

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11434

研究課題名(和文) 三次元培養筋におけるコレシストキニン遺伝子発現制御および分泌動態の解明

研究課題名(英文) Regulation of cholecystokinin gene expression and secretion dynamics in three-dimensional cultured muscle

研究代表者

中村 友浩 (Nakamura, Tomohiro)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：30217872

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)：本研究は、低酸素環境下におけるコレシストキニン(Cck)遺伝子発現および分泌動態を解析することで、Cck遺伝子の生物学的、生理的役割を明らかにすることを目的とした。Cck遺伝子は筋分化とともに発現が上昇してくることが明らかになってきたため、低酸素誘導因子Hif1aをノックダウンさせた状態で筋分化を誘導したところ、発現の著しい低下が観察された。Cck遺伝子は三次元的に培養すると発現が上昇し、低酸素曝露でその発現が増強することから分泌動態についても検討したが、培地内の顕著な同定に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外の研究動向では、食欲抑制に関与するマイオカインは全く同定されておらず、骨格筋細胞におけるコレシストキニン(Cck)の発現、分泌動態および分子制御についての報告は皆無であった。本研究の研究成果から分化した筋細胞に対する低酸素曝露はCck遺伝子の発現を上昇させ、低酸素特異的な転写因子であるHif1aノックダウンでCck遺伝子の発現が著しく抑制されることが明らかとなった。このことから運動および低酸素環境における食欲抑制現象を骨格筋-Cckを軸とした生理学的生体制御として部分的に提唱することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the biological and physiological role of the Cck gene by analyzing the cholecystokinin (Cck) gene expression and secretion dynamics under hypoxic conditions. When muscle differentiation was induced under hypoxia-inducible factor Hif1a knockdown, a marked decrease in Cck gene expression was observed. Since Cck gene expression is also upregulated in three-dimensional culture and enhanced by hypoxia, we tried to detect the secretory product, but could not identify it remarkably in the culture medium.

研究分野：運動生理学

キーワード：マイオカイン 低酸素 コレシストキニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年では収縮依存的に筋細胞から種々のマイオカインが分泌され、筋そのものや脂肪細胞など他の臓器の機能に影響を与える分泌器官として重要な働きをしていることが明らかにされている。しかしながら、骨格筋から分泌される新規生理活性物質の探索において、生体筋に近い生体外代謝環境の構築が困難なことから、十分な解析が行われていなかった。代表者は独自に開発した三次元培養筋に対して高強度運動を模倣した急性の高頻度電気刺激を印加し、発現上昇する遺伝子群を検討したところ、意外にも食欲抑制ホルモンとして知られるコレシストキニン(Cck)による細胞内シグナリング(CCKR signaling map)を同定した。先行データから三次元培養筋においてCck遺伝子の構成的発現および分泌が観察され、低酸素培養下で強く誘導されることが明らかとなった(T.Nakamura et al. 2021)が、細胞内分子制御について十分な解析が行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、低酸素誘導因子を破壊した三次元培養筋を作成し、低酸素環境下におけるコレシストキニン遺伝子発現および分泌動態を解析することで三次元培養筋に発現するコレシストキニン遺伝子の生物学的、生理的役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 低酸素誘導因子 Hif1 $\alpha$ 遺伝子破壊骨格筋細胞株の作製

計画当初、低酸素誘導因子 Hif1 $\alpha$  遺伝子破壊株の作製として CRISPR-Cas9 遺伝子改変技術を活用することを計画していたが、強い筋分化抑制を起こす可能性が考えられたために計画を変更して一時的な遺伝子発現抑制系として Hif1 $\alpha$  siRNA を利用した遺伝子のノックダウンによる発現抑制系の確立と評価を遂行した。

### 2) 低酸素誘導因子 Hif1 $\alpha$ 遺伝子ノックダウン細胞株の解析

1) において、Hif1 $\alpha$  siRNA を利用した遺伝子抑制系を確立したが3次元化培養筋の導入が技術的に確立されていない。先行研究から筋分化に伴って Hif1 $\alpha$  が増加することが知られており、さらに Cck 遺伝子も平面培養系において筋分化とともにその発現が上昇するため、平面培養系の筋分化期間における Cck 発現や Hif1 $\alpha$  ノックダウン株の検証を行った。

### 3) Hif1 $\alpha$ 遺伝子ノックダウン細胞株がコレシストキニン発現に与える影響

2) の平面培養系における Hif1 $\alpha$  遺伝子ノックダウンの影響を検証した。

## 4. 研究成果

siRNA を利用した Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンによる効果検証を行ったところ、Hif1 $\alpha$  の発現を 50%低下させることに成功した

(Fig. 1)。Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンが筋分化抑制に働く可能性もあるため、筋特異的な転写因子である Myogenin, MyoD1、および総ミオシンの発現量を評価したところ、コントロールと比較してその発現が増加していることが明らかとなった。また、Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンが細胞周期関連遺伝子群の発現に影響を与える可能性を検討したが、コントロールと比較して変動していないことが明らかとなった。さらに Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンが Hif1 $\alpha$  ターゲット遺伝子に与える影響を検討したところ、ターゲット遺伝子の 1 つである Pdk1 遺伝子発現の低下が観察できた。

Cck 遺伝子発現は、筋分化とともに発現が上昇することが明らかとなっているため、Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンが強い筋分化抑制を起こすと発現制御の解析が困難になる。本研究で遂行した Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンでは、少なくとも筋分化抑制は生じていなかったため、Cck 遺伝子発現の影響を検証した。その結果、Hif1 $\alpha$  遺伝子ノックダウンは筋分化中の Cck 遺伝子の発現の著しい発現低下を誘導することが明らかとなった (Fig. 2)。この効果は Hif1 $\alpha$  自身の発現低下よりも大きな影響を与えていた。また、生体筋では、Trim33 が Cck 遺伝子を強く抑制していることが知られている。そこで、Hif1 $\alpha$  遺伝子のノックダウンが Trim33 遺伝子発現に与える影響を検討したところ、変動は観察できなかった。このことから、Hif1 $\alpha$  遺伝子ノックダウンによる Cck 遺伝子発現の著しい低下には Trim33 遺伝子発現変動は関与していないことが明らかとなった。また、Cck 分泌動態として先行データから平面培養では培地中に微量であるが検出されたために、まず 3 次元化した培養筋内の Cck および培地中に放出された Cck の同定を試みた。その結果、培養筋内の Cck は検出されたものの、培地内の Cck は検出することはできなかった。また、当初電気刺激により Cck 発現経路の活性化が生じていたために、電気刺激負荷に伴う筋収縮の効果を再検証したところ、細胞内の構成的な発現上昇および培地中への分泌も検出されなかった。以上の事から、Cck タンパク質は、平面培養筋および 3 次元培養筋において一定量の構成的な発現が確認できるものの細胞外への分泌は非常に少ないか、分泌されない可能性があることが示唆された。今後は Cck タンパク質の検出感度をあげて、低酸素曝露による Cck タンパク質の発現や分泌動態について詳細な検証を続ける予定である。

#### <引用文献>

- ① T. Nakamura, S. Takagi, D. Okuzaki, S. Matsui, T. Fujisato. Hypoxia transactivates cholecystokinin gene expression in 3D-engineered muscle. *J. Biosci. Bioeng.* 132(1):64-70 2021.

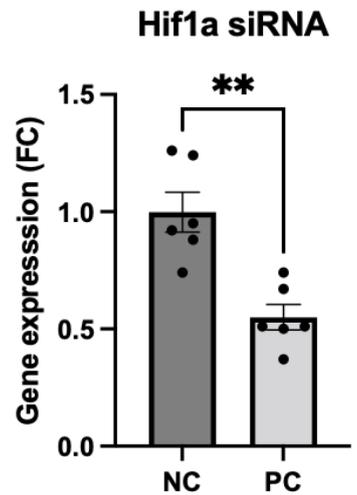


Fig.1 Hif1 $\alpha$  ノックダウンの効果  
NC:Control siRNA, PC:Hif1 $\alpha$  siRNA  
\*\*p<0.01 n=6/group

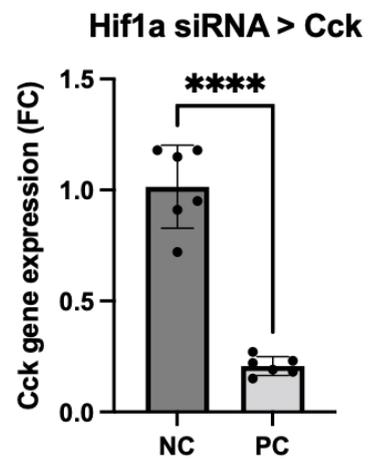


Fig.2 Hif1 $\alpha$  ノックダウンが Cck 遺伝子発現に与える影響 NC:Control siRNA, PC:Hif1 $\alpha$  siRNA \*\*\*\*p<0.0001 n=6/group

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Nakamura Tomohiro, Takagi Shunya, Okuzaki Daisuke, Matsui Seika, Fujisato Toshia	4. 巻 132
2. 論文標題 Hypoxia transactivates cholecystokinin gene expression in 3D-engineered muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 64 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.03.006	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 T.Sugimoto, S.Imai, M.Yoshikawa, T.Fujisato, T. Hashimoto, T. Nakamura.	4. 巻 132(4)
2. 論文標題 Mechanical unloading of 3D-engineered muscle leads to muscle atrophy by suppressing protein synthesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Appl. Physiol.	6. 最初と最後の頁 1091 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00323	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 Sugimoto Takeshi, Nakamura Tomohiro, Yokoyama Sho, Fujisato Toshia, Konishi Satoshi, Hashimoto Takeshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Investigation of Brain Function-Related Myokine Secretion by Using Contractile 3D-Engineered Muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5723 ~ 5723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23105723	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 中村友浩、藤里俊哉	4. 巻 54(7)
2. 論文標題 3次元培養筋のCck遺伝子発現と低酸素応答	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞.	6. 最初と最後の頁 34 ~ 37
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 中村友浩、藤里俊哉	4. 巻 6(7)
2. 論文標題 マイオカイン探索モデルとしての3次元培養筋	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 84-86
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村友浩, 今井尚馬, 藤里俊哉
2. 発表標題 筋細胞株C2C12細胞におけるコレシストキニン遺伝子発現動態の解析
3. 学会等名 第75回日本体力医学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井尚馬, 杉本岳史, 橋本健志, 藤里俊哉, 中村友浩
2. 発表標題 機械的除負荷が三次元培養骨格筋に与える影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harada M., Nakamura T., Yokoyama S.
2. 発表標題 DESIGN AND CONSTRUCTION OF A CONTINUOUS QUANTITATIVE FORCE MEASUREMENT MICRODEVICE FOR ARTIFICIAL SKELETAL MUSCLE
3. 学会等名 MicroTAS 2020 Conference
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田真樹, 中村友浩, 横山奨
2. 発表標題 人工骨格筋収縮力の連続的定量測定を目的としたデバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中永裕香, 石田高志, 藤里俊哉, 中村友浩
2. 発表標題 3次元培養筋の機械的除負荷がNAD+/Sirt1発現に与える影響
3. 学会等名 第8回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村友浩, 藤里俊哉
2. 発表標題 低酸素誘導因子Hif-1 のノックダウンは筋芽細胞株C2C12のコレシストキニン遺伝子発現を抑制する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>健康体育研究室 スタッフ紹介  <a href="https://www.oit.ac.jp/japanese/academic/eng/dept/human/ken-tai/staff_nakamura.html">https://www.oit.ac.jp/japanese/academic/eng/dept/human/ken-tai/staff_nakamura.html</a>  OIT-P 地域産業プラットフォーム  <a href="https://www.oit.ac.jp/oitp/introduction/nakamura.html">https://www.oit.ac.jp/oitp/introduction/nakamura.html</a>  FLOW トレーニングでも越えられぬ素質 それを早期に見極めることが トップアスリート育成のカギ  <a href="https://www.josho.ac.jp/flow/olympic/oit/interview_19.html">https://www.josho.ac.jp/flow/olympic/oit/interview_19.html</a>  大阪工業大学 工学部 総合人間学系教室 健康体育研究室  <a href="https://www.oit.ac.jp/japanese/academic/eng/dept/human/ken-tai/">https://www.oit.ac.jp/japanese/academic/eng/dept/human/ken-tai/</a></p>
--

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	北村 憲司  (Kitamura Kenji)  (40214811)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・准教授   (15401)	
研究 分 担 者	藤里 俊哉  (Fujisato Toshiya)  (60270732)	大阪工業大学・工学部・教授   (34406)	

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