

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12777

研究課題名(和文)筋組織恒常性維持機構における細胞内イオンの分配制御

研究課題名(英文)Control of intracellular ion on skeletal muscle formation

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞活動を規定する細胞内イオンの時間的、量的な変化が細胞分化をどのように調節するかについて、骨格筋をモデルとして明らかにすることを目的とした。筋芽細胞が融合して合胞体である筋管細胞を形成する過程を経時的に検出できる細胞融合モニターシステムを構築した。光スイッチを導入した細胞に対する光照射は筋管細胞に含まれる核数と細胞径を増大させ、細胞融合に関わる遺伝子群を亢進させた。光刺激によって引き起こされたカルシウムシグナルは細胞融合を促進させ、筋管細胞の形成を誘導す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
組織の恒常性維持を担う細胞の増殖や分化の制御機構を知ることは重要である。本研究は骨格筋形成における細胞内イオン動態の働きを明らかにすることを目指した。形態的な指標では曖昧な筋芽細胞の融合現象を蛍光シグナルの変化により視覚化する光遺伝学ツールを構築し、経時変化を感度良く検出することができた。筋分化誘導時にカルシウムシグナルを惹起させると、筋芽細胞の融合が促されて筋管細胞の形成が誘導されることが示唆された。筋形成の光誘導技術は骨格筋組織の再生や発達のメカニズムを検証するツールとしてだけでなく、新しい骨格筋治療の基盤技術としても期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we controlled the intracellular ion to elucidate the mechanism of skeletal muscle cell differentiation using optogenetics. We developed a color switch-based reporter system with optogenetic stimulation for the detection of myoblast fusion. Our results suggested that the intracellular calcium increase are essential for the myoblast fusion to form multinucleated myotubes and have the capability to promote the skeletal muscle formation.

研究分野：細胞工学

キーワード：細胞融合 細胞内カルシウム 骨格筋細胞分化 光遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋芽細胞の融合は骨格筋の再生、成長において重要なステップである。筋線維の形質膜と基底膜の間に存在する筋衛星細胞（サテライト細胞）が筋の修復や成長時に活性化し、筋芽細胞を産生して筋芽細胞同士あるいは既存の筋線維と融合することで筋組織がつくられる。細胞膜に存在するイオンチャネルやトランスポーターなどのイオン輸送体が内外に電気的な特性を形成して細胞活動を制御しており、細胞の分化が活動依存的に調節されていることが知られている。単核の筋芽細胞が融合して多核の合胞体である筋管細胞を形成する過程において細胞内カルシウムが関わることを示唆されているが、分子機構については未だ不明な点が残されている。

2. 研究の目的

本研究では光遺伝学技術を用いて細胞内のイオン環境の変化が骨格筋の形成過程における筋芽細胞の融合にどのように関わるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞融合の検出系構築

筋管細胞の同定には融合した核数や特異的マーカーの発現量などの形態学的あるいは生化学的な指標が用いられる。しかし、これらの方法では経時的な変化を評価することは難しい。そこで、Cre-loxP システムを用いた細胞融合モニター系を構築した。loxP の DNA 配列に対して組換え酵素 Cre が働くことにより部位特異的組換えが生じる遺伝子組換え反応である。緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合させた光応答性イオンチャネル (ChR) 遺伝子を loxP 配列で挟み、その下流に赤色蛍光タンパク質 RFP を配置した発現ベクターと DNA 組換え酵素 iCre の発現ベクターを作製した。それぞれの遺伝子をマウス筋芽細胞 (C2C12) に導入し、薬剤選抜およびセルソーターにより安定発現する細胞株を得た。細胞培養環境 (5% CO₂、湿度 95%) を維持した蛍光顕微鏡のステージ上で培養を行い、経時的な変化を観察した。

(2) 筋管細胞の光誘導

細胞融合は骨格筋細胞分化の最終過程であるが、この過程において細胞内カルシウムが関わることを示唆されている。細胞内のカルシウム濃度を変化させて細胞融合を引き起こされるかを検証した。筋芽細胞に光を照射して細胞活動を規定する膜電位およびカルシウムシグナルを変化させ、筋管細胞の形成について検討を行った。照射する光の強度や間隔などパラメータを変化させて光刺激を加え、分化誘導 1 日後から 7 日後まで経時的に蛍光画像を取得した。撮影した画像は Image J を用いて EGFP と RFP 陽性細胞の輝度値、細胞径、核数を計測した。また筋分化に関与する制御因子の発現量を検討した。細胞から RNA を抽出して、逆転写酵素で cDNA を合成後、リアルタイム定量 PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。各時点での刺激群と非刺激群について得られた値を比較 CT 法による相対定量を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 筋芽細胞が融合して合胞体を形成する過程を観察するために、異なる蛍光タンパク質 EGFP と RFP を発現する筋芽細胞を作製した。共培養により増殖させた後、分化培地に切り替えて経時観察を行った。培養開始後、細胞は伸展、収縮しながら移動を繰り返し、24 時間後には EGFP と RFP の細胞質の混合が観察されはじめ、両方の蛍光を持つ細胞が徐々に検出された。時間の経過とともに二重陽性の細胞が増え、合胞体が形成されていく様子が観察された。次に細胞融合を正確に捉えるために、Cre-loxP システムを用いた細胞融合モニター系を構築した。ChR を発現する細胞 (ChR-EGFP/RFP) と iCre を発現する細胞 (iCre-BFP) を共培養後、分化を誘導して筋管細胞を形成させた。形態学的な変化とともに形成された多核の筋管細胞からは EGFP 蛍光が消失して RFP 蛍光が検出される様子が見られた。RFP 蛍光は培養 6 日後に最大となり、培養日数の経過とともに徐々に輝度が上昇していくことが観察された。また ChR-EGFP/RFP を発現する筋管細胞を形成させた後に iCre-BFP 細胞を播種したところ、筋管細胞に取り込まれ、RFP が検出される細胞が認められた。

(2) 筋芽細胞への光刺激が筋管細胞の形成に与える効果を検証した。カルシウム蛍光色素 X-Rhod-5 を用いて光刺激に対するカルシウム応答を観察した。分化を誘導する前の細胞 (ChR-EGFP/RFP) に青色光 (470 nm) を照射すると光に反応して細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。分化誘導時に光刺激を加えて培養を行ったところ、刺激細胞群では RFP の輝度値と陽性細胞数が非刺激群よりも増加した。1 つの細胞内にどの程度の核が含まれているかにより評価する Fusion index を用いて、RFP 陽性細胞における核数を比較したところ、5 核以下の細胞の割合が減少し、15 核以上の細胞が増加しており、非刺激群に比べ高い Fusion index 値を示した。形成された筋管細胞の直径を測定すると、刺激を加えた細胞において増大していることが認められた。筋芽細胞の分化誘導時にカルシウムシグナルを生じさせることで、筋芽細胞の融合が促進され筋管細胞の多核化と成長を引き起こしたことが示唆された。

次に、分化誘導前、誘導後 24 時間、48 時間、96 時間のそれぞれの時点での mRNA を回収し、リアルタイム PCR 法による遺伝子の比較定量を行った。分化に伴って発現が亢進する筋分化遺伝子である myogenin、MyHC (myosin heavy chain)、myomaker、myomier の発現の増加を、野生型と同様に Cre-loxP システムを組み込んだ安定細胞株で確認することができた。筋芽細胞の融合に関与する遺伝子を調べたところ、非刺激群と比べて発現量や時間的な発現パターンに変化が見られる遺伝子があることがわかった。それらは筋管形成に伴って活性化される転写因子であることが知られている。その内のいくつかについてはカルシウムとの関連の報告がない遺伝子であった。また細胞周期を抑制する遺伝子の発現上昇も見られ、亢進することで筋分化を進めていると考えられた。

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

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			
ドイツ	Institute for Physiology I	University of Bonn		
シンガポール	Department of Biochemistry	Yong Loo Lin School of Medicine	National University of Singapore	