

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07244

研究課題名（和文）骨格筋再生における筋芽細胞膜融合の責任因子の探索

研究課題名（英文）Analysis of molecular basis underlying the membrane fusion between myoblasts.

研究代表者

亀高 諭（Kametaka, Satoshi）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：10303950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：損傷した骨格筋が再生する過程において、筋衛星細胞が筋分化し筋芽細胞に変化したのち、筋芽細胞同士の融合を経て多核の筋細胞が形成される。この筋芽細胞融合現象の分子機序を明らかにし、筋再生を補助あるいは促進する薬剤シーズを探索する目的で、新規細胞融合アッセイ系（HiMy法）（Isobe et al., 2022）を用いて、様々な化合物スクリーニングを開始し、メバロノラクトン処理により筋芽細胞融合が促進されることを見出した。さらにコレステロールの生合成量を薬理的に変化させることで筋分化における膜融合が促進することを示し、融合に関わる分子機序においてコレステロールが重要な役割を有することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化を迎える本邦において、高齢者の健康寿命を延伸することは社会の喫緊の課題でもある。特にサルコペニアをはじめとする筋疾患は生活の質を下げる主要な要因であり、骨格筋萎縮に対抗するための医療介入法の策定が急がれる。本研究は骨格筋の維持を支える分子機序の一つである筋衛星細胞からの筋分化を促進することを目的とした研究であり、本研究で得られた成果は筋萎縮の予防や損傷筋からの回復促進につながる点で重要な社会的インパクトを有する。

研究成果の概要（英文）：In the process of regeneration of damaged skeletal muscle, myosatellite cells differentiate into myoblasts, which then fuse with other myoblasts to form multinucleated myocytes. To elucidate the molecular mechanism of this myoblast fusion phenomenon and to search for drug seeds that assist or promote muscle regeneration, we started screening various compounds using a novel cell fusion assay system (HiMy method) (Isobe et al., 2022) and found that myoblast fusion is promoted by mevalonolactone treatment. We found that treatment with mevalonolactone promoted myoblast fusion. Furthermore, we showed that pharmacological alteration of cholesterol biosynthesis promotes membrane fusion in myogenesis, suggesting that cholesterol plays an important role in the molecular mechanisms involved in the myoblast fusion event.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨格筋分化 筋芽細胞融合 細胞融合 膜交通

1. 研究開始当初の背景

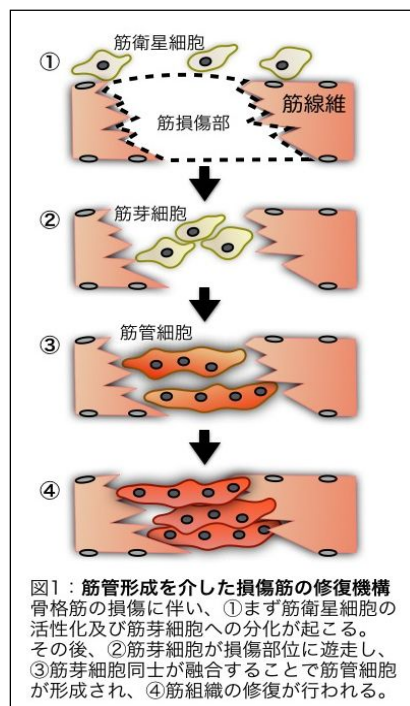
骨格筋は体重の 40 - 60% を占め、物理的な力の源だけではなく、糖貯蔵、内分泌、体温調節など多彩な生理機能を有する組織である。また、一時的に損傷しても、再生することのできる可塑性に富んだ組織でもある。骨格筋量の維持は我々の健康的な質のよい生活を送る上で必須であるため、超高齢化社会を迎えた現代において、物理的な筋損傷からの回復の促進策の策定は、重要な課題といえる。損傷した骨格筋細胞が回復する過程は、個体発生時の骨格筋分化の過程と同様に細胞膜融合現象を伴う。

まず骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞の筋芽細胞への分化(図 1-)、筋芽細胞同士の融合を経て筋管と呼ばれる筋の前駆細胞が形成される(図 1-)。さらに筋管細胞が融合を繰り返すことで損傷を受けた骨格筋が修復される(図 1-)。

現在までにその分子基盤として、カドヘリンなどの分子を介した筋芽細胞同士の係留、アクチン線維を含む微小な突起様構造による細胞膜脂質同士の物理的な近接による細胞膜融合が重要であると提唱されている (Abmayr and Pavlath, 2012)。また、近年その融合起点に集合する膜内在性分子 Myomaker やその機能を調節すると考えられる Myomerger など新たな分子も同定されている (Millay et al., 2012; Quinn et al. 2017) がその分子機序ははまだ不明である。このように、細胞融合に関わる分子機構に関して一定の理解は進んでいるものの、これまでこれらの膜融合現象をモニターする良い検出系がなかったため、その分子装置および制御因子を網羅的に探索することや、そのプロセスを促進する効果的な薬剤の開発は困難であった。

この問題を乗り越えるために、近年我々は、培養筋芽細胞株 C2C12 および強発光型ルシフェラーゼ (NanoLuc, Promega 社) を用いて細胞の膜融合を高感度に検出できるシステム、HiMy (HiBiT-based Myogenic Cell Fusion) 法を開発した。本アッセイ法は、近年プロメガ社によって開発された HiBiT、LgBiT と呼ばれるルシフェラーゼ断片

が高い親和性で会合し活性型発光酵素が再構成する現象を応用したもので、その感度の高さより、これまで顕微鏡下で 48-96 時間を有した筋管形成の検出が筋分化誘導後 3-12 時間で可能になる。加えて 96 ウェルプレートで簡便かつ定量的な測定が可能であり、この新規検出システムを用いることでこれまででは困難だった筋芽細胞の膜融合現象、ひいては骨格筋修復に関わる遺伝子および生理活性因子の迅速かつ網羅的探索が可能になった。



2. 研究の目的

本研究ではこの高感度検出システムを用いて、

- (1) 筋芽細胞融合に関わる新規遺伝子を網羅的に探索しこれらの遺伝子の膜融合における機能解析を行い、
- (2) 膜融合を抑制あるいは促進する化合物を探索する。さらに
- (3) マウス骨格筋損傷モデルを用いた生体内での遺伝子機能解析および、ヒット化合物による損傷からの回復促進効果の検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HiMy アッセイ系を用いた筋芽細胞融合に関わる遺伝子の探索

HiMy アッセイを用いた筋芽細胞融合関連遺伝子の探索を行う。

C2C12 培養筋芽細胞に GFP-LgBiT, mCherry-HiBiT を導入した安定発現株は構築済みである。各々の細胞を共培養し、約 800 遺伝子の siRNA ライブラリ (MISSION[®], Rab siRNA ライブラリ) を導入し 2 日間培養したのち、筋分化を誘導する。誘導 12 時間後に生細胞用発光基質を培養液に添加することで筋芽細胞の融合に応じた NanoLuc 発光を検出し、ノックダウンにより膜融合を阻害あるいは促進する遺伝子を探索する。

で見出された候補遺伝子に関して、遺伝子をクローニングし性状解析を行う。

(2) 細胞融合を阻害あるいは促進する化合物の探索

約 1000 種からなる FDA 承認薬ライブラリを各々添加した培養条件下で、HiMy アッセイにより、(1)と同様に筋芽細胞融合に影響を与える化合物の 1 次スクリーニングを行う。融合に対し促進あるいは阻害効果が得られたものを候補化合物として選択し、これらに関してさらに筋芽細胞の膜融合現象に対する濃度依存的な効果、分化シグナル等に与える影響を検証する。

4. 研究成果

(1) HiMy アッセイ系に用いる GFP-LgBiT、mCherry-HiBiT を導入した C2C12 安定発現株は構築済みであったが、筋分化効率が不安定であったため、さらに筋分化効率の高く安定なクローンの単離を試みた。その結果、両テスタークローンについて筋分化及び細胞融合効率の高いクローンを単離でき、アッセイ系の精度を高めることが可能となった(図 2)。また、これらのアッセイ系を用いて C2C12 筋芽細胞の筋分化に伴う細胞融合アッセイを行った結果、低血清培地(2% horse serum を含む DMEM)に交換したのち、数時間以内に細胞融合がスタートすることが分かった(図 3)。これまで、筋芽細胞の融合現象は数日間の筋分化後の筋管形成の形態の確認が主な手法であり、筋管形成の初期における膜融合現象の定量的解析は本研究が初めて可能にしたものである。

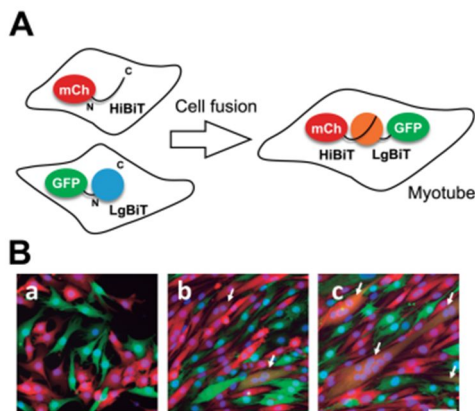


図2 HiMy アッセイシステム

(2) 本系を用いた最初のアプローチとして、様々な酵素阻害剤を用いた、スモールスケールのライブラリアッセイを行った(図 4、Table1)。

その結果、mevalonolactone 存在下で、筋芽細胞融合が約 2 倍に上昇した。本化合物はコレステロールの生合成を増加することが期待されることから、さらに検討を加えた結果、細胞内コレステロール量を低下させることにより筋芽細胞融合が阻害されることから、筋芽細胞同士の細胞膜融合現象か、その前段階に起こる細胞膜表面での融合関連分子(fusogen)の準備にコレステロールが関与していることが示唆された。

また、本研究では acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT-1)の阻害効果を持つ CI-976 もまた、筋芽細胞融合を上昇させる効果があることが見出された。ACAT-1 はコレステロールエステルを増加させる過程でフリーのコレステロール量を低下させることが示唆されることから、上記の結果と同様に、フリーコレステロールの量が筋芽細胞融合に関与していることが強く示唆される。

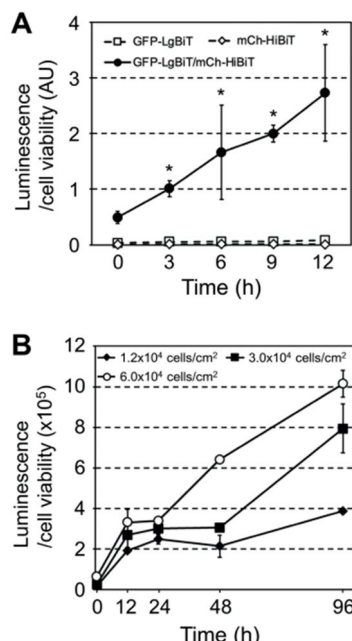


図3 HiMy アッセイのタイムコース

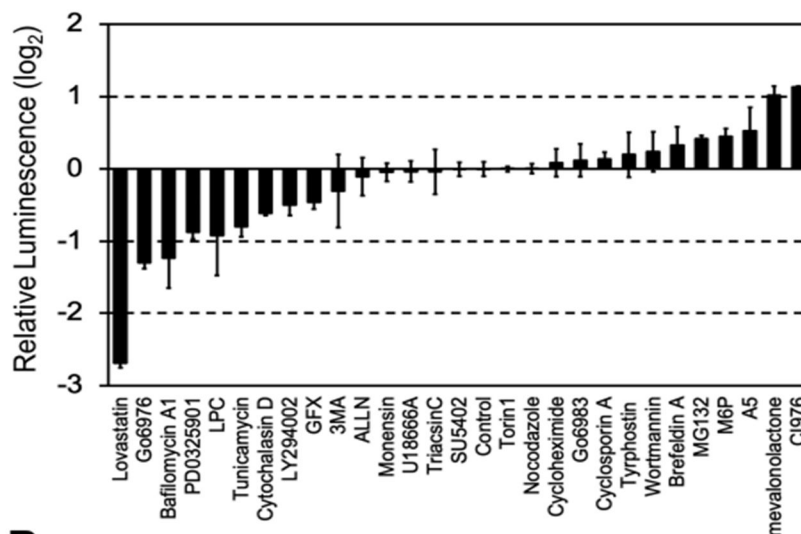


図4 HiMy アッセイ(スモールスケールスクリーニング)

以上の結果にもとづき、現在、既知薬理活性化合物ライブラリ（約 1700 化合物、東京大学創薬機構 DD1）、標準阻害剤キット（約 320 化合物、先端モデル動物支援プラットフォーム AdAMS）遺伝子 1700 の臨床承認薬剤ライブラリおよび、酵素阻害剤ライブラリを用いたスクリーニングを行っている。

Table 1. Reagents used in this study

Reagent	Activity/Effect	Company	Concentration used in this study
3-methyladenine (3MA)	PI3Kinase inhibitor	Sigma-Aldrich	1 mM
A5	Membrane traffic inhibitor	Santa Cruz	10 μ M
N-acetyl-l-leucyl-l-leucyl-l-norleucinal (ALLN)	Proteasome inhibitor	Sigma-Aldrich	10 μ M
Bafilomycin A1	V-type ATPase inhibitor	Santa Cruz	0.8 nM
Brefeldin A	ARF GEF inhibitor	Sigma-Aldrich	100 ng/mL
CI-976	acyl-CoA acyltransferase (ACAT)/ lysophospholipid acyltransferase (LPAT) inhibitor (Field FJ <i>et al.</i> 1991; Chambers K <i>et al.</i> 2005)	Santa Cruz	4 μ M
Cycloheximide	protein translation inhibitor	Wako	5 μ g/mL
Cyclosporin A	cyclophilin inhibitor	Sigma-Aldrich	200 nM
Cytochalasin D	actin polymerization inhibitor	Sigma-Aldrich	200 nM
GF109203X (GFX)	PKC inhibitor, Potent GSK-3 inhibitor	Sigma-Aldrich	2 μ M
G86976	PKC inhibitor (α and β 1)	Cell Signaling Technology	100 nM
G86983	PKC inhibitor	Cell Signaling Technology	100 nM
Lovastatin	HMG CoA reductase inhibitor	R&D Systems, Inc.	4 μ M
Lysophosphatidylcholine (LPC)	Inhibition of membrane fusion (Chemomordik LV <i>et al.</i> 2005)	Avanti Polar Lipids	150 μ M
LY294002	PI3Kinase inhibitor	Sigma-Aldrich	4 μ M
Mannose 6-phosphate (M6P)	Inhibition of ligand binding to M6P receptors	Wako	200 μ M
M β CD	Depletion of cholesterol	Sigma-Aldrich	1 mM
DL-mevalonolactone	promotion of cholesterol synthesis	Cayman Chemical Co.	50 μ M
MG132	proteasome inhibitor	Wako	50 nM
Monensin	Inhibition of ER-Golgi protein transport	Sigma-Aldrich	20 nM
Nocodazole	Inhibition of microtubule polymerization	Sigma-Aldrich	20 nM
PD325901	MEK inhibitor	Sigma-Aldrich	200 nM
SU5402	FGFR1 inhibitor	Sigma-Aldrich	20 μ M
Torin1	mTORC1 and mTORC2 inhibitor	Sigma-Aldrich	50 nM
Triacsin C	Acyl-CoA synthase inhibitor	Sigma-Aldrich	1 μ M
Tunicamycin	Inhibition of N-linked glycosylation	Cayman Chemical Co.	4 ng/mL
Tyrphostin	EGFR inhibitor	Cayman Chemical Co.	2 μ M
U18666A	Inhibition of intracellular cholesterol transport	Selleck co.	60 ng/mL
Wortmannin	PI3Kinase inhibitor	AdipoGen	200 nM

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yogo Katsunori, Misawa Masaki, Shimizu Hidetoshi, Kitagawa Tomoki, Hirayama Ryoichi, Ishiyama Hiromichi, Yasuda Hiroshi, Kametaka Satoshi, Takami Seiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Radiosensitization Effect of Gold Nanoparticles on Plasmid DNA Damage Induced by Therapeutic MV X-rays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 771 ~ 771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano12050771	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 ISOBE Mari, SUZUKI Yumika, SUGIURA Hideshi, SHIBATA Masahiro, OHSAKI Yuki, KAMETAKA Satoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Novel cell-based system to assay cell-cell fusion during myotube formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 107 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.43.107	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 亀高諭
2. 発表標題 Spg12/Reticulon2の小胞体膜局在化機構の解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 迫直輝、亀高諭
2. 発表標題 デキサメタゾン誘発性骨筋萎縮回復モデルの確立とアディポネクチンシグナルの影響の検討
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立匠、杉浦英志、亀高諭
2. 発表標題 筋分化におけるSnx9の機能
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木裕美香、亀高諭
2. 発表標題 M-カドヘリンの細胞膜局在化の分子機構の解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴若祐太、亀高諭
2. 発表標題 遺伝性痙性対麻痺に関わるSpg12/Reticulon2Bの近接依存性ビオチン標識法を用いた 相互作用解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------