

# Establishment of protocol for rat single muscle fiber isolation and culture: Practical application toward understanding mature muscle fiber characteristics

小宮, 佑介

<https://hdl.handle.net/2324/1807102>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名 : 小宮 佑介

論文題名 : Establishment of protocol for rat single muscle fiber isolation and culture:  
Practical application toward understanding mature muscle fiber  
characteristics  
(ラット筋線維単離・培養法の確立: 成熟筋線維の機能解明への応用)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋は生体内で最大の組織であり、生体の運動機能や熱産生を担っている。この骨格筋は多核の筋細胞（筋線維）から構成されており、筋線維は未分化な筋芽細胞が分化、融合し形成される筋管（幼若な筋線維）を経て、成熟型へと最終分化したものである。現在、生物の分子メカニズムの解析には、培養細胞を用いたアッセイが非常に有用である。筋線維のモデル細胞として多くの研究者は筋芽細胞から分化させた筋管を用いているが、筋管は骨格筋を形成する成熟した筋線維が持つような機能（例えば収縮機能）をほとんど有しておらず、成熟筋線維のモデルとして最適とは言えない。骨格筋の成熟筋線維で生じる現象のメカニズムをよりの確に捉えるためには、より優れたモデル細胞が必要であると考え、我々は筋組織から筋線維を直接単離する初代培養系に着目した。本研究では既存のマウス筋線維単離法を改良し、ラット単離筋線維が、長期培養が可能であるか、また成熟筋線維の *in vitro* モデルとして適当であるかを確認し、成熟筋線維培養法を確立すると共に、この手法が、成熟筋線維における生理機構解析に応用が可能であることを示した。

### 1) ラット筋線維単離および培養法の検討 (第 2 章)

まず単離した筋線維が長期培養可能であるか確認するために筋線維の生存率を経時的に測定した。3-4 週齢の F344 雄性ラットの短趾屈筋、ヒラメ筋および長趾伸筋から筋線維を単離し、培養 1, 3, 5, 7 日の生存率を測定した。その結果、ヒラメ筋および長趾伸筋由来の筋線維は培養の経過に伴い、著しく生存率が低下したが、短趾屈筋由来の筋線維は培養 7 日目でも 90%以上の高い生存率を示した。従って、ラット短趾屈筋を用いることで、長期にわたる筋線維培養が可能となった。次に単離筋線維と筋管において成熟筋線維のマーカーである成体型ミオシン重鎖 (MyHC) アイソフォームの発現量を比較した結果、単離筋線維は筋管に比べ成体型 MyHC mRNA の発現量が極めて高いことが分かった。以上より学位申請者が確立した単離筋線維培養系は、分子マーカーの観点からも成熟筋線維の培養モデルとして適当であることが示唆された。

### 2) 単離筋線維を用いた筋線維タイプに関する生理機構の解析 (第 3, 4 章)

筋線維には収縮特性と代謝特性が大きく異なる複数のタイプの存在が認められ、このタイプは筋線維タイプと呼ばれる。筋線維タイプは、大きく遅筋タイプ (type 1) と速筋タイプ (type 2) に分類される。遅筋タイプの筋線維の方が、脂肪酸酸化能力に優れていることはよく知られていたが、筋線維内脂肪 (IMCL) の蓄積と筋線維タイプとの関連を示す知見はほとんどない。そこで、単離筋線維を利用し、この両者の関係性を調べた。まずマウスを細胞内に脂肪が蓄積しやすい状況下 (高脂肪食摂取 + 除神経処理) で飼育後、ヒラメ筋 (遅筋タイプ優位) と長趾伸筋 (速筋タイプ優位) を摘出し IMCL 蓄積に違いがあるかを単離筋線維を用いて確認した。その結果、高脂肪食 + 除神経処理をしたヒラメ筋由来の単離筋線維でのみ、肥大した脂肪滴が明瞭に観察された。type 2 は 2A, 2X および 2B に細分化され、速筋タイプとしての特性は  $2A < 2X < 2B$  の順で異なる。type 1 を含めた 4 種類の筋線維タイプ別に、IMCL 蓄積の比較を行ったところ、type 1 ではなく type 2A の筋線維で IMCL の蓄積量が最も大きかった。以上の結果から、遅筋優位な筋組織であるヒラメ筋は IMCL の蓄積能力も優れており、この特性は type 1 ではなく次に組成比が高い type 2A 筋線維に依存していることを明らかにした。

さらには、既存の抗 MyHC 抗体 (マウスモノクローナル IgM 抗体を含む) では、同時に複数の MyHC アイソフォームを検出することは不可能であったことから、4 種類の成体型 MyHC アイソフォームに特異的なラットモノクローナル IgG 抗体を作製し、それらに異なる蛍光色素を結合させることで、筋線維タイプを単一検体で明瞭かつ簡便に判別する方法を確立した。本手法によって、培養細胞において 4 種類の MyHC アイソフォームを同時に識別可能であることを、ラットおよび

マウスから単離した筋線維で示した。さらに単離筋線維を用いた本手法により、ハイブリッドファイバー（2 つ以上の異なる MyHC アイソフォームが 1 つの筋線維に混在している）の存在が明確に確認され、また異なる MyHC アイソフォームが筋線維内でどのように空間的分布をするかを初めて観察することが可能となった。

以上、本研究では、筋線維タイプおよび筋線維内脂肪に着目して研究を行ったが、この他にも成熟筋線維で生じる現象は多く存在する。本研究で確立した単離筋線維培養系および MyHC アイソフォーム多重免疫染色法が多くの研究者に利用され、骨格筋の機能がさらに解明されることが期待された。