

令和 5 年 4 月 6 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19751

研究課題名(和文) 生体の性質を獲得した成熟型培養筋線維の創出

研究課題名(英文) Creation of mature cultured muscle fibers that acquire its original function

研究代表者

古市 泰郎 (Furuichi, Yasuro)

東京都立大学・人間健康科学研究科・助教

研究者番号：40733035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：世界中で使われている骨格筋の培養細胞(筋管細胞)は、生体の骨格筋細胞(筋線維)に比べると幼弱で骨格筋本来の性質を獲得しきれていない。本研究は、筋管細胞の成熟度を促進させる方法を開発し、成熟した培養「筋線維」を創ることに挑戦した。

まずは細胞の数を確保するため、筋芽細胞の増殖を促進させる因子とその機序を明らかにした。さらに、インクジェット加工装置によって細胞外基質を線状に塗布し、筋細胞の伸長方向を統一させることに成功した。また、骨格筋と筋管細胞の網羅的な遺伝子発現解析によって分化の促進因子を絞り込んだ。以上のように、筋細胞の成熟度を高める条件を見出し、進化した筋細胞の培養方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の未知なる働きを解明するためには培養細胞を用いた実験が必須であるが、世界中で使われている「筋管細胞」は、生体の「筋線維」に比べると極めて幼弱で骨格筋本来の性質を獲得しきれていない。そのため、筋管細胞を用いた実験には限界があり、それが骨格筋研究の発展を阻んできた。筋管細胞の成熟度を促進させ、既存の筋管細胞よりも成熟した培養「筋線維」を創ることができれば、骨格筋細胞の生物学的意義を解明する研究が加速し、医療や健康科学の発展に貢献される。

研究成果の概要(英文)：Cultured skeletal muscle cells (myotubes) used all over the world are unmaturing compared to in vivo skeletal muscle cells (myofibers), and do not have the original properties of skeletal muscle. In this study, we developed a method to promote the differentiation of myotubes and challenged to create a mature cultured myofiber. First, we found the factors to enhance the proliferation of myoblasts and the underlying mechanisms and succeeded to acquire a large number of cultured cells. Furthermore, we unified the elongation direction of muscle cells by applying the extracellular matrix linearly with an inkjet printing device. In addition, we performed the screening for the factors that promote differentiation by comprehensive gene expression analysis of muscle tissue and myotube. As described above, we found the conditions for increasing the maturity of muscle cells and established a method for culturing evolved muscle cells.

研究分野：運動生化学

キーワード：骨格筋 培養細胞 幹細胞 細胞分化 細胞増殖 遺伝子発現解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は動きを生み出す運動器としてだけでなく、代謝や内分泌器官として働くことから、健康を維持するためにも重要な臓器として注目されている。骨格筋の詳細な解析には、培養細胞を用いた研究が広く行われている。骨格筋の培養細胞は、初めは「筋芽細胞」と呼ばれる分裂可能な単核の細胞であるが、成熟すると互いに融合して多核の長い「筋管細胞」に成る。筋管細胞は遺伝子改変が比較的容易で、筋収縮もさせられることから、骨格筋の *in vitro* モデルとして世界中で使用されている。しかし、実際は生体内の本物の筋細胞（筋線維）のレベルまでは成熟しきっておらず、骨格筋としての複数の性質を獲得できずにいる。

2. 研究の目的

本研究では、筋管細胞をさらに成熟（分化）させ、これまで誰も成し遂げられなかった培養「筋線維」を作製することを目的とした。本研究によって、進化した培養筋細胞が完成すれば、それは骨格筋の基礎研究を進展させるだけでなく、創薬を目的とした質の高い化合物スクリーニングを実現させる。また、再生医療の分野では、未分化の細胞を生体に移植すると、それが腫瘍を形成し、目的の機能を果たせないといった技術上の問題が実用化への道を阻んでいるが、本研究はその問題解決の糸口を拓くことができる。上記目標のために下記の目的を掲げた。

(1) 初代細胞を大量に培養する培養液の開発と機序の解明

筋管細胞が筋線維に比べて細いのは、単純に細胞数が足りない可能性がある。申請者はマウス骨格筋からサテライト細胞を大量に増殖させられる培養液の開発を行ってきた。これまでの研究によってグルコース濃度が細胞の増殖に影響を与える可能性を掴んでいる。サテライト細胞の増殖を促進するグルコースの濃度と機序を明らかにすることで、細胞を大量に培養する実験条件を確立することを目指した。

(2) 筋管細胞の伸長方向を揃える

生体の筋線維は方向が統一されており、骨格筋の収縮装置（サルコメア）は規則的に整列しその構造も明確に観察される。しかし筋管細胞はランダムな方向に伸長するため、サルコメアの形成が不十分で構造も不明確である。そこで、細胞の接着に必要なマトリゲル（接着因子の混合物）を「線状」に塗布すれば、細胞はそこだけに整列して伸長方向が揃うと考えた。マウス骨格筋から酵素処理によって骨格筋の組織幹細胞「サテライト細胞」を剥離させ、それを培養する。超微細インクジェットプリンタ（SIJ テクノロジー）によって細胞径の太さのマトリゲルラインを培養皿に印刷する。

(3) 骨格筋細胞にあって筋管細胞には足りないシグナル経路を補完する

筋線維に成熟するためには、骨格筋以外の細胞や組織からの分泌物や接触刺激等が必要な可能性がある。それが事実ならば、細胞培養では筋細胞だけを集めて純粋培養するため、それらの因子の入力が生じていないことが問題と考えられる。そこで筋管細胞で欠損しているシグナル経路（特に分化や成長に関わる）を見つけ出し、遺伝子操作によって強制的にその経路を回復させることに挑む。筋管細胞と生体の骨格筋組織からそれぞれ RNA を回収し、DNA マイクロアレイ解析によって筋管細胞に足りない遺伝子群とシグナル経路を探索する。

3. 研究の方法

(1) サテライト細胞の増殖培養

マウスの骨格筋（長指伸筋）から筋線維を単離し、酵素処理によってサテライト細胞を播種した。高グルコース培地（最終濃度 19 mM）と低グルコース培地（最終濃度 2 mM）をそれぞれ調製し、グルコース濃度の異なる条件で培養した。培養 3, 4, 5, 6 日目に細胞を 4%PFA で固定し、筋分化のステージを同定するためにそれぞれの段階のマーカー・タンパク質の免疫染色を行った。また、ウシ胎児血清（FBS）中のグルコースを分解するためにグルコースオキシダーゼを、またその反応で生成される H_2O_2 を分解するためにカタラーゼをスライドガラスに固定して、FBS を 3 週間反応させた。

(2) マトリゲルの塗布

細胞外基質マトリゲルを 1.0 mg/mL 濃度で調製し、それをサブフェムトインクジェット加工装置（SIJ テクノロジー）によって培養プレートに塗布した。マトリゲル溶液は線状に塗布し、幅は 10-50 μm とした。一週間増殖培養したサテライト細胞由来の筋芽細胞を継代し、その培養プレートに播種した。分化培地で培養後、 α -actinin で免疫染色した。

(3) 遺伝子発現の網羅的解析

マウス下肢から長趾伸筋（EDL）を摘出した。また、それらの筋線維に付着しているサテラ

イト細胞を培養し、増殖後に継代、分化誘導を行って筋管細胞を作製した。分化5日目にRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った（DNAチップ研究所に委託）。

4. 研究成果

(1) サテライト細胞の増殖培養

サテライト細胞を低グルコースで培養すると6日目の時点で細胞数が高グルコース条件よりも有意に増加し、高濃度のグルコースは細胞の増殖を抑制することが示唆された。また、Pax7とMyoDを共染色した結果、Pax7陽性かつMyoD陰性の細胞集団の割合が、高グルコースより低グルコース条件で有意に増加したことが示された（図1b）。

FBSで調製した増殖培地はグルコース濃度が0.1 mMで、高グルコース培地の約1%程度であった。グルコースを枯渇させた培地でサテライト細胞を培養したところ、通常の増殖培地と同程度に細胞は増殖した。細胞の増殖を促進させるグルコース濃度の閾値を検討するため、グルコースを段階的に調製した培地で細胞を培養した。細胞増殖はグルコース濃度が8 mM以下で促進されることが分かった。

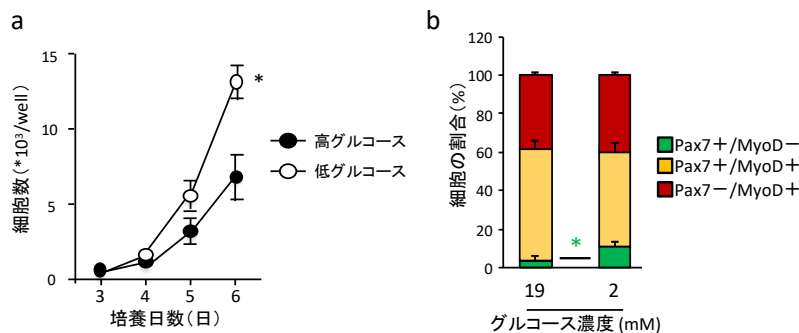


図1. グルコース濃度によるサテライト細胞の増殖と運命決定の変化

a) サテライト細胞を高グルコース（19 mM）と低グルコース（2 mM）の増殖培地で培養した際の細胞数の変化を示した。培養6日目において、低グルコース条件の方が高グルコースよりも有意に細胞数は増加していた。

b) 培養6日目のサテライト細胞を固定し、Pax7およびMyoD抗体で免疫染色後、細胞数を計測した。Pax7+/MyoD-細胞の細胞集団の割合は、低グルコース（2 mM）で有意に増加した。

(2) 筋管細胞の配向

インクジェット加工装置によって50 μm幅のマトリゲルラインを1.0 mm間隔で培養プレートに作製し、そこに筋芽細胞を播種した。細胞はマトリゲル上に接着し、マトリゲルの無い部分に接着した細胞は少なかった。分化培地で5日間培養すると、マトリゲル上で融合した細胞はラインに沿って伸長した。α-actininで免疫染色したところ、マトリゲルラインで分化した細胞にはサルコメア構造が観察された（図2）。

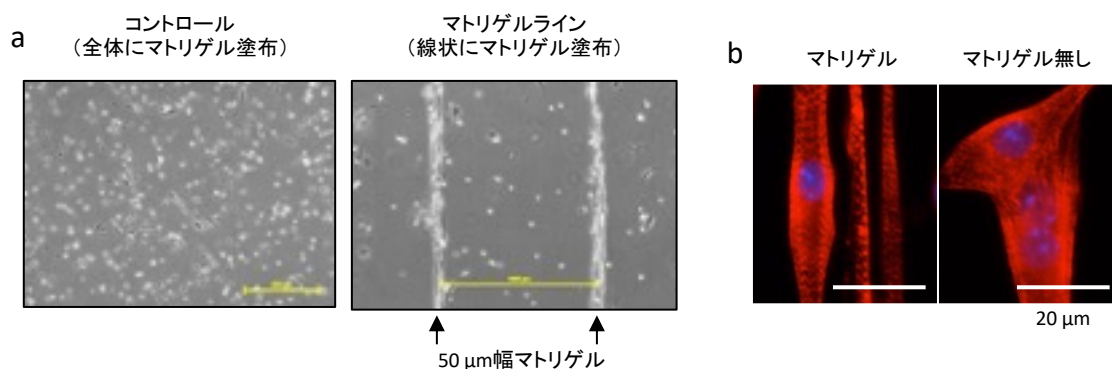


図2. 筋管細胞の配向培養

a) マトリゲルを全体的（左）と線状（右）に塗布して筋芽細胞を培養した。マトリゲルラインに沿って筋芽細胞が接着した。

b) 分化後に筋管細胞をα-actininで免疫染色した。マトリゲルに沿って伸長した細胞にはサルコメア構造が観察された。

(3) 遺伝子発現解析

EDLの骨格筋組織と筋管細胞のDNAマイクロアレイ解析を行った。両者の遺伝子リストを比較したところ、骨格筋で4倍以上発現が亢進したプローブは2269個、逆に筋管細胞で亢進したプローブは2092個であった。GO解析を実施したところ、Biological Process、Molecular

Function に有意差が認められた。そのリストの中から、筋分化を促進する候補因子を抽出し、筋芽細胞に遺伝子導入、また、siRNA によるノックダウンを行った。筋分化マーカーの発現量を指標に、筋成熟の変化を評価した。

以上のように本研究の結果から、培養筋管細胞を成熟化させるための条件が見出された。細胞増殖を促進させるための培養方法を用いた上で、今後は配向性や分化促進因子導入などの各要素を組み合わせた上で検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Furuichi Yasuro, Kawabata Yuki, Aoki Miho, Mita Yoshitaka, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 640399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.640399	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 Tsukamoto-Sen Sakuka, Kawakami Shinpei, Maruki-Uchida Hiroko, Ito Ryouichi, Matsui Naoko, Komiya Yuki, Mita Yoshitaka, Morisasa Mizuki, Goto-Inoue Naoko, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Morita Minoru, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of antioxidant supplementation on skeletal muscle and metabolic profile in aging mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 825 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0fo02051f	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 Hoshino Daisuke, Kawata Kentaro, Kunida Katsuyuki, Hatano Atsushi, Yugi Katsuyuki, Wada Takumi, Fujii Masashi, Sano Takanori, Ito Yuki, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Suzuki Yutaka, Fujii Nobuharu L., Soga Tomoyoshi, Kuroda Shinya	4. 巻 23
2. 論文標題 Trans-omic Analysis Reveals ROS-Dependent Pentose Phosphate Pathway Activation after High-Frequency Electrical Stimulation in C2C12 Myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101558 ~ 101558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101558	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 Tamura Kotaro, Goto-Inoue Naoko, Miyata Kaede, Furuichi Yasuro, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of treatment with conditioned media derived from C2C12 myotube on adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237095	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 Sakamoto Kenichi, Furuichi Yasuro, Yamamoto Masashi, Takahashi Megumi, Akimoto Yoshihiro, Ishikawa Takahiro, Shimizu Takahiko, Fujimoto Masanori, Takada Watanabe Aki, Hayashi Aiko, Mita Yoshitaka, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L, Ishibashi Ryoichi, Maezawa Yoshiro, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro, Takemoto Minoru	4. 巻 20
2. 論文標題 R3hdm1 regulates satellite cell proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e47957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201947957	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 Sato Satoko, Nomura Mitsuru, Yamana Ikko, Uchiyama Akira, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 83
2. 論文標題 A new in vitro muscle contraction model and its application for analysis of mTORC1 signaling in combination with contraction and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1851 ~ 1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1625261	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 古市泰郎, 藤井宣晴	4. 巻 269
2. 論文標題 加齢に伴う骨・骨格筋量減少に及ぼす運動の影響 - そのメカニズム -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 949 ~ 954
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 古市泰郎, 井上菜穂子, 増田和実	4. 巻 67
2. 論文標題 骨格筋におけるカルニチン : 動態解析から見た新たな役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 体力科学	6. 最初と最後の頁 261-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jspfsm.67.261	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 古市泰郎, 眞鍋康子, 藤井宣晴	4. 巻 17
2. 論文標題 内分泌器官としての骨格筋	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ortho Ped	6. 最初と最後の頁 6-9
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 古市泰郎, 藤井宣晴	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 加齢に伴う骨・骨格筋量減少に及ぼす運動の影響 - そのメカニズム -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 古市泰郎, 藤井宣晴	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 Goto-Inoue N, Morisasa M, Machida K, Furuichi Y, Fujii NL, Miura S, Mori T	4. 巻 33
2. 論文標題 Characterization of myofiber-type-specific molecules using mass spectrometry imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rapid Commun Mass Spectrom	6. 最初と最後の頁 185-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8319	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 Furuichi Y, Manabe Y, Takagi M, Aoki M, Fujii NL	4. 巻 13
2. 論文標題 Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0206146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0206146	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7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古市泰郎
2. 発表標題 RNA結合タンパクMusashiが骨格筋量の維持に果たす役割
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古市泰郎、川端有紀、青木美穂、眞鍋康子、藤井宣晴
2. 発表標題 高グルコースは骨格筋幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuro Furuichi
2. 発表標題 An in vitro model for evaluating skeletal muscle cell function: Myokine secretion and satellite cell myogenesis
3. 学会等名 京都大学ウイルス・再生医科学研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furuichi Y
2. 発表標題 Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes
3. 学会等名 23rd annual congress of European College of Sport Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古市泰郎
2. 発表標題 骨格筋の組織幹細胞を純粋かつ大量に増殖培養させる方法
3. 学会等名 第10回分子骨格筋代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古市泰郎
2. 発表標題 筋収縮によるマイオカインの分泌の証明とその調節機序
3. 学会等名 第13回日本運動免疫学研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 青木美穂, 三田佳貴, 内田沙綺, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 グルコース制限はサテライト細胞の純粋かつ大量培養を可能にする
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨格筋初代細胞の培養液	発明者 古市 泰郎, 眞鍋 康子, 藤井 宣晴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-000194	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京都立大学 運動分子生物学研究室 ホームページ
http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/index.html

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		
米国	University of California, San Diego	サンフォードコンソーシアム再生医学研究所	