモデルにおいても、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ が筋線維核の増加に必須であるかについて検証する必要がある。そこで、生理的な運動モデルとして、回転ホイールを用いた自発運動モデルを確立し、コントロールおよび間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ マウスにおける運動量・筋重量・筋線維核数の増加を比較検討した。

1-3 運動依存的に間葉系前駆細胞が発現するケモカインの解析

申請者は外科的な筋肥大モデルにおいて間葉系前駆細胞が様々な可溶性因子を発現することを明らかにしている (Cell Stem Cell, 2022)。運動依存的な筋線維核数の増加に必須のサテライト細胞の増殖には、Thrombospondin-1 (Thbs1) が必須である。さらに、間葉系前駆細胞は単球・マクロファージの走化性因子である Ccl2 や Ccl17 などのケモカインを発現する。これらケモカインの発現と YAP/TAZ の関係性、マクロファージの浸潤および、その肥大効果に与える影響を検証した。

1-4 間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損が骨格筋再生に与える影響

サテライト細胞内の YAP/TAZ は、筋再生時のサテライト細胞の増殖に必須であることが報告されている。しかし、筋再生における間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ の役割についてはこれまで報告がない。そこで、間葉系前駆細胞の再生過程における YAP/TAZ の役割の解明を目的に、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスの再生能力をコントロールマウスと比較検討した。

2. 研究方法と経過

2-1 間葉系前駆細胞特異的な活性型 YAP1 発現マウスの解析

Pdgfra^{CreERT} と活性化型 YAP (YAP^{S5A}) 誘導型マウスを交配し、間葉系前駆細胞特異的な活性型マウス (*Pdgfra^{CreERT}::iYAP^{S5A}*) マウスの作

出を試みた。

2-2 間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ が自発運動による筋肥大に与える影響

間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 二重欠損マウス (*Pdgfra^{CreERT}::YAP^{flox/flox}::TAZ^{flox/flox}*) と同腹のコントロールマウスにタモキシフェンを投与後、個別に回転ケージで2週間飼育し、回転ケージによる運動の負荷を受けるヒラメ筋と足底筋を固定した。また、2週間チミジンアナログである EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)を毎日投与し、サテライト細胞を含む増殖細胞を EdU で標識し、運動により増加した筋線維核を EdU 陽性かつジストロフィンの内側に存在する核として定量解析を行った。

2-3 運動依存的に発現するケモカイン

運動依存的に浸潤してくるマクロファージも間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ に依存しているか否かを検証するために、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 二重欠損マウスと同腹のコントロールマウスにタモキシフェンを投与後、外科的な筋肥大モデルを誘導し、2日目における代表的なマクロファージの遊走に機能する Cc12, Cc17 の遺伝子発現を両群で比較した。また、4日目におけるマクロファージの浸潤細胞数も検討した。

2-4 間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ が筋再生に及ぼす影響

間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 二重欠損マウスに蛇毒であるカルジオトキシンを前脛骨筋に投与し、投与後 2 週間後の組織学的な解析を実施した。なお、タモキシフェンを投与する時期を変えることで、筋再生過程における YAP/TAZ の欠損時期を調整し、組織学的な変化をコントロールおよび、YAP/TAZ 欠損マウス間で比較検討した。

3. 研究の成果

3-1 間葉系前駆細胞特異的な活性型 YAP1 発現マウスの解析の結果

100 匹程度の産仔を得たが、1 匹も CreERT と YAP5A を同時にもち個体を得ることができなかった。これは、CreERT が発生過程で僅かに leaky であったため、個体発生に異常が出た

めと考えられる。現在、別ラインの CreERT による解析を検討している。

3-2 間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ は自発運動によるサテライト細胞への影響

コントロールと間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスでは、回転ケージによる2週間の運動量(ホイールの回転数)に違いはなかった。そのため、運動量による影響を排除することができた。

自発運動モデルでは、主に Planter Flexor muscle と呼ばれる後ろ足の裏側の筋肉が使用される。実際、我々の検討でも、サテライト細胞由来の新たな筋線維核は Planter Flexor muscle であるヒラメ筋や足底筋で観察された。そこで、これら筋肉の解析した結果、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスでは、ジストロフィンの内側に存在する EdU 陽性の新たな筋線維核の増加が抑制されている傾向にあった。現在、個体数を増加させるとともに、遺伝子発現解析の準備を進めている。また、筋重量に関しても、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスはコントロールと比較してヒラメ筋は低値を示した。

3-3 筋肥大におけるマクロファージ浸潤も間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ に依存している

コントロールおよび間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ マウスに外科的な筋肥大モデルを処置し、2日後に足底筋を回収し、Cc12 および Cc17 の発現をリアルタイム PCR により、その発現の検討した。その結果、YAP/TAZ 欠損により、Cc12 と Cc17 の発現とも減少する傾向にあった。また、間葉系前駆再特異的な YAP/TAZ 欠損マウスでは浸潤マクロファージの数も減少していた。つまり、運動依存的に浸潤するマクロファージもまた、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ の活性化に依存していることが明らかとなった。

3-4 間葉系前駆細胞における YAP/TAZ 欠損は、欠損時期により再生像が大きく異なる

間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 二重欠損マウスは、タモキシフェンの投与により時期特的に YAP/TAZ が欠損可能である。カルジオトキシンの投与前に、タモキシフェンを投与した際の再生は、筋重量低下を示したが、組織学的な顕著な異常は認められなかった。一方

で、カルジオトキシンを投与後にタモキシフェンを投与した場合には、脂肪細胞の蓄積や再生不全を観察することができた。この結果は、他の細胞同様に YAP/TAZ は間葉系前駆細胞の増殖に必須であり、カルジオトキシン投与前にタモキシフェンを投与した場合には、YAP/TAZ を欠損することで、間葉系前駆細胞が増殖ができず、細胞死または老化細胞になっていることを予想された。一方で、カルジオトキシン投与後にタモキシフェンを投与した場合には、間葉系前駆細胞が十分に増殖したのちに YAP/TAZ が欠損することで、細胞死・細胞老化ではなく、脂肪細胞などに分化したと予想された。つまり、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ は異所性の筋内脂肪蓄積に対して生理的にその分化を抑制していることが明らかとなった。

4. 今後の課題

4-1 活性型 YAP 発現マウスの改良

間葉系前駆細胞特異的な活性型 YAPS5A 誘導型発現マウスにおいて、CreERT と YAPS5A の両方の transgene を発現するマウスを得ることができなかつたため、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ を活性化することで、どれほどの運動模倣効果が実現できるかを検証することが困難であった。これは、個体発生過程において、YAPS5A の発現が leak した可能性が考えられる。今後は、異なる PDGFRa-Cre ラインの作成や、多段階制御による YAPS5A の発現誘導マウスを用いた検討が必要である。

4-2 自発運動効果と間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ

自発運動モデルにおいても間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ がサテライト細胞依存的な筋線維核増加に機能していることが分かりつつある。しかし、外科的な筋肥大モデルと異なり、自発運動モデルでは、顕著な筋線維サイズの増加を観察することが難しい。そのため、このサテライト細胞依存的な筋線維核の増加が、自発運動モデルにおける筋肥大にどれだけ重要であるかを結論づけるのは困難である。また、サテライト細胞依存的な筋線維核の増加自体も、外科的な筋肥大モデルと比較すると極めてその数は少ない。また、運動期間を延長しても、マウスが回転ホイールに慣れてしまい運動量が低下するため、実験系として再現性の担保される

かつ変化の観察しやすい系の構築も必要である。

4-3 間葉系前駆細胞制御による運動効果の再現

人工的に間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ を制御することができれば、筋線維核数の増加・マクロファージの浸潤など、ある程度は運動を模倣することが可能であることが明らかとなった。しかし、サテライト細胞の制御においては、その維持に必須のカルシトニン受容体の発現制御は、間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ に依存しておらず、このカルシトニン受容体の発現抑制が無いと、Thbs1 による増殖促進効果も見られない。そのため、運動を模倣するためには、サテライト細胞におけるカルシトニン受容体の発現制御機構、言いかえると、運動刺激がカルシトニン受容体の発現を低下させる分子機構の解明が必須である。間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ とこの経路が同定できれば、全身の筋肉に人工的な運動効果を誘発できると期待される。

4-4 間葉系前駆細胞と筋再生

骨格筋内脂肪は、糖尿病、老化、遺伝性筋疾患などで観察され、その量は様々な健康障害と相関があることが報告されている。つまり、老化筋における骨格筋内脂肪の原因の一端が、YAP/TAZ であることが予想される。実際に、様々な組織における間質細胞の YAP/TAZ が細胞老化を抑える働きがあり、個体老化を抑制していることが近年報告されている。今後は、YAP/TAZ を介した骨格筋間葉系前駆細胞の脂肪分化機構および、その他の運命決定機構との関連などについて解析が必要である。

5. 研究成果の公表方法

5-1 自発運動効果と間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ

自発運動モデルにおける間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ の検証においては、個体数を増やしたのちに再現性を確認し、運動科学に関する優れた研究が多数報告されている Am. J. Cell Physiol. への投稿を予定している。

5-2 間葉系前駆細胞とマクロファージの関連

間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ とマクロファージ浸潤に関する研究は、現在論文を準備しており、今年中の論文掲載を目指している。

5-3 間葉系前駆細胞と筋再生

筋再生中の間葉系前駆細胞における、YAP/TAZ の仕事に関しては、タモキシフェンを投与する時期を変えることで、筋再生の表現がたが大きく異なることが明らかになりつつある。再生前にタモキシフェンを投与すると、再生後の筋重量は低下するが、組織学的には癒痕形成は見られない。再生中にタモキシフェンを投与すると、組織の約半分に癒痕形成が見られる個体もあり、重篤な再生不全を呈する。一方で、再生誘

導して 2 日後からタモキシフェンを投与すると、組織学的には比較的綺麗であるが、脂肪細胞の出現が観察される。これらの違いは、間葉系前駆細胞の増殖時期と相関していることが予想され、上記 3 つの実験は、YAP/TAZ を欠損した時期が増殖前、中、後であると予想される。YAP/TAZ の時間・空間的な制御・役割の違いを明らかにし、筋再生に負の影響を与える因子についての同定を目指していく予定である。

以上

Identification of target factors associated with 'exercise-medicine'

Primary Researcher: So-ichiro FUKADA
Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University

Exercise is the safest and most effective method of preventing sarcopenia. However, because of the risk of bone fractures in the elderly and bedridden patients, elucidation and application of the effects of exercise are desired. The applicant has discovered that muscle-resident mesenchymal progenitors sense the physical load induced by exercise via YAP/TAZ and that this sensing mechanism is responsible for muscle hypertrophy. In other words, the YAP/TAZ-dependent factors in mesenchymal progenitors mimics a part of exercise, which may lead to the prevention and treatment of sarcopenia. Therefore, with this project, we conducted research to explore the role of YAP/TAZ in mesenchymal progenitors in spontaneous locomotion, exercise, and muscle regeneration.