

令和元年6月27日現在

機関番号：92506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01856

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮抑制に対する他動的メカニカルストレスの関与

研究課題名(英文) Extrinsic mechanical stress involves in inhibitory effect of muscle atrophy

研究代表者

原田 伊知郎 (Ichiro, Harada)

社会医療法人社団蛭水会名戸ヶ谷病院(名戸ヶ谷研究所メカノメディスン部門)・メカノメディスン部門・主任
研究員

研究者番号：00361759

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)：運動による各組織への機械的な刺激は固体の恒常性維持に貢献する。しかし、具体的にどの程度刺激が身体や各組織に反映されているかは不明なことが多い。特に、筋腱組織においてはマッサージや身体ストレッチなどの力学刺激の効果も認められており、運動以外の外的刺激の重要性も示唆される。本研究ではマウスと培養細胞を用いて、外からの力学刺激が筋萎縮抑制や硬化抑制に効果があるのかを検討した。その結果、筋組織の硬さに応答して増殖する線維芽細胞が存在することが分かった。その細胞は、筋組織の維持や速筋・遅筋の遷移に貢献する組織細胞のメンテナンス細胞であり、筋組織への外的刺激の新しい側面を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、筋組織には造血細胞由来ではない複数種の単核細胞が存在することが示唆されていたが、それはすべて同一の前駆細胞由来であることが示されていた。その細胞は異所性の脂肪となることも分かっているが、線維芽細胞へ分化した後の運命についてはまだ未解明であった。本研究で示された数種類の線維芽細胞も同一の系譜であることは確認されているが、線維芽細胞化の後にことなる表現系となっていることは新しい発見である。また、組織の硬さに応答して増殖し筋組織の恒常性維持に関わっていることは、今後加齢に伴う筋萎縮に対して新しい予防方法考案に大いに貢献する。

研究成果の概要(英文)：It is well known that mechanical stimulation through a physical activity contribute for homeostasis of organs. However, how such mechanical stimuli affect organs and tissue is largely unidentified in cellular and molecular level. Especially for musculotendinous tissue homeostasis, it is recognized that importance of mechanical stimuli is not only through a physical activity but also through extrinsic stimuli, such as massage or physical stretch. Here, we studied how extrinsic mechanical stimuli inhibit muscle atrophy or fibrosis, using mice and cultured cells. As the results, we found that there are several fibroblasts exhibit different phenotype, and fibroblasts, which actively divide on stiffer scaffold, involved in muscle differentiation and maintenance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：筋萎縮 細胞外マトリクス 線維芽細胞 メカノトランスダクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動による各組織への機械的な刺激は固体の恒常性維持に貢献する。このことは、細胞に対するストレッチ実験においても確認されていることである。しかし、個体レベルにおける他動的メカニカルストレスの効果として、どの程度の刺激が身体や各組織に反映されているかなど不明なことが多い。これまでのマウスを用いた予備実験において他動的メカニカルストレスは神経支配下でない筋組織においてもその筋萎縮抑制効果があること、また効果的なメカニカルストレスは組織の硬化レベルに依存している可能性が示されてきた。そこで、本研究ではこれまでのメカニカルストレスに関する予備実験を定量的に解析すること、さらに細胞培養実験でも同等の力学環境を再現することにより、メカニズムの細胞・分子レベルにおいて筋組織のメンテナンスに有効なメカニカルストレスの分子機序に迫ることができると考えた。

2. 研究の目的

これまでの予備的知見において A) 神経支配が無くなった筋組織においても外部からの他動的メカニカルストレスは萎縮の抑制効果になりうること、B) ストレッチなど外部からのメカニカルストレスの効果は組織の硬い軟らかいという力学特性に依存する、ということが分かっていた。その予備的知見を元に本研究では

- 1) 片下肢坐骨神経切除を施したマウスの術側足に対し、他動的メカニカルストレス負荷を定量的に加え、他動的メカニカルストレスと筋萎縮の程度を定量化
 - 2) 最大背屈固定した際に生じる関節、腱、筋組織硬化モデルに対する組織硬化程度の定量解析と他動的メカニカルストレスの効果の検証
 - 3) 組織内物性と他動的メカニカルストレスを生体外にて再現した新規培養モデルによる生体外培養系での細胞レベルで生化学的検証し、関与するシグナル解析
- を実施し、廃用性筋萎縮へ組織の力学特性を考慮した他動的メカニカルストレスの貢献とそのキーとなるシグナルカスケードを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではマウスを用いた機械的な負荷実験とその環境を模倣した培養実験を照合しつつ進める方針とした。それらは

- A) 片足坐骨神経切除または関節固定マウスの介入側足への他動的メカニカルストレス実験を施し、組織切片観察による形態変化や免疫染色観察を実施。さらに、介入足より筋サテライト細胞の採取し生化学的な分析。
- B) 組織の物性とメカニカルストレスを独立制御できる培養系を用い、非介入(コントロール)足より採取した培養細胞へのメカニカルストレスとその生化学的な分析である。

4. 研究成果

(1) 個体解析結果

まず初めに、片足関節固定実験の条件の最適化を目的に、固定期間、固定位(背屈位、底屈位)の差違を詳細に検討した。その結果、足首を底屈位固定した場合には2週間で筋萎縮は最大となり、4週間固定では2週間と変化がないことを確認した。また、底屈固定2週間より固定化を解除すると筋質量は徐々に回復する。ところが足首を背屈位で固定化す

ると2週間でわずかに筋湿重量が低下するが、4週間固定を継続すると湿重量はもとの重さに戻るという結果となった(図1)。これらの現象は神経切除を行いつつ固定化を施した場合も固定化のみより萎縮は大きいものの、その増減に関しては同様の傾向(底屈固定では固定により萎縮、解除により萎縮停止。背屈固定では萎縮は神経切除のみと同等、解除によりさらなる萎縮)であったが、神経切除と固定化の両方を施した場合、個体差とマウスが自身の足を噛んで損傷させることが多く実験結果が安定しない。そこで当初の実験計画を変更し、まずは固定化のみの差による減少の違いについて解析し基礎データとすることとした。背屈位、底屈位およびそれぞれの解除によって得られた湿重量変化の結果と切片のジストロフィン染色より解析した禁断面積の変化傾向はおおむね一致しており、固定位の違いによって浮腫の生じやすさの違いが湿重量変化として現れたわけではないことが確認された(図1)。さらに、背屈位固定では、腓腹筋にて遅筋の増大が確認された(図1)。筋断面積の回復と遅筋の増大は背屈位固定解除では増加せず、固定時のみに生じる現象であることが分かった。さらに、筋断面積が増大した腓腹筋の外部、遅筋が増大した腓腹筋内部にはコラーゲンの沈着が亢進しており、その部分には単核の細胞数が増大していた。これらの現象は、腓腹筋は固定化により不動化していることから、細胞への力学的刺激としては背屈時の筋の伸張位また底屈位の伸縮位という筋の静的な状態が関与していると考え、培養系ではポリアクリルアミドゲルを培養基質とした静的弾性率の効果について検討することとした。

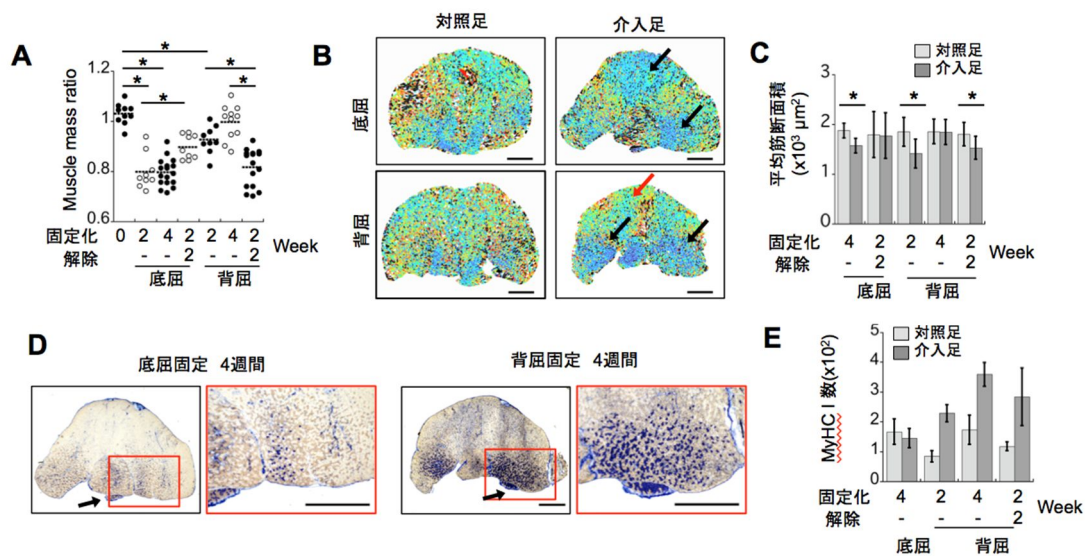


図1 個体解析結果。A.各固定条件における下腿三頭筋湿重量比(介入足/非介入)。コントロールは左足/右足。B.筋断面積解析結果。介入・非介入足は同一個体のもの。C.平均筋断面積定量結果。D.遅筋(Myosin Heavy Chain Type I)染色結果。E.遅筋筋線維数カウント結果。(* $P < 0.01$)

(2) 筋サテライトの培養環境変化による分化誘導差違

腓腹筋の静的弾性率は最大底屈位で $7.9\text{kPa} \pm 1.5 \text{ kPa}$ 、最大背屈位で $58.0 \pm 7.4 \text{ kPa}$ であった(図2)。そこで、 $7.5 \sim 67 \text{ kPa}$ のマトリゲルコートしたアクリルアミド培養基質ゲルを作製し、その上で非介入下腿三頭筋より採取した筋サテライト細胞の分化誘導を行った。しかし、どの培養基質上でも分化誘導効率や長期間培養による遅筋(Myosin heavy chain Type I)の出現率に優位な差は確認できなかった。そこで、(1)によって見られた筋組織変化は筋細胞そのものによるのではなく、筋組織に存在する他の細胞からの外的刺激によるものであると考えた。そこで、研究計画を大幅に変更し、筋細胞ではなく組織中の他の細胞についても解析を進めることとした。

(3) 筋組織中に存在する線維芽細胞への力学的刺激の影響

(1)の個体解析結果にてコラーゲンの沈着が多い部分は単核の細胞の増加が確認された。これらのうち線維芽細胞がどの程度存在するかを確認するために、筋結合組織内に存在する線維芽細胞特異的のマーカである転写因子 Tcf4(Tcf217)にて染色を行った。単核細胞のうち、50~70%程度が Tcf4 陽性細胞であったが、固定化位の違いによってその数に違いがあるように観察された(図2)。さらに、ウェスタンブロッティングによって Tcf4 発現量を確認したところ、底屈固定 < 非介入(コントロール) < 背屈固定の順に発現量が多いことが確認された。このことを培養系にて検証するために、(2)で行ったように 7.5~67 kPa のコラーゲンコートしたアクリルアミド培養基質ゲルを作製して、通常飼育マウスより採取した下腿三頭筋内線維芽細胞を培養したところ、組織切片で観察された結果と同様に基質が硬いほど Tcf4 の増加する現象が確認された(図2)。筋組織中の線維芽細胞は組織のリモデリングだけではなく、筋繊維のメンテナンスに關与する増殖因子やサイトカインのソース細胞としての重要性も示されている。そこで、Tcf4 高発現線維芽細胞の増加と筋メンテナンスの關与を確認するために、硬い基質(67.2kPa)と軟らかい基質(7.5kPa)に通常飼育マウスの下腿三頭筋より採取した線維芽細胞を培養した培養上精を筋サテライトの分化誘導時に添加する実験を行った。その結果、通常の分化誘導培地と比較して、硬い基質に培養した線維芽細胞の培養上精添加は分化誘導効率を上昇させ、さらに遅筋の出現率を上昇させることが確認された(図2)。

本実験より、個体実験で見られた筋の伸張位固定による Tcf4 高発現細胞数の増加、筋萎縮抑制と遅筋線維の増加は培養系にて、静的弾性率の変化として再現することができた。また、Tcf4 高発現線維芽細胞は非常に高い走化性を示すことが観察されたことから、筋組織のメンテナンスに關与する特別な細胞である可能性も想像される。本研究開始当初の研究提案は筋サテライトの分化誘導効率とメカニカルストレスとの関係性を示すことで、筋組織の恒常性維持の機序を明らかにすることを目的としていたものであったため、研究計画は大幅に変更となった。しかし、筋組織内の線維芽細胞へのメカニカルストレスへと視点を変えることによって、目的であった筋組織への機械的刺激と組織メンテナンスの機序を全くことなった切り口で明らかにすることが出来た。

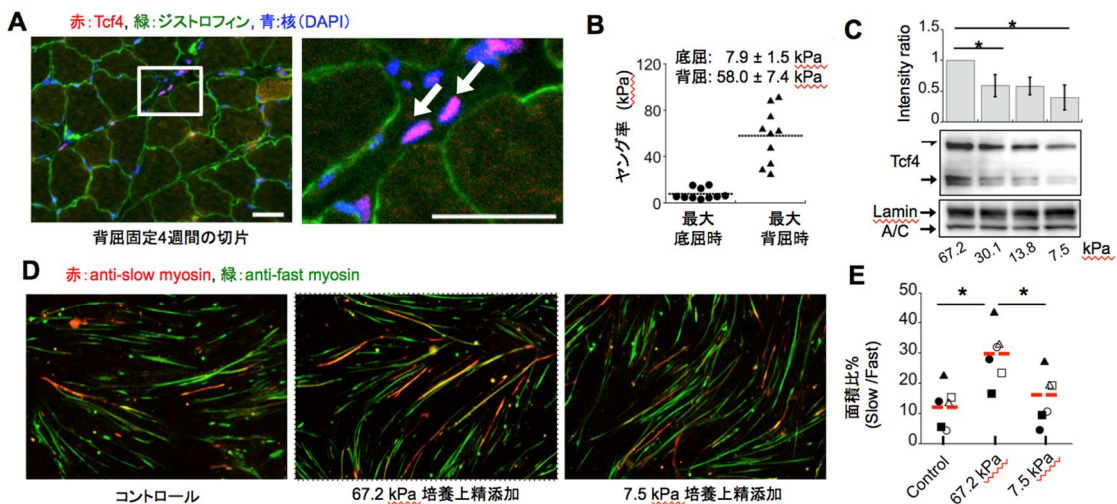


図2 接着基質弾性率に応答した線維芽細胞の影響。A. 背屈固定した腓腹筋の切片染色。白い矢印のように強くTcf4に染色される細胞が増大。B. 最大底屈時と最大背屈時の下腿三頭筋の静的弾性率。C. 各弾性率に培養した線維芽細胞のTcf4発現量。硬いほど発現量は増大する。D. 筋サテライト分化誘導時に各弾性率の基質に培養した線維芽細胞上精を添加結果。E. 遅筋の出現率の定量結果。培養皿中に存在する遅筋の面積を速筋の面積で割って算出。7.5 kPaの培養上精は通常の分化誘導培地と差違がない。(*P<0.01)

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

須山孟、荒津史裕、原田伊知郎、上皮増殖因子の局所刺激に応答した細胞の走化性の解析、日本分子生物学会年会、2018

原田伊知郎、尾田幸映、須山孟、組織の物性に応答する線維芽細胞の Tcf4 発現量とその筋組織制御、細胞生物学会大会、2019

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。