

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02585

研究課題名(和文) 骨格筋発達の統合的理解を目指す異種細胞間コミュニケーション機構の全容解明

研究課題名(英文) Cell-cell communication in developing skeletal muscle

研究代表者

西邑 隆徳 (NISHIMUTA, TAKANORI)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10237729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋肥大と脂肪蓄積の制御機構を解明するため、骨格筋内の異種細胞間コミュニケーション機構を追究した。1.筋細胞および脂肪細胞が分泌するエクソソームが異種細胞へ取り込まれ、エクソソームを取り込んだ細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことを実証した。2.脂肪細胞は筋細胞におけるIL-6の発現および分泌を誘導することで、分化を抑制するとともに筋萎縮を促進していることを明らかにした。3.筋再生時にAPOBEC2は、分化した衛星細胞が融合し筋管を形成するパスウェイを抑制しセルフリニューアルを促進することを明らかにした。4. TGF- β 1は、筋再生や脂肪形成の初期段階で強力に抑制効果を発揮することが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家畜骨格筋における筋肥大(赤肉生産)と筋肉内脂肪蓄積(霜降り肉生産)の制御機構について、骨格筋内の細胞群(筋細胞、脂肪細胞、神経細胞およびマクロファージ)とコミュニケーションの場である細胞外マトリックスに着目し、分泌性生理活性因子およびエクソソーム(細胞間でタンパク質およびmicroRNAを運搬する小胞)を介した異種細胞間のローカルなコミュニケーションとその制御機構を解明する。これにより、肉用家畜生産における肉量・肉質制御技術開発のための細胞分子基盤を確立する。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the regulatory mechanism of muscle hypertrophy and intramuscular fat accumulation, we investigated the cell-cell communication in skeletal muscle. 1. We found that exosomes secreted by muscle cells and adipocytes were taken up into heterologous cells and affected the gene expression of the cells that took up exosomes. 2. Adipocytes suppress the differentiation of muscle cells and promote muscle atrophy by inducing the expression and secretion of IL-6 in muscle cells. 3. We show that APOBEC2 suppresses the pathway in which differentiated satellite cells fuse to form myotubes and promote self-renewal during muscle regeneration. 4. TGF- β 1 has been shown to exert potent inhibitory effects at the early stages of muscle regeneration and lipogenesis.

研究分野：農学

キーワード：家畜骨格筋 細胞間コミュニケーション 筋細胞 脂肪細胞 筋幹細胞 運動神経 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

食肉の主体である家畜・家禽の骨格筋は、筋組織、脂肪組織、結合組織、神経および血管など多様な組織で構築されており、その量と分布、性状が最終産物である食肉の品質（赤肉量、霜降り、テクスチャーなど）に直接影響する。骨格筋という同一空間内でそれぞれの細胞は共存する異種細胞と協調あるいは競合しながら各組織を構築していく。しかし、骨格筋内の細胞群の制御機構は未解明であり、食肉の量と質を制御する肉用家畜生産技術開発のための研究基盤は確立されていない。

これまでの骨格筋発達に関する研究では、筋細胞だけに着目したものが多く、筋細胞周辺に存在する他種細胞を含む細胞群を包括的に捉えた研究はほとんど行われてこなかった。また、細胞種ごとに増殖・分化様相を検討しても、また、特定の増殖因子だけに着目しても、骨格筋で起こる複雑な組織構築や形態形成の全容を解明することは困難である。

申請者らは、同一個体内の異なる部位の骨格筋において筋肉内脂肪蓄積および筋線維型の発現が一様にならないこと、筋・脂肪・神経の各細胞は隣接して存在すること、各細胞は増殖因子などの生理活性因子を分泌・受容することから、骨格筋の質および量は全身性のサイトカインの影響よりも、むしろ、「**骨格筋内の各種細胞が分泌する生理活性因子を介したローカルな細胞間コミュニケーションにより骨格筋組織の発達は規定される**」という新規仮説を立て研究を推進してきた。

2. 研究の目的

家畜骨格筋における筋肥大（赤肉生産）と筋肉内脂肪蓄積（霜降り肉生産）の制御機構について、骨格筋内の細胞群（筋細胞、脂肪細胞および神経細胞）とコミュニケーションの場である細胞外マトリックスに着目し、分泌性生理活性因子およびエクソソーム（細胞間でタンパク質および microRNA を運搬する小胞）を介した異種細胞間のローカルなコミュニケーションとその制御機構を解明することで、肉用家畜生産における肉量・肉質制御技術開発のための細胞分子基盤を確立することを目指した。

本研究では、骨格筋内の各種細胞が分泌するエクソソームのプロファイリングを行い、エクソソームを介した細胞間コミュニケーションを実証する。また、「筋細胞-脂肪細胞」および「筋衛星細胞-運動神経末端」の機能的連関を追究する。さらに、異種細胞間ニッチにおける細胞外マトリックス分子およびその制御因子の動態を調べ、骨格筋異種細胞間コミュニケーションにおける細胞外マトリックスの役割を追究する。

3. 研究方法

1. 新規コミュニケーションツールとしてエクソソームの解析

マウス脂肪細胞（3T3-L1）およびマウス骨格筋細胞を用いて常法により培養し、脂肪分化あるいは筋分化を誘導した。各細胞が分泌したエクソソームを調製するために、分化・成熟の各段階において細胞培養液を回収し、エクソソーム画分を超遠心法にて調製した。なお細胞培養にはエクソソームフリーの血清を使用し、血清由来のコンタミネーションを最小限にした。調製したエクソソーム画分にエクソソームが含まれていることを確認するために、エクソソーム内に含まれる Let-7a 等の microRNA(miRNA)の発現を PCR にて確認した。エクソソーム画分から RNA を調製し、マイクロアレイによる miRNA の網羅的な発現解析に供した。調製したエクソソーム画分を異種細胞への導入するために、色素である PKH26 でエクソソーム画分を標識した。エクソソーム画分を導入した細胞から total RNA を調製し、mRNA の網羅的な発現解析を行った。

2. 筋-脂肪細胞のコミュニケーション機構の解明

3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導した脂肪細胞を C2C12 筋細胞とセルカルチャーインサートを用いて共培養し、筋細胞の分化指標である筋管形成率および筋管直径を単独培養した C2C12 筋細胞と比較検討した。また、筋分化転写因子である MyoD および Myogenin、骨格筋形成抑制因子である Myostatin、ならびに筋萎縮・分解に関連する Ubiquitin E3 ligases である Atrogin-1 と MuRF-1 の発現量を共培養区と単独培養区（対照区）で比較検討した。また、脂肪細胞の筋細胞に対する分化抑制作用には脂肪細胞が分泌する液性因子が関与していることが予想されたので、共培養下での脂肪細胞と筋細胞における炎症性サイトカイン（TNF- α および IL-6）の発現および分泌パターンを調べた。さらに、脂肪細胞との共培養下で形成された筋管の筋線維型組成、遅筋型筋管形成誘導因子である Sema3A の発現レベル、およびミオシンのアイソフォームを単独培養区と比較検討した。

3. 筋再生における筋幹細胞（衛星細胞）と運動神経との細胞間コミュニケーション

筋再生過程での筋幹細胞（衛星細胞）と運動神経との細胞間コミュニケーションを明らかにすべく、まず、分化初期特異的に衛星細胞が合成・分泌する神経軸索ガイダンス因子 Sema3A が筋細胞特異的転写因子（myogenin, Pax7, Myf5, MyoD）の発現制御に関与しているかを RT-qPCR により調べた。また、Sema3A-siRNA によるノックダウン細胞培養系を用いて、運動神経末端の筋線維接着（運動神経支配の確立）に必須なニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）の発現および細胞膜での機能的凝集（クラスタリング）に及ぼす影響を RT-qPCR と BTX 蛍光染色法により精査した。更には、坐骨神経切除により筋線維の運動神経支配を解除すると衛星細胞で APOBEC2（apoB mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like family）が高発現することを見出したので、これが衛星細胞の動態制御にどのように関わっているかを追究した。最終年度では、衛星細胞特異的 Sema3A コンディショナルノックアウトマウス（Sema3A-cKO マウス）を用いた筋損傷実験を行い、運動終盤（運動神経末端の筋線維への機能的接着によって形成される最終シナプス）の構築に表現型が現れるかどうかを組織染色学的手法により観察した。

4. 筋再生における組織形態形成

代表的な化学的筋損傷誘導剤であるカルディオキトキシン（CTX）と、グリセロールをマウスあるいはラットの筋組織中に注入し、損傷後の組織の変化を光学顕微鏡レベルで観察し、それらを比較した。注入 4 日目

です。すでに、両処置群間で筋組織に形態学的な違いが現れることが明らかになったので、誘導剤注入直後の筋組織の微細構造の変化を電子顕微鏡で観察した。多くの生体組織では、損傷後に組織の線維化が誘導されるが、筋組織での報告はほとんどなかった。そこで、線維化誘導因子である TGF- β 1 に着目し、外因性 TGF- β 1 がグリセロールによる筋損傷誘導後の筋再生や脂肪形成に及ぼす影響を検討した。

5. 脂肪細胞による筋肉内結合組織のリモデリング

骨格筋内で脂肪組織は筋線維束間および筋線維間に形成されることから、脂肪細胞は筋内膜や筋周膜といった筋肉内結合組織 (IMCT) を足場に増殖・分化し、自らに適した細胞外環境にするために IMCT をリモデリングするのではないかと予想された。そこで、生体骨格筋の高次構造を維持した IMCT 基質上で脂肪細胞を長期間 (40 日間) 培養し、脂肪細胞が IMCT 構造に及ぼす影響を走査電子顕微鏡等で観察した。

4. 研究成果

1. 新規コミュニケーションツールとしてエクソソームの解析

(1) 脂肪細胞が分化・成長過程に分泌するエクソソームの解析

培養脂肪細胞が分泌するエクソソーム画分に含まれる miRNA の発現変動を解析した。脂肪細胞が分泌するエクソソーム画分の量は、分化 0 日目、4 日目および 16 日目にピークがあり、脂肪分化・成熟過程にかけてエクソソーム画分の分泌量が変化することが判明した。調製したエクソソーム画分から RNA を抽出し miRNA のマイクロアレイによる網羅的な発現解析を行った。なお、エクソソーム画分の分泌量が多かった分化 0 日目、4 日目、12 日目および 16 日目のサンプルを用いて比較解析を行った。その結果、検出できた miRNA 数はそれぞれ 329、426、406、および 380 であった。主成分分析の結果、12 日目と 16 日目は同一のグループに分けられ、計 3 つのグループに分離できた。脂肪細胞の分化直後 (0 日目)、脂肪細胞内に脂肪滴が蓄積し始める時期 (4 日目)、および成熟した脂肪滴が観察できる時期 (12、16 日目) では、エクソソームに含まれる miRNA のプロファイリングが異なった。

(2) 骨格筋細胞が分化・成長過程に分泌するエクソソームの解析

骨格筋細胞でも脂肪細胞と同様に、培養骨格筋細胞が分泌するエクソソーム画分に含まれる miRNA の発現変動を解析した。脂肪細胞とは異なり骨格筋細胞では、分化に伴いエクソソーム画分の分泌量は増加することが明らかになった。調製したエクソソーム画分から RNA を抽出し miRNA のマイクロアレイによる網羅的な発現解析を行った結果、検出できた miRNA 数は分化 0 日目、2 日目、および 4 日目において、それぞれ 131、330、および 361 であった。主成分分析の結果、miRNA のプロファイリングが各サンプル間で異なることが判明した。

(3) 脂肪細胞-骨格筋細胞間におけるエクソソームを介したコミュニケーション

エクソソームを介した脂肪細胞-骨格筋細胞のコミュニケーション機構を明らかにするために、脂肪細胞由来のエクソソーム画分を蛍光標識し、培養骨格筋細胞へ導入した。培養脂肪細胞由来のエクソソームを取り込んだ骨格筋細胞の遺伝子発現の網羅的な解析をすることで、取り込まれたエクソソームによる骨格筋細胞へおよび影響を検討した。対照群と比較して 1.5 倍以上の発現上昇があった約 300 の遺伝子を Gene Ontology 解析した。その結果、エクソソームを導入した骨格筋細胞において転写調節因子を活性化に関連する遺伝子群の発現が上昇する傾向にあった。一方 1.5 倍以下の減少があった遺伝子は約 20 個であった。

骨格筋細胞由来のエクソソーム画分を導入した脂肪細胞についても同様に遺伝子解析を行った。その結果、対照群と比較して 1.5 倍以上の発現上昇があった約 300 の遺伝子を Gene Ontology 解析した。エクソソームを導入した脂肪細胞において、細胞接着に関する遺伝子群の発現上昇が検出された。一方 1.5 倍以下の減少があった遺伝子は約 30 個であった。骨格筋細胞由来のエクソソームを脂肪細胞へ添加すると、遺伝子発現が上昇する傾向にあった。

上記の結果より脂肪細胞-骨格筋細胞間において、分泌されたエクソソームが異種細胞へ取り込まれ、エクソソームを取り込んだ細胞の遺伝子発現に影響をおよぼすことが実証できた。

2. 筋-脂肪細胞のコミュニケーション機構の解明

(1) 3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導した脂肪細胞を C2C12 筋細胞と共培養した結果、筋管形成率および筋管直径は単独培養した C2C12 筋細胞に比べて小さく、脂肪細胞との共培養によって筋細胞の分化は抑制された。脂肪細胞と共培養した筋細胞では、筋分化転写因子である MyoD および Myogenin の発現量低下、ならびに筋収縮タンパク質であるミオシン重鎖の発現量低下がみられた。また、骨格筋形成抑制因子である Myostatin の発現亢進、ならびに筋萎縮・分解に関連する Ubiquitin E3 ligases である Atrogin-1 と MuRF-1 の発現誘導が認められた。以上の結果は、脂肪細胞は筋細胞の分化を抑制するとともに、筋萎縮を促進していることが示唆された。

(2) 脂肪細胞の筋細胞に対する分化抑制作用には、脂肪細胞が分泌する液性因子を介していることが予想されたので、共培養下での脂肪細胞および筋細胞における炎症性サイトカインの発現及び分泌パターンを調べた。共培養期間中、脂肪細胞における TNF- α および IL-6 の発現量は mRNA およびタンパク質レベルで大きな変化はみられなかった。一方、脂肪細胞と共培養した筋細胞における IL-6 の発現量は単独培養した筋細胞に比べてタンパク質レベルで有意 ($p < 0.05$) に高く、また、培養液中の IL-6 量も有意 ($p < 0.05$) に高かった。以上の結果から、脂肪細胞は自ら IL-6 を産生するとともに、共存する筋細胞における IL-6 の発現亢進および分泌促進をしていることが明らかになった。そこで、この作用機序を明らかにするために、IL-6 に対する中和抗体を添加した培養液を用いて脂肪細胞と筋細胞の共培養を行った結果、筋管形成率および筋管直径は対照区に比べて有意 ($p < 0.05$) に大きかった。以上の結果は、脂肪細胞は筋細胞からの IL-6 の発現および分泌を誘導し、IL-6 は自己分泌的に筋分化の抑制に働いていることが示唆された。

(3)脂肪細胞との共培養によって筋管が細くなる現象が見られたことから、この形態的变化に筋管の筋線維型の変換、すなわち遅筋型の筋管は細く、速筋型は太いことから筋管の遅筋化が起こったのではないかと予想された。そこで、形成された筋管の筋線維型組成の変化と遅筋型筋管の形成誘導因子である Sema3A の発現レベルを調べた。脂肪細胞との共培養によって Sema3A のタンパク質発現量は増加したが、予想に反して、遅筋型ミオシン重鎖の発現量は変化せず、むしろ速筋型のミオシン重鎖の発現量が増加する傾向にあった。脂肪細胞との共培養によって筋管が細くなるのは筋線維型の変化（遅筋化）を伴わないと考えられた。

3. 筋再生における筋幹細胞（衛星細胞）と運動神経との細胞間コミュニケーション

(1) 筋衛星細胞が分化初期特異的に合成・分泌する神経軸索ガイダンス因子 Sema3A の生理機能を検討した結果、筋細胞特異的転写因子 (myogenin, Pax7, Myf5, MyoD) の発現制御に関与していることを見出した。また、筋線維の運動神経支配を解除すると衛星細胞が APOBEC2 を高発現することを見出し、これが衛星細胞の分化・融合を抑制的に制御していることを明らかにした。APOBEC2 をノックアウトすると、分化した衛星細胞が再び休止化し筋幹細胞プールを維持するセルフリニューアル機能も有意に低下した。従って、APOBEC2 は分化した衛星細胞が融合し筋管（幼若な新生筋線維）を形成するパスウェイを抑制しセルフリニューアルを促進することで、筋再生を巧みに制御していると考えられた。

(2) Sema3A は、運動神経末端の筋線維接着（運動神経支配の確立）に必要な要素であるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の発現および細胞膜での機能的凝集（クラスタリング）を誘導する鍵因子であることを *in vitro* で実証した。具体的には、nAChR のサブユニット（成熟型サブユニット）の発現を誘導し成熟型 nAChR の生合成を制御すること、および nAChR のクラスタリングを誘導することを新規定量法を開発し証明した。従って、筋幹細胞分泌因子 Sema3A によって運動神経末端の筋線維接着が制御されていると考えられた。

(3) 衛星細胞が分化初期特異的に合成・分泌する神経軸索ガイダンス因子 Sema3A が運動神経末端の筋線維接着（運動神経支配の確立）に関わっていることを直接に証明するため、衛星細胞特異的 Sema3A-cKO マウスを用いた筋損傷実験を行った。後肢下腿部のヒフク筋（代表的な速筋）にカルディオトキシン (CTX) を注入し筋損傷を誘導した後、筋再生完了時に、ポストシナプス領域（最終シナプスの筋線維側部位であり運動神経末端が結合する部分）および神経軸索を観察した結果、コントロールマウスと比較して、明瞭な表現型の違いは認められなかったが、単位面積あたりのポストシナプス数は若干減少する傾向は認められた。nAChR のサブユニットの発現にも有意差は認められなかったため、CTX による筋損傷ではシナプス形成を誘導することができなかったものと推察された。

4. 筋再生における組織形態形成

(1) 筋細胞に薬剤 (CTX およびグリセロール) で筋損傷を誘導し、その再生過程を、系時的に形態的手法で明らかにした。注入後早期では、CTX を注入した後、早期では筋線維中のミトコンドリアの増加と膨化が観察された。一方、グリセロールを注入すると筋線維中に顆粒が増加し、また筋線維の基底膜や細胞膜が局部的に破綻していた。また、CTX 注入ではグリセロール注入よりもより早期に、そしてより多数の炎症性細胞（好中球やマクロファージ）を損傷部に遊走させていた。活性化した筋衛星細胞は CTX とグリセロールのいずれの処置でも 6 時間後から観察され始めたが、同細胞の活性度を表す指標の細胞長や核/細胞質比は CTX 注入 4 日目で有意な差を示したことから、グリセロールを注入した場合より筋再生への移行がスムーズに行われていることが示唆された。また、4 日目には CTX 注入では線維芽細胞が、グリセロール注入では脂肪細胞前駆細胞が多数観察された。このように薬剤によって形態的な違いが筋組織に現れたことは、筋線維の損傷が異なる機構で誘導されたことを意味する。すなわち、CTX とグリセロールではダメージを与える組織内の構造対象が異なり、前者は筋線維のミトコンドリアであり、後者は基底膜や細胞膜が破綻することで引き起こされる細胞内浸透圧の変化であると考えられた。

(2) マウス前脛骨筋 (TA) をグリセロールで損傷させ、外因性の TGF- β 1 が筋再生及び脂肪形成に及ぼす影響を検討した結果、TGF- β 1 は、筋再生や脂肪形成の初期段階で強力に抑制効果を発揮することが明らかとなった。同様の実験をラットでも行ったところ、グリセロール注入後 4 日目のラットの TA には、広範囲に炎症性細胞の浸潤を伴う筋線維の変性が観察された。7 日目には、マウスのそれと異なる脂肪細胞の浸潤を伴わない再生筋管が出現し、14 日目には筋組織の線維化が生じた。ラットの筋では、グリセロールが筋組織に早期の線維化を誘発し、それは損傷後 2 週間まで持続することが明らかとなった。また、マウスで観察された脂肪組織の形成は見られなかった。線維化に関連する因子である TGF- β 1 に着目し、TGF- β 1 の中和抗体（抗 TGF- β 1 抗体）をグリセロール投与と同時に TA に注入すると、筋組織の線維化は有意に減少し、同時に筋再生が促進した。すなわち、ラットにおいて TGF- β 1 は、筋組織の線維化を促進し、筋再生を抑制することが示唆された。

5. 脂肪細胞による筋肉内結合組織のリモデリング

骨格筋内で脂肪組織は筋線維束間および筋線維間に形成されることから、脂肪細胞は筋内膜や筋周膜といった筋肉内結合組織 (IMCT) を足場に増殖・分化し、自らに適した細胞外環境にするために IMCT をリモデリングするのではないかと予想された。そこで、生体骨格筋における高次構造を維持した IMCT 基質上で脂肪細胞を長期間 (35 日間) 培養し、脂肪細胞が IMCT 構造に及ぼす影響を検討した。脂肪細胞は IMCT 基質によく接着し増殖・分化すること、IMCT 基質を構築するコラーゲン線維上を遊走し線維束間に浸潤すること、また、このような脂肪細胞の活動に伴って IMCT 基質を構築していたコラーゲン線維の高次構造が崩壊していくことが明らかになった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. Seo K, Suzuki T, Kobayashi K, Nishimura T. Adipocytes suppress differentiation of muscle cells in a co-culture system. *Animal Science Journal*, 90,423-434 (2019).doi:10.1111/asj.13145 (査読有)
2. Mahdy MAA, Warita K, Hosaka YZ. Glycerol induces early fibrosis in regenerating rat skeletal muscle. *Journal of Veterinary and Medical Science*. 2018; 80:1646-1649. (査読有)
3. Sato Y., Ohtsubo H., Nihei N., Kaneko T., Sato Y., Adachi S.-I., Kondo S., Nakamura M., Mizunoya W., Iida H., Tatsumi R., Rada C., Yoshizawa F. Apobec2 deficiency causes mitochondrial defects and mitophagy in skeletal muscle. *FASEB Journal* 32(3), 1428-1439 (2018). doi: 10.1096/fj.201700493R(査読有)
4. Izumi W., Takuma Y., Ebihara R., Mizunoya W., Tatsumi R., Nakamura M. Paired box 7 inhibits differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Animal Science Journal* 89(8), 1214-1219 (2018). doi: 10.1111/asj.13050(査読有)
5. Yoshida Y., Tsutaki A., Tamura Y., Kouzaki K., Sashihara K., Nakajima S., Tagashira M., Tatsumi R., Nakazato K. Dietary apple polyphenols increase skeletal muscle capillaries in Wistar rats. *Physiological Reports* 6(18), e13866 (2018). doi: 10.14814/phy2. (査読有)
6. Ohtsubo H., Sato Y., Matsuyoshi Y., Suzuki T., Mizunoya W., Nakamura M., Tatsumi R.,[†] and Ikeuchi, Y. ([†]corresponding author) Fluorescence microscopy data on expression of Paired Box Transcription Factor 7 in skeletal muscle of APOBEC2 knockout mice. *Data in Brief* 17, 1348-1351 (2018). doi: 10.1016/j.dib.2018.02.063 (査読有)
7. Mahdy MAA, Warita K, Hosaka YZ. Effects of transforming growth factor- 1 treatment on muscle regeneration and adipogenesis in glycerol-injured muscle. *Animal Science Journal*, 88(11), 1811-1819 (2017). doi: 10.1111/asj.12845. (査読有)
8. Ohtsubo H., Sato Y., Suzuki T., Mizunoya W., Nakamura M., Tatsumi R.,[†] and Ikeuchi Y. Data supporting possible implication of APOBEC2 in self-renewal functions of myogenic stem satellite cells: toward understanding the negative regulation of myoblast differentiation. *Data in Brief*, 12, 269-273 (2017). doi: 10.1016/j.dib.2017.03.051. (査読有)
9. Mizunoya, W., Okamoto, S., Miyahara, H., Akahoshi, M., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohtsubo, H., Komiya, Y., Qahar, M., Waga, T., Nakazato, K., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., and Tatsumi, R. Fast-to-slow shift of muscle fiber-type composition by dietary apple polyphenols in rats: Impact of the low-dose supplementation. *Animal Science Journal*, 88(3), 489-499 (2017). doi: 10.1111/asj.12655. (査読有)
10. Anderson J. E., Do M.-K. Q., Daneshvar N., Suzuki T., Dort J., Mizunoya W., and Tatsumi R. The role of semaphorin 3A in myogenic regeneration and the formation of functional neuromuscular junctions on new fibers. *Biological Reviews*, 92, 1389-1405 (2017)._doi:10.1111/brv.12286(査読有)
11. Tatsumi R.,[†] Suzuki T., Do M.-K. Q., Ohya Y., Anderson J. E., Sibata A., Kawaguchi M., Ohya S., Ohtsubo H., Mizunoya W., Sawano S., Komiya Y., Ichitsubo R., Ojima K., Nishimatsu S.-I., Nohno T., Ohsawa Y., Sunada Y., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y., Nishimura T., Yagi T., and Allen R. E. ([†]corresponding author) Slow-myofiber commitment by semaphorin 3A secreted from myogenic stem cells. *Stem Cells*, 35, 1815-1834 (2017). doi: 10.1002/stem.2639. (査読有)
12. Qahar, M., Takuma, Y., Mizunoya, W., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., and Nakamura, M. Semaphorin 3A promotes activation of Pax7, Myf5, and MyoD through inhibition of emerin expression in activated satellite cells. *FEBS Open Bio* 6, 529-539 (2016).doi: 10.1002/2211-5463.12050 (査読有)
13. Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ohkawa, Y., Nakamura, M., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., and Mizunoya, W. A one-step immunostaining method to visualize rodent muscle fiber type within a single specimen. *PLoS ONE* 11, e0166080 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0166080 (査読有)
14. Roh, S.-G, Suzuki, Y., Gotoh, T., Tatsumi, R., and Katoh, K. Physiological roles of adipokines, hepatokines, and myokines in ruminants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29, 1-15 (2016).doi: 10.5713/ajas.16.0001R (査読有)
15. Ojima K, Oe M, Nakajima I, Muroya S, Nishimura T. Dynamics of protein secretion during adipocyte differentiation. *FEBS Open Bio*, 6(8), 816-826, (2016). doi: 10.1002/2211-5463.12091.
16. Mahdy MA, Warita K, Hosaka YZ. Early ultrastructural events of skeletal muscle damage following cardiotoxin-induced injury and glycerol-induced injury. *Micron*. 91, 29-40. (2016). doi: 10.1016/j.micron.2016.09.009. (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 趙曉琳, 徐康珉, 鈴木貴弘, 小林謙, 西邑隆徳. 脂肪細胞が筋細胞の筋線維型決定に及ぼす影響. 日本畜産学会第 125 回大会、2019 年 3 月、相模原市.
2. Suzuki T., Tatsumi R., Mori A., Hisaeda K., Nishi Y., Kobayashi K., Ojima K., Nishimura T. Skeletal muscle fiber types may be regulated by multi-functional modulators secreted from satellite cells localized in each fiber. 2018 FASEB Science Research Conference on “Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration”, Steamboat Springs, CO, USA (July 8-13, 2018).
3. Tatsumi R., Suzuki T., Kawaguchi M., Do M.-K. Q., Ohya S., Matsuyoshi Y., Ohya Y., Anderson J. A., Mizunoya W., Sawano S., Sakata K., Nakamura M., Allen R. E. Slow-fiber commitment by Sema3A secretion from myogenic stem satellite cells. 2018 FASEB Science Research Conference on

“ Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration ”, Steamboat Springs, CO, USA (July 8-13, 2018).

4. **尾嶋孝一**. 骨格筋細胞が分泌する因子の網羅的な解析. 第6回若手による骨格筋細胞研究会. 大阪市. 2018年.
5. **保坂善真**. コンドロイチン硫酸を通して明らかとなった筋管の形成. 第161回日本獣医学会学術集会 獣医解剖分科会シンポジウム「透けてきたSkeleton構造-骨格筋・結合組織の形態形成機構とその利用-」、つくば、2018年9月.
6. **辰巳隆一**. 筋幹細胞分泌因子による筋線維型制御. 第161回 日本獣医学会学術集会「One Health-人と動物の健康と共生」、獣医解剖分科会シンポジウム：「透けてきたSkeleton構造：骨格筋・結合組織の形態形成機構とその利用」（2018年 9月12日，つくば国際会議場 第12会場，つくば市）
7. 鈴木貴弘, **辰巳隆一**, 森 愛華, 久枝皓雅, 西 百合子, 小林 謙, **尾嶋孝一**, **西邑隆徳**. 遅筋と速筋それぞれに局在する筋幹細胞は独自の筋線維型制御機構を有する. 日本筋学会第4回学術集会「筋研究の新たな地平へ-基礎と臨床の融合- ; シンポジウム2「骨格筋の可塑性と再生能を支える筋衛星細胞とエピジェネティック制御」(2018年 8月10,11日, 川崎医科大学医学部講義棟, 倉敷市)
8. 徐康珉, 鈴木貴弘, 小林 謙, **西邑隆徳**. 成熟脂肪細胞が筋芽細胞の分化に及ぼす影響. 日本畜産学会第122回大会、2017年3月、神戸市.
9. Mohamed AA. Mahdy, Warita Katsuhiko, **Yoshiano Z. Hosaka**. Transforming Growth Factor- Inhibits Adipogenesis in Regenerating Glycerol-injured Muscle, Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Termis-AP 2016), 台北,台湾.2016年9月
10. Qahar M., Takuma Y., Mizunoya W., **Tatsumi R.**, Ikeuchi Y., Nakamura M. Semaphorin 3A promotes activation of Pax7, Myf5, and MyoD through inhibition of emerlin expression. *Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease, the meeting of the Society for Muscle Biology*, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, US (June 6-11, 2016).
11. **Tatsumi R.**, Suzuki T., Ohya Y., Do M.-K. Q., Ohtsubo H., Kawaguchi M., Anderson J. E., Mizunoya W., Komiya Y., Qahar Q., Ojima K., Sawano S., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y., Allen R. E. Experiments reveal a novel mechanism to regulate myofiber types and its activation by functional food ingredients. *17th AAAP (Asian-Australasian Animal Production) Animal Science Congress, symposium: Animal Nutrition and Metabolism, in conjunction with 2016 Fall meeting of Japanese Society for Animal Nutrition and Metabolism*, Kyushu Sangyo University, Fukuoka, Japan (August 22-25, 2016).
13. Suzuki T., Ohya Y., Nishimatsu S.I., Terada K., Katase N., Ohtsubo H., Mizunoya W., Kobayashi K., Nohno T., **Nishimura T.**, **Tatsumi R.** Satellite cells isolated from soleus muscle may autonomously form slow-twitch fibers via Sema3A signaling. *17th AAAP (Asian-Australasian Animal Production) Animal Science Congress*, Kyushu Sangyo University, Fukuoka, Japan (August 22-25, 2016).
14. **Tatsumi R.** A possible mechanism to impact slow-fiber formation and its activation by functional food ingredients. *Muscle & Meat Sciences Meeting*, organized by Prof. Borjigin Gerelt, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia, China (Sep. 18, 2016).

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：辰巳 隆一

ローマ字氏名：(TATSUMI, Ryuichi)

所属研究機関名：九州大学

部局名：農学研究院、職名：准教、

研究者番号：40250493

研究分担者氏名：尾嶋 孝一

ローマ字氏名：(OJIMA, Kouichi)

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：畜産草地研究所 畜産物研究領域

職名：主任研究員、研究者番号：60415544

研究分担者氏名：保坂 善真

ローマ字氏名：(TATSUMI, Ryuichi)

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：農学部

職名：教授、研究者番号：00337023

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：水野谷 航

ローマ字氏名：(MIZUNOYA, Wataru)

研究協力者氏名：鈴木 貴弘

ローマ字氏名：(SUZUKI, Takahiro)

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。