

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658228

研究課題名(和文)単離筋線維の長期培養系を用いた筋線維タイプ調節機序解明への挑戦

研究課題名(英文)A challenge to establish long-term primary culture of isolated muscle fibers

研究代表者

池内 義秀 (Ikeuchi, Yoshihide)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90168112

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)：骨格筋(食肉)の筋線維タイプ制御機構の解明は、食肉生産や医療・スポーツ科学分野への貢献が期待される。本研究では筋線維タイプの詳細な解析を目的として、ラット単離筋線維の長期培養系の確立および特性を調べた。まずラットより単離した筋線維の生存率を7日間90%以上維持できる培養方法の確立に成功した。単離筋線維の培養に伴い、速筋タイプのミオシン重鎖が著しく低下しており、この変化は恐らく筋萎縮様の状態を反映していると推測した。次に筋萎縮マーカー分子atrogen-1のタンパク質レベルを調べた結果、経時的に増加していたことから、本培養系は筋萎縮モデルとして適用できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To attain high quality meat production, elucidation of the regulation system of skeletal muscle fiber type is required. That mechanism will also contribute in medical and sports science. For detailed analysis of muscle fiber type, in the present study, we challenged to establish long term culture system of isolated rat muscle fibers (single fibers) and examined its characteristics. First, we succeeded in establishment of a culture protocol that can maintain more than 90% survival rate of muscle fibers isolated from rat up to 7 days. In the cultured isolated muscle fibers, fast type of myosin heavy chain isoform was significantly reduced over the culture period. We assumed this alteration can be similar to the state of muscle atrophy. Therefore, we measured protein level of atrogen-1, which is the muscle atrophy marker. The level of atrogen-1 was increased over time, suggesting the possibility that the present culture system can be applied as muscle atrophy in vitro model.

研究分野：農学

キーワード：筋線維タイプ 骨格筋 筋線維 ミオシン重鎖 細胞培養 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

世界的な異常気象や世界経済の拡大、成長に起因する世界規模の飼料価格の高騰、また世界経済のグローバル化は、日本の畜産(食肉生産)農家の経営を圧迫している。このため効率的かつ付加価値の高い食肉の生産技術が求められている。その方策のひとつとして考えられるのは、優れた肉質を有する食肉生産技術を開発することである。これを実現するために、我々は骨格筋の質を左右する基本的な特性である筋線維タイプに着目をした。

骨格筋は筋線維と呼ばれる多核細胞が、束になった組織である。ほ乳類の筋線維は、収縮特性および代謝特性の違いから、遅筋タイプ(1型、赤筋)と、速筋タイプ(2B型、白筋)および2種類の間タイプ(2A, 2X型)に分類することができ、主としてミオシン重鎖(MyHC)アイソフォーム(MyHC1, 2A, 2X, 2B)で規定される。筋線維タイプ組成は、体内に分布する骨格筋組織によって異なり、また同じ筋組織でも動物個体間で異なる。

古くから持久運動トレーニングによって、遅筋タイプ筋線維の比率が増加することが多くの研究により示されてきたが、その詳細な作用機構は、依然として明らかでない。近年、持久運動により活性化される転写関連因子(PGC1 α , PGC1 β , PPAR δ など)に筋線維タイプを調節する役割が発見され注目を集めている。また我々は、一部の食品成分によって筋線維タイプ組成が変化しうることも明らかにしている。本研究は、筋線維タイプ組成変化の詳細を、特に培養筋線維(細胞)のレベルで解明を目指す先駆的な試みと言える。

筋線維タイプ組成は、上述のように後天的に変化するが、筋線維のどの部位で、どの程度の速さで変化が生じるか、現在までほとんど分かっていない。筋線維タイプ調節機構の解析には、遺伝子操作が容易かつ、神経系内分泌系の影響を排除できる培養細胞系が必須である。

これまでに筋線維の *in vitro* 培養細胞系としては筋芽細胞株である C2C12 や L6、あるいは動物より単離した衛星細胞を分化誘導して形成させた筋管が用いられてきた。しかし C2C12 を分化させて形成した培養筋管では、成熟骨格筋で発現する MyHC1, 2A, 2X, 2B ではなく、分化期にのみ発現が認められる embryonic MyHC や neonatal MyHC が主要なミオシン重鎖アイソフォームとして発現している(LaFramboise et al. 2003)。すなわち筋管は成熟した筋線維まで分化していない状態と考えられる。骨格筋の機能を解明するには成熟した筋線維を *in vitro* で解析できる手法の確立が求められている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず初めにラットの単離筋線維の長期(1週間以上)培養法の確立を試みた。次に生体で観察される運動トレーニングや不活動による筋線維タイプの変化を、単離筋線維培養系で *in vitro* で再現されるかを検証した。単離した筋線維培養系は、不活動の特性を強く示したため、筋萎縮のモデルとして妥当かどうか、筋萎縮マーカーの変動から評価を行った。

3. 研究の方法

実験1 ラット単離筋線維培養系

既に報告されているマウスの単離筋線維培養プロトコル(Wozniak and Anderson 2005, Ravenscroft et al. 2007)を参考にラット単離筋線維培養法の確立を試みた。ただしマウスのプロトコルも長期培養を前提とした手法ではないため、単離した筋線維が長期培養可能であるかどうかは実施するまで不明であった。Fischer344 系統(5週齢)雄性ラットの短趾屈筋から筋線維を単離・培養し、7日目まで生存率を調べた。

実験2 単離筋線維培養系における種々の条件の工夫

F344 ラットの短趾屈筋より単離した筋線維から培養0, 1, 3, 7日後に total RNA を回収、逆転写後、real time RT-PCR に供して、MyHC アイソフォームの mRNA 発現を測定した。また内部標準遺伝子として HPRT を用いた。また単離筋線維の培養中に以下に述べる条件を付加し、MyHC mRNA 発現を調べた。物理刺激(シェーカーによる振とう) アセチルコリン添加 伸展刺激 組織のまま培養(伸展刺激 or 無刺激) 電気刺激 動物種を変更(マウス)

実験3 単離筋線維培養系における筋萎縮マーカー分子発現

単離した筋線維を培養0, 1, 3, 5日後にタンパク質を回収し、筋萎縮に関わるタンパク質発現の変化を抗 MyHC-fast, atrogen-1, FOXO1 抗体を用いた Western blotting により検討した。

4. 研究成果

実験1

コラゲナーゼを中心にプロトコルの最適化を行った。その結果ラットの短趾屈筋を用いて筋線維を単離・培養すれば、培養7日目でも筋線維の生存率を 90%以上に維持することができた(Fig.1)。問題として、筋衛星細胞と思われる単核の細胞の存在が認められ、培養日数の経過と共にこの細胞が増殖した。培地交換の際に、筋線維を新しい培養ディッシュに移すことで、ディッシュ上から回収した単離筋線維の RNA およびタンパク質サンプルは、ほぼ筋線維に由来すると考えられた。

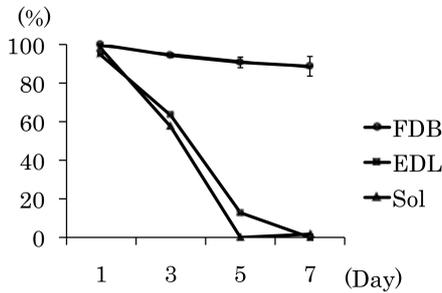


Fig1. ラットより単離した筋線維の生存率

FDB:短趾屈筋、EDL:長趾伸筋、Sol:ヒラメ筋

従来の筋線維モデルである培養筋管と単離筋線維の MyHC の遺伝子発現量を比較した。培養筋管にはラット由来筋芽細胞株 L6 を分化誘導培地で 4 日間培養し、筋管を作成した。その結果、単離筋線維では分化誘導した L6 に比べ、MyHC の発現量が著しく高かった (Fig.2)。すなわち単離筋線維は成熟筋線維の培養モデルとして優れていることが分かった。

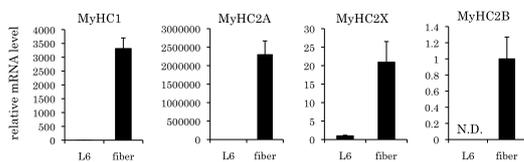


Fig2. L6 筋管と単離筋線維の MyHC 遺伝子発現の違い

実験 2

単離した筋線維では、筋収縮タンパク質の一種である MyHC mRNA の発現量が培養に伴い経時的に減少することを見出した (Fig.3)。この変化は、恐らく筋の不活動による萎縮を反映していると推測している。そこで、筋線維の培養に様々な条件を付加し、萎縮を防げるか検討したが、いずれも MyHC mRNA の低下を防ぐことはできなかった (data not shown)。

実験 3

MyHC のタンパク質レベルは mRNA の結果と同様、単離筋線維の培養期間経過に伴い、経時的に低下し、特に速筋タイプ (MyHC-fast) の減少が顕著であった (Fig. 4)。速筋タイプの優先的な萎縮はベッドレスト等の不活動でも見られる現象であり、不活動による萎縮と近い結果となった。また筋萎縮マーカー分子の atrogen-1 と FOXO1 タンパク質を調べたところ、両因子とも経過に伴い発現量が顕著に増加していた (Fig. 5)。以上より、単離筋線維培養系は生体における筋萎縮に近い状態であることが強く示唆され、本培養系は筋萎縮モデルとして適用できる可能性を見出した。

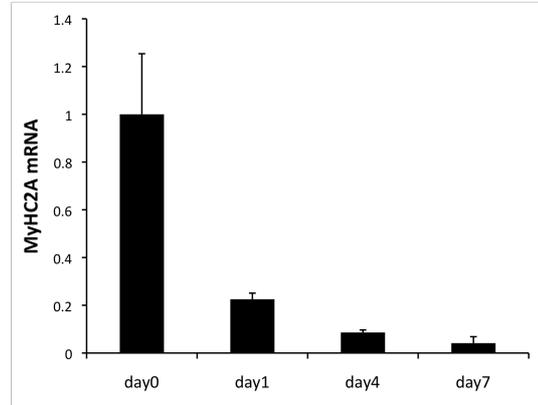


Fig3. 培養日数に伴う MyHC mRNA 発現量の低下 (day0 を 1 とした相対表示)



Fig4. 培養日数に伴う MyHC タンパク質の低下

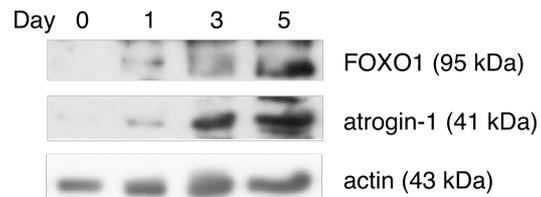


Fig5. 培養日数に伴う筋萎縮マーカータンパク質の増加

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9件)

Data in support for protocol for rat single muscle-fiber isolation and culture, Komiya Y, Anderson J.E., Akahoshi M., Nakamura M., Tatsumi R., Ikeuchi Y. and Mizunoya W. Data in Brief 4:7-10, 2015.

Protocol for rat single muscle-fiber isolation and culture, Komiya Y, Anderson J.E., Akahoshi M., Nakamura M., Tatsumi R., Ikeuchi Y. and Mizunoya W. Anal. Biochem. 482:22-24, 2015.

Cold Exposure Increases Slow-Type Myosin Heavy Chain 1 (MyHC1) Composition of Soleus Muscle in Wistar Rats. Mizunoya W., Iwamoto Y., Sato Y., Tatsumi R. and Ikeuchi Y. Anim. Sci. J. 85:293-304, 2014.

Preliminary time-course study of antiinflammatory macrophage infiltration in crush-injured skeletal muscle. Shono J.I., Sakaguchi S., Suzuki T., Do M.K., Mizunoya W., Nakamura M., Sato Y., Furuse M., Yamada K., Ikeuchi Y. and Tatsumi R. Anim. Sci. J., 84:744-750,2013.

Comparative analysis of semaphorin 3A in soleus and EDL muscle satellite cells in vitro toward understanding its role in modulating myogenin expression. Suzuki T., Do M.K., Sato Y., Ojima K., Hara M., Mizunoya W., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R. Int. J. Biochem. Cell Biol., 45:476-482, 2013.

Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice. Mizunoya W., Ohnuki K., Baba K., Miyahara H., Shimizu N., Tabata K., Kino T., Sato Y., Tatsumi R., Ikeuchi Y. SpringerPlus, 2:165, 2013.

Satellite cells produce neural chemorepellent semaphorin 3A upon muscle injury. Sato Y., Do M.K., Suzuki T., Ohtsubo H., Mizunoya W., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y. and Tatsumi R. Anim. Sci. J. 84:185-189, 2013.

Calcium influx through a possible coupling of cation channels impacts skeletal muscle satellite cell activation in response to mechanical stretch. Hara M., Tabata K., Suzuki T., Do M.K., Mizunoya W., Nakamura M., Nishimura S., Tabata S., Ikeuchi Y., Sunagawa K., Anderson J.E., Allen R.E. and Tatsumi R. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 302:C1741-1750, 2012.

Time-coordinated prevalence of extracellular HGF, FGF2 and TGF-beta3 in crush-injured skeletal muscle. Do M.K., Suzuki T., Gerelt B., Sato Y., Mizunoya W., Nakamura M., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R. Anim. Sci. J., 83:712-717, 2012.

〔学会発表〕(計9件)

APOBEC2 欠損マウスの骨格筋で観察されるオートファジーについて
藤田優平, 佐藤祐介, 大坪秀明, 水野谷航, 辰巳隆一, 池内義秀, 吉澤史昭, 菅原邦生
第118回日本畜産学会, 2014年3月27日、つくば国際会議場、つくば市

筋幹細胞による筋線維型自律制御機構は食品成分によって制御できる
鈴木 貴弘, 水野谷航, 赤星真理子, 尾嶋孝一, 大坪秀明, 中村真子, 池内義秀, 和賀俊明, 辰巳隆一
第118回日本畜産学会, 2014年3月27日、つくば国際会議場、つくば市

脱アミノ化酵素 APOBEC2 の欠損が筋再生に及ぼす影響
大坪秀明, 佐藤祐介, 鈴木貴弘, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀
第118回日本畜産学会, 2014年3月27日、つくば国際会議場、つくば市

Semaphorin 3A secreted from myogenic stem cells promotes slow-twitch muscle fiber generation.

Suzuki T., Ojima K., Do M.K., Hara M., Mizunoya W., Nakamura M., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R.
2013 EMBO Workshop on “Semaphorin Function and Mechanism in Action”, 2013年10月30日 Cemay-la-Ville

脱アミノ化酵素 APOBEC2 の欠損が筋細胞の分化に及ぼす影響
大坪秀明, 佐藤祐介, 鈴木 貴弘, 水野谷航, 中村 真子, 辰巳隆一, 池内義秀
第117回日本畜産学会大会, 2013年9月9日、新潟大学、新潟市

Syndecan-3 may implicate in regulation of neural chemorepellent Sema3A expression in satellite cells.

Do M.-K. Quy, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀
第116回日本畜産学会大会, 2013年3月30日、安田女子大学(広島)

活性化マクロファージは筋芽細胞の遊走性の調節に關与する
坂口昇平, 生野淳一, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀
第116回日本畜産学会大会, 2013年3月30日、安田女子大学(広島)

筋幹細胞による筋線維型の自律制御機構
鈴木貴弘, 尾嶋孝一, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀
第116回日本畜産学会大会, 2013年3月30日、安田女子大学(広島)

APOBEC2 deficiency causes increased autophagy and abnormal mitochondria in skeletal muscle. Sato Y., Ohtsubo H., Kanako T., Mizunoya W., Nakamura M., Tatsumi R., Iida H., Ikeuchi Y., Yoshizawa F., Sugahara K., Neuberger M.S. and Rada C. 2012 FASEB Science Research Conference on “Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells”, Italy, August, 2012

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/muscle_and_meat/

6. 研究組織
(1)研究代表者
池内義秀(九州大学大学院農学研究院)

研究者番号：90168112

(2)研究分担者

辰巳隆一（九州大学大学院農学研究院）

研究者番号：40250493

(3)研究分担者

水野谷航（九州大学大学院農学研究院）

研究者番号：20404056