

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560345

研究課題名(和文)筋収縮刺激による培養筋細胞を用いたミトコンドリア遊走機構の解明

研究課題名(英文)Electrical stimulation induced mitochondria migration in cell culture

研究代表者

檜垣 靖樹 (HIGAKI, Yasuki)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：10228702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満者の骨格筋細胞内には多量の脂肪が貯蔵されており、脂肪量とインスリン感受性は負の相関を示す。一方、インスリン感受性が亢進している持久鍛錬者の筋細胞内脂肪量は、肥満者よりもさらに多い。しかし、なぜ持久鍛錬者は多量の筋細胞内脂肪を有するのに、インスリン抵抗性を引き起こさないのか、不明である。本研究では、培養細胞実験系で、核の周辺にミトコンドリアと脂肪滴が局在すること、また、それらの解剖学的位置関係を有しながら脂肪滴を取り囲む現象を捉えた動画像を得た。インスリン抵抗性の背景に、ミトコンドリアと脂肪滴の解剖学的位置関係が影響する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that fat storage in skeletal muscle is higher in obese people than that in healthy people. Insulin resistance is associated with high levels of stored lipids in skeletal muscle cells. However, it is not clear why enhanced insulin sensitivity is observed in endurance athletes who had high lipid storage in skeletal muscle.

Our results shows that mitochondria and lipid droplet are existed around nucleus, and nucleus and mitochondria go around lipid droplet in C2C12 cell culture. We therefore hypothesized that localization of mitochondria and lipid droplet in skeletal muscle cells may be associated with insulin resistance.

研究分野：運動生理学

キーワード：ミトコンドリア 脂肪滴 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

肥満者の骨格筋細胞内には多量の脂肪が貯蔵されており、脂肪量とインスリン感受性は負の相関を示す(*Diabetes, 1997*)。一方、インスリン感受性が亢進している持久鍛錬者の筋細胞内脂肪量は、健常人(非運動選手)の2.5倍にも達し、肥満者よりもさらに多い(図1参照)。しかし、なぜ持久鍛錬者は多量の筋細胞内脂肪を有するのに、インスリン抵抗性を引き起こさないのか、筋内脂肪貯蔵が同量でも全く異なる生理現象を引き起こす要因は何か、不明である。

電顕写真像において、骨格筋細胞内の脂肪滴はよくミトコンドリア近傍に存在する(*Hoppeler et al. 1999*)。エネルギー産生の効率を考えると、脂肪という原料とミトコンドリアというエネルギー産生工場が近接する細胞内環境は、非常に好都合であるといえる。現在、細胞質内にある脂肪酸結合タンパク質(FATP)が脂肪滴をミトコンドリアに輸送すること(*Biochem J. 1999*)が報告されているが、脂質分解の律速は、FATPではなく長鎖脂肪酸の筋細胞内輸送とミトコンドリア内輸送であることが多くの実験データより示されている(*Exer. Sports Sci. Rev. 2012*)。

ところで、多核細胞である骨格筋細胞において、核自体が細胞内でお互いの距離を上手に保ち配置されている制御機構は謎であったが、最近、モーター蛋白(MAP7、Kinesin)を上手に操り核自体が動くことが明らかとなった(*Nature, 2012*)。興味深いことに、神経細胞のミトコンドリアにも同様な機構が報告されている(*J. Cell Sci. 2012*)。

これらの知見より、我々は、骨格筋細胞において、ミトコンドリア自身が細胞内のモーター蛋白とそのレールを利用し、脂肪滴へ遊走し脂肪分解の効率化を図っているという仮説を着想するに至った。そして、このシステムは持久鍛錬者で優れており、脂肪合成と分解の代謝回転に違いを生じる要因の一つとなる、と推量した。

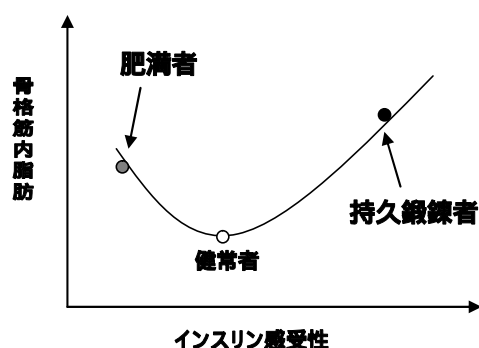


図1 骨格筋内脂肪とインスリン感受性の関係(持久鍛錬者の骨格筋内脂肪量は、肥満者に比べ高値を示すが、インスリン感受性の亢進を認めている。従って、骨格筋内脂肪量とインスリン感受性の関連にはパラドックスが存在する。)

2. 研究目的

本研究では、蛍光ユニットと高画質 CCD カメラが一体となった培養細胞をリアルタイムにイメージングできる装置を用い、作業仮説であるミトコンドリアが脂肪滴に移動する様子を視覚化することに挑戦した。

3. 実験方法

1) 実験 1

実験 1 では、iPS 細胞から分化し筋細胞(分化 14 日目)を用い、自作した多電極電気刺激装置で電気刺激による筋収縮実験を行った。対照細胞として、無刺激の筋細胞を設定し、DNA マイクロアレイ及び RT-PCR による定量解析を実施した。

2) 実験 2

実験 2 では、C2C12 細胞を用いた。培養条件は、CO₂: 5%、O₂: 20.9%(大気濃度)、温

度：37 とした。経時的な細胞モニタリングには、20 倍の対物レンズを使用し、使用光源は、明視野、青色励起 (BODIPY)、緑色励起 (MitoTracker) とした。各光源を用いたモニタリングの露光時間は、それぞれ 400msec (明視野)、1000msec (BODIPY)、500msec (MitoTracker) とした。撮影インターバルは 6 分間として、24 時間モニタリングした。

細胞培養には、増殖培地として 10% FBS, DMEM (1% antibiotics) を、分化培地として 2% FBS, DMEM (1% antibiotics) を用いた。なお、培養 14 日目に 50mM パルミチン酸溶液を最終濃度が 200 μ M になるよう、培養液に添加した。培養 15 日目より、ミトコンドリア染色のために MitoTracker 溶液を、そして脂質染色のため BODIPY 溶液を添加した。その後、モニタリング装置にプレートを設置し、細胞が融合し巨大化しており、かつ蛍光像が明瞭な部分が視野内に収まるように調整し、モニタリングを開始した。培養開始から計 16 日目にモニタリングが終了した。

4. 研究成果

iPS 筋細胞を用いた電気刺激実験では、タイムラプスによる動画解析において、明らかな収縮を観察することはできなかった。そこで、電気刺激による明らかな筋細胞収縮を観察できた C2C12 細胞を用いた実験を行った。

C2C12 細胞を用いて、BODIPY/MitoTracker 染色による脂肪滴とミトコンドリアの細胞内局在を観察した。図 2 には、培養細胞モニタリング装置による経時的な変化を観察した動画像より、静止画を掲載した。

図 2 の 4 区分のうち、左下に明視野画像を示した。左上には、MitoTracker によるミトコンドリアの染色画像を示し、4 つの画像の中央を横断する 1 本の線維の中央に丸く見えるのが核である。左上画像の赤色蛍光像はミトコンドリアの局在を示し、核の周辺に強い蛍光画像が認められた。右上には、BODIPY による脂肪滴の緑色蛍光像を、右下には、ミトコンドリアと脂肪滴の画像を重ね合わせて示した。核の周辺にはミトコンドリアが多く観察され、かつ、それらの周囲には脂肪滴が認められた。動画像においては、これらの脂肪滴が時間経過に伴い減少することを観察した。

電顕写真像において骨格筋細胞内の脂肪滴がよくミトコンドリア近傍に観察されているが、培養細胞実験系においても同様な結果が得られた。さらに、経時的にこれらの局在を観察した結果、ミトコンドリアと脂肪滴に加え、核が近づいてくる動画像を得た。核は、MAP7 や Kinesin などのモーター蛋白を操り、移動することがわかっているが (Nature, 2012)、その生物学的意味づけは不明である。仮に、核のエネルギー需要を一定に保つために、核自らがミトコンドリアと共に脂肪滴に移動し、エネルギー供給を得ているのであれば、核の自律性を示すものであると言える。持久的鍛錬者で観察される筋細胞内脂肪の増加は、筋収縮刺激によって発現する様々な遺伝子調節に必要なエネルギー供給のため、貯蔵されているのかもしれない。ミトコンドリアと核が非常に隣接した解剖学的位置関係を有しながら、脂肪滴を取り囲む動画像について、再現性の確認とともにそのメカニズムを明らかにする必要がある。

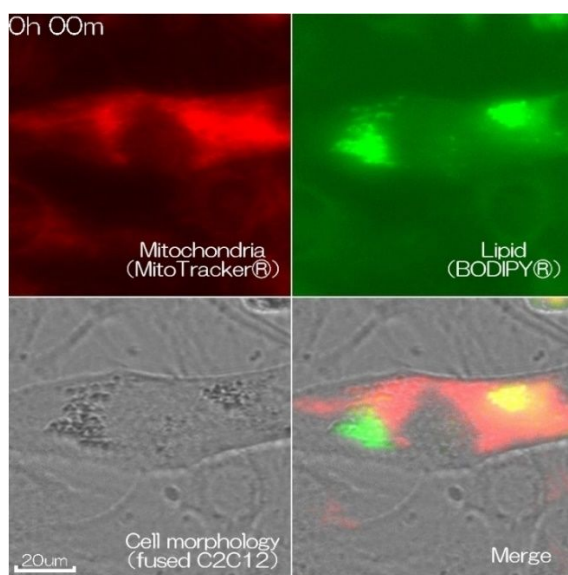


図2 C2C12 培養細胞を用いたミトコンドリア、脂肪滴、及び核の局在

結論として、培養細胞実験系で、核の周辺にミトコンドリアと脂肪滴が局在すること、また、それらの解剖学的位置関係を有しながら脂肪滴を取り囲む現象を可視化することが可能となった。

今後の課題として、インスリン抵抗性モデルおよび持久的鍛錬者のシミュレーションモデルを用いて、各組織の局在およびサイズの数値化、そして核とミトコンドリアの遊走速度の評価に取り組む予定である。

本研究の遂行にあたり、iPS 細胞は、京都大学 iPS 細胞研究所の桜井英俊講師より提供を受け、培養細胞実験の実施では、株式会社アステック学術研究員、緒方貴宏氏に技術的な支援をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計1本)

Yasuno I, Osafune K, Sakurai H, Asaka

I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H; Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 30; 448(2):175-81, 2014. (査読有)

【学会発表】(計5件)

桧垣 靖樹 分子骨格筋糖代謝と分子運動疫学の融合を目指して 第24回体力・栄養・免疫学会大会 平成26年8月30日(土) 同志社大学(京都府・京都市) 特別講演

桧垣 靖樹 iPS細胞由来筋細胞の機能解析 第4回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会 平成26年3月30日(日) 福岡国際会議場(福岡県・福岡市) ワークショップ

安野 哲彦 患者由来iPS細胞から病的筋細胞への分化誘導 第4回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会 平成26年3月30日(日) 福岡国際会議場(福岡県・福岡市) ワークショップ

兼岡 秀俊、安野 哲彦、桧垣靖樹; 患者iPS細胞由来筋細胞を用いた先天性横紋融解症の治療戦略 第35回福岡臨床免疫研究会 平成27年2月14日(土) 博多エクセル東急(福岡県・福岡市)

安野 哲彦、兼岡 秀俊、桧垣 靖樹、桜井 英俊、長船 健二; ヒトiPS細胞を用いた先天性横紋筋融解症の病態解明 第23回日本組織適合性学会大会 平成26年9月15日(月) 長崎大学(長

崎県・長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜垣 靖樹 (Higaki, Yasuki)
福岡大学・スポーツ科学部・教授
研究者番号：10228702

(2) 研究分担者

須藤 みず紀 (SUDO, Mizuki)
明治安田厚生事業団体体力医学研
究所・研究員
研究者番号：10585186

安藤 創一 (ANDO, Soichi)
電気通信大学・情報理工学研究科・
准教授
研究者番号：50535630

安野 哲彦 (YASUNO, Tetsuhiko)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：80551994

兼岡 秀俊 (KANEOKA, Hidetoshi)
福岡大学・医学部・教授)
研究者番号：20161169