

Fast-twitch myotube formation regulated through netrin signaling in the autocrine/paracrine manner

前野, 岳大

<https://hdl.handle.net/2324/7363873>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 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	前野 岳大				
論 文 名	Fast-twitch myotube formation regulated through netrin signaling in the autocrine/paracrine manner (筋芽細胞由来の netrin を介したオートクライン/パラクラインシグナリングによる速筋型筋管の形成制御)				
論文調査委員	主 査	九州大学	職名	准教授	氏名 鈴木 貴弘
	副 査	九州大学	職名	教 授	氏名 辰巳 隆一
	副 査	九州大学	職名	教 授	氏名 中村 真子
	副 査	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構			
			職名	上級研究員	氏名 尾嶋 孝一

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

骨格筋の筋線維型（遅筋型・速筋型）は、食肉の品質を左右する重要な要素である。特に、速筋型筋線維は遅筋型に比べて直径が大きく、機能性栄養成分であるイミダゾールジペプチドのカルノシンやアンセリンを豊富に含んでいる。そのため、速筋型筋線維の形成機構を解明することは、食肉や加工肉だけでなく、近年注目を集める培養肉の生産技術においても、肉質向上や機能性付与に寄与すると期待される。筋線維型を決定する仕組みとして、筋線維に接着する運動神経の刺激強度や頻度による生理機構が広く知られている。しかし最近では、筋芽細胞同士が融合して新生筋線維（筋管）を形成する過程で、多機能性細胞制御因子を合成・分泌し、オートクライン/パラクライン様式で筋線維型を自律制御する「神経支配とは独立した新機構」が注目されている。即ち、遅筋由来の筋芽細胞が多量に分泌する **semaphorin 3A (Sema3A)** とその細胞膜受容体を介した遅筋型筋管形成誘導機構が明らかにされている (Suzuki *et al.* 2013; Tatsumi *et al.* 2017)。一方で、速筋型の制御に関しては、神経系や骨系で **Sema3A** と相反する機能を示す **netrin** サブタイプのうち、**netrin-1** が速筋由来の筋芽細胞で多量に合成され、速筋型筋管形成に関与することが報告されているが (Suzuki *et al.* 2021)、未解明な点が多い。そこで本研究では、**netrin-1** と同じく筋芽細胞で産生される **netrin-4** が速筋型筋管の形成制御に関わるのかどうか、また、どのような細胞膜受容体を介してシグナリングしているのかを解明することを目的とした。

まず、**C57BL/6J** 成熟雄マウスのヒラメ筋（遅筋型筋線維が優勢）および長趾伸筋（速筋型筋線維が優勢）から単離した筋芽細胞を用いて、**netrin-4** の産生パターンをプロファイリングした。筋管を形成する分化・融合過程において、**netrin-4** の産生量はヒラメ筋由来よりも長趾伸筋由来の筋芽細胞で高い傾向が認められた。よって、**netrin-4** は速筋型筋管の形成に関与することが予想された。そこで、筋芽細胞の分化誘導時に **RNA 干渉法** を用いて **netrin-4** 特異的 **siRNA** を導入し、**Ntn4** 発現を抑制したところ、筋管自体の形成が抑制され、同時に筋分化転写因子 **MyoD** と筋芽細胞膜融合因子 **Myomixer** の産生量も低下した。その際、速筋型筋線維のマーカー分子である速筋型ミオシン重鎖 (**Fast MyHC**) の産生低下も確認した。さらに、筋芽細胞の分化誘導時にリコンビナント **netrin-4** を添加すると、筋管の形成が促進されるとともに、速筋型の **Myh2** および **Myh4** の発現増加を認めた。以上より、**netrin-4** は筋芽細胞同士の融合をコントロールし、速筋型筋管の形成を誘導することが示唆された。

続いて、筋芽細胞が産生する netrin-1 および netrin-4 が、いずれの netrin 受容体を介して速筋型筋管の形成に寄与するのかを検討した。C57BL/6J 成熟雄マウス骨格筋から単離した筋芽細胞の分化誘導過程において、netrin 受容体候補のうち neogenin、uncoordinated-5 homolog A、B、および C (UNC5A、UNC5B、および UNC5C) が産生され、特に *Unc5a* の発現量は分化の進行に伴い増加することを見出した。そこで、筋芽細胞の分化誘導時に UNC5A 特異的 siRNA を導入し *Unc5a* 発現を抑制したところ、速筋型筋管の形成不全、および速筋型筋線維の形成に参与する転写制御因子 *Sox6* の発現低下を確認した。さらに、リコンビナント netrin-1 または netrin-4 の添加による Fast MyHC の産生増加作用は、*Unc5a* の発現抑制条件下において阻害された。つまり、netrin は UNC5A との結合を介して速筋型筋管の形成を促進する可能性が示された。これらの知見から、上流から順に netrin-1/-4、UNC5A、*Sox6*、Fast MyHC という新規シグナリング軸によって速筋型筋管の形成が自律的に制御されることが明らかとなった。

以上要するに本論文では、i) netrin-4 は筋芽細胞同士の融合を制御して速筋型ミオシン重鎖の発現を誘導すること、ii) UNC5A は筋芽細胞で合成される netrin を受容して速筋型筋管の形成に参与することを明らかにした。本論文におけるこれらの知見より、筋芽細胞が自律的に速筋型の筋管を形成するための新たな制御機構を見出した点を高く評価する。また、UNC5A を標的として速筋型筋管を形成する筋芽細胞を特異的に分取し、大量培養することを可能にする技術基盤となることが期待された。筋線維型は食肉の品質と深く関連することから、消費者の多様な嗜好に対応できる近未来的食肉生産、特に培養肉生産へ寄与する価値ある業績と認める。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。