

厚生労働科学研究費補助金
(こころの健康科学研究事業)

内因性ユートロフィンの発現増強による
筋ジストロフィーの画期的治療法の開発

総合研究報告書
(平成15年度～平成17年度)

主任研究者 武田伸一

平成18年(2006)年3月

目 次

I. 総合研究報告	
内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発	
武田 伸一	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 13
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総合研究報告書

内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発

主任研究者 武田 伸一 国立精神・神経センター 神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 部長
分担研究者 鈴木 友子 国立精神・神経センター 神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 室長
石浦 章一 東京大学大学院 総合文化研究科
教授

研究要旨

1. ユートロフィン遺伝子上流 12.7 kb を LacZ 遺伝子に連結した DNA construct を導入したトランスジェニック・マウス (Gnls マウス) では、LacZ の発現はほぼ内因性のユートロフィン発現に近いものであったが、骨格筋、心筋では認められなかった。そこで同遺伝子のイントロン2内に同定されているエンハンサー (DUE) を組み込んだ construct を作成し、再度トランスジェニック・マウス (DUE マウス) を作出した。DUE マウスでは骨格筋の神経筋接合部、心筋で LacZ の発現が認められ、DUE がユートロフィンの骨格筋、心筋での発現に必須である事が証明された。DUE マウスは、ユートロフィンの発現を増強する化合物の high-throughput のスクリーニングにも有用であると期待される。
2. ジストロフィン欠損筋において内因性ユートロフィンの発現を増強させ、筋変性を抑制する治療を確立するために、マウス骨格筋の IL-6R と gp130 の発現を解析した。
3. ユートロフィン遺伝子 3'-非翻訳領域に対する RNA 結合蛋白質を検索したところ、52 kDa の蛋白質が特異的に結合していた。
4. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系 Purkinje 線維が早期から選択的な空胞変性に陥ることを初めて見出した。同線維では、発現集積した μ -calpain により cardiac Troponin-I が分解していた。断片化を受けた cardiac Troponin-I は、ubiquitin E3 ligase である MuRF-1 によりユビキチン化を受けている可能性がでてきた。したがって筋ジストロフィーに対するカルパイン・インヒビターないしはユビキチン・プロテアソーム阻害剤による治療法の開発が注目される。
5. 筋強直性ジストロフィー (DM) は、異常な繰り返し構造を持つ mRNA にタンパク質が結合し RNA スプライシングが異常になって発病する「RNA 病」であることが明らかになった。リピート RNA に結合する因子として MBNL ファミリーと CELF ファミリーという2つの遺伝子群から作られるタンパク質が関与しているが、種々の遺伝子のスプライシングを拮抗的に調節していることを証明した。
6. 米国 Pennsylvania 大学 Khurana 博士と共同して、イヌ型 pro-myostatin 遺伝子のクローニングを行った。

A. 研究目的

ユートロフィンは、ジストロフィンのホモログであり、骨格筋形質膜直下に発現し、ジストロフィン結合蛋白複合体を膜に局在させる。ウイルスベクターや発生工学的手法

を用いて筋に高発現させると、ジストロフィン欠損 *mdx* マウスの系では、筋変性を抑制する事が報告されている。我々は以前アデノウイルスベクター導入筋でユートロフィンが高発現し、その一部は IL-6 の作用

によると報告してきた (Yamamoto *et al.*, *Hum Gene Ther* 2000, 11, 669 ; Fujimori *et al.*, *Hum Gene Ther* 2002, 13, 509)。そこでジストロフィン欠損による筋ジストロフィーにおいて内因性ユートロフィンの発現を増強する治療法を確立する目的で、我々はユートロフィンの発現調節機序をトランスジェニックマウスを用いて解析するとともに、以前我々が報告した IL-6 によるユートロフィンの発現増強の分子機構を解析した。

また、ユートロフィン発現増強には、その mRNA を安定化する RNA 結合蛋白質の存在が示唆されており、実際に内因性のユートロフィンの発現が増強されているアデノウイルスベクターを導入した *mdx* 骨格筋抽出液においてそのような活性が見いだされるか、RNA プローブを用いた UV-cross linking assay を行った。

RNA 結合蛋白質に関しては、DMD に次いで頻度の高い筋強直性ジストロフィー (DM) との関連が注目される。DM1 型の責任遺伝子は、第 19 染色体にある DM キナーゼ (DMPK) 遺伝子であるが、その 3'-非翻訳領域にある CTG リピートの伸長が直接の原因である。また最近 DM2 型も発見されたが、その原因遺伝子は第 3 染色体にあるジンクフィンガータンパク質 ZNF9 遺伝子であり、そのイントロン 1 にある CCTG リピートの伸長を直接の原因としていた。そこで、こうした DM リピートに結合する RNA 結合蛋白質を明らかにすることを目的とした研究を行った。この研究はユートロフィン遺伝子の 3'-UTR に結合する RNA 結合蛋白質を見出し clonig するための基礎研究としても位置付けられる。

一方、ジストロフィン欠損の筋ジストロフィーに対して行われてきた研究は、ほとんど全て小型の *mdx* マウスを対象としていた。

mdx マウスを治療用のモデルとして用いるには、二つの大きな問題がある。一つは小型のモデル動物の限界であり、他の一つは比較的軽症で臨床的に進行性が目立たないことである。その点で注目されるモデル動物に筋ジストロフィー犬がある。筋ジストロフィー犬は、DMD と類似した重症で進行性の臨床症状を示し、四肢を利用した筋生検も可能であることから、治療用のモデルとして優れている。そこで、本研究では、筋ジストロフィー犬の分子病態を明らかにし、治療用モデルとして確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. ユートロフィン遺伝子の発現制御機構

1) ユートロフィン遺伝子上流を組み込んだトランスジェニック・マウス (Gnls マウス) の作成と解析

ユートロフィン遺伝子プロモータ領域を含む遺伝子上流 12.7 kb をマウス・ゲノミック DNA ライブラリーからクローニングし、LacZ 遺伝子に繋いだ transgene をマウス受精卵に導入し、トランスジェニック・マウスを 4 ライン作出した。また、得られたマウスを *mdx* マウスに交配した (Tg/*mdx*)。上記 4 ラインのマウスに関して、LacZ 遺伝子の各組織での発現を、X-gal 染色、ユートロフィン染色、及びヘマトキシリン・エオジンで検討した。

2) エンハンサーを組み込んだトランスジェニック・マウス (DUE マウス) の作成

マウスゲノムからプライマーと PCR を用いて、2000 年に Galvagni らが報告したイントロンエンハンサー (128 bp) を増幅し、TA ベクターにクローニングし、シークエンスを確認し、前回作成した Tg の上流に挿入した。直線化したプラスミドを 523 個の受精卵に injection して 129 匹の F0 を得

て、サザンブロットングにて transgene の有無を確認した。トランスジーンの有無は、マウスの尻尾からゲノム DNA を調整して、サザンブロットにて行った。

3) DUE マウスの解析

2000年に Galvagni らが J. Biol. Chem. に報告したイントロン・エンハンサー (128 bp) をクローニングし、前回作成した Tg 用コンストラクトの上流に挿入、トランスジェニック・マウスを作成した。得られた 2 ラインのマウスについて、X-gal 染色、RT-PCR 等を用いて、各臓器での transgene を発現する細胞の同定と発現のレベルを解析した。また、カルジオトキシンをトランスジェニック・マウスの前脛骨筋に投与して、筋再生を引き起こし、LacZ の発現増強が筋核で認められるか、調べた。

4) DUE エンハンサーに結合する因子の解析

128 bp のエンハンサー領域に結合する転写因子を転写因子の結合配列の data ベースをもとに検索した (富士通株式会社に委託)。

5) 2 週齢の *mdx* 及びコントロール B10 マウス骨格筋から mRNA を調整し、IL-6R 及び gp130 の mRNA の発現を RT-PCR で解析した。

6) ユートロフィン遺伝子 3'-非翻訳領域をクローニングし、³²P-UTP でラベルした RNA プローブを作成し、骨格筋抽出液とインキュベートし、UV-cross linking アッセイを行った。

2. DM リポートに結合する RNA 結合蛋白質

ヒト cDNA ライブラリーから、MBNL と CELF あわせて 9 種のリポート RNA 結合タンパク質 (MBNL1, MBNL2, MBNL3, CUG-BP, CUG-BP2, CELF3, CELF4, CELF5, CELF6) をクローニングした。これらの実験では市販のヒト cDNA ライブラリーを用いたため、倫理規定に抵触することはない。リ

ポート RNA と蛋白質の結合は、表面プラズモンバイオセンサ、酵母 three hybrid 法、gel retardation を用いて解析した。スプライシングアッセイには、塩素チャネル、インスリン受容体、 α アクチニン、c-src などの mini-gene を用いた。

3. 治療用モデル動物としての筋ジストロフィー犬

1) 材料

国立精神・神経センター内に設立された中型実験動物研究施設で維持されている筋ジストロフィー犬コロニーの中から正常対照犬 9 頭、筋ジストロフィー犬 13 頭 (ともに 1-15 ヶ月齢) を対象とした。

2) 血清 cardiac Troponin-I 及び Troponin-T の検出

筋ジストロフィー犬及びその対照犬について、3 ヶ月ごとに採血を行い、その血清について ELISA kit を用いて cardiac Troponin-I 及び Troponin-T の検出を試みた。

3) 組織学的解析

心臓をホルマリン固定後、洞結節を含む右心房、房室結節及び His 束を切り出し、Purkinje 線維を含む左心室は、基底部、乳頭筋レベル、心尖部の三層に横断面で全割した。大割組織片は通常のパラフィン切片作製後、10 μ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) で染色した。

4) micro-dissection を用いた解析

心筋凍結標本について、ARCTURUS 社の LCM (Laser-capture micro dissection system) 装置を用いて、作業心筋及び Purkinje 線維から 500-800 shot 集積した。ウェスタンブロットおよび免疫沈降法を用いて cTnI、ubiquitin、MuRF-1 の発現を解析した。また、上記各分子の局在については免疫組織化学的に検討を行った。

C. 研究成果

1. ユートロフィン遺伝子の発現抑制機構

1) Gnls マウスの解析

プロモータ A を含む 12.7 kb のユートロフィン遺伝子上流は、肝臓、精巣、大腸、小腸、顎下腺での LacZ の発現を制御していた。この発現は A-utrophin として報告されているユートロフィン分子種の内因性の発現と良く一致していた。一方 Gnls マウスでは骨格筋、心筋での A-utrophin の発現を再現していなかった。

2) DUE マウスの解析

新たに作成したトランスジェニック・マウス (DUE-Tg) では以前発現が確認されなかった心筋、骨格筋の神経筋接合部に β -gal の発現が認められた。心筋、骨格筋以外に臓器、例えば肺、小腸、小脳等でも β -gal の発現増強が認められ、DUE は筋特異的エンハンサーではなく、いろいろな臓器で活性を持つと考えられた。さらに、DUE-Tg の骨格筋に cardiotoxin を直接導入し、筋再生を誘発すると、トキシン投与 3 日後、5 日後に β -gal の mRNA のレベルが上昇していた。またそれに一致して、筋核で β -gal の発現が認められた。

3) エンハンサー領域 (DUE) に結合する転写因子の検索

DUE (Downstream utrophin enhancer) 128 bp の塩基配列の解析から、AP-1, Oct-1, TEF-1 がその結合因子の候補である事がわかった。

4) IL-6 とユートロフィンの発現

我々は、hyper-IL-6 を用いたジストロフィン欠損筋でのユートロフィンの発現増強を企図して、Christian Albrecht 大の Dr. Stefan Rose-John 博士と共同研究をスタートさせた。Preliminary な結果として、2 週齢の *mdx* 及び

コントロール C57Bl/6 骨格筋では IL-6R の発現は極めて低い、gp130 の発現は、肝臓や脾臓に匹敵するくらい高い発現が認められ、hyper-IL-6 を用いたユートロフィンの発現増強が IL-6 を用いた時よりも高いレベルで達成できると期待される。

5) ユートロフィン遺伝子の 3'-UTR

UV-cross linking 法による 3'-UTR RNA 結合蛋白の検索の結果、3'-UTR RNA に結合し、mRNA を安定化させる蛋白 (~52 kDa) の存在が示唆された。

2. DM リピートに結合する RNA 結合蛋白質

1) RNA 結合特異性

酵母 three hybrid 法の結果、CUG 並びに CCUG リピートに強く結合したのは、従来報告のあった CUG-binding protein (CUG-BP) ではなく、MBNL1 (muscleblind-like 1) であることが明らかになった。

CUG-BP は欧米の研究者から DM のリピートに結合する分子として報告されていたが、今回、私たちの表面プラズモンバイオセンサによる直接的結合解析、酵母 three hybrid 法による細胞内結合解析法、gel retardation による in vitro 結合解析によって、3 塩基リピートには結合しにくく、UG などの 2 塩基リピートに強く結合することが判明し、DM 症状には直接的関与が認められないであろうということが明らかになった。

また、MBNL1/EXP には 9 つのスプライシングアイソフォームがあり、MBNL1/EXP は CUG 3 塩基リピートだけでなく、CCUG 4 塩基リピートとも強く結合することがわかった。これらの系で PKR は、二本鎖の RNA に特異的に結合することがわかり、CUG や CCUG リピートという DM 関連の RNA リピートには結合しなかった。

2) RNA 結合タンパク質のスプライシングへの関与

まず、ミニ gene を用いた in vitro スプライシング系にこれら RNA 結合タンパク質を加え、mini-gene のスプライシングパターンが変化するかどうかを調べた。マウス塩素チャネル (マウス) では MBNL ファミリーの 3 つがエキソン 7A のスキップ方向に働くのに対し、CELF ファミリー (特に CELF3-6) はエキソン 7A を含むようにスプライスさせることがわかった。また、MBNL1 のスプライシングを CELF 型に変えるには、CELF4 が一番活性が高いことが判明した。

3) DM 筋における MBNL1 の発現

次に、リアルタイム PCR を用いて MBNL1 の量を、DM 患者 21 例と疾患対象者 12 例で調べたところ、DM の方が多少、少なかったが対照と比較しても有意差がなかった。

3. 治療用モデル動物としての筋ジストロフィー犬

1) 若齢筋ジス犬では、Purkinje 線維の選択的空胞変性を生ずる

対象とした全ての筋ジス犬で心電図上、異常 Q 波を認めたにもかかわらず、HE 染色による病理組織学的検討では、ほとんどの個体で作業心筋の変性所見は認められなかった。刺激伝導系では、房室結節と His 束に硝子化を認めた 1 頭を除き、洞結節から His 束まで変性所見は認められなかった。一方で Purkinje 線維では全頭で辺縁不整なおびただしい空胞が観察された。

空胞変性が認められた筋ジス犬 Purkinje 線維における μ -calpain の発現を検討した。免疫組織化学的染色では、筋ジス犬 Purkinje 線維に限局して μ -calpain の発現増加が認められ、空胞を伴わない線維では形質膜直下に、空胞を伴う線維では空胞内に局在していた。

2) 筋ジストロフィー犬血清では、cardiac

Troponin-I が検出される

ELISA 法を用いて、筋ジス犬の血清を検索したところ、正常対照犬からは全く検出されていないのに対し、筋ジス犬の血清から、最高値で 40 ng/ml の cardiac Troponin-I が検出された。そこで血清から Albinin 及び IgG を除去した後、SDS-PAGE を行って特異的抗体を用いた Western 解析を行った結果、calpain による cardiac TN-I の分解産物と考えられる 18 kDa 及び 14 kDa の band が検出された。なお、筋ジス犬の血清では cardiac Troponin-T が検出されることもあったが、non-specific と理解された。

3) 筋ジス犬 Purkinje 線維では cardiac Troponin-I の分解を生じている

筋ジス犬の血清で、calpain によると考えられる cardiac Troponin-I の分解産物を検出したため、その分解がどの臓器・組織で生じているのか micro-dissection により検体を集積した上で解析した。その結果、筋ジス犬の Purkinje 線維においてのみ、cardiac Troponin-I の分解産物が検出された。しかし特異抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果では、大きな異常は見られなかった。

4) 断片化された cardiac Troponin-I はユビチキン化されている可能性が高い

筋ジス犬のプルキンエ線維について検討を進め、以下の結果を得た。①ウェスタンブロットにより cTnI が μ -calpain による断片化を受けた場合に出現する、約 18 kDa および 14 kDa の断片が検出された。また、血清サンプルにおいても同分子量の断片化された cTnI が検出された。②免疫組織化学では、筋ジス犬の Purkinje 線維では正常対照犬に比べ ubiquitin および MuRF-1 の強い染色性を認め、cTnI と共局在を示した。③免疫沈降法により、ユビキチン化を受けた断片化 cTnI が検出された。

4. マイオスタチン機能抑制

1) イヌ型 pro-myostatin 遺伝子の cloning

Pennsylvania 大学の Teji Khurana 博士と協同で、イヌ型の pro-myostatin 遺伝子のクローニングを進めた。イヌ型の myostatin に対する抗体を樹立することは難しいので、promyostatin を大量生産するか、あるいは AAV ベクターに組み込んで、筋ジストロフィーに対する投与を考えたい。

D. 考察

1. ユートロフィン遺伝子の発現制御機構

ユートロフィン A-プロモータは A-ユートロフィンの、腎臓、肝臓、肺、だ液線、小腸、大腸における発現調節に重要な役割を果たす事がわかった。

骨格筋、心筋での A-ユートロフィンの発現は、A-プロモータを含む 12.7 kb の 5'-flanking region では十分ではなく、その他に、エンハンサーが必要であると考えられ、ため我々は新たにイントロンエンハンサーとして働く可能性のある領域をクローニングし、新しく transgene に組み込みそのトランスジェニックマウスを作出した。

その結果、骨格筋、心筋に於けるユートロフィンの発現調節には、ユートロフィン遺伝子のイントロン 2 に見つかった DUE と名付けられた 128 bp のエンハンサーが重要な役割を担っている事がわかった。今後はこのエンハンサーに結合する因子の同定を進める予定である。

また、このトランスジェニック・マウス由来の細胞に様々な化合物を加えて、ユートロフィンの発現を増強する可能性のある化合物を high-throughput のスクリーニングで探していく予定である。そうした化合物が見つければ、ジストロフィーが欠損して起こる筋ジストロフィーにおいて、筋膜を安定化さ

せ、筋ジストロフィー患者に見られる筋変性を軽減する治療法の確立が期待される。

一方、我々は IL-6 によって内因性のユートロフィンの発現が *mdx* 筋において誘導される事を報告しているが (Fujimori et al., Hum. Gene Ther. 2002)、IL-6R の発現レベルが低いのと対照的に、gp-130 が骨格筋に高いレベルで発現している事が今回わかり、hyper-IL-6 の有効性が期待される。

ユートロフィン mRNA の 3'-UTR に結合する 52 kDa の蛋白は、アデノウイルス導入時のユートロフィン mRNA の安定化に関わっていると考えられるが、今後はその分子種の同定が必要である。以前我々のラボで行ったアデノウイルス導入した *mdx* 筋と導入していないコントロール筋の microarray による網羅的遺伝子の結果と照らし合わせ、現在その候補を絞っているところである。

2. DM リピートに結合する RNA 結合蛋白質

今回の実験により、生体内にはリピート RNA に結合する分子には基質特異性があることが明らかになった。また、DM の発症原因は、CUG と CCUG リピートの伸長と考えられているが、私たちの単離した MBNL1/EXP がそのどれもにも強く結合することが判明した。

筋強直性ジストロフィーの多様な症状は、種々の遺伝子のスプライシングによる機能差から来るものであることが明らかになってきた。例えば、マウス塩素チャネル遺伝子では、エキソン 7A が入ると途中に停止コドンが入り、短縮されたタンパク質ができて機能が阻害されるが、エキソン 7A が飛ばされると正常型の塩素チャネルになる。前者は胎児筋で、後者は成熟筋で見られるスプライシングである。CELF4 が上がると短縮型ができ、MBNL1 が上がると正常型にな

る。このように、生体内ではこの2つのバランスがとれていると考えられる。

ところが、RNA結合タンパク質の発現量が増加するとこのバランスが崩れ、どちらかに偏ってしまうことが本研究で明らかになった。今後は、これらRNA結合タンパク質も治療の標的として検討すべきであることがわかった。

2. 筋ジストロフィー犬における心刺激伝導系の選択的障害

筋ジストロフィー犬の心刺激伝導系ではPurkinje線維に選択的な空胞変性が観察され、しかもそれには μ -calpainが関与していることが明らかになった。*mdx*マウス骨格筋では以前から μ -calpainの関与が指摘されているが、筋ジス犬では作業心筋が障害される以前に検出されていることから大変興味深い結果といえる。さらに、筋ジス犬Purkinje線維では、calpainによるcardiac Troponin-Iの分解を生じ、しかもその分解産物が血清で検出されることを明らかにした。この研究の意味するところは、次の3点に集約できる。

- (1) 血清cardiac Troponin-Iを筋ジストロフィーにおける心筋障害のマーカーとして利用できる可能性が生まれた。
- (2) calpainによるcardiac Troponin-Iの分解が筋ジストロフィー犬におけるPurkinje線維の障害の原因である可能性がある。
- (3) 筋ジストロフィーの横紋筋障害において、calpainが中心的な役割を果たしている可能性がある。

さらに筋ジス犬のPurkinje線維では、断片化されたcTnIがMuRF-1によってユビキチン化されてユビキチン-プロテアソーム系によってタンパク質分解を受けた結果、変性が生じている可能性が考えられる。また、これらの結果から、筋ジストロフィーの病態機構にも筋萎縮と同様のユビキチン化が関与

している可能性が示唆された。さらに、これらの研究結果はカルパイン・インヒビターあるいはユビキチン・プロテアソーム阻害剤が筋ジストロフィーに対する治療法として検討されるべきことを示唆している。

3. myostatin blockadeの可能性

myostatin blockadeに関しては、大型のmyostatinの抗体を準備するには困難が予想されるため、propeptideの作製を急いでいる。筋ジス犬におけるtrialの結果が期待される。

E. 結論

1. トランスジェニックマウスを用いたユ解析により、ユートロフィン遺伝子A-プロモータの活性が明らかになった。
2. ユートロフィンのAプロモータの上流に更にイントロン・エンハンサーを連結したものをレポーター遺伝子LacZにつなぎ、トランスジェニックマウスを作出し、2ラインを得た。さらに、このマウスの解析から、イントロン・エンハンサーが骨格筋と心筋におけるユートロフィン遺伝子発現制御において重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後、ユートロフィンの発現検定系として使える可能性が高い。
3. IL-6を用いたユートロフィン発現増強は、今後hyper-IL-6を用いてその効果を検討していく予定である。
4. ユートロフィンの発現増強には、52 kDaのmRNA結合/安定化因子が関わっていると考えられ、今後はそのクローニングを進めていく必要がある。
5. 筋強直性ジストロフィーの多岐にわたる症状は、原因遺伝子そのものではなく、リピート自身が引き起こしていることが明らかになった。そこで、伸

長リピートに結合する因子を探したところ、CUG-BP や MBNL1 などいくつかの RNA 結合タンパク質が候補に挙がってきた。RNA 結合タンパク質 MBNL1 が DM に見られるリピート RNA に結合し、正常な機能である RNA スプライシングをおかしくすることで、DM の多彩な症状を発現させている可能性が指摘された。

6. 筋ジストロフィー犬心刺激伝導系において Purkinje 線維が早期から選択的な空胞変性を生じ、しかも同部に μ -calpain が集積していることを明らかにした。さらに、calpain の作用により、cardiac Troponin-I が分解し、それが心筋障害につながっている可能性を初めて指摘した。
7. μ -calpain によって断片化を受けたと考えられる cardiac Troponin-I (cTnI) がユビキチン化を受けている可能性が指摘された。同線維では、ubiquitin および MuRF-1 の染色性を認め、cTnI と共局在を示した。さらにユビキチン化した cTnI 断片が検出された。
8. 筋ジストロフィー犬に myostatin propeptide を投与する準備のための研究を進めた。イヌ型の pro-myostatin 遺伝子を cloning した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

< 英文 >

1. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Ksaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N:
Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone

formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation
J Bone Mineral Res (in press)

2. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle
Biochem Biophys Res Commun, 341: 864-73, 2006
3. Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S:
Intracellular localization of Dysferlin and its association with the Dihydropyridine receptor.
Acta Myologica, XXIV: 134-144, 2005
4. Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S:
Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDj.
Acta Myologica, XXIV: 145-154, 2005
5. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y:
Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration.
Science, 2005 Jul 8; 309(5732): 314-7.
6. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S:
Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise.
Biochim Biophys Acta, 2005 Jun 10; 1740(3): 326-31.
7. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S:
Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice.

- Muscle Nerve*, 2005 Aug; 32(2): 191-9.
8. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S: Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle. *Am J Pathol*, 2005 Jun; 166(6): 1721-32.
 9. Ishiura, S., Kino, Y., Nezu, Y., Onishi, H., Ohno, E. and Sasagawa, N. (2005) Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein. *Acta Myologica*, 14, 74-77
 10. Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. & Ishiura, S. (2005) Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids. *Biochim Biophys Acta*, 1748: 174-179
 11. Mitsuhashi, H., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Hayashi, Y. & Ishiura, S. (2005) Denervation enhances the expression of SHPS-1 in the rat skeletal muscle. *J. Biochem*, 137: 495-502
 12. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S: ϵ -Sarcoglycan compensates for lack of α -sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 14(6): 775-83, 2005
 13. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL: Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol*, 168(4): 655-66, 2005
 14. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine. *J Gene Medicine*, 7(2): 237-48, 2004
 15. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in a relatively small percentage of *mdx* myofibers improved the *mdx* phenotype. *Mol Ther*, 10(5): 821-828, 2004
 16. Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T: Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 6(5): 483-8, 2004
 17. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration *Biochem Biophys Res Commu*, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
 18. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M: Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(16): 1775-1784.
 19. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H: Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res*, 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.

20. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M:
Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system.
Mol Brain Res, 125(1-2): 1-12, 2004
21. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:
alpha 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.
J Biol Chem, 279(15): 15091-5, 2004
22. Kino Y, Oma Y, Sasagawa N, Ishiura S:
Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. Human
Mol. Genet, 13, 495-507, 2004
23. Watanabe T, Takagi A, Sasagawa N, Ishiura S, Nakase H: Altered expression of CUG binding protein 1 mRNA in myotonic dystrophy 1: possible RNA-RNA inter-action. *Neurosci Res*, 49, 47-54, 2004
24. Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams G, Baldwin K, Yasui N, Kishi K, Takeda S:
Skeletal muscle gene expression in space-flown rats.
FASEB J 18:522-4, 2004.
25. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T:
Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression.
J Biol Chem 279: 10286-92, 2004.
26. Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K:
Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts.
Biochem Biophys Res Commun 311(1): 32-8, 2003.
27. Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, and Kataoka K:
Cell differentiation and p38 (MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 39(1): 89-97, 2003.
28. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, Motoyoshi K, Kamakura K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:
Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin.
Am J Pathol 163(1): 203-15, 2003.
29. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S:
Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD_J).
Experimental Animals 52(2): 93-97, 2003.
30. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Takeda S, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M :
Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy.
Lab Invest 83(5): 711-9, 2003.
31. Kano M, Kitano T, Ikemoto M, Hirasaka K, Asanoma Y, Ogawa T, Takeda S, Nonaka I, Adams GR, Baldwin KM, Oarada M, Kishi K, Nikawa T:
Isolation and characterization of a novel gene sfig in rat skeletal muscle up-regulated by spaceflight (STS-90).
J Med Invest 50(1-2): 39-47, 2003.

32. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E:
Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice.
Neuromuscul Disord 13(3): 207-15, 2003.
33. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R:
Negamycin Restores Dystrophin Expression in Skeletal and Cardiac Muscles of *mdx* Mice.
J Biochem (Tokyo) 134(5): 751-8, 2003.
34. Yoshikawa A, Mitsunashi H, Sasagawa N, Tsukahara T, Hayashi Y, Nishino I, Goto Y, Ishiura S:
Expression of ARPP-16/19 in rat denervated skeletal muscle.
J Biochem 134: 57-61, 2003.
35. Kino Y, Oma Y, Takeshita Y, Takahashi N, Sasagawa N, Ishiura S:
Direct evidence that EXP/muscleblind interacts with CCUG tetranucleotide repeats.
Basic Appl Myol 13: 293-298, 2003.
36. Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, Ishiura S:
Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats.
Basic Appl Myol 13: 305-308, 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況
準備中

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名, 巻号: ページ, 出版年
Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, <u>Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:</u>	Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 341: 864-73, 2006
Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, <u>Takeda S:</u>	Intracellular localization of yserlin and its association with the Dihydropyridine receptor.	<i>Acta Myologica</i> , XXIV: 134-144, 2005
Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, <u>Takeda S:</u>	Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMD _J .	<i>Acta Myologica</i> , XXIV: 145-154, 2005
Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, <u>Takeda S:</u>	Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle.	<i>Am J Pathol</i> , 166(6):1721-32, 2005
Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, <u>Takeda S:</u>	e-Sarcoglycan compensates for lack of a-sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy.	<i>Hum Mol Genet</i> . 14(6): 775-83, 2005
Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, <u>Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:</u>	The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine.	<i>J Gene Medicine</i> , 7(2): 237-48, 2005
Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, <u>Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:</u>	AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype.	<i>Mol Ther</i> , 10(5): 821-8, 2004
Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, <u>Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:</u>	Mac-1 ^{low} early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 321(4):1050-61, 2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名, 巻号: ページ, 出版年
Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, <u>Miyagoe-Suzuki Y</u> , <u>Takeda S</u> , Yamamoto H:	Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody.	<i>Exp Cell Res</i> , 296(2): 245-55, 2004
<u>Ishiura S</u> , Kino Y, Nezu Y, Onishi H, Ohno E, Sasagawa N:	Regulation of splicing by MBNL and CELF family of RNA-binding protein.	<i>Acta Myologica</i> , XXIV: 74-77, 2005
Watanabe T., Takagi, A., Sasagawa N, <u>Ishiura S</u> , Nakase H:	Altered expression of CUG binding protein 1 mRNA in myotonic dystrophy 1: possible RNA-RNA interaction.	<i>Neurosci Res</i> , 49: 47-54, 2004
Kino Y, Mori d, Oma Y, Takeshita Y, Sasagawa N, <u>Ishiura S</u> :	Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats.	<i>Hum Mol Genet</i> , 13: 1-13, 2004
Takeshita Y, Sasagawa N, Usuki F, <u>Ishiura S</u> :	Decreased expression of alpha-B-crystallin in C2C12 cells that express human DMPK/160CTG repeats.	<i>Basic Appl Myol</i> , 13: 305-308, 2003

Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle

Akiyoshi Uezumi, Koichi Ojima, So-ichiro Fukada, Madoka Ikemoto, Satoru Masuda, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda *

Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Received 18 December 2005
Available online 23 January 2006

Abstract

Skeletal muscle regeneration has been exclusively attributed to myogenic precursors, satellite cells. A stem cell-rich fraction referred to as side population (SP) cells also resides in skeletal muscle, but its roles in muscle regeneration remain unclear. We found that muscle SP cells could be subdivided into three sub-fractions using CD31 and CD45 markers. The majority of SP cells in normal non-regenerating muscle expressed CD31 and had endothelial characteristics. However, CD31⁻CD45⁻ SP cells, which are a minor subpopulation in normal muscle, actively proliferated upon muscle injury and expressed not only several regulatory genes for muscle regeneration but also some mesenchymal lineage markers. CD31⁻CD45⁻ SP cells showed the greatest myogenic potential among three SP sub-fractions, but indeed revealed mesenchymal potentials *in vitro*. These SP cells preferentially differentiated into myofibers after intramuscular transplantation *in vivo*. Our results revealed the heterogeneity of muscle SP cells and suggest that CD31⁻CD45⁻ SP cells participate in muscle regeneration.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Side population cells; Muscle regeneration; Mesenchymal differentiation; Transplantation

Adult skeletal muscles have a remarkable ability to regenerate following muscle damage. This regeneration has been attributed to satellite cells that reside between the sarcolemma and the basal lamina. Satellite cells are quiescent mononucleated cells in normal conditions, however, in response to muscle damage, they become activated, proliferate, and then exit the cell cycle either to renew the quiescent satellite cell pool or to differentiate into mature myofibers. Thus, they have been considered to be the myogenic precursor cells that give rise to myoblasts and the sole source of adult myogenic cells [1].

In 1998, Ferrari et al. [2] have demonstrated for the first time that bone marrow (BM)-derived cells contribute to the skeletal muscle after BM transplantation. Side population (SP) cells were first identified in bone marrow based on the ability to exclude Hoechst 33342 dye as an enriched

fraction of hematopoietic stem cells (HSCs) [3], later, it has been reported that they also participate in muscle regeneration [4]. Studies using whole BM cells showed that BM-derived mononucleated cells display several characteristics of satellite cells, suggesting that donor-derived BM cells contribute to muscle fibers in a stepwise biological progression [5,6]. However, using single HSC transplantation experiment, Camargo et al. [7] suggested that cells committed to the myeloid lineage contribute to muscle through fusion event. Therefore, multiple mechanisms underlay contribution of BM-derived cells to skeletal muscle regeneration.

SP cells have been also identified in skeletal muscle [4]. Muscle SP cells cannot only reconstitute the hematopoietic system of lethally irradiated mice [4,8], but also differentiate into skeletal muscle cells [4,9]. Furthermore, they have been reported to participate in vascular regeneration [10]. Several lines of evidence suggest that muscle SP cells are a cell population distinct from satellite cells [9,11–13]. While muscle SP cells possess these attractive

* Corresponding author. Fax: +81 42 346 1750.
E-mail address: takeda@ncnp.go.jp (S. Takeda).

features, they have been reported to be heterogeneous population. In fact, muscle SP cells contain both CD45⁺ and CD45⁻ cells, and hematopoietic potential has been exclusively found in CD45⁺ fraction [8,9]. As regards the myogenic potential, both CD45⁺ and CD45⁻ fractions have been shown to differentiate into skeletal muscle cells [9,14], but there is no comparative study dealing with subpopulation of muscle SP cells during muscle regeneration.

In the present study, we have further divided muscle SP cells into three sub-fractions using CD31 and CD45, examined the properties of each sub-fraction, and identified a novel subpopulation (CD31⁻CD45⁻ SP cells) that showed the greatest myogenic potential both in vitro and in vivo. These results provide a new insight for stem cell-based therapy of muscular dystrophy.

Materials and methods

Animals. All procedures using experimental animals were approved by the Experimental Animal Care and Use Committee at the National Institute of Neuroscience. Eight- to ten-week-old C57BL/6 mice were purchased from Nihon CLEA (Japan). GFP Tg mice were provided by Dr. M. Okabe (Osaka University) and used in cell transplantation experiments. NOD/scid mice provided by the Institute for Experimental Animals, Japan, were used as recipients.

To induce muscle regeneration, 100 μ l of CTX (10 μ M in saline, Wako Chemicals) was injected into the tibialis anterior (TA) muscle with a 29-gauge needle. In FACS analysis experiments, CTX was injected into TA (50 μ l), gastrocnemius (50 μ l), and quadriceps femoris muscles (25 μ l).

BM transplantation was performed as previously described [14]. Mice were subjected to analysis 12 weeks after transplantation.

Antibodies. Mouse Bcrp-1 cDNA was provided by Dr. A.H. Schinkel [15]. A DNA fragment corresponding to cytoplasmic domain of Bcrp1, amino acids 300–337, was fused to GST in a pGEX-4T-2 vector (Amersham Biosciences), and the fusion protein was used to immunize rabbits. The serum obtained was affinity-purified. Other antibodies used in these studies are listed in Table S1.

Cell preparation and FACS analysis. Muscle-derived mononucleated cells were prepared from C57BL/6 mice, GFP Tg mice, or GFP-BM transplanted mice as previously described [14]. Hoechst staining was performed as described by Goodell et al. (http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new_site/protocols.html). Cells were re-suspended at 10⁶ cells per ml in DMEM (Invitrogen) containing 2% FBS (Trace Biosciences), 10 mM Hepes, and 5 μ g/ml Hoechst 33342 (Sigma), and incubated for 90 min at 37 °C in the presence or the absence of 50 μ M verapamil (Sigma). During incubation, cells were mixed 3–4 times. For analysis of Ac-LDL uptake, 10 μ g/ml DiI-labeled Ac-LDL (Biomedical Technologies) was added. After antibody staining, cells were re-suspended in PBS containing 2.5% FBS and 2 μ g/ml propidium iodide (PI) (BD PharMingen). Cell sorting was performed on a FACS VantageSE flow cytometer (BD Biosciences). Debris and dead cells were excluded by forward scatter, side scatter, and PI gating. Cell viability after staining and sorting was comparable to that previously reported [14].

RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was extracted from 1 \times 10⁴ FACS sorted cells by using a RNeasy Micro Kit (Qiagen) and then reverse transcribed into cDNA by using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Roche). The PCRs were performed with 1 μ l cDNA product under the following cycling conditions: 94 °C for 3 min followed by 40 cycles of amplification (94 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s) with a final incubation at 72 °C for 5 min. Specific primer sequences used for PCR are available on request.

Cell culture. SP cells were cultured alone with growth medium (GM); DMEM containing 20% FBS and 2.5 ng/ml bFGF (Invitrogen) in chamber slides (Nalge Nunc) coated with Matrigel (BD Biosciences) for 3–5 days. For osteogenic differentiation, the medium was changed to a differentiation medium (DM), 5% horse serum in DMEM supplemented with or without 500 ng/ml recombinant human BMP2 (R&D Systems), and cultured for 4–6 days. For adipogenic differentiation, cells were exposed to 3 cycles of 3 days of adipogenic induction medium (Cambrex Bioscience) followed by 1 day of adipogenic maintenance medium (Cambrex Bioscience) and then cells were maintained for five more days in the adipogenic maintenance medium. Alkaline phosphatase (AP) was stained using Sigma kit #85 according to the manufacturer's instructions. To stain lipids, cells were fixed in 10% formalin, rinsed in water and then 60% isopropanol, stained with Oil red O in 60% isopropanol, and rinsed in water. For myogenic differentiation, muSP-31, muSP-45, or muSP-DN purified from GFP Tg mice were co-cultured with myoblasts prepared from C57BL/6 mice as previously described [16,17] in GM. DM was supplied 3–5 days after starting co-culture.

Osteogenic activity and myotube-forming activity were determined by the following formulas: osteogenic activity = [the number of AP⁺ cells in seven randomly selected fields (corresponding to one-tenth of the whole area of the well)]/(the number of seeded cells) and myotube-forming activity = (the number of GFP⁺ myotubes in seven randomly selected fields)/(the number of seeded cells). In order to measure the extent of adipogenic differentiation, stained oil droplets were extracted for 5 min with 100 μ l of 4% Nonidet P-40 in isopropanol, and the absorbance of the dye-triglyceride complex was measured at 520 nm [18]; then, adipogenic activity was determined by the following formula: (the absorbance at 520 nm)/(the number of seeded cells).

Intramuscular transplantation experiments. muSP-DN or muSP-31 cells were purified from GFP Tg mice and were injected directly into the TA muscles of NOD/scid mice. One day before transplantation, host TA muscles were treated with CTX. The number of transplanted cells is indicated in Table 1. Three weeks after transplantation, TA muscles were excised and fixed in 4% PFA for 30 min, immersed sequentially in 10% sucrose/PBS and 20% sucrose/PBS, and frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen.

Immunohistochemistry. FACS sorted cells were collected by Cytospin3 (ThermoShandon). Cells were fixed with 4% PFA for 5 min. Frozen muscle tissues were sectioned using a cryostat. Specimens were blocked with 5% goat serum (Cedarlane) in PBS for 15 min and incubated with primary antibodies at 4 °C overnight, followed by secondary staining. Stained cells were mounted in Vectashield with DAPI (Vector) and photographed using a fluorescence microscope IX70 (OLYMPUS) equipped with a QuantixTM air-cooled CCD camera (Photometrics) and IP Lab software (Scanalytics Inc.). Stained muscle sections were counterstained with TOTO-3 (1:5000; Molecular Probes), then mounted in Vectashield (Vector), and observed under the confocal laser scanning microscope system TCSSP (Leica).

Statistics. Values were expressed as means \pm SD or \pm SEM. Statistical significance was assessed by Student's *t* test. In comparison of more than two groups, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Fisher's PLSD was used. A probability of less than 5% ($P < 0.05$) or 1% ($P < 0.01$) was considered statistically significant.

Table 1
Appearance of GFP⁺ myofibers after intramuscular transplantation

Cell type	Experiment No.	Number of injected cells/TA muscle	Number of GFP ⁺ myofibers/TA muscle
muSP-DN cells	Ex. 1	1.7 \times 10 ³	14
	Ex. 2	2.5 \times 10 ³	9
	Ex. 3	2.5 \times 10 ³	0
muSP-31 cells	Ex. 1	1.6 \times 10 ⁴	3
	Ex. 2	1.6 \times 10 ⁴	0
	Ex. 3	1.6 \times 10 ⁴	0

Results

Most muscle SP cells are found in a subset of capillary or vein endothelial cells in non-regenerating skeletal muscle

We identified verapamil-sensitive SP cells in skeletal muscle after Hoechst staining (Fig. 1A) and analyzed the expression of several markers on them. The majority of muscle SP cells were CD31⁺, usually recognized as a marker of endothelial cells (Figs. 1B–E), and negative for a pan-hematopoietic marker, CD45 (Fig. 1B). More than half of muscle SP cells were CD34⁺, and Sca-1⁺ cells comprised 90% of muscle SP cells (Figs. 1C and D). Compared to FACS profiles of whole-muscle-derived cells, SP cells were enriched in Sca-1⁺ cells (Fig. S1). More than 85% of muscle SP cells were CD31⁺ and took up acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL), a functional marker for endothelial cells and macrophages (Fig. 1E). These results indicate that most muscle SP cells have endothelial characteristics. Only cells in the main population (MP) were found to be Pax7⁺, indicating that SP cells do not include muscle satellite cells (data not shown).

To examine the localization of muscle SP cells, we generated a rabbit polyclonal anti-mouse Bcrp1 antibody, because it has been reported that Bcrp1 is the major determinant of the SP phenotype [19]. Our antibody clearly recognized Bcrp1 expression in liver, small intestine, and kidney, as previously reported (Fig. S2) [20,21]. We confirmed that Bcrp1 antibody recognizes more than 80% of SP cells and less than 3% of MP cells collected by cytopsin (Figs. 1F and G). In skeletal muscle, Bcrp1⁺ cells were found outside the muscle basal lamina (Fig. 1H), which clearly distinguished Bcrp1⁺ cells from satellite cells. Next, Bcrp1 expression in the vascular system was investigated. CD31 staining identified all endothelia from larger vessels to capillaries in muscle sections. Intriguingly, Bcrp1 was expressed by CD31-expressing endothelial cells, and its expression was preferentially observed on a subpopulation of capillary endothelium (Figs. 1I–K) and venous endothelium surrounded by thin vessel walls, as revealed by α -smooth muscle actin (α SMA) expression (Figs. 1L–N). These results, together with the results of FACS analysis, strongly suggest that the majority of muscle SP cells are a subset of endothelial cells present in capillaries or veins in non-regenerating skeletal muscle.

Behavior of muscle SP cells during muscle regeneration

We next examined the kinetics of SP cells during muscle regeneration induced by injection of cardiotoxin (CTX). After CTX injection, the total number of mononuclear cells per muscle weight gradually increased, with a peak at day 3. The number of SP cells also increased and reached its peak at day 3 (Fig. 2A). Muscle SP cells could be divided into three subpopulations based on CD31 and CD45 expression: CD31⁺CD45⁻ SP cells (designated muSP-31 cells), CD31⁻CD45⁺ SP cells (muSP-45 cells), and

CD31⁻CD45⁻ SP cells (muSP-DN cells). muSP-31 cells and muSP-DN cells distributed throughout the SP tail, but muSP-45 cells were located close to the shoulder (data not shown). The majority of muscle SP cells in untreated muscle were muSP-31 cells (Fig. 1B). During regeneration, however, muSP-45 cells and muSP-DN cells increased in both their ratios and their numbers (Figs. 2B and C). Although CD45⁺ cells were abundant in whole muscle-derived cells during regeneration and most of them were F4/80 antigen-positive mature macrophages, SP cells did not contain any mature inflammatory cells, as previously reported (data not shown) [14].

To clarify the origin of each subpopulation of SP cells, BM transplantation experiments were performed. We confirmed that muSP-45 cells were mobilized from bone marrow as previously reported (Figs. 3A and B) [14]. In contrast, both CD45⁻ SP fractions are residents of skeletal muscle (Figs. 3A and B), consistent with the results reported by Rivier et al. [22].

Next, to determine whether each subpopulation of SP cells proliferates in damaged muscle, cells were stained with Ki67 antibody. Most muSP-45 cells (Figs. 3C and D) and muSP-31 cells (Figs. 3G and H) prepared from regenerating muscle were negative for Ki67, suggesting that the proliferation activities of these two fractions were low. On the other hand, about 60% of muSP-DN cells were positive for Ki67 (Figs. 3E and F), indicating that muSP-DN cells actively proliferated during muscle regeneration.

We next examined Bcrp1 expression on three sub-fractionated SP cells and found that only muSP-31 cells were Bcrp1-positive (Fig. 3K). These results suggest that some ABC transporters other than Bcrp1 are responsible for the phenotype of CD31⁻ SP cells.

Gene expression of muscle SP cells during muscle regeneration

Our analysis revealed that each subpopulation of SP cells showed distinct kinetics during muscle regeneration. To better understand the traits of muscle SP cells, we analyzed gene expression during muscle regeneration. Three subpopulations of SP cells (in following experiments, muSP-45 cells from untreated muscle were omitted because of their low yield) or MP cells were collected from each time point during muscle regeneration, and RT-PCR was performed. We chose several myogenic (*Pax3*, *Pax7*, and *myf5*), endothelial (*Tie2*, *Flk1*, and *vWF*), and mesodermal-mesenchymal-associated (α SMA, *PPAR γ* , *Runx2*, *PDGFR α* , and *PDGFR β*) genes to clarify lineage characteristics of the target cells. We also examined expression of genes of developmental regulators (*msx1*, *Frizzled4* (*Fzd4*), *Patched1* (*Ptc1*), and *BMPRI1A*), angiogenic factors (*angiopoietin-1* (*ang1*) and *VEGF*), and TGF- β superfamily antagonists (*folliculin* and *DAN*). muSP-DN cells from untreated muscles expressed only *PDGFR β* , *Ptc1*, *ang1*, *folliculin*, and *DAN* (Fig. 4, cont, lane 1). Neither myogenic nor other lineage-specific markers could be detected in

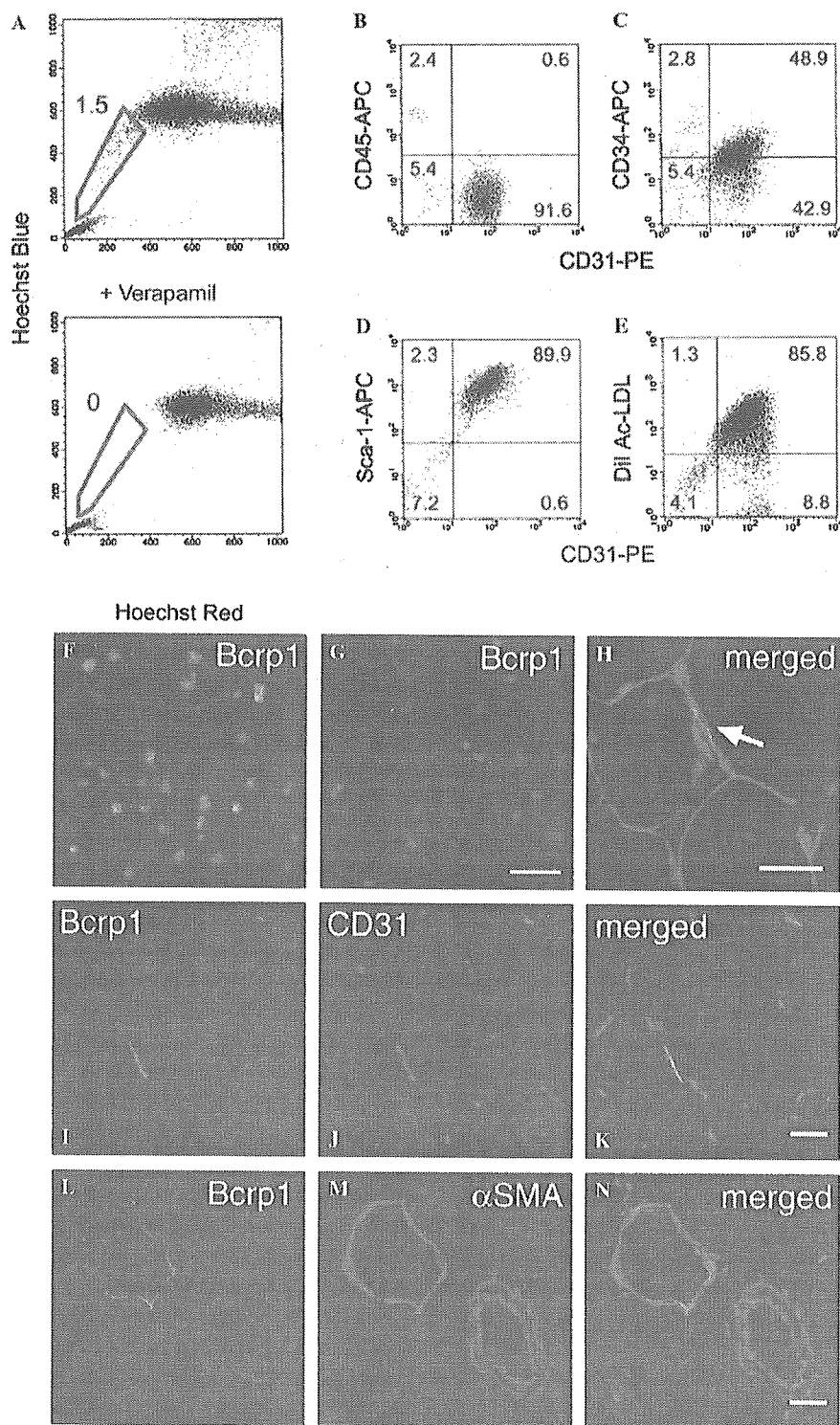


Fig. 1. Characterization of skeletal muscle SP cells. (A) Flow cytometric analysis of muscle-derived mononucleated cells after Hoechst 33342 staining with (lower panel) or without Verapamil (upper panel). The numbers indicate the percentage of SP cells (blue pentagons) in all mononucleated cells. (B–E) The expression of CD45 (B), CD34 (C), Sca-1 (D), and DiI-Ac-LDL uptake (E), and CD31 (B–E) on muscle SP cells. The percentage of cells in each quadrant is shown in the panel. (F,G) Immunofluorescent staining for Bcrp1 (green) and DAPI counterstaining (blue) of freshly sorted SP (F) and MP (G) cells. Immunofluorescent staining for Bcrp1 (green) and laminin $\alpha 2$ chain (red) (H), Bcrp1 (green) and CD31 (red) (I–K), and Bcrp1 (green) and α -smooth muscle actin (red) (L–N). TOTO-3 nuclear staining is shown in merged images (blue in H, K, and N). Bcrp1-positive cells are located outside the basal lamina (arrow), and they are partially overlapped with endothelial cells of capillary (I–K) and vein (L–N). Bars: 50 μ m in (F,G), 20 μ m in (H–N).

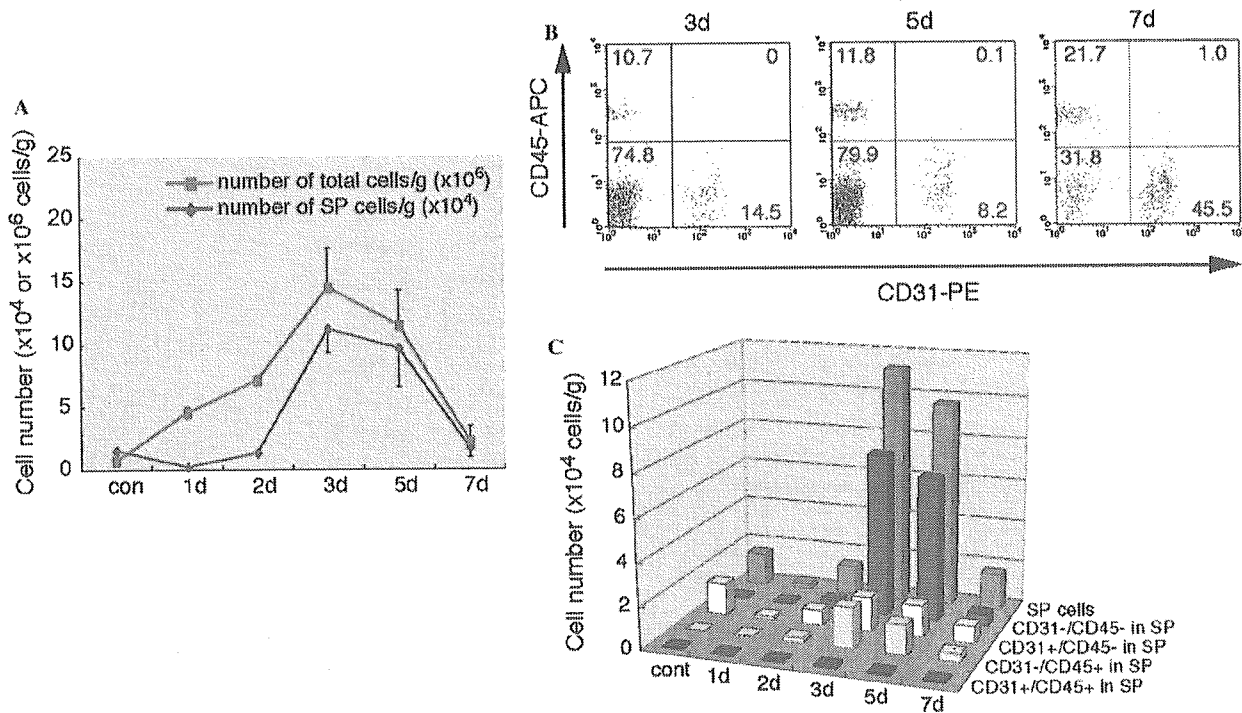


Fig. 2. Behavior of subpopulations of SP cells during muscle regeneration. (A) At 1 day (1d), 2 days (2d), 3 days (3d), 5 days (5d), and 7 days (7d) after CTX injection, the number of total cells (pink line) and SP cells (blue line) per gram of muscle weight was quantified. (B) At 3 days (3d), 5 days (5d), and 7 days (7d) after CTX injection, muscle SP cells prepared from regenerating muscle were analyzed for CD31 and CD45 expression. (C) Cell numbers in subpopulations of SP cells. muSP-45 cells (light blue bar) and muSP-DN cells (dark red bar) were significantly increased in number during muscle regeneration. Values (A,C) are the average of three independent experiments. Error bars represent SD.

this population indicating that muSP-DN cells do not contain cells committed to the lineages tested. At day 3 after CTX injection, muSP-DN cells began to express developmental regulator genes (Fig. 4, 3d, lane 1), and then at day 5, they also began to express several other lineage-specific genes (*Tie2*, α SMA, *PPAR γ* , and *Runx2*). Angiogenic factors and TGF- β superfamily antagonists were also strongly expressed at this time point (Fig. 4, 5d, lane 1). In contrast, muSP-31 cells continuously expressed all three endothelial genes analyzed throughout the regeneration process (Fig. 4, lane 2). Expression of mature endothelial marker, such as *vWF*, suggests that muSP-31 cells represent committed endothelial cells. muSP-45 cells expressed only low levels of α SMA, *PDGFR β* , and *follistatin* at day 5 after CTX injection (Fig. 4, lane 3). Myogenic markers, *Pax7* and *myf5*, were detected only in the MP fraction (Fig. 4, MP) indicating that myogenic cells are completely sorted into the MP fraction even during the process of muscle regeneration.

Differentiation potential of muscle SP cells for mesenchymal lineages

muSP-DN cells showed a unique gene expression pattern during muscle regeneration process: they began to express several mesenchymal genes at a late phase of muscle regeneration. Therefore, we examined the mesenchymal

potentials of muscle SP subpopulations. muSP-DN cells from untreated muscle readily gave rise to alkaline phosphatase (AP)-positive cells when cultured in the presence of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) (Figs. 5A and C). With adipogenic induction, they also differentiated into adipocytes containing numerous lipid droplets in the cytoplasm (Figs. 5A and D). Reflecting the results of gene expression analysis, muSP-DN cells from regenerating muscle more efficiently differentiated into osteogenic cells and adipocytes than those from untreated muscle did (Figs. 5B–D). Unexpectedly, muSP-DN cells from regenerating muscle also differentiated into adipocytes without adipogenic induction (Figs. 5B and D), suggesting that they are susceptible to adipogenesis under our culture condition. In contrast, muSP-31 cells did not possess these differentiation potentials (Figs. 5A–D). Nor did muSP-45 cells, which were dramatically mobilized from BM into regenerating muscle (Figs. 5B–D). The attribute of differentiation potential is therefore a feature of muSP-DN.

Myogenic potential of muscle SP cells in vitro

We next evaluated the myogenic potential of muscle SP cells in vitro. When SP cells were cultured alone, they never differentiated into skeletal muscle cells (data not shown). Each subpopulation of SP cells was prepared from GFP Tg mice and co-cultured with wild type (WT) primary