

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15959

研究課題名（和文）筋幹細胞が自律的に筋線維型を初期決定する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）The search study of the molecular mechanisms about the autonomous myofiber type determination by myogenic stem cells.

研究代表者

鈴木 貴弘（Suzuki, Takahiro）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80750877

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）：研究者らは、遅筋または速筋由来の筋幹細胞（衛星細胞）が融合して新生筋線維（筋管）を形成する過程で、それぞれ多機能性細胞制御因子semaphorin 3Aまたはnetrin-1を合成して自律的に筋タイプを決定する分子メカニズムの解明を目指している。本研究では、衛星細胞が局在する筋タイプに応じて特性が保持されている可能性と、衛星細胞を取り巻く細胞外環境から受ける物理的刺激による特性獲得の2パターンからアプローチした。その結果、物理刺激（細胞接着面の弾性率）の影響による特性獲得の可能性は低く、衛星細胞が局在していた筋線維の筋タイプに応じて特性を保持するメカニズムの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食肉の質を向上させるためには、骨格筋の筋タイプ（遅筋型および速筋型で大別される）を制御する生産方法の開発が求められる。これまでに、筋タイプは成熟した筋線維に接着する運動神経刺激の支配下にあると考えられてきたが、各筋タイプ特異的な筋線維に局在する衛星細胞は自律的に筋管の筋タイプを制御する能力を有することが明らかとなっている。本機構は物理的刺激などの外的要因を受けずに維持される可能性があるため、それぞれの筋タイプに特異的な衛星細胞をターゲットとした筋肥大誘導技術開発によって、容易に筋タイプを変換する新技術開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We focused on resident myogenic stem cells (satellite cells) are attracting attention for their novel roles in myofiber type regulation. When satellite cells were separately isolated from the slow fiber-abundant muscles or the fast-type muscles, each cell highly synthesized semaphorin 3A or netrin-1 for autonomous myofiber type determination. However, the molecular mechanisms how did each muscle derived-satellite cells acquire their characters were uncertain. We hypothesized that the two cases would be the key contents for the specification-acquirement mechanisms. First, satellite cells can maintain the unique potentials according to their host myofiber even though the post-isolation. Second, satellite cells may be affected the physical stimulations like elasticities of each culture substrate. Upon our results, we predict that satellite cells isolated from each myofiber, keeping their own specification, would be responsible for the autonomous myofiber type commitment.

研究分野：筋細胞生物学

キーワード：筋幹細胞 衛星細胞 筋タイプ 初期決定機構 単一筋線維 培養基質の弾性率

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は食肉の主な原料となるため、筋量の増加はもちろんのこと肉質(味、香り、柔らかさおよび脂肪交雑の程度など)も高めた効率的な生産技術開発が求められる。しかし、成熟個体において、肉質と深いつながりのある骨格筋の「筋線維型(筋タイプ; 持久力が高く細いため柔軟性に富む“遅筋型”と瞬発力を発揮して太く硬い“速筋型”に大別される)」を制御することは困難であると考えられている。すなわち、動物が成長し、成熟していく過程において、筋線維に接着した運動神経によって筋タイプが制御される神経刺激作用が構築され、遅筋型または速筋型のそれぞれに対応した神経末端を繋ぎ換えるといった大掛かりな外科的処置を施さなければ、筋タイプ的大幅な変換は困難であるとされてきた(Schiaffino & Reggiani, 2011, *Physiol. Rev.*)。一方で研究者らは、骨格筋の肥大や再生に寄与する筋幹細胞(衛星細胞)が互いに融合して、新生筋線維(筋管)を形成する際、運動神経の影響を受けずに自律的に筋タイプを制御する「コミットメント(初期決定)機構」の存在に着目している。すなわち、研究者らは遅筋(ヒラメ筋)または速筋(長趾伸筋)部位から単離した衛星細胞が、それぞれで異なる多機能性細胞制御因子(semaphorin 3A および netrin-1)を多量に合成および分泌し、神経刺激とは独立して自律的に筋タイプを初期決定する新奇制御システムの見出し(Tatsumi et al., 2017, *STEM CELLS*; Suzuki et al., 2021, *Int. J. Mol. Sci.*)。よって、衛星細胞による筋タイプの初期決定機構の妥当性が期待されているが、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、衛星細胞が互いに融合して筋管を形成し、遅筋型または速筋型へと各々の筋タイプを初期決定する過程で、その方向性に起因する分子メカニズムの解明を目的とした。衛星細胞は自身が局在する筋線維の「①筋タイプに応じて特異性を維持している」パターンと、「②筋部位内で衛星細胞を取り巻く細胞外環境から獲得した特異性を保持している」という2パターンの作業仮説を立てた。特に②における細胞外環境を構築する具体的な候補として、筋部位ごとで異なる「物理刺激」による影響に着目した。そこで、以下に示す項目についての検証を行なった。

- (1) 遅筋型/速筋型筋線維のみに局在する衛星細胞の高純度単離培養系の確立、および動態変化の観察
- (2) 筋部位ごとの物理刺激モデルが衛星細胞による筋タイプ初期決定機構に与える影響
以上の検証を通して、衛星細胞はそもそも局在していた筋線維によって独自性が決められているのか、あるいは自身が置かれた環境に適応して自在に性質を変化させることが可能なのかという点を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

(1) 衛星細胞の単離、培養法

8-12週齢のC57BL/6雄マウスの骨格筋(ヒラメ筋または長趾伸筋)を摘出し、酵素処理により各骨格筋から単一筋線維を分離した。Poly-L-lysineとMatrigelでダブルコートしたカルチャープレートに、単一筋線維を接着させて3-4日間培養し、その間プレート上に遊走する衛星細胞を採取した。5.0 x 10⁴ cellsとなるよう細胞を再播種し、5% CO₂、95%大気、37°Cの条件下で24時間増殖培養した(培養液; 30% FBS-DMEM)。その後、分化誘導培養液(5% HS-DMEM)に切り換えて、筋管形成が認められた分化120時間目まで培養した。

(2) ポリアクリルアミドゲル基質の作製

Ishiharaら(2013, *Exp. Cell Res.*)の方法に従って、7.5, 13.8 および 67.2 kPaの弾性率を示すポリアクリルアミドゲルを培養基質として作製した。細胞接着を促すため、type I コラーゲン含有処理と残存アクリルアミド(モノマー)の除去を行なった後、Matrigel コートをし、(1)に示すとおり採取した衛星細胞を播種した。

(3) RNA抽出およびreal-time RT-qPCR

各骨格筋由来の衛星細胞(筋芽細胞および筋管を含む)をPBSで洗浄後、RNA抽出試薬(ISOGEN II, ニッポンジーン)により溶解し、メーカー推奨のプロトコルに従ってtotal RNAを抽出し、逆転写に供試して(ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO) cDNAを作成した。作製したcDNAを含む逆転写反応液を鋳型とし、TaqMan Probe Assayを用いたreal-time RT-qPCR(Light Cycler 480 system II, Roche)によって定量的解析を行った。データの分析は、添付のソフトウェアを用いて行った。

(4) タンパク質の抽出およびWestern Blotting

各骨格筋由来の衛星細胞(筋芽細胞および筋管を含む)をPBSで洗浄後、Laemmli sample bufferでタンパク質を抽出した。サンプルは10%ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEに供試し、泳動後のゲルよりPVDFメンブレンにタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、5%(w/v)のスキムミルクを添加したtween 20含有トリス緩衝液により30分間ブロッキングし、免疫反応

促進試薬 (Can Get Signal, TOYOBO) で希釈した 1 次抗体溶液中で一晩インキュベーションした。メンブレンを洗浄後、同様に希釈した HRP 標識 2 次抗体溶液で 1 時間インキュベーションした。その後、ECL Western Blotting Reagents (GE Health care) とメンブレンを反応させ、ChemiDocTM XRS+システム (Bio-Rad) を用いて化学発光検出を行った。

4. 研究成果

(1) 遅筋型/速筋型筋線維のみに局在する衛星細胞の高純度単離培養系の確立、および動態変化の観察

まず、単離した衛星細胞の純度測定のために、衛星細胞マーカーである転写因子 Pax7 および MyoD 陽性率を計測した。野生型マウスより単離した Pax7 陽性細胞の割合は、ヒラメ筋由来の衛星細胞で約 97.4%であり、長趾伸筋由来の細胞で約 96.7%であった。MyoD 陽性細胞の割合は、ヒラメ筋由来の衛星細胞で約 95.8%であり、長趾伸筋由来の細胞で約 97.0%であった。よって、本法による衛星細胞の高純度単離培養系は確立できた。

筋収縮タンパク質であるミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MyHC) のアイソフォームは、遅筋型および速筋型によって異なるため、各筋タイプマーカーとして用いることができる。そこで次に、遅筋型の slow MyHC に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合し遅筋型筋線維が識別できる遺伝子組み換えマウス (GFP-Myh7) と、速筋型の fast MyHC を橙色蛍光タンパク質 (Kusabira-Orange; KO) で標識させて速筋型を識別するマウス

(KO-Myh1) を準備して、本研究の目的とする衛星細胞の採取作業を行った。しかし、それぞれの筋タイプに特異的な単一筋線維が充分量に分離することができず、衛星細胞の高純度採取に至らなかった。参考までに、再播種を行わずに筋線維から遊走した衛星細胞で直接分化誘導を行なった際、遅筋型筋線維由来の衛星細胞は遅筋型だけでなく速筋型筋管の形成を行なったが (Fig. 1)、速筋型由来の衛星細胞は速筋型筋管のみを形成することが示唆された。今後、採取プロトコルを改善し、より詳細に解析する必要がある。

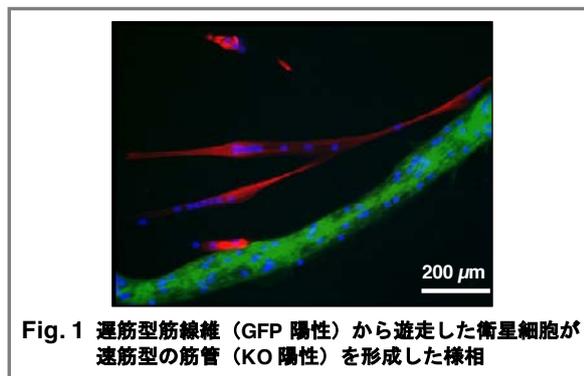


Fig. 1 遅筋型筋線維 (GFP 陽性) から遊走した衛星細胞が速筋型の筋管 (KO 陽性) を形成した様相

(2) 筋部位ごとの物理刺激モデルが衛星細胞による筋タイプ初期決定機構に与える影響

ヒラメ筋のような遅筋は柔軟性に富み、一方で長趾伸筋のような速筋は硬質であるとされている。そこで、異なる弾性率を有する基質上で衛星細胞を培養することによって、各筋タイプに優勢な骨格筋の特性を模倣した物理刺激モデルを用いて、形成された筋管における筋タイプマーカーの発現変化を検証した。本研究では、架橋剤の濃度を調整することで培養基質の硬さをコントロールできるアクリルアミドゲルを使用し、遅筋モデルとしては弾性率をより低く、速筋はより高い割合と想定して検証を行なった。野生型マウスのヒラメ筋より単離した衛星細胞を、各弾性率を有するゲル上で培養して筋管の形成を誘導したところ、いずれのゲル基質上においても筋タイプマーカー (slow MyHC [I 型] および fast MyHC [より遅筋側より IIa, IIx および IIb 型] によって分類される) の発現レベルに差は認められなかった (Fig. 2, 3)。また、長趾伸筋由来の衛星細胞においても、同様の結果であり弾性率間で差が認められなかった。すなわち、培養基質の弾性率は形成された筋管の筋タイプ組成に影響を及ぼさないことが示唆された。

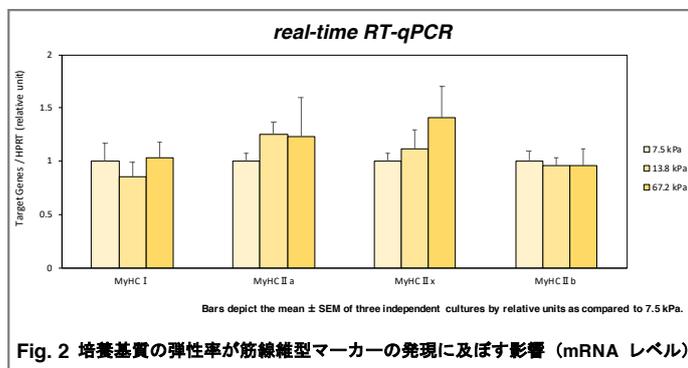


Fig. 2 培養基質の弾性率が筋線維型マーカーの発現に及ぼす影響 (mRNA レベル)

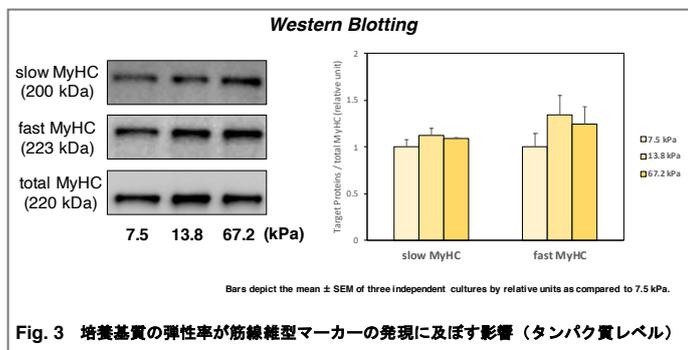


Fig. 3 培養基質の弾性率が筋線維型マーカーの発現に及ぼす影響 (タンパク質レベル)

以上より、速筋型筋線維を由来とする衛星細胞は元の局在に応じた特性を維持することで、自律的に筋タイプを制御して速筋型筋管を形成することが示唆された。しかし、遅筋型から単離した衛星細胞には、同様な特性維持機構が保有されていない可能性もあるため、今後更なる詳細な検証が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe, N., Komiya, Y., Sato, Y., Watanabe, Y., Suzuki, T., and Ariahara, K.	4. 巻 525
2. 論文標題 Oleic acid up-regulates myosin heavy chain (MyHC) 1 expression and increases mitochondrial mass and maximum respiration in C2C12 myoblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 406 ~ 411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.099	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 Elgaabari Alaa, Miyawaki-Kuwakado Atsuko, Tomimatsu Kosuke, Wu Qianmei, Tokunaga Kosuke, Izumi Wakana, Suzuki Takahiro, Tatsumi Ryuichi, Nakamura Mako	4. 巻 In Press
2. 論文標題 Epigenetic effects induced by the ectopic expression of Pax7 in 3T3-L1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab030	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 Suzuki Takahiro, Mori Aika, Maeno Takahiro, Arimatsu Rio, Ichimura Emi, Nishi Yuriko, Hisaeda Kouga, Yamaya Yuki, Kobayashi Ken, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Ojima Koichi, Nishimura Takanori	4. 巻 22
2. 論文標題 Abundant Synthesis of Netrin-1 in Satellite Cell-Derived Myoblasts Isolated from EDL Rather Than Soleus Muscle Regulates Fast-Type Myotube Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4499 ~ 4499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094499	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24件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Suzuki, T., Mori, A., Nishi, Y., Arimatsu, R., Maeno, T., Kobayashi, K., Ojima, K., Tatsumi, R., and Nishimura, T.
2. 発表標題 Netrin-1 synthesized in satellite cells may promote fast myofiber-type commitment during myogenic differentiation phase.
3. 学会等名 Society for Muscle Biology 2019 meeting on Frontiers in Myogenesis Meeting “ Skeletal Muscle: Development, Regeneration and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Arimatsu, R., Nishi, Y., Kobayashi, K., Tatsumi, R., Ojima, K., Nishimura, T. and Suzuki, T.
2 . 発表標題 Myogenin has distinct function in satellite cells isolated from different muscles.
3 . 学会等名 Society for Muscle Biology 2019 meeting on Frontiers in Myogenesis Meeting “ Skeletal Muscle: Development, Regeneration and Disease (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Suzuki, T., Mori, A., Ichimura, E., Nishi, Y., Arimatsu, R., Maeno, T., Kobayashi, K., Ojima, K., Tatsumi, R., and Nishimura, T.
2 . 発表標題 Netrin-1 synthesized in satellite cells isolated from fast-twitch muscle may promote fast myofiber-type commitment.
3 . 学会等名 The 2019 joint meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO) 2019 meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kigaki, M., Ojima, K., Suzuki, T., Kobayashi, K. and Nishimura, T.
2 . 発表標題 The replacement of myosin molecules in thick filaments is different between slow- and fast-twitch myofibers.
3 . 学会等名 The 2019 joint meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO) 2019 meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 山谷有希, 有松里央, 前野岳大, 久江未記, 小林謙, 辰巳隆一, 尾嶋孝一, 西邑隆徳, 鈴木貴弘
2 . 発表標題 培養基質の弾性率が筋芽細胞による自律的な筋線維型制御に与える影響
3 . 学会等名 第5回 日本筋学会学術集会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木貴弘, 森愛華, 久枝皓雅, 西百合子, 小林謙, 辰巳隆一, 尾嶋孝一, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋幹細胞が合成するNetrin-1は速筋型筋線維の形成誘導に関する
3. 学会等名 第5回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木貴弘, 西百合子, 有松里央, 小林謙, 西邑隆徳
2. 発表標題 マウス系統間における筋幹細胞の機能的不均一性の検証
3. 学会等名 日本畜産学会大会 第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木貴弘
2. 発表標題 筋幹細胞が合成するNetrin-1は筋管の速筋化を誘導する; Netrin-1 abundantly synthesized in satellite cells isolated from fast-twitch muscles may promote fast myofiber-type commitment.
3. 学会等名 第7回 若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久枝皓雅, 鈴木貴弘
2. 発表標題 多機能性細胞外因子semaphorin 3Eが筋分化に与える影響; A Multi-potent cell regulator semaphorin 3E may affect myogenic differentiation.
3. 学会等名 第7回 若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木貴弘
2. 発表標題 筋幹細胞の機能的不均一性について-筋線維型の制御に着目したアプローチ-
3. 学会等名 第21回日本畜産学会若手企画シンポジウム【オンライン開催】
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松吉祐児, 鈴木貴弘, 中村真子, 辰巳隆一
2. 発表標題 神経筋接合部の形態観察を目的とした上腕二頭筋損傷モデルの検討
3. 学会等名 第6回 日本筋学会学術集会【Web開催】
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木貴弘
2. 発表標題 培養基質の弾性率が筋幹細胞による自律的な筋線維型制御に与える影響
3. 学会等名 第8回骨格筋生物学研究会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今富菜々, 城戸潤力, Alaa Elgaabari, 中島崇, 澤野祥子, 水野谷航, 松吉祐児, 鈴木貴弘, 中村真子, 辰巳隆一
2. 発表標題 筋幹細胞活性化因子HGFのニトロ化による不活化の生理学的意義：加齢性筋萎縮・再生不全の主要因のブレイクスルー
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増原夏海, Mohamed Z. Elhussiny, Vishwajit S. Chowdhury, 今富菜々, Alaa Elgaabari, 城戸潤力, 澤野祥子, 水野谷航, 松吉祐児, 鈴木貴弘, 中村真子, 古瀬充宏, 辰巳隆一
2. 発表標題 筋幹細胞の活性化・増殖因子HGFのニトロ化による不活化の生理学的意義：暑熱ストレスによる筋成長阻害との関係
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穂本翔太, 徳永亘祐, 鈴木貴弘, 辰巳隆一, 中村真子
2. 発表標題 ニワトリ胚における砂嚢平滑筋層分化の経時的変化
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳永亘祐, 饗場万知子, 穂本翔太, 水野谷航, 鈴木貴弘, 辰巳隆一, 中村真子
2. 発表標題 無血清培地を用いたニワトリ砂嚢由来平滑筋細胞の分化維持培養系の確立
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木貴弘, 有松里央, 尾嶋孝一, 中村真子, 辰巳隆一, 小林謙, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋幹細胞におけるmyogeninの生理機能を骨格筋種で比較する
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前野岳大, 有松里央, 久枝皓雅, 山谷有希, 小林謙, 中村真子, 西邑隆徳, 辰巳隆一, 鈴木貴弘
2. 発表標題 筋幹細胞が合成するnetrin-4の筋線維型制御への関与
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松吉祐児, 金子琉輝, 鈴木貴弘, 中村真子, 辰巳隆一
2. 発表標題 筋線維型評価における上腕二頭筋の有用性についての検証
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田拓太, 松吉祐児, 水野谷航, 鈴木貴弘, 中村真子, 辰巳隆一
2. 発表標題 Sema3A依存的な遅筋型筋線維形成機構の食品機能学的制御：クロロゲン酸のSema3A受容体アゴニスト活性の検証
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川拓実, 松吉祐児, 城戸潤力, 鈴木貴弘, 中村真子, 辰巳隆一
2. 発表標題 持久的運動負荷による遅筋型筋線維の増加に筋幹細胞は関与しているか？
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市村恵美, 尾嶋孝一, 鈴木貴弘, 小林謙, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子置換に及ぼすユビキチンリガーゼの影響
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Alaa Elgaabari, Nana Imatomi, Hirochika Kido, Yuji Matsuyoshi, Takashi Nakashima, Shoko Sawano, Wataru Mizunoya, Takahiro Suzuki, Mako Nakamura, Ryuichi Tatsumi
2. 発表標題 Insight linking between nitration and myogenic dysfunction of HGF/NK1 domain
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城戸潤力, 今富菜々, Alaa Elgaabari, 奥田晶子, 真鍋宜隆, 中島崇, 澤野祥子, 水野谷航, 松吉祐児, 鈴木貴弘, 中村真子, 辰巳隆一
2. 発表標題 筋幹細胞の活性化抑制機構の発見: 活性化因子 HGFのニトロ化による生理活性の消失
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会【オンライン開催】
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap個人ページ (https://researchmap.jp/takahe0302)
--

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