

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03205

研究課題名(和文)骨格筋幹細胞の性差：エピジェネティクス制御機構の解明とサルコペニアへの応用

研究課題名(英文)Sex differences in skeletal muscle stem cells

研究代表者

町田 修一 (Machida, Shuichi)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授

研究者番号：40421226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い骨格筋の筋肉量および筋力は低下する。しかし、この加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の発症機序の詳細については十分に解明されていない。また、男性と女性には、思春期以降体格や身体組成のような外形的性差が存在し、高齢期においても歴然とし骨格筋量の差が存在する。骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし、加齢に伴い筋再生能は低下する。サルコペニア発症の要因のひとつとして、怪我等による筋損傷からの再生が補いきれないために顕在化するという考えがある。本研究では、高齢期骨格筋における量と質の性差について、骨格筋幹細胞である筋サテライト細胞に着目して検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニア発症の要因のひとつとして、怪我等による筋損傷からの再生が補いきれないために顕在化するという考えがある。特に、女性においては、性ホルモンのエストロゲン分泌が低下した閉経以降では顕著に筋再生能が失われる。本研究では、骨格筋幹細胞である筋サテライト細胞の筋分化能には性差が認められ、エストロゲンの影響を受けることを示唆した。骨格筋の幹細胞に関するこれまでの知見は、株化された筋芽細胞から得られた結果より推察されたことが多く見受けられた。しかし、本研究のように、性差の影響を細胞レベルで明らかにすることで、性別に応じたサルコペニア予防の介入方法を開発する上で有益な基礎資料になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：Aging is associated with sarcopenia, which is defined by reductions in skeletal muscle mass, strength, and physical function. Sarcopenia decreases the ability to perform activities of daily living, reduces quality of life, and increases fall-risk and associated injuries. Older women exhibit greater frailty and skeletal muscle mass and strength losses compared to that in older men. It is likely that the underlying causes of sarcopenia are different in women and men, which will require the identification of sex-specific therapeutic targets. Skeletal muscles are generally considered to have high regenerative capacity. However, muscle regeneration capacity progressively declines with aging. Satellite cells are a group of adult muscle stem cells that play a key role in mediating muscle regeneration. Recent studies have shown that satellite cells progressively undergo sex-specific changes in cell-intrinsic characteristics and functions.

研究分野：運動生理学

キーワード：筋サテライト細胞 筋分化 性差

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

高齢期骨格筋の特徴として、骨格筋量の低下と伴に、筋肉内脂肪量が増加することが知られている。しかし、このサルコペニアの発症機序の詳細については十分に解明されていない。また、男性と女性には、思春期以降体格や身体組成のような外形的性差が存在し、高齢期においても歴然とした筋肉量の差が存在する。さらに、筋肉内脂蓄量は男性よりも女性の方が高いことが報告されている。2015年には80歳以上の高齢者が1,000万人を超えて本格的な高齢社会を迎えた本邦において、ゆとりと豊かさに満ちた社会を実現するためには、性差に関係なく、ひとりひとりが高齢になっても援助なしで自由に自立した生活を営めることが鍵となる。したがって、加齢に伴うサルコペニア発症やその性差のメカニズムを解明し、その改善および予防のための対策を講じることは今後益々重要になると思われる。

骨格筋は本来、再生能力の高い組織と考えられている。しかし、加齢に伴い筋再生能は低下する。サルコペニア発症の要因のひとつとして、怪我等による筋損傷からの再生が補いきれないために顕在化するという考えがある (Grounds, 1998)。特に、女性においては、性ホルモンのエストロゲン分泌が低下した閉経以降では顕著に筋再生能が失われる。骨格筋は、多核の筋線維から構成されているが、筋線維の筋形質膜と基底膜の間には筋サテライト細胞と呼ばれる単核の細胞が存在する。骨格筋が損傷等を受けると、筋サテライト細胞は増殖因子やサイトカイン等の刺激で活性化されて増殖を開始し、筋前駆細胞 (筋芽細胞) となる。増殖した筋サテライト細胞は、互いに、あるいは既存の筋線維と細胞融合することによって筋再生を促す。そのため、筋の再生能力の大半は筋サテライト細胞によって担われていると考えられ、骨格筋の再生において重要な役割を担っている (Hawke ら, 2001)。しかし、筋サテライト細胞は加齢に伴い数 (量的) および諸機能 (質的) が低下することが知られており、現時点では、筋サテライト細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構は多くが未解明である。

高齢期骨格筋における量と質の性差については、性染色体の違いによる遺伝的要因が重要であることを言うまでもない。また、最近では、サルコペニアと関連する遺伝子多型が報告され、骨格筋量に及ぼす遺伝的要因についても注目されている。その一方で、身体活動や栄養環境、そしてホルモンなどの外的要因 (環境因子) によって、塩基配列の変化を伴わない後天的なゲノム修飾 (DNA メチル化やヒストンアセチル化など) によるエピジェネティックな遺伝子発現制御のメカニズムが注目されている。筋細胞が分化し多核の筋管細胞を形成する際に、グローバルな脱メチル化が生じ (Taylor and Jones, 1979)、骨格筋分化誘導マスター制御因子である MyoD が発現されることが分かっている (Davis ら, 1987)。そのため、骨格筋の幹細胞である筋サテライト細胞が、加齢やホルモンの環境因子によってどのように影響されるのか、エピジェネティックな遺伝子発現制御の観点から検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨格筋における量と質の性差について、骨格筋幹細胞である筋サテライト細胞の機能に着目し、加齢およびホルモンが筋サテライト細胞の筋分化能に及ぼす分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物: 若年期 (3 カ月齢) および閉経後 (12 カ月齢) の F344 系雌性ラットおよび同齡の

雄性ラットを実験動物として用いた。

筋サテライト細胞の培養：両性群のラットより下肢骨格筋（ヒラメ筋、足底筋、前脛骨筋、腓腹筋、長趾伸筋、大腿四頭筋）を摘出し、Machidaら（J Cell Physiol 2003）の方法に基づき、筋サテライト細胞を単離し初代培養を行った。

筋サテライト細胞の増殖能：20%FBSを含む増殖培地中にBrdUを添加し1時間培養後、抗BrdU抗体で免疫染色してBrdUの取込み率をS期細胞の割合として算出した（Exp Gerontol 2004; Cell Prolif 2004; BB Reports 2018）。

筋サテライト細胞の筋分化能：筋分化能については、2%HSを含む筋分化培地で4~7日間培養し、細胞形態の変化、筋管形成の違いを雌雄間で比較した。形成された筋管については免疫染色でMyHCの発現を確認した。筋分化初期の細胞状態については筋分化開始16時間後に細胞を固定し、MyoD、myogenin、Pax7の免疫染色を行い各陽性細胞数の割合を算出し雌雄細胞間での違いを比較した（Exp Gerontol 2004; Cell Prolif 2004; BB Reports 2018）。

筋サテライト細胞の脂肪細胞への分化能：Machidaらが既に高齢期筋サテライト細胞用に確立したプロトコール（Annals of the New York Academy of Sciences 2006）に基づき、脂肪生成の誘導剤（デキサメサゾン、IBMX、インスリンを含む）を用いて検討した。評価方法としては、脂肪分化培地で6日間培養した細胞の形態観察、オイルレッド-O染色による脂肪滴蓄積の評価、細胞内トリグリセライド量の定量を行い雌雄細胞間で比較した。

#### 4. 研究成果

若年期の雄性および雌性ラットの骨格筋より筋サテライト細胞をそれぞれ単離し、同一培養条件下で増殖能、筋分化能、そして多分化能（脂肪細胞へ分化転換する能力）の性差について検討した。若年期のF344両性ラットの各下肢骨格筋から単離した筋サテライト細胞の増殖能については、BrdUの取込み率をS期細胞の割合として算出し雌雄細胞間で比較した。その結果、細胞増殖能については雌雄の筋サテライト細胞に違いは認められなかった。その一方で、脂肪細胞への分化処理によって、細胞内にはオイルレッド-Oで染色される脂肪滴が蓄積し、これらの細胞内のタンパク質あたりのトリグリセライド含有量には雄雌で違いが見られ、トリグリセライドは雌の細胞に多く蓄積される傾向にあった。また、筋分化処理によって、筋管形成は雌よりも雄で多数の筋管が安定して形成された。筋分化初期に誘導される転写因子の発現を検討したところ、myogenin陽性細胞数に違いは認められなかったが、MyoD陽性細胞は雌よりも雄で多く、Pax7陽性細胞は雄よりも雌で多く認められた。以上から、若年期における雌雄の筋サテライト細胞は増殖能には違いはないが、分化能には性差があり、特に筋分化能については顕著な差が認められた。

今回我々は、閉経後の12カ月齢雌性ラットおよび同齢の雄性ラットの骨格筋より若年期と同様に筋サテライト細胞をそれぞれ単離し、同一培養条件下で筋分化能の性差についても検討した。その結果、雄から単離した筋サテライト細胞では、加齢に伴い筋管形成の低下が認められた。その一方、エストロゲンの影響が軽減している12カ月齢雌性ラットの筋サテライト細胞では、筋管形成は若年期よりも多数の筋管が安定して形成された。以上から、加齢に伴う筋分化能の変化に顕著な性差が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawanishi N, Takagi K, Lee HC, Nakano D, Okuno T, Yokomizo T, Machida S.	4. 巻 314
2. 論文標題 Endurance exercise training and high-fat diet differentially affect composition of diacylglycerol molecular species in rat skeletal muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R892-R901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00371.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawanishi N, Funakoshi T, Machida S	4. 巻 57
2. 論文標題 Time-course study of macrophage infiltration and inflammation in cast immobilization-induced atrophied muscle of mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 1006-1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.26061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funakoshi T, Kanzaki N, Otsuka Y, Izumo T, Shibata H, Machida S	4. 巻 13
2. 論文標題 Quercetin inhibits adipogenesis of muscle progenitor cells in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 39-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2017.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hatazawa Y, Ono Y, Hirose Y, Kanai S, Fujii NL, Machida S, Nishino I, Shimizu T, Okano M, Kamei Y, Ogawa Y	4. 巻 32
2. 論文標題 Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1452-1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201700573R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto T, Machida S	4. 巻 38
2. 論文標題 Changes in FOXO and proinflammatory cytokines in the late stage of immobilized fast and slow muscle atrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 331-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi N, Nozaki R, Naito H, Machida S	4. 巻 5
2. 論文標題 TLR4 defective (C3H/HeJ) mice are not protected from cast immobilization induced muscle atrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koltai E, Bori Z, Chabert C, Dubouchaud H, Naito H, Machida S, Davies KJ, Murlasits Z, Fry AC, Boldogh I, Radak Z	4. 巻 595
2. 論文標題 SIRT1 may play a crucial role in overload induced hypertrophy of skeletal muscle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of physiology	6. 最初と最後の頁 3361-3376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP273774.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Itaka T, Agemizu K, Aruga S, Machida S	4. 巻 30
2. 論文標題 The G allele of the IGF2 Apal polymorphism is associated with judo status	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Strength Cond Res	6. 最初と最後の頁 2043-2048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1519/JSC.0000000000001300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chang SW, Yoshihara T, Machida S, Naito H	4. 巻 9
2. 論文標題 Circadian rhythm of intracellular protein synthesis signaling in rat cardiac and skeletal muscles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 153-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2016.12.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nozaki R, Hung Y-L, Takagi K, Nakano D, Fujii T, Kawanishi N, Okamoto T, Machida S	4. 巻 41
2. 論文標題 Differential protective effects of Radix astragali, herbal medicine, on immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 139-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara T, Machida S, Tsuzuki T, Kakigi R, Chang SW, Sugiura T, Naito H	4. 巻 125
2. 論文標題 Age-related changes in histone modification in rat gastrocnemius muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental gerontology	6. 最初と最後の頁 110658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2019.110658.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takisawa S, Funakoshi T, Yatsu T, Nagata K, Aigaki T, Machida S, Ishigami A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Vitamin C deficiency causes muscle atrophy and a deterioration in physical performance.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41229-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 町田修一
2. 発表標題 サルコペニア予防のための運動プログラムに骨格筋の性差は考慮されるべきか？
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 町田修一
2. 発表標題 サルコペニアを細胞生物学的に理解するヒント - 筋線維と筋サテライト細胞に着目して -
3. 学会等名 第4回サルコペニア・フレイル学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakano D, Machida S
2. 発表標題 Estradiol changes mitochondrial morphology into complexity in response to exercise
3. 学会等名 Experimental Biology 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakano D, Machida S
2. 発表標題 Mitochondrial morphological changes differ between skeletal muscle types and in the different phases of the menstrual cycle in response to acute exercise
3. 学会等名 Cell Symposia: Exercise Metabolism（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kondo Y, Takisawa S, Noda Y, Machida S, Aigaki T, Ishigami A
2. 発表標題 Vitamin C deficiency in skeletal muscle switches muscle fiber types from slow to fast
3. 学会等名 The International Conference on Frailty & Sarcopenia Research 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihara T, Kakigi R, Tsuzuki T, Shuo-wen C, Natsume T, Takamine Y, Ichinoseki-Sekine N, Machida S, Sugiura T, Naito H
2. 発表標題 Physical inactivity-induced histone modification in rat soleus muscle
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 63th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nakano D, Takagi K, Machida S
2. 発表標題 Effects of acute aerobic exercise on mitochondrial morphology in endurance-trained rats
3. 学会等名 2016 APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 町田修一
2. 発表標題 高齢期における骨格筋の性差
3. 学会等名 第3回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 町田修一
2. 発表標題 高齢者を対象としたレジスタンストレーニングの効果を規定する要因とその分子機序
3. 学会等名 日本スポーツ栄養学会第5回大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Machida S
2. 発表標題 Sex difference in sarcopenia: mechanisms and interventions
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hung YL, Ota K, Ishido M, Machida S
2. 発表標題 Estrogen deficiency leads to decreased water channel aquaporin 4 expression in skeletal muscle
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 町田修一(分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 市村出版	5. 総ページ数 195
3. 書名 筋力トレーニングの基礎, トレーニングのための生理学的知識	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡本 武志  (Okamoto Takeshi)  (80638320)	東海大学・健康学部・准教授     (32644)	