

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350882

研究課題名(和文)筋萎縮条件下における骨格筋幹細胞の機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism for the maintenance of functionality of reserve cells under nutrition starvation

研究代表者

我妻 玲 (Wagatsuma, Akira)

東京大学・情報理工学(系)研究科・学術支援専門職員

研究者番号：00347121

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)：代表的な筋芽細胞株C2C12は分化誘導すると、筋管細胞へと分化する細胞と分化せずに筋芽細胞のままで留まる“リザーブ細胞”の2つのサブポピュレーションに分かれる。リザーブ細胞は、未分化かつ休眠状態を維持していると考えられており、筋衛星細胞に近い性質を持つと考えられている。この細胞培養系を使って、栄養飢餓ストレス下における骨格筋幹細胞の機能制御機構について検討した。栄養飢餓ストレスは、筋管細胞に不可逆的細胞障害、つまり細胞死を引き起こす。一方、リザーブ細胞はそのような過酷なストレス条件下であっても生存することができ、正常な細胞機能を有していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Upon serum deprivation, C2C12 culture contains two different subpopulation, multinucleated myotubes and undifferentiated reserve cells, like quiescent satellite cells. Using this cell culture system, we investigated the regulatory mechanism for the maintenance of functionality of reserve cells under nutrition starvation. Reserve cells exhibited more marked tolerance to nutrition starvation than myotubes. Reserve cells did not impair their ability to regulate cell proliferation and differentiation, suggesting the maintenance of their cell functionality.

研究分野：運動生化学

キーワード：リザーブ細胞 栄養飢餓 ストレス 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は人体で最大の組織であり、男性で体重の38%、女性で30%を占める。その役割は、運動、エネルギー代謝あるいは糖取込みである。骨格筋は適応力に富んだ組織であり、環境の変化に应答して形態的变化、いわゆる筋肥大や筋萎縮を起こす。筋肥大はレジスタンストレーニングやエクササイズ、筋萎縮は絶食や老化、除神経、腱切除、ギプス固定、長期臥床、宇宙飛行等で見られる。また神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症や遺伝性疾患である進行性筋ジストロフィー発症によっても重篤な筋萎縮が観察される。さらにガン、後天性免疫不全症候群(AIDS)、慢性心不全・腎不全、糖尿病等の疾患が原因となることもある。筋萎縮は筋繊維径と数の減少および筋力低下を主症状とする。通常、タンパク質の合成と分解は平衡状態にあるが、筋萎縮時にはタンパク質の分解が合成を上回る。例えば、筋萎縮誘導6時間後にはタンパク質合成率が35%低下し、24時間後にはタンパク質分解率が49%増加するという報告がある。つまり筋萎縮はタンパク質合成と分解のバランスが破綻した結果生じる。

一方、筋萎縮条件下で骨格筋幹細胞がどのような機能変化を示すかについての研究例は少ない。骨格筋幹細胞である筋衛星細胞は、筋繊維の筋筋質膜と基底膜の間に存在する単核の細胞である。通常、筋衛星細胞は休止状態にあるため“眠れる筋芽細胞”とも呼ばれる。筋衛星細胞は組織修復に中心的な役割を果たす。物理的に骨格筋を損傷させると筋衛星細胞は細胞分裂を開始し、筋前駆細胞群を形成した後、細胞分裂を停止し、互いに融合、あるいは既存の筋繊維と融合することによって筋繊維の修復に貢献する。しかしながら、萎縮筋では筋衛星細胞が動員されることがなく、筋繊維の萎縮を軽減させることもない。むしろ筋衛星細胞数の減少が報告されている。このような筋萎縮条件下で、筋衛星細胞の機能はどのように調節されているのかわからない点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、栄養飢餓ストレス下における骨格筋幹細胞の機能制御機構を明らかにすることを目的とした。代表的な筋芽細胞株C2C12は分化誘導すると、筋管細胞へと分化する細胞と分化せずに筋芽細胞のまま留まる“リザーブ細胞”の2つのサブポピュレーションに分かれる。リザーブ細胞は、未分化かつ休眠状態を維持していると考えられ

ており、筋衛星細胞に近い性質を持つと考えられている。この細胞培養系を使って研究を行った。

3. 研究の方法

細胞培養

C2C12細胞を増殖培地[20%のウシ胎児血清を含む高グルコースダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)]で培養し、70-80%コンフルエントになった時点で、分化培地(2%ウマ血清を含むDMEM)で培養し分化を誘導した。

栄養飢餓ストレス

分化誘導後96時間後に十分な筋管細胞が形成されたことを確認したら、分化培地の代わりに1mM CaCl₂と0.5mM MgCl₂を含むダルベッコリン酸緩衝整理食塩水(DPBS)に交換し、48時間継続した。

リザーブ細胞の採取

PBSで洗浄後、0.05%トリプシン溶液で全細胞(筋管細胞とリザーブ細胞)を剥離し、15mlの遠心管に移した。十分にピペティング(筋管細胞を破壊することと、筋管細胞についた単核細胞を分離させる目的で行う)して、細胞を分散させた。セルストレイナーを用いて細胞懸濁液の分離を行い、ゼラチンコートした組織培養用ディッシュに播種し、30分間インキュベータ内で培養した。浮遊している筋管細胞などをPBSで洗い流し、接着した細胞を実験に用いた。

細胞数のカウント

細胞をパラフォルムアルデヒドで固定した後、0.05%クリスタルバイオレット色素で染色し、洗浄後、メタノールを加え吸光度を測定した。

イムノプロット

全タンパク質と核タンパク質を抽出後、SDS-PAGEサンプルバッファーで溶解し、イムノプロットを行った。タンパク質を直接法で検出し、PVDF膜をスキャンニングし、画像データを得た。画像解析にはImageJを用いて、シグナルを半定量的に解析した。

RT-PCR

全RNAを抽出後、RT-PCRを行った。PCR産物をポリアクリルアミドゲル分離し、エチジウムブロマイドで染色してUV照射しながら写真撮影をして、画像データを得た。画

像解析には ImageJ を用いて、シグナルを半定量的に解析した。

4. 研究成果

In vitro 筋管細胞萎縮モデル

本研究では分化培地をカルシウムとマグネシウムを含む DPBS に交換することで、細胞を栄養飢餓ストレスに曝露させる方法を用いた。このモデルの妥当性を検討するため、同一筋管細胞の径を経時的に測定したところ、1 時間後に 3%、3 時間後には 15%、6 時間後には 28%、12 時間後には 60%、24 時間後には 74%、48 時間後には 80% と著しい萎縮が観察された。これらの結果は、先行研究の実験データと一致しており、モデルとしての妥当性が高いことが示された。

リザーブ細胞の採取方法の検討

先行研究にしたがって短時間にトリプシン処理する方法で、リザーブ細胞の採取を行って見たが、小さい筋管細胞の混入やリザーブ細胞の収量が低いといった問題があった。そこで新たな採取方法を考案した。詳細は実験方法に記載してあるが、この方法により、リザーブ細胞の収量や実験の再現性が向上した。また、採取されたリザーブ細胞が先行研究で報告されているタンパク質の発現パターン (Pax7⁺、MyoD⁻、myogenin⁻、MyHC⁻、Bcl-2⁺) であることを確認した。

栄養飢餓ストレスがリザーブ細胞数に与える影響

栄養飢餓ストレス 48 時間後のリザーブ細胞数を計測したところ、顕著な減少 (-55%) が観察された。

栄養飢餓ストレスがリザーブ細胞の形状に与える影響

分化培地で培養されていたコントロールリザーブ細胞を増殖培地で 24 時間培養した時、細胞はディッシュ表面に伸展接着しており、細胞増殖期にある C2C12 筋芽細胞によく似た形態をしていた。一方、栄養飢餓ストレスに曝露されていたリザーブ細胞は 24 時間増殖培地で培養した後でも、小さく丸い形態をしていることが多く、伸展接着している細胞は非常に少なかった。しかしながら 72 時間後には細胞増殖期にある細胞の形態を呈していた。これらの結果から、栄養飢餓ストレスに曝露されていたリザーブ細胞は、増殖刺激に対する初期の反応性は低いものの、増殖機能は維持されていると推測された。

栄養飢餓ストレスがリザーブ細胞の増殖・分化能力に与える影響

増殖培地で培養 72 時間後までは、栄養飢餓ストレスに曝露されていたリザーブ細胞の増殖スピードは、コントロールリザーブ細胞よりも遅かった。しかしながら、96 時間後にはコントロールリザーブ細胞とほぼ同数にまで増殖した。

次に、リザーブ細胞の分化能力について検討した。リザーブ細胞を播種した後、80% コンフルエントになるまで培養し、低血清培地に切り替え分化誘導を行った。どちらのリザーブ細胞とも 24-48 時間後には、細長く伸長した形態を示した。72 時間後には筋芽細胞は融合を開始し、144 時間後には多数の筋管細胞を観察した。また、筋分化制御因子である MyoD と myogenin、分化マーカーであるミオシン重鎖の発現レベルに差は見られなかった。これらの結果から、栄養飢餓ストレスに曝露されていたリザーブ細胞の分化機能は維持されていると推測された。

栄養飢餓ストレスがリザーブ細胞の mRNA/タンパク質の発現レベルに与える影響

栄養飢餓ストレスに曝露されても生き残ったリザーブ細胞の細胞機能は維持されていることが明らかになった。その機構を推測するため、栄養飢餓ストレスがリザーブ細胞の遺伝子・タンパク質発現に与える影響について検討した。栄養飢餓ストレスは、Pax7、MyoR、Sprouty1、Survivin、Foxo1/3a/4 の mRNA 発現レベルを高めていた。また、Foxo1/3a タンパク質の核内蓄積が促進されていた。Foxo1/3a のリザーブ細胞増殖・分化過程における生理的機能を推測するため、Foxo1/3a の量的変化を解析した。増殖過程では Foxo1 の増加と Foxo3a の減少が観察された。分化過程では Foxo1 の減少と Foxo3a の再増加が観察された。これらの結果から、Foxo3a はリザーブ細胞の未分化性に関与している一方で、Foxo1 は分化を抑制することにより、増殖に寄与していると推測された。

栄養飢餓ストレスは、筋管細胞に不可逆的細胞障害、つまり細胞死を引き起こす。一方、リザーブ細胞はそのような過酷なストレス条件下であっても生存することができ、正常な細胞機能を有していることが明らかになった。mRNA の発現レベルから推測すると、栄養飢餓ストレス条件で生き残ったリザー

ブ細胞は、コントロールリザーブ細胞と比較して、筋衛星細胞により近い性質を有していると考えられた。Foxo はストレス応答に関与していることが示唆されている。Foxo3a の核内蓄積量の増加は、栄養飢餓ストレスに対する適応反応と考えられ、細胞機能の維持に貢献していると考えられた。

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4件)

Wagatsuma A, Shiozuka M, Takayama Y, Hoshino T, Mabuchi K, Matsuda R. Effects of ageing on expression of the muscle-specific E3 ubiquitin ligases and Akt-dependent regulation of Foxo transcription factors in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jan;412(1-2):59-72. doi: 10.1007/s11010-015-2608-7. (査読有)

Takayama Y, Wagatsuma A, Hoshino T, Mabuchi K. Simple micropatterning method for enhancing fusion efficiency and responsiveness to electrical stimulation of C2C12 myotubes. *Biotechnol Prog*. 2015 Jan-Feb;31(1):220-5. doi: 10.1002/btpr.2003. (査読有)

Wagatsuma A, Sakuma K. Vitamin D signaling in myogenesis: potential for treatment of sarcopenia. *Biomed Res Int*. 2014;2014:121254. doi:10.1155/2014/121254. (査読無)

Wagatsuma A, Sakuma K. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:593267. doi: 10.1155/2013/593267. (査読無)

[学会発表](計15件)

我妻玲、山田茂 サルコペニア発症マウスにおける骨格筋特異的ユビキチンリガーゼの発現動態及びその調節機構. 第166回日本体力医学会関東地方会、お茶の水女子大、文京区、東京、3/27、2016.

吉岡基、宮廻裕樹、我妻玲、満洲邦彦、星野隆行. 倒立型電子線描画を用いた細胞膜電気穿孔現象. 第63回応用物理学会春季学術講演会、東工大大岡山キャン

パス、目黒区、東京、3/19-22、2016.

奥谷智裕、我妻玲、米谷玲皇、満洲邦彦、星野隆行. 地形的なパターンによる筋芽細胞 C2C12 の運動への影響. 第63回応用物理学会春季学術講演会、東工大大岡山キャンパス、目黒区、東京、3/19-22、2016.

吉岡基、宮廻裕樹、我妻玲、満洲邦彦、星野隆行. 電子線の界面導電現象で誘起された接着性一細胞への局所的な染色流入現象の観察 (Observing Local Dye Inflow into Single Adherent Cells induced by Electrokinetic Phenomena of Electron Beam). 第53回日本生物物理学会年会、金沢大学角間キャンパス自然科学本館、金沢市、石川、9/13-15、2015.

吉岡基、宮廻裕樹、我妻玲、満洲邦彦、星野隆行. 子線描画を用いた細胞膜穿孔現象の閾値探索. 第62回応用物理学会春季学術講演会、東海大学湘南キャンパス、平塚市、神奈川、3/11-14、2015.

Yoshioka M, Miyazako H, Wagatsuma A, Mabuchi K, Hoshino T. Single-Cell Membrane Surgery by Virtual Electrodes Using an Inverted Electron Beam Lithography System. 2014 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII2014). Korakuen Campus, Chuo University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, 12/13-15, 2014.

宮廻裕樹、我妻玲、満洲邦彦、星野隆行. 電子線励起作用による細胞培養環境の時空間ポテンシャル生成と拡散運動操作 (Electron-Beam induced Spatio-temporal Potential of Electric Field and Mechanical Manipulation of Diffusive Motion in Culture Conditions Using an Inverted-Electron Beam Lithography). 第61回応用物理学会春季学術講演会、青山学院大学相模原キャンパス、相模原市、神奈川、3/17-20、2014.

我妻玲、小竹直樹、山田茂. 塩化コバルト曝露による筋分化制御因子の不安定化機構の解析. 第160回日本体力医学会関東地方会、東京慈恵医科大学国領キャンパス、狛江市、東京、3/8、2014.

Shiozuka M, Nishida A, Takeshima Y, Yagi M, Lee T, Matsuo M, Wagatsuma A, Yoshida M, Date M, Nonomura Y, Matsuda R. Arbekacin suppress nonsense mutations in mouse model and human cells of Duchenne muscular dystrophy. The 53th American Society for Cell Biology, Annual Meeting, New Orleans, USA, 12/14-18, 2013.

我妻玲、小竹直樹、山田茂. 塩化コバルトによる擬似低酸素環境は筋分化を抑制する. 第159回日本体力医学会関東地方会、電気通信大学、調布市、東京、12/7、2013.

Hoshino T, Miyazako H, Wagatsuma A, Mabuchi K. Measurement of Intracellular Strain Energy Distributions by Using Inverted-Electron Beam Lithography. The 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2013), Sapporo-shi, Hokkaido, Japan, 11/5-7, 2013.

我妻玲. 加齢に伴う筋サテライト細胞の動態及びその制御機構. ~サルコペニアに対する運動と栄養の効果~. 第3回日本臨床スポーツ栄養学会. 実践女子大学香雪記念館、日野市、東京、11/2, 2013.

Hoshino T, Wagatsuma A, and Mabuchi K. Direct chemical computer interface for living cell analysis. The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), Freiburg, Germany, 10/27-31, 2013.

Kondo Y, Takayama Y, Hoshino T, Wagatsuma A, Fukayama O, Mabuchi K. Culture device for analysis of activity in developing neuronal circuit and control morphology by electrical stimulation (神経回路網の発達過程における活動特性解析と電気刺激による形態制御手法の開発). ライフエンジニアリング部門シンポジウム、慶應義塾大学日吉キャンパス、横浜市、神奈川、9/12-14, 2013.

Takayama Y, Wagatsuma A, Hoshino T, Mabuchi K. Micropatterning C2C12 myotubes for orderly recording of

intracellular calcium transients. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka-shi, Osaka, Japan, 7/3-7, 2013.

〔図書〕(計1件)

Ono Y, Miyazaki M, Yamaguchi A, Sakuma K, Morita I, Aoi W, Ogata T, Kawano F, Suwa M, Wagatsuma A, Aizawa K. Wagatsuma A. Basic Biology and Current Understanding of Skeletal Muscle. (Sakuma K. ed.) Pages: 329. Chapter 9. A Role for Mitochondria as a Potential Regulator of Myogenesis., NOVA Science Publishers Inc., NY, 2013, pp. 251-288.

6. 研究組織

(1)研究代表者

我妻 玲 (WAGATSUMA AKIRA)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・学術支援専門職員

研究者番号：00347121