

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01770

研究課題名(和文) 三次元培養筋を活用した骨格筋の新たな生理的機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a new physiological function of skeletal muscle utilizing a three-dimensional culture muscle

研究代表者

中村 友浩 (NAKAMURA, TOMOHIRO)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：30217872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規のマイオカインを探索するために三次元培養筋に対して急性の電気刺激を印加し、網羅的な遺伝子解析を行った。急性電気刺激は効率的に収縮機能に影響を及ぼし、収縮力の低下を引き起こした。驚いたことに、網羅的な遺伝子解析は、コレシストキニン受容体(CCKR)を介した細胞内シグナリングの活性化を誘発した。また、コレシストキニンは構成的に三次元培養筋で発現増加し、その発現は低酸素状態によって増強されることを明らかにした。本研究の結果は、低酸素が三次元培養筋におけるコレシストキニン発現を活性化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、三次元化筋細胞において食欲抑制ホルモンの1つであるコレシストキニン遺伝子を同定することができ、その発現が低酸素によって制御されていることを明らかにした。先行研究から高地滞在中や急性運動後に観察されている血中コレシストキニン濃度の上昇は一部、低酸素状態に曝された骨格筋由来である可能性が示唆され、食欲抑制に関する骨格筋の新たな役割を提唱することができたことに学術的および社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We employed acute electrical pulse stimulation(EPS), followed by a microarray analysis, to discover novel myokines in 3D engineered muscle. Acute EPS efficiently affects the contractile function, inducing a decline of the contractile force. Surprisingly, microarray analysis revealed an EPS-induced activation of the cholecystokinin receptor (CCKR)-mediated signaling. Furthermore, Cck was constitutively expressed in 3D engineered muscle, and was upregulated by hypoxic conditions. Our results suggested that hypoxia transactivated Cck expression in 3D engineered muscle.

研究分野：スポーツ生化学

キーワード：三次元培養筋 コレシストキニン 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 身体活動に伴う筋収縮によって、骨格筋は運動器として生体の動きを支えるだけでなく、血液からの糖の取り込みを行うなど代謝臓器としても重要な役割を担っている。このような骨格筋の役割に加え、近年では収縮依存的に筋細胞から種々の生理活性物質が分泌され、筋そのものや脂肪細胞など他の臓器の機能に影響を与える分泌器官として重要な働きをしていることが明らかにされている。しかしながら、骨格筋から分泌される新規生理活性物質の探索において、生体筋に近い生体外代謝環境の構築が困難なことから、十分な解析が行われていない。従来の生理活性物質の探索では、血液由来成分を除外できる平面培養筋を使用して実施されてきた。しかしながら、培養期間の短い平面培養による筋の成熟度は低く、筋管までの分化誘導に留まっているため、生体の骨格筋と比較して筋成熟度が大きく異なっている。このため、成熟度の高い培養筋モデルが望まれていた。

(2) 近年、研究代表者は、革新的な組織工学技術を利用して脱細胞化豚大動脈を人工腱とした成熟度の高い三次元培養筋の作製に成功した(T. Nakamura *J. Biosci. Bioeng.* 2017)。開発した三次元培養筋は、人工腱を保持して培養器から取り外すことが可能なため、ソフトアクチュエータや外部装置による張力測定など応用面の汎用性が極めて高い。この三次元培養筋は、長期培養が可能であり、1mN以上の張力を生み出すことにも成功しており、平面培養筋と比較して成熟型ミオシンタンパク質(速筋型 Type A タンパク質)の発現が顕著であり、培養期間と共にその発現量は増大する。このことから本研究における三次元培養筋は、平面培養筋と比較してより生体筋に近い成熟度、代謝特性を有していることが明らかになっている。

(3) 研究代表者は、三次元培養筋に対して高頻度電気刺激印加による一過性の筋収縮を誘導し、5時間後に増加してくる遺伝子群をすでに登録されているマイクロアレイデータと比較した。その結果、ヒト外側広筋における高強度筋力トレーニング応答に関する遺伝子発現変動と類似していたこと、発現が上昇する遺伝子の中で分泌が予想できる遺伝子を解析したところ、既知のマイオカインが多く含まれていることが明らかになった。このことから、三次元培養筋に対する高頻度電気刺激応答は、生体筋における急性運動後の代謝応答と類似し、マイオカインの探索系としても適切であることが示された。しかしながら、今まで三次元培養筋に急性電気刺激を印加することで、細胞外に直接どのような分泌物が放出されているかについて探索を行った報告はない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では成熟した三次元培養筋を利用し、今まで全く知られていないマイオカインを発見し、生体における発現および分泌解析を行うことで骨格筋の新たな機能を明らかにすることを目的として行った。

## 3. 研究の方法

(1) 平成29年度は、三次元培養筋を用いた分泌物探索法を確立することを目的とした。電気刺激による副次的な要因を除外するために、電気刺激に伴う電気分解や電気刺激が、細胞損傷や生存に与える影響を評価し、三次元培養筋を利用した最適化された分泌物探索法を確立することを目的に電気刺激条件や細胞損傷状態を評価した。

(2) 平成30年度以降は、平成29年度に確立された探索法による新規分泌物の同定と三次元培養筋ならびに生体筋における発現、分泌動態の解析を行った。無血清培地に分泌されている微量低分子タンパク質およびペプチドを濃縮し、質量分析法によって新規分泌物を探索し、同定する試みをした。同定された分泌物の発現が、筋細胞において収縮依存的に惹起されているかを確認し、その発現制御について解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 計画当初は、自作の電気刺激装置での実験を検討していたが、電気分解の可能性を排除できないために、その可能性を最小限にするために、カーボン電極使用、交流波で印加可能な電気刺激装置を購入し、アラマーブルー法による細胞損傷評価実験をおこなった。急性の電気刺激条件は、計画当初は、印加電圧を1V/mmの電解条件で検討していたが、培地中の交流波の乱れが生じるために、0.4V/mmの電界強度とした。先行データから、100Hz印加条件では、24時間後の機能的な回復が見られなかったため、三次元培養筋が強縮する最小の周波数である15Hzも含めて評価を行った。その結果、急性の電気刺激は三次元培養筋の細胞生存率に影響を与えないことが明らかとなった(図1)。

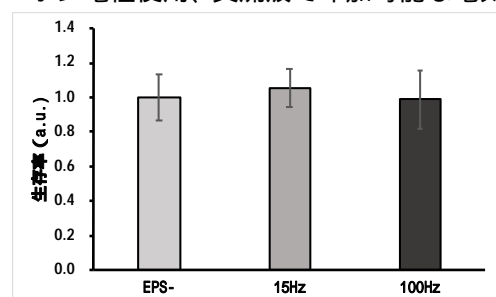


図1. 急性電気刺激が三次元培養筋の生存率に与える影響

(EPS-: 電気刺激なし)

(2) 平成 30 年度以降は、三次元培養筋から分泌される新規分泌物質の探索を行った。培地中に分泌されている化合物の基礎的なデータを得るために、平面培養筋と三次元培養筋の増殖期および分化期における分泌化合物の動態を解析した。その結果、平面培養筋と比較すると、特に低分子領域において多くの化合物ピークが観察されることが明らかとなった(図 2)。そこで、発現の異なる特徴的なピークに対して質量分析法の MS/MS 解析および銀染色によるバンド切り出しによって同定を試みた。しかしながら、三次元培養筋の培養上清に含まれる特徴的なピークの同定には至らなかった。この原因として三次元培養筋の播種細胞数が少ないために濃縮過程を行っても検出する濃度まで到達しないことが考えられた。当初計画では、最適化された電気刺激印加条件で三次元培養筋を収縮させ、その培養上清を解析する予定であったが、電気刺激を実施しない状態でも分泌している化合物の同定が困難であったために、急性電気刺激後の遺伝子発現変動データからマイオカイン候補を検討することとした。

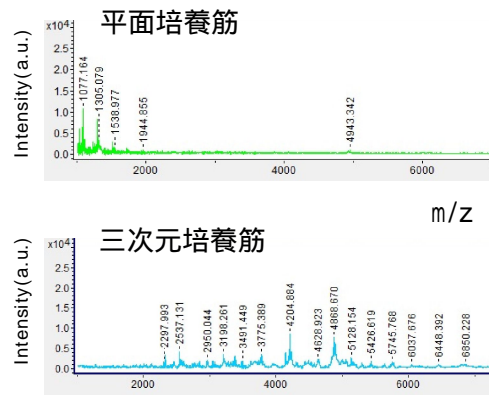


図 2. 培養上清の質量分析

そこで、急性の電気刺激(100Hz)によって発現が上昇してくる遺伝子群に対してバイオインフォマテック解析を行い、活性化する細胞内シグナリングを探索した。その結果、意外にも食欲抑制ホルモンのひとつで小腸や脳で発現することが知られているコレシストキニン受容体シグナルカスケード(CCKR signaling)の活性化が同定された(表 1)。

表 1 . 急性高頻度電気刺激後に上昇する遺伝子群の pathway 解析

Pathways	REF#	F#	Expected	Fold Enrichment	P value	FDR
PI3 kinase	52	18	6.26	2.88	3.29E-04	1.80E-02
EGF receptor signaling	133	33	16.01	2.06	5.60E-04	2.29E-02
PDGF signaling	143	34	17.21	1.98	8.53E-04	2.33E-02
Gonadotropin-releasing hormone receptor	233	55	28.05	1.96	2.12E-05	1.74E-03
<b>CCKR signaling</b>	<b>161</b>	<b>37</b>	<b>19.38</b>	<b>1.91</b>	<b>7.49E-04</b>	<b>2.46E-02</b>
Integrin pathway	189	41	22.75	1.80	1.20E-03	2.81E-02

REF#: number of reference genes in the given category; F#: number of genes found among the upregulated genes after acute electrical stimulation; False Discovery Rate value calculated by Benjamini-Hochberg procedure for multiple test correction. P-value threshold is considered 0.05.

そこで、基礎的なデータを得るために、構成的な遺伝子発現動態を確認したところ、平面培養筋と比較して三次元培養筋では構成的なコレシストキニン遺伝子発現量が上昇し、微量だが培地中に存在していることが明らかとなった(図 3)。先行研究から血液中のコレシストキニン濃度は高地環境や急性の運動後に上昇することが知られている。そのため、低酸素環境が直接、筋細胞のコレシストキニン遺伝子の発現を制御している可能性があるため、低酸素曝露の発現を検討したところ、1%低酸素曝露で遺伝子の発現が上昇すること、低酸素特異的転写因子である Hif-1a の結合配列がコレシストキニン遺伝子プロモータに存在することを明らかにした。

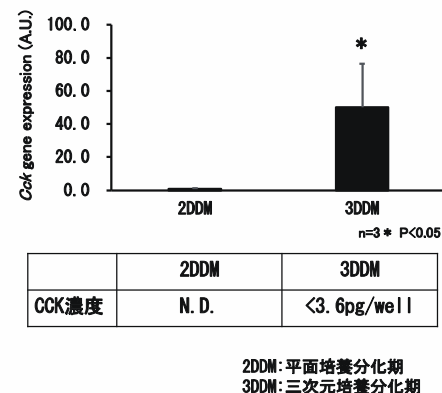


図 3 . 三次元培養筋の Cck 遺伝子の発現と分泌

以上のことから、三次元培養筋を活用としたマイオカインの探索を行うことで、食欲抑制ホルモンのひとつであるコレシストキニンと同定し、その遺伝子発現が低酸素で誘導されることを明らかにした。高地環境や急性の高強度運動後には、食欲抑制が生じることが知られているが、その生体機序のひとつとして筋細胞から分泌されるコレシストキニンが関与する可能性を示唆することができた。今後の展望は、より詳細な発現および分泌状態について解析を行う予定である。

#### < 引用文献 >

T. Nakamura, S. Takagi, T. Kamon, K. Yamasaki, T. Fujisato. Development and evaluation of a removable tissue-engineered muscle with artificial tendons. *J. Biosci. Bioeng.* 123(2):265-271,2017.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Takagi, T. Nakamura, T. Fujisato	4. 巻 21(2)
2. 論文標題 Effect of heat stress on contractility of tissue-engineered artificial skeletal muscle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Artif. Organs	6. 最初と最後の頁 207,214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10047-018-1020-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Ishido, T. Nakamura	4. 巻 39(1)
2. 論文標題 The expression of aquaporin-4 is regulated based on innervation in skeletal muscles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Muscle Res. Cell. Motil.	6. 最初と最後の頁 17,23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10974-018-9494-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Nakamura, S. Takagi, T. Kamon, K. Yamasaki, T. Fujisato	4. 巻 123(2)
2. 論文標題 Development and evaluation of a removable tissue-engineered muscle with artificial tendons.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 265-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2016.08.003. Epub 2016 Sep 9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Ishido, T. Nakamura	4. 巻 38(2)
2. 論文標題 Marked decrease of aquaporin-4 protein is independent of the changes in 1-syntrophin and TRPV4 levels in response to denervation-induced muscle atrophy in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Muscle Res. Cell. Motil.	6. 最初と最後の頁 175-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10974-017-9471-y. Epub 2017 May 9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Takagi, T. Nakamura, T. Fujisato	4. 巻 23
2. 論文標題 Effect of heat stress on contractility of tissue-engineered artificial skeletal muscle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Artif. Organs.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-018-1020-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 T. Nakamura, T. Shibahara, A. Takamori, A. Nunomiya, M. Miyata, R. Nagatomi, T. Fujisato
2. 発表標題 The mass analysis of constitutively secreted compounds in tissue-engineered muscle.
3. 学会等名 Termis2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Nakamura, T. Shibahara, A. Takamori, A. Nunomiya, M. Miyata, R. Nagatomi, T. Fujisato
2. 発表標題 The exploration of constitutively expressed myokines utilizing tissue-engineered skeletal muscle.
3. 学会等名 IBEC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石道峰典、中村友浩
2. 発表標題 過負荷による筋肥大がアクアポリン4の発現特性に及ぼす影響について
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布宮亜樹、高木空、丹藤由希子、池田悠理、中村友浩、藤里俊哉、永富良一
2. 発表標題 三次元培養筋モデルの遺伝子発現解析
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村友浩編著、長森英二監修	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシーリサーチ	5. 総ページ数 4
3. 書名 生体システムの司令塔としての筋肉-マイオカインとは- その探索系課題と展望(第2-5章) . 骨格筋研究を核とした筋スマート社会	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北村 憲司  (KITAMURA Kenji)  (40214811)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・准教授   (15401)	
研究分担者	藤里 俊哉  (FUJISATO Toshiya)  (60270732)	大阪工業大学・工学部・教授   (34406)	
研究分担者	石道 峰典  (ISHIDO Minenori)  (80737536)	大阪工業大学・工学部・講師   (34406)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中村 太郎 (NAKAMURA Taro) (30291082)	大阪市立大学・理学系研究科・教授  (24402)	