

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19725

研究課題名(和文) インスリン1および2を欠損したマウス培養骨格筋クローン細胞の樹立と機能解析

研究課題名(英文) Establishment and functional analysis of mouse cultured skeletal muscle clone cells lacking insulin 1 and 2

研究代表者

藤井 宣晴 (FUJII, Nobuharu)

東京都立大学・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40509296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、「インスリンは骨格筋細胞でも産生・分泌されている」ことを発見している。そのため、マウスには2つあるインスリン遺伝子を、骨格筋細胞で破壊して機能不全とすることを目的とした。レンチウイルスあるいはアデノ随伴ベクターによって、CRISPER-Cas9法を用いてノックダウンしたが、様々な改良を加えたものの、いずれのベクターの感染効率は低かった。そこで、siRNAによるノックダウンを試みたところ、高効率のゲノム編集が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はこれまでに、骨格筋から分泌されるホルモンの網羅的探索を進めてきた。その過程で、インスリンが骨格筋でも産生・分泌されている証拠を複数得た。骨格筋が、膵臓から分泌されるインスリンの単なる受け手ではなく、自身でもインスリンを産生・分泌しているとなれば、これまでの加齢性筋萎縮成立機序とその予防・治療法の常識は覆される。そこで本研究では、「骨格筋から分泌されるインスリンの変調がサルコペニアを誘起する」という仮説を検証することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Our group has discovered that "insulin is also produced and secreted by skeletal muscle cells." Therefore, the aim of this study is to disrupt the two insulin genes in mice skeletal muscle cells to make them dysfunctional. It was knocked down by lentivirus or adeno-associated virus vector using the CRISPER-Cas9 method, but the infection efficiency of both vectors was low despite various improvements. However, when the genes knockdown by siRNA was attempted, highly efficient genome editing became possible.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：骨格筋 インスリン 筋肥大 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

- (1) 加齢に伴う骨格筋量の減少および筋力の低下はサルコペニアと呼ばれ、高齢者の生活の質を下げるだけでなく、様々な疾病に対する抵抗力を減少させる。日本は世界に先駆け未曾有の超高齢化社会を迎えており、サルコペニアの予防が、医療費の低減・要介護の回避・健康寿命の延伸といった諸問題の解決に必須と考えられている。
- (2) インスリンはタンパク質合成促進作用を持つホルモンで、膵臓の細胞のみで産生されるとされてきた。骨格筋は膵臓から分泌されたインスリンが作用する最も大きな標的臓器であり、加齢に伴うインスリン感受性の低下(インスリン抵抗性の増大)が、筋量および筋力を低下させる原因と考えられてきた。
- (3) 申請者はこれまでに、インスリンが骨格筋でも産生・分泌されている証拠を複数得た。骨格筋が、膵臓から分泌されるインスリンの単なる受け手ではなく、自身でもインスリンを産生・分泌しているとなれば、これまでのサルコペニア成立機序とその予防・治療法は再考をよぎなくされる。

2. 研究の目的

- (1) 「骨格筋から分泌されるインスリンの変調がサルコペニアを誘起する」という仮説を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) CRISPER/Cas9 法を用いたゲノム編集によってインスリンの2つの遺伝子を破壊し、インスリンを産生できない骨格筋細胞を作製した。マウス由来筋細胞株および筋サテライト細胞に、独自に作製する CRISPER/Cas9-レンチウイルス・ベクターを感染させ、インスリンの遺伝子情報を削除した。ベクターの設計は、U6-gRNA-EF1a-Puro02A-Cas9-2A-tGFP とした。インスリン1と2の両者を同時に破壊できる塩基配列(gRNAに相当)は独自に同定したものを使用した。
- (2) 正常な筋細胞と、インスリンを産生できない筋細胞を比較することで、骨格筋のインスリンが筋量およびそれに付随した筋力の決定因子であるかどうかを検討した。測定項目は、細胞増殖能力、細胞融合能力、細胞分化能力、細胞タンパク質合成能力であった。細胞収縮力の解析には、独自に開発した新システムを用いた(特許 2018-145693 2018。動画;https://www.youtube.com/watch?v=f_lh5iaPJbQ&feature=youtu.be)

4. 研究結果

- (1) ポリプレンを利用したレンチウイルスを用いた試み

ゲノム編集のために、Cas9 と gRNA を細胞へ導入する手段として、レンチウイルス・ベクターを用いる場合がある。条件が整えば、レンチウイルス・ベクターの導入効率は高いとされる。本研究では、ポリプレンを共使用する方法を用いた。細胞とウイルスはマイナスに停電しており反発しうる。ポリプレンはウイルスのマイナス電荷を中和する作用があるとされており、両者の反発を軽減して、ウイルスが細胞に感染しやすくする作用に期待した。ウイルスには GFP タンパク質をコードする遺伝子が挿入されており、ウイルス感染が生じれば GFP 蛍光で視覚的に確認できるはずであった。しかし実験の結果、GFP 蛍光は確認されなかった。おそらく、十分量のウイルスが確保できなかったことが原因と考えられた。

- (2) レンチウイルスのトランスダクション方法の検討

高濃度のレンチウイルスを得るために、HEK293FT 細胞にウイルスベクターを導入した。初回のトライアルの約 100 倍にあたる 1.0×10^4 VP/cell のウイルスを、筋芽細胞に対して、1 ウェルあたり添加した。しかし、それでも感染は確認できなかった。付議に、細胞、ウイルス、およびポリプレンを同時に懸濁して遠心することで(Spin infection法)導入効率の向上を計ったが、やはり感染は確認できなかった。ポリプレンを添加時に、ウイルスがない状態でも細胞同士が融合してしまう現象が観察された。非分裂細胞ではウイルスの感染効率が一般的に低い、細胞同士が融合することで、さらに感染効率が低下した可能性が考えられた。

- (3) サテライト細胞を用いた試み

次に、ウイルスを感染させる細胞を、より未分化な状態にあるサテライト細胞に替えて実験を行った。セルソータを用いて、マウス下肢骨格筋組織からサテライト細胞を精製し、レンチウイルスを感染させた。その結果、筋芽細胞を用いた場合よりも強い GFP 蛍光が観察された。しかしそれでも、感染レベルは十分ではなかった。作製したレンチウイルスは結果的に、ベクターサイズが大きすぎたため、もともと他の細胞に比べると導入効率が低いとされている骨格筋細胞では、表現型を解析するのに十分な導入効率を得ることができなかったと推察された。

- (4) アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた感染の試み

レンチウイルスの代替手法として、AAV によるコンストラクトを構築した。AAV を使用した理由として、(1) AAV には複数の血清型が存在し、その違いによって特定の組織や細胞への感染指向性を示すため、骨格筋への感染指向性を示す血清型の AAV を用いることで、100%に近い効率で骨格筋細胞への遺伝子導入が期待できること、(2) ウイルスの扱いが P1 レベルであり、通常

の実験室で動物個体への導入が可能であること、(3) 増殖中の細胞(筋芽細胞)だけでなく、成熟した非分裂細胞(筋管細胞)への導入が可能であること、などが挙げられる。本研究で AAV を用いたゲノム編集の手法を細胞で確立できれば、将来的にマウスに投与するだけで骨格筋特異的に標的遺伝子をノックアウトできるようになるため、生体内でのマイオカインの生理機能を詳細に探索することも期待できる。

AAV ベクタープラスミドは 2 つの Inverted Terminal Repeat (ITR) の間に gRNA と Cas9 遺伝子をもつ AAV ベクタープラスミド (Addgene) にインスリン遺伝子を認識する gRNA をライゲーションすることによって作製した。AAV ベクターを作製させる細胞として、ヒト胎児腎細胞由来の株化細胞である HEK293T 細胞 (Takara) を用いる。HEK293T 細胞を 100 mm dish (住友ベークライト) に 2.0×10^6 cells (48 時間後に 80-95%コンフルエントとなるように) 播種する。培養 48 時間後、Prdx6 ノックアウト AAV ベクタープラスミド、Rep および Cap 遺伝子をもつプラスミド (Rep/Cap プラスミド) (Addgene)、アデノウイルスヘルパー遺伝子をもつプラスミド (ヘルパープラスミド) (Addgene) の 3 種類のプラスミドを 1 : 1 : 1 で混合し、opti-MEM (Gibco) で $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整する。80 μl プラスミド溶液と、120 μl TransIT-VirusGEN Transfection Reagent (Takara)、4 ml opti-MEM を混合し、室温で 15 分インキュベーションする。80-95%コンフルエントの HEK293T 細胞に溶液を 1 ml/dish で滴下し、5% CO₂、37 °C のインキュベーターで 72 時間培養することで、AAV ベクターを産生させた。

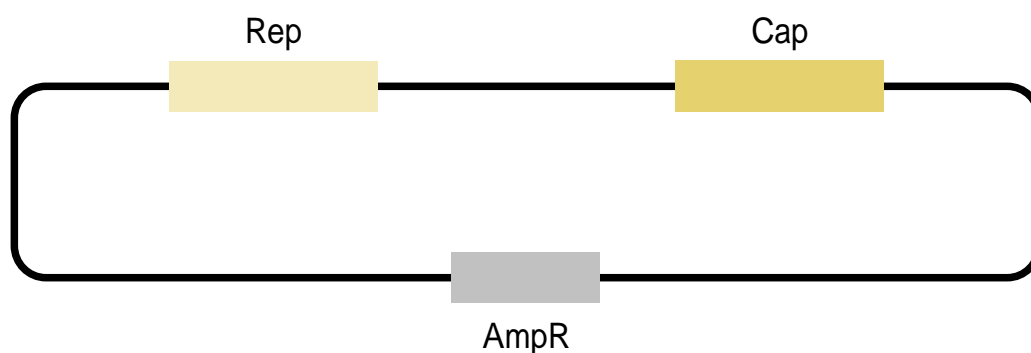


図 1. REP/CAP プラスミド

AmpR : アンピシリン耐性遺伝子

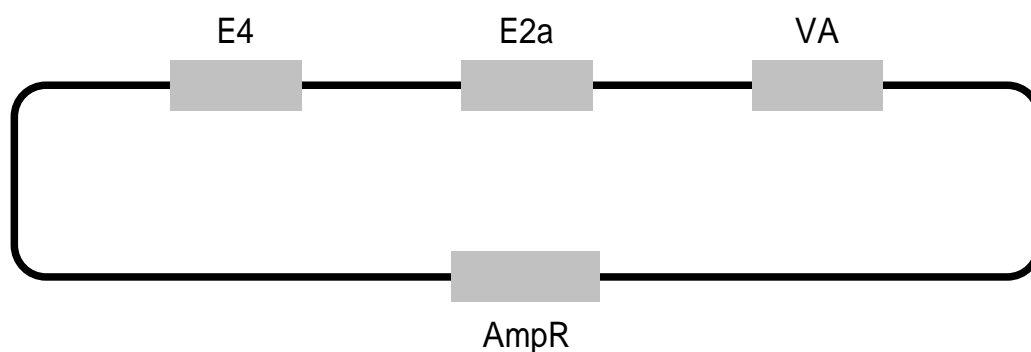


図 7. ヘルパープラスミド

E4、E2a、VA : E2a、E4、VA RNA アデノウイルス遺伝子、AmpR : アンピシリン耐性遺伝子

しかし、AAV を用いても、目的の達成に十分な感染は認められなかった。おそらく CRISPER-Cas9 のコンストラクトが、AAV においても比較的長くなってしまうことが原因のようで、これが原因の場合はそもそもアデノ随伴ベクターの使用自体ができなくなってしまう。そこで、さらなる戦略を変更し、シンプルに siRNA によるノックダウンを試みた。すると、まだ予備実験の段階ではあるが、高効率のゲノム編集 (すなわちインスリンのノックダウン) が観察された。2 年間の研究期間は超過してしまったが、今後は siRNA を手法の基盤としてインスリン遺伝子のノックダウンを進める予定である。

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 Takakura Hisashi, Yamada Tatsuya, Furuichi Yasuro, Hashimoto Takeshi, Iwase Satoshi, Jue Thomas, Masuda Kazumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Muscle immobilization delays abrupt change in myoglobin saturation at onset of muscle contraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 87~96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.11.87	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 Goto-Inoue Naoko, Morisasa Mizuki, Kimura Keisuke, Mori Tsukasa, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L	4. 巻 in press
2. 論文標題 Mass spectrometry imaging reveals local metabolic changes in skeletal muscle due to chronic training	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac037	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 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞鍋康子, 濱口裕貴, 松井翼, 出口真次, 古市泰郎, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋を多角的視点から考える」- 骨格筋培養細胞の収縮力評価法の開発とその応用-
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞鍋康子, 三田佳貴, 古市泰郎, 藤井宣晴
2. 発表標題 マイオカインの最前線
3. 学会等名 日本栄養食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井宣晴
2. 発表標題 マイオカイン研究の歴史と現状
3. 学会等名 日本運動生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古市泰郎, 三田佳貴, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋の「質」を制御するマイオカイン
3. 学会等名 日本体力医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 筋幹細胞の増殖におけるグルコースの意義
3. 学会等名 日本筋学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨格筋 Type I 細胞への分化誘導剤	発明者 藤井宣晴, 眞鍋康子, 古市泰郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 60451	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京都立大学 運動分子生物学研究室
<https://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/>

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
---------	---------