

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32672

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01631

研究課題名(和文) 次世代微細構造3D解析による修復筋周囲の間質細胞相互作用の形態的評価

研究課題名(英文) Advanced 3D analysis of the stromal cells interaction and formed network following acute muscle trauma by the FIB/SEM observation.

研究代表者

小林 正利 (Kobayashi, Masatoshi)

日本体育大学・体育学部・教授

研究者番号：30320154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋組織間質中の単核細胞が筋修復に負担する可能性が報告されているが、これらの細胞が筋修復に如何に関与するかは不明確である。本研究ではSDラット腓腹筋に挫滅損傷負荷後の修復過程をFIB/SEMを用いて観察し、且つ3D再構築することで各細胞の形態や相互関係を検討した。その結果損傷筋組織間質には3種の細胞が確認され、それぞれが密接または連絡し、損傷5日後には修復筋を囲む様なネットワークを形成していた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the mononuclear cells which locate in the interstitial space of damaged muscle might take part in muscle fibers repair. However, the strain of these cells are not clear. In this study, trauma loaded rat skeletal muscles were observed with FIB/SEM, which were reconstructed into 3D images by the program to develop the localization and formation of stromal cells. As a result, we observed that many cells invaded it in muscle fibers, and three kinds of stromal cells were identified in the interstitial space of the gastrocnemius muscles at the 1st and the 2nd day after muscle damage. These 3 types of cells were contacted one another and formed network. At the 5th days after, stromal cells were surrounded the regenerate muscle fiber. It was suggested that these stromal cells may exchange some information which plays some important roles in regeneration process after muscle damage.

研究分野：骨格筋の組織化学

キーワード：骨格筋 筋損傷 修復糧 筋組織間質細胞 細胞性ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

従来から筋衛星細胞が、骨格筋の組織幹細胞として筋線維の肥大や修復に大きな役割を演じていることが知られてきた。一方で骨格筋組織間質に存在する単核細胞も筋線維の修復に荷担しているという報告もある¹⁾²⁾。しかしながら、これらの筋組織間質に存在する単核細胞が、正常筋線維周囲において如何なる種の細胞として存在し、筋線維や間質細胞同士とどのような形態学的相互関係を有するのかは、不明確である。

申請者は、これまで骨髄由来細胞が正常骨格筋において骨髄由来細胞が、骨格筋線維間質に一定のルールのもと点在し、且つ筋線維に近接して局在することや線維芽細胞に意味ありげに密接していることや骨髄由来細胞が骨格筋再生・発達課程で筋由来細胞と融合し、成熟筋線維に成長する可能性を報告した³⁾。(図 1A)

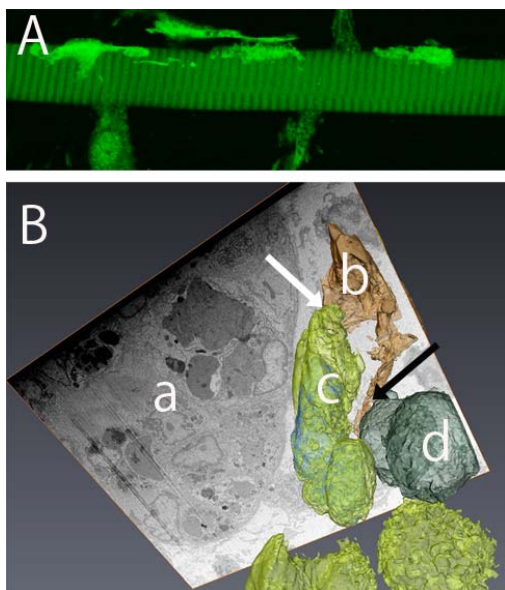


図 1.骨格筋と間質細胞

A. 骨髄移植マウスにおける GFP 陽性筋線維と骨髄由来間質細胞 (小林ら, 久留米医学会雑誌, 2014)

B. FIB/SEM 観察による損傷 2 日後の筋線維 (a)と骨格筋間質細胞(b, c, d)の 3 次元関係 (小林ら, 日体大紀要, 2013) 修復筋線維(a)の周囲に b, c, d3 種の細胞が存在し、矢印部でコンタクトがある。

損傷骨格筋組織内の構造物を次世代電子顕微鏡である FIB/SEM (focused ion beam/ scanning electron microscopy: 収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡) を用いて電顕レベルの 3 次元構築解析を行い、損傷 2 日後

の筋線維間質で数種の細胞が密接することを観察してきた⁴⁾。(図 1B)このような細胞相互の Cell to Cell contact は、生体内で重要な働きを演ずると考えられるが、この役割については未だ不明瞭な点が多い。

また、筋修復過程においても筋間質細胞が、筋線維や筋衛星細胞と如何なる相互関係を有し、筋修復にあたるのか未だ不明瞭な点が多く、この関係や役割を解明することで、今まで治療困難であった難病の治療法の確立にも役立つ可能性を秘めている他、スポーツやリハビリ過程での効果的なトレーニング法の開発に役立ち、国民が生涯にわたって健康で活力ある生活を行う為の基礎基板となり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、筋損傷からの回復過程における修復筋線維と間質細胞、間質細胞相互にみられる Cell to Cell contact の役割を解明することを目的とし、下肢挫滅筋損傷モデル動物を作成後、筋損傷負荷後に経時的に試料を採取し、筋組織の変化を観察していく。

これらの採取試料を FIB/SEM で連続的に観察・記録することで筋損傷からの回復過程における骨格筋線維と間質細胞相互間のミクロレベルの形態的相互関係の変化を、3次元微細構造再構築モデルを作成することで検索をすすめるとともに、骨格筋線維周辺に存在する細胞相互の contact が損傷筋への侵入、形質転換、修復・分化・機能維持といった事柄に如何なる役割を演じているのかを検索し、細胞間情報連絡の意味・役割を明確にしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

①試料の採取

実験は、日本体育大学倫理審査委員会による審査・承認を請け(承認番号第 015-A01 号、第 016-A01 号、第 017-A02 号)、日本体育大学動物実験規定に基づいて行った。

実験には 10 週齢 雄 Sprague Dawley ラットを用い、動物をペントバルビタールナトリウムで深麻酔を行っ

た後、Kamiら⁵⁾の方法に従って、長さ20cm、底面の直径1.0cm、重さ640gの銅製の棒をアルミニウム製のシリンドラーをガイドに250mmの高さから、動物の右脚腓腹筋に落下させ挫滅損傷を負荷し、1日後、2日後、5日後、7日後に試料を採取した。

②電子顕微鏡観察資料の作製

電子顕微鏡観察のための試料は、小林ら⁴⁾およびOhtaら⁶⁾の方法に従い動物をペントバルビタールナトリウム麻酔下で開胸、開腹し、心臓左心室より生理食塩水を灌流後、2%パラフォルムアルデヒド/2.5%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(PB)により灌流固定を行った。

その後、後肢から腓腹筋を摘出した。摘出した腓腹筋は1mm³角に細切し、上記固定液にて4℃で2時間浸漬固定後0.1M PBにて3回洗浄を行い、2%OsO₄と1.5%フェロシアン化カリウムを0.1Mカゴジレイトbufferに混和した溶液に4℃で1時間浸漬した。さらに蒸留水で5回洗浄後、1%チオカルボヒドラジド水溶液に室温で1時間浸漬した。またさらに蒸留水で5回洗浄後、2%OsO₄水溶液に浸漬し、蒸留水にて5回洗浄の後、電子顕微鏡観察時のコントラストを上げるために4%酢酸ウラン・25%メタノール溶液で一晩ブロック染色を行い、その後蒸留水にて洗浄した。試料はさらにWalton 18)のアスパラギン酸鉛水溶液、にて2時間浸漬した。試料はエタノールの上昇脱水系列(25%, 30%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%,各10分間)で脱水の後、エポキシ樹脂(Epon 812, TAAB社製)包埋し、60℃で72時間重合させた。完全に重合した樹脂は1.5mm角にトリミングし、Ultracut E microtome (Leica社)上にセットしたダイヤモンドナイフで表面を切削後に走査型電子顕微鏡(以下SEM)用試料ホルダーにセットした。

③収束イオンビーム搭載型走査型顕微鏡(FIB/SEM)による観察および3次元再構築

SEM用試料ホルダーに乗せた試料はチャージングを防ぐために表面にカーボンを蒸着しFIB/SEM(Quanta 3D FEG, FEI社製)にセットした。その

後、試料表面を加速電圧5.0KV bias 2.5KVの条件で反射電子像を撮影し、収束イオンビーム(focused ion beam:以下FIB)で切削しながら観察していく場所を確定の後69.1μm×50μmの領域を収束ガリウムイオンビーム(加速電圧30KV, 3.0nA)で0.1μmずつ切削しながらSlice & View G2 operating software (FEI社製)にて連続的に反射電子像の自動撮影を行った。得られた画像はAmira 6.0 software (VSG社製)にてimage stackingを施すとともに3次元再構築像を作製した。

4. 研究成果

① 子顕微鏡観察による損傷筋の経時的变化

挫滅損傷筋周辺の1日後、2日後、5日後、7日後のSEM観察用ブロックをダイヤモンドナイフで薄切し、その表面の二次電子像を観察した写真を図2に示した。

挫滅損傷1日目後に筋線維は壊れはじめ、筋線維周辺には単核細胞が多数出現しはじめた。損傷2日目には筋線維中に多数の細胞が侵入すること。筋線維間質にも形態のことなる数種の細胞が確認できた。

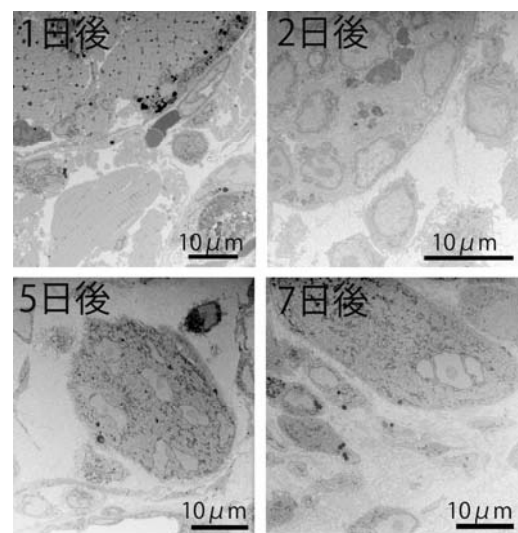


図2. 挫滅損傷後の筋線維および筋線維間質
損傷1日後から筋線維周辺に間質細胞が出現し、7日後まで観察できる。

5日目には筋線維の修復が進んでいることをうかがわせる所見が得られた。7日目には修復筋の目安である中心核

をもった筋線維が出現した。損傷 5 日、7 日も筋線維に周辺には、やはり形態が異なる数種の細胞が確認できた。

②損傷 1 日後の筋および筋周囲の変化と組織間質細胞の 3 次元再構築像の観察

挫滅損傷 1 日後の筋線維が崩壊し始めていることが観察できた。(図 3B)

また、筋線維周辺の間質中の毛細血管周囲に線維芽細胞様の細長い細胞(図 3B の細胞 f)と細胞内に顆粒を有する白血球様細胞(図 3A 緑色の細胞, 図 3B, C の細胞 g)が密接している所見が確認できた。(図 3C 矢頭部)

また、この図 3B の部分を収束イオンビームで $0.1\mu\text{m}$ 切削しながら、連続写真を取得し、コンピュータソフト上で 3 次元再構築を試みた物が図 3A である。図 3B で細長い細胞として観察された細胞 f は再構築像では平たいシート状の細胞であることがわかった(図 3A, 黄色で示す細胞)。これは、FIB/SEM を用いてはじめてわかる形態である。このシート状の細胞は、白血球用の細胞と接触しているだけでは無く、筋線維間質中の毛細血管(図 3A, 赤色で示す)や突起を多数有するマクロファージ様細胞(図 3A, 黄緑色で示す)とも接触していることが観察された。

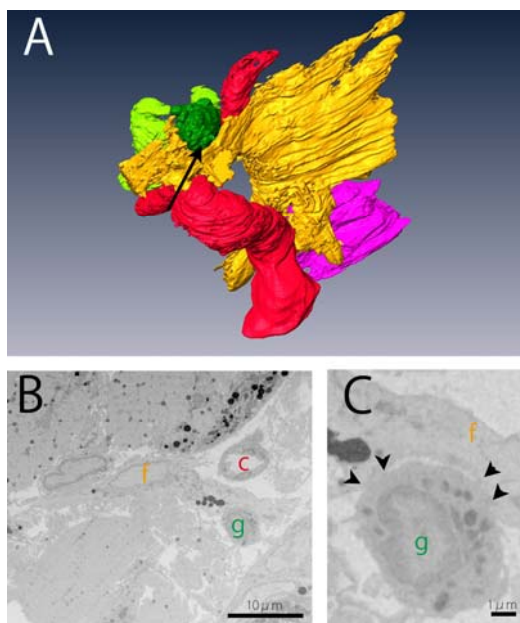


図3. 損傷 1 日後の筋線維および筋線維間質毛細血管 (c) 付近で線維芽細胞様細胞(f)と白血球系細胞(g)が矢頭部(▲)で接触している。A は筋線維間質の 3D 再構築像

③損傷 5 日後の筋および筋周囲の変化と組織間質細胞の 3 次元再構築像の観察

挫滅損傷 5 日後の筋線維および筋組織間質の 3 次元再構築像を図 4 に示した。

筋損傷 2 日後の筋線維中に筋原線維が充満し、核が細胞質中に散在するような修復途中の像が確認できた。

筋線維間質には多数の細胞が確認できるものの、2 日後に比してマクロファージ様細胞(図 4A の黄緑で示す細胞)及び白血球様の細胞の数は非常に少なくなっていた。一方線維芽細胞様の細胞は多数観察されるとともに、1 日後、2 日後と同様にマクロファージ様細胞とも密接している像が観察された。

また、この線維芽細胞様細胞は、修復筋周囲で複数の細胞が細胞相互に密接しあい細胞性のネットワークを形成していた。(図 4A, B)

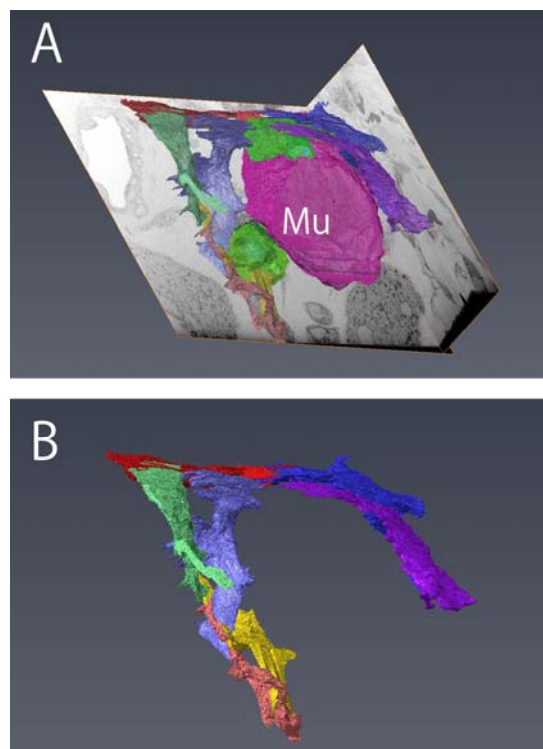


図4. 損傷5日後の筋線維および筋線維間質の 3 次元再構築像

5 日後には筋線維 (Mu) が修復され、周囲の間質細胞がネットワークを形成していた。

④まとめ

筋損傷からの修復過程において筋間質に多くの細胞が移入することは従来から知られていたが、これらの細胞が

相互にネットワークを形成している所見は、本研究で行った FIB/SEM を用いて 0.1 μ m ごとの連続写真を 600 枚以上取得し、パソコン上で 3 次元再構築することで初めて明らかになったものである。

図 1B, 図 2 に示すように筋損傷 1 日後から筋線維周囲の筋組織間質に存在する形態の異なる数種類の細胞同士が Cell to Cell contact を有している所見が多数確認された。

特に損傷 5 日後には線維芽細胞様細胞が修復筋を相互に取り囲み細胞ネットワークを形成していることが明確になった。この細胞性ネットワークは、筋修復過程で偶然接触したものではない可能性が考えられる。これらの細胞同士がダイレクトにコンタクトする事によって損傷筋線維内に侵入する際に大変重要な意味を持つのではないかと考えられるとともに、従来から考えられているサイトカイン等の液性シグナルだけでなく、細胞相互のダイレクトコンタクトも細胞の形質転換や補充に重要な働きを演ずるのではないかと示唆された。

この研究は、平成 27 年度～29 年度まで ABis(先端バイオイメージング支援プラットフォーム)の支援を受けて研究を進めたものである。

<引用・参考文献>

- 1) Tamaki et al, Cell Biol, 2007.
- 2) Motohashi et al, Am J Pathol, 2008.
- 3) 小林ら, 久留米医学会雑誌, 2014.
- 4) 小林ら, 日本体育大紀要, 2013.
- 5) Kami et al, Med Sci Sports Exerc., 1993.
- 6) Ohta et al, J Struct Biol., 2012.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

① 小林正利, 太田啓介, 中村桂一郎 他

FIB/SEM 観察による筋損傷後の筋線維間質に現れる細胞性ネットワークの経時変化, 第 71 回日本体力医学会大会, JPFMS, Vol. 5, No. 6, 2016, P434.

② 鴻崎香里奈, 小林正利 他
伸縮性収縮により誘発される神経損傷の発生部位およびその進行, 第 71 回日本体力医学会大会, JPFMS, Vol. 5, No. 6, 2016, P430.

③ 小林正利, 太田啓介, 中村桂一郎 他

FIB/SEM 観察による再生筋間質に現れる細胞性ネットワークの検討, 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会講演プログラム・抄録集, 2017, p196.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正利 (KOBAYASHI, Masatoshi)
日本体育大学・体育学部・教授
研究者番号: 30320154

(2) 連携研究者

中村 桂一郎 (NAKAMURA, Kei-Ichiro)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 20172398

太田 啓介 (OHTA, Keisuke)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 00258401