

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660251

研究課題名(和文)筋線維タイプ変換と筋衛星細胞の関係性解明—後天的筋衛星細胞欠損マウスの利用—

研究課題名(英文)The relationship between skeletal muscle fiber type and muscle satellite cells

研究代表者

水野谷 航(MIZUNOYA, WATARU)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20404056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋(食肉)の筋線維タイプ組成は食肉の栄養特性や物性(硬さ)に大きな影響を与えることが知られている。我々は、筋線維タイプ組成の変換に、筋組織に存在する幹細胞の一種である筋衛星細胞が寄与するかどうかを明らかにする目的で研究を行った。本研究結果として、まず薬剤処理で後天的に筋衛星細胞を死滅できる遺伝子組換えマウスの導入を完了した。また、筋損傷からの回復後に、筋線維タイプ組成が変化することを見出した。この結果は、筋衛星細胞が再生後の筋線維タイプ組成に影響を与えることを示している。

研究成果の概要(英文)：Composition of skeletal muscle fiber types affects meat quality such as nutritional and physicochemical properties. Here, we tested whether muscle satellite cells could affect muscle fiber type composition. We completed the introduction of the transgenic mouse strain which enables muscle satellite cells ablation induced by Tamoxifen injection. We also found the muscle fiber type composition was altered by muscle injury and regeneration, suggesting muscle satellite cells could affect the muscle fiber type composition after regeneration.

研究分野：筋細胞生物学・食肉科学

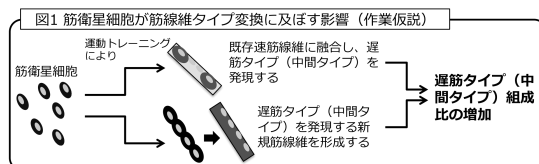
キーワード：骨格筋 筋線維タイプ 筋衛星細胞 Cre/loxPシステム 運動トレーニング タモキシフェン マウス

1. 研究開始当初の背景

骨格筋を構成する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(2型、白筋)に分けることができる。遅筋タイプは赤色が強く、酸化的代謝能力に優れる。遅筋タイプが多い食肉では、タウリン、カルニチン、鉄分が多いことが知られている。さらに近年の食味官能試験の結果では、遅筋タイプが多い食肉の方が、軟らかさや多汁性の評価が高いとされることから、筋線維タイプは肉質を左右する重要な特性と考えられる。筋線維タイプ組成比は後天的に変化することが知られ、持久運動トレーニングを行うと速筋タイプ比率が減少し、遅筋タイプあるいは中間タイプ比率が増加することが知られている。

筋衛星細胞は、筋線維の周囲に存在する未分化な幹細胞で、運動刺激や筋損傷で活性化後、筋線維へと分化し、筋肥大や筋再生の中心的役割を担うと考えられている。筋衛星細胞が筋線維に分化・融合した後、その後の筋線維タイプ組成にどの程度影響するか一切知られていないが、我々のこれまでの研究で、筋衛星細胞の培養過程で、特定の成長因子刺激をかけると、遅筋タイプにも速筋タイプにも分化誘導できることが示されている。

以上の事実を踏まえ、我々は運動時に筋衛星細胞が活性化し、既存の筋線維に融合するか、もしくは新規に筋線維を形成して、筋組織全体の筋線維タイプ組成の再構成に大きく寄与していると着想した(図1)。



従来の技術では筋線維タイプの変換に筋衛星細胞が寄与したのかどうか区別することは困難であったが、近年、組織や時期特異的にマウス生体の遺伝子発現をコントロールする技術である Cre-loxP システムおよび変異エストロゲン受容体融合タンパク質(CreERT2)システムを利用して、成体で、任意のタイミングで、筋衛星細胞を選択的に死滅させる技術が報告された(Relaix & Zammit, Development 2012)。この技術によって、筋線維タイプ組成に及ぼす筋衛星細胞の役割を検証する事が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では遺伝子工学的手法から、後天的に筋衛星細胞を欠失できるマウスを作出し、運動トレーニング時の筋線維タイプ変換における筋衛星細胞の役割を示すことを最終目的として研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1)筋衛星細胞欠失マウスの作出

筋衛星細胞を薬剤処理で後天的に欠失できる遺伝子組換えマウスは、新規で作出する必要はなく、既存の系統を交配させることで得ることができる。その系統とは、B6;129-Gt(ROSA)26Sortm1(DTA)Mrc/J 系統、および B6;129-Pax7tm2.1(cre/ERT2)Fan/J 系統である。この2系統を交配することにより Pax7-CreERT2,R26R-DTA マウスを作出した。この Pax7-CreERT2,R26R-DTA マウスは筋衛星細胞マーカーの Pax7 プロモーター下に Cre と ERT2 の融合タンパク質を発現するように設計されているが、通常時は Cre は DNA に作用しない。しかし ERT2 アゴニストであるタモキシフェンの投与により部位時期特異的に筋衛星細胞でジフテリア毒 A フラグメント(DTA)遺伝子が発現誘導され、DTAを発現した筋衛星細胞が選択的に死滅できるように設計されている。

一方、筋衛星細胞を欠失したマウスに、外因的に筋衛星細胞を細胞移植することで、筋線維タイプの変換に及ぼす衛星細胞の効果を検証できる。この検討のため、全身で赤色蛍光タンパク質を発現するマウス(tdTomatoマウス)由来の筋衛星細胞をドナー細胞として用いることにした。この tdTomato マウスは理研 BRC から入手した(C.Cg-Gt(ROSA)26Sor<tm6.1(CAG-tdTomato)Maoh>(RBRC05472))。

(2)筋衛星細胞の単離と移植

tdTomato マウスから、Allen らの方法に従い筋衛星細胞を単離した。その後7日間増殖培地で培養し、細胞を増やした。移植当日に、細胞が200 μl中に4.0×10⁶個含まれるように細胞懸濁液を調製した。さらに野生型の6週齢の雄性 BALB/c マウスの前脛骨筋にカルデイオトキシン(CTX)を注射して、筋損傷を誘導後、その翌日に、tdTomato マウスの骨格筋から単離した筋衛星細胞を筋損傷部位に4.0×10⁶個移植した。CTX 処理から2週間後に前脛骨筋を摘出し、筋組織の凍結切片を作製した。その後、tdTomato の蛍光観察と HE 染色および筋線維タイプマーカーのミオン重鎖(MyHC)アイソフォームの蛍光免疫染色を行い、移植した筋衛星細胞の局在と形態の観察、および筋線維タイプを測定した。

4. 研究成果

(1)筋衛星細胞欠失マウスの作出

B6;129-Gt(ROSA)26Sortm1(DTA)Mrc/J、B6;129-Pax7tm2.1(cre/ERT2)Fan/J 系統のマウスを国内の研究者から分譲して頂き、繁殖を行った。本研究期間内では、実施に至らなかったが、今後このマウスを用いて、筋線維タイプ組成に及ぼす筋衛星細胞の役割を評価していきたい。

(2)筋衛星細胞の単離と移植

レシピエントである、野生型の BALB/c マウスにおいて、CTX 処理による筋損傷と tdTomato マウス由来の細胞移植後、2 週間が経過した前脛骨筋を採取し、筋切片を観察した。その結果、tdTomato マウスから採取した筋衛星細胞由来と考えられる赤色蛍光が観察された。この結果より、CTX による筋損傷からの筋再生に際し、移植した筋衛星細胞が生着し、それを蛍光観察により区別できることが示唆された。MyHC アイソフォームの蛍光免疫染色の結果、再生後の筋線維タイプは筋損傷前に比べて、速筋タイプ (MyHC2B) が減少する傾向にあり、中間タイプである MyHC2X および type 2B と 2X のハイブリッドファイバーが増加した。従って、筋損傷から回復した筋線維タイプは損傷前と異なることが示唆された。

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 9 件)

Mulan Qahar, Yuko Takuma, Wataru Mizunoya, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Mako Nakamura, Semaphorin 3A promotes activation of Pax7, Myf5, and MyoD through inhibition of emerlin expression in activated satellite cells, *FEBS openbio*, 査読有, 2016.03. DOI:10.1002/2211-5463.12050

Mai-Khoi Q. Do, Naomi Shimizu, Takahiro Suzuki, Hideaki Ohtsubo, Wataru Mizunoya, Mako Nakamura, Shoko Sawano, Mitsuhiro Furuse, Yoshihide Ikeuchi, Judy E. Anderson, Ryuichi Tatsumi, Transmembrane proteoglycans syndecan-2, 4, receptor candidates for the impact of HGF and FGF2 on semaphorin 3A expression in early-differentiated myoblasts, *Physiological Reports*, Vol.3, No.9, e12553, 査読有, 2015.09. DOI: 10.14814/phy2.12553

Shoko Sawano, Takahiro Suzuki, Mai-Khoi Q. Do, Hideaki Ohtsubo, Wataru Mizunoya, Yoshihide Ikeuchi, Ryuichi Tatsumi, Supplementary immunocytochemistry of hepatocyte growth factor production in activated macrophages early in muscle regeneration, *Animal Science Journal*, Vol.85, No.12, pp.994-1000, 査読有, 2014.12. DOI: 10.1111/asj.12264

Shohei Sakaguchi, Jun-ichi Shono,

Takahiro Suzuki, Shoko Sawano, Judy E. Anderson, Mai-Khoi Q. Do, Hideaki Ohtsubo, Wataru Mizunoya, Mako Nakamura, Mitsuhiro Furuse, Yoshihide Ikeuchi, Ryuichi Tatsumi, Anti-inflammatory macrophages implicate in regenerative moto-neuritogenesis, by promoting myoblast migration and *Sema3A* expression, *Animal Science Congress 2014 of the Asian-Australian Association of Animal Production Societies (AAAP) Grha Sabha Pramana, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta, Indonesia (November 10-14, 2014)*, 査読有, 2014.11.

[学会発表](計 38 件)

水野谷 航, 抗ミオシン抗体多重染色による筋線維タイプ解析, 第 4 回骨格筋生物学研究会, 2016.03.05, 松本大学(長野県・松本市)

水野谷 航, 筋線維タイプとその解析法に関する研究, 第 7 回分子骨格筋代謝研究会, 2015.08.29, 京都大学(京都府・京都市)

鈴木貴弘, 西松伸一郎, 寺田久美子, 片瀬直樹, 濃野勉, 大澤裕, 砂田芳秀, 水野谷 航, 池内 義秀, 辰巳 隆一, 筋幹細胞由来の *Sema3A* による筋線維型制御に関する研究, 第 1 回日本筋学会学術集会, 2015.08.08, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

Shoko Sawano, Yuri Tajima, Johan Rung, Mako Nakamura, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Wataru Mizunoya, Transcriptomic and metabolomic analyses depicted distinct characteristics between slow-twitch and fast-twitch muscles in mice, ACN2015(12th Asian Congress of Nutrition), 2015.05.17, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002754/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野谷 航 (MIZUNOYA WATARU)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：20404056

(2) 研究分担者

辰巳 隆一 (TATSUMI RYUICHI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：40250493

(3) 連携研究者

なし