

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17801

研究課題名（和文）リボソーム生合成に着目したマッスルメモリーの分子生物学的メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the molecular mechanism of muscle memory focusing on ribosome biosynthesis

研究代表者

中田 智史（Nakada, Satoshi）

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・特任助教

研究者番号：20778881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマッスルメモリーの分子生物学的メカニズムの解明のために、リボソーム生合成能力との関連に着目し研究を行った。まず、マッスルメモリーの分子生物学的メカニズムの検討に適した細胞モデルの構築を行い、脱細胞処理により市販の食肉骨格筋から骨格筋細胞外マトリクスを得て、骨格筋細胞培養系の基質として使用する手法を確立した。これにより、骨格筋の力学的刺激受容機構で重要になる細胞外マトリクスと骨格筋細胞との関連を検討することができるようになった。現在、本モデルを使用して、現在マッスルメモリーの分子生物学的メカニズム解明に応用してデータを解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マッスルメモリーのメカニズムを研究する上で、新たな細胞培養系を構築した。このモデルは骨格筋の力学的刺激受容機構で重要になる細胞外マトリクスと骨格筋細胞との関連を検討することができるため、マッスルメモリーのメカニズム研究だけにとどまらず、多くの骨格筋研究に応用できると考えられる。また、マッスルメモリーを上手く引き出すことができれば、アスリートの競技復帰のサポートや、長期入院後のリハビリテーションなどに繋がれる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to elucidate the molecular biological mechanism of muscle memory, we focused on the relationship between muscle memory and ribosome genesis. First, we constructed a cell model suitable for investigating the molecular biological mechanism of muscle memory and established a method using decellularized skeletal muscle as a substrate for skeletal muscle cell culture system. This has enabled us to study the relationship between the extracellular matrix and skeletal muscle cells, which is important in the mechanoreceptor mechanism of skeletal muscle. We are currently using this model to analyze data applied to the elucidation of the molecular biological mechanism of muscle memory.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 筋肥大 筋萎縮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋量を高く保つことはアスリートの競技能力を高めるだけでなく、生活習慣病の予防や高齢者の生活体力の維持に極めて重要である。そのためにはレジスタンストレーニングを継続することが重要だが、しかし実際には怪我や仕事による多忙などによって定期的なトレーニング習慣を維持するのは難しいのが現状である。

そこで我々はマッスルメモリーと呼ばれる現象に着目した。マッスルメモリーとは骨格筋がレジスタンストレーニングによって高いレベルに筋肥大した場合、その肥大の経験を何らかの形で骨格筋自体が「記憶」し、その「記憶」は脱トレーニングによって筋萎縮が起きても保持されるとする仮説である(右図参照)。長期トレーニング休止の後の再トレーニングの際に筋量の獲得が初めてのトレーニングの際と比べて早くなることはこの「記憶」が関与していると考えられる。

このマッスルメモリーを上手く引き出すことができれば、アスリートの競技復帰のサポートや、長期入院後のリハビリテーションなどに繋げられる可能性がある。しかし、マッスルメモリーの存在を間接的に示唆する研究は古くからあるものの(Staron et al. 1991)、そのメカニズムに関しては多くのことが分かっていない。

本研究ではマッスルメモリーのメカニズムをリボソーム生合成に着目して解明する。これまでの研究から、骨格筋中のリボソーム密度は筋肥大の際に約2倍と大幅に増加する一方で、筋萎縮の際には30%程度の減少に留まっている(Heinemeier et al. 2009)。そのため、筋肥大の後に筋萎縮を行えば、相対的に骨格筋中のリボソーム密度の増加が起きる可能性がある。我々のこれまでの研究から、骨格筋中のリボソーム密度の増加は筋肥大の効率に密接に関わることから(Nakada et al. 2016)、筋肥大と筋萎縮を組み合わせることでリボソーム密度が増加し、それがマッスルメモリーとなり、筋肥大効率を高める可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では前述の考えのもと、骨格筋におけるリボソーム動態の変化に着目してマッスルメモリーのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

課題 : 骨格筋萎縮時に発現する遺伝子の網羅的解析

課題 : 骨格筋細胞培養モデルを用いた検討

これまでの細胞モデル系は細胞外マトリクスが未熟なため、骨格筋のメカニカルストレス受容機構で重要になる細胞外マトリクスと骨格筋細胞との関連を検討することができなかった。マッスルメモリーを細胞モデル系で検討する上で、骨格筋のメカニカルストレス受容機構を検討できる細胞モデルの開発が必要である。そこで、細胞外マトリクスのみを抽出できる脱細胞処理により、市販の食肉骨格筋から骨格筋細胞外マトリクスを得て、骨格筋細胞培養系の器材として使用する手法を確立した。

### 3. 研究の方法

課題 : 骨格筋萎縮時に発現する遺伝子の網羅的解析

(実験動物) C57B/L6系の雄マウスを用いた。マウスは2群にわけ、それぞれ安静群、後肢懸垂群とした。マウスは室温25℃、湿度60%、12時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。飼料、飲水は自由摂取とした。

(後肢懸垂) 後肢懸垂群のマウスはイソフルラン吸入による麻酔下で尾部に吊り下げ用の装置を装着し、後肢懸垂を行った。後肢懸垂により後肢の骨格筋を無負荷状態にし筋萎縮を惹起させることができる。

(筋のサンプリング) 安静群、後肢懸垂群の下腿の骨格筋である腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋を採取し、重量を測定後、凍結し保存した。

(脛骨長の測定) 齧歯類など実験動物では体格による骨格筋量の補正は体重がもっとも多く使われるが、加齢により脂肪量が増加する場合、体重による補正は骨格筋量の過小評価につながる可能性がある。そこで脛骨長を測定し、体格による骨格筋量の補正に用いる。骨格筋のサンプリングの後に膝関節を切断することで脛骨を含む下腿を得た。下腿は2mlチューブへ超純水と共に入れ、85℃で一晩加熱した。加熱が終わった下腿は流水中で徒手により解すことで腱や骨格筋を除去し、脛骨を得た。脛骨はデジタルノギスを用いて長さを測定した。

(RNAの抽出) 液体窒素下で粉末化した骨格筋を元にTRIzolによってTotal RNAの抽出を行った。

(CAGE法) 得られたTotal RNAをCap Analysis of Gene Expression法(CAGE法)を用いて解析し、後肢懸垂によって発現変化が起きている遺伝子をリストアップし解析を行った。

課題 : 骨格筋細胞培養モデルを用いた検討

(脱細胞骨格筋シート作成) 市販の鶏胸肉を-30℃で凍結し、その後、凍結状態で1mm厚に骨格筋の縦断方向に薄切した。得られたスライスにはPBS中で解凍後、1%SDS溶液によって脱細胞処理を行い、細胞成分の除去を行った。これを脱細胞骨格筋シートとした。

(脱細胞骨格筋シートへの細胞の播種と定着性の確認) 脱細胞骨格筋シートが細胞培養基質と

して使用できるか確認するために、脱細胞骨格筋シートへの細胞の定着性の確認を行った。プラスチックフラスコ上で増殖させたマウス筋芽細胞株 C2C12 を脱細胞骨格筋シートへ播種した。播種した細胞の定着性はカルセインによって生細胞を染色し、顕微鏡観察を行った。また、脱細胞骨格筋シート中に残存している細胞外マトリクスであるコラーゲン IV を免疫染色によって染色した。

(脱細胞骨格筋シート上での筋管細胞への分化)

脱細胞骨格筋シートへ筋芽細胞を播種した後、低血清培地へ変更することで、筋管細胞への分化を誘導した。筋管細胞は蛍光標識ファロイジンによって染色し、コラーゲン IV を免疫染色によって染色し、顕微鏡観察を行った。

#### 4. 研究成果

課題 : 骨格筋萎縮時に発現する遺伝子の網羅的解析

(骨格筋量) 後肢懸垂によってマウス下腿の骨格筋重量は通常状態のマウスに比べて有意な減少を示した。また、後肢懸垂マウスは体重の減少も伴うことから、骨格筋重量/体重は実際よりも過大評価される可能性が考えられたことから、脛骨長で骨格筋量の補正を行った。それによって、さらに有意な下腿の骨格筋重量の減少が確認できた。

(Cap Analysis of Gene Expression) 得られたマウス骨格筋から Total RNA を抽出し、CAGE 法によって筋萎縮時に発現変化する遺伝子のリストを得た。現在、この遺伝子リストからマッスルメモリーに関わる遺伝子をピックアップし、検討を行っている。

課題 : 骨格筋細胞培養モデルを用いた検討

(脱細胞骨格筋シート作成) 1%SDS 溶液による脱細胞処理により、シート状の骨格筋結合組織を得ることができた。このシートは高い柔軟性と繰り返しの機械的伸展にも耐えうる物理特性を持っていた。さらに骨格筋の縦断方向に薄切したため、骨格筋結合組織の配向が残存した状態のシートを作成することができた。

(脱細胞骨格筋シートへの細胞の播種と定着性の確認) 脱細胞骨格筋シートへの筋芽細胞株 C2C12 の定着性を確認したところ、シートへの良好な定着性を確認できた。さらにシート中に残存するコラーゲン IV を足場に C2C12 が接着することが確認できた。

(脱細胞骨格筋シート上での筋管細胞への分化) 脱細胞骨格筋シート上に播種した C2C12 を低血清培地によって筋管細胞への分化を誘導したところ、シート上で筋管細胞まで分化することを確認できた。また、筋管細胞は脱細胞骨格筋シート中のコラーゲン IV の配向にそって筋管を形成することが確認できた。さらに、脱細胞骨格筋シート上で筋管細胞を長期間培養し、筋管細胞の安定性を確認したところ、約 3 週間の長期的な安定性が確認できた。これはプラスチックプレート上では分化後 1 週間ほどで筋管細胞の剥離が起きるのに対して、脱細胞骨格筋シートを細胞培養基質として使用することで長期に安定性が保たれていることが分かった。

(まとめ) これらのことから食肉由来の骨格筋より、骨格筋結合組織を培養基質として使用するための手法が開発できた。また、この手法は骨格筋細胞を検討する上で極めて有用な物理的特性や細胞親和性、細胞安定性を持つことから、骨格筋細胞培養に適した培養基質を作ることができた。現在、この脱細胞骨格筋シートを用いてマッスルメモリーの細胞モデル系のサンプリングを行い検討を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakada Satoshi, Yamashita Yuri, Machida Shuichi, Miyagoe-Suzuki Yuko, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 9
2. 論文標題 Perlecan Facilitates Neuronal Nitric Oxide Synthase Delocalization in Denervation-Induced Muscle Atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2524 ~ 2524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Yuri, Nakada Satoshi, Yoshihara Toshinori, Nara Takeshi, Furuya Norihiko, Miida Takashi, Hattori Nobutaka, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 8
2. 論文標題 Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25635-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maekawa Takahiro, Ogasawara Riki, Tsutaki Arata, Lee Kihyuk, Nakada Satoshi, Nakazato Koichi, Ishii Naokata	4. 巻 43
2. 論文標題 Electrically evoked local muscle contractions cause an increase in hippocampal BDNF	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism	6. 最初と最後の頁 491 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2017-0536	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 Madarame Haruhiko, Nakada Satoshi, Ohta Takahisa, Ishii Naokata	4. 巻 38
2. 論文標題 Postexercise blood flow restriction does not enhance muscle hypertrophy induced by multiple-set high-load resistance exercise	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Physiology and Functional Imaging	6. 最初と最後の頁 360 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cpf.12421	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平澤恵理、山下由莉、中田智史
2. 発表標題 骨格筋メカノトランスダクション制御機構における細胞外マトリクスの関与
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田智史、山下由莉、赤澤智宏、馬淵洋、平澤(有川)恵理
2. 発表標題 SJSモデルマウス由来初代筋管細胞培養を用いた疾患神経筋接合部モデル構築
3. 学会等名 第6回日本筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平澤恵理、中田智史
2. 発表標題 高次骨格筋機能・構造評価のためのiPS細胞由来三次元筋組織モデルの開発
3. 学会等名 AMED疾患iPS事業筋疾患拠点・2020年度拠点運営会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下由莉、中田智史、平澤恵理
2. 発表標題 Schwartz-Jampel 症候群の病態解明と調査
3. 学会等名 令和2年度 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患政策研究事業) 「希少難治性筋疾患に関する調査研究班(20FC1036) 班会議」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S Akiba, S Nakada, Y Yamashita, R Sudo, K Mizuno, E Arikawa-Hirasawa
2. 発表標題 Role of extracellular matrix on 3D Myoculture formation
3. 学会等名 第51回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平澤恵理、山下由莉、中田智史
2. 発表標題 細胞外マトリックスの運動刺激シグナル受容と老化への関与
3. 学会等名 第19回 日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神経筋接合部モデル構築と解析の試み
2. 発表標題 中田智史、島孟留、山下由莉、平澤恵理
3. 学会等名 第5回 日本筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下由莉、中田智史、平澤恵理
2. 発表標題 Schwartz-Jampel 症候群の病態分子機構臨床分類の再評価と治療開発に向けた試み
3. 学会等名 令和元年度 希少難治性筋疾患に関する調査研究
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田智史、山下由莉、秋葉星哉、須藤壘、水野一乗、平澤(有川)恵理
2. 発表標題 脱細胞骨格筋を用いた筋細胞3D培養系技術の開発
3. 学会等名 第4回日本筋学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤壘、厚澤雄二、下野知性、服部俊治、水野一乗、中田智史、平澤恵理
2. 発表標題 脱細胞化マウス筋 - 関節系の作製
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平澤恵理、中田智史
2. 発表標題 筋疾患におけるメカノトランスダクションの解明
3. 学会等名 筋ジストロフィー関連疾患分子病態解明と診断法・治療法開発(29-4)西野班班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田智史、平澤恵理
2. 発表標題 In vitro 3D筋線維構築の試み
3. 学会等名 AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「疾患特異的iPS細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム」平成30年度DMDミーティング
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------