

令和元年6月19日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01392

研究課題名(和文) 骨格筋幹細胞の老化：転写因子の局在変化を基盤とした筋分化・再生制御機構の解明

研究課題名(英文) Senescence of skeletal muscle stem cells

研究代表者

船越 智子(石井智子)(Funakoshi, Tomoko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・技術員

研究者番号：90318460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、サルコペニア発症に関わる1つの要因として、骨格筋の組織幹細胞に着目し、ラットから単離した筋サテライト細胞を用いて、脂肪分化を抑制する素材候補を得ることができた。単離した筋サテライト細胞は筋分化条件下では筋への分化を示す、筋管を掲載した一方、脂肪分化条件下培養すると、細胞内に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞様の形態を示した。脂肪分化培養条件にケルセチン配糖体を添加したところ、添加濃度依存的な脂肪分化誘導の抑制が認められた。上記素材などの生体内での効果を検討するため、下り走させたラット用いた筋損傷モデルについて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢によって筋肉量や筋力の自然発生的低下が起こることが知られている。それらが一定基準以上に認められる場合には、加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)とされ、転倒の危険性が高まるだけでなく、自立した生活自体が困難な状況に陥る場合がある。高齢化が進む現在、高齢者の自立した生活を長期にわたって維持することは、重要な課題の一つである。サルコペニア発症に繋がるメカニズムとともに、筋再生や筋肥大の分子機序を明らかにすることは、サルコペニア発症予防の素材探索と効果の科学的根拠明らかにすることとともに、サルコペニアや寝たきりの予防や改善、介護者の筋量低下予防への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Muscle satellite cells are known as muscle tissue stem cells that are required for muscle maintenance at adulthood. The primary cells isolated from rat lower limbs muscles have fused each other and formed myotubes under myogenesis culture conditions. However, the cells showed adipocyte morphology with lipid droplets accumulation in the cytoplasm after culture in adipogenesis medium. Using this adipogenesis induction conditions, I searched material that show activity to suppress the adipogenesis phenotypes. By addition of quercetin, as glycoside, to the culture, accumulation of lipid droplets and triglyceride content of the cells and mRNA levels of transcriptional regulators, like PPAR-gamma were suppressed in a dose dependent manner, even in adipogenesis induction medium.

研究分野：細胞生物学

キーワード：筋サテライト細胞 組織幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は体を支え、運動機能を司ると同時に基礎代謝機能を担う組織である。骨格筋は過度な運動による損傷や、長期入院や宇宙飛行などの不活動に起因した萎縮が起っても、健常者であれば数週間のうち修復・再生されて機能回復するといった、可塑性に富んだダイナミックな組織である。その一方で、肥満、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病患者では筋肉量の減少が病態悪化に繋がることが示されている。また、加齢による筋肉量や筋力の自然発生的低下が、一定基準以上に認められる場合は加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)とされ、転倒の危険性を高めるだけでなく、身体活動そのものを低下させ自立した生活自体が困難な状況に陥らせる場合がある。高齢者の自立した生活を長期にわたって維持することは、重要な課題の一つである。しかしながら、サルコペニアの発症に繋がるメカニズムの詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

骨格筋の組織幹細胞である筋衛星(サテライト)細胞は、筋損傷後の修復や筋の肥大に寄与する細胞として、成体の筋量・筋機能維持に重要な役割を担っている。本研究では、組織幹細胞の増殖能・多分化能などの機能に着目し、筋再生時に必要な細胞の増殖・分化刺激の応答に関わる転写因子の細胞内局在制御について解析するとともに、組織幹細胞の機能維持効果のある素材、もしくは機能低下を抑制する素材の探索を試みる。

3. 研究の方法

(1) 初代培養筋サテライト細胞は筋の他、脂肪などへの多分化能を持つと報告されていた。そこで、筋再生促進や脂肪分化抑制活性を示す素材の探索を試みた。ラット下肢骨格筋より単離した、筋サテライト細胞を筋分化培地、脂肪分化培地でそれぞれ培養した。細胞の筋分化能は筋分化培地で培養後4-7日後に形成される筋管細胞の数で評価した。脂肪分化については脂肪分化培地中で培養し、細胞質内の脂肪滴の蓄積といった形態変化を観察するとともに、トリグリセリド含量を継続的に測定した。トリグリセリドの定量には和光純薬のラボアッセイTMトリグリセリド(GPO・DAOS法)を用いてグリセリンを標準とし、トリオレイン相当量として算出した。タンパク質の定量にはThermo Scientific社のPierce BCA Protein Assay Kitを用いウシ血清アルブミンを標準とした。細胞溶液中の脂質による影響を避けるため、2%SDSを加えてタンパク質定量を行った。

(2) 上記素材などの生体内での効果を検討するため、下り走筋損傷モデルについて検討した。下り走による筋損傷のモデルの実験条件はArmstrongらの報告(*J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1983)を参考に、傾斜角マイナス16度のトレッドミルで、分速16m、5分間走行、2分休憩を1セットとし、18セット実施した。筋損傷の指標として血中クレアチンキナーゼ(CK)の値を測定した。麻酔下で尾部よりカミソリ刃による創傷部からヘパリン処理したガラスパストール管で採血し、全血1サンプルについて1~3回測定を行った。測定には乾式臨床科学分析装置、レフロトロンプラス(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)とクレアチンキナーゼ測定試験紙、レフロトロンCKII(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)を用いた。四頭筋、二頭筋、三頭筋について筋損傷の部位を組織学的に観察した。

(3) ビタミンC不足による骨格筋への影響を調べるために、ビタミンC生合成経路の酵素、グルコノラクトナーゼ(加齢指標タンパク質30)、SMP30/GNLノックアウトマウスを利用して、ビタミンC不足状況下での下肢筋重量、身体機能を指標として検討した。

4. 研究成果

(1) 目的の1つであった、転写因子の細胞内局在制御についての解析は異動・動物利用環境の問題等により進めることが出来なかったが、ラット下肢骨格筋から単離した初代培養細胞を用いて、脂肪分化を抑制する素材候補を得ることができた。単離した細胞は筋分化条件下では細胞同士が融合して筋管を形成した。同細胞を脂肪分化誘導条件下で培養することにより、脂肪滴を細胞内に蓄積する脂肪細胞へ効率良く分化させる培養系を構築した。形態観察による脂肪細胞分化の程度はオイルレッド-O染色の程度は比例関係にあり、トリグリセリド量によって定量化できることを確認した。脂肪分化培養条件に候補素材を添加し、細胞の形態や、トリグリセリド濃度を測定した結果、ケルセチン配糖体の添加濃度依存的に脂肪分化の抑制が認められた。

(2) 運動前のF344雄性ラット(15-16週齢)の血中CK値を基準として、運動直後から継続的な血中クレアチンキナーゼ(CK)値変化を観察した。下り走運動直後から継続的に血中CKを測定した。下り走実施前、正常時のCK値は殆どの個体で100U/L以下で、下り走直後に上昇した。既に効果が知られている素材を経口投与(投与群)し、水を投与したコントロール群と比較した。Armstrongらの報告と同様に、下り走実施前投与群、下り走直後投与群、水投与群の下り走実施群ではいずれでも二相性のCK値上昇が認められた。2度目のCKピーク値の平均は下り走実施前投与群、水投与群、下り走直後投与群の順で高かった。個体差があるものの、2度目のCKピーク値を比較すると、コントロールの水投与群に比べ、下り走実施前投与群では高値、下り走直後からの投与群では低値を示した。実験期間中持続投与しても、下り走を実施しない場合にはCK値が100U/Lを超えることはなかった。損傷の部位を組織学的に観察したところ、下肢四頭筋の一部、筋膜直下の限定された領域で損傷が激しいことがわかった。血中CK値と筋

損傷度を観察することで、生体内での筋損傷や損傷からの回復への効果を評価できる可能性がある。

(3) 通常のマウスはビタミン C を生合成できる。異動先では、ビタミン C 生合成経路の酵素であるグルコノラクトナーゼ(加齢指標タンパク質 30)、SMP30/GNL のノックアウトマウス (SMP30/GNL-KO マウス) を飼育維持していた。この SMP30/GNL-KO マウスを利用して、ビタミン C の下肢骨格筋への影響を検討した。ビタミン C 不足状態では、下肢骨格筋の重量減少や、筋繊維の断面積の減少、さらに身体機能の低下が認められた。これらの影響はビタミン C を与えることで回復した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Takisawa S, Funakoshi T, Yatsu T, Nagata K, Aigaki T, Machida S, Ishigami A. Vitamin C deficiency causes muscle atrophy and a deterioration in physical performance. *Sci Rep*. 2019. 9(1):4702 査読有 doi:10.1038/s41598-019-41229-7

Funakoshi T, Kanzaki N, Otsuka Y, Izumo Ti, Shibata H, Machida S. Quercetin inhibits adipogenesis of muscle progenitor cells *in vitro*. *Biochem Biophys Rep*. 2017. 13:39-44. 査読有 doi:10.1016/j.bbrep.2017.12.003

Kawanishi N, Funakoshi T, Machida S. Time-course study of macrophage infiltration and inflammation in cast immobilization-induced atrophied muscle of mice. *Muscle Nerve*. 2018. 57(6):1006-1013 査読有 doi:10.1002/mus.26061

Koltai E, Bori Z, Chabert C, Dubouchaud H, Naito H, Machida S, Davies JA K, Murlasits Z, Fry C A, Boldogh I, Radak Z. SIRT1 may play a crucial role in overload-induced hypertrophy of skeletal muscle. *J Physiol*. 2017. 595(11):3361-3376. 査読有 doi:10.1113/JP273774

Kawanishi N, Nozaki R, Naito H, Machida S. TLR4-defective (C3H/HeJ) mice are not protected from cast immobilization-induced muscle atrophy. *Physiol Rep*. 2017. 5(8):e13255. 査読有 doi:10.14814/phy2.13255

Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci*. 2016 66(4):337-343. 査読有 doi:10.1007/s12576-015-0432-1

町田修一、船越智子
骨格筋再生と老化制御：筋サテライト細胞の役割 基礎老化研究 2016 40:13-17 査読有

川西修一、川西範明
サルコペニアの分子メカニズム 神経内科 2015 3:355-360 査読無

[学会発表] (計 10 件)

Machida S. Sex difference in sarcopenia: mechanisms and interventions. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (招待講演) (国際学会) 2019

町田修一. 高齢者を対象としたレジスタンストレーニングの効果を規定する要因とその分子機序. 日本スポーツ栄養学会第 5 回大会 (招待講演) 2019

船越智子, 滝沢晶子, 谷津智史, 永田喜三郎, 相垣敏郎, 町田修一, 石神昭人. アスコルビン酸欠乏がマウス骨格筋に及ぼす影響. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018

谷津智史, 滝沢晶子, 滝野有花, 船越智子, 町田修一, 石神昭人. ビタミン C 欠乏による骨格筋の筋萎縮. 第 4 回日本筋学会学術集会. 2018

Funakoshi T, Ohta K, Machida S. Localization of Damage in Rat Quadriceps Femoris Muscle Induced by Downhill Running. The 3rd Congress, International Academy of Sportology (国際学会) 2018. 東京都

Funakoshi T, Kanzaki N, Otsuka Y, Izumo T, Shibata H, Machida S. Quercetin inhibits the adipogenesis of muscle satellite cells. The 6th International Conference on Food Factors (国際学会)

2015. COEX, Seoul, Republic of Korea

町田修一, 船越智子. 培養細胞から見えてきた骨格筋の性差. 第 70 回日本体力医学会大会 (招待講演) 2015. 和歌山県民分化会館、和歌山市

Machida S. Aging skeletal muscle is associated with increased adipogenesis and impaired inflammation. The 2nd Congress, International Academy of Sportology (国際学会) 2015. 順天堂大学有山登記念館講堂、東京都

町田修一. サルコペニアのメカニズム解明とその対策 - 骨格筋幹細胞からのアプローチ -. 第 38 回日本基礎老化学会大会 (招待講演) 2015. パシフィコ横浜、横浜市

Kawanishi N, Naito H, Machida S. Role of Toll-like Receptor 4 In Cast Immobilization-induced Muscle Atrophy. 62nd Annual Meeting of American College of Sports Medicine (国際学会) 2015. Hynes Convention Center, San Diego, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：町田修一

ローマ字氏名：Machida Shuich

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：スポーツ健康科学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40421226

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。