

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11540

研究課題名(和文) 骨格筋細胞の分化運命を可視化するシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of a System for Visualizing the Differentiation Fate of Skeletal Muscle Cells

研究代表者

山添 光芳 (YAMAZOE, Mitsuyoshi)

武庫川女子大学・健康・スポーツ科学部・教授

研究者番号：00284745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋前駆細胞が速筋または遅筋に分化する際に、どのような刺激が制御しているのか、また速筋と遅筋間の相互変化をどのように促進できるのかという疑問を解明するために、骨格筋の状態を効率的に解析できるシステムが必要だった。本研究では、ゲノム編集技術を活用し、各筋繊維のミオシン重鎖遺伝子領域に異なる色の蛍光タンパク質遺伝子を挿入することで、マルチカラーで筋繊維のタイプを可視化しようとした。しかしミオシン重鎖遺伝子がファミリーを形成していて、ターゲティングプラスミドの作製が非常に困難だった。まずMYH7遺伝子座(遅筋タイプ)へのノックインを試みたが、現時点では遺伝子改変に成功した細胞は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

速筋と遅筋を生細胞の状態で区別することができれば、両者の比率が変化するような刺激を探索することができる。このようにして見出した新規の物理的刺激を利用することで、新しいトレーニング方法を開発できる可能性がある。また老人や廃用性萎縮の患者では、速筋繊維と遅筋繊維の組成が偏ることが日常生活に支障をきたす一因となっている。このような場合、筋繊維タイプを変化させることができる刺激を与えることで、QOLを向上できる。さらにマウスiPS細胞にこのレポーター遺伝子系を導入することで、シャームライトランスミッションを経て遺伝子改変マウスを作製し、個体レベルで筋繊維組成の変化について研究を進めることができる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate what stimuli regulate the differentiation of skeletal muscle progenitor cells into fast or slow muscle fibers, and how the mutual transformation between fast and slow fibers can be facilitated, it was necessary to develop a system that can efficiently analyze the state of skeletal muscles. In this study, I aimed to visualize the types of muscle fibers in multiple colors by using genome editing techniques to insert genes for fluorescent proteins of different colors into the myosin heavy chain gene regions of each muscle fiber. However, the myosin heavy chain genes form a family, making it extremely difficult to create targeting plasmids. I first attempted to knock-in a gene into the MYH7 locus (slow muscle type), but I have not yet obtained cells with successful genetic modification.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格筋 速筋 遅筋 分化運命 ゲノム編集 蛍光蛋白質

1. 研究開始当初の背景

骨格筋を構成する筋繊維は、収縮力や収縮速度、易疲労性などの性質に基づき、速筋繊維と遅筋繊維に分類される（表1）。ヒトの骨格筋ではこれらが混在しており、各筋繊維の比率は筋肉の種類によって異なると言われている。以前は、この比率は遺伝的要因によるところが大きく、トレーニングなどによって変化しないと言われてい

（表1 速筋と遅筋の特徴）

	速筋（白筋）	遅筋（赤筋）
収縮速度	速い	遅い
収縮張力	強い	弱い
易疲労性	疲れやすい	疲れにくい
局在	表在性	深部
ミオグロビン含量	少ない	多い

た。しかし最近では、トレーニングの結果により後天的に速筋繊維と遅筋繊維の組成が変化しうると考えられている（Pette D., 2001）。また、加齢に伴い速筋繊維の方が減少しやすいため、中高年では瞬発的な運動が苦手になる一因となっている（Lexell J., 1995）。一方、廃用性萎縮の患者では遅筋優位から速筋優位に変化しているため（Ciciliot S., 2013）、遅筋繊維を維持できれば日常生活の質を向上させる可能性がある。しかし、これらは現象論に過ぎず、その分子メカニズムを科学的に解析した研究はほとんど無い。

筋繊維分化過程を *in vitro* で再現する系として、筋衛星細胞に由来するマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞が広く利用されている。C2C12 細胞は速筋繊維と遅筋繊維の両方に分化するため、分化過程における筋繊維タイプの運命決定機構や、筋繊維に最終分化した後の両タイプの相互変化を解析するには都合の良い系である。しかし、それぞれの筋繊維タイプに特異的なミオシン重鎖に対するモノクローナル抗体を使った解析では感度と特異性に限界があり、生細胞のまま経時的に観察することは不可能であった。

2. 研究の目的

本研究は、どのような刺激がタイプの異なる骨格筋繊維を作り出すのかという問いに答えるために、まず速筋と遅筋を容易に観察できる系を構築し、その知見をもとに以下の応用を目指す。

（1）科学的根拠に基づいたトレーニング方法の開発

速筋繊維と遅筋繊維の組成がトレーニングや酸素濃度などの環境因子によって変化することが知られている。新規の物理的刺激が筋繊維組成に影響を与えることが明らかになれば、この物理的刺激を利用した新しいトレーニング方法を開発する可能性がある。

（2）加齢や廃用性筋萎縮による筋肉の退行性変化における QOL 向上

老人や廃用性萎縮の患者では、速筋繊維と遅筋繊維の組成の偏りが日常生活に支障をきたす一因となる。このような場合に、筋繊維タイプを変化させる刺激を与えることで QOL の向上に寄与する可能性がある。

(3) 遺伝子改変マウス iPS 細胞を用いた筋細胞の分化モニタリング

pluripotent な iPS 細胞にレポーター遺伝子系を導入すれば、iPS 細胞から筋前駆細胞を経て速筋繊維および遅筋繊維へ分化させる際に、それぞれのタイプの筋繊維マーカーとして使用できる。遺伝子改変した iPS 細胞からジャームライントランスミッションを経て遺伝子改変マウスを作製することで、細胞レベルで得た結果を基に個体レベルで筋繊維組成の変化を研究することが可能になる。

(4) 遺伝子改変 C2C12 筋芽細胞の配布による研究促進

一度このような細胞を作製すれば、他の研究者に配布して使用してもらうことにより、筋細胞の様々な研究に役立てることができる。これにより、この分野の理解が深まり、研究が促進されることが期待できる。

3. 研究の方法

遅筋には TypeI 繊維、速筋には TypeII 繊維が多く含まれ、TypeII 繊維には遅筋に近い性質を持つ TypeIIa/IIx 繊維と速筋の特徴のみ持つ TypeIIb 繊維が存在する。そして各筋繊維で特異的に発現するミオシン重鎖タンパク質があり、それぞれ TypeI 繊維では MyHC- (遺伝子は MYH7)、TypeIIa/IIx 繊維では MyHC-2A (遺伝子は MYH2)、TypeIIb 繊維では MyHC-2B (遺伝子は MYH4) となっている。

そこで一つの細胞でこれら 3 種類のミオシン重鎖遺伝子の一方の対立遺伝子を、異なる蛍光波長をもった蛍光タンパク質の遺伝子に置き換える。これによってそれぞれの筋繊維がどのタイプのミオシンタンパク質を発現しているのか、マルチカラーで識別することが可能になる。

● 遺伝子改変筋芽細胞の作製

(1) 各タイプの筋繊維に特異的なミオシン重鎖遺伝子のターゲティングプラスミドの構築【図 1】

3 種類のミオシン重鎖遺伝子について調節領域を含む上流部分 (a) と翻訳開始配列 (ATG) より下流部分 (b) の部分をクローニングする。

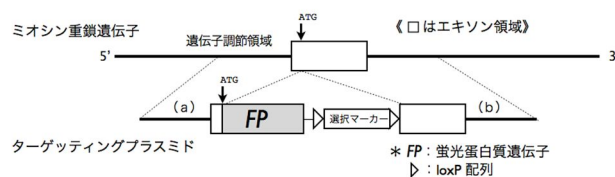
(a) と (b) の間に、ミオシン重鎖遺伝子の翻訳開始配列と合わせた蛍光タンパク質の遺伝子及び loxP 配列で挟んだ選択マーカーの DNA 断片を挿入する。

それぞれのミオシン重鎖遺伝子には、青色、緑色、遠赤色といった異なる色の蛍光タンパク質の遺伝子を連結させる。

loxP 配列に挟まれた選択マーカーは、後で Cre 組換え酵素によって切り出すことができる。

(2) 各々のターゲティングプラスミド DNA がロックインされた細胞の作製

【図 1】ターゲティングプラスミドの概略



それぞれのターゲティングプラスミドを gRNA と Cas9 蛋白質とともに、マウス筋芽細胞 C2C12 に導入する。

当該ミオシン重鎖遺伝子の一方の対立遺伝子のみに蛍光タンパク質遺伝子がノックインされた細胞を選択する。

(3) ノックイン細胞の表現型の確認

上記で遺伝子を改変した C2C12 細胞を筋繊維に分化させたとき、予想した蛍光を発する筋繊維が確認できることを蛍光顕微鏡で確かめる。

またそれぞれの筋繊維に特異的なモノクローナル抗体を使用して免疫染色を行い、蛍光タンパク質の発色と免疫染色とが同等であることを確かめる。

(4) 3種類の蛍光タンパク質遺伝子がトリプルにノックインされた細胞の作製

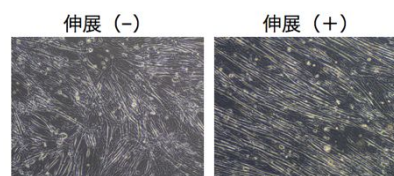
(2) で作製した3種類の遺伝子改変細胞のうち1つを選び、これに残り2つのターゲティングプラスミドを CRISPR/Cas9 の部位特異的ヌクレアーゼプラスミドとともに次々と導入する。

3つのミオシン重鎖遺伝子を改変した細胞が正常な表現型を持っていることを確認する。

● 遺伝子改変細胞を用いた解析

完成した遺伝子改変筋芽細胞が、筋繊維に分化途中あるいは最終分化した後に下記のような様々な刺激を与え、分化速度や速筋繊維と遅筋繊維の組成にどのような変化が現れるのかを調べる。

【図2】筋芽細胞の分化における細胞伸展刺激の影響



(1) 低出力パルス超音波 (Low-Intensity Pulsed UltraSound)

(2) 伸展刺激・メニコン社の培養細胞伸展システム ShellPa を使用する。筋分化段階で伸展刺激を加えると、分化した筋繊維の方向性が一定になることがわかっている【図2】

(3) 温熱刺激

(4) 電氣的刺激

(5) 酸素分圧

(6) 様々な小分子化合物の添加

4. 研究成果

ターゲティングプラスミドを構築するために、3種類のミオシン重鎖遺伝子上流部分と下流部分の増幅を PCR で試みた。しかしながらこれらの遺伝子はファミリーを構成しているために、幾つかのケースではマルチバンドになってしまった。また当初は各遺伝子上流と下流断片が 2kb ずつ増幅していたため、蛍光タンパク質遺伝子、プラスミド骨格 (pMD20) を加え

ると 7kb を超えるベクターになってしまった。このため大腸菌の形質転換効率が低下し、コンストラクトの作成が困難であった。そこで PCR のプライマーを再設計し、遺伝子の flanking 領域を 2kb から 1kb ずつに短縮した。また宿主大腸菌を *deoR* 変異を持つ DH5 に替えて、まず MYH7 ターゲティングプラスミドの候補を得た。そこでマウス筋芽細胞 C2C12 にターゲティングプラスミド、Cas9 蛋白質、gRNA をエレクトロポレーション法により導入した。出現したコロニーのうち、10 クローンをピックアップしてノックインの有無を調べたが、現時点でノックインされたものは認められていない。原因として

- (1) トランスフェクションの方法が悪かった・・・一般的にエレクトロポレーション法の方がリポフェクション法より効率が高いといわれているので、こちらは考えにくい。
- (2) ターゲティングプラスミドがゲノムに組み込まれる効率が低かった・・・薬剤耐性遺伝子をターゲティングプラスミドに入れて、トランスフェクション後に薬剤選択をすると、効率のアップが期待できる。またターゲティングプラスミドから 1 本鎖の DNA を調製し相同組み換えの効率を上げる方法を試してみる。
- (3) gRNA の場所が良くなかった・・・「TrueDesign Genome Editor」を利用して他の配列を試してみる。

以上の可能性を絞るために、トランスフェクション後の細胞をまとめて分化を促し、蛍光を発する細胞が出てくるかどうかを検証する。もしそのような細胞が認められた場合は、ゲノム編集が理論通りに行われている事を示しているので、効率を上げれば目的の細胞を得ることができると推測される。

本科研費の助成期間中に当初の目的を達成できなかったが、これまでの経過を礎に引き続き本研究を進め、成果を上げたいと考えている。

< 引用文献 >

- Pette D. and Staron R.S. Transition of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 115(5):359-72 (2001)
- Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* No:11-6 (1995)
- Ciciliot S., Rossi AC., Dyar KA., Blaauw B and Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10):2191-9 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------