

2007年4月16日  
独立行政法人 理化学研究所

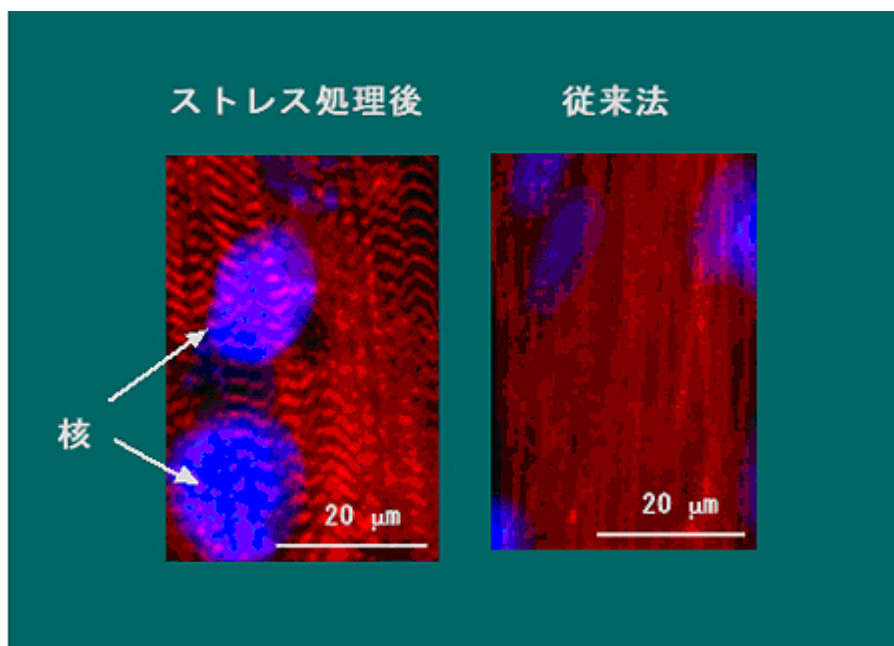
## 細胞内ストレスを利用して収縮する筋細胞を作る

### - 「善玉」ストレスの効用を実証 -

弱った筋力をアップさせたり、損傷した筋肉を再生させて自由な動きを獲得することは、人類が持ち続けている夢の一つ。失った筋力の機能を補うために、ロボットや人工筋肉の開発・研究が進んでいますが、生きた筋肉細胞を育てて失った筋肉を再生させ、力を取り戻すことを実現するにはまだ多くの難問が残っています。

中央研究所バイオ解析チーム及びバイオアーキテクト研究推進グループの研究グループは、筋肉のもととなる筋芽細胞にストレス刺激を与えてから培養する手法により、シャーレの中で筋収縮活動をする筋繊維細胞を作りました。

筋芽細胞は、細胞融合して多核の筋管細胞に分化し、さらに成熟して収縮能を持つ筋繊維細胞を形成する段階を経て筋肉となります。ところが、筋分化の初期に生じる小胞体ストレスを考慮していない従来の培養法では、筋管の段階で分化がストップしてしまう場合がほとんどでした。研究グループは、この問題を人為的に小胞体ストレスを与える方法でクリアーし、筋繊維細胞をつくる技術を確立しました。まだ、マウスの細胞を使った研究段階ですが、生体内での筋繊維形成や筋分化を実現できれば、医療や健康増進への応用が見込め、夢の実現に近づきそうです。



2007年4月16日  
独立行政法人 理化学研究所

## 細胞内ストレスを利用して収縮する筋細胞を作る

### - 「善玉」ストレスの効用を実証 -

#### ◇ポイント◇

- ・ 生体内の現象に基づいた筋肉形成法を考案、シャーレの中で筋収縮
- ・ ストレス刺激で筋繊維形成が促進
- ・ 筋肉が関わる病気の治療や健康増進への応用にも可能性

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、細胞内ストレスが筋肉作り（筋分化）の促進に有効であることを示し、シャーレの中で収縮する筋細胞を作る分化誘導法を確立しました。理研中央研究所バイオ解析チーム（堂前直チームリーダー）の中西慶子協力研究員と同チーム兼バイオアーキテクト研究推進グループ「細胞がつくるもの」研究チームの森島信裕専任研究員らによる成果です。

筋肉は筋芽細胞（筋肉のもとになる細胞）が細胞融合を起こして多核細胞の筋管となり、筋管がさらに成熟して収縮能を持つ筋繊維を形成する段階を経て作られます。シャーレの中で培養した哺乳類や鳥類の筋芽細胞を細胞融合させる条件は約30年前に確立されました。しかし、この条件では筋管までは容易に形成できるものの、筋繊維の形成効率は低く、シャーレの中で筋収縮を起こさせることがなかなかできませんでした。

研究チームはすでに、生体内で筋肉作りが起こる時に細胞内ストレスの一種、小胞体ストレスが生じていることを発見しています（平成17年5月23日プレス発表）。ところが、シャーレの中で筋分化させる従来の条件の中には、小胞体ストレスが全く考慮されていませんでした。研究チームは、マウスの培養筋芽細胞に小胞体ストレスを起こす薬剤を投与してから筋分化を誘導するという新しい方法を考案しました。薬剤を投与した新しい条件のもとでは、筋芽細胞内に強く一過的な小胞体ストレスが生じている状態から筋分化過程が進みます。このようにして形成させた筋管は、従来の方法によって作られるものに比べ桁違いに大きい上、成熟した筋繊維に効率よく分化することが分かりました。シャーレ内で分化した筋繊維は、糖尿病治療薬など筋肉における糖代謝改善薬の検定に用いることが可能です。また、小胞体ストレスを利用した分化誘導法は生体内での筋繊維形成法、筋分化促進法の開発につながる可能性があり、医療や健康増進への応用にも期待が持てます。本研究成果は、米国の科学雑誌『*The FASEB Journal*』（9月号）に掲載される予定です。

## 1. 背景

骨格筋は筋繊維と呼ばれる細長い多核細胞（たくさんの核を含む細胞）の束から構成されています。筋繊維細胞は、筋芽細胞が繰り返し細胞融合を起こして一つになったもので、細胞分裂をしない分化状態にあります。この筋分化過程をシャーレの中で再現しようという試みは1915年ころに始まり、培養液の開発を経て、1970

年代に筋芽細胞を融合させる条件が確立されました。筋芽細胞は、高濃度の細胞増殖因子を含む増殖培地中では増殖しますが、その後、貧栄養にすると増殖は止まり、筋芽細胞同士が融合して多核の筋管細胞を形成します。筋管がさらに成熟し、細胞内に収縮タンパク質の繊維構造を作ると自立的に収縮する筋繊維細胞になります

(図 1)。筋分化過程が、シャーレの中で再現できるようになったことで、この過程に関わる遺伝子やタンパク質の研究が進んできました。また、分化させた筋繊維を用いて筋萎縮<sup>\*1</sup>を治療する試みも行われています。

筋分化研究の多くでは、株化<sup>\*2</sup>した筋芽細胞が用いられますが、従来の分化誘導条件では筋管形成のステップで止まってしまう場合がほとんどです。分化誘導条件にはまだ足りないものがあることを示唆していました。研究チームは筋分化に伴って起きているアポトーシス<sup>\*3</sup>の研究を進める過程で、筋繊維形成条件に小胞体ストレスを加えるというアイデアを得ました。

## 2. 研究手法

筋分化に伴うアポトーシスは、100 年以上前に観察データが発表されていましたが、その原因が小胞体と関係することが分かったのは最近です。細胞表面にある膜タンパク質や細胞外に分泌されるタンパク質は、前もって小胞体の中でそれぞれに固有の立体構造を形成します。正常な立体構造を形成できなかったタンパク質は小胞体内に留められます。構造が異常なタンパク質が蓄積した状態を「小胞体ストレス」と言い、ストレスが強いとカスパーゼ 12 と呼ばれるタンパク質分解酵素が活性化してアポトーシスが起こります。研究チームは、マウス胚の筋肉組織で起きているアポトーシスが小胞体ストレスを原因とするカスパーゼ 12 の活性化によることを突き止めました(平成 17 年 5 月 23 日プレス発表: 筋肉組織の構築に細胞ストレスが必要なことを発見)。

マウス胚で生じるこの小胞体ストレスは、一過的であり、筋分化の初期にだけ起きていました。小胞体ストレスが筋肉組織でどのようにして生じているのかは謎ですが、小胞体にある酵素の働きを止める薬剤を用いると人為的にストレスを起こすことが可能です。そこでマウス由来の株化筋芽細胞を小胞体ストレス誘導剤(ツニカマイシン、タプシガルジン)で短時間処理し、その後に増殖因子の少ない貧栄養培地に移して分化させ、(1) 分化に伴うアポトーシスの起こり方、(2) 筋管、筋繊維形成に与える影響を解析しました。

## 3. 研究成果

増殖培地中で培養している筋芽細胞に小胞体ストレス誘導剤を与えて 20 時間程度置くと全ての細胞がアポトーシスを起こして死んでしまいます。そこで、ストレス処理時間を 30 分から数時間程度にし、その後、貧栄養培地(小胞体ストレス誘導剤は含まない)に移すことにしました。

### (1) 分化に伴うアポトーシスの起こり方

分化誘導を開始して 1、2 日の間に 30-40% 程度の細胞がアポトーシスを起こしましたが、3 日目以降にはぴたりと細胞死が止まりました。アポトーシスを起こした細胞内ではカスパーゼ 12 が活性化していました。ストレスを付加しない

従来の条件に比べてアポトーシス細胞は2、3倍多くなっている一方で、アポトーシスが起きる日数は大幅に短くなっていました。すなわち、ストレスで死ぬべき細胞が効率よくアポトーシスを起こしたと解釈できます。

## (2) 筋管、筋繊維形成に与える影響

従来の分化条件では、筋管を作らせることはできますが、収縮能を持つ筋繊維の形成は非常に稀にしか起こりません。これに対し、ストレスによって選別した生細胞は従来法による筋管に比べて長さ、太さとも数倍から数十倍大きい多核細胞を効率よく形成することが分かりました（図2）。細胞中には規則的な繊維構造ができていて、このような細胞はシャーレの中で収縮を繰り返すことから成熟した筋繊維であることが示されました（図3）。このように小胞体ストレスを利用すると簡単な操作で効率よく筋繊維を作れます。この理由はシャーレの中の条件がより生体内の状況に近づいたためと考えています。

小胞体ストレスは、筋芽細胞をストレス耐性の違いによって効率よく選別し、さらに筋繊維形成を促進しました。小胞体ストレスは役に立つ善玉ストレスとも言えます。

## 4. 今後の期待

シャーレの中で作られた筋繊維は、筋肉をターゲットとする薬品の開発に用いることが可能です。例えば、筋肉は食事をした後に糖を活発に取り込む組織として知られています。シャーレ中の筋繊維は、糖の取り込みや糖代謝に効果のある薬剤の検定と詳細な解析に用いることができ、糖尿病などの治療薬の開発に役立ちます。

また、筋分化を効率よく起こさせる方法の開発は、健康の増進や筋肉が関わる病気の治療に貢献する可能性があります。健康な人々にとっても怪我や老化による筋肉の減少は起こりえます。そう遠くない将来には、宇宙を旅する人も少しずつ増え、無重力空間での廃用性<sup>\*4</sup>筋萎縮がますます問題となってきます。従って宇宙環境における健康問題の解決にも貢献できるのではないかと考えています。また、本来筋肉となるべき組織で筋分化の効率が低い病気、または筋肉以外の組織ができてしまう難病などの治療法を開発する上で、善玉ストレスの利用が一つのヒントになるかも知れません。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

中央研究所 バイオ解析チーム

(兼) バイオアーキテクト研究推進グループ

「細胞がつくるもの」研究チーム

専任研究員 森島 信裕 (もりしまのぶひろ)

Tel : 048-462-1332 / Fax : 048-462-4704

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

## <補足説明>

### ※1 筋萎縮

筋肉がやせ細ることを指す。筋肉自身や運動神経の異常によって起こる進行性の筋萎縮は重篤な症状を呈する。

### ※2 株化

培養可能な細胞で、多細胞生物の生体から採取したあと不死化させ、半永久的な増殖を可能にした状態。特に、1個の細胞に由来する細胞集団を株化細胞と呼ぶことが多い。細胞の増殖には本来限りがあり、最大で数十回程度しか細胞分裂を起こさないとされている。株化は生体から取り出した細胞の培養を継続するだけで達成できる場合と不死化を起こす遺伝子を人為的に細胞に入れて行う場合とがある。株化細胞は細胞株、セルライン (cell line) とも呼ばれる。

### ※3 アポトーシス

細胞が自ら死んでいく現象で、もともと形態学的に定義されたもの。細胞凝縮や細胞断片化、染色体凝縮などを特徴とする。カスパーゼファミリーに属するタンパク質分解酵素が働くことによって細胞が自己分解する。アポトーシスの役割には発生過程における形作り、成体における古い細胞の処理、がん化しかけている細胞の自己破壊などがある。成人では1日に数千億の細胞がアポトーシスを起こしていると言われている。

### ※4 廃用性

長い間、器官や筋肉を使わないと機能低下が生じ、障害が起こることを指す。無重力、微小重力空間では筋肉を使うことが少ないために筋肉が萎縮する。宇宙から帰還した飛行士は地上では立っていることさえ困難になる場合がある。病気やけがなどで長期間安静にしている場合にも腕や脚が細くなって筋力が衰える。

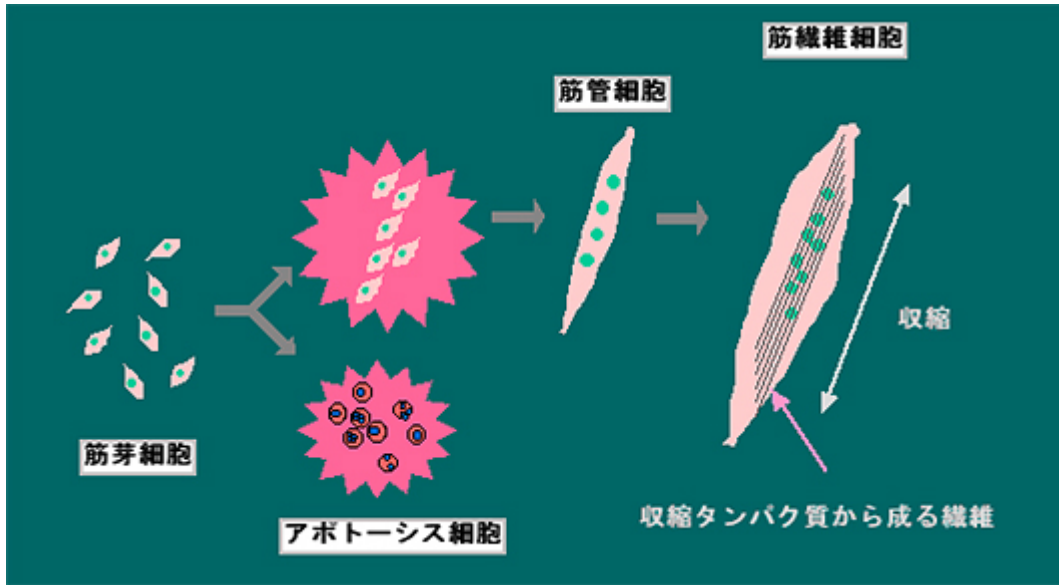


図1 筋肉のつくられ方

筋芽細胞が増殖をストップした後、お互いに融合して多核の筋管細胞となる。細胞融合が始まる段階では細胞内に小胞体ストレスが生じており、一部の細胞はアポトーシスを起こして消滅する（下段）。筋管細胞はさらに細胞融合を繰り返して大きくなるとともに、細胞内では筋収縮に必要な収縮タンパク質が繊維を形成する。このようにしてできた細胞が筋繊維細胞である。細胞内のタンパク質繊維は筋原繊維と呼ばれる。

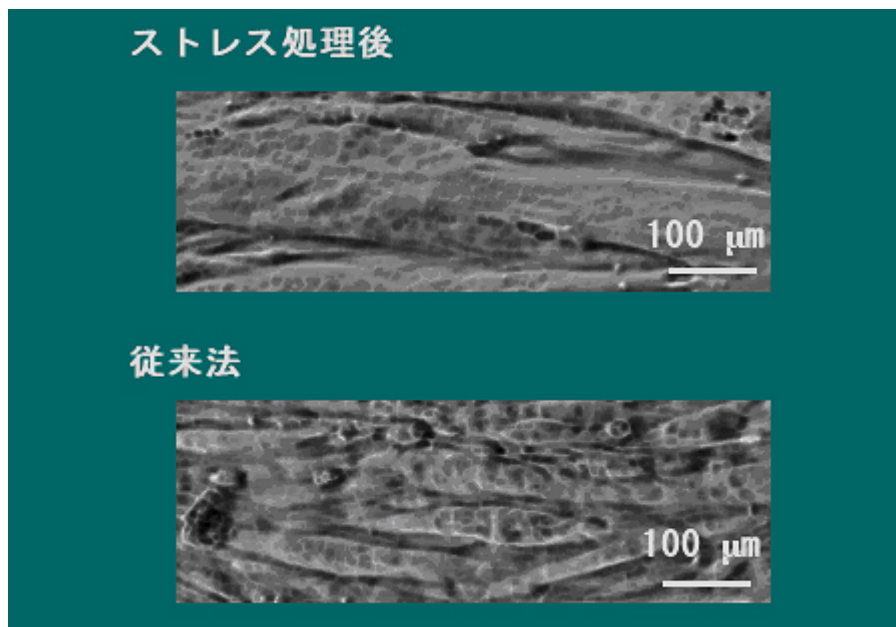


図2 シャーレの中でできた多核細胞

一過性の小胞体ストレスを経験してから筋分化過程を進んだ筋芽細胞は大きな多核細胞を形成した（上段）。ストレス処理をしていない従来法によるもの（下段）に比

べて多核細胞の長さ、幅とも数倍から数十倍大きくなっている。

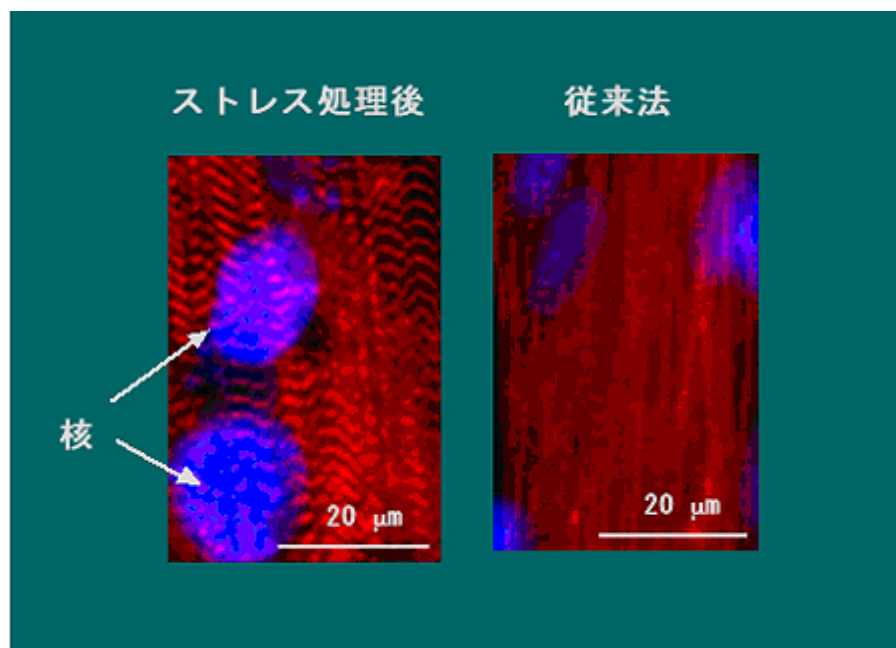


図3 収縮タンパク質が細胞内に形成する繊維

ストレス処理を行った筋芽細胞は筋管細胞を経て筋繊維細胞となった。筋繊維細胞の中には収縮タンパク質から成る特殊な構造（筋原繊維）が作られている。筋原繊維を観察するために収縮タンパク質に結合している $\alpha$ アクチニンを蛍光抗体で染色して可視化した。アクチン、ミオシン、アクチニンなどの筋タンパク質が規則正しく並び、筋節（サルコメア）と呼ばれる単位が繰り返すため縞模様が見える。