

令和 6 年 5 月 2 7 日現在

機関番号：3 2 6 5 3

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：2 0 K 1 8 0 1 1

研究課題名（和文）段階的分化誘導法による骨格筋筋芽細胞分化過程におけるストレスシグナルの役割の解明

研究課題名（英文）Role of stress signals in the differentiation process of skeletal myoblasts by stepwise differentiation induction

研究代表者

菊地 鉄太郎（Kikuchi, Tetsutaro）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：0 0 6 5 0 8 0 5

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では骨格筋の修復と再生を担う筋芽細胞の分化過程におけるストレスシグナルの役割の解明を目指した。段階的分化誘導法を用いて筋管（筋線維）形成前と筋管形成時の筋芽細胞の分化状態を別々に解析する手法を確立した。同手法を用いて、ストレスに対する応答シグナルが筋芽細胞の分化に与える影響を調査したところ、これらのシグナルの抑制は筋管形成前段階・筋管形成段階の双方において分化を抑制する傾向がみられた。しかし、細胞増殖因子の添加に比較してその効果は軽微であった。以上により、ストレスシグナルが筋管形成の前後において筋芽細胞の分化を修飾する因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨格筋の修復・再生に重要な役割を果たす筋芽細胞の分化過程におけるストレスシグナルの役割の解明に取り組んだ。特に、筋芽細胞の分化段階を筋管形成前と筋管形成時に分けて解析する手法を確立し、それぞれにおけるストレス応答シグナルの関与を解析した。この研究は、骨格筋の再生メカニズムの理解を深めるだけでなく、筋ジストロフィーなどの筋疾患の新しい治療法の開発に貢献する可能性がある。また、加齢や損傷による筋力低下の予防や改善にも応用できるため、広範な健康問題の解決に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the role of stress signals in the differentiation process of myoblasts, which are responsible for the repair and regeneration of skeletal muscle. A stepwise differentiation induction method was established to separately analyze the differentiation states of myoblasts before and during myotube (muscle fiber) formation. Using this method, the effects of stress response signals on myoblast differentiation were investigated. The results showed that the inhibition of these signals tended to suppress differentiation in both the pre-myotube formation stage and the myotube formation stage. However, this effect was minor compared to the addition of cell growth factors. These findings indicate that stress signals are modulatory factors in myoblast differentiation before and after myotube formation.

研究分野：細胞生物学、再生医療、組織工学、機械工学、細胞培養工学

キーワード：骨格筋 筋芽細胞 再生 分化 ストレスシグナル p38 UPR

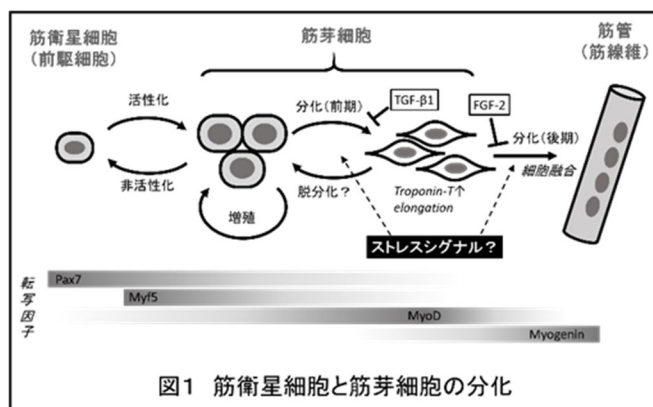
## 1. 研究開始当初の背景

筋衛星細胞は成人の骨格筋の修復・再生を担う前駆細胞の一種であると考えられており、筋線維と筋線維を囲む基底膜の間に存在する。骨格筋が損傷を受けると活性化して増殖を開始し、筋芽細胞となる。筋芽細胞は徐々に分化し、最終的に、新たな筋線維の形成（筋管形成）をしたり、既存の筋線維と融合したりすることで損傷を修復する（図1）。

初代培養の筋芽細胞やMyoDを発現するC2C12細胞などの株化細胞は低血清条件下で筋管形成が誘導されることが知られている。このin vitroの分化誘導系を用いた研究では、筋管形成の際に変動する遺伝子群にATF4やXBP1などの小胞体ストレスの関連遺伝子が含まれていることが報告されている（Genes Dev, 2005）。また、実際にこれらの細胞の分化時に小胞体ストレスに対する応答であるUPRが起きていることも報告されている（Pros One, 2011）。しかし、このUPRが筋芽細胞の筋管形成に必須の要素であるかどうかは証明されておらず、筋芽細胞において低血清刺激がUPRを惹起する機序についても十分にわかっていなかった。

また、筋芽細胞の分化に関わるストレス関連因子としてはUPR以外にp38シグナルが知られている。p38シグナルの阻害は、MyoD等の発現が上昇する筋芽細胞の分化過程の前期、および、細胞同士が融合し筋管形成する分化誘導の後期のいずれについても抑制的な効果を示すが、前者はIGFシグナルにより緩和される一方、後者は緩和されない（Am J Physiol Cell Physiol, 2015）。よって、p38シグナルは分化前期と分化後期で異なる役割を持つ可能性がある。p38とUPRの関係として、UPRにはIRE1-ASK1-MKK4等を介してp38シグナルを誘導する経路があり、逆にp38シグナルはNADPHオキシターゼ等を介してUPRを誘導することも知られている。そのため、筋芽細胞分化におけるUPRはp38シグナルの結果もしくは原因である可能性が考えられる。

このように骨格筋筋芽細胞の分化過程において、ストレスシグナルであるUPRやp38が関与していることが報告されているが、両者の関係性やそれらが惹起される機序、および、これらのシグナルが骨格筋の再生を促すのか抑制するのかについてはコンセンサスが得られていない。そこで、その理由の一つが、従来の低血清培養による分化誘導系では筋芽細胞の分化過程の前期と後期を別々に解析することが困難であるためと考え、より詳細に筋芽細胞の分化過程を追うことができる段階的分化誘導法を用いれば、これらストレスシグナルの役割の解明につながるのではないかと考えた。



## 2. 研究の目的

従来の研究では筋芽細胞の分化誘導方法として2%～5%程度の低血清培地が用いられてきた。増殖培地を低血清培地に切り替えることで筋芽細胞は分化を開始し、最終的に筋管形成に至る。しかし、この低血清刺激による分化誘導法では、MyoDやTroponin-Tの発現上昇がみられる筋芽細胞の分化過程の前期と、Myogenin等の発現が上昇し細胞融合により筋管形成する分化誘導の後期の両方が進行するため、分化の段階に対応した分析を行うことが困難であった（図1参照）。そこで、本研究では、段階的分化誘導法を用いて筋芽細胞の分化段階を制御することで、これまで十分に理解されていなかった、筋芽細胞の分化過程におけるストレスシグナルの役割について解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト骨格筋細胞の調製

実験には市販のヒト骨格筋筋芽細胞を使用した。SkGM-2（Lonza）に10 ng/mLの線維芽細胞成長因子-2（FGF-2）と125 ng/mLのiMatrix-221を添加した増殖培地で、2～3回継代培養し、凍結ストックを作製した。

## (2) 筋管形成を避けた無血清分化培養

ヒト骨格筋細胞を培養皿に 2,500 細胞/cm<sup>2</sup> で播種し、1 mg/mL の組換えヒト血清アルブミン、1/100 ITS-G 溶液、500 ng/mL の iMatrix-221、100 U/mL のペニシリンおよび 100 U/mL のストレプトマイシンを含む高グルコース Dulbecco 改変イーグル培地 (DMEM) にて 3 日間培養した。実験に応じて 10 ng/mL FGF-2、10 ng/mL 上皮成長因子 (EGF)、1 ng/mL 形質転換成長因子ベータ-1 (TGF- $\beta$ 1)、1  $\mu$ M SB505124、10  $\mu$ M U0126、2  $\mu$ M PD184352、50  $\mu$ M LY-294002、10  $\mu$ M SB203580、0.3  $\mu$ M BIRB796、10  $\mu$ M SP600125 を添加した。

## (3) フローサイトメトリー

ヒト骨格筋細胞に対してフローサイトメトリー解析を実施した。一次抗体を固定前に適用する場合は、回収された細胞を無血清培地中で 1/400 の一次抗体で 30 分処理した。一次抗体を洗浄後、細胞は 1/400 の二次抗体で 30 分処理され、再度洗浄した。次に、1%パラホルムアルデヒド水溶液で 4℃で一晩固定した。すべての一次抗体を固定後に適用する場合は回収後に直ちに細胞を固定した。固定後、洗浄された細胞は 0.1% Triton X-100 と一次抗体で 30 分処理した。洗浄後、二次抗体および 0.5  $\mu$ g/mL の 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で 30 分処理した。その後、フローサイトメトリー解析を行った。洗浄および抗体の希釈には、1% Blocking One Solution (Nacalai Tesque) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を使用した。

## (3) 磁気細胞分離 (MACS)

筋芽細胞の 2 つのサブポピュレーションを分取するために MACS を利用した。まず、細胞懸濁液をマーカー抗体 (マウス IgM) で 4℃で 30 分処理した。洗浄後、細胞は磁気ビーズ結合抗マウス IgM 抗体で 30 分 4℃で処理した。その後、磁気分離カラムを使用して細胞を分離した。陽性選択された分画はマーカー陽性細胞として保存し、フロースルーはさらに磁気ビーズ結合抗 NCAM 抗体で処理され、別のカラムで分離した。陽性選択された分画とフロースルーはそれぞれマーカー陰性細胞およびフロースルー細胞とした。

## (4) 筋管形成アッセイ

筋芽細胞の分化および筋管形成の程度を評価するために、分化培養および免疫蛍光イメージングを実施した。分離された細胞を、マトリゲルでコーティングされた細胞培養プレートに 5 × 10<sup>4</sup> 細胞/cm<sup>2</sup> で播種し、上記の分化培地で培養した。細胞はパラホルムアルデヒド水溶液で固定後、PBS で洗浄した。抗 MYH4 抗体および抗デスミン抗体で 1 時間処理した。洗浄後、細胞は 2 次抗体、Alexa Fluor 568 結合ファロイジン、および DAPI で 1 時間処理した。洗浄後、レーザー走査型共焦点顕微鏡で蛍光画像を取得した。

## (5) 免疫蛍光イメージングの解析

すべての細胞、デスミン陽性細胞、および MYH4 陽性細胞の核を、ImageJ ソフトウェアを使用して検出した。次に、全体のデスミン陽性比率 (筋芽細胞の純度) およびデスミン陽性細胞中の MYH4 陽性比率 (筋管形成比率) を計算した。

## (6) 遺伝子発現解析

MACS で分離された細胞から total RNA を抽出した。RNA から cDNA を合成し、TaqMan RT-PCR アッセイにより遺伝子発現量の解析を行った。Ct の計算には geNorm 法により決定された 3 つの遺伝子の発現の幾何平均 (Ct 値の算術平均) を内因性対照として使用した。

# 4. 研究成果

## (1) 筋芽細胞の分化コントロール

ヒト骨格筋筋芽細胞を用いて段階的な分化誘導の方法について検討を行った。はじめに従来の低血清培地による筋管形成アッセイにより筋管形成に対する FGF-2 と TGF- $\beta$ 1 の効果を確認したところ、FGF-2 と TGF- $\beta$ 1 は濃度依存的かつ協同的に筋芽細胞の elongation および筋管形成を抑制した。また、筋管形成を誘導する前の増殖培養の段階での TGF- $\beta$ 1 の添加は筋管形成を遅延した。

一方、フローサイトメトリーによるポピュレーション解析の結果、筋管形成前の筋芽細胞についても、2 つのサブポピュレーションが存在することが示唆された。そこで 2 群を識別する手法を検討した結果、細胞固定後の NCAM (CD56) 抗体に対する染色性が異なることが分かった (図 1)。

そこで、サブポピュレーションに影響を及ぼす因子を検討した結果、無血清分化誘導培地で培養すると、NCAM 染色性が上昇するのにに対し、増殖因子 (FGF-2: 10 ng/mL, EGF: 10 ng/mL, TGF- $\beta$ 1: 1 ng/mL) を添加すると、NCAM 染色性の上昇が抑制された。さらに、SB505124 (TGF- $\beta$ 1 signal inhibitor)、U0126 (ERK1/2 signal inhibitor) は NCAM 染色性を上昇させ、LY-294002 (PI3K

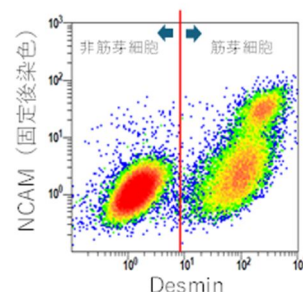


図 1



signal inhibitor) と BIRB796 (p38 signal inhibitor) は NCAM 染色性を低下させた。これらのことから、筋管形成前の筋芽細胞サブポピュレーションのうち、NCAM 染色性の高い群が分化型 (differentiated)、低い群が増殖型 (proliferating) の筋芽細胞に相当すると推測された。

また、検討を重ねた結果、この筋芽細胞の 2 つのサブポピュレーションを分離する抗体を発見したので、MACS 分離を行った。分離した 2 つの群を解析した結果、NCAM 染色性の高い、マーカー陽性群で MYOG、MYH7、MYH3、TNNT3 などの筋芽細胞の分化により上昇すると考えられている遺伝子の発現が上昇していた。さらに、各群で筋管形成アッセイをした結果、マーカー陽性群の方が筋管形成率が高かった。よって、NCAM 染色性の高い群がより分化が進んだ筋芽細胞であると考えられた。

## (2) 筋管形成前におけるストレスシグナルの筋芽細胞分化への影響

p38 シグナルと UPR がどのように筋管形成前の筋芽細胞分化に影響するかをフローサイトメトリーを用いて調べた。まず、無血清分化誘導培地において p38 シグナルの阻害剤である BIRB796 と UPR などのストレスを軽減する効果が報告されている TUDCA の影響を見たところ、わずかに分化 (マーカー抗体の染色性の上昇) を抑制する傾向は見られたものの効果はあまり大きくなかった (図 2)。そこで増殖培地を用いて、活性酸素を発生する過酸化水素と分泌系を阻害して UPR を誘発する Brefeldin A をストレス因子として用いて阻害因子との組み合わせを検討した。その結果、ストレス因子には分化抑制傾向を認めたものの、BIRB796 や TUDCA に大きな効果はなかった (図 3)。よって、筋管形成前の筋芽細胞の分化については、増殖因子の効果に比較して、p38 や UPR の関与は限定的であると考えられた。

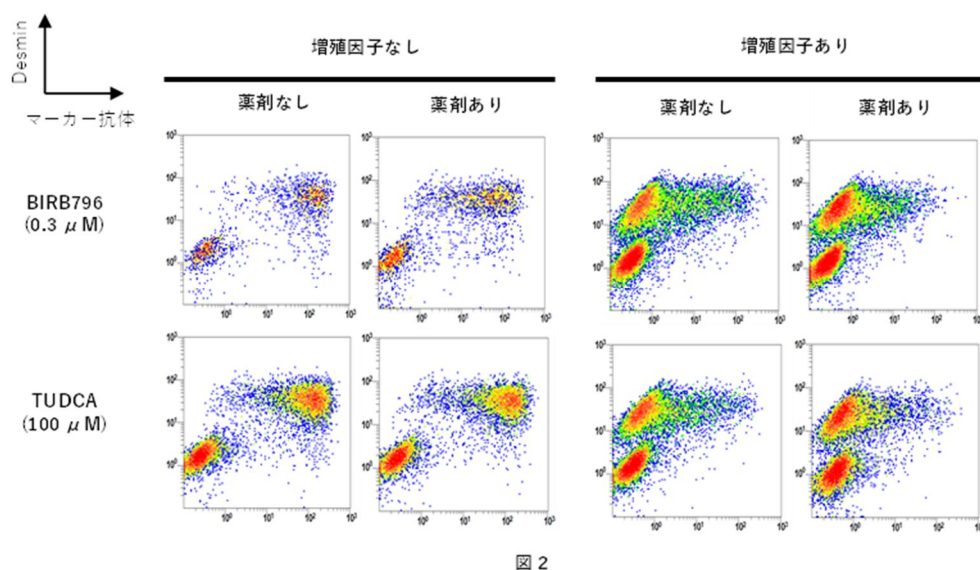


図 2

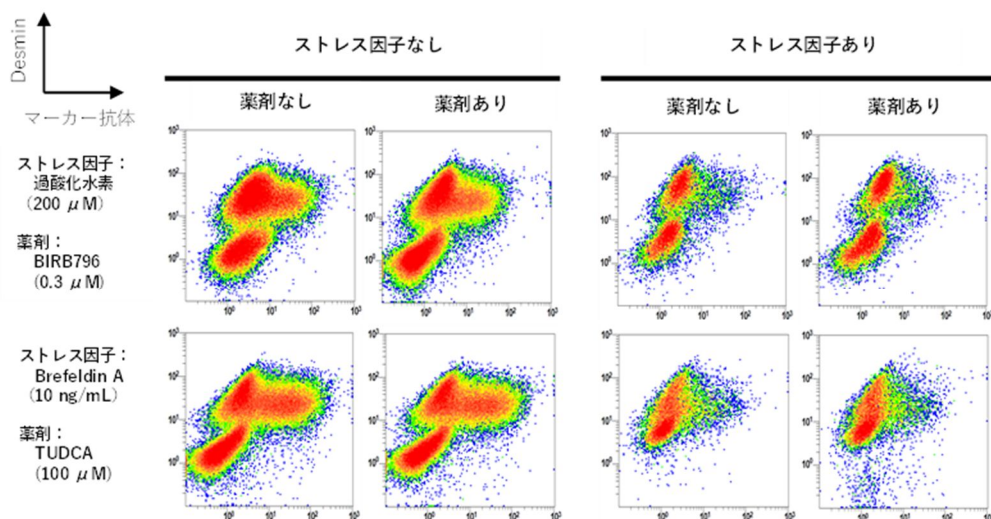


図 3

### (3) ストレスシグナルの筋管形成への影響

最後に筋管形成時の p38 シグナルと UPR の影響について調べた。NCAM 抗体による MACS を行い純化したヒト骨格筋筋芽細胞を用いて、無血清分化培養による筋管形成アッセイを行った（図 4）。ストレス因子と考えられる過酸化水素・Brefeldin A、および、ストレスを緩和すると考えられる BIRB796・TUDCA のいずれもやや筋管形成を抑制する傾向があった。しかも、ストレス因子とストレス緩和因子を両方入れた場合は相加的に筋管形成を抑制した。非生理的な酸化ストレスや ER ストレスが筋芽細胞の分化を抑制する一方で、ストレスに対して防御的に働く p38 シグナルや UPR の抑制はストレスを増強することにより結果的に分化に対して抑制的に働いているのではないかと考えられる。

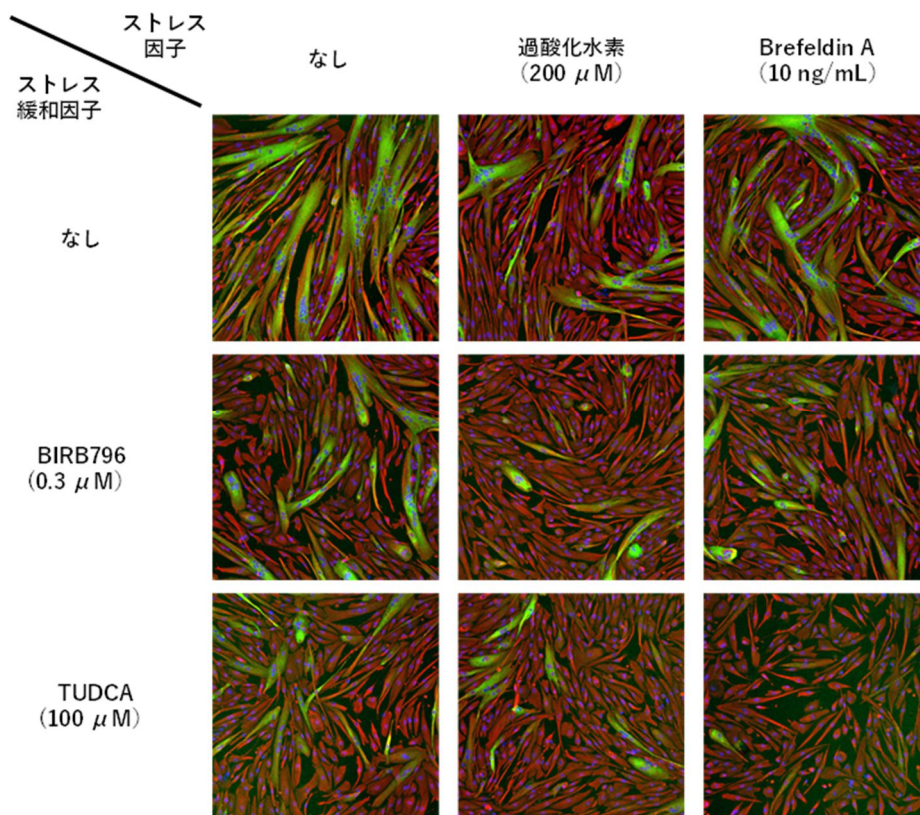


図 4 筋管形成アッセイ (48h)  
(赤：デスミン、緑：ミオシン 4、青：核)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikuchi Tetsutaro, Matsuura Katsuhisa, Shimizu Tatsuya	4. 巻 132
2. 論文標題 Non-coating method for non-adherent cell culture using high molecular weight dextran sulfate and bovine serum albumin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 537 ~ 542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.08.006	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊地鉄太郎
2. 発表標題 ヒト骨格筋芽細胞の分化過程におけるNCAM-1分子の変化
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Kikuchi
2. 発表標題 Population analysis using Desmin and CD56 as markers revealed that the transition from proliferative myoblasts to differentiated myoblasts is directly irreversible
3. 学会等名 ISSCR/JSRM International Symposium Virtual（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地 鉄太郎
2. 発表標題 ヒト骨格筋芽細胞における増殖型から分化型への遷移過程の解析
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------