

可食性成分を用いた筋管細胞分化促進の可能性探索

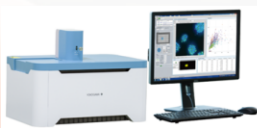
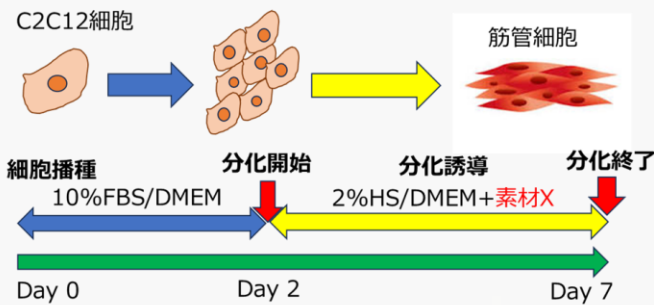
概要

当社独自の可食性筋分化促進物質（素材X）を用いて、成熟度の高い骨格筋を作製します。マウス骨格筋由来の筋芽細胞株C2C12細胞を2Dあるいは3D培養にて筋分化させることにより、従来よりも成熟した骨格筋モデル（筋管細胞、筋オルガノイド）を作製することができます。

実験方法

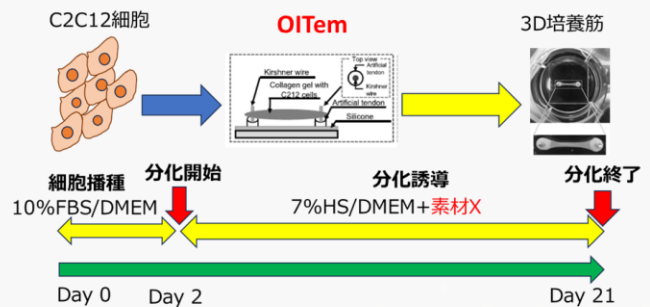
- 細胞 : マウス筋芽細胞（C2C12細胞）
- 分化誘導
 - 2D培養：細胞播種・増殖後、素材X添加培地で5日間分化誘導
 - 3D培養：3D培養デバイス上で細胞播種・増殖後、素材X添加培地で3週間分化誘導

2Dでの検討



筋管細胞マーカー(MHC)、速筋マーカー、遅筋マーカーを染色し、速筋マーカー/MHC、遅筋マーカー/MHCを解析した

3Dでの検討



α-Actinin (サルコメアマーカー)
Phalloidin (アクチン細胞骨格マーカー)
による染色

引用文献) J. Bioscience and Bioengineering (2017)
J. Appl Physiol. (2022)

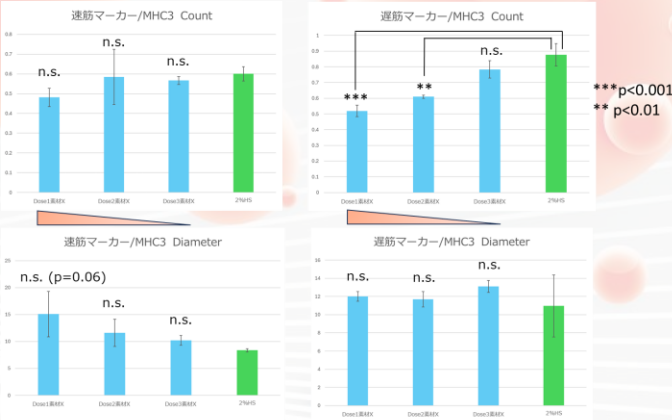
実験結果

① 2次元分化培養での素材X添加による効果

素材Xの添加により筋管細胞マーカーに対する速筋マーカーのカウント率には影響が見られなかったが、遅筋マーカーのカウント率に対しては濃度依存的に抑制効果が見られた。

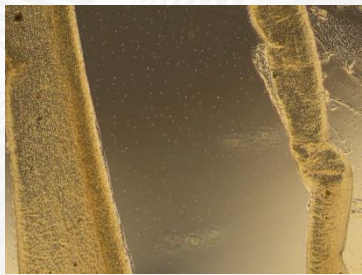
一方筋管細胞の太さについては素材Xの添加により遅筋マーカーには影響が見られず、逆に速筋マーカーに対して濃度依存的に太くなる傾向が見られた。

この結果から、素材Xを適切な濃度で使用すると速筋の発達を促進することがわかった。



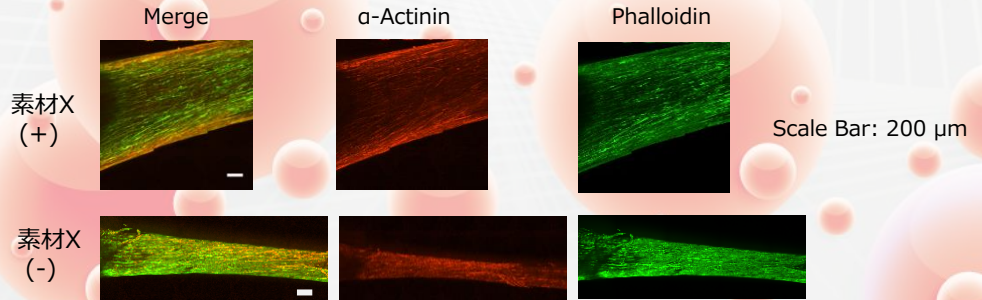
実験結果

② 3次元分化培養での素材X添加による効果



素材X (+)

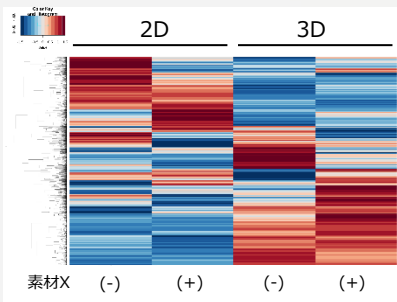
素材X (-)



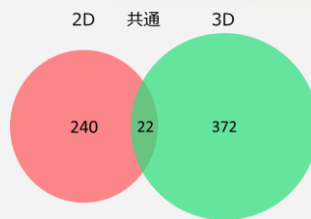
3D培養筋においても素材X添加により太く強靱な培養筋が再現性良く作製できることがわかった。明視野画像（左写真）では、作製した組織の写真撮影のために、固定治具から外したところ、素材X (-) では形状が歪に変化した、素材X (+) は形状の変化がみられなかった。

③ 素材X添加による2次元、3次元分化培養筋での遺伝子発現解析

発現が見られた遺伝子での Heatmap

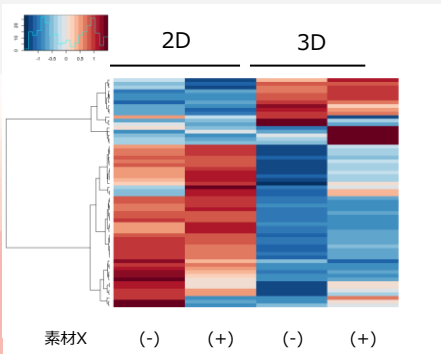


発現変動遺伝子数



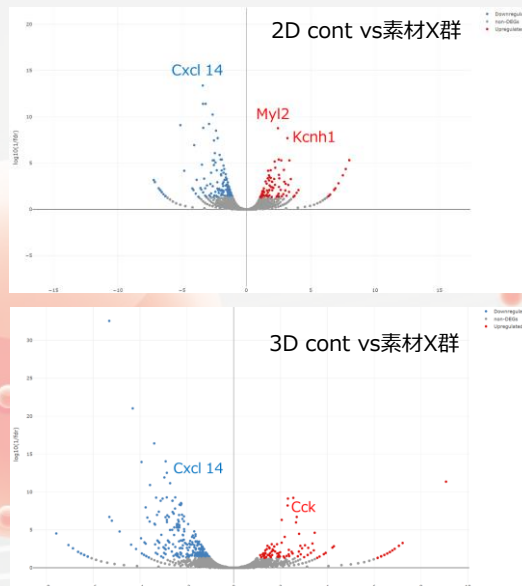
2D、3Dに関わらず、素材X添加により遺伝子発現パターンが大きく異なることがわかった。また、素材X添加により変動する発現変動遺伝子は3Dで394遺伝子、2Dで262遺伝子あり、2Dと3Dで共通の遺伝子は22遺伝子のみであった。共通遺伝子の中には、骨格筋形成の調節因子Cxcl14などが含まれていた。

骨格筋関連遺伝子 (63遺伝子) のみでの Heatmap



2Dと3D培養筋で骨格筋関連遺伝子の発現パターンが大きく異なっていた。3D培養筋で発現が増加する遺伝子は63遺伝子中18遺伝子あり、その中で特に素材Xで発現上昇がみられた遺伝子の中には筋に関連する遺伝子が含まれていた。

2D、3Dでの発現変動遺伝子を用いたVolcano plot



2Dでは262発現変動遺伝子中、74遺伝子が素材X添加により発現上昇が見られた。その中で筋線維の活動を調節する調節性ミオシン軽鎖のMyl2や筋芽細胞の分化時に活性化する電位依存性カリウムチャネルのKcnh1が得られた。一方、骨格筋形成の負の調節因子Cxcl14が優位に低下していた。

3Dでは394発現遺伝子中78遺伝子が素材X添加により発現上昇が見られ、特に3Dでの培養で発現が上昇することが知られている食欲抑制ホルモンのCckが素材X添加で更に発現上昇が認められた。

2Dで発現低下が見られたCxcl14は3Dでも発現低下が見られた。

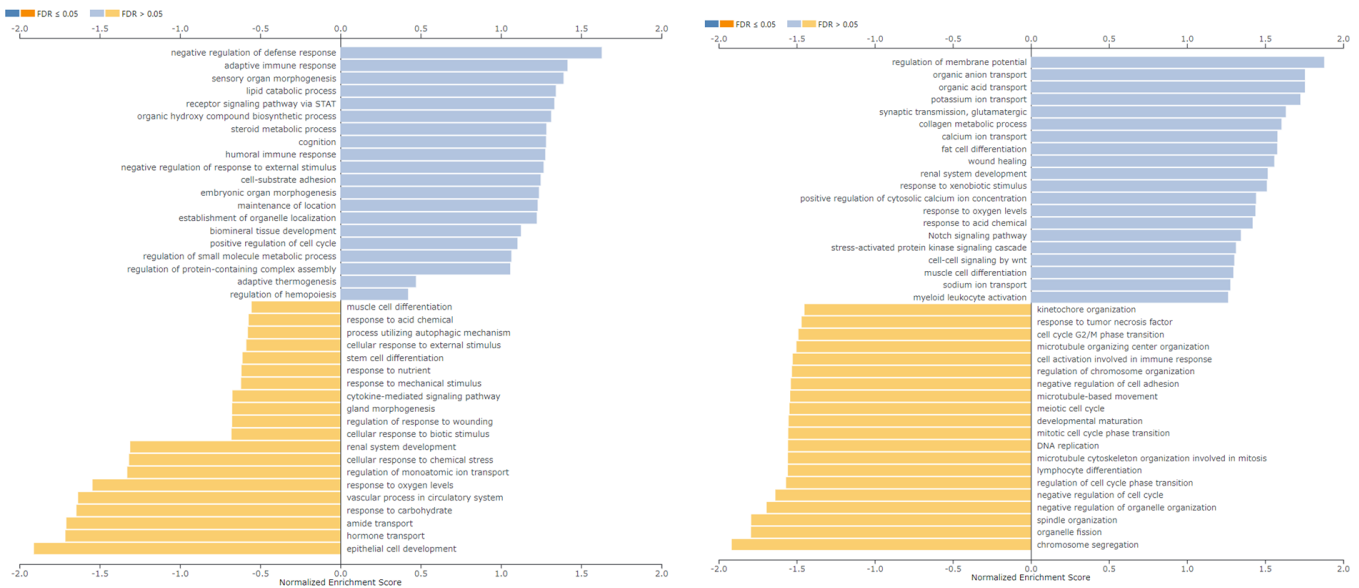


実験結果

Gene Set Enrichment Analysis

2D (Day 5)

3D (Day 21)



GSEA解析より、2Dでは脂肪代謝などが上がっていたことから、筋分化段階の時期がまだ初期段階であると推測される。一方3Dでは膜電位に関する因子や筋収縮に関わるカルシウムシグナリングに関する因子が上がっていた。逆に、細胞分裂に関わる因子が下がっていた。これらの結果から、2Dでは筋分化のごく初期の現象が見られており、3Dでは筋分化の機能的な成熟に関わる段階の遺伝子群が変動していることが示唆された。

特徴

通常の分化方法と比べて下記のような特徴があります

- ✓ 2D培養：筋管細胞が太くなり、速筋への分化を促進
- ✓ 3D培養：太く強靱な筋オルガノイドを形成
- ✓ 3D培養デバイスでも安定的に筋オルガノイドを形成

活用例

In vitro骨格筋モデルとして応用が期待されます。

- ✓ 様々な疾患モデルとして
筋ジストロフィー、サルコペニア、MPSへの応用
- ✓ 骨格筋に対する毒性・安全性評価モデル
筋収縮、細胞毒性
- ✓ 機能的食品研究への応用
筋老化予防、筋力低下改善モデル
- ✓ 培養肉研究にも応用できます。
筋細胞の成熟化による肉質向上

