

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0164

研究課題名（和文）光時空間動態操作による生体内筋機能制御

研究課題名（英文）Control of muscular function by manipulating spatiotemporal dynamics with light

研究代表者

浅野 豪文（ASANO, Toshifumi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30552476

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 15ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は骨格筋の再生、形成における活動依存的な調節機構を明らかにするために、光で筋収縮を制御できる骨格筋運動モデルの開発を目的とした。骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞（サテライト細胞）から筋線維を再構築し、光に対する収縮能を有する細胞であることを確認した。光運動筋組織の培養を検討し、刺激と収縮力を計測できる実験系を構築した。光照射による運動刺激を継続的に加えることによって筋機能が維持されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は損傷しても速やかに回復することのできる再生能力に富んだ組織であり、筋組織の維持機構を明らかにすることは重要である。本研究では神経活動を伴わない収縮運動が骨格筋の形成や維持にどのように働いているかを評価する運動モデルの基盤技術を構築した。光で運動を制御できる骨格筋は収縮の強度や時間、活性化する筋線維を正確にコントロールすることができ、創薬研究や筋疾患の治療法への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We developed a skeletal muscle contraction model that can control with light to investigate the activity dependent modulation and maturation of skeletal muscle development. Photosensitive muscle fibers were reconstructed from satellite stem cells which express light-sensitive actuators, channelrhodopsin-2 (ChR2), and induced contractile responses synchronized with light. Our results suggested that muscle function is maintained by chronic optogenetic stimulation.

研究分野：細胞工学

キーワード：骨格筋 筋収縮 光遺伝学

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は活動量に応じて機能的、構造的な適応能を持ち、運動負荷の増大は肥大をもたらし、不活動などによる筋活動量の低下は萎縮を引き起こす。筋肉は神経からの刺激、ホルモンによる刺激、収縮様式の異なる運動刺激、受動的な伸張刺激などに応じて筋線維の大きさや筋組成が変化する。骨格筋の再生、成長を担うのが筋衛星細胞（サテライト細胞）と呼ばれる幹細胞である。損傷を受けるとサテライト細胞の活性化が起こり、修復に必要な細胞数を確保するために活発に増殖を繰り返して筋芽細胞を産生する。その後、筋芽細胞は互いに融合して筋管細胞となり損傷した筋線維を修復、もしくは既存の筋線維の損傷部に融合することで骨格筋の再生が行われる。また筋の修復のみならず、運動刺激によってもサテライト細胞による筋線維の肥大が起こる。骨格筋の形成過程にはサテライト細胞の活性化、増殖、細胞融合の3つのステップが必要であるが、それぞれのステップにおける分子機序は未解明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究は骨格筋組織の再生、形成における活動依存的な調節機構を調べるために、光運動骨格筋モデルを開発することを目的とした。光で筋収縮活動をコントロールして組織の恒常性に果たす役割について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨格筋細胞の初代培養

初代骨格筋細胞は光応答性イオンチャネル (ChR2(H134R)-EYFP) を筋特異的に発現するトランスジェニックマウスの後肢骨格筋から単離した。摘出した骨格筋から結合組織と脂肪組織を可能な限り取り除いた後、はさみを用いて細切した。コラゲナーゼ溶液を加えて37°Cで1時間処理をした。培地を加えて懸濁した後、40 $\mu$ mセルストレーナーで濾過した。遠心分離して上清を除去した後、培地で再度懸濁して培養皿に播種した。細胞培養培地は20% FBS (Fetal bovine serum)、bFGF (fibroblast growth factor)、1% Penicillin/streptomycinを含むHam's F-10を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。筋分化はコンフルエントに増殖させた後、2% HS (horse serum)、10 nM insulinを含むDMEMの分化培地に切り替えて同様に行った。実験計画は所属機関および海外受入先機関の遺伝子組換え生物等実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得た。

#### (2) 筋組織切片の作製

トランスジェニックマウスを麻酔下で神経切断を行い、除神経後7日目と14日目に筋組織を取り出して免疫蛍光染色により評価した。組織を摘出した後、OCT (optimal cutting temperature) コンパウンドに包埋して液体窒素内で急速凍結した。包埋された組織サンプルをクライオトームにより10  $\mu$ mの連続凍結切片を作製した。免疫染色は10%ホルマリンで固定を施して、0.2% TritonXを含むPBSで15分間浸漬した後、10%馬血清を含むPBSでブロッキングを行った。その後、MyHC-I、MyHC-II、lamininの1次抗体を室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、Alexa Fluor 488、594、633とHoechst33258の2次抗体を室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、封入剤を用いてカバーガラスで包埋し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。撮影した横断面の画像から筋線維タイプ毎の断面積と線維数を計測した。マウスは固型飼料、新鮮な水道水を自由に摂取させた2-6ヶ月齢を使用した。

#### (3) 収縮骨格筋組織の培養

トランスジェニックマウスのヒラメ筋を摘出した後、両端の腱組織をフォーストランスデューサーに接続されたフックに固定した。培養容器に二酸化炭素と酸素の混合ガスをバブリングした培養液を循環させて37°Cで24-72時間の培養を行った。筋組織表面に光ファイバーを設置して、培養下で青色光を照射した。パルスジェネレータによりプログラム化されたパルス信号を青色レーザー光源に入力して、任意のタイミング、持続時間の光刺激を行った。培養開始前と培養後にフォーストランスデューサーにより筋収縮力を測定した。測定終了後にOCTコンパウンドに包埋して液体窒素内で急速凍結した。包埋された組織サンプルを上記と同様にクライオトームにより10  $\mu$ mの連続凍結切片を作製した。

### 4. 研究成果

(1) 後肢筋から単離した筋細胞を増殖させた後、分化培地中で培養して筋管細胞を誘導し、光応答性について評価した。培養7日目以降には多核の筋管細胞が十分な細胞数、濃度で確認でき、黄色蛍光タンパク質 EYFP が認められる細胞を蛍光顕微鏡で観察できた。形成された筋管細胞に青色光 (480 nm) を照射すると筋収縮が誘発された。ChR を活性化しない赤色光 (605 nm) では収縮は観察されず、青色光に対して応答する初代骨格筋細胞を再構築することができた。 $\alpha$  アクチニンによる免疫染色により細胞内収縮構造の最小単位ユニットであるサルコメア (筋節) が認められた。単離した筋細胞を継代培養して、同様に筋管細胞の形成を試みたところ、数代の継代培養までは増殖させられること、誘導した筋管細胞には光応答性が維持されることを確認した。

(2) 骨格筋は代謝特性が異なる複数のタイプがあり、哺乳類の筋線維は遅筋線維（タイプ I）と速筋線維（タイプ II）に大別される。廃用性萎縮ではタイプ II 線維よりもタイプ I 線維が速く萎縮しやすく、部位により減少量や減少率、速度に違いがあることが知られている。神経切断による除神経を行ったヒラメ筋と長指伸筋について萎縮の変化を調べた。除神経後 7 日目と 14 日目にそれぞれ組織を取り出して免疫蛍光染色した。長指伸筋では、通常タイプ I 線維よりも大きい断面積を持つタイプ II 線維が萎縮を起し、14 日目ではタイプ I と同等もしくはそれよりも小さくなっていた。タイプ I 線維については線維径や数の減少はほとんど見られなかった。一方、タイプ I 線維が優位の筋であるヒラメ筋では 7 日目からタイプ I 線維の萎縮が見られ、14 日目には断面積の著しい減少が認められた。

(3) 摘出したヒラメ筋をトランスデューサーを接続した培養容器内で組織培養を行い、開始前後の収縮力および光応答性について検討した。筋組織表面に設置したファイバーを通して青色光を照射すると収縮運動が誘発された。光照射とともに数十ミリ秒で最大となり、消灯とともに弛緩することを確認した。照射する光パルスの強度 (0.15~1.4 mW/mm<sup>2</sup>)、持続時間 (0.5-50 ms) により発生する収縮力をコントロールすることができた。収縮力を測定すると培養開始直後では 61.9±0.1 mN の収縮力に対して培養後は 25.3±0.2 mN と培養開始前の約 39%まで減少していた。培養中の組織に対して光刺激を加えたところ、刺激に対する反応性の維持および、収縮力の減少が抑制された。

新型コロナウイルス感染症により実験計画の大幅な変更を余儀なくされたが、本研究により構築した国際共同研究のネットワークを今後も継続し、光で運動を制御できる骨格筋モデルを用いて、神経活動を伴わない収縮運動による骨格筋の維持機構についてさらに解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchimura Tomoya, Asano Toshifumi, Nakata Takao, Hotta Akitsu, Sakurai Hidetoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 A muscle fatigue-like contractile decline was recapitulated using skeletal myotubes from Duchenne muscular dystrophy patient-derived iPSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xcrm.2021.100298	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 Asano Toshifumi, Teh Daniel Boon Loong, Yawo Hiromu	4. 巻 1293
2. 論文標題 Application of Optogenetics for Muscle Cells and Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 359 ~ 375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-8763-4_23	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

〔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 浅野 豪文、中田 隆夫
2. 発表標題 骨格筋芽細胞における細胞内カルシウムの特異的操作
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	サッセ フィリップ  (Sasse Philipp)	ボン大学・Institute of Physiology I・Professor	

	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
その他の研究協力者	ホルスト フランク  (Holst Frank)		
その他の研究協力者	マーレン ダニエラ  (Malan Daniela)		
その他の研究協力者	ヤングサングトン ワンチャナ  (Jangsangthong Wanchana)		
その他の研究協力者	ジン チュゼン  (Jin Chu-Jen)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

シンガポール	Department of Biochemistry	Yong Loo Lin School of Medicine	National University of Singapore	
--------	----------------------------	------------------------------------	-------------------------------------	--