

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19762

研究課題名（和文）運動を具現化する新規異種細胞間輸液制御モジュールを活用した細胞機能関連研究の挑戦

研究課題名（英文）Assessment of functional interactions between organs or tissues by using PC-controllable cell and tissue system modules containing subsystems which may simulate exercise training

研究代表者

橋本 健志（Hashimoto, Takeshi）

立命館大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70511608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：培地の輸液や自動回収作業を制御できるモジュールにて、C2C12骨格筋細胞に電気刺激（筋の収縮運動）を加え、その際の培地を自動回収することで、培地中に分泌された乳酸濃度をマニュアル操作と同様に解析できることを認めた。また、脂肪細胞内の中性脂肪を合成あるいは分解する薬剤刺激をコンピュータ制御により適宜加え、脂肪蓄積量を一定に制御できることが認められた。さらに、骨格筋細胞と脂肪細胞の機能を亢進しうる外的刺激（低酸素環境や機能性食品素材など）について、明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内では、組織と組織、あるいは臓器と臓器が機能的に連携し、健康状態を維持している。当該分野で、実験動物を使用している研究が難しくなっている中、特に運動・栄養処方を臨床応用研究に展開するための、組織間の機能関連亢進を意図した細胞培養研究は殆ど存在しない。

本研究で、各種運動・栄養刺激に対する細胞動態を検証しつつ、その知見を基軸とした骨格筋と脂肪組織の機能関連解析を実現し、その亢進を図るための基盤が形成できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：By using PC-controllable cell and tissue system modules containing subsystems of automated sampling, dispensing and electrical stimulations, we assessed the muscle contraction-induced lactate concentrations in media, and validated "exercise training" on muscle cells. Further, the application of the system to the feedback control of the lipid droplet (LD) size, where biochemical stimulation using insulin and adrenaline is controlled by a PC according to the obtained LD imaging data, was also validated. In addition, we determined exogenous stresses, which may enhance the function of skeletal muscle cells and adipocytes, were hypoxic condition and some functional nutrients. Our in vitro module may be useful for evaluating countermeasures against muscle and adipocytes disorders, such as mechanical loading and nutritional supplements, and may become an alternative to animal experiments for clinical applications and contribute in part to "animal-free" social implementation in the future.

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：筋収縮 肥満 サルコペニア 乳酸 脂肪分解 顕微鏡 電気刺激 細胞工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内では、組織と組織、あるいは臓器と臓器が機能的に連関し、複雑な生体内システムを構築している。組織間の機能連関の破綻は、疾患・疾病の誘因となる。例えば、加齢に伴う骨格筋量の減少と筋力の低下（サルコペニア）は、内臓脂肪の増加（肥満）を誘発するが、これらがさらにサルコペニアを助長し、サルコペニアと肥満の負の連鎖をもたらす（Roubenoff, 2000）。また、それらが合併した「サルコペニア肥満」は、生活習慣病のリスクをさらに増大させる（Kim et al., 2009）。一方、組織間の機能連関が高まれば、健康増進に繋がると考えられ、そのための方略として運動・栄養処方や薬理的な処置が想起される。一般的に、こうした処方・処置は細胞培養を対象に研究を進め、その知見を実験動物、そしてヒトへと、生体という複雑系に臨床応用展開する手法がとられることが多い。しかしながら、特に運動・栄養処方の臨床応用研究に展開するための、組織間の機能連関亢進を意図した細胞培養研究は殆ど存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロマシンの中でも培養細胞を扱ったバイオチップに関する研究実績を有する共同研究分担者に協力を仰ぎ、異なるディッシュ間の培地輸液制御に重点を置いた「培地間インターコネクション・チャンネルモジュール」を活用して、組織間機能連関研究に挑む。各種運動・栄養刺激に対する細胞動態を検証しつつ、その知見を基軸とした骨格筋と脂肪組織の機能連関解析を実現し、その亢進を図ることを最終目的とする。生体レベルでの運動・栄養処方の効果検証に有用な細胞情報を取得し、実際に生体応用への移行（e.g., 抗サルコペニア肥満研究）を次の展開として目指す。

3. 研究の方法

研究（1）：脂肪細胞への刺激と細胞応答解析

脂肪細胞中には脂肪滴と呼ばれる中性脂肪の貯蔵庫が存在し、食事（主に糖質）摂取により分泌されるインスリンによって中性脂肪は合成され、脂肪滴に蓄積する。一方、運動時などは、アドレナリン分泌によって脂肪分解が進み、脂肪滴が縮小化する。本研究では、こうした生体での生理反応を薬理（インスリンとアドレナリン）刺激によって模倣し、3T3-L1 脂肪細胞内の脂肪滴の大きさの増減を制御した。この際、顕微鏡画像情報により脂肪滴サイズをコンピュータ解析し、結果を薬剤刺激にフィードバックするシステムを構築し、脂肪滴の大きさを制御するとともに、生化学的に中性脂肪蓄積量を解析した。

研究（2）：骨格筋細胞への刺激と細胞応答解析

C2C12 骨格筋細胞の増殖・分化過程で経時的に電気刺激を、強度や時間、頻度、さらには培地中の糖濃度を変えて印加し、乳酸の分泌量、細胞の生育状況・形態的变化、筋タンパク質合成に関わるタンパク質の発現変化を組織化学的・生化学的解析によって解析した。併せて、微細流路、バルブやポンプ等の流体制御デバイスによる自動培地交換、生化学センサによる様々なモニタリング技術が集積されたデバイスを構築し、分泌された乳酸を含む培地を自動回収し、

その濃度を解析した。

研究(3)： 骨格筋細胞ならびに脂肪細胞に対する運動・栄養処方の実践的検証

異なるディッシュ間の培地輸液制御に重点を置いた「培地間インターコネクション・チャンネルモジュール」を活用した、組織間機能連関研究を展開するため、それぞれの細胞培養群(組織)の機能向上を図った。

4. 研究成果

研究(1)： 成熟した3T3-L1脂肪細胞を顕微鏡観察し、併せて画像解析システムにより細胞内脂肪滴のサイズを評価しながら、そのサイズを維持するために、アドレナリンとインスリンの付加を自動制御した。その結果、定期的なアドレナリンとインスリンの刺激が交互に加わり、脂肪滴のサイズを一定に制御できることが認められた。また、画像処理システムで評価した脂肪蓄積量は、生化学的に解析した脂肪蓄積量と定性的に近似することを認めた。

研究(2)： 栄養状態の違いによって電気刺激に対する筋合成関連タンパク質発現量の違いを認めた。具体的には、C2C12骨格筋細胞に電気刺激を加えた前後で、細胞の栄養状態を変えることによって、筋形態特性にどのような影響がみられるのか、またどのようなメカニズムによって細胞に影響をおよぼしているのかを明らかにすることを目的とし、検証した。本研究では、電気刺激によって筋タンパク質合成に関わるシグナル伝達系(mTORおよびp70s6Kのリン酸化)が活性化され、筋タンパク質合成が促進することが認められた。また、電気刺激を加える前に細胞に栄養(グルコース)を与えることで、p70s6Kのリン酸化が一層活性化され、より筋タンパク質合成が促進されることが明らかとなった。こうした骨格筋へ機械的刺激を加えるタイミングでの栄養状態が筋合成・分解に及ぼす影響については、ヒトを対象とした実践的研究への足がかりとなった。

一方、バルブやポンプを導入したチャンネルモジュールを構築し、培地の輸液や自動回収作業を制御できることを確認した。また、培地試料の保存環境の最適化の検討を実施した。その結果、標的とする代謝物の解析が実施できることを確認した。具体的には、C2C12骨格筋細胞に電気刺激を加え、その際の培地を自動回収し、培地中に分泌された乳酸濃度を解析したところ、マニュアル操作した乳酸濃度と近似することを認めた。

研究(3)： 上記(2)で示した培地中のグルコース濃度と電気刺激以外に、骨格筋細胞の機能向上に資する外的刺激を検討した。複数の濃度の低酸素環境下(5%、10%、15%、20.9% O_2)にて骨格筋細胞の培養を行うことで、酸素環境そのものが骨格筋細胞の形態的特性に与える影響を検討した。その結果、10%、15%の低酸素環境が通常酸素環境20.9%と比較して、骨格筋細胞の生育を促し、筋肥大シグナル発現を促進することで筋肥大を誘導することを明らかにした。この結果は、適度な低酸素という外的刺激が骨格筋細胞の成長に及ぼす分子メカニズムの理解を進め、サルコペニアに対する効果的な運動処方の開発に寄与するものと考えられた。

また、異種細胞間機能連関を評価する上で、骨格筋細胞と脂肪細胞の双方に作用しうる機能性食品素材の添加効果の検証は興味深い。本研究では、わかめなどの褐藻類に含まれる成分であるフコキサンチンの体内代謝産物であるフコキサンチノールが、骨格筋細胞に対して酸化ス

トレス由来の筋萎縮および筋細胞減少を抑制すること、また、脂肪細胞に対して脂肪の分解を高め、中性脂肪の蓄積を抑制することを確認した。本研究の結果から、フコキサンチノールがサルコペニア肥満を抑制する素材であることが明らかとなった。さらに、これまで骨格筋細胞に対する作用が知られていた性ホルモン的一种であるデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) が示す抗肥満効果の分子機序を、細胞培養実験により検証した。その結果、DHEA は代謝を制御すると考えられている 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性化ならびに mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の不活性化をもたらすと共に、脂肪細胞分化ならびに脂質蓄積を抑制することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kume W, Yasuda J, Hashimoto T	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 Acute effect of the timing of resistance exercise and nutrient intake on muscle protein breakdown	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12041177	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 Yoshikawa M, Hosokawa M, Miyashita K, Fujita T, Nishino H, Hashimoto T	4. 巻 47
2. 論文標題 Fucoxanthinol attenuates oxidative stress-induced atrophy and loss in myotubes and reduces the triacylglycerol content in mature adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 2703-2711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-05369-8	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 Sakushima K, Yoshikawa M, Osaki T, Miyamoto N, Hashimoto T	4. 巻 525(4)
2. 論文標題 Moderate hypoxia promotes skeletal muscle cell growth and hypertrophy in C2C12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 921-927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.152	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 Higashida K, Takeuchi N, Inoue S, Hashimoto T, Nakai N	4. 巻 21(3)
2. 論文標題 Iron deficiency attenuates catecholamine-stimulated lipolysis via downregulation of lipolysis-related proteins and glucose utilization in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 1383-1389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2020.10929	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 Hashimoto T, Yokokawa T, Narusawa R, Okada Y, Kawaguchi R, Higashida K	4. 巻 56
2. 論文標題 A Lactate-based compound containing caffeine in addition to voluntary running exercise decreases subcutaneous fat mass and improves glucose metabolism in obese rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 84-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2019.03.007	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 Yokokawa Takumi, Sato Koji, Narusawa Ryoko, Kido Kohei, Mori Risako, Iwanaka Nobumasa, Hayashi Tatsuya, Hashimoto Takeshi	4. 巻 528
2. 論文標題 Dehydroepiandrosterone activates 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase and suppresses lipid accumulation and adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 612 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.136	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 Hashimoto Takeshi, Okada Yoko, Yamanaka Atsushi, Ono Natsuhiko, Uryu Keisuke, Maru Isafumi	4. 巻 24
2. 論文標題 The effect of eleutherococcus senticosus on metabolism-associated protein expression in 3T3-L1 and C2C12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Activity and Nutrition	6. 最初と最後の頁 13 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20463/pan.2020.0016	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 Konishi Satoshi, Hashimoto Takeshi, Nakabuchi Tsubasa, Ozeki Takatoshi, Kajita Hiroki	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell and tissue system capable of automated culture, stimulation, and monitor with the aim of feedback control of organs-on-a-chip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80447-2	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 Yokokawa Takumi, Hashimoto Takeshi, Iwanaka Nobumasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Caffeine increases myoglobin expression via the cyclic AMP pathway in L6 myotubes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 14869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14869	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 Yoshikawa Maki, Hosokawa Masashi, Miyashita Kazuo, Nishino Hoyoku, Hashimoto Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Fucoxanthin on the Inhibition of Dexamethasone-Induced Skeletal Muscle Loss in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13041079	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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Kume W, Katayama K, Hashimoto T
2. 発表標題 Acute effect of nutrition intake before or after resistance on muscle breakdown in the morning in healthy young men
3. 学会等名 24th annual congress of the European College of Sport Science, Prague, Czech Republic, Prague Congress Center (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakushima K, Yoshikawa M, Osaki T, Miyamoto N, Hashimoto T
2. 発表標題 Moderate hypoxia promotes skeletal muscle cell growth and hypertrophy
3. 学会等名 24th annual congress of the European College of Sport Science, Prague, Czech Republic, Prague Congress Center (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikawa M, Okubo S, Oka A, Kiriyama C, Murai H, Hashimoto T
2. 発表標題 An anti-obesity effect of fucoxanthin supplementation and low intensity/volume exercise in diet-induced obese mice
3. 学会等名 24th annual congress of the European College of Sport Science, Prague, Czech Republic, Prague Congress Center (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kume W, Yasuda J, Yoshikawa M, Hashimoto T
2. 発表標題 Acute effect of the order of resistance exercise and nutrient intake on muscle breakdown
3. 学会等名 The American College of Sports and Medicine 66th Annual Meeting, Orlando, Florida, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakushima K, Yoshikawa M, Hashimoto T
2. 発表標題 The effect of moderate hypoxia on skeletal muscle cell growth and related protein expression
3. 学会等名 The American College of Sports and Medicine 66th Annual Meeting, Orlando, Florida, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikawa M, Okada Y, Mikumo M, Ono N, Uryu K, Hashimoto T
2. 発表標題 The effect of Eleutherococcus senticosus on adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells
3. 学会等名 The American College of Sports and Medicine 66th Annual Meeting, Orlando, Florida, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikumo M, Okada Y, Yoshikawa M, Ono N, Uryuu K, Hashimoto T
2. 発表標題 The effect of Eleutherococcus senticosus on metabolism-associated protein expressions in C2C12 cells
3. 学会等名 The American College of Sports and Medicine 66th Annual Meeting, Orlando, Florida, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本健志
2. 発表標題 栄養介入の分子作用機序解明と抗サルコペニアへの応用
3. 学会等名 日本スポーツ栄養学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kume W, Yoshikawa M, Yasuda J, Hashimoto T
2. 発表標題 Acute effect of resistance exercise and substantial breakfast on muscle breakdown in healthy young men
3. 学会等名 European College of Sport Science 23th Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikawa M, Sakushima K, Kume W, Usami K, Hosokawa M, Miyashita K, Nishino H, Hashimoto T
2. 発表標題 Ameliorative effect of Fucoxanthin on decreased skeletal muscle mass in mice
3. 学会等名 European College of Sport Science 23th Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakushima K, Yoshikawa M, Hashimoto T
2. 発表標題 Hypoxia promotes skeletal muscle differentiation in C2C12 skeletal muscle cells
3. 学会等名 European College of Sport Science 23th Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 橋本健志、小河繁彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 杏林書院	5. 総ページ数 7
3. 書名 体育の科学 『トレーニングと認知機能適応』	

〔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	小西 聡 (Konishi Satoshi) (50288627)	立命館大学・理工学部・教授 (34315)	

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