

Establishing primary culture of myogenic stem satellite cells from young rats and application to evaluate the agonistic impact of dietary polyphenols on Sema3A ligand-dependent slow-fiber commitment

松吉, 祐児

<https://hdl.handle.net/2324/7182522>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 松吉 祐児

論文題名 : Establishing primary culture of myogenic stem satellite cells from young rats and application to evaluate the agonistic impact of dietary polyphenols on Sema3A ligand-dependent slow-fiber commitment
(若齢ラット由来筋幹細胞の初代培養系の確立と、Sema3A リガンド依存的な遅筋型筋線維形成に対する食事性ポリフェノールのアゴニスト効果の評価への適用)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋組織幹細胞（筋幹細胞）である筋衛星細胞は、筋肥大・再生機構において重要な機能を担っている。筋衛星細胞の初代培養系はその機能を解明する有用な手段であるが、従来の細胞単離法 (Allen *et al.* 1996) では若齢個体から高純度の筋衛星細胞を得ることは困難である。若齢期には線維芽細胞などの増殖活性が高い細胞が筋衛星細胞標品に混入することがその主な要因である。本研究では、細胞を精製する際の一般的な手段であるパーコール密度勾配遠心分離法を用いて、若齢ラットから筋衛星細胞を単離・培養することを試みた。real-time RT-qPCR 法 (TaqMan Probe 法) および筋衛星細胞を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により、若齢ラットの骨格筋から単離した筋衛星細胞の純度を 50% から 90% 程度まで高めるパーコールの密度勾配および遠心分離条件を至適化した。この純度は、従来法によって成熟ラットの骨格筋から回収される筋衛星細胞の純度と同程度であり、また、単離した筋衛星細胞は増殖・融合し筋管（幼若な筋線維）を正常に形成することも確認した。このように、若齢ラットから筋管形成可能な筋衛星細胞の初代培養系を確立することが可能になったため、次に、この培養系を用いて、筋線維型が食品機能学的に制御できるかどうか調べた。

骨格筋を構成する筋線維は、収縮速度、代謝特性、疲労耐性が異なる遅筋型 (I 型) と速筋型 (II 型) に分類され、骨格筋内に占めるそれぞれの筋線維型の割合によって骨格筋の特性が左右される。そのため、筋線維型の決定機構の解明および食品機能学的制御法の開発は、健康科学、スポーツ科学、食肉生産科学などに貢献が期待される大きな研究課題である。筋線維型の制御活性を有する食品成分として、リンゴポリフェノール (リンゴ幼果皮から調整したポリフェノールの混合物; アサヒビール社製 “アップルフェノン”) が挙げられる。リンゴポリフェノールの摂取により遅筋型筋線維の割合が増加し筋持久力が向上することが報告されたが (Mizunoya *et al.* 2015, 2017)、効力を発揮する単一成分および作用機序は不明であった。そこで本研究では、近年発見された筋衛星細胞合成・分泌因子 Sema3A 依存的な遅筋型筋線維形成誘導メカニズム (Tatsumi *et al.* 2017) に注目し、これが、リンゴポリフェノール中の有効成分によって活性化されるのではないかと予想し (作業仮説)、実験を行った。前述のパーコール密度勾配遠心分離法により若齢ラットから単離した筋衛星細胞を培養し、分化培養時にリンゴポリフェノールおよびこれに含まれる各種単一ポリフェノール成分を添加して筋管を形成させた。リンゴポリフェノールの濃度依存的に遅筋型筋線維形成誘導シグナル伝達軸を構成する myogenin、MEF2D、および遅筋型ミオシン重鎖 (MyHC1: 遅筋型筋線維の指標) の mRNA 発現が有意に上昇し、その効果は 500-1000 ng/ml でその効果が最大となる顕著な濃度依存性を示した。またリンゴポリフェノールの主成分であるクロロゲン酸およびフロリ

ジンの添加区（終濃度 100 ng/ml）でも同様に、myogenin、MEF2D、MyHC1 の mRNA 発現が有意に増加する顕著な濃度依存性を示し、クロロゲン酸では 10-100 ng/ml で、フロリジンでは 100-1000 ng/ml で最大の効果を発揮した。タンパク質レベルでも MyHC1 の発現がクロロゲン酸添加によって有意に上昇することを確認した。一方、リンゴポリフェノールに含まれる他のポリフェノール（エピカテキン、プロシアニジン類）には MyHC1 の発現誘導効果は認められなかった。これらの実験結果より、リンゴポリフェノールに含まれるクロロゲン酸およびフロリジンに顕著な遅筋型筋線維形成誘導活性があることが明らかになった。

この遅筋型筋線維形成誘導の分子メカニズムを追究するため、Sema3A 発現を筋衛星細胞特異的にコンディショナルノックアウト(cKO)したマウスから先と同様に筋衛星細胞を単離・培養し、クロロゲン酸の添加実験を行った。その結果、遅筋型筋線維形成誘導シグナリング因子（myogenin、MEF2D、MyHC1）の mRNA 発現がクロロゲン酸濃度依存的に増加することが認められた。従って、クロロゲン酸は Sema3A を介さず直接作用する、即ち、クロロゲン酸が Sema3A 受容体のアゴニストとして Sema3A 依存的な遅筋型筋線維形成誘導シグナルを活性化させることが示唆された。このことは、前述の通常（Sema3A-cKO していない）筋衛星細胞の初代培養系にクロロゲン酸およびフロリジンを添加しても Sema3A の mRNA 発現に大きな変化が認められなかったことと符合した。

以上、本研究により、i)若齢ラットより高純度の筋衛星細胞標品を単離する方法を確立し、ii)この初代培養系を用いて、リンゴポリフェノールの主要成分であるクロロゲン酸およびフロリジンが Sema3A 依存的な遅筋型筋線維形成誘導シグナルを活性化することが明らかになった。また、クロロゲン酸およびフロリジンが Sema3A の細胞膜受容体のアゴニストとして機能することを示唆するはじめての研究成果であり、これらの補助的摂取により遅筋型筋線維の形成を促進できる可能性が提起された。