

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350830

研究課題名(和文) 3次元培養筋を用いた筋収縮依存的に発現する遺伝子群の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene expression induced by muscle contraction in three-dimensional tissue-engineered muscle.

研究代表者

中村 友浩 (Nakamura, Tomohiro)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：30217872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、成熟した3次元培養筋を用いて、電気刺激による筋収縮によって発現誘導される遺伝子群の網羅的解析を行い、筋収縮に伴う新たな分子メカニズムや分泌が期待できる新規生理活性物質を探索することを目的とした。

その結果、筋収縮によって発現誘導される遺伝子群には、分泌タンパク質をコードするものが多く含まれており、その中には摂食調節に関係する遺伝子も含まれていた。以上の事から、骨格筋は、筋収縮に伴う分泌タンパク質の産生を介して、遠隔組織とコミュニケーションを取っている可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate a novel role of muscle contraction by comprehensive gene analysis using three-dimensional tissue-engineered muscle.

Comprehensive gene analysis indicated that many genes encoding secretory proteins upregulated with muscle contraction. Furthermore, a gene associated feeding behavior included within the gene pool. Taken together, It is likely that skeletal muscles actively communicate and regulate remote organs through the production of secretory proteins by muscle contraction.

研究分野：運動生理学

キーワード：3次元培養筋 網羅的解析 マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

筋収縮を引き金として骨格筋では様々な生理生化学的な代謝反応が生じる。しかしながら、筋収縮依存的に骨格筋細胞に直接どのような細胞内シグナリングが生じるかということは十分に解明されているとは言えない。

また、近年では収縮依存的に筋細胞から種々のミオカインが分泌され、筋そのものや脂肪細胞など他の臓器の機能に影響を与えていることが明らかにされている。しかしながら、さらなる未知の新規生理活性物質が分泌されている可能性もあるものの、十分な検証が行われていない。

本研究では研究を遂行するに当たり、平面培養とは異なる新たな三次元培養筋モデルを用いた(藤里ら.設計工学誌 2013)。従来の平面培養モデルでは培養期間が短いために概して筋管までの分化誘導に留まっており、成熟した生体内の筋と大きく異なっている。本研究に用いるモデルでは従来の培養モデルと比較して、5週間までの長期培養が可能である。また、電子顕微鏡による解析から顕著なサルコメア構造を有する成熟した培養筋細胞であることが明らかになっている。また、培養とともに筋特異的な遺伝子およびタンパク質の発現も誘導されることが明らかにされている(中村ら.投稿中)。

また、自作の電気刺激装置を活用することで平面培養では観察できないダイナミックな筋収縮を引き起こすことができ、その等尺性収縮力も測定できる。この等尺性収縮力は培養期間を通じて増大し、三週間目では $\sim 200 \mu\text{N}$ の値を示すことが確認されている。この電気刺激装置を利用することで三次元培養筋モデルに対して長時間にわたって持続的に収縮を促すことが可能である。

以上のことから、本研究では従来の平面培養筋モデルでは不可能であった成熟した培養筋細胞に対してダイナミックで持続的な収縮を引き起こすことが可能であり、従来の平面培養モデルとは異なる網羅的な遺伝子群の発現解析が可能である。

2. 研究の目的

本研究は、平成 25～27 年度にかけ、三次元培養筋を用い、電気刺激により疲労困憊までダイナミックに収縮させることで発現誘導される遺伝子群の網羅的解析を行うことを主な目的とした。

本研究の実施により、筋収縮に伴う新たな分子メカニズムや新規生理活性物質を予測できる知見が得られ、身体活動に伴う骨格筋の新たな役割が明らかになると期待された。

3. 研究の方法

成熟した三次元培養筋モデルを構築し、疲労困憊まで十分に収縮させる電気刺激、培

養条件を検討する。電気刺激によって十分に収縮させた三次元培養筋モデルを用いて、筋特異的に発現してくる細胞内遺伝子群をマイクロアレイ法によって網羅的に解析する。解析された分子経路を *in silico* 解析し、既存経路との検証および生理活性物質等の予測、同定を行う。筋収縮によって大きく変動した分子経路および遺伝子について動物生体筋を利用して発現検証し、運動や筋肥大モデルの運動負荷条件での発現動態を検討する。

4. 研究成果

平成 25、26 年度は、新たに電気刺激装置を購入し、成熟した 3 週目の培養筋に対して持続的に電気刺激を印加し、一定間隔で張力を測定し、その反応が見られなく条件(疲労困憊条件)を探索した。その結果、培地温度の上昇が起こらない条件で、刺激開始後 60 分以内で反応しなくなる電気刺激条件やその張力評価方法を得ることに成功した(図 1)。

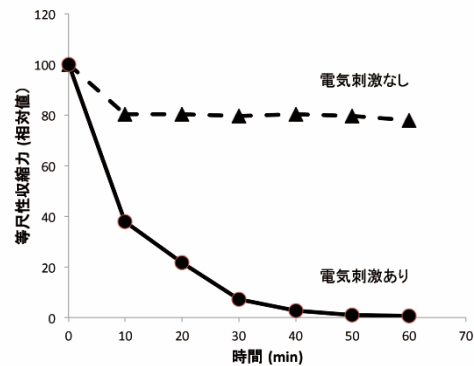


図 1 . 50V 100Hz 印加に伴う張力低下特性

次に、三次元培養筋の張力低下が、疲労ではなく細胞損傷に起因するかどうかを検証するために、60 分後培地中に漏れ出した Lactate dehydrogenase (LDH) 放出量を電気刺激印加していない培養筋と比較した。その結果、統計的に有意な LDH 活性差は見られず、張力低下による細胞損傷はなかった(図 2)。

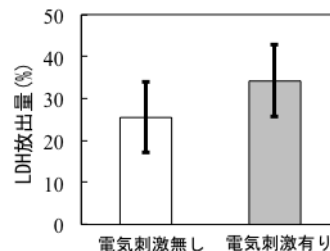


図 2 . 電気刺激印加による細胞損傷評価

平成 27 年度は、培養筋の疲労困憊条件においてマイクロアレイ解析を実施した。

50V 100Hz 60 分間の電気刺激条件下において、LDH 放出量に基づく膜の細胞損傷は起きていないものの、細胞内部の構造崩壊の可能

性も否定できない。また、遺伝子発現のプロファイルも、サンプリングのタイミングで異なってしまう可能性もある。そのため、マイクロアレイ解析のサンプリングをマイルドな条件かつ複数のポイントで行うこととした。具体的には、電気刺激印加時間を 30 分間とし、刺激終了直後並びに 5 時間目のサンプルに対してマイクロアレイ解析を行った。

電気刺激印加直後から 5 時間後に 2 倍以上変動した遺伝子群を、イルミナ社の Nextbio を用いてすでに登録されているマイクロアレイデータと比較したところ、ヒト外側広筋における一過的な高強度筋力運動の遺伝子発現変動と類似していることが明らかとなった(図 3)。

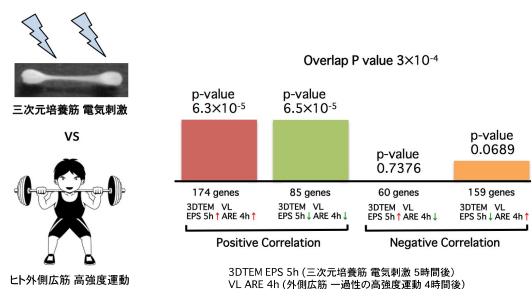


図 3 . 遺伝子発現変動の類似性

次に、電気刺激によって 2 倍以上上昇した遺伝子群についてクラスター解析を行ったところ、その転写産物が膜タンパク質や分泌タンパク質など N 末にシグナル配列を有するクラスターが上位に位置することが明らかとなった(図 4)。

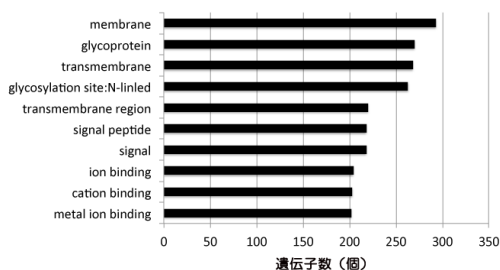


図 4 . 発現上昇遺伝子群のクラスター解析

発現上昇した遺伝子群を詳細に検討したところ、複数の既知マイオカインが含まれることが明らかとなった。そこで、未知のマイオカイン候補が存在するか、探索したところ、腸から分泌されているコレシストキニン(CCK)が、筋細胞で発現し、電気刺激 5 時間後にその発現が上昇することが明らかとなった(図 5)。CCK は、摂食抑制を促すペプチドホルモンとして知られているため、ヒトにおいても高強度筋活動において骨格筋から摂食調節に関わる生理活性物質が分泌されている可能性が明らかとなった。

本研究によって、身体活動によって骨格筋細胞から分泌される生理活性物質が、血液を介して摂食調節に関わる可能性が示唆され

た。

コレシストキニンの遺伝子発現動態

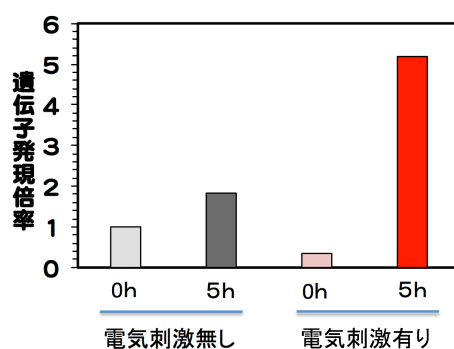


図 5 . 電気刺激による CCK 遺伝子の発現誘導

<引用文献>

培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用 . 藤里俊哉, 中村友浩, 筒井博司 . 設計工学. 48(1): 16-21. 2013 .

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 3 件)

Aquaporin-4 protein is stably maintained in the hypertrophied muscles by functional overload. M. Ishido, T. Nakamura. Acta Histochemica et Cytochemica. 査読有. in press. 2016.

介護予防を支える三次元培養骨格筋研究 中村友浩, 筒井博司, 藤里俊哉. 介護福祉・健康づくり . 日本介護福祉・健康づくり学会 編. 査読無. in press. 2016.

培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用 . 藤里俊哉, 中村友浩, 筒井博司 . 設計工学. 査読有. 48(1):16-21. 2013 .

[学会発表](計 6 件)

中村友浩, 高木空, 松本彰宏, 奥崎大介, 秋本崇之, 藤里俊哉. 3次元培養筋を利用した筋収縮依存的に転写誘導される遺伝子群の網羅的解析 . 第 38 回日本分子生物学会年会 . 2015.

中村友浩, 高木空, 奥崎大介, 秋本崇之, 藤里俊哉. 3次元培養筋を利用した新規マイオカイン遺伝子群の探索 . 第 70 回日本体力医学会大会 . 2015.

T. Nakamura, S. Takagi, T. Akimoto, T. Kamon, T. Fujisato. The development of fatigue model in a tissue-engineered muscle. ECSS. 2015.

中村友浩, 高木空, 掃部貴文, 秋本崇之, 藤里俊哉. 3次元培養筋の構築と生理学的応

用. 第3回 骨格筋生物学研究会. 2015.

.高木空、掃部貴文、秋本崇之、藤里俊哉、中村友浩.三次元培養骨格筋を用いた疲労モデルの検討. 第69回日本体力医学会大会. 2014.

. S .Takagi, S. Hatoma , T. Kamon, I. Nakamura, T.Fujisato. Effect of Electrical Stimulation of Tissue-Engineered Skeletal Muscle. TERMIS Americas Conference 2013.

〔図書〕(計1件)

筋の肥大と萎縮. 勝田茂、征矢英昭編 (7 講担当 中村友浩、和田正信). 運動生理学 20 講 ~ 第3版 ~ (朝倉書店).p51-57. 2015.

〔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.oit.ac.jp/ip/~ken-tai/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 友浩 (Nakamura Tomohiro)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：30217872

(2)研究分担者

藤里 俊哉 (Fujisato Toshia)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：60270732

(3)連携研究者

奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00346131