

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12677

研究課題名(和文)骨格筋細胞における核とミトコンドリアの共遊走機構の解明

研究課題名(英文)Migration of mitochondria and nuclei in cell culture

研究代表者

檜垣 靖樹 (Higaki, Yasuki)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：10228702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満者の骨格筋細胞内には多量の脂肪が貯蔵されており、脂肪量とインスリン感受性は負の相関を示す。一方、インスリン感受性が亢進している持久鍛錬者の筋細胞内脂肪量は、肥満者よりもさらに多い。しかし、なぜ持久鍛錬者は多量の筋細胞内脂肪を有するのに、インスリン抵抗性を引き起こさないのか、不明である。

本研究では、iPS細胞由来の筋細胞を用いて、核の周辺にミトコンドリアと脂肪滴が局在することを観察した。我々は、これらの局在環境がインスリン抵抗性と関連していると考えている。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance is associated with high levels of stored lipids in skeletal muscle cells. Fat storage in skeletal muscle from endurance athlete is higher than that in obese people. However, it is not clear why enhanced insulin sensitivity is observed in endurance athletes who had high lipid storage in skeletal muscle.

In this study we observed that mitochondria and lipid droplet are existed around nucleus, and nucleus and mitochondria go around lipid droplet in human induced pluripotent stem cells-derived myocytes. We speculate that localization of mitochondria and lipid droplet in skeletal muscle cells may be associated with insulin resistance.

研究分野：運動生理学

キーワード：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

脂肪の過剰蓄積は、インスリン感受性の低下を惹き起こす。しかし、唯一、持続的トレーニング者の骨格筋内脂肪のみが例外である。すなわち、持続的トレーニング者の骨格筋内脂肪量は、肥満者よりもさらに多いにもかかわらず、インスリン感受性は亢進している（図1）。

我々は、培養筋細胞を用いて、ミトコンドリアと脂肪滴の位置情報を経時的に視覚化したところ、ミトコンドリアと核と一緒に細胞内を移動し、脂肪滴を取り囲み、分解しているように捉えられる画像を観察した。核は、モーター蛋白(MAP7, Kinesin)を上手に操り動くことが明らかとなっており (*Nature, 2012*)、一方、ミトコンドリアにおいても神経細胞で同様な機構が報告されている (*J. Cell Sci. 2012*)。

これらの知見より、骨格筋細胞において、ミトコンドリアが核と共に細胞内のモーター蛋白とそのレールを利用し、脂肪滴へ遊走し脂肪分解の効率化を図っている、という仮説を着想した。この機能の優劣が図1に示すパラドックスを解く有力な候補と考えている。

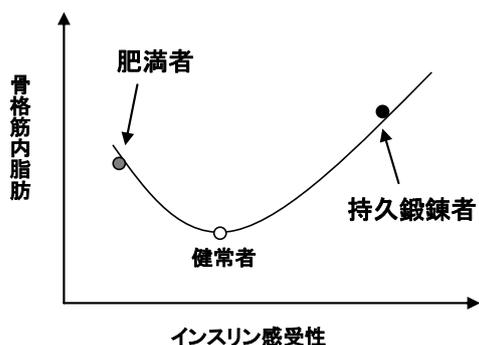


図1 骨格筋内脂肪とインスリン感受性の関係（持久鍛錬者の骨格筋内脂肪量は、肥満者に比べ高値を示すが、インスリン感受性の亢進を認めている。従って、骨格筋内脂肪量とインスリン感受性の関連にはパラドックスが存在する。）

2. 研究目的

本研究では、C2C12細胞で得られた知見に基づき、iPS細胞由来の筋細胞を用いて以下のことを明らかにすることを目的とした。

- 1) iPS細胞由来の筋細胞内に脂肪滴を作成するパルミチン酸添加条件を確立する。
- 2) iPS細胞由来の筋細胞のミトコンドリアと核の局在を明らかにする。
- 3) iPS細胞由来の筋細胞のミトコンドリア機能を評価する。

3. 研究の方法

1) 実験1

実験1では、iPS細胞から分化し筋細胞（分化12日目）を用い、パルミチン酸添加による脂肪滴の誘発を検討した脂肪添加溶液を添加し30分CO₂インキュベータ内に静置し脂肪滴を細胞内に誘発した。

○脂肪添加溶液

- 2% FBS_DMEM
- 50mM パルミチン酸（最終濃度 200 μM）
- 10%BSA 溶液（最終濃度 4g/L）

2) 実験2

実験2では、iPS細胞由来の筋細胞のミトコンドリアと核の局在を検討した。実験1で脂肪滴を誘発した筋細胞をPBSで3回洗浄し、ミトコンドリアをMito Trackerで脂肪滴をBODIPYで染色した（CO₂インキュベータで、30分静置）。染色後、PBSで3回洗浄し、蛍光顕微鏡（FSX100、オリンパス）で観察した。

3) 実験3

実験3では、iPS細胞の筋細胞のミトコンドリア機能について細胞外フラックスアナ

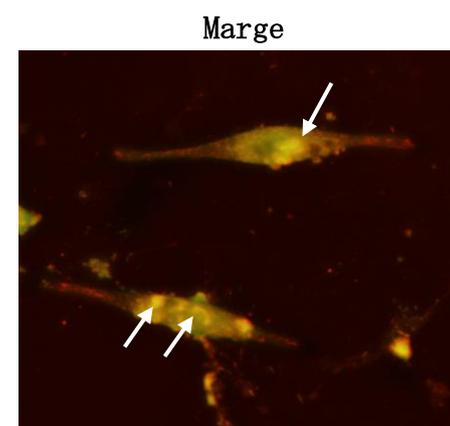
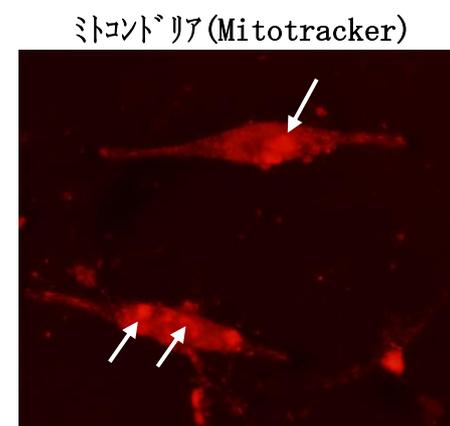
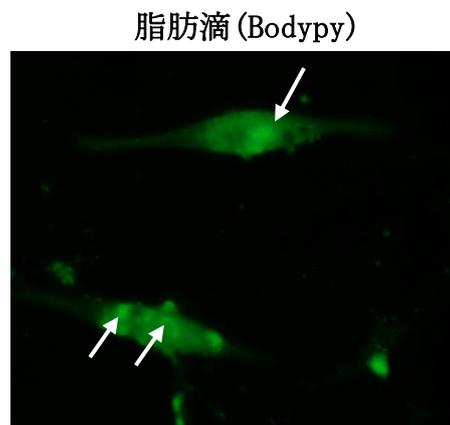
ライザー(Seahorse 社)を用いて評価した。

iPS 細胞を 24well-plate に 3×10^4 個/well で播種し、筋細胞へ分化させた。分化 10 日目の細胞の培地を解析培地に置換し、 37°C 、 CO_2 フリーインキュベーターに静置した(1 時間)。次に、解析用センサープレートの各ポートに Olygomicin (最終濃度 $2 \mu\text{M}$)、FCCP(最終濃度 $2 \mu\text{M}$)、Rotenon/Antimycin A (最終濃度 $0.5 \mu\text{M}$) 添加し、キャリブレーションを行った。1 時間静置した細胞をフラックスアナライザーにセットし、ミトコンドリア機能を評価した。

4. 研究成果

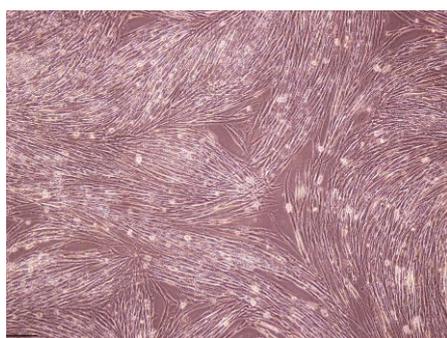
iPS 筋細胞を用いて、BODYPY/MitoTracker 染色による脂肪滴とミトコンドリアの細胞内局在を観察した。C2C12 細胞と同様に細胞内に脂肪滴を作り出すことに成功した。また、パルミチン酸の添加 24 時間後の脂肪滴とミトコンドリアの局在を観察したところ、両者の局在はほぼ同じ位置にあり、それは、核周辺に集まっていることが確認できた

(図 2)。iPS 細胞由来の筋細胞の走行性も C2C12 細胞と同じく不均一である。そこで、iPS 細胞を筋細胞へ分化させる時の細胞数と分化誘導に必要な添加剤の量と添加時期をそれぞれ検討した。その結果、細胞数は 3×10^5 cells/35mm-dish の時が多く筋細胞を誘導させることができた。分化誘導に必要な添加剤については、分化初期段階では、半分量になるように培地に添加し、分化 4 日目から規定量の添加剤入りの培地で培養することで死細胞の割合を減少させ多くの細胞を筋細胞へ誘導することが可能となった。この方法により、筋細胞の走行性も均一になることが確認できた (図 3)。

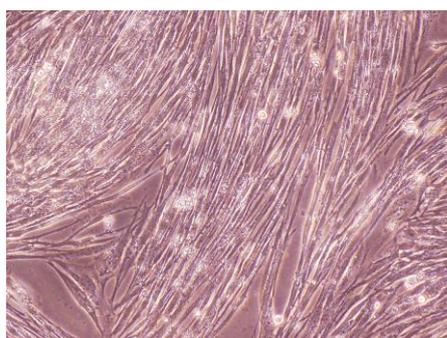


x15

図 2 iPS 細胞由来の筋細胞を用いたミトコンドリア、脂肪滴及び核の局在



x4



x10

図3 iPS細胞由来の筋細胞の走行性

iPS細胞由来の筋細胞のミトコンドリア機能が評価できるかどうかを検討した。ミトコンドリアの機能評価には Seahorse 社製 細胞外フラックスアナライザーを用いた。その結果、ミトコンドリア機能の指標となる基礎呼吸量、予備呼吸量等について酸素消費量(OCR)として評価可能であることが確認できた(図4)。

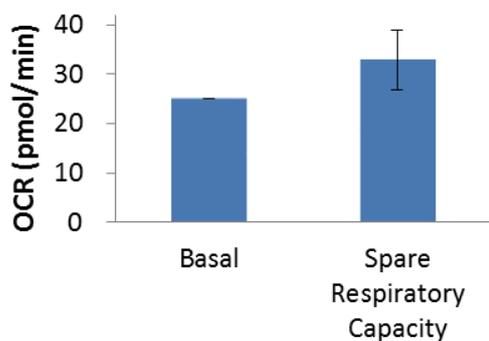


図4 iPS細胞由来の筋細胞のミトコンドリア機能

結論として、iPS細胞由来の筋細胞において、核の周辺にミトコンドリアと脂肪滴が局在すること、また、ミトコンドリア機能も評価が可能であることが明らかとなった。

本研究の遂行にあたり、iPS細胞は、京都大学 iPS細胞研究所の桜井英俊講師より提供を受け、培養細胞実験では、株式会社アステック学術研究員、緒方貴宏氏に技術的な支援をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

<特許出願に係る知見>

本研究を遂行する過程において、以下の新知見を得た。C2C12細胞に物質Xを添加し筋管細胞へ分化誘導したところ、分化4日目で筋管細胞の走行性が均一になることが確認された。また、筋管細胞内のグリコーゲン貯留量が物質Xを添加していない培地で分化誘導した筋管細胞と比較すると、有意に増加していることを見出した。これらの結果は、平成29年5月8日福岡大学発明審査委員会の承認を得て、特許出願を行った(特願2017-106080)。尚、この研究は、福岡大学スポーツ科学部教育技術職員の中島志穂子氏、健康スポーツ科学研究科博士課程前期2年の後藤里奈氏と共同で実施した。

5. 主な発表論文等

【学会発表】(計1件)

① 檜垣 靖樹

運動の効果を模倣する、副作用のない創薬は可能か 第90回日本薬理学会年会プログラム180-181, 2017.3.17.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜垣 靖樹 (Higaki, Yasuki)
福岡大学・スポーツ科学部・教授
研究者番号：10228702

(2) 研究分担者

須藤 みず紀 (SUDO, Mizuki)
明治安田厚生事業団体体力医学研
究所・研究員
研究者番号：10585186

安藤 創一 (ANDO, Soichi)
電気通信大学・情報理工学研究科・
准教授
研究者番号：50535630

安野 哲彦 (YASUNO, Tetsuhiko)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：80551994

兼岡 秀俊 (KANEOKA, Hidetoshi)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：20161169