

京都大学	博士 (工学)	氏名	平野 航太郎
論文題目	Mechanosensitive Ion Channels as Biophysical Sensors of Muscle Satellite Cells (筋衛星細胞における機械受容イオンチャネルに関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>骨格筋を形成する筋線維は、絶え間ない筋収縮・弛緩による損傷を被るにもかかわらず、自らに備えた高い再生能を通じて組織恒常性を維持している。筋線維再生においては、筋衛星細胞が組織幹細胞として重要な役割を果たす。その際には、筋衛星細胞には様々な物理的刺激が加わるが、筋衛星細胞が力を感知する「細胞力覚」の基盤となる分子機構およびその意義は未解明である。本論文では、膜張力を感知する「機械受容イオンチャネル」(Mechanosensitive channel) 群が、筋衛星細胞の機能を制御するという仮説に基づき、筋衛星細胞に高発現する PIEZO1、TRPM7 各イオンチャネルについて、遺伝子改変マウスを用いた役割解明を行った。本論文はその研究成果をまとめたものであり、序論および本論 (三章) から構成される。以下にその概略を示す。</p> <p>序論では、骨格筋、組織幹細胞に関する概論、筋衛星細胞の筋再生に関連する先行研究、筋衛星細胞の力学的環境変動とその意義、物理的な刺激に応じて活性化される機械受容イオンチャネルに関する先行研究を記述し、本論文の目的が述べられている。</p> <p>第一章では、筋衛星細胞における機械受容イオンチャネル PIEZO1 に関する研究が記述されている。筋再生時、多様な物理的な負荷が筋衛星細胞に掛かり、筋再生の制御に関わると想定されてきたが、筋衛星細胞における細胞力覚機構は未だ明らかではなかった。そこで、膜張力に応じて活性化され、細胞内への Ca^{2+} 流入を惹起する機械受容イオンチャネル PIEZO1 に着目した。筋衛星細胞特異的 <i>Piezol</i> 欠損マウスを作出し、筋融解作用をもつヘビ毒 <i>Cardiotoxin</i> を用いて筋線維を壊死させ、筋再生過程を観察したところ、骨格筋組織の断面積の低下や線維化を伴った筋再生の遅延が観察された。また、単離筋線維上に存在する筋衛星細胞の性状解析を行ったところ、<i>Piezol</i> 欠損筋衛星細胞では、細胞周期が進行する増殖期の筋衛星細胞の顕著な増加が見られたことから、PIEZO1 は筋衛星細胞の性化を抑制することが想定された。さらに、<i>Piezol</i> 欠損筋衛星細胞は、培養ディッシュの基質の硬さに応じた増殖能変化を失い、遊走能の減弱も示した。以上の発見により、筋衛星細胞の活性化・分裂・増殖に果たす PIEZO1 チャンネルの役割が明らかとなった。</p> <p>第二章では、筋衛星細胞で機能する機械受容イオンチャネル TRPM7 に関する研究が記述されている。<i>in silico</i> 解析により、筋衛星細胞に高発現する遺伝子群の中に機械受容性を示す TRPM7 チャンネルをコードする遺伝子が含まれることを見出した。筋衛星細胞特異的 <i>Trpm7</i> 欠損マウスを作出したところ、筋再生能の消失と著しい線維化が観察された。さらに、筋再生 3 日目において、再生筋組織上にて筋衛星細胞・筋芽細胞を検出したところ、筋衛星細胞特異的 <i>Trpm7</i> 欠損マウスでは、筋衛星細胞数が著しく減少していたことから、TRPM7 は筋再生時にて筋衛星細胞の活性化や増殖に関与することが強く示された。</p> <p>そこで、筋衛星細胞の活性化における TRPM7 の役割に着目し、筋線維を単離・培養した後、筋線維上に存在する筋衛星細胞の活性化を誘導したところ、<i>Trpm7</i> 欠損筋衛星細胞では、細胞周期が進行する増殖期の筋衛星細胞の数が著しく低下していた。このことより、TRPM7 の筋衛星細胞の細胞周期促進における重要性が明らかとなった。また、単離 <i>Trpm7</i> 欠損筋衛星細胞にて、増殖能や細胞融合能、細胞サイズがそれぞれ</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	平野 航太郎
------	---------	----	--------

低下したことから、TRPM7は筋分化にて重要な役割を果たすとともに、細胞の大きさを制御する Phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin 経路の上流因子であることが示唆された。

さらに、筋衛星細胞としての幹細胞性への影響についても検討を行った。*Trpm7* 欠損筋衛星細胞では、筋衛星細胞特異的な転写因子 Pax7 の発現量が低下し、幹細胞としての自己複製能が低下していることを見出した。先行研究において、Akt 経路の下流にてストレス応答性転写因子 FOXO が機能し、筋衛星細胞の幹細胞性を制御していることが報告されている。そこで、FOXO1 及び FOXO3a の細胞内局在を検出したところ、*Trpm7* 欠損筋衛星細胞では FOXO の核外移行が阻害されることを見出した。以上の結果から、筋衛星細胞では TRPM7-Akt-FOXO 経路が亢進することで、幹細胞性の維持をもたらすことも示唆された。

第三章では、機械受容イオンチャネルの発現量の変動により、筋衛星細胞の性質の違いが生み出されるという仮説に基づき、PIEZO1 による幹細胞の多様性制御への関与を検討した。まず、筋衛星細胞特異的に *Piezo1* 欠損を誘導後、1、2、および 16 週間後に筋線維を単離したところ、筋線維上に存在する筋衛星細胞数が低下することを見出した。この結果は、機械受容イオンチャネル PIEZO1 が筋衛星細胞の静止状態維持に重要であることを支持する。続いて、PIEZO1 C 末端に蛍光タンパク質 tdTomato を付加した *Piezo1*-tdTomato マウスを用いて、そこから単離・培養した筋衛星細胞において免疫染色法により *Piezo1*-tdTomato の蛍光強度を検出したところ、個々の細胞にて PIEZO1 の発現量が大きく異なっていた。PIEZO1 高発現 (PIEZO1^{High}) 細胞と低発現 (PIEZO1^{Low}) 細胞について、性質の違いを検討すべく筋分化の指標である Pax7 や Myogenin の発現量を免疫染色法により分析したところ、PIEZO1^{High} 細胞では Pax7 は高く発現しており、筋分化マーカー (Myogenin) の発現量は低い傾向を示した。一方、PIEZO1^{Low} 細胞では Pax7 の発現量は低く、Myogenin の発現量は高かったことから、PIEZO1^{High} 細胞は幹細胞性が高く、PIEZO1^{Low} 細胞は筋分化が進行していることが示された。

PIEZO1^{High}・PIEZO1^{Low} 細胞間の性質を理解するために、FACS を用いて PIEZO1^{High} 細胞と PIEZO1^{Low} 細胞を分取し、RNA-seq 解析を行った。Gene set enrichment analysis により、PIEZO1^{High} 細胞では、G2/M 期チェックポイント、脂質代謝、DNA 修復などの関連遺伝子群が高発現していることがわかった。一方、PIEZO1^{Low} 細胞では、筋分化の関連遺伝子群が高く発現していた。これは、第一章で記述したように、PIEZO1 が細胞分裂に関与することに加え、PIEZO1^{Low} 細胞で Myogenin が高く発現していることと相関していた。

筋衛星細胞の幹細胞性の維持には、Notch 経路の関与が知られている。そこで筋分化の進行が Notch 経路にて調節されているか、検証を試みた。Notch 経路を阻害する γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT を培地内に添加したところ、PIEZO1 の発現量が有意に低下した。さらに Notch 経路の細胞外リガンド Delta-like-ligand 4 を処置した培養基質上で筋衛星細胞を培養したところ、PIEZO1 の発現量の増加が認められた。これらの結果から、Notch 経路は PIEZO1 の発現調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

以上の結果から、機械受容イオンチャネルが筋衛星細胞の多様性制御の最上流因子として機能することが示唆された。すなわち、本論文は、筋衛星細胞が周囲の力学的環境を認識する機構、さらには筋再生機構の全容解明に繋がると言える。

氏名	平野 航太郎
----	--------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、骨格筋の再生に重要な役割を果たす幹細胞である筋衛星細胞を研究題材とし、それらに発現する機械受容イオンチャネル群に着目して骨格筋幹細胞の細胞力覚機構の解明を目指した研究であり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 機械受容イオンチャネル PIEZO1 は、細胞膜に張力が加わることで活性化する Ca^{2+} 透過型のイオンチャネルである。機械受容イオンチャネル PIEZO1 が筋衛星細胞の周囲の基質の硬さを感知し、細胞増殖を制御することを示し、さらにその分子機構を明らかにした。本研究により明らかとなった細胞力覚機構は、組織幹細胞の力学的環境感知の最重要基盤となる。
2. 機械受容性を示す TRPM7 イオンチャネルが筋衛星細胞の活性化機構を制御することを明らかにした。また、その下流経路として Phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin 経路が存在し、筋衛星細胞の細胞サイズの制御を行なっていることを明らかにした。
3. PIEZO1 チャネルの発現レベルの不均一性を筋衛星細胞が示すことを明らかにした。さらに、PIEZO1 チャネルの発現量を制御する機構として、Notch 経路が存在することを見出した。本研究により、機械受容イオンチャネル PIEZO1 の発現量によって筋衛星細胞の多様性が生み出されることを明らかにした。

以上のように、本論文は骨格筋幹細胞の力覚機構、及びその筋発生・再生における生物学的意義に関する知見を著しく向上させたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：令和5年3月31日以降