

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11089

研究課題名（和文）脂質スフィンゴミエリンの合成系によって制御される筋肥大の解明と筋肥大促進法の開発

研究課題名（英文）Study of muscle hypertrophy regulated by the lipid sphingomyelin synthesis system and development of methods to promote muscle hypertrophy

研究代表者

長田 洋輔（Nagata, Yosuke）

岡山理科大学・理学部・講師

研究者番号：50401211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウス筋芽細胞株C2C12にスフィンゴミエリン合成酵素Sms1, Sms2の強制発現によって筋核数の多い巨大な筋管が形成されること、siRNAを用いたノックダウンによって筋管形成が抑制されることを明らかにした。Sms1の強制発現によって、筋分化制御因子MyoD, Myf5, myogenin, MRF4の発現量に大きな変化は見られなかった。その一方で、筋細胞融合関連タンパク質myomaker陽性シグナルの増加が検出された。スフィンゴミエリン合成酵素の強制発現によってもたらされるスフィンゴミエリンの増加は、筋分化でなく、筋細胞の融合を促進し、巨大な筋管が形成されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋はわれわれが体を動かすために必要な組織であり、加齢に伴う運動機能の低下を防ぐためには骨格筋の再生能と可塑性のメカニズムを解明し、筋量を維持する方法を開発することが有効と考えられる。骨格筋の機能を担う筋線維は多数の筋前駆細胞の融合によって形成され、筋肥大の際には既存の筋線維に新たな筋前駆細胞が融合する。本研究では、骨格筋の細胞融合に膜脂質の一種であるスフィンゴミエリンが関与することを明らかにし、筋肥大の促進に役立てられる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We found that forced expression of sphingomyelin synthases Sms1 and Sms2 in the mouse myoblast cell line C2C12 resulted in the formation of large myotubes with a high number of myonuclei, and that siRNA-based knockdown suppressed myotube formation. MyoD, Myf5, myogenin, and MRF4 were not significantly altered by forced expression of Sms1. On the other hand, an increase in myocyte fusion-related protein myomaker positive signal was detected, indicating that the increase in sphingomyelin induced by forced expression of sphingomyelin synthetases promotes myocyte fusion and the formation of giant myotubes rather than muscle differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨格筋 筋肥大 スフィンゴミエリン スフィンゴミエリン合成酵素 細胞融合

1. 研究開始当初の背景

骨格筋はわれわれが体を動かすためばかりでなく、姿勢の維持や呼吸のためにも必要な組織である。骨格筋の機能は筋線維と呼ばれる巨大な細胞が担っている。骨格筋は損傷を負っても短期間のうちに筋線維を再生する。また、負荷を与えると肥大する一方で、不使用状態が続くことで萎縮するという可塑性を持つ。骨格筋の量(筋量)と健康寿命には正の相関があること(Srikanthan and Karlamangla, 2014)から、私は骨格筋の再生能と可塑性を利用して筋量維持の方法を開発することができれば、健康増進に貢献できると考えた。

骨格筋の再生能は筋サテライト細胞と呼ばれる骨格筋幹細胞の働きによる。平静時には活動を停止している筋サテライト細胞が活性化し、多数の筋前駆細胞を生み出すと、筋前駆細胞同士の融合によって未熟な筋線維である筋管が形成される。一方で、筋肥大は筋線維のタンパク質合成が増加することによって始まり、細胞質が十分に拡大すると筋サテライト細胞に由来する筋前駆細胞の融合によって新たな核を獲得する。筋再生、筋肥大に共通するのは筋前駆細胞による細胞融合である。筋前駆細胞の融合には接着タンパク質やプロテアーゼが関与することは明らかにされているものの、そのメカニズムは十分には解明されていない。

細胞融合は細胞膜の融合を伴うため、膜脂質の存在にも目を向ける必要がある。生体膜を構成する脂質の分子種は多種多様であり、それぞれの脂質分子が固有の役割を担っている可能性がある。実際に、ホスファチジルセリンは筋前駆細胞の融合の際に細胞表面に露出し、細胞融合に必要であることが明らかにされている(Hochreiter-Hufford et al, 2013)。私はリン脂質とスフィンゴ脂質の両方の性質を備えた脂質スフィンゴミエリンに注目した。スフィンゴミエリンは細胞膜を構成する主要なリン脂質の一つであり、シグナル分子となるセラミド等の貯蔵体としての働きに加えて、他のスフィンゴ脂質やコレステロールと形質膜状で会合し脂質マイクロドメインを形成する。脂質マイクロドメインは細胞接着や細胞内情報伝達系の集積所として重要な役割を果たすと考えられている。

私はこれまでに、細胞表面のスフィンゴミエリンが筋サテライト細胞の活性化にともなって減少すること、活性化した筋衛星細胞が休眠状態に戻る際にはもとのレベルまで回復することを報告した(Nagata et al, 2006)。そしてスフィンゴミエリンの代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸が筋サテライト細胞の活性化を促進することを明らかにした(Nagata et al, 2006)。その一方で、スフィンゴミエリンが筋分化、特に筋前駆細胞の融合に関与している可能性も考えられたため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究はスフィンゴミエリンの合成系に注目し、筋分化におけるスフィンゴミエリンの役割を明らかにするとともに、スフィンゴミエリン合成系をターゲットにすることで筋肥大の促進や筋萎縮の抑制を実現する方法の開発を目指した。

スフィンゴミエリンは生体内において合成と分解によって調整される。スフィンゴミエリンの合成はスフィンゴミエリン合成酵素SMSによって触媒される。SMSには細胞内局在の異なる2種類が存在し、Sms1はゴルジ体に局在し、Sms2はゴルジ体および形質膜に局在する。

そこで本研究では筋細胞におけるスフィンゴミエリン合成酵素の役割に注目し、筋前駆細胞が融合する過程でスフィンゴミエリンが果たす役割を解明し、骨格筋の大きさを維持する場面でのスフィンゴミエリン合成系の必要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス骨格筋由来の細胞株 C2C12 細胞を用いて実験を行った。C2C12 細胞は高血清条件では無限増殖能を示すが、低血清条件にすることで容易に筋分化を誘導することができる。

マウス Sms1 あるいは Sms2 の強制発現には、テトラサイクリン発現誘導システム Tet-On を用いた。そのためには、CMV プロモーター制御下にリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) を安定的に発現する C2C12 細胞に、tet0 反復配列をもつテトラサイクリン応答因子 (TRE) の下流に Sms1 あるいは Sms2 の遺伝子をコードする応答発現プラスミドをトランスフェクションし、安定発現株を選別し、C2Tet-Sms1 細胞および C2Tet-Sms2 細胞を樹立した。一方、Sms1 あるいは Sms2 のノックダウンは siRNA のトランスフェクションによって誘導し、定量的 RT-PCR によっていずれも 1 割程度に転写産物量が減少したことを確認した。

細胞の増殖、分化は各マーカーの免疫細胞化学的染色によって検出した。増殖については Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine; 5-エチニル-2'-デオキシウリジン) 取り込み、あるいは細胞核数によって、分化については筋分化を制御する転写因子 MyoD, myogenin, と横紋筋型ミオシン重鎖 (sMyHC) によって判定した。また、脂質マイクロドメインはコレラ毒素 B サブユニット (CTB) により、M-cadherin, β -catenin, p120 catenin, Myomaker の蛍光抗体法によって検出した。

筋分化関連遺伝子、筋細胞融合関連遺伝子については、定量的 RT-PCR によって転写産物量を比較した。C2Tet-Sms1 細胞から RNA を抽出し、逆転写反応によって調製した cDNA を鋳型として定量的 PCR を行い、比較 C_T 法によって測定した。

4. 研究成果

マウス骨格筋細胞株 C2C12 に Tet-On 発現誘導システムを用いてスフィンゴミエリン合成酵素 Sms1 あるいは Sms2 を発現する細胞株 C2Tet-Sms1 細胞, C2Tet-Sms2 細胞を樹立した。これらはテトラサイクリン系抗生物質ドキシサイクリン (Dox) によって、Sms1 あるいは Sms2 の発現を誘導することができる。強制発現した Sms1 はゴルジ体に、Sms2 は形質膜を中心とする細胞膜系に局在し、いずれもスフィンゴミエリン結合タンパク質ライセニンの細胞表面への結合が顕著に増大した。

Sms1, Sms2 の強制発現によって通常よりも筋核数の多い巨大な筋管が形成された (図 1, 2)。対照的に、siRNA を用いて Sms1 あるいは Sms2 をノックダウンすると、筋管形成が抑制された (図 3)。なお、Sms2 に比べて Sms1 をノックダウンした場合に強い影響が見られたことから、通常の筋形成においては Sms1 が中心的な役割を担

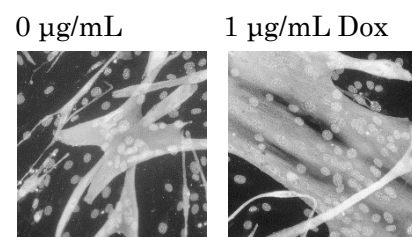


図 1. C2Tet-Sms1 細胞

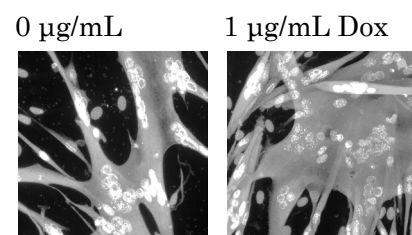


図 2. C2Tet-Sms2 細胞

っていると考えられる。そこで、以降の実験は Sms1 を中心に解析を行った。

Sms1 の強制発現を行っても、筋分化制御因子 MyoD および myogenin, あるいは横紋筋型ミオシン重鎖の発現量は、タンパク質レベルでは大きくは変化しなかった。これらはいずれ

も転写産物レベルでは増加傾向が見られたものの、統計的に有意な変化ではなかった。このことから、Sms1 は筋分化を促進するのではなく、筋細胞の融合を促進すると考えた。

そこで、筋細胞の融合に関与するタンパク質 myomaker (Millay et al, 2013), myomixer の検出を試みた。これらは転写産物レベルでの顕著な増加は見られなかったが、免疫細胞化学的検出では Sms1 強制発現によって myomaker 陽性シグナルが増加したことから、Sms1 の強制発現によってもたらされたスフィンゴリエリンの増加は、筋細胞の融合を促進することが明らかになった。

スフィンゴリエリンは脂質マイクロドメインの構成要素であり、スフィンゴリエリン合成量の変化によって脂質マイクロドメインの動態が変化する可能性が考えられた。脂質マイクロドメインの動態が、筋細胞表面の接着タンパク質等の局在を制御することによって筋細胞融合を調節することが報告されている (Mukai and Hashimoto, 2013)。そこで、M-cadherin, β -catenin, p120-catenin の局在を免疫細胞化学的に検出したが、Sms1 強制発現による変化は見られなかった。その一方で、コレラ毒素 B サブユニット (CTB) によって脂質マイクロドメインの検出を試みたところ、Sms1 強制発現によって CTB 陽性シグナルが減少することが明らかになった。

以上の結果により、スフィンゴリエリン合成酵素の強制発現によるスフィンゴリエリンの増加は、脂質マイクロドメインのダイナミックな変化に影響を与え、myomaker の細胞内局在を変化させることによって、筋細胞の融合が促進することが考えられる。

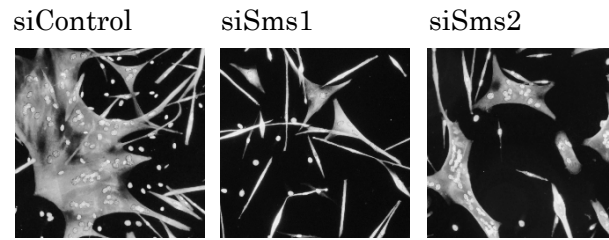


図 3. Sms1, Sms2 ノックダウンによる影響

<引用文献>

- Hochreiter-Hufford, A.E., et al., *Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion*. Nature, 2013. 497(7448): 263-267
- Millay, D.P., et al., *Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation*. Nature, 2013. 499(7458): 301-305
- Mukai, A. and N. Hashimoto, *Regulation of pre-fusion events: recruitment of M-cadherin to microrrafts organized at fusion-competent sites of myogenic cells*. BMC Cell Biol, 2013. 14:37
- Nagata, Y., et al., *Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2006. 54(4): 375-384
- Nagata, Y., et al., *Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling*. Journal of Cell Biology, 2006. 174(2): 245-253
- Srikanthan, P. and A.S. Karlamangla, *Muscle mass index as a predictor of longevity in older adults*. Am J Med, 2014. 127(6): 547-553

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 長田洋輔, 松田良一	4. 巻 52
2. 論文標題 スフィンゴ脂質による骨格筋形成のコントロール	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 43-46
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 無
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 Tsuchiya Masaki, Hara Yuji, Okuda Masaki, Itoh Karin, Nishioka Ryotaro, Shiomi Akifumi, Nagao Kohjiro, Mori Masayuki, Mori Yasuo, Ikenouchi Junichi, Suzuki Ryo, Tanaka Motomu, Ohwada Tomohiko, Aoki Junken, Kanagawa Motoi, Toda Tatsushi, Nagata Yosuke, Matsuda Ryoichi, Takayama Yasunori, Tominaga Makoto, Umeda Masato	4. 巻 9
2. 論文標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04436-w	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長田洋輔, 松田良一
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素による骨格筋形成の制御についての研究
3. 学会等名 日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長田 洋輔, 松田 良一
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素による筋芽細胞の機能制御
3. 学会等名 動物学会第89回札幌大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------