

令和 2 年 1 月 28 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年

受付番号 201860207

氏

名

藤田 諒

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: マギル大学 (国名: カナダ)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

高い再生能力を保持した骨格筋幹細胞の新たな培養方法の開発とその分子機構の解明

3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 1 月 12 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Human Genetics, McGill University

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

骨格筋は骨折や寝たきり、老化などによって筋活動が低下すると萎縮し、反対に運動などによって筋活動が増加すると肥大する可塑性をもつ。さらに骨格筋は損傷しても骨格筋幹細胞によって速やかに再生される。しかし、このような可塑性や再生能は加齢や慢性的な疾患などで低下し、筋量や筋力低下につながる可能性が示されている。また骨格筋は生体内最大のエネルギー代謝臓器でもあることから、骨格筋恒常性の破綻は、2 型糖尿病などの代謝性疾患を発症しやすい素地をつくると考えられる。申請者はこれまで、主に骨格筋再生の分子基盤の解明と幹細胞治療の応用を目的に研究を進めてきた。骨格筋再生はサテライト細胞以外にも、さまざまな細胞が関与する非常に複雑なプロセスである。このような複雑なプロセスを紐解くには、サテライト細胞の性質を理解することはもちろん、サテライト細胞自体を制御する分子細胞基盤の両方を理解することが重要である。また、幹細胞治療のハードルの一つとして、幹細胞自体が非常に非均質な集団であることと、培養による幹細胞性 (ステムネス) の低下が問題視されている。つまり、幹細胞の非均質性の理解と幹細胞を維持する分子基盤の解明、さらにステムネスを維持した培養方法の開発は再生医療への大きなブレイクスルーとなる。

私が所属する研究室では休止期の骨格筋幹細胞において、活性化因子の一つである **Myf5 mRNA** がすでに発現しているものの、**Myf5** のタンパク質翻訳が抑えられているということを見出した。即ち休止期の骨格筋幹細胞では活性化に備え、翻訳効率の調節によって骨格筋幹細胞の制御を行っていることを示唆している (Crist et al. *Cell Stem Cell*. 2012)。さらに、私たちはこれらの研究を行う中で見つけた **FMRP** という **RNA granule** に含まれる分子の一つにも着目し、**FMRP** が **Myf5 mRNA** の翻訳効率に影響を及ぼし、骨格筋幹細胞の自己複製や休止期の維持に関与する可能性を報告した (Fujita et al. *Skeletal Muscle*. 2017)。

一般に組織幹細胞では、細胞にとってエネルギーを非常に多く消費するタンパク質の翻訳を抑制することで幹細胞を長期的に維持すると考えられている。特に真核生物型開始因子 (**eIF2 α**) のリン酸化は細胞のグローバルなタンパク質翻訳を抑制することが知られている。私が所属する研究室は **eIF2 α** のリン酸化が休止期及び自己複製中の骨格筋幹細胞で高く維持されていることを見出し、**eIF2 α** のリン酸化が骨格筋幹細胞の幹細胞性を維持する上で重要であることを報告した (Zismanov et al. *Cell Stem Cell*. 2016)。

しかしこの報告では **eIF2 α** のリン酸化が骨格筋幹細胞の自己複製能や休止期維持をどのように制御しているかに関しては明らかでなかった。そこで我々が次に着目したメカニズムの一つが **eIF2 α** リン酸化時に起きる選択的タンパク質翻訳機構である。前述のように、**eIF2 α** リン酸化によりタンパク質翻訳を抑制することはすでに一般に周知された事実であるが、非常に興味深いことに **eIF2 α** のリン酸化によって翻訳が亢進される分子が一部存在することが確認されている。つまり、骨格筋幹細胞は自己複製時などの状況において **eIF2 α** をリン酸化することにより **Myf5** などのタンパク質翻訳を抑制する一方で、選択的に特定の分子の翻訳を更新させる、非常にユニークな幹細胞特異的な翻訳調節機構を持つと仮説を立てた。即ち、骨格筋幹細胞は **eIF2 α** のリン酸化を利用しグローバルにタンパク質翻訳を抑え、必要な因子のみを選択的に作り出す巧妙なメカニズムを持つ可能性があるということである。そしてその分子こそが骨格筋幹細胞の幹細胞としての特性維持に必要な "ステムネス因子"ではないかという着想に至った。

そこで、本研究は骨格筋幹細胞の自己複製能を中心とした、ステムネス維持機構を制御する新たな分子機構を特に骨格筋幹細胞の選択的翻訳機構に着目しメカニズムを明らかにすることで、より高い再生能力を保持した骨格筋幹細胞の培養方法の開発を目的に研究を行なった。

これまでの実験結果によって、**eIF2 α** のリン酸化を促進する低分子化合物 **sal003** を用いて、**eIF2 α** のリン酸化時に特異的に翻訳されている分子 (ステムネス因子) の同定を試みた。具体的には、分離した骨格筋幹細胞を **sal003** で処理し、**RNA-sequence** とプロテオーム解析を行なって、タンパク質翻訳のみが上昇している分子を絞り込んだ。さらに、これらの分子の中から、選択的翻訳に必要とされる **upstream open reading frame (uORF)** を持つ、**mRNA** を検索し、その因子についてルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、**eIF2 α** のリン酸化によって、**uORF** を介して選択的に翻訳される分子として **Tacc3** 同定した。また、これらの分子が骨格筋幹細胞の自己複製能を制御しているかどうかを **shRNA** 及び抑制剤を用いて検討を行なったところ、骨格筋幹細胞の自己複製能と増殖能が有意に低下した。さらに我々はこの分子

の機能を正確に調べるために、骨格筋幹細胞特異的に *Tacc3* を欠損するマウス (*Pax7^{CreERT2/+}; Tacc3^{fl/fl}*) を作成した。タモキシフェンによって骨格筋幹細胞特異的に *Tacc3* を欠損させたところ、shRNA や抑制剤の実験と同様に、骨格筋幹細胞の自己複製機能が低下することを発見した。さらに興味深いことに、*Tacc3* 欠損骨格筋幹細胞における *Pax7* の発現が顕著に低下していた。しかし、*Tacc3* 欠損細胞において、*Tacc3* をレンチウイルスベクターで戻すと、*Pax7* の発現がコントロールと同等レベルまで回復した。*In vivo* においても、*Pax7^{CreERT2/+}; Tacc3^{fl/fl}* はコントロールマウスに比べ、筋再生能が有意に低下しており、さらに *Pax7* 発現も同時に有意に低下することが観察された。これらの結果から、eIF2 α のリン酸化によって選択的に翻訳される *Tacc3* は骨格筋幹細胞における自己複製に重要な役割をしている可能性が示唆された。

次に我々は *Tacc3* がどのような分子メカニズムによって自己複製能を維持しているかを検討するべく *Tacc3* に関わる分子シグナルを検討することを決めた。まず、*Tacc3* の機能は細胞分裂等に非常に重要な役割をすると考えられている *Aurora kinase* と相互作用することが先行研究で示されていたため、*Tacc3* 欠損骨格筋幹細胞、及び eIF2 α リン酸化を高める sal003 存在下で *Aurora kinase* のリン酸化をウェスタンブロットによって調べた。sal003 存在下では *Aurora Kinase* のリン酸化が高まる一方で、*Tacc3* を欠損させると *Aurora kinase* のリン酸化が著しく低下しており、eIF2 α リン酸化及び *Tacc3* が *Aurora kinase* 活性に影響を及ぼす可能性が考えられた。さらに我々は別のアプローチとして、近年タンパク質相互作用を調べるツールとして注目されている TurboID を用いて *Tacc3* のターゲット因子を同定する実験を開始した。Turbo ID プラスミドに *Tacc3* をクローニングし、作製したプラスミドが機能的であることを確認した後に、このプラスミドを骨格筋幹細胞で利用するためにレンチウイルスベクターに載せ替える作業を行なった。今後、作製した Lentivirus-Turbo ID-*Tacc3* ベクターを用いて骨格筋幹細胞において *Tacc3* と結合する因子を同定し、さらなる分子基盤の解明を進めていく予定である。

ここまでの成果を、2019 年 12 月に福岡で行われた第 42 回日本分子生物学会ワークショップ「骨格筋再生研究の新展開」(招待講演者) で発表した。本実験で使用したマウスの輸送とリカバリーに非常に時間がかかっていたため、実験が思うように進まない時間があったが、この時間を利用して、レビューなどの執筆に貢献した (Fujita R and Crist C. Cell Stem Cell (Editorial), 2018; Fujita R and Crist C. Curr Top Dev Biol (review), 2018.)。

さらにこの間に、骨格筋幹細胞のステムネスを制御する新たな分子の探索を既存のデータベースを用いて行なった。その中で、uORF を持ち、且つ骨格筋幹細胞の休止期に強く発現する因子 オーフアン Adhesion 型 G 蛋白質共役型受容体 (GPR116) に着目した。また、発現パターンだけでなく、GPR116 は細胞外に非常に長いドメインを持つことが特徴であり、細胞外マトリックスのラミニンやコラーゲンと結合する可能性があり、骨格筋幹細胞に発現する GPR116 がニッシュと骨格筋幹細胞をつなぐ橋のような役目をしているのではないかと仮説を立て実験を進めた。

この仮説を証明するために、はじめに *In vivo* 及び *ex vivo* において、GPR116 の骨格筋幹細胞における発現を確認した。先行研究とほぼ一致して GPR116 は休止期の骨格筋幹細胞及び、自己複製中の骨格筋幹細胞に強く発現する分子であることを明らかとなった。さらに、GPR116 を骨格筋幹細胞特異的に欠損させ、骨格筋幹細胞における機能を解析したところ、GPR116 は骨格筋幹細胞の休止期維持と自己複製能に必須であることがわかった。このマウスに対して、筋損傷を加えたところ、GPR116 欠損骨格筋幹細胞による筋再生能が徐々に衰えていくことがわかった。さらに、老化に伴い GPR116 は野生型マウスと比較し、より顕著に骨格筋幹細胞数が低下した。

遺伝性筋疾患の一つである Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は筋再生と崩壊を慢性的に繰り返し、やがて骨格筋幹細胞の能力が低下することが知られている。前述の結果を受け、骨格筋幹細胞における GPR116 が自己複製能を制御していることが明らかとなったため、DMD における筋再生、骨格筋幹細胞の幹細胞性維持に GPR116 欠損がどのような影響を及ぼすかを検討した。骨格筋幹細胞特異的 GPR116 を欠損するマウス (*Pax7^{CreERT2/+}; Gpr116^{fl/fl}*) と DMD マウス (mdx) を掛け合わせ、*Mdx; Pax7^{CreERT2/+}; Gpr116^{fl/fl}* (Mdx-KO) を作成した。タモキシフェン投与により、ノックアウトを誘導させ、その後筋横断面積、骨格筋幹細胞数、筋

力 (*In vivo* & *ex vivo*) 等を測定した。ノックアウト誘導直後では、コントロール **Mdx** マウスと **Mdx-KO** との間にいずれの測定項目においても、差がみられなかった。しかし、ノックアウト誘導後 3 ヶ月を経過すると、筋横断面積の低下と骨格筋幹細胞数の低下を示した。さらに重要なことに、**Mdx-KO** マウスは有意な筋力低下を示した。これらの結果は、骨格筋幹細胞に発現する **GPR116** が **Duchenne** 型筋ジストロフィーの病態において、骨格筋幹細胞数を維持し、長期的な筋再生能力を維持するために非常に重要な役割をしていることを示唆している。

GPR116 はオーファン **GPCR** であるため、その下流の分子やリガンドなどについては不明な点が多いため。そこで、休止期の骨格筋幹細胞において活性化しているリン酸化シグナルを網羅的に解析する **Phospho-proteomics** を行なった。その結果、検出された 900 近くのリン酸化シグナルのうち特に **GPCR** の関係が深いと考えられる **Arrb1** (β -Arrestin1) に着眼した。興味深いことに、この分子も **GPR116** と同様に休止期の骨格筋幹細胞で強く発現していることが確認できた。実際に β -Arrestin1 ノックアウトマウスを用いて解析を進めたところ、 β -arrestin1 は骨格筋幹細胞の自己複製に重要である可能性が *In vivo*, *In vitro* の両方で確認することができた。

次に **GPR116** の活性化と β -arrestin1 がリンクしているかを明らかにするために、**GPCR** の専門家の一人である **Dr. Michel Bouvier (University of Montreal)** の研究室に出向いて、共同研究を開始した。**BRET** というバイオセンサーを用いて、**GPR116** の活性化により β -Arrestin1 非常にクリアに活性化することを示すことに成功した。これらの結果は、**GPR116- β -Arrestin1** パスウェイが骨格筋幹細胞において重要な可能性を示唆している。

これらの成果をこれまでにカナダ、日本を中心に学会等で発表した。2018 年 10 月に開催されたカナダとフランスとの合同幹細胞会議において、**selected speaker** として選ばれ口頭発表を行なった。またこの成果が認められ、**McGill University Regenerative Medicine** より **The Lucie Bessner** を受賞した。また同時期に所属研究所内でのセミナーにおいてベストプレゼンテーションに選ばれた。さらに、2018 年 11 月にオタワで開催された **Till & McCulloch meeting** では同プロジェクトで **Travel award** を受賞し、ポスター発表を行なった。2018 年 12 月には日本に一時帰国し筋ジストロフィー班会議でも招待講演者として口頭発表をおこなった。2019 年 9 月にはコスタリカで開催された国際学会 **Myogenesis meeting** で **selected speaker** に選出され口頭発表をした。同年 12 月には熊本大学発生医学研究所で招待講演者としセミナーを行なった。