

令和元年6月12日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01727

研究課題名(和文)筋サテライト細胞が骨格筋機能に果たす役割の解明 キメラ筋細胞の作成と解析

研究課題名(英文)The role of satellite cells in skeletal muscle function -Preparation and investigation of the chimeric multinuclear myotubes-

研究代表者

中井 直也(Nakai, Naoya)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：90324508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋に存在する幹細胞である筋サテライト細胞を個体から単離し、生体外での機能について検討した。短期間の糖代謝異常などの後天的環境要因によって個体における骨格筋機能が低下しても、個体から単離した筋サテライト細胞はほぼ正常な機能を発揮する。一方、遺伝的要因による影響は個体から単離しても残存する。また、遺伝子を欠損した筋サテライト細胞と野生型の筋サテライト細胞を混合して形成した多核の筋管細胞(キメラ筋管細胞)は、両者の中間的な機能を示した。すなわち、同じ筋管細胞内であっても、遺伝子欠損の影響は野生型の筋サテライト細胞由来の核によって完全には補償されないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能が低下した骨格筋から採取した筋サテライト細胞を適正な条件で培養し、筋分化させるとほぼ正常な機能を回復できる可能性を示した点で、本研究の社会的意義がある。すなわち、生活習慣を見直し、正常な代謝に回復できれば以前の生理機能を取り戻せる可能性を示した。また、骨格筋細胞が多核細胞であることを利用して、遺伝的背景の異なる筋サテライト細胞からキメラ筋細胞を作成し、正常な核による補償効果を解析した点に学術的意義があるが、結果からは両者の核が同じ細胞内に存在しても遺伝子欠損の影響は補償できないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle satellite cell is a stem cell, which located in a niche on the surface of the muscle fiber. We examined the function of satellite cell in vitro. Whereas the acquired environmental factors such as abnormality of glucose metabolism depressed the function of skeletal muscle, the isolated satellite cells retained its normal function in vitro. The isolated gene knock-out satellite cells exhibited the same characteristics as gene knock-out skeletal muscle. In addition, multinuclear myotubes which formed by the mixture of gene knock-out satellite cells and wild-type satellite cells (chimeric myotube), exhibited the intermediate characteristics. Thus, nuclei from wild-type satellite cell could not fully compensate the function of the nuclei from gene knock-out satellite cell, even both nuclei were located in the same myotube.

研究分野：運動生化学、運動栄養学

キーワード：筋サテライト細胞 骨格筋 糖代謝 タンパク質合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋の成長、再生、肥大には筋サテライト細胞が重要な役割を担っている。筋サテライト細胞は筋線維（筋細胞）の形質膜と基底膜の間に存在し、通常は休止期に留まっているが、刺激を受けると活性化され、増殖・分化し筋線維と融合することによって新たな筋核となり機能する。加齢や糖尿病は筋サテライト細胞の数や活性を減少させ、筋萎縮や筋再生不良の一因となっている。一方、身体運動や運動後のタンパク質摂取はサテライト細胞の数や活性を高めることが報告されている。すなわち、サテライト細胞の機能は、個体の置かれる後天的環境要因に大きく影響を受けることが考えられる。一方、サテライト細胞の機能変化には環境要因に加えて遺伝的要因の影響も大きい。代表的な例はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）である。DMDはジストロフィン遺伝子変異により筋線維膜直下に存在するジストロフィンタンパク質が欠損することで生じる。DMDの骨格筋に対して正常のサテライト細胞や他の幹細胞、近年ではiPS細胞を移植する治療法が検討されている。筋細胞は多核細胞であるため、疾患の原因となる欠損遺伝子を正常に発現する細胞が筋細胞と融合すれば、細胞機能が正常化される可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

後天的環境要因および遺伝的要因が、筋サテライト細胞の機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。後天的環境要因の影響については、薬理的に糖尿病を発症させたマウスから採取した筋サテライト細胞の機能を解析した。遺伝的要因の影響については、分岐鎖アミノ酸（BCAA）代謝の律速酵素である分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素複合体（BCKDH）を不活性化するBCKDHキナーゼ（BDK）を欠損させたマウス（BDK KOマウス）から、筋サテライト細胞を単離し、その機能を解析した。また、遺伝的要因の異なる筋サテライトを混合することにより、多核の筋管細胞（キメラ筋管細胞）を形成し、その機能を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) サテライト細胞の単離・培養

C57BL/6マウスから長指伸筋（EDL）を採取し、0.2%コラゲナーゼ溶液中で37°C、110分間反応させた。その後、顕微鏡下でEDLから単一筋線維を単離し、増殖用培地で培養した。一定期間の増殖後、Trypsin-EDTA処理により、筋サテライト細胞のみを回収し、12 wellもしくは6 well plateでさらに増殖させた。80~90%コンフルエンスの時点で分化誘導培地に交換し、4~6日間培養することにより筋管細胞を形成させた。

#### (2) 糖尿病モデルマウスの作成

5~7週齢のC57BL/6マウスに、ストレプトゾトシン（STZ）溶液を腹腔内投与した（200 mg/kg体重、STZ群）。STZ投与10日後に、多尿や体重減少を確認した。断頭屠殺により安楽死させ、血液とEDLおよび前脛骨筋（TA）を採取した。対照群には生理食塩水を同様に投与した（CON群）。上記方法により、EDLから筋サテライト細胞を採取した。

#### (3) BDK KOマウスの解析

7~10週齢の野生型マウス（WT群）とBDK KOマウス（KO群）からEDLを採取し、筋サテライト細胞を採取した。

### 4. 研究成果

#### (1) 糖代謝異常が筋サテライト細胞に及ぼす影響

STZ投与10日後には、血糖値が有意に上昇し、体重は有意に低値を認めたことから、STZ群は糖代謝異常を呈していることが示された。筋サテライト細胞の増殖速度（図1）およびMyosin heavy chain（MHC）の発現を指標とした筋分化速度（図2）には、STZ投与の影響は認められなかった。分化6日目の筋サテライト細胞（筋管細胞）にインスリン刺激を行ったとこ

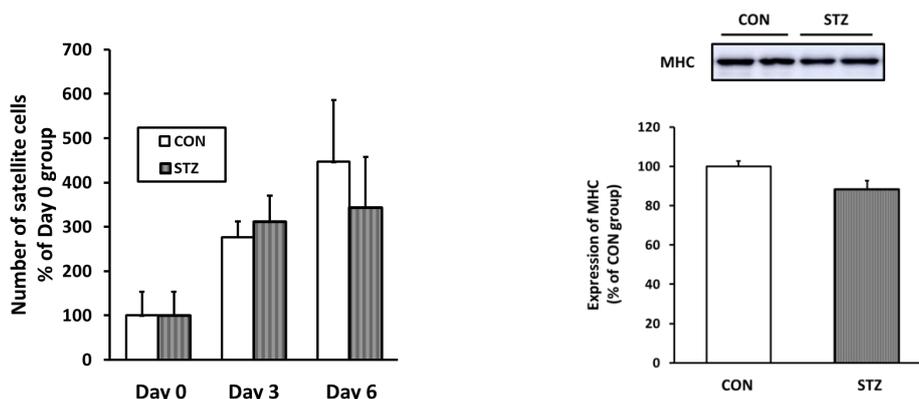


図1 筋サテライト細胞の増殖速度

図2 Myosin heavy chainの発現量

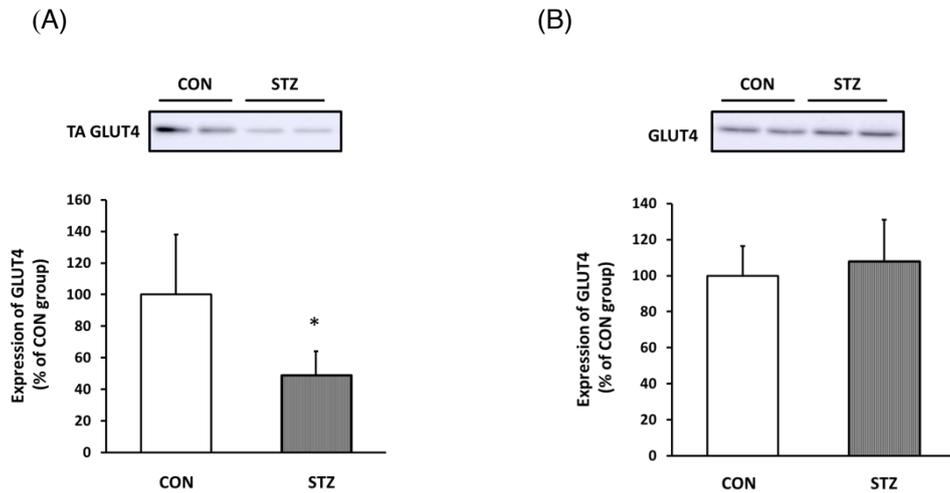


図3 前脛骨筋 (TA) (A) および筋サテライト細胞 (B) の GLUT4 発現量

る、インスリンシグナル経路の Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) のリン酸化には両群間に差を認めなかったが、Akt のリン酸化は STZ 群で減弱していた。mTOR の下流に存在し、タンパク質合成促進作用の指標となる p70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化の上昇にも STZ 投与の影響は認められなかった。STZ 群の前脛骨筋 (TA) GLUT4 タンパク質量は CON 群に比して有意に低下していたが (図 3A)、分化 6 日後の筋サテライト細胞では両群間に有意差は認められなかった (図 3B)。インスリン刺激による筋サテライト細胞の糖取り込み速度にも STZ 投与の影響は認められなかった (図 4)。

以上の結果より、短期間の代謝異常にさらされ、骨格筋に影響が及んだ場合であっても、個体から単離し生体外で培養した筋サテライト細胞は、正常な個体から単離した筋サテライトとほぼ同等にインスリンに対して反応することが示唆された。

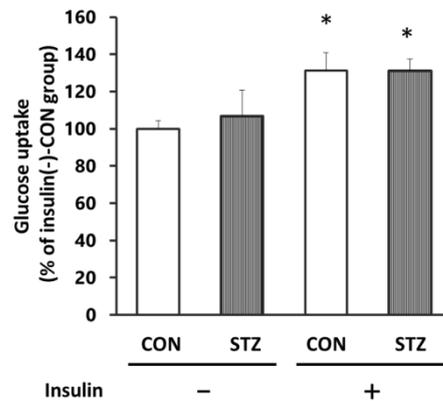


図4 インスリン刺激による糖取り込み速度

## (2) BCAA 代謝の亢進が筋サテライト細胞に及ぼす影響

野生型マウスおよび BDK KO マウスの骨格筋より採取した分化 4 日目の筋サテライト細胞に対して BCAA 刺激 (最終濃度、ロイシン:バリン:イソロイシン=2:1:1 mM) を行った。刺激前には、90 分間の BCAA スタベーションを負荷した。BCAA スタベーションにより、p70S6K のリン酸化は KO 群でのみ有意に低下したが、WT 群と KO 群間には有意差は認められなかった (図 5)。BCAA 刺激により両群ともに p70S6K のリン酸化が上昇したが、その増加率は KO 群で大きく、WT 群に比して KO 群で有意に高いリン酸化レベルを認めた (図 5)。

BCAA のタンパク質合成促進作用に関与することが報告されている L-type amino acid transporter 1 (LAT1) および Vacuolar protein sorting 34 (Vps34) のタンパク質発現量には両群間に差は認められなかった。電気刺激による収縮活動は両群の p70S6K のリン酸化を上昇させたが、両群間には差は認められなかった。

以上の結果より、遺伝的に BCAA 代謝が亢進しているマウス骨格筋から単離し、生体外で増殖・分化させた筋サテライトは、個体の骨格筋と同様に BCAA に対する感受性が上昇していることが明らかになった。しかし、そのメカニズムについては不明であり、今後の研究の進展が望まれる。

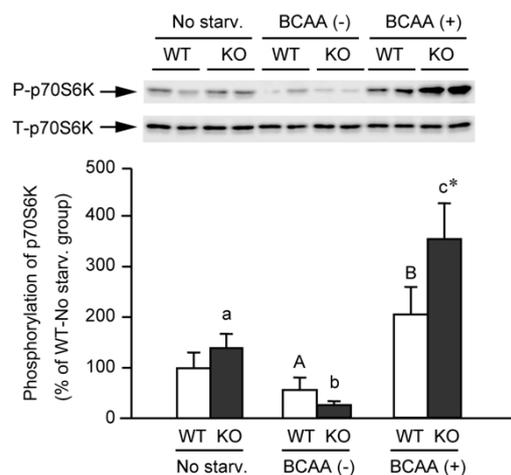


図5 BCAA 刺激による p70S6K リン酸化の上昇

(3) キメラ筋管細胞の作成と解析

WT 筋サテライト細胞と BDK KO 筋サテライト細胞を 1:1 で混合し増殖後、分化を誘導すると遺伝的背景の異なる核からなるキメラ筋管細胞が形成された。キメラ筋管細胞の BDK 発現量は WT 群と KO 群の間であった。また、BCAA 刺激による筋管細胞の p70S6K リン酸化の上昇も、WT 群と KO 群の間となった。すなわち、異なる遺伝的背景を持つ筋サテライトが細胞融合をへて同一の筋管細胞となっても、それぞれの核による遺伝子発現様式は変動しない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Leucine supplementation after mechanical stimulation activates protein synthesis via L-type amino acid transporter 1 in vitro. Nakai N, Kawano F, Murakami T, Nakata K, Higashida K. J. Cell. Biochem. 119(2): 2094-2101, 2018. DOI: 10.1002/jcb.26371.
2. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. Ishikawa T, Kitaura Y, Kadota Y, Morishita Y, Ota M, Yamanaka F, Xu M, Ikawa M, Inoue N, Kawano F, Nakai N, Murakami T, Miura S, Hatazawa Y, Kamei Y, Shimomura Y. Sci. Rep. 7: 39825, 2017. DOI: 10.1038/srep39825.
3. Prenatal myonuclei play a crucial role in skeletal muscle hypertrophy in rodents. Kawano F, Ono Y, Fujita R, Watanabe A, Masuzawa R, Shibata K, Hasegawa S, Nakata K, Nakai N. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 312(3): C233-C243, 2017. DOI: 10.1152/ajpcell.00151.2016.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 中井直也、飯田典子、北井彩貴、井上祥花、北浦靖之、下村吉治、東田一彦  
分岐鎖アミノ酸代謝の亢進が筋サテライト細胞のタンパク質合成に及ぼす影響  
第 73 回日本体力医学会大会 2018 年
2. 北井彩貴、飯田典子、井上祥花、東田一彦、中井直也  
グルコース枯渇は C2C12 細胞のタンパク質合成シグナルの低下およびオートファジーを誘導する 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 2018 年
3. 成澤諒子、東田一彦、中井直也  
短期間の糖代謝異常は筋サテライトのインスリンシグナルを低下させる  
第 72 回日本体力医学会大会 2017 年
4. 中井直也、東田一彦  
筋サテライト細胞を用いた培養骨格筋細胞モデルによるタンパク質合成促進作用機序の解析 第 71 回日本体力医学会大会 2016 年

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://naoyanakai.wixsite.com/ex-nutrition>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。