

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16517

研究課題名(和文)骨による骨格筋増強作用の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of muscle hypertrophy by osteoblasts

研究代表者

榭原 伊織 (Sakakibara, Iori)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：50734662

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)：骨と骨格筋はどちらも環境、および、年齢に応じて、筋量・骨量が同調して変化するため、骨と筋肉の間のクロストークが存在するのではないかと考え、その相互作用を解明するために、本研究を行った。研究のモデルとしては、培養細胞系を用いて、骨芽細胞株と筋芽細胞株の共培養を行ったところ、分化した骨芽細胞との共培養により、筋芽細胞の融合が進み、形成された筋管が自発的な収縮を起こすことが明らかとなった。本研究により、骨芽細胞と筋芽細胞の間には筋芽細胞の分化を促進する直接作用が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The change of muscle mass and bone mass are well synchronized through aging and by environmental stimuli, which suggested the existence of crosstalk between skeletal muscles and bones. The signals from skeletal muscles to bones are well analyzed compared with the signal from bones to muscles. The purpose of this study is to clarify the signal from bones to muscles. Direct co-culture of myoblasts and osteoblasts promoted myoblast differentiation into myotube accompanied with spontaneous myotube contraction. This study proved the positive signal from osteoblast for myoblast differentiation.

研究分野：骨格筋

キーワード：骨格筋 骨 共培養

1. 研究開始当初の背景

現代社会は高齢社会の進行に伴い、高齢者に特有なロコモティブシンドロームが増加している。加齢に伴い増加する疾患にはさまざまな相互作用が背景に存在し、骨粗鬆症と糖尿病に正の相関が見られるなどの多臓器間のクロストークが明らかとなってきた。骨と骨格筋はどちらも環境、および、年齢に応じて、筋量・骨量が変化するが、その増減は同調している。栄養、成長ホルモン、性ホルモン、運動などは筋量・骨量の増加に寄与し、一方、飢餓、加齢、グルココルチコイド、denervationなどは筋量・骨量の減少に寄与する(Kaji H, J. bone Metab., 2014)。このことから、外部からのシグナルだけでなく、筋量・骨量の増減を同調させるフィードフォワードな骨と筋肉の間のクロストークが存在すると考えられる。すでに筋肉から骨へ作用する分子については研究が進んでおり、IGF-1、IL-6、osteoglycinなどの重要性が明らかとなっているが、骨から骨格筋に作用する分子には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では骨と筋肉のクロストークの中でも骨から筋肉へ作用する分子の同定、および、その分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

-共培養

C2C12細胞株と骨芽細胞株との共培養を行い、C2C12細胞株への作用を解析した。

-RNA-sequencing

骨芽細胞に発現する候補遺伝子を網羅的に解析した。

-CRIPR/Cas9

骨芽細胞に発現する候補遺伝子をノックアウトした。

4. 研究成果

筋線維-間質細胞間のシグナルに着目し、様々な種類の細胞(主に間葉系細胞)と筋芽細胞株 C2C12 細胞とを共培養し筋細胞分化の変化を探索した。マウス筋芽細胞株 C2C12 は、コンフルエントの後、2%ウマ血清(HS)による低栄養状態にすると筋細胞へと分化し筋管を形成する。ヒト由来細胞では、極めて分化が進んだ場合には更に筋線維の収縮を認めることがあるが、C2C12 由来の筋線維では数日間では収縮を認めることはない。ところが、特定の骨芽細胞株を分化させた状態で C2C12 細胞を播種し、2%HSにて数日間分化誘導した場合、筋線維のダイナミックな収縮が顕著に認められた。この筋収縮は、C2C12 細胞単独培養や他の間葉系細胞・未分化な骨

芽細胞株との共培養では全く認められなかった。この収縮を伴う筋細胞分化誘導能を定量的に解析した結果、骨芽細胞株の分化に従って増強されることが明らかとなった。この筋細胞分化誘導能は、直接的な細胞との接着によるものか、分化した骨芽細胞株が分泌した液性因子によるものかを明確にするため、膜で隔てられた同一ウェル内で直接的な接着が無く液性因子を共有できる状態で共培養したところ、筋線維の収縮は認められなかった。このことから、分化した骨芽細胞株の表面もしくは骨芽細胞株が形成した細胞外基質と筋細胞との直接的な接着により収縮を伴う筋細胞分化が誘導されることが示唆された。また、骨芽細胞株との共培養開始 1 日後には、2%HS に変更することなく、筋分化の決定因子である myogenin の発現が上昇し、筋管の形成が起こることが明らかとなり、骨芽細胞株との共培養には、筋分化を誘導する作用があることが示された。この共培養を 2 ヶ月間継続したところ、分化した C2C12 細胞が維持され、筋収縮が安定的に継続した。これらのことから、骨芽細胞株との共培養は、筋分化誘導作用、筋収縮誘導作用、筋管の保護作用の 3 つの作用があることが明らかとなった。

この筋細胞分化促進現象を誘導す

る分子を同定する事を第一の研究項目とする。すでに未分化および劇的な筋細胞分化誘導能を有する分化した骨芽細胞株との遺伝子発現プロファイルの比較を RNA-seq を用いて解析した。その結果、未分化では発現しておらず、分化後に 4 倍以上の発現を有する 144 遺伝子が得られ、Gene ontology 解析により 膜表面タンパク質、細胞外基質タンパク質に着目して候補分子を 24 抽出した。これらの分子に対し、エレクトロポレーションによる CRISPR/Cas9 システムを用いた骨芽細胞株に対する遺伝子ノックアウトを各候補分子に対して行った上で細胞分化させ、C2C12 細胞と共培養し、筋細胞分化誘導（の消失）を評価にすることで筋分化作用を持つ遺伝子をスクリーニングすることを試みた。

ところが、CRISPR/Cas9 システムでは細胞一つ一つでノックアウトされるかどうかの違いがあるため、細胞を単離しない条件では、ヘテロな集団となってしまう、スクリーニングに適さないことがわかった。そのため、シングル細胞を FACS により採取することにした。しかしながら、FACS を行うと、骨芽細胞がダメージを死んでしまうことが起きた。このため、本研究では、骨芽細胞から C2C12 細胞株への細胞間直接作用による分化促進作用があること、および、その促進作用を担う候補遺伝子群を提示することができたが、候補遺伝子の同定までには至

らなかった。今後、引き続き候補遺伝子を同定する方法について検討を行いたい。

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 1 件)

1. 骨による骨格筋増強作用の可能性.
(2016) 榭原伊織 体育の科学 66 巻 9 号 648-652、査読あり

[学会発表](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榭原 伊織 (Sakakibara, Iori)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号: 50734662

(2) 研究分担者

研究者番号:

なし

(3) 連携研究者

()

なし

研究者番号:

(4) 研究協力者

()

なし