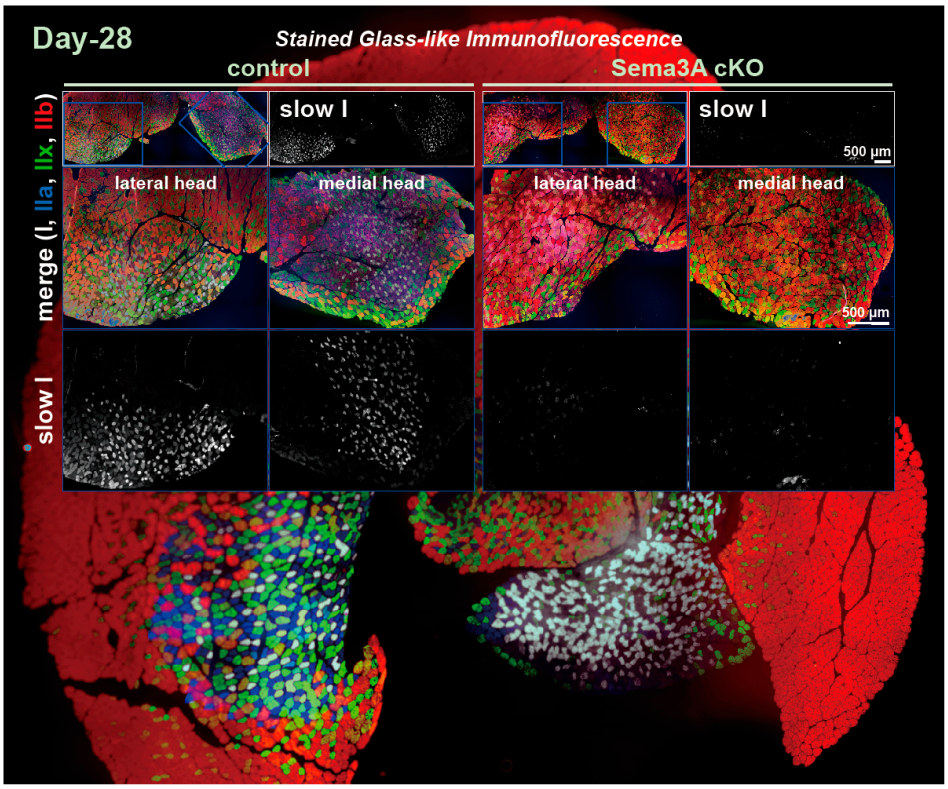
10　抗疲労性筋線維の形成機構の解明と食品機能学的制御	辰巳　隆一

【目的】骨格筋の主体である筋線維（筋細胞）は、収縮特性やエネルギー代謝特性の違いから、抗疲労性筋線維（遅筋型筋線維）と易疲労性筋線維（速筋型筋線維）の 2 つの型に分類される。動物の出生後の筋成長および筋損傷後の再生過程で形成される筋線維の型を決定する機構は不明である。代表者はこれまでに、筋幹細胞（衛星細胞）が合成・分泌する多機能性制御因子 semaphorin 3A（Sema3A）によって抗疲労性筋線維の形成が誘導されることを細胞培養系を用いて示唆した。この新奇制御系を *in vivo* で直接検証することを本研究の目的とした。

【方法】衛星細胞特異的に Sema3A 発現をコンディショナルノックアウトしたマウス（Sema3A-cKO：タモキシフェン投与によって活性化した Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{flox}）の後肢下腿部筋の表現型を解析した。

【結果】筋の再生および初期成長のいずれの場合でも、Sema3A 発現を cKO すると抗疲労性筋線維は有意に減少し、易疲労性筋線維（IIb 型）の代替的増加が認められた（抗 myosin 重鎖アイソフォーム抗体による 4 重蛍光免疫染色；図のカラー画像参照）。この結果は、myoglobin、porin、遅筋型・速筋型 myosin 重鎖などの筋線維型関連因子の mRNA 発現変化および後肢下腿部の筋持久力の低下とも符合した。従って、衛星細胞分泌因子 Sema3A によって作動するシグナル伝達軸は、神経支配や転写制御因子 PPARδ-PGC1α系が確立する前に筋線維型を初期決定（コミット）する強力な分子機構であることが明確になった。また、Sema3A の細胞膜受容体と同定した neuropilin2-plexinA3 のアゴニスト活性を食品成分に見出したので、抗疲労性筋線維の形成を栄養機能学的に促進できると期待された。

筋幹細胞特異的 Sema3A-cKO による抗疲労性筋線維の激減
（再生筋の myosin 重鎖アイソフォーム 4 重蛍光免疫染色）



10. 抗疲労性筋線維の形成機構の解明と食品機能学的制御

辰巳　隆一

九州大学 大学院農学研究院 資源生物科学部門 動物・海洋生物科学講座 畜産化学分野

Key words：resident myogenic stem cell(satellite cell)，fatigue-resistant myofiber(slow-twitch myofiber)，semaphorin 3A（Sema3A），hepatocyte growth factor（HGF），cell-membrane receptor agonist

緒　言

骨格筋の主体である筋細胞（細長い巨大な細胞なので“筋線維”と呼ばれる）は、収縮特性やエネルギー代謝特性の違いから、抗疲労性筋線維（遅筋型筋線維とも呼ばれる）と易疲労性筋線維（速筋型筋線維）の 2 つの型に分類される。それぞれ、遅筋型 myosin と速筋型 myosin の発現によって特徴付けられる。骨格筋の筋線維型組成（抗疲労性・易疲労性筋線維の割合）はヒトの運動機能や QOL（生活の質）などに関わる重要な要素であるので、これを支配している分子機構を解明する意義は極めて大きい。

運動に伴う運動神経刺激（頻度や強度）や核内受容体 PPARδ-PGC1α転写制御系は成熟した既存の筋線維型をリモデリングあるいは維持する上で重要であると考えられる一方［1〜3］、動物の出生後の筋成長・肥大および筋損傷後の再生過程で形成される新しい筋線維（新生筋線維）の型を決定する分子機構は不明である。

申請者はこれまでに、細胞培養系での実験結果に基づき、筋幹細胞（衛星細胞とも呼ばれる）が合成・分泌する多機能性制御因子 semaphorin 3A（Sema3A）によって抗疲労性筋線維の形成が誘導されることを提起した。即ち、i）活性化・増殖した衛星細胞が分化・融合し幼若な新生筋線維（筋管）を形成する時期特異的に肝細胞増殖因子（HGF）を受容すると Sema3A を大量に合成・分泌する［4〜7］、ii）Sema3A が細胞膜受容体 neuropilin2-plexinA3 に結合すると、筋細胞特異的転写制御因子 myogenin およびその協同制御因子 MEF2D, HDAC7 を介して遅筋型 myosin の発現をシグナリングする、iii）別の Sema3A 受容体である neuropilin1-plexinA1,2 は速筋型 myosin の発現を抑制し抗疲労性筋線維の形成を促進することなどを明らかにした［8］。これらの新規知見は、神経支配や PPARδ-PGC1α制御系が確立する前に筋線維型を初期決定（コミット）する強力な Sema3A 依存的シグナリング機構が存在することを示唆している。

本助成研究では、この作業仮説を *in vivo* で直接的に検証するため、衛星細胞特異的に Sema3A 発現をコンディショナルノックアウトしたマウス（Sema3A-cKO；申請者が作出した $Pax7CreER^{T2}$-$Sema3A^{flox}$）の表現型を筋再生および筋成長過程で解析した。実験方法および結果・考察の概要を以下に記載する。

方　法

1. Sema3A-cKO マウスの筋損傷・再生実験

8〜10 週齢の成熟雄性 Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{flox} マウスの腹腔にエストロジェン受容体タイプ 2 のアゴニストであるタモキシフェン（200 μg/g 体重/日、3 回）を投与し衛星細胞特異的に Sema3A 遺伝子を cKO した。タモキシフェン投与開始 2 週間後に、3 種混合麻酔下で後肢下腿部のヒフク筋（GAS）および前脛骨筋（TA）に 10 μM カルディオトキシン（CTX）溶液を注入し筋損傷・再生を誘導した（n＝3〜6 匹）。同週齢の Sema3ALoxP マウスに同様にタモキシフェンと CTX を投与し、対照区とした（n＝3〜5 匹）。後肢大腿部および背部の筋から単離・培養した衛星細胞のゲノム PCR によって Sema3A 遺伝子の cKO を確認した［9］。

2. Sema3A-cKO マウスの筋成長実験

1 週齢の雄性 Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{flox} マウスにタモキシフェン（100 μg/g 体重/日、2 回）を投与した（n＝3 匹）。Sema3ALoxP マウスに同様にタモキシフェンを投与し、対照区とした（n = 3 匹）。3 週齢で離乳後、15 週齢まで自由摂食飲水条件にて通常飼育した。上記の筋損傷実験も含めて、動物実験は全て、日本学術会議が定める動物実験実施ガイドラインに従い九州大学動物実験審査委員会の承認の下実施した（承認番号 A26-081、A28-091、A28-092）。

3. 筋線維型組成解析

筋損傷・再生実験および筋成長実験でそれぞれ回収した筋組織試料の凍結切片を抗 myosin 重鎖アイソフォーム抗体で多重蛍光免疫染色し、筋線維型組成（I, IIa, IIx, IIb 型の相対比）を測定した［10］。また、myosin 重鎖アイソフォームおよび筋線維型関連因子の mRNA 発現変化を RT-qPCR によって解析した。

結果および考察

1. Sema3A-cKO による再生筋の筋線維型組成変化

筋幹細胞（衛星細胞）の合成・分泌因子 Sema3A によって抗疲労性筋線維の形成が誘導されるかどうかを *in vivo* で直接的に検証するため、衛星細胞特異的 Sema3A-cKO の表現型を解析した。先ず、成熟した Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{flox} マウスにタモキシフェンを投与し Sema3A 発現を cKO した後、後肢下腿部のヒフク筋に CTX を注入し筋損傷・再生を誘導した。筋再生が概ね完了したと考えられる損傷後 28 日目に、ヒフク筋の筋線維型組成を抗 myosin 重鎖アイソフォーム抗体の 4 重蛍光免疫染色法により解析した（Fig. 1）。この免疫染色法は、ヒフク筋（Gas）、ヒラメ筋（Sol）、足底筋（Pla）からなるふくらはぎの筋に対して、抗疲労性筋線維および速筋型筋線維（IIa, IIx, IIb）の計 4 種の筋線維を明確に識別することが可能であった（Fig. 1A）。筋損傷前のヒフク筋の外側部（lateral head）および内側部（medial head）には抗疲労性筋線維が多く存在することから、本研究の解析の対象として適当であった。抗疲労性筋線維が優勢な筋であるヒラメ筋には CTX を経皮注入することが困難であるため、別途、注入方法を整備し実験を行うこととした。

Fig. 1B に示すように、衛星細胞の Sema3A 発現を cKO するとヒフク筋の外側部および内側部共に抗疲労性筋線維の割合が大きく低下し、易疲労性筋線維（IIb）が代替的に増加することが認められた（p＜0.01）。この結果は、myosin 重鎖アイソフォーム（I, IIa, IIb 型）および筋線維型関連因子（myoglobin, porin, α-actinin3）の mRNA 発現変化と良く符合した（Fig. 1C）。更には、新生筋線維の形成が盛んな損傷後 5 日目においても、28 日目と同様の表現型が観察された他、前述の Sema3A 依存的シグナリング軸の構成要素である myogenin および MEF2D の発現も Sema3A-cKO により有意に低下した（Fig. 2）。Sema3A-cKO による抗疲労性筋線維の減少（および易疲労性筋線維の代替的増加）は、損傷後 28 日目の後肢下腿部筋の最大発揮張力の増加および筋持久力の低下（最大発揮張力の経時的減衰速度の増加や Rotarod Performance の低下）とも符合した（Fig. 3）。以上の結果より、筋再生過程において衛星細胞が分化初期特異的に合成・分泌する Sema3A は抗疲労性筋線維の形成に極めて重要な細胞外リガンドであることが明確になった。

2. 筋成長期の Sema3A-cKO による筋線維型組成変化

次に、上記の Sema3A リガンド依存的な新規制御系が、出生後の筋の初期成長期、即ち、筋再生時と同様に増殖した衛星細胞が分化・融合する時期においても機能しているかどうかを調べた。1 週齢の Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{flox} マウスにタモキシフェンを投与し Sema3A 発現を cKO した後、15 週齢でヒラメ筋の筋線維型組成を解析した（Fig. 4A に示した実験デザインを参照）。Fig. 4C に示すように、Sema3A-cKO により抗疲労性筋線維は劇的に減少し、易疲労性筋線維（IIb）の代替的増加が認められた。この表現型は myosin 重鎖アイソフォーム（I、IIb 型）の mRNA 発現変化とも一致した（Fig. 4D）。一方、3 週齢で Sema3A を cKO すると、これらの表現型は認められなくなったので（data not shown）、3 週齢以前の初期成長期において Sema3A は抗疲労性筋線維の形成に必須であると考えられた。現在、その他の後肢下腿部筋の筋線維型組成および筋線維型関連因子の発現変化などを調べており、研究成果を別の機会に公表する予定である。

3. 衛星細胞分泌因子 Sema3A のシグナル伝達軸と食品機能学的制御

本研究成果およびこれまでの細胞培養系での実験結果より、筋の再生および初期成長において、衛星細胞分泌因子 Sema3A によって作動するシグナル伝達軸（Sema3A 細胞膜受容体 neuropilin2-plexinA3 複合体 → 転写制御因子群 myogenin/MEF2D/HDAC7 → 遅筋型 myosin）は、神経支配や転写制御因子 PPARδ-PGC1α系が確立する前に筋線維型を初期決定（コミット）する強力な制御機構であることが明らかになった（Fig. 5 のモデル図参照）。また、受容体 neuropilin2-plexinA3 のアゴニスト活性を食品成分（単一のポリフェノール成分）に見出したので、抗疲労性筋線維の形成を栄養機能学的に促進できると期待された。

加齢や不活動（寝たきりなど）に伴う筋持久力の低下は運動機能やQOLの低下の大きな要因である。適度な運動や分岐鎖アミノ酸の摂取が推奨されているが、より効果的な方策が求められている。「機能性食品成分の補助摂取による抗疲労性筋線維の形成誘導・促進」は、作用機構に裏付けられた本格的な栄養機能学的方策となると期待された。また、脂肪酸をエネルギー源とする抗疲労性筋線維の増加は肥満の予防にもつながり、高齢者の健康寿命の延伸にも貢献できると考えられた。

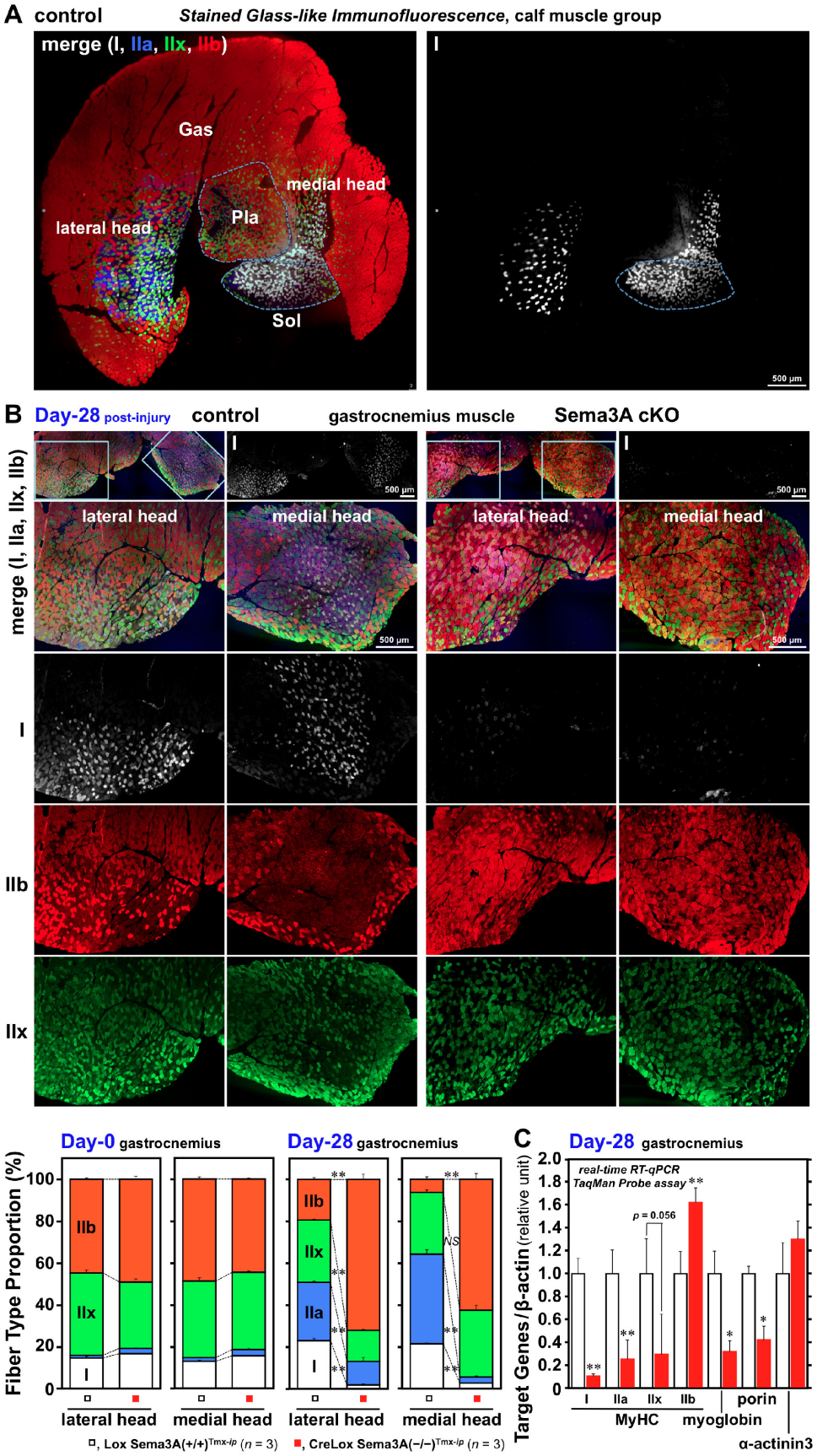

A control
Stained Glass-like Immunofluorescence, calf muscle group
merge (I, IIa, IIx, IIb)
Gas
medial head
Pla
lateral head
Sol
I
500 μm
B Day-28 post-injury
control
gastrocnemius muscle
Sema3A cKO
merge (I, IIa, IIx, IIb)
lateral head
medial head
I
IIb
IIx
Day-0 gastrocnemius
Day-28 gastrocnemius
Fiber Type Proportion (%)
IIa
lateral head
medial head
□, Lox Sema3A(+/+)Tmx-ip (n = 3)
■, CreLox Sema3A(−/−)Tmx-ip (n = 3)
C Day-28 gastrocnemius
real-time RT-qPCR
TaqMan Probe assay
p = 0.056
Target Genes/β-actin (relative unit)
MyHC
myoglobin
porin
α-actinin3

Fig. 1

Fig. 1. Sema3A-cKO abolishes slow-fiber generation upon CTX-injection injury

(A) Demonstration of quadruple myosin heavy chain (MyHC)-immunofluorescence. Merged and slow-MyHC views of calf muscles of control mice without tamoxifen or CTX. Gas, gastrocnemius; Pla, plantaris; Sol, soleus muscles. (B) Fiber-type proportions of gastrocnemius (lateral and medial head regions) assayed at day-28 after injury. First row, representative low-magnification views; lower micrographs, magnified views of boxed areas. Slow fibers (type I) and fast fibers (types IIa, IIx, and IIb) were counted and expressed as relative ratios (panel B graph). (C) Fiber-type-related gene expression profiles of whole gastrocnemius assayed by RT-qPCR at day-28. Bar data are represented as mean ± SEM; * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. *NS*, not significant at $p < 0.05$.

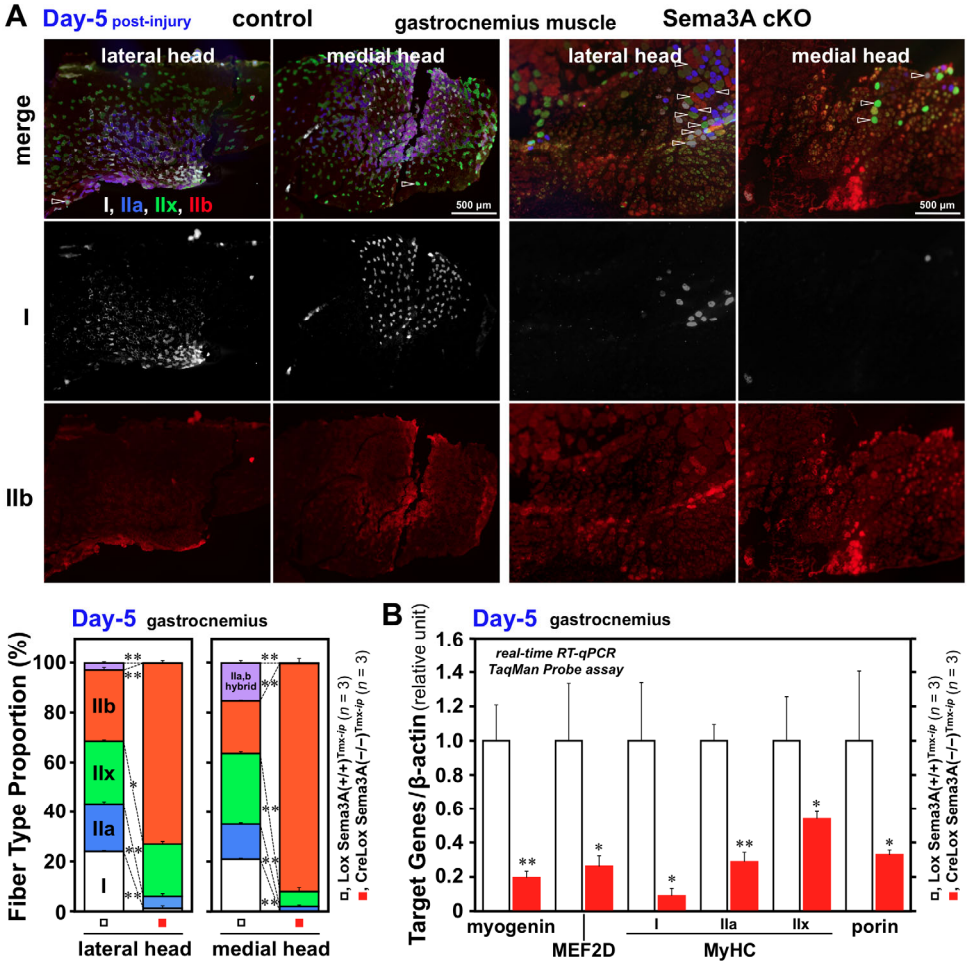


Fig. 2. Sema3A-cKO abolishes slow-fiber generation (supplemental assay at day-5 after CTX-injection injury)

(A) Fiber-type proportions of gastrocnemius (lateral and medial head regions) assayed by quadruple MyHC-immunofluorescence. Slow fibers (type I) and fast fibers (types IIa, IIx, and IIb, and IIa, b hybrid) were counted and expressed as relative ratios (panel A graph). (B) Fiber-type-related gene expression profiles of whole gastrocnemius. Bar data are represented as mean ± SEM; * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. Note that day-5 immuno-stained myofibers were typically thinner than day-28. Thicker fibers were also seen (may be CTX-resistant fibers, not generating fibers), typically indicated by arrowheads in panel A first row and included for the counting.

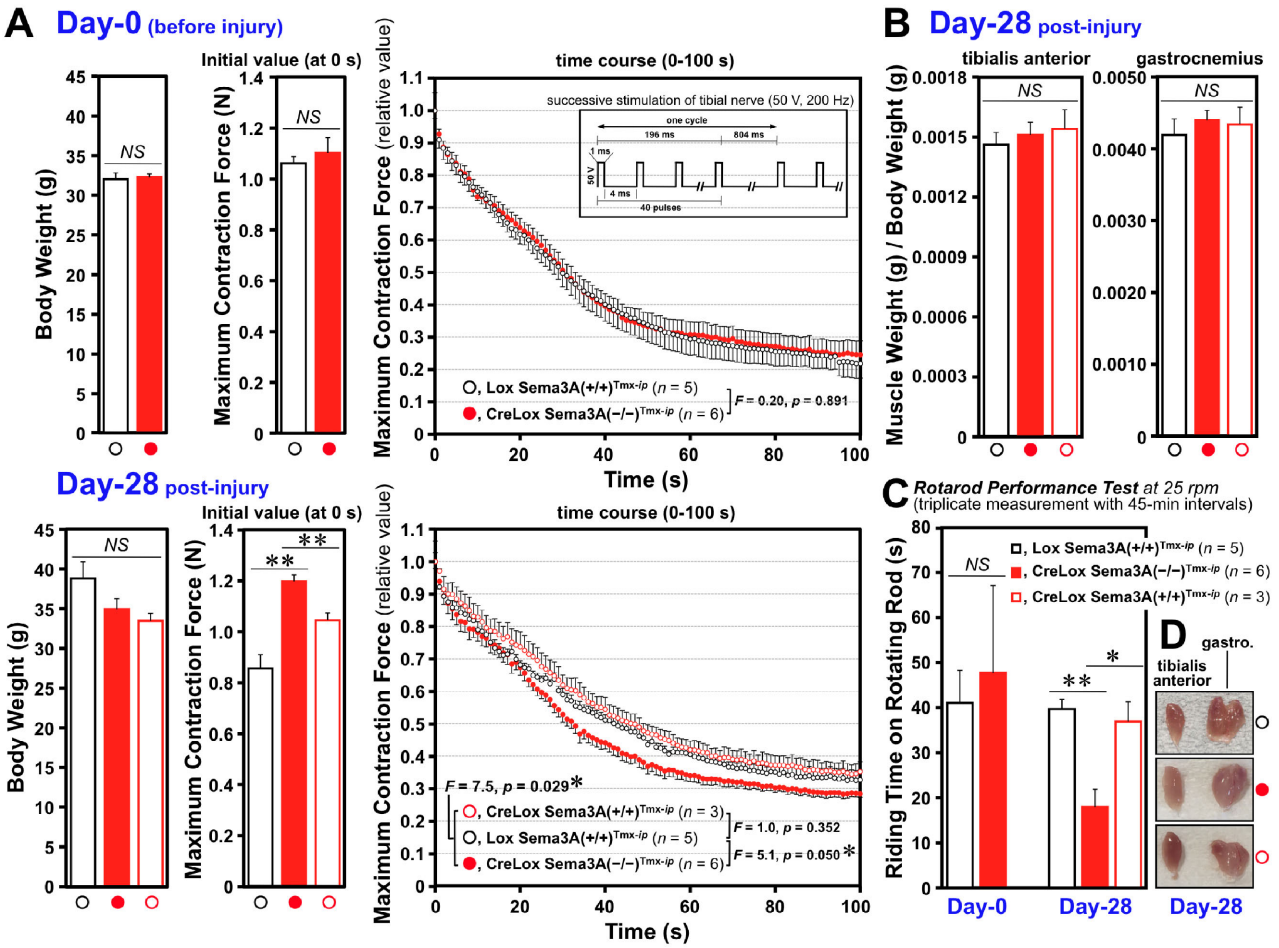


Fig. 3. Sema3A-cKO alters muscle contractility

(A) Maximum plantar-flexion force (0-sec) and endurance (time-course of the decline with fatigue by a 100-s train of electrical stimulation of the tibial nerve under anesthesia) at day-0 and day-28 after CTX injection. (B) Muscle weight of tibialis anterior and gastrocnemius muscles (day-28). (C) Rotarod performance (day-0 and day-28). Data are represented as mean ± SEM; * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. *NS*, not significant at $p < 0.05$. (D) Views of regenerated muscles at day-28. Experiments included two control strains, Sema3A-loxP mice (black open bars and circles) and Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{flox} mice (red open bars and circles) in which the Sema3A gene was not truncated by tamoxifen treatment.

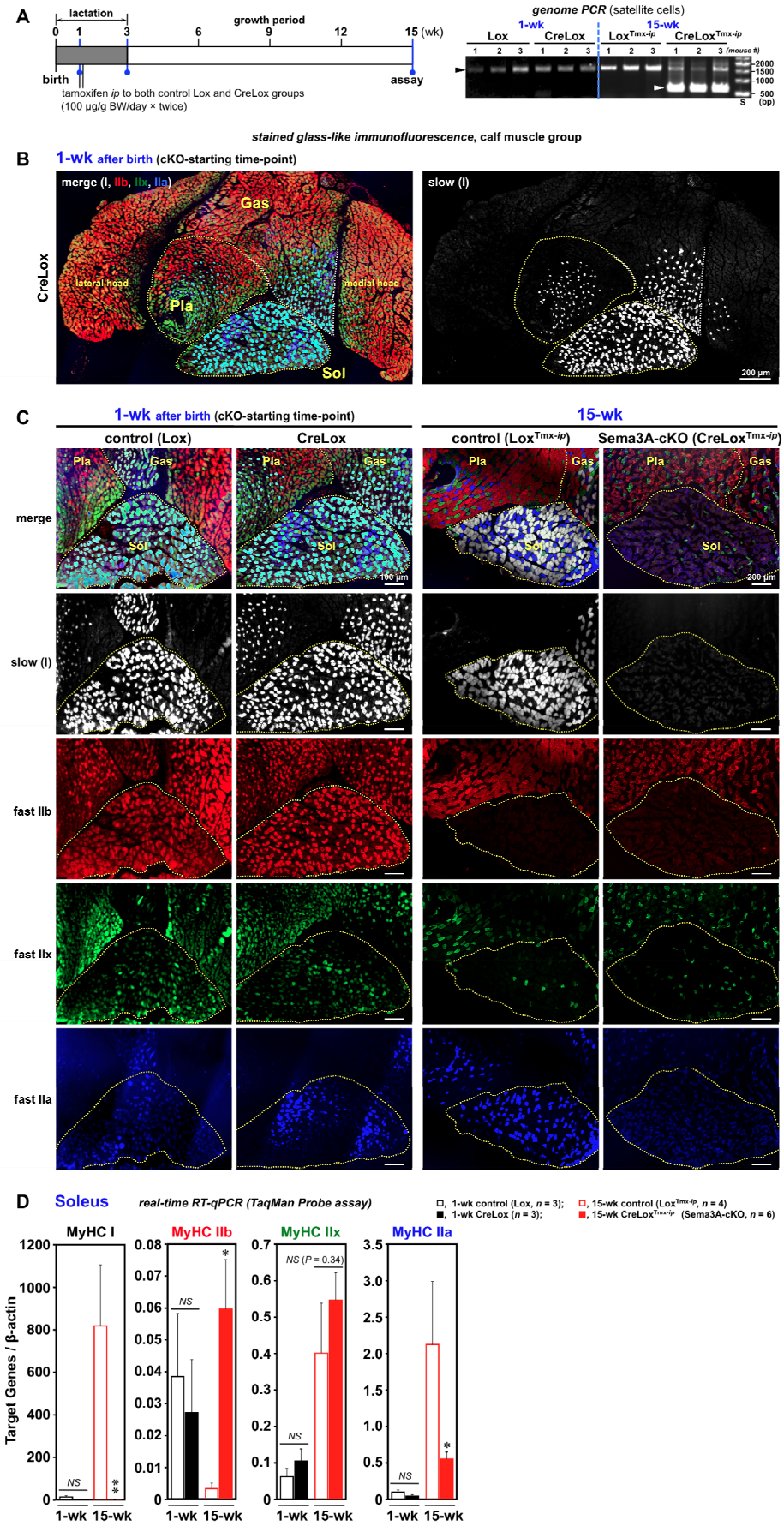

A
lactation
growth period
0 1 3 6 9 12 15 (wk)
birth
assay
tamoxifen ip to both control Lox and CreLox groups
(100 μg/g BW/day × twice)
genome PCR (satellite cells)
1-wk
15-wk
Lox
CreLox
Lox Tmx-ip
CreLox Tmx-ip
(mouse #)
2000
1500
1000
500
(bp)
stained glass-like immunofluorescence, calf muscle group
B
1-wk after birth (cKO-starting time-point)
merge (I, IIb, IIx, IIa)
slow (I)
CreLox
Gas
lateral head
medial head
Pla
Sol
200 μm
C
1-wk after birth (cKO-starting time-point)
15-wk
control (Lox)
CreLox
control (Lox Tmx-ip)
Sema3A-cKO (CreLox Tmx-ip)
merge
slow (I)
fast IIb
fast IIx
fast IIa
Pla
Gas
Sol
100 μm
200 μm
D
Soleus
real-time RT-qPCR (TaqMan Probe assay)
1-wk control (Lox, n = 3);
1-wk CreLox (n = 3);
15-wk control (Lox Tmx-ip, n = 4)
15-wk CreLox Tmx-ip (Sema3A-cKO, n = 6)
MyHC I
MyHC IIb
MyHC IIx
MyHC IIa
Target Genes / β-actin
NS
NS (P = 0.34)
*
**
1-wk
15-wk

Fig. 4

Fig. 4. Sema3A impacts slow-fiber generation in postnatal muscle growth

(A) Experimental design (left) and status of Sema3A-cKO by tamoxifen i.p. at 1-wk (right). Evaluated by genome PCR of Sema3A in satellite-cell preparations from control Sema3A-loxP (Lox) and Pax7CreERT2-Sema3Aflox (CreLox) mice at 1-wk (just before tamoxifen i.p.) and 15-wk-old. See 650-bp truncated bands (indicated by white arrowhead) of lox-inserted Sema3A genes (1600 bp, black arrowhead). S, DNA ladder markers. (B) Quadruple MyHC-immunofluorescence; merged and slow-MyHC views of calf muscles of CreLox mice without tamoxifen. Gas, gastrocnemius; Pla, plantaris; Sol, soleus muscles. (C) Representative magnified views at 1-wk and 15-wk after birth. (D) MyHC isoform expression levels in soleus assayed by RT-qPCR and represented as mean ± SEM; * and **, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. *NS*, not significant at $p < 0.05$.

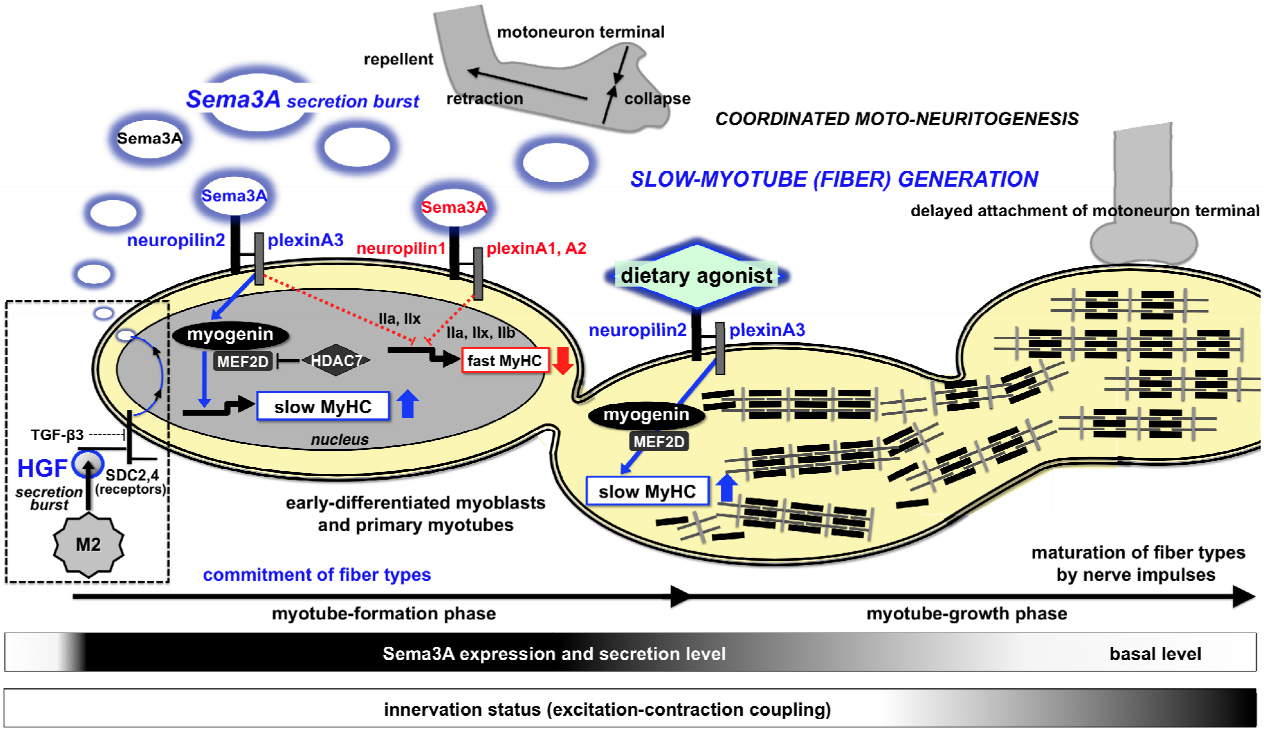


Fig. 5. A Model for time-coordinated progression of slow-fiber commitment and maturation in muscle regeneration and postnatal growth

((Left-half) Sema3A ligand is secreted from early-differentiated myoblasts (in a HGF/syndecan2, 4-dependent manner, shown in dashed-line box) and impacts slow-fiber commitment through neuropilin2-plexinA3 → myogenin (and MEF2D/HDAC7) → slow MyHC. A paracrine source of HGF release may be activated anti-inflammatory macrophage population (CD206-positive M2) in muscle regeneration. The model includes additional elements to suppress fast-MyHC expression and hence enhance slow-fiber formation (red-dotted lines). (Right-half) At the subsequent growth-phase, slow-MyHC-positive myotubes establish the motor innervation that contributes to fiber-type maturation through a calcium/calcineurin signaling pathway, along with configuration of regenerated capillaries and transcriptional PGC1α/PPARδ-circuitry (not depicted here). Presumed changes in extracellular Sema3A and innervation status are indicated by the black-to-white gradations in the bars.

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院農学研究院動物・海洋生物科学講座の鈴木貴弘、Do Mai-Khoi Q.、川口舞、松吉祐児、柴田歩美、水野谷航、澤野祥子、中村真子である。

文 献

1) Sréter FA, Gergely J, Salmons S, Romanul F. Synthesis of fast muscle myosin light chains characteristic of slow muscle in response to long term stimulation. Nat New Biol. 1973 Jan 3;241(105):17-9. PMID:4266906 DOI:10.1038/newbio241017a0

2) Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature. 2002 Aug 15;418(6899):797-801. PMID:12181572 DOI:10.1038/nature00904

3) Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo R, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARδ. PLoS Biol. 2004 Oct;2(10):e294. Epub 2004 Aug 24. PMID:15328533 PMCID:PMC509410 DOI:10.1371/journal.pbio.0020294; erratum in PLoS Biol. 2005. 3:e61.

4) Tatsumi R, Sankoda Y, Anderson JE, Sato Y, Mizunoya W, Shimizu N, Suzuki T, Yamada M, Rhoads RP Jr, Ikeuchi Y, Allen RE. Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Aug;297(2):C238-52. Epub 2009 Jun 10. PMID:19515904 DOI:10.1152/ajpcell.00161.2009

5) Do M-KQ, Sato Y, Shimizu N, Suzuki T, Shono J, Mizunoya W, Nakamura M, Ikeuchi Y, Anderson JE, Tatsumi R. Growth factor regulation of neural chemorepellent Sema3A expression in satellite cell cultures. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Nov;301(5):C1270-9. Epub 2011 Aug 24. PMID:21865583 DOI:10.1152/ajpcell.00257.2011

6) Sakaguchi S, Shono J, Suzuki T, Sawano S, Anderson JE, Do M-KQ, Ohtsubo H, Mizunoya W, Sato Y, Nakamura M, Furuse M, Yamada K, Ikeuchi Y, Tatsumi R. Implication of anti-inflammatory macrophages in regenerative moto-neuritogenesis: Promotion of myoblast migration and neural chemorepellent semaphorin 3A expression in injured muscle. Int J Biochem Cell Biol. 2014 Sep;54:272-85. Epub 2014 Jun 2. PMID:24886696 DOI:10.1016/j.biocel.2014.05.032

7) Suzuki T, Do M-KQ, Sato Y, Ojima K, Hara M, Mizunoya W, Nakamura M, Furuse M, Ikeuchi Y, Anderson JE, Tatsumi R. 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 Feb;45(2):476-82. Epub 2012 Oct 22. PMID:23085379 DOI:10.1016/j.biocel.2012.10.003

8) Tatsumi R, Suzuki T, Do M-KQ, Ohya Y, Anderson JE, Shibata A, Kawaguchi M, Ohya S, Ohtsubo H, Mizunoya W, Sawano S, Komiya Y, Ichitsubo R, Ojima K, Nishimatsu S-I, Nohno T, Ohsawa Y, Sunada Y, Nakamura M, Furuse M, Ikeuchi Y, Nishimura T, Yagi T, Allen RE. Slow-myofiber commitment by semaphorin 3A secreted from myogenic stem cells. Stem Cells. 2017 Jul;35(7):1815-34. Epub 2017 May 31. PMID:28480592 DOI:10.1002/stem.2639

9) Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, Yagi T. Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. Neuron. 1997 Sep;19(3):519-30. PMID:9331345 DOI:org/10.1016/S0896-6273(00)80368-2

10) Sawano S, Komiya Y, Ichitsubo R, Ohkawa Y, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Mizunoya W. A one-step immunostaining method to visualize rodent muscle fiber type within a single specimen. PLoS One. 2016 Nov 4;11(11):e0166080.eCollection2016. PMID:27814384 PMCID:PMC5096669 DOI:10.1371/journal.pone.0166080