

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01616

研究課題名(和文)再生筋における筋衛星細胞遊走性のin situイメージング

研究課題名(英文)In situ imaging of the satellite cells in rat regenerated muscles

研究代表者

春日 規克(Kasuga, Norikatsu)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：60152659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：激しい収縮により細長い骨格筋線維の一部で損傷が起きる。一部に損傷を受けた場合にも筋線維上の広い範囲で筋衛星細胞(SC)は活性化する。SCは増殖し分化に至る過程の中で損傷部へ遊走し、融合して再生を完成させる。本研究は、挫滅損傷を起こしたラットのヒラメ筋上のSCの動態をM-cadherinでラベルし生体上で観察した。遊走能を示すSCは損傷3日後に最高遊走速度を示し、全体の30～50%が損傷方向への移動であった。さらに、筋上にHGFを添加し濃度分布を作成した場合には、SCの移動方向がランダムとなり速度が高まった。このことから生体内においてHGFがSC遊走の誘発因子となっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Muscle damage with severe contractions occurs in a part of elongated skeletal muscle fibers. The satellite cell (SC) response to severe muscle damage in a wide range on the muscle fiber is related to regeneration. The SCs migrate to the site of myofiber damage and fuse in the process of proliferation and differentiation to complete regeneration. In this study, using quantum dots conjugated to anti-M-cadherin antibody, we observed spatiotemporal change in SC in injured skeletal muscle of rat in situ. The highest velocity of the SC migration showed in day 3 post-injury muscle, and proportion of SC migrating in the direction of the injured site was 30 to 50% of the total moving cell. In addition, when HGF was added on the one side of soleus muscle and make the concentration gradient, the movement direction became randomized and the movement velocity increased. It was shown that the regulatory mechanism of HGF-induced satellite cell migration ability in vivo skeletal muscle.

研究分野：運動生理学

キーワード：再生筋筋衛星細胞 筋衛星細胞

1. 研究開始当初の背景

筋衛星細胞は筋細胞を包む基底膜と形質膜の間に存在する幹細胞である。発生初期には、筋原細胞が分裂成長し、筋管細胞、筋細胞となり骨格筋を形成するが、筋芽細胞の段階で発育を止め成熟筋細胞に付着した状態でサテライトとして残った細胞であり、筋衛星細胞は増殖能を有している。

筋衛星細胞は、筋損傷や運動トレーニングなどによる刺激に対して活性化し、増殖、分化、融合と進み、筋の修復再生、新たな筋細胞の形成、肥大に働く。筋衛星細胞の活性化や増殖は、損傷筋細胞やマクロファージ、白血球に由来する増殖因子(LIF,IL-6,IGF等)、細胞外マトリックスや筋衛星細胞自体から放出される増殖因子(TGF- β , FGFs, HGF,IGF)、その他、分子やタンパクの誘因移動に働くケモカインなどのサイトカインによっても制御されている。刺激を受けた筋衛星細胞が活性化増殖分化と進み再生に働くシステムは、培養系実験を基に理解が進んできた一方で、最近のスポーツ科学分野においても、筋肥大や損傷修復時の遺伝子発現・タンパク制御因子、情報伝達物質などの働きと筋衛星細胞との関係を調べる研究数が増えている。一方、細胞の生存や機能発揮には化学的なシグナルだけではなく、物理的な要因が強く関与していることも知られている。線維芽細胞や平滑筋細胞を用いた実験では、細胞の生命存続は細胞内外の増殖因子が決定するのではなく、細胞の接着基盤の質(硬さや接着空間)に関わる物理的な力と運動性を発揮する力学制御機構が増殖因子の活性化を制御し、細胞機能維持の決定因子となることを考え合わせると、線維芽細胞、平滑筋細胞と同様の接着性細胞である筋衛星細胞の遊走性が骨格筋細胞の適応性だけでなく生命存続の一翼を担っていると考えられ

るが、筋衛星細胞の遊走や融合といった物理的機能に関しては、その研究の技術的困難性もあり報告が極めて少ない。

本研究の目的は、生体上での筋衛星細胞の動態を調べたことにあり、筋衛星細胞の運動能を生命現象の姿としてリアルタイムで観察することは、再生という生命現象を理解する上で高い意義があると考えられる。

これまで申請者は、筋衛星細胞の遊走性の観察手法を開発することを研究テーマとしてきた。申請者は、筋端部に挫滅損傷を与えた後の筋より単一筋線維を取り出し、筋衛星細胞の活性化・増殖・増殖停止・分化という一連の過程を、筋タンパク制御因子(MyoD, myogenin, PCNA, p21)から決定すると共に、筋線維長軸上の筋衛星細胞分布を M-cadherin ,DAPI から筋衛星細胞を同定し、健常部において増殖した筋衛星細胞が損傷部に移動する可能性を報告し、さらに、生体の骨格筋内に局在する筋衛星細胞の動態を顕微鏡下にて直接観察することに成功しており、本研究にてさらに筋衛星細胞の動態を探りたいと計画した。

2. 研究の目的

運動にともなう筋損傷はスポーツ選手にとって、早期に完全な回復が求められる問題である。また、損傷は筋萎縮につながる可能性を含むため、運動療法の視点からも検討されるべき問題である。筋損傷発生時には、筋衛星細胞がその修復再生の主役となる。この際の筋衛星細胞の増殖・分化・融合といった一連の過程は再生部位への移動という遊走をとめない、また、支配神経や微小循環系などの変化と密接に関連を持ちながらダイナミックに進行すると考えられる。

本研究では、筋損傷から再生する際の筋衛星細胞の遊走動態をバイオイメージング

し、遊走の時期、速度、方向性を測定する事で、個体の物理的な営みとして再生機能のメカニズムを解明し、安全な早期回復のための知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、蛍光性ナノ粒子 (Qdot) と細胞マーカーとなる一次抗体との複合体を作成し分子・細胞運動のイメージングを行なう。Qdot はカドミウムセレンからなる直径 2~10nm の結晶ビーズであり、非常に高い光強度により生体上の分子・細胞を同定できると同時に、短時間内の数ナノメートル精度の微小の動きを通常の顕微鏡下でも観察可能とする。実験には、生後 10~15 週齢の Fischer344 雌ラットを用いる。被験筋はヒラメ筋 (SOL)、前脛骨筋 (TIB) とする。筋の一部に挫滅損傷を与え、その後、タンパク制御因子の発現にて明らかとした再生過程において、筋衛星細胞を中心に再生に関わる分子・細胞の動的変化を生体上にて観察する。

<筋衛星細胞の生体上での遊走性の解明; 再生時期ごとの多数の細胞運動速度、方向性の定量解析>

麻酔下のラットに対し、下腿背部を切開しヒラメ筋をピンセット先端 (幅 2mm) で 5 秒間強く圧迫することで、挫滅損傷を惹起する。挫滅筋損傷を与えた 1 から 14 日後の各日後に、麻酔下のラットの被検筋を血流維持の状態ですべて露出し、Qdot (蛍光波長 655nm)-一次抗体 M-cadherin (M-cad) 複合体により、生体上で 1 時間インキュベートをおこなう。その後、DAPI (1 μ l/ml; PBS) にて核の染色後、吸引麻酔を維持し蛍光共焦点顕微鏡下で筋衛星細胞をタイムラプス観察する。筋上での筋衛星細胞が空間移動する様相を観察することが可能であることは既に証明できており、さらに光学

系を改良し対物レンズ倍率は下げ広範囲を観察することで、遊走能を示した筋衛星細胞と再生時期を決定する。

<軸索終末形成タンパク、血管内皮細胞増殖因子の測定; 骨格筋の機能再生に働く神経・血管系とのネットワークシステムの解析>

運動誘発性筋損傷時におこる支配神経の解離及び再神経支配に関して、脊髄内の神経細胞体での GAP43 の増強、シュワン細胞内での NGF 受容体の増加が筋損傷により起こり、軸索終末の突起伸張、シナプス形成とそれに関わる分子・細胞移動など形態形成を進行させることを組織学的研究の成果として報告してきた。ブンガロトキシンによる神経筋接合部上の軸索終末部を血流維持されている筋組織上でリアルタイム観察ができることも確認している。そこで神経筋接合部の筋挫滅損傷後からの再生筋上に起こる神経解離後の再神経支配を軸索終末の発芽・延伸と毛細血管の再生を筋衛星細胞の動態とともに捉える。

<筋衛星細胞遊走性のコントロール法の検討; 生体上に HGF (肝細胞増殖因子) 濃度勾配を作成し筋衛星細胞の誘導>

本バイオイメージング法により細胞の移動の誘発を試みた結果、HGF 濃度に依存する移動速度を示す細胞の存在を明らかとしてきた。本研究では、1) 下肢背部を実験前日に切開し、Qdots-Mcad 抗体複合体の前日導入、2) Qdots と HGF との同時インキュベートの試行、さらに、3) HGF の濃度分布を生体上で作り、濃度勾配による移動方向の測定を行う事で、筋衛星細胞遊走性のコントロール法を検討する。

4. 研究成果

骨格筋は適応性に優れた組織であり身体活動量の増大などにより、その代謝特性や収縮特性が顕著に変化する。一方、過度の筋収縮が繰り返される場合は、容易に筋細胞自体に傷害を発生させる。この傷害時には筋衛星細胞が再生に働き、この再生機構が筋の適応能を助長すると考えられる。本研究では、蛍光性ナノ粒子 (Qdot) と細胞マーカーとなる一次抗体との複合体を作成し分子・細胞運動のイメージングを行なった。実験には、生後6週齢のFischer344雌ラットを用い下肢筋(ヒラメ筋)の一部に挫滅損傷を与え、その後、タンパク制御因子の発現にて明らかとした再生過程において、筋衛星細胞の挙動を生体上で観察し、筋再生機構の動的役割を検討した。筋上での筋衛星細胞が空間移動(遊走)する様相を観察することが可能であることは既に証明できており、今回は対物レンズの倍率は下げ観察することで、多数の遊走を起こす筋衛星細胞を観察し、損傷後の日経過にともなう筋衛星細胞の遊走速度・方向を同定・比較することが出来た。遊走速度は細胞ごと実験日ごとに大きなばらつきが見られた。また、遊走方向も一様でなかった。遊走核数は、損傷部より2mm遠位にて損傷1・2日後に活発に見られ、その後2mmの部位での遊走が沈静化するが、より遠位部位(4mm)で3日目に移動数の増加が見られた。遊走速度においても遊走核数の変化と同様の様相を示し、2mmの遠位部位では活性化が起きている1日後に遊走速度のピークが見られ、一方、4mmの遠位部位では増殖・分化が進行する3日後に遊走速度が最高値を示した。遊走方向と損傷部位別の継時的動態を観ると、全ての実験日において損傷部方向へ遊走する核の割合は、観察された遊走核数の30~50%を占め、損傷部に近いほど損傷方向への遊走率に高い値が示された。

一方、再生過程で刺激を受けた筋衛星細胞が活性化し再生に働くには化学的なシグナルだけではなく、再生を可能とする環境を整え

る必要がある。血管と神経は2大ネットワークとして生理機構の全てに関与する存在である。損傷筋の再生には、血管由来の酸素・栄養物質の供給と、筋損傷が神経筋接合部での脱神経をとともなう場合には再支配と軸索輸送由来のシグナル伝達物質による連絡も必要とされ、筋形態再生・機能回復、再生速度、2次的効果など種々の面からも再生筋と血管系、神経系の関係の検討が必要であると考えられる。筋損傷時におこる支配神経の解離及び再神経支配に関して、脊髄内の神経細胞体でのGAP43の増強、シュワン細胞内でのNGF受容体の増加が筋損傷により起こり、軸索終末の突起伸張、シナプス形成とそれに関わる分子・細胞移動など形態形成を進行させることを組織学的研究の成果としてこれまで報告してきた。また、組織の成長時には組織内の内皮細胞が発達し前駆細胞と結合する先行過程があることが知られており、これら血管・神経系の2大ネットワークとの関係を求める事が回復のメカニズムを知る手がかりとなると考えられる。そこで、前脛骨筋またヒラメ筋に対する挫滅損傷を惹起し、3,5,7,15日後の回復期に筋を摘出し、10 μ m厚の横断切片に対する組織染色により神経筋接合部の形態変化、筋線維当たりの毛細血管数、マクロファージ浸潤率、損傷面積比の変化を調べた。筋損傷率は過去の報告どおり挫滅3日後には単核細胞が膨潤または壊死した細胞間隙に集合し、次いで5日後には空洞化した細胞中に単核細胞の浸潤や亀裂状に見られる新生細胞の存在が観察された。マクロファージ浸潤率は損傷前と15日後には認められず、挫滅後3-7日には全体の3-4%を占めていた。筋全体に対する損傷線維率は挫滅5日後に横断切片の18%以上を占めるが、ブンガロトキシンで画像化した運動終板像や電子顕微鏡像で得られた軸索終末に正常構造を保つ神経筋接合部の全体比は挫滅刺激3日後で54.4%まで減少し、5日以降回復に推移した。GAP45により神経成長細胞を観察し損傷筋線

維比率を比較したが、神経成長因子の発現は常に損傷筋量より先行し、筋の損傷がピークとなる5日後に既に半減していた。過去の研究では、損傷筋由来のLIFがその受容体を持つ神経細胞に軸索逆輸送されシグナル伝達系を通して軸索の修復、再支配を促進することも知られている。CD31、VEGFにて求めた新生血管数は挫滅3日後で急増し、5日後まで続いた後に減少し15日後には前値にまで回復した。この変化を挫滅前値に対する増減比とした場合、損傷筋線維比率とかさなることから血管新生が筋の回復を支持することが示唆された。過大な筋損傷は筋に内包する神経系や血管系を同時に損傷させるが、その再生には神経系の回復が先行し再生制御系を整えてから血管系が回復し、その指令と供給の基盤整備が整った上で筋が再生されることが示された。

次に、筋衛星細胞の移動誘発因子であるHGFの濃度勾配を生筋上で作り遊走を誘発できるか、さらに濃度勾配による移動方向のコントロールを試みた。激しい収縮をとまなう筋損傷は細長い構造を示す骨格筋線維の一部で起こる。筋端部で起こる場合と筋中央部(神経筋接合部付近)で起こる場合が多い。このため筋衛星細胞は筋線維上の広範囲で増殖し分化に至る過程の中で損傷部へ移動・融合し再生を完成させる。これまで、損傷部から離れた正常部において活発な遊走能を生体上の筋表層部で捉えることが本研究室では可能とした。そこで、3日前にヒラメ筋中央部に挫滅損傷を惹起させたラットを用いて吸引麻酔下にてヒラメ筋を露出させた状態で、筋衛星細胞のマーカーとなるM cadherin一次抗体と-Qdot結合体をヒラメ筋に導入し、導入後数時間のM cadherinの動態をヒラメ筋中央付近で、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。連続観察は従来どおり可能であり、ヒラメ筋上にHGFを添加した1時間後から筋衛星細胞の移動能が格段に高まった。筋衛星細胞の移動方向が添加前は正常側から損傷側の移動が全体

の4割近くを占めていたのに対し、添加後はランダムとなり移動速度が高まった。損傷部で分泌されるHGFが同様の誘発因子がSCの遊走能を調整していることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Suzuki, I., Komiya, H., Maeda, J., Kasuga, N., Change in myosin heavy chain composition in response to short-term endurance exercise in young rats. *Exercise and Sports Physiology*, 査読有, 23-1:9-17, (2017)
<http://seiri.taiiku.tsukuba.ac.jp/%7Ejessp/>

Tamaki, H., Yotani, K., Ogita, F., Sugawara, K., Kirimoto, H., Onishi, H., Kasuga, N., Yamamoto, N., Electrical stimulation of denervated rat skeletal muscle ameliorates bone fragility and muscle loss in early stage disuse musculoskeletal atrophy. *Calcif Tissue Int.*, 査読有, 100-4:420-430, (2017)
DOI: 10.1007/s00223-017-0250-y

Tamaki, H., Yotani, K., Ogita, F., Kirimoto, H., Onishi, H., Kasuga, N., Bone loss due to disuse and electrical muscle stimulation. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 査読有, 5-4: 267-273, (2016)
DOI: 10.7600/jpfsm.5.267

辻本 尚弥, 鈴木 英樹, 春日 規克, 成熟期中期のラット足底筋に対するジャンプトレーニングの影響, 久留米大学健康・スポーツ科学研究紀要, 査読無, 23:11-18, (2016)
<http://www.mii.kurume-u.ac.jp/kenspo/kenkyu/index.html>

Nishizawa, T., Kasuga, N., Changes in neuromuscular junction morphology occurring in conjunction with muscular atrophy. 21th Annual Congress ECSS, Proceeding. 査読有, 1.512, (2016)
http://sport-science.org/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=78

Kasuga, N., Adaptative changes and contractile properties of skeletal muscle: Significance and problems of tension measurement. The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine 査読有, 4-4:343-346, (2015)
DOI: 10.7600/jpfsm.4.343

Tamaki, H., Yotani, K., Ogita, F., Sugawara, K., Kirimto, H., Onishi, H., Kasuga, N., Yamamoto, K., Effect of electrical stimulation-induced muscle force and streptomycin treatment on muscle and trabecular bone mass in early-stage disuse musculoskeletal atrophy. J Musculoskelet Neuronal Interact. 査読有, 1-3:270-278, (2015)
<https://www.wismni.org>

Ishido, M., Kasuga, N., Characteristics of the Localization of Connexin 43 in Satellite Cells during Skeletal Muscle Regeneration In Vivo. Acta Histochem. Cytochem. 査読有, 48 (2): 53-60, (2015)
DOI: 10.1267/ahc.14056

Nishizawa, T., Kasuga, N., A Study on spinal cord motor neurons and neuromuscular junction morphology in old rats. 20th Annual Congress ECSS, Proceeding. 査読有, 1062, (2015)
http://wp1191596.server-he.de/DATA/CONGRESSES/VIENNA_2016/DOCUMENTS/VIENNA_BoA.pdf#search=%2721th+Annual+Congress+ECSS%2CProceeding.%27

〔学会発表〕(計 7 件)

西沢 富江, 春日 規克, 老齡期の運動がラット骨格筋機能および形態に及ぼす影響, 日本体力医学会, (2017)

田巻 弘之, 與谷 謙吾, 桐本 光, 春日 規克, 前脛骨筋の伸張性収縮の実施が脛骨骨幹端の骨量および骨梁構造に及ぼす影響, 日本体力医学会, (2017)

Nishizawa, T., Kasuga, N., Changes in neuromuscular junction morphology occurring in conjunction with muscular atrophy. 21th Annual Congress ECSS, (2016)

佐脇 匠, 春日 規克, 繰り返しの筋損傷が及ぼす回復能力について, 日本体育学会, (2015)

西沢 富江, 春日 規克, 老齡期の運動が神経筋接合部および脊髄運動神経細胞形態に及ぼす影響, 日本体力医学会, (2015)

Nishizawa, T., Kasuga, N., A Study on spinal cord motor neurons and neuromuscular junction morphology in old rats. 20th Annual Congress ECSS, (2015)

田巻 弘之, 與谷 謙吾, 荻田 太, 中川 弘毅, 桐本 光, 春日 規克, 下肢不動ラットにおける脛骨骨幹部の力学的特徴と筋電気刺激の効果, 日本体力医学会, (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春日 規克 (Kasuga, Norikatsu)
愛知教育大学・教育学部・教授
研究者番号: 60152659

以上