

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01485

研究課題名(和文) ヒト骨格筋細胞を用いた筋萎縮予防法の開発

研究課題名(英文) Development of muscle atrophy prevention method using human skeletal muscle cells

研究代表者

中谷 直史 (Nakatani, Masashi)

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：00421264

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)：ヒト骨格筋由来の、筋衛星細胞と間葉系前駆細胞の単離を行い研究材料とした。当初の計画していた筋衛星細胞は分化度の優れた株の単離に時間を要したため、間葉系前駆細胞を用いたスクリーニングを実施し、天然成分由来の候補分子を1つ特定することができた。In vitroの解析から発見した分子は骨形成を抑制する効果があることが明らかになった。今後続けてIn vivoの解析を進める予定である。骨格筋萎縮予防因子の特定のために、長期透析患者の血清を採取し、クレアチニン量をもとに筋萎縮の見られる患者を特定した。今後、この患者の血清を用いて筋萎縮に関わる因子の同定を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒト骨格筋から筋の恒常性に関わっている、2つの細胞(筋衛星細胞、間葉系前駆細胞)を単離し、その細胞を用いて有益な化合物・薬剤の探索を行う。ヒト骨格筋から単離した細胞を用いることで、ヒトの病態に直結し、有効な化合物を同定できる可能性が高い。本研究で作用が明らかになった分子は天然由来の経口で摂取されている分子であるため、筋の恒常性を維持する新しい化合物としての可能性が高い。近年の高齢化に伴う社会において、骨格筋の恒常性の維持は非常に重要であるため、本研究結果は社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human satellite cells and mesenchymal progenitor cells derived from human skeletal muscle were isolated and used as research materials. Since the originally planned muscle satellite cells took time to isolate a highly differentiated strain. Therefore, screening using mesenchymal progenitor cells was performed. As a result, one candidate molecule derived from a natural component could be identified. We plan to continue in vivo analysis in the future. To identify the skeletal muscle atrophy preventive factor, sera of long-term dialysis patients were collected and patients with muscle atrophy were identified based on the amount of creatinine. In the future, we plan to identify the factors involved in muscle atrophy using the serum of this patient.

研究分野：細胞生物学、生化学、生理学

キーワード：骨格筋 筋衛星細胞 間葉系前駆細胞 異所性骨化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は生体組織の中で大きな割合を示し、生体の恒常性の維持に大きく関わる非常に重要な組織である。また、生命活動を行う上で必須の運動機能を担い、われわれの QOL に直結した組織でもある。更には、全身の代謝機能の調節、近年、免疫作用にも関与していることが報告されている。このような重要な働きを行っている骨格筋の萎縮は様々な病態で見られ、骨格筋量の減少により病態の進行を亢進させ、さらには病態回復にも大きく関係することが明らかになりつつある。さらに、「骨格筋の質」についても重要性が示されつつある。肥満、糖尿病を始めとする代謝性疾患において、骨格筋内の脂質の沈着、脂肪細胞の出現により倦怠感や筋疲労などが生じやすいことが報告され、また近年大きな社会問題となっている、サルコペニア、フレイル等にも、「骨格筋の質」は大きく関与していることが明らかになりつつある。生体にとって重要な働きを担う骨格筋には、十分な筋量と、健康的な状態が必要である。

2. 研究の目的

申請者は本研究でヒト骨格筋由来筋衛星細胞、間葉系前駆細胞を用いて、分子スクリーニングを行い、骨格筋量の維持、骨格筋の恒常性の維持に関与する分子探索を目的とする。長期透析患者において筋量の減少(骨格筋の萎縮)と筋力の低下が確認され、このことから、透析患者血清において筋萎縮誘導因子の増加が予想される。この患者血清中に新規の筋萎縮誘導因子が発見される可能性が高いと考えた。また、間葉系前駆細胞を用いた分子スクリーニングから、骨格筋の恒常性を維持する分子のスクリーニングを行う。骨格筋内で生じる、異常な異所性骨化、異所性脂肪化を抑制することで、骨格筋の恒常性を保つ作用のある分子探索を目的とした。本研究の遂行による、新しい筋萎縮メカニズムの解明は、近年社会的問題となっているサルコペニアを始めとする様々な病態が大きく改善される可能性のある重要な研究である。

3. 研究の方法

ヒト骨格筋組織をコラゲナーゼ処理し、その後数日間培養した後、FACSを用いて、筋衛星細胞(CD56 陽性細胞)、間葉系前駆細胞(PDGFR 陽性細胞)のソーティングを行う。単離細胞は実験に必要な数まで増やして実験材料として使用し、一部を凍結保存する。単離細胞の分化度を表面抗原の量、分化誘導させたときのミオシン陽性筋管細胞の数から確認し、分化度の高い細胞を実験へ用いる。分子スクリーニングには、天然物由来ライブラリーを用い、細胞へ添加し、分化を抑制する分子を探索する。その後、毒性試験、細胞内のシグナルを確認する。透析患者由来血清解析は、血中クレアチニン量をもとに骨格筋量を算出し、筋萎縮が見られた患者血清について筋衛星細胞へ添加し、筋線維の萎縮度を調べる。

4. 研究成果

本研究期間中に、筋衛星細胞の単離方法の見直しを行った。分化度の高い筋衛星細胞を得るために条件検討を行った。細胞継代のタイミング、培養期間、細胞の培養密度と条件を検討した所、培養密度と培養期間が分化度の維持に重要であることが明らかになった。また、表面マーカーによって再度ソーティングを行い単離し直すことも、適切ではないことが明らかになった。その結果、スタート時の骨格筋量を増やし、ソーティングにより単離する細胞数を増やすことが最も分化度が高い細胞を多く回収する条件であ

った。それらの細胞を用いて多くの共同研究を実施することが出来た（業績 1,3,4）。高分化能をもつ筋衛星細胞の単離に時間を要したため、間葉系前駆細胞を用いた実験を進めた。骨格筋間葉系前駆細胞は、恒常性の破綻が生じた時に、骨格筋内で異所性の脂肪組織、骨組織を生じる原因細胞である。骨格筋の恒常性の維持を目的として、骨格筋異所性骨化抑制分子の探索を行った。ヒト骨格筋より単離した間葉系前駆細胞へ骨分化を行い、その際に天然由来分子ライブラリーを添加し、骨形成抑制分子のスクリーニングを行った。その結果、4種類の分子が骨形成を抑制することが明らかになった。2次スクリーニングで、濃度依存性について調べた所、2種類の分子に絞り込まれ、さらに、細胞毒性をWST-8で調べた所、2種類の分子について細胞毒性がなく、骨分化を抑制することが明らかになった。薬剤添加後の細胞の形態解析から最終的に1分子が、細胞毒性なく、骨形成を抑制することが明らかになった。この1分子について、骨形成シグナルの中心である、BMPシグナルについてしらべた。BMPシグナルは、細胞内でリン酸化されたSmad1/5/8のリレーにより情報伝達される。今回分子スクリーニングによって得られた骨形成抑制分子は、Smad1/5/8のリン酸化を抑えていた事からBMPシグナルの抑制効果が一因であることが明らかとなった。今後はさらに他のシグナル伝達について詳細を明らかにする予定である。今回のスクリーニングで、骨化抑制をアリザリンレッド、アルカリフォスファターゼについて調べたが、間葉系前駆細胞の軟骨分化への効果を調べるために、軟骨分化誘導系の実験系の構築を行った。間葉系前駆細胞のペレット培養を行い、軟骨分化誘導を行い、2週、3週間後に凍結組織標本を作製し、アルシャンブルー染色により形成された軟骨を染色し、軟骨分化度を計測できるか検討した。その結果、間葉系前駆細胞は軟骨へ分化は行すが、薬剤のスクリーニング、薬剤の効果を評価するほどの差を捉えることが難しかった。また、本研究と同様の実験系を用い、FDA認証ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、効果のある1分子を発表することが出来た（業績 2）。

長期透析患者による筋萎縮度を血中クレアチニン濃度をもとに算定した。80件体の患者血液検査情報から骨格筋量の減少を調べた所、筋萎縮度がひどかった検体、筋萎縮があまり見られなかった検体を特定することが出来た。今後はこれらの血清を用いて、筋管細胞を作用させ、萎縮効果のある患者血清を特定し、その血清について解析を続ける予定である。

業績

1) Hitachi K, **Nakatani M**, Funasaki S, Hijikata I, Maekawa M, Honda M, Tsuchida K. Expression Levels of Long Non-Coding RNAs Change in Models of Altered Muscle Activity and Muscle Mass. *International Journal of Molecular Sciences*. 27;21(5). 2020年2月

2) Kusano T, **Nakatani M**, Ishiguro N, Ohno K, Yamamoto N, Morita M, Yamada H, Uezumi A, Tsuchida K. Desloratadine inhibits heterotopic ossification by suppression of BMP2-Smad1/5/8 signaling. *The Journal of Orthopaedic Research*. In Press 2020年2月

3) Hitachi K, **Nakatani M**, Tsuchida K. Long Non-Coding RNA Myoparr Regulates GDF5 Expression in Denervated Mouse Skeletal Muscle. *Non-coding RNA* 5(2) 2019年4月

4) Hitachi K, **Nakatani M**, Takasaki A, Ouchi Y, Uezumi A, Ageta H, Inagaki H, Kurahashi H, Tsuchida K. Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation. *EMBO reports* 20(3) 2019年3月

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Zhang L, Zhou H, Hashimoto M, Okamura K, Matsui Y, Tsukazaki K, Hosoyama T, Nakatani M, Morita M, Yamada H, Tsuchida K, Fukada S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Reduced expression of calcitonin receptor is closely associated with age-related loss of the muscle stem cell pool.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCSM Rapid Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Long Non-Coding RNA Myoparr Regulates GDF5 Expression in Denervated Mouse Skeletal Muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Noncoding RNA	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ncrna5020033.	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 Hitachi K, Nakatani M, Takasaki A, Ouchi Y, Uezumi A, Ageta H, Inagaki H, Kurahashi H, Tsuchida K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 47468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201847468	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 Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi K, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, Kahyo T, Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka N, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H, Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K.	4. 巻 9
2. 論文標題 UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-06197-y.	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 Takehiro Kasai, Masashi Nakatani, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno, Naoki Yamamoto, Mitsuhiro Morita, Harumoto Yamada, Kunihiro Tsuchida, Akiyoshi Uezumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Promethazine Hydrochloride Inhibits Ectopic Fat Cell Formation in Skeletal Muscle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2627-2634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.08.008	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中谷 直史、山本 直樹、森田 充浩、山田 治基、土田 邦博
2. 発表標題 ヒト骨格筋由来細胞を用いた分子スクリーニング
3. 学会等名 日本肥満学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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	中井 滋 (Nakai Sigeru) (20345896)	藤田医科大学・保健学研究科・教授 (33916)	