

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17589

研究課題名（和文）骨格筋伸張性収縮時の筋肥大・損傷セットポイントを規定する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms that define muscle hypertrophy and injury set points during skeletal muscle eccentric contraction.

研究代表者

中田 智史（Nakada, Satoshi）

順天堂大学・大学院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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では筋疾患患者iPS細胞から誘導した筋管細胞を用いて力学的ストレス負荷モデルを構築し、細胞損傷を評価した。伸展刺激24時間後の培養上清中に漏出する筋逸脱酵素の活性は疾患株で修復株に比べて有意に高い値を示した。また、培養上清中に漏出するmiRNAは疾患株で伸展刺激により増加した。伸展刺激24時間後のサルコメア損傷修復遺伝子の発現量は疾患株で修復株に比べて有意に高い値を示した。このことから、疾患株では伸展刺激により筋逸脱酵素とmiRNAの漏出がより起きやすく、サルコメア損傷がより強く発生していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、iPS細胞から分化した筋管細胞を用いた新たな細胞培養系を構築し、機械的伸展刺激装置によるメカニカルストレスを負荷する実験系を構築した。このモデルから得られた知見により、筋細胞が損傷をした際のバイオマーカーとなりうる因子が見つかったことから、細胞培養系だけにとどまらず、アスリートを含めたヒトを対象とする筋損傷発生のリスク予測研究に応用することができると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a mechanical stress loading model was constructed using myotubular cells derived from iPS cells of patients with muscle diseases, and cell damage was evaluated. The activity of muscle deleterious enzymes leaked into the culture supernatant 24 hours after extension stimulation was significantly higher in the diseased strain than in the repaired strain. In addition, miRNAs leaked into the culture supernatant were increased by stretch stimulation in the diseased strain. The expression level of sarcomere damage repair genes after 24 hours of extension stimulation was significantly higher in the disease strain than in the repair strain. This indicates that muscle aberrant enzyme and miRNA leakage are more likely to occur upon stretch stimulation in the diseased strain and that sarcomere damage occurs more intensely in this strain.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 細胞損傷

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、力学的刺激が骨格筋の成長、恒常性の維持に重要であることがわかっている。一方で過剰な力学的刺激は筋損傷を誘発することが知られている。このことから、骨格筋には損傷という応答にスイッチする“力学的刺激のセットポイント”が存在すると想定される。しかし、生体におけるセットポイントを同定し分子機構を解明することは難しい。そこで、申請者は力学的刺激を定性的に負荷し、下流シグナルを解析できる *in vitro* の系を確立する。本研究では、新規細胞培養手法を用いて、筋損傷高リスク者由来の細胞に関して検証し、筋質の差による細胞損傷バイオマーカー変動の差異についても検証する。これらの検証により、筋損傷を予測する新たなバイオマーカーを提示する。

### 2. 研究の目的

#### 骨格筋細胞培養に適した脱細胞組織由来培養基材作成法の決定

本研究を行う上で細胞に親和性の高い培養基材の作成が必須である。これまでに、生体骨格筋に脱細胞処理を行い、伸展性と細胞親和性のある細胞外マトリクスからできたシート状素材を得る方法を開発し、細胞培養に用いて検討している。そこで脱細胞手法のさらなる改善を行い、接着性の低い細胞に対しても使用可能な培養基材の改良により手法を決定する。

#### 筋損傷高リスク者骨格筋における特徴的なバイオマーカー変動の解明

筋損傷高リスク者に特徴的なバイオマーカー変動を細胞モデルで明らかにする。バイオマーカーは筋逸脱酵素、筋逸脱 miRNA、サルコメア修復関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子に関して検討する。

### 3. 研究の方法

#### 骨格筋細胞培養に適した脱細胞組織由来培養基材作成法の決定

脱細胞手法の改良：これまで確立した脱細胞手法に関して更に改良を加え、接着性の弱い細胞でも良好な接着性を得ることができる脱細胞骨格筋シートを作成した。具体的には脱細胞骨格筋シートをヒト組換えラミニン・エンタクチンタンパクによって修飾を行った。細胞接着効率の確認は京都大学 iPS 細胞研究所より分与された健常ヒト iPS 細胞を骨格筋細胞へ分化させ接着性を確認した。

#### 筋損傷高リスク者骨格筋における特徴的なバイオマーカー変動の解明

京都大学 iPS 細胞研究所櫻井英俊博士が樹立している骨格筋細胞に分化が可能な筋疾患患者由来の iPS 細胞の分与を受けた。筋疾患患者由来の iPS 細胞は本研究で確立した実験系により伸展刺激を加え、筋疾患患者筋管細胞で増加するバイオマーカーを見つけ出した。バイオマーカーは筋逸脱酵素、筋逸脱 miRNA、サルコメア修復関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子に関して検討した。

### 4. 研究成果

#### 骨格筋細胞培養に適した脱細胞組織由来培養基材作成法の決定

健常ヒト iPS 細胞を骨格筋細胞へ分化させ接着性を確認したところ、ラミニン・エンタクチンによる修飾は細胞の接着効率を大幅に改善することを確認した(図 1)。

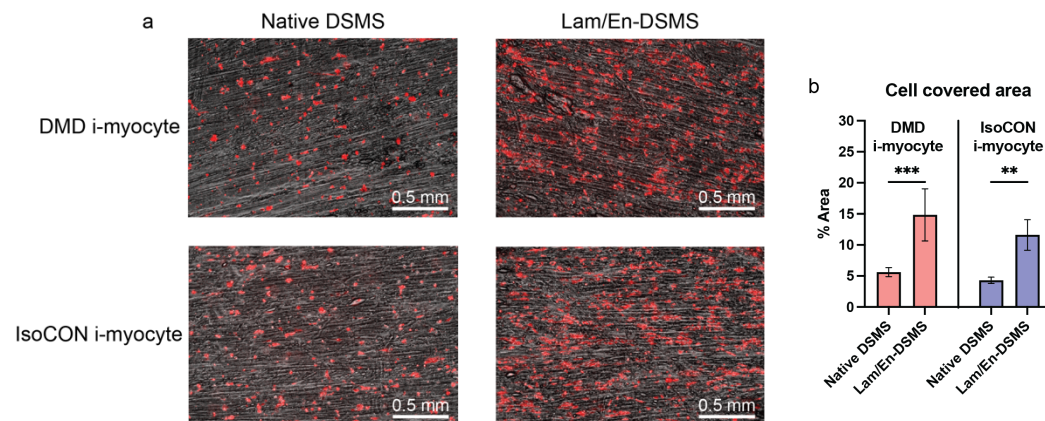


図.1 ラミニン・エンタクチンによる修飾は細胞接着効率を改善した。

#### 筋損傷高リスク者骨格筋における特徴的なバイオマーカー変動の解明

伸展刺激 24 時間後の培養上清中 CK, LDH, AST の活性は筋損傷高リスク者株で健常株に比べて有意に高い値を示した(図 2)。伸展刺激 24 時間後のサルコメア損傷修復遺伝子である XIRP1, FLNC, PGM5 の発現量は筋損傷高リスク者株で健常株に比べて有意に高い値を示した(図 3)。伸展刺激 24 時間後の Apoptotic gene である Caspase 3, Caspase 9 の発現量は、筋損傷高リスク者株で健常株に比べて有意に高い値を示した。このことから、筋損傷高リスク者株では伸展刺激により細胞内酵素の漏出がより起きやすく、サルコメア損傷がより強く発生しており、Apoptosis は亢進することが明らかになった。また、培養上清中に漏出する miR-22, miR-95a, miR-206 は筋損傷高リスク者株で伸展刺激により up-regulate した(図 4)。また、培養上清中の miR-1, miR30a, miR-133a, miR-133b, miR-193b, miR-208b, miR-378a はどちらの株でも伸展刺激によ

り up-regulate したが、筋損傷高リスク者株の方がより up-regulate していた。培養上清中の miR-30c, miR-483 に関してはどちらの株でも伸展刺激により up-regulate したが、株間の違いは見られなかった。これにより、筋損傷高リスク者株では伸展刺激によって miR の漏出がより強く発生していることが明らかになった。

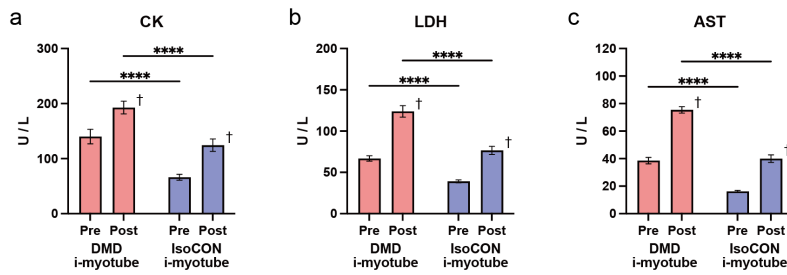


図. 2 培養上清中に漏出する筋逸脱酵素量

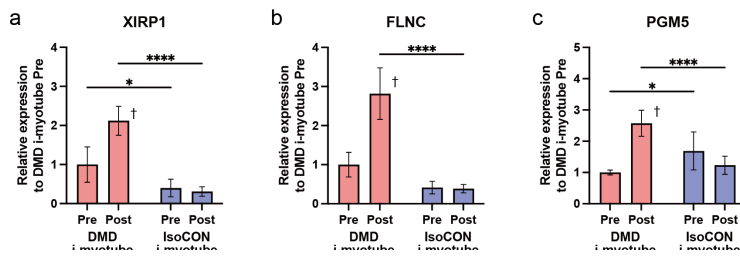
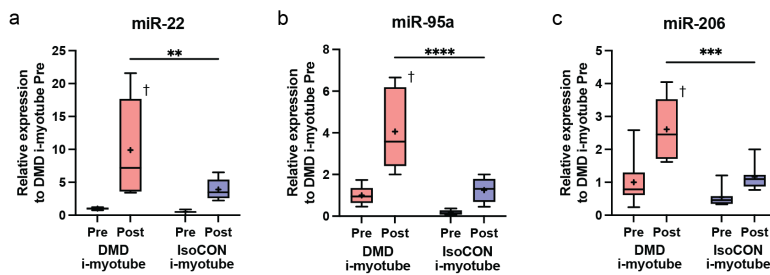


図. 3 伸展刺激後に細胞内で発現するサルコメア修復関連の遺伝子の発現量

Group 1



Group 2

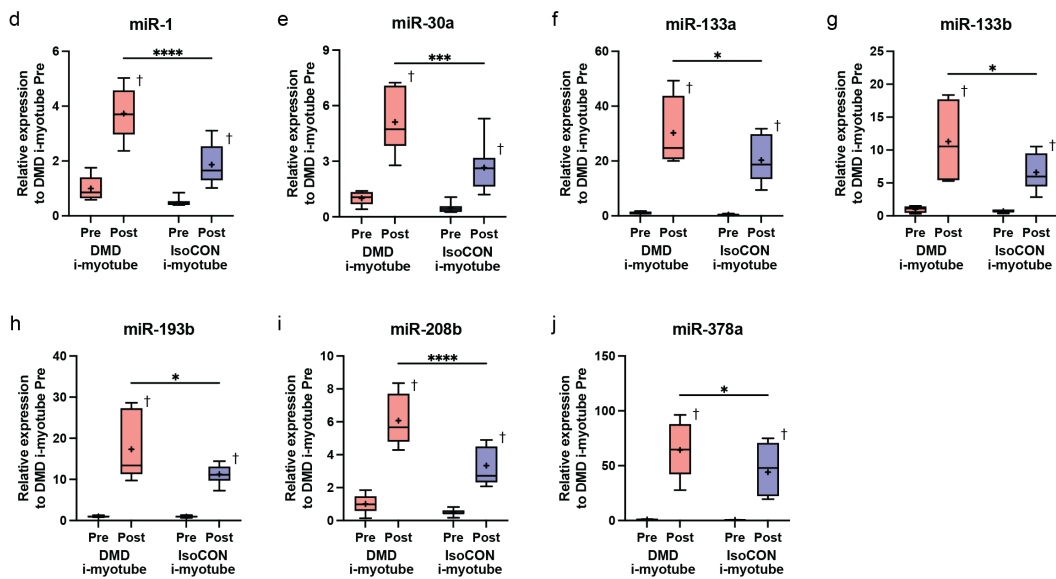


図. 4 培養上清中に漏出する miRNA 量

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 2件）

1. 著者名 Nakada Satoshi, Yamashita Yuri, Akiba Seiya, Shima Takeru, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 9
2. 論文標題 Myocyte Culture with Decellularized Skeletal Muscle Sheet with Observable Interaction with the Extracellular Matrix	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 309 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering9070309	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, Nakamura Kyoko, Sakurai Hidetoshi, Ohno Kinji, Goto Tomohide, Mabuchi Yo, Akazawa Chihiro, Hattori Nobutaka, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Derived from a Patient with Schwartz-Jampel Syndrome Revealed Distinct Hyperexcitability in the Skeletal Muscles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 814 ~ 814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11030814	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 Eri Hirasawa, Satoshi Nakada, Yuri Yamashita, Hidetoshi Sakurai, Nobutaka Hattori.
2. 発表標題 Construct a disease muscle model system using patient-derived human iPS cells.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会. 東京. 2022年5月18-21日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田 智史, 山下 由莉, 平澤 恵理.
2. 発表標題 筋疾患患者iPS由来筋細胞を用いたメカニカルストレス負荷モデルの構築.
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会. 東京. 2022年8月5-6日.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田智史, 山下由莉, 櫻井英俊, 平澤(有川)恵理
2. 発表標題 患者iPS由来筋細胞を用いた伸展刺激モデルによる筋細胞損傷マーカーの検出
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会. 大阪. 2023年8月
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平澤恵理, 山下由莉, 中田智史, 服部信孝, 櫻井英俊
2. 発表標題 筋疾患特異的iPS細胞を使った治療効果検証系の構築
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会. 京都. 2021年5月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田智史, 秋葉星哉, 山下由莉, 櫻井英俊, 平澤恵理
2. 発表標題 骨格筋結合組織を利用した新規培養方法の確立
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会. 東京. 2021年6月
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト筋疾患モデル筋組織	発明者 中田智史、平澤恵理、山下由莉	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-023837	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------