

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20500447

研究課題名 (和文) 微小重力環境を利用した筋萎縮メカニズムの検討

研究課題名 (英文) Mechanism of muscle atrophy in microgravity environment

研究代表者

河原 裕美 (KAWAHARA YUMI)

広島大学・病院・研究員

研究者番号：20457279

研究成果の概要 (和文)：

ラット筋芽細胞株を通常環境 (1G 群) または微小重力環境 (CL 群) で 5 日間分化誘導した後、さらに 5 日間、重力環境を変えない群 (1G/1G 群, CL/CL 群) と変える群 (1G/CL 群, CL/1G 群) で培養を継続した。1G/1G 群は筋芽細胞が筋管細胞に分化したが、CL/CL 群では筋分化が抑制された。また、通常環境から微小重力環境に移すと (1G/CL 群) 分化が後退し、逆に微小重力環境から通常環境に戻ると (CL/1G 群) 分化が一気に促進された。

研究成果の概要 (英文)：

L6 rat myoblast cells were induced differentiation in 1G environment (group 1G) or  $10^{-3}$ G environment (group CL). After 5 days induced differentiation, cells were divided into two more groups and cultured for another 5 days. Subject was continued to culture in same environment (group CL/CL, group 1G/1G), the other subject was exchanged culture environment of the cells (group 1G/CL, group CL/1G). Microgravity inhibited myoblast differentiation by morphological observation and molecular biological analysis. The cells in group 1G/CL suppressed differentiation when cells in  $10^{-3}$ G environment, while the cells in group CL/1G began differentiation when cells in 1G environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：微小重力環境, 筋芽細胞, 筋分化抑制, 重力, 筋萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に物理的刺激に対する細胞、生体応答に関する研究が注目され、その機序の解明と物理的刺激を用いた治療の効果検証が行われている。宇宙飛行士にみられる筋萎縮や骨萎縮のような宇宙適応症候群は、地上の 1G 環境から宇宙の  $10^{-3}$ G 環境に適応す

るために起こる生理的变化である。このような宇宙医学の研究から重力が細胞の増殖・分化に大きな影響を与えることが分かってきた。三菱重工業株式会社が共同開発した重力分散型模擬微小重力装置 (3D-クリノスタット) は、宇宙開発の技術を利用し、地上でスペースシャトル内と同じ  $10^{-3}$ G の微小重力環

境を再現できる装置である。申請者の所属研究室でも、これまで重力・磁気・電気・超音波などの物理的刺激に対する細胞応答について、独自の研究手法を開発して研究を行い、物理的刺激によって、細胞の分化や増殖がコントロールできることを報告している。

これまでに研究代表者は、筋の分化促進に関する研究を行い、そのメカニズムとして、細胞接着分子が関与している可能性を見出した。細胞接着斑 (focal contact) は、 $\alpha$ -アクチニン、パキシリン等、物理的刺激センサーとして働いているとも考えられており、重力低下 (微小重力環境) という物理的刺激による筋分化抑制メカニズムにも関係していると推察される。

## 2. 研究の目的

本研究では、重力依存性に筋の分化抑制メカニズムの解明を目標に、重力による物理的刺激センサー分子について検討することにより、重力という観点から、筋萎縮のメカニズムを検証し、長期臥床による筋萎縮への対策に繋げたい。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ラット骨格筋由来の筋芽細胞である L6 細胞株を用いた。通常の 1G 環境で増殖させた後、通常の 1G 環境下 (1G 群) または 3D-クリノスタット (図 1) を使用した微小重力環境下 (clinostat: CL 群) で 5 日間分化誘導した後、その細胞をさらに 5 日間、重力環境を変えない群 (1G/1G 群, CL/CL 群) と入れ替える群 (1G/CL 群, CL/1G 群) で培養を続けた。



図 1 三次元重力分散型模擬微小重力発生装置 (3D-クリノスタット)

直行二軸のまわりに試料を 360°回転させ、重力ベクトルを時間軸で積分することにより  $10^{-3}$  G の環境をつくることができる。

### (2) 形態観察

倒立型位相差顕微鏡 (TE300 Eclipse: Nikon Co., Japan) および多機能顕微鏡 (BZ-9000 BIOREVO: KEYENCE Co., Japan) を用いて、細胞の形態変化を経時的に観察した。

### (3) 分化マーカーの mRNA 発現解析 (RT-PCR)

分化誘導 5 日後 (Day 5) と 10 日後 (Day 10) に Isogen を用いて培養細胞から RNA を抽出した。濃度測定後、SuperScript™ II (Invitrogen Co., USA) を使用して逆転写反応を行った。作成した cDNA を鋳型とし、BD Advantage™ 2 PCR Kits (BD Bioscience Clontech, USA) を使用して PCR を行い、筋分化マーカーおよび筋分化抑制マーカーの mRNA 発現を解析した。

### (4) 分化マーカーのタンパク質発現解析 (Western blot)

2 x サンプリングバッファー (125mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% グリセロール, 2% ドデシル硫酸ナトリウム, 4% 2-メルカプトエタノール, 0.02% プロモフェノール・ブルー) にて培養細胞を回収した。濃度測定後、12.5% ポリアクリルアミド・ゲルにて SDS-PAGE を行った。ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、4°C で一晩ブロッキングした。使用した一次抗体と希釈倍率は、以下の通りである。抗 MyoD 抗体 (1:1,000), 抗 myogenin 抗体 (1:1,000), 抗 myf-6 抗体 (1:1,000) (いずれも Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)。内部標準タンパク質には、 $\beta$ -アクチン抗体 (1:1,000) (Sigma-Aldrich Co.) を、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体 (1:10,000) (Cell Signaling Technology, Inc., USA) を使用した。

### (5) 細胞内シグナル伝達の解析

p38<sup>MAPK</sup> (Thr180/Tyr182) と SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) のリン酸化を Western blot により解析した。解析には、PhosphoPlus® MAP Kinase Antibody Kit (Cell Signaling Technology, Inc., USA) を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 微小重力環境の形態変化への影響

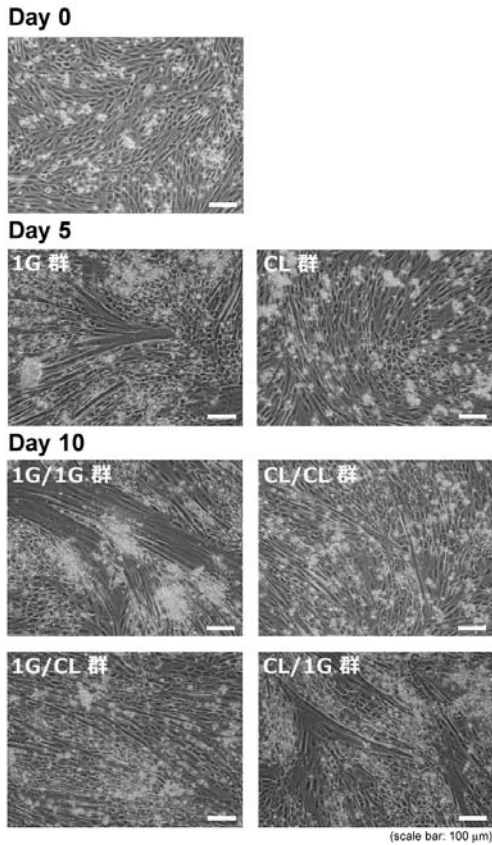


図2 微小重力環境の形態変化への影響  
分化誘導開始前 (Day 0), 分化誘導 5 日後および 10 日後の細胞形態を示す。

分化誘導 5 日後 (Day 5), 1G 群は筋管細胞が観察された (図 2)。CL 群では、筋管細胞が観察できなかった。分化誘導 10 日後 (Day 10), 重力環境を変えなかった 1G/1G 群では、筋管細胞が発達し、太い筋管細胞が観察された。CL/CL 群では、細い筋管がみられた。重力環境を変えた 1G/CL 群では、形成されていた筋管細胞が細くなり、筋分化が後退しているようにみえた。一方、CL/1G 群では、Day 7 より筋管が形成され、Day 10 には太い筋管細胞が観察された。

### (2) 微小重力環境の筋分化マーカー発現への影響

分化誘導 5 日後 (Day 5), CL 群では筋分化抑制マーカーである *msx1* の発現がみられた (図 3)。分化誘導 10 日後 (Day 10), 1G/1G 群は筋分化マーカーの発現がみられ、CL/CL 群では筋分化マーカーの発現が弱かった (図 4)。1G/CL 群では、筋分化マーカーの発現が弱くなり、*msx1* の発現もみられた。CL/1G 群では、Day 5 と比較して筋分化マーカーの発現が強かった。

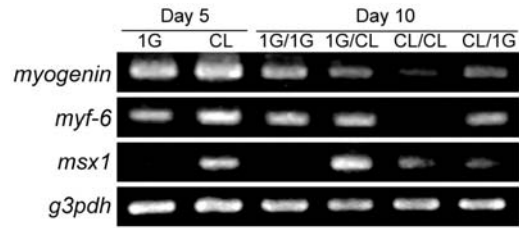


図 3 微小重力環境の筋分化マーカー発現への影響 (mRNA)

筋分化マーカー (*myogenin*, *myf-6*) および筋分化抑制マーカー (*msx1*) の mRNA 発現を示す。

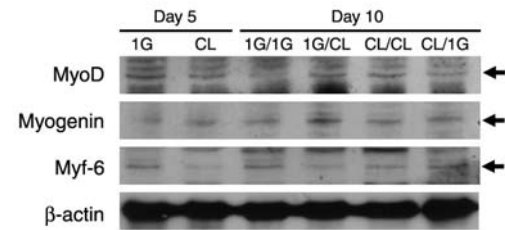


図 4 微小重力環境の筋分化マーカー発現への影響 (Western blot)

筋分化マーカー (*MyoD*, *Myogenin*, *Myf-6*) のタンパク質発現を示す。

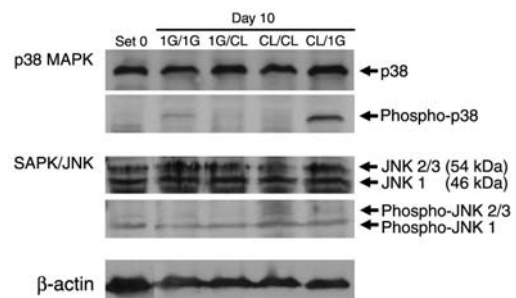


図 5 微小重力環境の細胞内シグナル伝達への影響 (Western blot)

細胞分化とストレス反に関わる  $p38^{\text{MAPK}}$  およびストレス応答に関わる SAPK/JNK のリン酸化活性を示す。

### (3) 微小重力環境の細胞内シグナル伝達への影響

分化誘導 10 日後 (Day 10), 1G/1G 群では細胞分化を促進する  $p38^{\text{MAPK}}$  の活性がみられたが、微小重力環境にあった 1G/CL 群および CL/CL 群では活性がみられなかった (図 5)。一方、CL/1G 群は、 $p38^{\text{MAPK}}$  が強く活性化された。ストレス反応に関連する SAPK/JNK の活性には差がなかった。

### (4) 微小重力環境における遺伝子発現への影響

ヒト間葉系幹細胞とマウス胚性幹細胞を 1G 環境と微小重力環境で 7 日間培養し、Human Gene 1.0 ST Array あるいは Mouse Gene 1.0 ST Array (いずれも Affymetrix 社) 遺伝子発現を比較した。得られたデータは、log 対数による発現量を用いて、1G 群と CL 群の比較を行い、2 倍以上変化があった遺伝子について検討した。その結果、共通して微小重力環境で発現が減少する遺伝子は 37, 増加する遺伝子は 19 あることが分かった (data not shown)。特に、共通して発現が減少する遺伝子の約半数は、アクチンフィラメントや細胞接着分子等の細胞骨格構成に関連する遺伝子であった。

(5) まとめ

本研究では、分化誘導中に筋芽細胞の培養重力環境を変えることにより、筋分化への影響を検討した。

通常の 1G 環境で分化誘導すると (1G 群, 1G/1G 群), 筋芽細胞から筋管細胞に分化し、時間の経過とともに太くなり、筋分化マーカーの発現も確認できた。しかし、微小重力環境では (CL 群, CL/CL 群), Day 10 に細い筋管細胞が観察できる程度であり、分化マーカーの発現も弱く、分化抑制マーカーの発現があることから、筋分化が抑制されたと考えられる。

分化誘導中に重力環境を変えた 1G/CL 群では、Day 10 の筋管細胞は Day 5 と比較して細く、筋分化マーカーの発現が弱く、筋分化抑制マーカーが発現した。一方、CL/1G 群では、Day 10 には Day 5 ほとんどみられなかった筋管細胞が観察できた。細胞分化に関与する細胞内シグナル伝達である p38<sup>MAPK</sup> の活性化が高く、この経路が関与している可能性が考えられる。

重力環境の違いによる筋分化状態の変化は、細胞が細胞自身の置かれた重力環境の変化を感知し、細胞内シグナル伝達に影響を与えたものと考えられ、物理的刺激センサー分子群が筋細胞の増殖・分化に関連することを強く示唆するものである。微小重力により低下した物理的刺激センサー分子群への重力刺激、細胞骨格の発現を、電気刺激や伸長刺激、あるいは薬剤等で 1G 環境と同程度に戻すことができれば、筋萎縮を予防できるか可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Yuge L., Sasaki A., Kawahara Y., Wu SL., Matsumoto M., Manabe T., Kajiume T.,

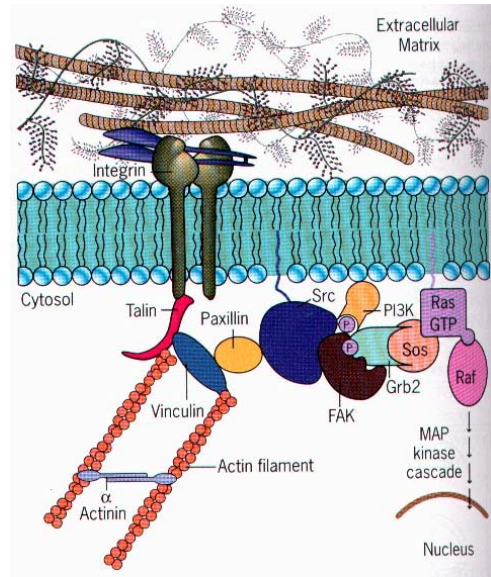


図 6 focal contact の概略図

細胞には、自身がおかれる物理的環境の変化を focal contact で感知し、細胞骨格を介して核内へと伝達する機構が備わっている。

Takeda M., Magaki T., Takahashi T., Kurisu K., Matsumoto M.: Simulated microgravity maintains the undifferentiated state and enhances the neural repair potential of bone marrow stromal cells. *Stem Cells Dev*, 2011 in press. 査読有

2. Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Kajiume T., Matsumoto M., Yuge L.: LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *PLoS ONE* 4: e6343, 2009. 査読有
3. Kawahara Y., Nikawa T., Hirasaka K., Miyashita T., Kataoka K., Yuge L.: Preventive effect of isometric contraction exercise on disuse muscle atrophy using tail suspension mice. *Journal of Physical Therapy Science*, 20: 39-44, 2008. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 森川久美, 松本昌也, 深澤賢宏, 猪村剛史, 孫 亜楠, 河原裕美, 弓削 類: 重力による細胞分化の促進と抑制. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011 年 3 月 2 日.
2. Kawahara Y., Kajiume T., Matsumoto M., Fukazawa T., Imura T., Morikawa K., Matsumoto M., Yuge L.: Simulated microgravity makes mouse embryonic stem cells aggregate to maintain pluripotency in LIF-free culture. BIT's 3<sup>rd</sup> Annual World

- Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells (RMSC) 2010, Everbright Convention & Exhibition Center, Shanghai, China, December 5-7, 2010.
3. Morikawa K., Matsumoto M., Fukazawa T., Imura T., Sun YN., Khalesi E., Kawahara Y., Yuge L.: Gravity affects myoblast differentiation and undifferentiation -Myotub development study-. BIT's 3<sup>rd</sup> Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells (RMSC) 2010, Everbright Convention & Exhibition Center, Shanghai, China, December 5-7, 2010.
  4. Kawahara Y., Kajiume T., Matsumoto M., Imura T., Matsumoto M., Yuge L.: A specific-gravity medium: novel approach for mouse hematopoietic stem cell culture. 8<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research (ISSCR), San Francisco, CA, USA, June 18, 2010.
  5. Imura T., Matsumoto M., Kawahara Y., Yuge L.: Aggregates formation of mouse ES cells using simulated microgravity and neural differentiation. 8<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research (ISSCR), San Francisco, CA, USA, June 17, 2010.
  6. 猪村剛史, 松本昌也, 河原裕美, 弓削 類: 模擬微小重力環境下での細胞塊形成と神経分化能. 第45回日本理学療法学会学術大会, 岐阜, 2010年5月29日.
  7. 河原裕美, 松本昌也, 猪村剛史, 松本昌泰, 弓削 類: 微小重力環境と幹細胞の未分化維持 -マウスES細胞での検討-. 第9回日本再生医療学会総会, 広島, 2010年3月18日.
  8. 猪村剛史, 松本昌也, 河原裕美, 弓削 類: 模擬微小重力環境下での細胞塊形成と神経分化能. 第9回日本再生医療学会総会, 広島, 2010年3月18日.
  9. Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Imura T., Kajiume T., Takeda M., Matsumoto M., Yuge L.: Simulated microgravity: a novel approach to embryonic stem cell culture. American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB 25<sup>th</sup> Annual Meeting NASA), Raleigh, NC, USA, November 7, 2009.
  10. Takeda M., Magaki T., Sasaki A., Manabe T., Matsumoto M., Kawahara Y., Yuge L., Kurisu K.: Transplantation of bone marrow stromal cells cultured under simulated microgravity into a spinal cord injury rat. American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB 25<sup>th</sup> Annual Meeting NASA), Raleigh, NC, USA, November 6, 2009.
  11. Kawahara Y., Manabe T., Matsumoto M., Ogawa K., Kajiume T., Takeda M., Magaki T., Yamashita H., Takahashi T., Aoki S., Sueda Y., Matsumoto M., Yuge L.: Simulated microgravity enables LIF-free culture in mouse embryonic stem cells. 7<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Barcelona, Spain, July 9, 2009.
  12. 真鍋朋誉, 武田正明, 松本昌也, 小川和幸, 河原裕美, 弓削 類: ラットにおける脊髄損傷後の微小重力培養骨髄由来細胞移植. 第44回日本理学療法学会学術大会, 東京, 2009年5月30日.
  13. Kawahara Y., Manabe T., Ogawa K., Matsumoto M., Yamashita H., Takahashi T., Aoki S., Sueda Y., Matsumoto M., Yuge L.: Microgravity environment is a novel control approach for myoblast differentiation. BIT's 1<sup>st</sup> Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2008, Sanshui Garden Hotel (FSGH), Foshan, China, December 2-4, 2008.
  14. Yuge L., Kawahara Y., Yoshimoto R., Sasaki A., Wu S.L., Manabe T., Ogawa K., Matsumoto M., Kajiume T., Takeda M., Magaki T.: Gravity affects to myoblast differentiation. The ESA ISGP ASGSB ELGRA Meeting "Life in Space for Life on Earth"e for Life on Earth" (29<sup>th</sup> Annual ISGP Meeting, 10<sup>th</sup> ESA Life Sciences Symposium, 24<sup>th</sup> Annual ASGSB Meeting, ELGRA Symposium), Anger, France, June 25, 2008.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
河原 裕美 (KAWAHARA YUMI)  
広島大学・病院・研究員  
研究者番号: 20457279
  - (2) 研究分担者  
弓削 類 (YUGE RUI)  
広島大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号: 20263676
  - (3) 連携研究者  
該当なし