



・准教授
鈴木 貴弘

<共同研究者>

・教授
玖村 朗人

2014年 九州大学 大学院生物資源環境科学府
博士課程修了 博士（農学）

2014年 日本学術振興会特別研究員 PD
川崎医科大学 医学部

2015年 北海道大学 大学院農学研究院 助教

2020年 九州大学 大学院農学研究院 准教授

筋線維型に応じて変化する

筋幹細胞の特性獲得メカニズムの検証

1. 背景・目的

食肉の質（味、香り、柔らかさおよび脂肪交雜の程度など）を向上させるためには、原料となる骨格筋の筋線維型（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）を制御する必要がある。しかし、出生後の筋形成と成長の過程において、骨格筋細胞（細く長い構造を有するため“筋線維”と呼ばれる）を取り巻く運動神経によって筋線維型を制御する刺激機構が構築されると考えられている。そのため、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や、長期的なトレーニングを介した運動負荷をかけなければならないため、筋線維型の変換は現実的には困難であるとされている[1]。

しかし、我々は骨格筋の肥大や再生に寄与する筋幹細胞（衛星細胞）が筋芽細胞へと分化し、互いに融合して新生筋線維（筋管）を形成する際、上述の運動神経の影響を受けずに自律的に筋線維型を制御する「コミットメント（初期決定）機構」の存在に着目している。これまでに我々は、神経細胞の混入を防いだ高純度の細胞培養系を用いて、遅筋部位を由来とする衛星細胞では速筋由来の細胞よりも、多機能性の細胞制御因子 **semaphorin 3A (Sema3A)** を多量に合成・分泌すること[2]、および **Sema3A** が遅筋型筋管の形成を誘導することを突き止めた[3]。同培養系を用いて、最近では、速筋部位を由来とする衛星細胞が **Sema3A** と同様に多機能ではあるが、様々な組織や細胞において相反する生理機能をもった因子 **netrin-1** を遅筋由来の細胞よりも多量に合成し、速筋型の筋管を積極的に形成することも報告した[4]。以上より、衛星細胞による筋管の筋線維型初期決定機構という仮説の妥当性が示されつつある。

一方で、どのような経緯を経て衛星細胞が自律的に筋線維型を制御する特性を獲得したのか、詳細な分子メカニズムについては不明である。すなわち、1種の体性幹細胞として

認識される衛星細胞が、由来とする骨格筋部位を異にするだけで、何故 *Sema3A* や *netrin-1* といった別々の細胞制御因子を高発現する能力を獲得し、さらには筋線維型の違う筋管を形成できるのかという要因について未解明なのである。

そこで本研究課題では、衛星細胞（および筋芽細胞）が局在する筋部位の細胞外環境が特性獲得の一因となっているのではないかと作業仮説を立てた。特に、「細胞が接着する足場の硬さの違いによる影響」に着目した。一般的に、遅筋部位は細く柔軟性に富み、速筋は太く硬い性質を示す。よって、それぞれの筋部位に局在する衛星細胞が受ける硬さの度合いには違いがあると予想される点を踏まえ、本研究課題ではモデルとなる細胞培養実験系を構築し、筋管の筋線維型の変化について検証作業を行った。

2. 方法

2.1 ポリアクリルアミドゲル基質の作製と筋芽細胞の培養

本課題では、細胞が接着する足場、すなわち細胞培養基質の硬さの度合い（弾性率）が異なるモデル培養系の構築から着手した。そこで、架橋材の濃度を調整することで弾性率を自在にコントロールできるポリアクリルアミドゲルを基質として採用した。Ishihara ら（2013）の方法に従って、7.5 kPa および 13.8 kPa の弾性率を有し、かつ type I コラーゲンを含むアクリルアミドゲル基質を作製した[5]。それぞれの培養基質に、マウス由来の筋芽細胞株 C2C12 を 2.5×10^4 cells/cm² で播種し、20%牛胎児血清含有のハム F10 培養液（増殖培養液）にて 24 時間静置後、5%馬血清含有 DMEM 培養液に切り換えて 120 時間分化誘導培養を行った。細胞培養は、5% CO₂、95%大気、37°C の条件下で行った。

2.2 RNA 抽出および real-time RT-qPCR

各弾性率を有するゲル基質上で分化誘導後培養をした C2C12 細胞を、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 を抽出した。濃度 50 ng/μL となるようそれぞれのサンプルを調整してから、逆転写に供試して（ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO）、cDNA を作製した。cDNA を含む逆転写反応液を鋳型とし、SYBER GREEN-detection format based on LightCycler Carousel-Based system を用いた real-time RT-qPCR（Light Cycler 1.5 instrument, 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。

2.3 タンパク質の抽出および Western Blotting

項目 2.2 と同様に培養後の C2C12 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 25°C にてブロッキングし、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 4°C において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 25°C にてインキュベーションした。その後、ECL Western Blotting Reagents (Cytiva) とメンブレンを反応させ、Ez-Capture MG システム (ATTO) を用いて化学発光検出を行った。

2.4 統計解析

測定値は平均値±標準誤差で示した。Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft) を用いて、各測定値から得られたデータを Student の t 検定によって有意差検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意であるとした。

3. 結果および考察

3.1 ポリアクリルアミドゲル基質を用いた培養系の妥当性

C2C12 が分化して形成する筋管の成熟度に対して、細胞培養基質の硬さが影響を及ぼすことを調べた先行研究において、約 8–11 kPa の弾性率の範囲が適切であったこと [6]、および間葉系幹細胞を約 8–17 kPa の弾性率を有する基質上で培養すると、筋芽細胞に分化したという報告がある [7]。本研究課題ではこれらの報告をもとに、Ishihara ら (2013) のプロトコルにおいて作製可能な 7.5 kPa または 13.8 kPa の弾性率を示すポリアクリルアミドゲルの 2 種を、本培養基質として採用した。なお、7.5 kPa のゲル基質を遅筋部位を反映したモデル、13.8 kPa を速筋部位と想定して検証作業を進めた。

まず、各ゲル基質が筋芽細胞の培養に適しているか否かを判断するために、播種後 24 時間増殖培養液にて静置した C2C12 を回収し、トリパンブルー染色して生存性を確認した。7.5 kPa の基質上での生存率は約 97.9%、13.8 kPa では約 98.3% であり、細胞毒性等の懸念は小さく、C2C12 を適切に培養できる系であることを確認した。次に、分化培養後の筋管形成様相を確認した (図 1)。その際、一般的に C2C12 を培養する際に用いるプラスティック

ディッシュ (弾性率 約 2–3 GPa) に、type I コラーゲンをコートした基質上での細胞培養も行なったが、いずれも同様に筋管の形成が認められた。

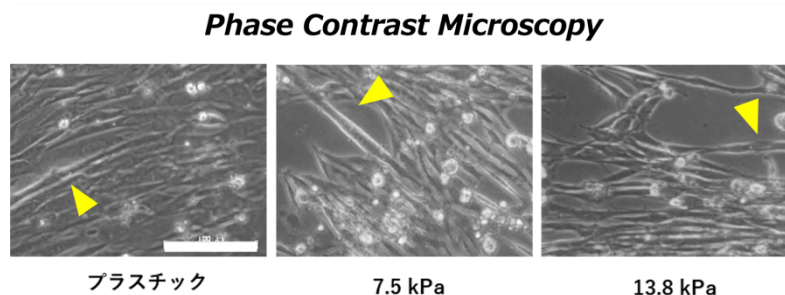


図 1 各基質上での筋管形成の様相

C2C12 をプラスチックディッシュ基質、7.5 kPa または 13.8 kPa の弾性率を有するポリアクリルアミドゲル基質で、それぞれで分化 120 時間目まで培養した際の位相差顕微鏡像。Arrowhead は筋管を示す。スケールバーは 100 μm を示す。

3.2 基質の弾性率差は筋管の形成度合いに影響しない

3.1 より、C2C12 はプラスチック基質上での培養と同様に、ポリアクリルアミドゲル基質上でも筋分化できる可能性が示された。本小項目では、弾性率の違いが筋管の形成自体に影響を及ぼすのか否かを検証した。すなわち、筋管マーカーとなる筋収縮タンパク質ミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MyHC) の幼若なアイソフォームである MyHC-embryonic (*Myh3*) および MyHC-neonatal (*Myh8*) の mRNA 発現レベルを real-time RT-qPCR で調べた (図 2A)。また、MyHC の総アイソフォーム (total MyHC) を認識する抗体を用いて、タンパク質発現レベルについても Western Blotting に供試して比較した (図 2B)。いずれの実験においても、弾性率の違いによって MyHC の発現レベルには差が認められなかった。よって、筋管の形成に対して、設定したゲル基質の弾性率の違いは、影響を及ぼさない可能性が示された。幸いにも、衛星細胞 (および筋芽細胞) による筋線維型の自律制御機構の解明を本課題の主目的とすることを踏まえると、そもそもの筋管形成に弾性率の違いを起因とした差異が生じなかった点は、以降に示す筋線維型組成への影響を検証するために適した実験系であると考えられた。

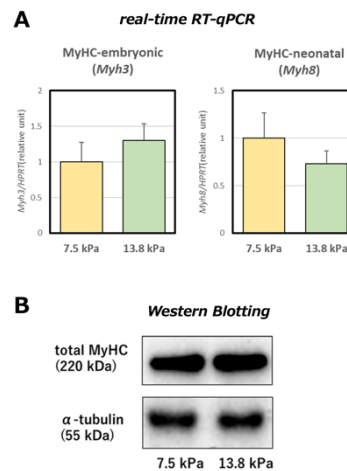


図 2 筋管形成マーカーの発現量の比較
C2C12 を 7.5 kPa または 13.8 kPa の弾性率を有するポリアクリルアミドゲル上で分化 120 時間目まで培養した。A) MyHC-embryonic、MyHC-neonatal の mRNA 発現量を比較した。それぞれ 7.5 kPa を 1 とした相対値で示す。内部標準には HPRT を用いた。B) total MyHC のタンパク質発現量を比較した。内部標準には α -tubulin を用いた。

3.3 基質の弾性率の違いが筋管の筋線維型組成へ変化を及ぼす

本小項目では、培養基質の弾性率の違いが、筋管の筋線維型組成へ与える影響について調べた。すなわち、筋線維型のマーカーとなる MyHC アイソフォーム (遅筋型; I [*Myh7*], 中間型; II a [*Myh2*], 速筋型; II x [*Myh1*], および超速筋型; II b [*Myh4*]) の発現レベルを、real-time RT-qPCR に供試して比較した。なお本比較に際して、内部標準として 3 種類の遺伝子を用いて検討した。3.2 においても使用したプリン代謝関連酵素のハウスキーピング遺伝子 HPRT (図 3A)、同じく 3.2 においてゲル基質の弾性率違いに応じて発現量に変化しなかった MyHC-embryonic (*Myh3*) (図 3B) および MyHC-neonatal (*Myh8*) (図 3C) をそれぞれ用いた。

まず、内部標準に HPRT を用いた際には、MyHC I が 13.8 kPa のゲル基質で、II x が 7.5 kPa でそれぞれ発現量が高い傾向であった。しかし、MyHC II a および II b の発現量に差は認められなかった。

次に、内部標準に MyHC-embryonic を用いた場合には、MyHC I は 13.8 kPa のゲル基質で、II x は 7.5 kPa で、それぞれ有意に高い発現量が認められた。なお、MyHC II a および II b では差が認められなかった。

さらに、内部標準に MyHC-neonatal を用いた際には、MyHC I および II b が 13.8 kPa のゲル基質で、II x は 7.5 kPa で有意に高い発現量であった。MyHC II a は 13.8 kPa で高い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、遅筋型のアイソフォームである MyHC I は 13.8 kPa のポリアクリルアミドゲル基質上において、速筋型の II x は 7.5 kPa の基質上で、それぞれ分化誘導培養した C2C12 で高い発現レベルを示すことが明らかとなった。つまり、培養基質

の弾性率の違いは、形成される筋管の筋線維型組成に変化を与えることが示唆された。予想と反して、速筋部位として設定した 13.8 kPa の基質上では遅筋型のマーカーの発現量が、遅筋部位と想定した 7.5 kPa では速筋型のマーカーがそれぞれ高い発現量を示した点は大変興味深く、その要因追求は今後の新たな研究課題となるであろう。

4. まとめ

本研究課題では、衛星細胞（および筋芽細胞）が自律的に筋線維型を制御するメカニズム解明の一端として、局在する細胞接着面の硬さによる影響に着目した。そこで、7.5 kPa と 13.8 kPa の弾性率を示すポリアクリルアミドゲル基質上に C2C12 筋芽細胞を播種し、分化誘導培養を通して筋管形成を誘導した。形成された筋管の筋線維型組成を調べたところ、7.5 kPa の基質上ではより速筋型のマーカーが、反対に 13.8 kPa では遅筋型マーカーの発現レベルがそれぞれ高いことが明らかとなった。すなわち、細胞の足場の硬さによって、筋線維型の異なる筋管が形成される可能性が示された。本研究成果は、運動神経刺激を介さずに筋線維型を制御する次世代型肉質改良技術開発の礎となると考えている。また、昨今大いに注目されている培養肉生産技術への応用も

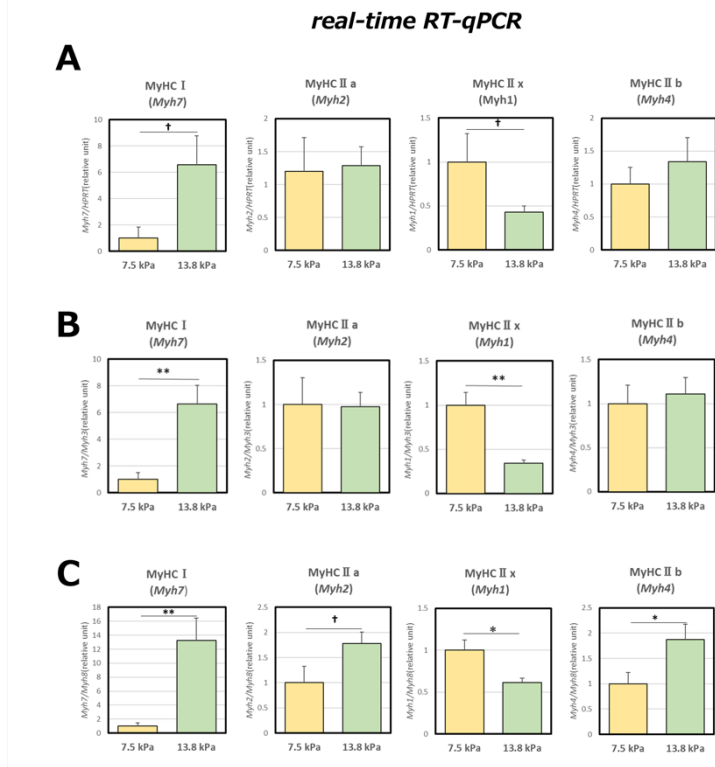


図3 筋線維型マーカーの発現量の比較

C2C12を7.5 kPaまたは13.8 kPaの弾性率を有するポリアクリルアミドゲル上で分化120時間目まで培養し、回収したサンプルをreal-time RT-qPCRに供試して、MyHC I, IIa, IIx およびIIbのmRNA発現量を比較した。内部標準にはA) HPRT、B) MyHC-embryonic、およびC) HPRT MyHC-neonatalをそれぞれ用いた。7.5 kPa区を1とした相対値で示す。†は $p < 0.10$ 、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ である。

見込まれる。すなわち、高価な培養試薬等を導入せずとも、培養基質の弾性率を調整することで、安価かつ容易に肉質をコントロールする技術へと発展することも期待している。

5. 謝辞

本研究課題の実施において、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝申し上げます。ポリアクリルアミドゲル基質の作製をご指導くださいました、北海道大学 大学院先端生命科学研究院の石原誠一郎助教に心より御礼申し上げます。

6. 引用文献

1. Schiaffino, S.; Reggiani, C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 1447–1531, doi:10.1152/physrev.00031.2010.
2. Suzuki, T.; Do, M.K.Q.; Sato, Y.; Ojima, K.; Hara, M.; Mizunoya, W.; Nakamura, M.; Furuse, M.; Ikeuchi, Y.; Anderson, J.E.; et al. Comparative analysis of semaphorin 3A in soleus and EDL muscle satellite cells in vitro toward understanding its role in modulating myogenin expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 476–482, doi:10.1016/j.biocel.2012.10.003.
3. Tatsumi, R.; Suzuki, T.; Do, M.K.Q.; Ohya, Y.; Anderson, J.E.; Shibata, A.; Kawaguchi, M.; Ohya, S.; Ohtsubo, H.; Mizunoya, W.; et al. Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1815–1834, doi:10.1002/stem.2639.
4. Suzuki, T.; Mori, A.; Maeno, T.; Arimatsu, R.; Ichimura, E.; Nishi, Y.; Hisaeda, K.; Yamaya, Y.; Kobayashi, K.; Nakamura, M.; et al. Abundant synthesis of netrin-1 in satellite cell-derived myoblasts isolated from edl rather than soleus muscle regulates fast-type myotube formation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–17, doi:10.3390/ijms22094499.
5. Ishihara, S.; Yasuda, M.; Harada, I.; Mizutani, T.; Kawabata, K.; Haga, H. Substrate stiffness regulates temporary NF- κ B activation via actomyosin contractions. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 2916–2927, doi:10.1016/j.yexcr.2013.09.018.
6. Engler, A.J.; Griffin, M.A.; Sen, S.; Bönnemann, C.G.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 877–887, doi:10.1083/jcb.200405004.
7. Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126*, 677–689, doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.