

課題番号 53

タイムラプス観察を用いた骨格筋萎縮プロセスの視覚的解析

[1] 組織

代表者：久保 純

(大阪大学大学院 薬学研究科)

対応者：家村 顕自

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：なし

研究費：物件費 7,410 円，旅費 122,590 円

[2] 研究経過

超高齢化社会において転倒や寝たきりを防ぐという観点から、骨格筋の萎縮（サルコペニア）の予防法の開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、骨格筋萎縮の予防法の開発の第一段階として、生体内で起こるために通常はリアルタイムで観察することが困難な骨格筋の萎縮について、経時的に観察することでより詳細な知見を得ることを目的として研究を行った。

骨格筋は運動機能や代謝機能を維持する重要な役割を果たしているが、年齢とともに筋肉量の減少が起こり、これによりサルコペニアと呼ばれる骨格筋の萎縮が発生することがある。サルコペニアは主に高齢者に影響を及ぼし、日常生活の活動能力の低下や生活の質（QOL）の低下につながる可能性がある。

筋萎縮の発症には、FoxO 転写因子群（Foxo1, Foxo3, Foxo4）の活性化が関与しており、Atrogenes と呼ばれる筋萎縮原因遺伝子群の発現が誘導されることで、筋タンパク質の分解を引き起こす可能性が示唆されている。Foxo の活性を適切に制御することで、サルコペニアを含む筋萎縮の予防法や治療法の開発が可能と考えられる。

しかし、通常、筋萎縮は生体の骨格筋での事象であるため、各進行段階での筋細胞の状態をリアルタイムに観察することは困難であり、時間軸に沿った詳細な筋萎縮プロセスの解析はこれまでにない。例えば、筋萎縮の発症は筋タンパク質の分解によるものと考えられていますが、「**多核細胞である筋繊維が脱分化し、筋繊維内の細胞核の脱落も同時に起こるのか**」といった点については未だ解明が進んでいない。生体のイモリの筋肉では、再生時

に筋繊維が脱分化し、細胞核が分離する様子が報告されているが、哺乳類の筋肉でも同様のことが起こるのかどうかはわかっていない。また FoxO タンパク質がいくつかの細胞種において脱分化に係ることが報告されている。以上のことから、筋萎縮発症時には筋タンパク質の分解のみならず、FoxO が介在する脱分化などの事象も発生している可能性が考えられる。したがって、本研究ではタイムラプス観察を活用し、筋萎縮の進行に伴う、筋細胞の挙動を詳細に解明することを目指した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

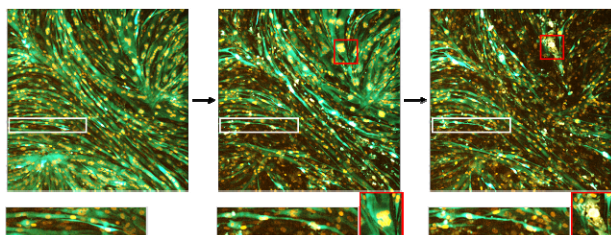
研究の実施においては、受け入れ教員である分子腫瘍学研究分野の家村顕自助教とメールなどを用いて、アドバイスをいただきながら実施した。また、メールなどでは難しい場合には、実際に加齢医学研究所を訪問し、家村助教と対面でのディスカッションを行った。加齢医学研究所へは 10 回以上訪問しディスカッションを行った。そのうち、3 回の訪問については、本共同利用・共同研究費から支出を行った。

[3] 成果

（3-1）研究成果

萎縮を誘導した筋細胞のイメージングを行うために、アデノウイルスを用いた遺伝子導入を利用することを試みた。そこで、まず 2 つのアデノウイルスの作製を行った。一つ目のアデノウイルスは、マウス Foxo1 タンパク質と緑色蛍光タンパク（eGFP）の融合タンパク質を発現するアデノウイルス（Foxo1-eGFP）である。二つ目のアデノウイルスは核ラミナを構成するマウス Lmna タンパク質と赤色蛍光タンパク（mCherry）の融合タンパク質を発現するアデノウイルス（mCherry-Lmna）である。どちらのアデノウイルスもドキシサイクリンによって発現が誘導される TRE3G プロモーターの制御下にトランスジーンが挿入されている。C2C12 由来の筋管に対し、このアデノウイルスを同時に感染させた後、ドキシサイクリンを培養液中に添加したところ、筋管全体が緑色で、筋管内の細胞核が赤色で標識された。また発現した Foxo1 の効果により、筋管の萎縮が誘導された。

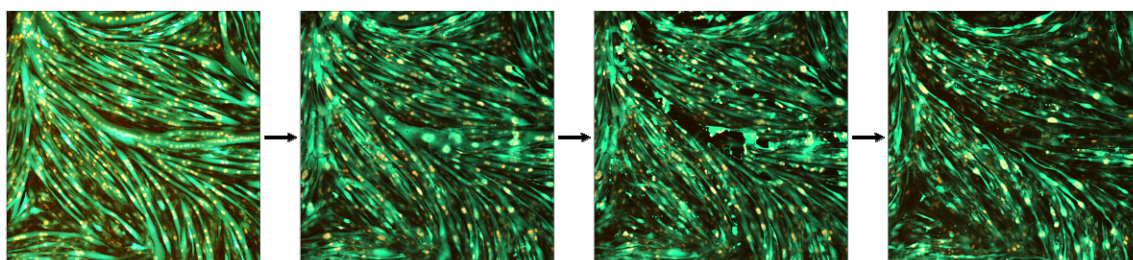
次に、骨格筋萎縮を経時的に観察するために、ハイスループット細胞機能探索システム CellVoyager CV8000 (YOKOGAWA)を用いたリアルタイム共焦点観察を試みた。アデノウイルスを感染させた C2C12 筋管に対し、培養液中にドキシサイクリンを添加することで Foxo1-eGFP, mCherry-Lmna を発現させた。ドキシサイクリン添加した後、10 分間隔で 72 時間の撮影を行った。以下に、観察結果の一例を示す。時間経過とともに筋管がやせ細っていく様子や筋管内を細胞核が移動する様子が観察された。また細胞死によって筋管が破裂する直前に、細胞核が一か所に集まる様子が観察された。



Foxo1 過剰発現による筋管の萎縮のタイムラプスイメージング

萎縮誘導後も筋管内にとどまる細胞核が観察された (白枠)。また、赤枠で示す箇所では、細胞核の凝集が起こった後、細胞死による筋管の破裂が観察された

Foxo1 の過剰発現による筋萎縮のタイムラプス観察に成功したことから、その他の筋萎縮として、ステロイドによる筋萎縮についてもタイムラプス観察を試みた。Foxo1-eGFP を発現するアデノウイルスの代わりに、eGFP のみを発現するアデノウイルスを作製し、前回同様、mCherry-Lmna アデノウイルスと同時に C2C12 筋管に感染させた。ドキシサイクリンによりトランスジーンを発現を誘導することで、筋管と細胞核を可視化した。ドキシサイクリン添加と同時に、デキサメタゾンを 10uM で培地に添加し、筋管の萎縮を誘導した。経時的観察にはハイスループット細胞機能探索システム CellVoyager CV8000 (YOKOGAWA)を用い、10 分間隔で 96 時間の撮影を行った。この実験でも、筋管の萎縮、細胞核が移動する様子を観察できた。



デキサメタゾン添加によるタイムラプスイメージング

最後に、タイムラプス撮影によって得られた画像データの解析を行った。イモリの筋肉では、再生時に筋繊維が脱分化し、細胞核が分離して単核細胞に戻る現象が報告されているが、同様の事象が哺乳類の筋肉でも起こりうるかを検討した。そこで、筋萎縮誘導前に筋管内に存在した細胞核のトラッキングを行った。Foxo1 過剰発現による筋萎縮でも、デキサメタゾンによる筋萎縮でも、筋管内にあった細胞核が分離し、単核細胞に戻る現象は確認できなかった。筋管内にとどまっている細胞核に加えて、多くの筋管では細胞死によって筋管自体が破裂し、細胞核が放出される様子が観察された。また、筋管が破裂する直前に複数の細胞核が凝集する様子が観察された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究において、加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野の家村助教のアドバイスを受けながら、数日に及ぶ長時間の筋萎縮のリアルタイム観察に成功することができた。これまで生体の中で起こる筋萎縮をリアルタイムに観察する方法がなかったため、本実験系を立ち上げられた意義は大きい。本研究ではパイロット的にマウスの筋管を用いて実験を行ったが、将来的にはより生体の環境に近い条件で、ヒトの筋線維を用いた観察を行っていきたいと考えている。

[4] 成果資料

該当なし