

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32672

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21771

研究課題名（和文）骨格筋のミトコンドリア機能を評価する新手法の考案と実装：不均質性・多様性の理解へ

研究課題名（英文）Devising and implementing a new method to assess mitochondrial function in skeletal muscle: toward understanding heterogeneity and diversity.

研究代表者

田村 優樹（Tamura, Yuki）

日本体育大学・体育学部・准教授

研究者番号：20794978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：より効果的な骨格筋萎縮や代謝疾患の治療を実現するためには、骨格筋のミトコンドリアの機能を正しく測定することが必要となる。しかし、従来のミトコンドリアの解析法は、骨格筋のミトコンドリアを均質溶液化することで評価されており、ミトコンドリアの不均質性・多様性は評価できなかった。本研究では、骨格筋のミトコンドリアのATP産生能力をミトコンドリアの空間情報を保持しながら評価する新たな手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、空間情報を保持しながら骨格筋のミトコンドリアの機能を評価できる手法が開発されたことにより、微小であるが重要なミトコンドリアの機能的変化を評価できるようになった。このような技術は、骨格筋に関わる病態の一層の理解や治療法やリハビリテーションの開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to achieve more effective treatment of skeletal muscle atrophy and metabolic diseases, it is necessary to accurately measure the mitochondrial function in skeletal muscle. However, conventional methods for mitochondrial analysis have been based on homogeneous solution of mitochondria in skeletal muscle, and mitochondrial heterogeneity and diversity could not be evaluated. In this study, we developed a new method to evaluate the ATP-producing capacity of skeletal muscle mitochondria while preserving mitochondrial spatial informatics.

研究分野：分子運動生理学

キーワード：ミトコンドリア 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー(ATP)産生を担う細胞小器官であり、細胞内の恒常性維持に重要な役割を担っている。特にヒト生体で最大の組織である骨格筋において、ミトコンドリアの機能が低下すると、廃用性および加齢性の骨格筋萎縮、糖尿病などの代謝疾患、がん性悪液質の病因となることが実験生物医学および疫学から明らかにされてきた。したがって、「ミトコンドリアの機能を改善させること」が、骨格筋ミトコンドリアの機能不全を起因とした上述の疾患予防・治療の基本戦略となる。より効果的な治療戦略を実現するためには、「骨格筋のミトコンドリアの機能を正しく測定・評価すること」が必要不可欠である。

骨格筋を含め、生体組織のミトコンドリアの機能は、組織を破砕しミトコンドリアを単離することで測定されてきた。このような生化学的手法による解析では、定量的な解析が可能である利点がある。ただし、対象とする骨格筋内のミトコンドリアを「均質/同質な集団」であることを前提とした評価手法であることに留意する必要がある。

申請者は最近、ミトコンドリアの健全度を保持したまま高解像度で骨格筋のミトコンドリアを可視化する手法を確立した。その結果、「骨格筋内のミトコンドリアが不均一なネットワークを形成し、多様性を有すること」および「骨格筋の不均一なネットワーク形成は高い可塑性(=適応性)を有すること」を見出した。

上述の通り、骨格筋のミトコンドリア機能を測定する従来手法では、対象とする骨格筋内のミトコンドリアを均一な集団として見なしている。つまり、骨格筋内のミトコンドリアの空間情報(不均一性・多様性)は考慮されていない。つまり、従来の評価手法では、下記の重大な課題が生じる。

課題① 細胞内局在によってミトコンドリアの機能が異っていたとしても、違いを検出することは不可能

課題② 「生物学的に重要であっても、微細な変化」を検出することはできない(もしくは過小評価)。

2. 研究の目的

本研究では、上述の課題を解決するために、空間情報を保持しながら、骨格筋のミトコンドリアの機能を評価する新たな手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

「ミトコンドリア局在型の緑色蛍光タンパク質」および「ミトコンドリア局在型 ATP センサー蛍光タンパク質 (MaLionRed)」を骨格筋細胞もしくは骨格筋組織に導入し、マウス骨格筋のミトコンドリアと ATP 産生を同時に可視化する。続いて、骨格筋に反応試薬を添加し、ミトコンドリアの ATP 産生に共役した最大酸素消費を惹起させる。ATP の産生速度を疑似カラーに変換し、ミトコンドリアのネットワーク画像にマッピングする。このような一連の作業により、空間情報を保持しながら骨格筋の機能評価を達成する。本研究では、上記の研究を遂行するために、下記の検討課題を設定した。

検討課題 1：プラスミドベクターの構築

検討課題 2：骨格筋細胞・骨格筋組織への効率的な遺伝子導入法の検討

検討課題 3：骨格筋の培養細胞を対象とした検討

検討課題 4：マウス骨格筋組織を対象とした検討

4. 研究成果

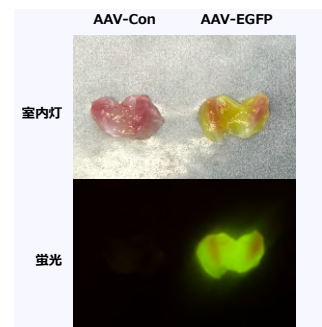
検討課題 1：プラスミドベクターの構築

先行研究では、細胞内の ATP 濃度を感知する赤色蛍光バイオセンサーとして MalionRed が開発された。本研究では、MalionRed の N 末端にミトコンドリアを移行シグナルを付加し、ミトコンドリアの ATP 濃度を選択的に評価できるようにした。続いて、T2A リンカーでミトコンドリア移行シグナルを付加した EGFP を連結させた。このような設計により、ミトコンドリアの ATP 濃度とミトコンドリアの空間情報を同時に得ることができる。本研究では、以降の検討で最終的にアデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子導入を行うこととなったため、導入遺伝子の両端にアデノ随伴ウイルスのパッケージングに必要な ITR を付加した。最終的なプラスミドのデザインは下図の通りとなった。



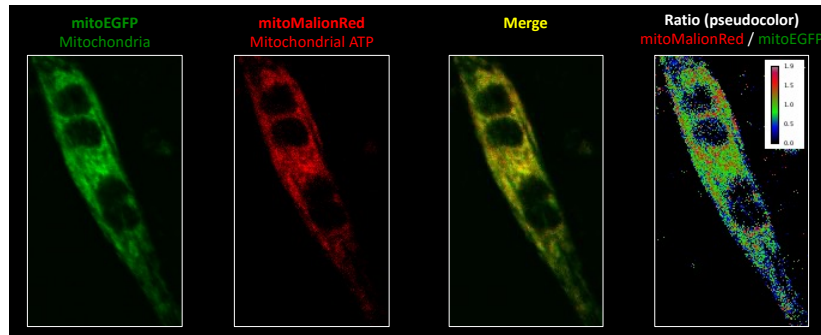
検討課題 2：骨格筋細胞・骨格筋組織への効率的な遺伝子導入法の検討

マウス骨格筋由来培養細胞株 (C2C12 myoblasts/myotubes) およびマウス骨格筋組織は、遺伝子導入が難しい細胞および組織であることが知られている。本研究では、検討課題 1 で作成したバイオセンサーを効率的に発現させるための方法を検討した。本研究では、エレクトロポレーションおよびアデノ随伴ウイルス (血清型 6 および血清型 9) を検討した。本研究では、遺伝子導入効率ならびに遺伝子導入に伴う骨格筋の損傷の程度等を踏まえ、血清型 9 のアデノ随伴ウイルスを遺伝子導入のためのベクターとして用いることが妥当であるとの結論に至った。遺伝子の導入実験の一例を右図に示す。

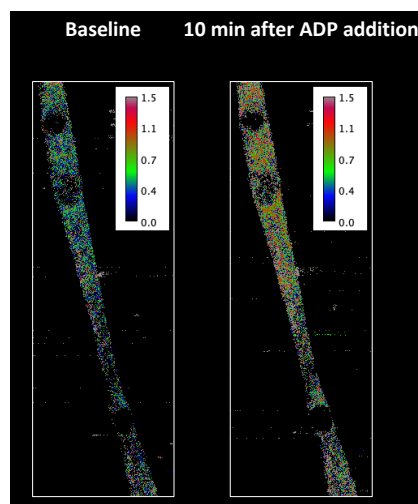


検討課題 3 : 骨格筋の培養細胞を対象とした検討

C2C12 myotubes にアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、ATP 評価用のバイオセンサー遺伝子を導入した。まず、定常状態の ATP 濃度を評価したところ、ミトコンドリアの ATP の濃度分布は、不均質であることが確かめられた (下図)。

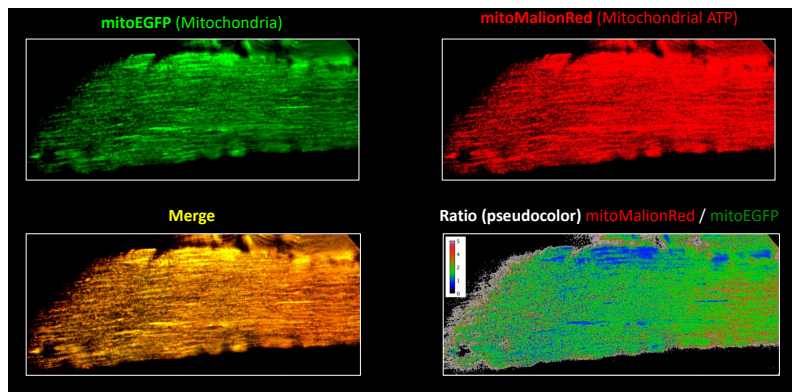


続いて、ミトコンドリアの ATP 産生能力を評価するために、Digitonin で細胞膜の透過処理を行った C2C12 myotubes に、基質としてピルビン酸とリンゴ酸、ADP を加えた。その結果、空間情報を保持しながらミトコンドリアの ATP 産生を評価することが可能であることが示された。(下図)



検討課題 4 : 骨格筋の培養細胞を対象とした検討

培養細胞を対象として機能する実験系が、生体の骨格筋においても利用できるか否かを評価するための検討を行った。マウスの腓腹筋を対象にアデノ随伴ウイルスベクターを用いてバイオセンサー遺伝子を導入し、摘出した腓腹筋を対象に検討を行った。培養細胞と同様に、Digitonin で細胞膜の透過処理を行ったあと、ピルビン酸、リンゴ酸、ADP を加え、ミトコンドリアの ATP 産生を惹起した。その結果、マウスの骨格筋組織においても、空間情報を保持しながら、ミトコンドリアの ATP の産生動態を評価可能であることが示された (下図)。



まとめ

本研究では、当初の目的・計画通り、空間情報を保持しながら、骨格筋のミトコンドリアのATP産生機能を評価できる技術を開発することができた。現在は、この技術をより簡便に利用できるように深層学習を用いた解析アルゴリズムの開発に着手している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Tamura Yuki, Jee Eunbin, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of endurance training on the expression of host proteins involved in SARS CoV 2 cell entry in C57BL/6J mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15014	査読の有無 無
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 Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 319
2. 論文標題 Electrically stimulated contractile activity-induced transcriptomic responses and metabolic remodeling in C₂_{C₁₂} myotubes: twitch vs. tetanic contractions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1029 ~ C1044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00494.2019	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村優樹
2. 発表標題 体力医学における骨格筋のミトコンドリアの解析法の整理・再考
3. 学会等名 第74回 日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------