

氏名	藤巻 慎		
学位の種類	博士（学術）		
学位記番号	博甲第 7817 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	運動による骨格筋衛星細胞の活性化を制御する 分子基盤に関する研究		
主査	筑波大学教授	理学博士、博士（医学）	武政 徹
副査	筑波大学教授	学術博士	西平賀昭
副査	筑波大学教授	医学博士	大森 肇
副査	筑波大学教授	博士（体育科学）	前田清司

### 論文の内容の要旨

骨格筋はヒトの身体の大部分を占める日常動作に必須な組織であり、随意運動によって多量の糖を代謝する働きをもつことから、糖尿病やメタボリックシンドロームなど、近年罹患率が増加している疾患の治療標的と考えられている。さらに、加齢による筋の減弱（サルコペニア）によって骨格筋重量が減少すると基礎代謝が低下するとともに、日常生活に支障が生じてしまうため、超高齢社会を迎えた我が国においても、いかに骨格筋の量や機能を維持して、自立した活動ができる身体を維持するかは重大な課題である。

骨格筋は、肥大や萎縮、筋線維タイプや酸化代謝能力の変化、損傷からの再生など、種々の刺激に応答して変化するすぐれた可塑性を有している。この骨格筋の可塑性を維持することが、健康で活動的な日常生活を送るために重要である。骨格筋の可塑性は、骨格筋特異的に存在する幹細胞である筋衛星細胞（以下、サテライトセル）がその一端を担っている。骨格筋を構成する筋線維はサテライトセルが終末分化した成熟細胞であり、サテライトセルによって新しい筋線維が形成される。遺伝子組換えによって作成されたサテライトセルを持たないマウスの骨格筋を損傷させると筋再生が一切起こらないことから、サテライトセルが存在しないと新しい筋線維を形成することができないことは明らかである。筋線維を作ることができなくなると、骨格筋の重量や筋力が低下し、日

常生活に支障をきたす。実際に、加齢した骨格筋ではサテライトセルの数や質が低下しており、これがサルコペニアの一因であると報告されている。このことから、骨格筋の恒常性を維持し、骨格筋機能を保持するためにはいかにサテライトセルを維持するかが重要であると考えられる。

レジスタンストレーニングが筋肥大を誘導したり、有酸素トレーニングが酸化的代謝能力を向上させたりするなど、運動は骨格筋機能に大きな影響を与えることが明らかにされてきた。また、運動によってサテライトセルの数が増加することも知られている。しかしながら、運動によるサテライトセルの質的变化やそれを制御する分子基盤に関する研究は乏しいのが現状である。幹細胞であるサテライトセルは、通常休止しているため、細胞数の評価がそのまま細胞機能の評価になるということには決してならない。そこで本研究は、運動によるサテライトセルの質的变化を検討することを目的とした。サテライトセルには休止型と活性型が存在し、通常は休止しているが、刺激を受けることで活性化し、増殖・分化して新しい筋線維を形成する。本研究では、このサテライトセルの活性化を質的变化として捉え、運動がサテライトセルの活性化に与える影響を検討するとともに、それを制御する分子メカニズムの探索を行う。さらに、幹細胞の機能が低下することが予想される高齢マウスや糖尿病マウスを用いることで、様々な個体環境におけるサテライトセルの質的变化とそれに対する運動の効果を分子レベルで検討し、サテライトセルの活性化を制御する分子基盤を解明することを目的とした。

研究課題 1 では、運動に対するサテライトセルの顕著な反応を捉えるために、レジスタンス運動のモデルである代償性過負荷をラットに与え、サテライトセルの活性化を検討すると共に、それを制御する分子メカニズムの探索を行った。12 週齢の Fischer 344 系雌ラットを用い、代償性過負荷を与えた FO (Functional Overload) 群と通常飼育した Cont (Control) 群に無作為に分けた。FO 群のラットに対して協働筋切除手術(足関節底屈筋群のうちヒラメ筋と腓腹筋を切除する手術)を行い、手術から 1 週間後に両群のラットから足底筋を摘出した。その結果、FO 群の足底筋は顕著な肥大を示すとともに、サテライトセルの数が有意に増加していた。また、全サテライトセルあたりの活性化したサテライトセルの割合も増加していた。さらに、両群の足底筋からサテライトセルを単離し、分化培地で培養したところ、Cont 群と比較して FO 群で融合する細胞の数が多く、より大きな筋管を形成した。これらことから、レジスタンス運動を模した過負荷刺激によってサテライトセルが活性化し、その分化能力が向上することが明らかとなった。この背景にある分子基盤を明らかにするために、様々な組織において幹細胞の運命決定に関与することが知られている Notch シグナルと Wnt シグナルに注目した。Notch シグナルは、胎生期において骨格筋幹細胞の自己複製を制御しており、反対に Wnt シグナルは骨格筋幹細胞の分化を促進すると考えられている。これら両シグナルを構成する遺伝子の定量解析を行った結果、Notch シグナルの標的遺伝子である Hes1 と HeyL の mRNA 発現量は FO 群で有意に低値を示した一方で、Wnt シグナルの細胞外リガンドである Wnt3 や R-spondin1 の mRNA 発現量は FO 群で有意に高値を示した。このことから、過負荷刺激によるサテライトセルの活性化は、Notch シグナルの不活性化と Wnt シグナルが活性化を介して起こる可能性が示唆された。

研究課題 2 では、サテライトセルの量や質が低下することが知られている高齢マウスを用い、サ

テライトセル機能の加齢変化とそれに対する運動効果を検討することを目的とした。また、研究課題 1 で明らかとなった、運動によるサテライトセルの活性化を制御する因子の 1 つである Wnt シグナルに着目し、運動による Wnt シグナルの変化とサテライトセルの活性化がどのように関与しているのか、詳細な解析を行った。なお、筋損傷の影響を除外するために、運動モデルとしてはマウスの骨格筋に対してストレスがかかりにくいと考えられる自発性走運動を採用した。8 週齢 (Adult) および 23 ヶ月齢 (Aged) の C57BL/6j 系雄マウスを用い、Adult および Aged 双方について自発性走運動を行わせた Run (Runner) 群と通常飼育した Cont (Control) 群に無作為に分けた。Run 群のマウスは、ランニングホイールが設置された個別ケージで飼育することで自発的に走運動を行わせた。実験開始から 4 週間後にすべてのマウスから腓腹筋を摘出した。筋組織切片免疫染色の結果、全サテライトセルあたりの活性化したサテライトセルの割合は Adult マウスと比較して Aged マウスで低値を示したものの、自発性走運動によって顕著に増加した。活性化したサテライトセルのマーカー遺伝子である Myf5 や MyoD のタンパク質発現量も Adult マウスおよび Aged マウスともに Run 群で増加していた。また、Wnt シグナルの細胞外リガンドである Wnt3、Wnt5a、Wnt5b の mRNA 発現量および Wnt シグナルの転写因子として働く  $\beta$ -catenin のタンパク質発現量も、Adult マウスおよび Aged マウスともに Run 群で顕著に増加していた。「サテライトセルの活性化 (Myf5 や MyoD の発現)」と「Wnt シグナルの活性化」に直接的な関係があるかどうかを検討するために、Wnt シグナルの転写因子として働く複合体である  $\beta$ -catenin/TCF/LEF の Myf5 および MyoD プロモーターに対する結合をクロマチン免疫沈降解析によって定量した。その結果、Adult マウスおよび Aged マウスともに Run 群でその結合が顕著に増加していた。これらの結果から、走運動によって活性化した Wnt シグナルが Myf5 や MyoD の転写を促進することで、直接的にサテライトセルの活性化を制御しており、この現象は高齢マウスの骨格筋においても起こることが明らかとなった。

研究課題 3 では、加齢と同じく幹細胞の機能が低下することが知られている糖尿病モデルを用い、疾患下においてサテライトセルの活性化を制御する因子がどのように変化するかを観察するとともに、運動によってサテライトセルの機能低下を抑制できるかどうかを検討した。また、糖尿病は認知機能を低下させることが報告されているため、研究課題 2 で採用した自発性走運動を糖尿病マウスが行わない可能性が考えられる。そこで、研究課題 3 では、トレッドミルを用いた強制走運動を運動モデルとして採用した。4 週齢の C57BL/6j 系雄マウスを用い、200mg/kg のストレプトゾトシンを腹腔内投与して糖尿病を誘導した STZ (Streptozotocin) マウスと比較対象として溶媒を投与した Veh (Vehicle) マウス双方について、強制走運動を行わせた Run 群と通常飼育した Cont (Control) 群を設定した。Run 群には、トレッドミルを用いた強制走運動 (1,000 m/day、5 days/week) を 4 週間にわたって行わせた。なお、経時的に血糖値を測定し、300mg/dL 以上を糖尿病の発症と定義し、発症してから運動を開始し、4 週間後にすべてのマウスから足底筋と腓腹筋を摘出した。筋組織切片免疫染色の結果、全サテライトセルあたりの活性化したサテライトセルの割合は Veh マウスと比較して STZ マウスで低値を示したものの、自発性走運動によって顕著に増加した。また、Notch シグナルを構成する DLL4、Hes1、HeyL および Wnt シグナルの細胞外リガンドである Wnt3、Wnt5a、Wnt5b の mRNA 発現量は、いずれも Veh マウスと比較して STZ

マウスで有意に低値を示した。しかしながら、DLL4、Hes1、HeyL の発現量は運動で変化しなかったものの、Wnt3、Wnt5a、Wnt5b は、4 週間の走行運動によって糖尿病による発現量の低下が抑制された。これらの結果から、糖尿病によって活性化したサテライトセルの数は減少するものの、走運動を行って Wnt シグナルを活性化させることでその機能低下を抑制することができることが示唆された。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本博士論文は、加齢や糖尿病など幹細胞の機能が低下するような個体環境においても、運動によりサテライトセルの質が維持できることを示すとともに、運動によるサテライトセルの活性化を制御する分子基盤として Wnt シグナルが重要な役割を果たしていることを見出した。この結果は、加齢や糖尿病による骨格筋の減弱を抑制する手段として運動を推奨するための大きなエビデンスになると考えられ、審査員から高い評価を得た。また、Wnt をターゲットとして、骨格筋疾患に対する医療や創薬に応用されることも期待でき、今後の課題としてこの可能性を追求して欲しい。

平成 27 年 12 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。