

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18788

研究課題名(和文)多様な筋幹細胞による新奇筋線維型制御機構の解明

研究課題名(英文)The novel mechanism of fiber-type determination by myogenic stem cells isolated from various muscle sites

研究代表者

鈴木 貴弘 (Suzuki, Takahiro)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：80750877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らは、筋幹細胞(衛星細胞)が融合して新生筋線維(筋管)を形成する過程で、多機能性の細胞外制御因子を合成・分泌して自律的に筋線維型を早期決定する新奇制御機構に着目している。これまでに、遅筋由来の衛星細胞から多量に分泌されるsemaphorin 3A(Sema3A)は筋管の遅筋化を誘導することを明らかにしたが、速筋化誘導に関する機構は全く不明であった。本研究では、神経系においてSema3Aと反対の生理機能を有するNetrin-1が筋線維型決定に与える影響を検証した。その結果、速筋由来の衛星細胞はNetrin-1を多量に合成し、自律的に速筋型の筋管を形成する制御機構を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食肉の原料となる骨格筋は、主に筋細胞(細長い巨大な細胞のため“筋線維”と呼ばれる)から構成される。筋線維は、収縮特性や代謝特性等の違いによって遅筋型または速筋型といった筋線維型で分類される。これまでに、筋線維型は成熟した筋線維に接着する運動神経刺激によって制御されると考えられてきたが、本研究結果より、各筋線維型に特異的な衛星細胞はそれぞれで多量に産生する多機能性の細胞外制御因子によって、筋管の筋線維型を制御する「早期決定機構」の存在が明らかとなった。本機構の応用により、容易に筋線維型を変換することで、食肉の質を自在にコントロールできる新技術開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We currently focus on the novel role of satellite cells in the myofiber-type regulation. Our previous studies proposed that satellite cell cultures from soleus muscle (slow-myofiber abundant) synthesized and secreted larger amount of semaphorin 3A (Sema3A) than extensor digitorum longus (EDL; fast-myofiber abundant) and Sema3A promoted the slow-twitch myofiber formation. In this study, we focused on Netrins characterized as multi-functional modulators like Sema3A also importantly mediate myofiber-type commitment early before motor-neural stimulations. Initially, we detected the expression levels of Netrins during myogenic differentiation phase. Next, the satellite cells from EDL expressed higher levels of Netrin-1 than those from soleus. Netrin-1 knockdown experiments in satellite cell cultures performed the inhibition of fast-myotube formation. Taken together, these results suggest that satellite cell-derived Netrin1 may be the key modulator for the fast-myofiber-type commitment.

研究分野：筋細胞分子生物学

キーワード：筋幹細胞 衛星細胞 筋線維型 早期決定機構 多機能性の細胞外制御因子 速筋化 Netrin-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食肉の質を左右する味、香りおよびテクスチャー(きめの細かさ)などは、骨格筋細胞(細長くて巨大な細胞であるため“筋線維”と呼称される)の筋線維型組成に大きく依存する。研究者らは、筋線維型を自在にコントロールできるような次世代型食肉生産技術の開発を目指すため、筋線維型制御機構に関する基礎研究を展開している。筋線維型は、大まかに“遅筋型”と“速筋型”という形態学および生理学的な特徴が正反対な2種類に分類される。様々な部位を構成している骨格筋は、どちらかの筋線維型に特異的か、または両筋線維型が混在した“中間型筋”として存在する。これまでに筋線維型を決定する主な要因は、筋線維を取り巻く運動神経支配による影響と定義されており、特に成熟動物における大規模な変換は困難だと考えられてきた。しかし研究者らは、動物の筋成長過程や損傷後の筋再生過程において筋幹細胞(衛星細胞)が互いに融合して形成する新生筋線維(筋管)では、上述の神経による影響を受けずに筋線維型が制御される「早期決定機構」が存在する可能性に着目した。

これまでに研究者らは、分化期以降の衛星細胞から多機能性の細胞外制御因子である semaphorin 3A (Sema3A) が合成・分泌され、その発現パターンが遅筋のヒラメ筋(soleus)において速筋の長趾伸筋(extensor digitorum longus; EDL)よりも高いことを明らかにした(Suzuki *et al.*, 2013)。そこで、衛星細胞からの Sema3A 発現を抑制したところ、遅筋型筋管の形成が阻害されることを細胞培養および生体レベルの実験系で観察した(Tatsumi *et al.*, 2017; 鈴木貴弘, 2018)。すなわち、遅筋に局在する衛星細胞は Sema3A を多量に分泌して、自律的に筋管を遅筋化する機構を有することが考えられた。よって、衛星細胞による筋線維型早期決定機構の妥当性が期待されたが、速筋化を促す機構については全く不明である。

2. 研究の目的

研究者らは、速筋化を促す有力な候補因子として、神経系および骨系において Sema3A とは反対の生理機能を発揮する多機能性の細胞外制御因子 Netrin family (Netrin-1, 3 および 4) に着目した。分化誘導後のマウス由来筋芽細胞株 C2C12 において Netrin family が合成され、かつ筋管形成の促進に寄与することから(Kang *et al.*, 2004) 候補因子としての妥当性が期待された。そこで、以下の項目について検証を進めた。

- (1) 衛星細胞の初代培養系における Netrin family の発現パターン
 - (2) 遅筋または速筋を由来とする衛星細胞の Netrin family と受容体の発現量の比較
 - (3) 衛星細胞からの Netrin サブタイプのノックダウン条件下における筋線維型組成の変化
- 本研究結果とこれまでに得られた知見より、遅筋または速筋では異なる制御因子が分泌される点を考慮すると、それぞれの筋線維型には特異的な衛星細胞が存在することが推測できる。よって本研究は、「筋線維型に応じて衛星細胞は多様化する」という新たな知見の捻出につながることを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 衛星細胞の初代培養系
2ヶ月齢の C57BL/6 雄マウスの骨格筋(脊柱起立筋群、大殿筋、ヒラメ筋; soleus、足底筋、腓腹筋、長趾伸筋; EDL、前脛骨筋および大腿直筋を含む)を摘出し、Allen 博士ら(1997年)および辰巳博士ら(2006年)の方法を参考に、溶血行程を追加した衛星細胞の単離培養方法を採用した。Fibronectin と poly-L-lysine でダブルコートしたカルチャープレートに、骨格筋量 0.5-1.0 g/ml の濃度となるように調製した衛星細胞懸濁液を播種し、5% CO₂、95% 大気および 37°C の条件下において、細胞密度が 50% コンフルエントになるまで 20% FBS-F10 で増殖した。その後、5% HS-DMEM に切り換えて分化誘導した。
- (2) RNA 抽出および Semi qRT-PCR/real-time qRT-PCR
培養細胞を PBS で洗浄後、RNA 抽出試薬 (ISOGEN II, ニッポンジーン) により溶解し、メーカー推奨のプロトコルに従って total RNA を抽出した。続いて、逆転写に供試して (ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO) cDNA を作成した。作製した cDNA を含む逆転写反応液を鋳型とし、RT-PCR (KOD Fx, TOYOBO) に供したサンプルをアガロースゲル電気泳動による半定量的解析、または TaqMan Probe Assay を用いた real-time qRT-PCR (Light Cycler 480 system II, Roche) によって定量的解析を行った。データの分析は、添付のソフトウェアを用いて行った。
- (3) タンパク質の抽出および Western Blotting
培養細胞を PBS で洗浄後、Laemmli sample buffer でタンパク質を抽出した。サンプルは 10% ポリアクリルアミドゲルによる SDS-PAGE に供試し、泳動後のゲルより PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、5% (w/v) のスキムミルクを添加した tween 20 含有トリス緩衝液により 30 分間ブロッキングし、免疫反応促進試薬 (Can Get Signal, TOYOBO) で希釈した 1 次抗体溶液中で一晩インキュベーションした。メンブレンを洗浄後、同様に希釈した HRP 標識 2 次抗体溶液で 1 時間インキュベーションした。そ

の後、ECL Western Blotting Reagents (GE Healthcare)とメンブレンを反応させ、ChemiDoc™ XRS+システム (Bio-Rad) を用いて化学発光検出を行った。

(4) RNA 干渉法を用いた Netrin-1 ノックダウン

20% FBS-F10 を用いて 1.0×10^4 cells/ml に濃度を調製した衛星細胞由来の筋芽細胞を、Type I コラーゲンでコーティングしたカルチャープレートに播種し、5% CO₂、95% 大気および 37°C の条件下で 24 時間増殖させた。その後、5% HS-DMEM に切り換えて分化誘導を行い、筋管形成が十分に認められた分化 120 時間目まで培養した。分化誘導と同時に、濃度 40 nM に調製した Netrin-1 特異的な siRNA (stealth siRNA, Invitrogen) を siRNA transfection reagent (Screen Fect™, WAKO) を用いてトランスフェクションした。なお、対照群として濃度 40 nM の Control siRNA (AllStars Negative Control siRNA, QIAGEN) を同様にトランスフェクションした。

4 . 研究成果

(1) 衛星細胞の初代培養系における Netrin family の発現パターン

まず衛星細胞の分化誘導開始後から筋管形成期にかけての Netrin family および Sema3A の mRNA 発現パターンを調べた (Fig. 1)。Netrin-1 は、分化誘導後 48 および 72 時間目において発現量が分化誘導開始前すなわち 0 時間目より有意に増加した。Netrin-3 は、0 時間目が検出されなかったため有意差を検証することは不可能であったが、分化誘導後の発現量に増加傾向が認められた。Netrin-4 の発現量は、Netrin-1 と同様に 48 および 72 時間目において有意に増加した。以上より、衛星細胞の初代培養系において Netrin family の発現量は分化誘導後に増加傾向を示すことが明らかになった。また、Sema3A の発現量は 24 時間目以降から有意に増加し、72 時間目まで維持されていた。よって、Netrin family のうち特に Netrin-1 および 4 と Sema3A は、分化誘導後に発現量の有意な増加を示すという点で、類似した発現パターンであることが明らかになった。

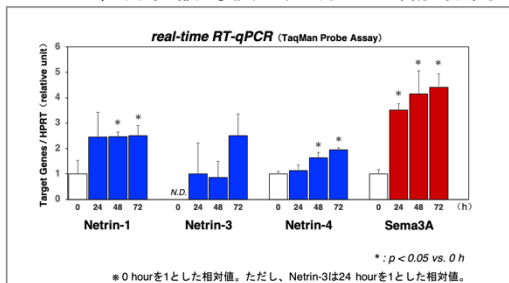


Fig.1 分化誘導後の衛星細胞における Netrin family の発現パターン

(2) 遅筋または速筋を由来とする衛星細胞の Netrin family と受容体の発現量の比較

前項において、分化誘導後の衛星細胞からの Netrin family 発現パターンが、Sema3A と同様に増加することが明らかになったため、本項では実際に速筋化誘導因子の候補として妥当であるかを直接的に検討するため、マウスの遅筋である soleus および速筋の EDL それぞれを由来とする衛星細胞における Netrin family の mRNA 発現量を調べた (Fig. 2)。なお本研究では、前項においていずれの Netrin family の発現量が増加することが認められた分化誘導後 72 時間目においてサンプリングを行った。その結果、Netrin-3 および 4 の発現量は soleus 由来の衛星細胞と EDL の間では有意な差は認められなかったが、Netrin-1 は soleus よりも EDL において発現量が有意に高かった (Fig. 2A)。Netrin-1 の mRNA 発現量に差が認められたため、Western Blotting を用いてタンパク質発現量も比較した。その結果、タンパク質発現量に関しても、Netrin-1 は soleus よりも EDL において発現量が高かった (Fig. 2B)。以上より、速筋である EDL 由来の衛星細胞において発現量が高かった Netrin-1 は、速筋化誘導因子の有力な候補であることが予想された。

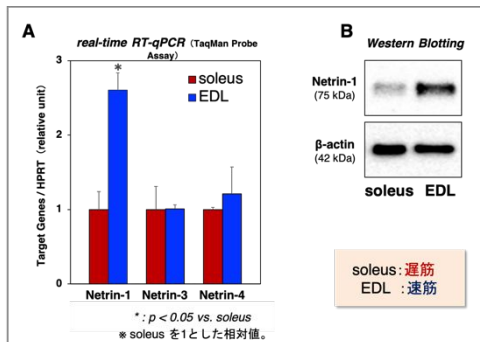


Fig.2 遅筋および速筋由来の衛星細胞における Netrin family の発現パターン

次に、Netrin 受容体の mRNA 発現量の比較を行った (Fig. 3)。そこで、衛星細胞において発現する Netrin family 受容体の種類を明らかにするため、RT-PCR 後のアガロースゲル電気泳動を用いて、soleus および EDL 由来の衛星細胞における Netrin family 受容体 (neogenin、BOC、CDO、DCC および Unc5A-D) の mRNA 発現の有無の検証と発現量の半定量的比較を行った (Fig. 3A)。その結果、neogenin、BOC、CDO、Unc5B および Unc5C は、それぞれの衛星細胞において mRNA 発現が認められたが、顕著な差は

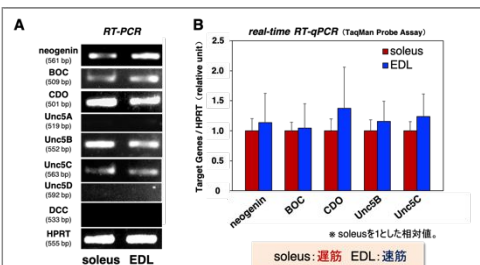


Fig.3 遅筋および速筋由来の衛星細胞における Netrin family の受容体の発現パターン

認められなかった。DCC、Unc5A および Unc5D は、検出されなかった。さらに、発現が認められた受容体に関しては、発現量を定量的に比較するために real-time qRT-PCR を用いた検証も行った (Fig. 3B)。その結果、いずれの受容体の発現量についても、soleus と EDL で有意な差は認められなかった。以上より、遅筋と速筋由来の衛星細胞で Netrin 受容体の発現量に差はないと考えられたが、合成された Netrin-1 は受容され筋線維型制御に関与することが示唆された。

(3) 衛星細胞からの Netrin サブタイプのノックダウン条件下における筋線維型組成の変化

本項では、分化誘導と同時に RNAi 法を用いて Netrin-1 特異的 siRNA をトランスフェクションし、筋管の筋線維型組成への影響を調べた (Fig. 4) まず、Netrin-1 発現量をタンパク質レベルで効果的に減少させることを確認した (Fig. 4A)。その際、筋線維型マーカーの筋線維型ミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MyHC) の発現量を比較したところ、slow MyHC については変化が認められなかったが、fast MyHC は Netrin-1 特異的 siRNA 処理区において Control siRNA 処理区よりもタンパク質発現量が低かった。続いて、fast MyHC のアイソフォームのうち IIa、IIx および IIb 型 MyHC のいずれの発現量に変化があったのかを明らかにするため、各アイソフォームに特異的なプライマーを用いた real-time qRT-PCR による解析を行った (Fig. 4B)。その結果、IIa および IIx 型 MyHC については有意ではなかったが減少傾向が、超速筋型である IIb 型 MyHC のみ mRNA 発現量の有意な減少が認められた。なお、slow である I 型 MyHC については変化は認められなかった。以上の結果より、Netrin-1 は速筋型の筋管形成誘導に寄与することが明らかとなった。

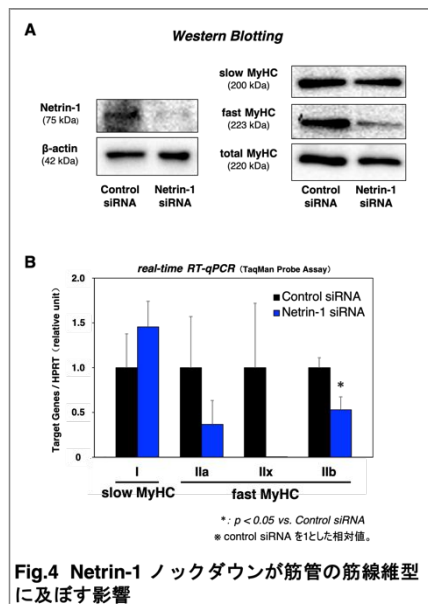


Fig.4 Netrin-1 ノックダウンが筋管の筋線維型に及ぼす影響

以上より、速筋を由来とする衛星細胞は Netrin-1 を多量に合成して、筋管の速筋化を促す新奇制御機構の存在が明らかとなった。Sema3A による遅筋化誘導機構と併せると、局在する骨格筋の筋線維型に応じて衛星細胞は特異性を有し、それぞれで自律的に筋線維型を早期決定すると予想された。本研究成果は、食肉科学分野に留まらず、医学やスポーツ・健康科学など様々な分野の発展に貢献できる知見であると期待された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Seo, K., Suzuki, T., Kobayashi K. and Nishimura T. “Adipocytes suppress differentiation of muscle cells in a co-culture system.” *Animal Science Journal*, 90, 423-434 (2019) 査読有, doi: 10.1111/asj.13145.

鈴木貴弘 “筋幹細胞の新たな性質を見出す” *食肉の科学* 59, 33-38 (2018) 査読無

Anderson, JE., 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) 査読有, doi:10.1111/brv.12286.

Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohya, Y., Anderson, JE., Shibata, 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, RE. “Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells.” *STEM CELLS*, 35, 1815-1834 (2017) 査読有, doi:10.1002/stem.2639. *Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohya, Y. contributed equally to this work.

[学会発表] (計 14 件)

国際学会 2 件

Suzuki, T., Mori, A., Hisaeda, K., Nishi, Y., Kobayashi, K., Matsuyoshi, Y., Tatsumi, R., Ojima, K., and Nishimura, T. “Expression profiles of semaphorin and Netrin family subtypes in satellite cells during myogenic differentiation phase: toward further understanding of myofiber-type commitment models” *Proceeding of 2018 FASEB Science Research Conference on Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration*, Steamboat Springs, CO, U.S.A., July, 8-13, 2018. (Poster Presentation)

Suzuki, T., Ohya, Y., Nishimatsu, S-I., Terada, K., Katase, N., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Kobayashi, K., Nohono, T., Nishimura, T., and Tatsumi, R. “Satellite cells isolated from soleus

muscle may autonomously form slow-twitch fibers via Sema3A signaling. ” *Animal Science Congress 2016 of the Asian-Australian Association of Animal Production Societies (17th AAAP)*, Kyushu Sangyo University, Fukuoka, Japan, August, 22-25, 2016. (Poster Presentation)

国内学会 12 件

鈴木貴弘, 森愛華, 久枝皓雅, 西百合子, 有松里央, 小林謙, 辰巳隆一, 尾嶋孝一, 西邑隆徳 『筋幹細胞の合成・分泌因子 Netrin-1 による速筋型筋線維の形成誘導』 VIII29-05 (口頭発表、査読無し) 日本畜産学会大会 第 125 回大会 麻布大学 神奈川県 (2019 年 3 月 27-30 日)

鈴木貴弘 『衛星細胞が発現する semaphorin および Netrin ファミリーは筋線維型の制御に関わるかもしれない』 P-15 (ポスター発表、査読なし) 第 6 回 若手による骨格筋細胞研究会 大阪大学 大阪府 (2018 年 11 月 12-13 日)

辰巳隆一, 鈴木貴弘, MaiKhoi Q. Do, 水野谷航, 西邑隆徳 『筋幹細胞分泌因子による筋線維型制御』 (口頭発表、査読なし) 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」 シンポジウム: 「透けてきた Skelton: 骨格・筋・結合組織の形態形成機構」 つくば国際会議場 茨城県 (2018 年 9 月 12 日)

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衛星細胞は独自の筋線維型制御機構を有する』 S2-4 (口頭発表、査読あり) 第 4 回 日本筋学会学術集会 「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-」 川崎医科大学 岡山県 (2018 年 8 月 10-11 日)

西百合子, 有松里央, 森愛華, 福地達貴, 久枝皓雅, 小林謙, 辰巳隆一, 西邑隆徳, 鈴木貴弘 『マウス系統種の違いによる衛星細胞の分化能の比較』 A-11 (ポスター発表、査読あり) 第 4 回 日本筋学会学術集会 川崎医科大学 岡山県 (2018 年 8 月 10-11 日)

有松里央, 西百合子, 小林謙, 西邑隆徳, 鈴木貴弘 『衛星細胞における myogenin の機能は局在部位で異なる』 A-12 (ポスター発表、査読あり) 第 4 回 日本筋学会学術集会 川崎医科大学 岡山県 (2018 年 8 月 10-11 日)

橋本尚弥, 西百合子, 森愛華, 小林謙, 辰巳隆一, 西邑隆徳, 鈴木貴弘 『衛星細胞由来の Sema3A による遅筋線維の形成誘導メカニズムの解析』 V29-13 (口頭発表、査読無し) 日本畜産学会大会 第 124 回大会 東京大学 東京都 (2018 年 3 月 27-30 日)

鈴木貴弘, 森愛華, 西百合子, 橋本尚弥, 小林謙, 辰巳隆一, 西邑隆徳 『筋幹細胞由来分泌因子による筋線維型制御機構に関する研究-速筋化誘導因子の候補 netrin に着目して-』 P-48 (ポスター発表、査読あり) 第 3 回 日本筋学会学術集会 国立精神・神経医療研究センター 東京都 (2017 年 8 月 4-5 日)

鈴木貴弘, 西百合子, 橋本尚弥, 小林謙, 辰巳隆一, 西邑隆徳 『筋幹細胞分泌因子 netrin の筋線維型制御作用を検証する』 V29-11 (口頭発表、査読無し) 日本畜産学会大会 第 122 回大会 神戸大学 兵庫県 (2017 年 3 月 27-30 日)

西百合子, 小林謙, 西邑隆徳, 鈴木貴弘 『マウス系統種の違いによる筋幹細胞の筋分化能力を比較する』 V29-13 (口頭発表、査読無し) 日本畜産学会大会 第 122 回大会 神戸大学 兵庫県 (2017 年 3 月 27-30 日)

鈴木貴弘, 西松伸一郎, 寺田久美子, 片瀬直樹, 濃野勉, 橋本尚弥, 西百合子, 小林謙, 辰巳隆一, 西邑隆徳 『各骨格筋由来のサテライト細胞の特徴を検証する』 P-6 (ポスター発表、査読なし) 第 4 回 若手による骨格筋細胞研究会 ウィンクあいち 愛知県 (2016 年 11 月 14-15 日)

鈴木貴弘, 西松伸一郎, 寺田久美子, 片瀬直樹, 濃野勉, 小林謙, 水野谷航, 大澤裕, 砂田芳秀, 辰巳隆一, 西邑隆徳 『各骨格筋に局在するサテライト細胞の部域特異性を検証する』 P-048 (ポスター発表、査読あり) 第 2 回 日本筋学会学術集会 国立精神・神経医療研究センター 東京都 (2016 年 8 月 5-6 日)

〔その他〕

ホームページ等

http://lab.agr.hokudai.ac.jp/cell_tissue_biology/?page_id=92

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名: 西邑 隆徳、辰巳 隆一、尾嶋 孝一

ローマ字氏名: (NISHIMURA, takanori; TATSUMI, ryuichi; OJIMA, koichi)

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。