

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32672

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10762

研究課題名(和文)3D微細構造解析による損傷筋組織間質細胞相互機能の解明

研究課題名(英文)The stromal cells interaction and formed 3D network

研究代表者

小林 正利(Masatoshi, Kobayashi)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の損傷・修復過程で筋組織間質に集積する細胞の相互関係について、FIB/SEMをもちいて損傷1日後から7日後まで筋組織のデータを取得し、3D画像を作成し検討を行った。この結果、筋損傷1日後から7日後まで形態的特徴が異なるマクロファージ様細胞、線維芽細胞様細胞、白血球様細胞の3種類の細胞が損傷した骨格筋組織間質内に存在することを確認した。損傷5、7日後には筋管や中心核を持った筋線維が形成された。同時に間質の白血球様細胞、マクロファージ様細胞の数は減少傾向にあったが、線維芽細胞様細胞については修復筋線維周辺で筋線維を相互に囲む様に細胞性の3次元性ネットワークを形成していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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知られていたが、これらの細胞が相互にContactし、ネットワークを形成していることは本研究で初めて明らかになったものである。特に損傷7日後には線維芽細胞様細胞が修復筋を取り囲む様に存在していた。本研究で観察された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、これらの細胞同士が何らかの情報交換を行い、細胞の形質転換や補充、筋線維に侵入する際に大変重要な意味を持つのではないかと示唆するものである。

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 up to the 2nd day after muscle damage. These cells were contacted one another and formed network. At the 7th 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 損傷 筋修復 FIB/SEM 組織間質細胞

1. 研究開始当初の背景

従来から骨格筋の組織幹細胞として筋衛星細胞が知られており、筋線維の肥大や修復に大きな役割を演じていることが報告されてきた。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(Tamaki ら, *Cell Biol*, 2007., Motohashi ら, *Am J Pathol*, 2008.)。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別の細胞として存在し、筋線維や他の間質細胞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。我々は、GFP トランスジェニックマウスから骨髄を移植した野生型マウスを用いて、骨髄由来細胞の分布と周囲の組織との形態学的な関連についての研究(Takayama, Kobayashi ら, *Anat Rec*, 2009.)を行い、この動物の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、密接していることを観察した。注目すべきは GFP 陽性筋線維が確認されたことである(小林ら, 久留米医学会雑誌, 2014.)。これは骨髄由来の間質細胞が、骨格筋再生・発達課程で筋由来細胞と融合し、成熟筋線維に成長したことを示す証拠であり、再生中に骨格筋線維間質細胞が互いに連絡し、何らかの重要な役割を演じている可能性を示したものである。

また、筋修復過程や筋肥大課程においても、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も不明瞭な点が多く、これら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。

2. 研究の目的

本研究では、筋線維修復過程や筋肥大に関与する間質細胞相互の連絡機構“Cell to Cell contact”についての意味・役割の解明を進める事を目的とする。生体内には、従来から知られている役割以外に未知の役割を持つ細胞が多く存在する。本研究では、筋線維修復に関与する可能性が報告されている筋組織間質に存在する単核細胞が、筋損傷からの回復過程で演ずる役割、各種細胞間の相互関係、形態的变化、細胞間情報連絡について検索し、各細胞の働きや制御機構解明の一助としていきたい。

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(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 (*Med Sci Sports Exerc.*, 1993.) の方法に従って、長さ 20cm、底面の直径 1.0 cm、重さ 640 g の銅製の棒をアルミニウム製のシリンダーをガイドに 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、4 日後、5 日後、7 日後に試料(腓腹筋)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(日本体育大学紀要, 2013) および Ohta ら(*J Struct Biol.*, 2012) 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角に細切り、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 カコジレイト 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 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°C 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 69.1 μ m \times 50 μ m の領域を収束ガリウムイオンビーム (加速電圧 30KV, 3.0nA) で 0.1 μ m 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 FIB/SEM 観察による損傷筋組織の経時的変化

筋損傷 1 日後から 7 日後までマクロファージ様細胞、線維芽細胞様細胞、白血球様細胞の形態的特徴が異なる 3 種類の細胞が、損傷を受けた骨格筋組織間質内に存在することを確認した。また、損傷 1 日後、2 日後の筋線維内には、マクロファージ様細胞の浸潤や集積が確認出来、筋線維内に浸潤中のマクロファージ様細胞と筋線維外に存在する細胞とが接触・連絡し細胞性のネットワークを形成していることが確認出来た。その後筋線維内のマクロファージ様細胞は減少したが、筋線維間質には 3 種類の細胞が引き続き確認出来た。

損傷 5 日後には筋管の形成が確認され、損傷 7 日後には中心核を持った筋線維が形成され、筋線維が再生していることが確認できた。また、損傷 5 日後、7 日後では間質の白血球様細胞、マクロファージ様細胞数は減少傾向にあったが、線維芽細胞様細胞については修復筋線維周辺で筋線維を囲む様に細胞性の 3 次元性ネットワークを形成していることを確認した。

② 筋損傷 2 日後の筋線維及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

筋損傷 1 日後には筋線維の崩壊が確認され始めた。筋損傷 2 日目には損傷筋線維周囲に形態がことなる多数の単核細胞が確認された。同時に、損傷筋線維内にも多数の細胞が浸潤していることも確認された。(図 1 B,C,D,E)

注目すべきは、図 1 B,C,D,E の各写真では、各細胞 (c, d, e) が筋間質に浮遊しているように観察できるが、これらを連続写真から 3 次元再構築を行ってみると c, d, e の細胞は連続して相互間関係を持ちながら存在する事が確認され、更には損傷筋内へ浸潤している細胞 b と相互関係を保ちながら連続して間質内に存在する事が確認された。このことから何らかの細胞間連絡を予想させる像であった。これは連続写真から 3 次元再構築を行ったことではじめて明確になった事象である。

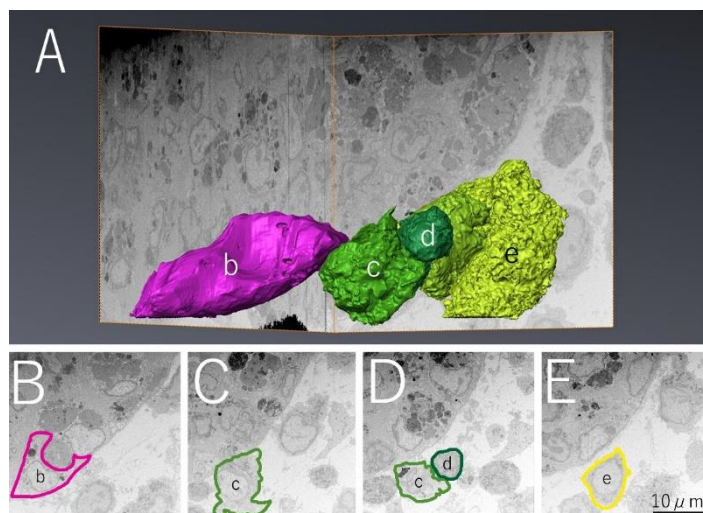


図 1. 損傷 2 日後の筋線維と間質細胞の相互関係

A ; 3 次元再構築像

B-E ; 反射電子像

損傷筋線維内に浸潤している細胞 (b) と筋組織間質に存在する単核細胞 (c, d, e) が相互に連絡し、Cell to Cell Contact ネットワークを形成している。

③ 筋損傷 7 日後の筋線維及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

筋損傷後 4 日には修復過程の筋線維が確認され、5 日後には筋管を形成していることを確認した。

筋損傷 7 日後 (図 2) には中心核を持った再生筋線維が確認された (図 2A, C, D:Mu)。4 日目以降は筋線維内への浸潤は認められなかったものの、筋組織間質には筋線維間に単核細胞が確認された。これらの単核細胞は損傷初期に観察されたような、マクロファージ様細胞や血球様細胞については減少傾向がみられたが、2 次元の反射電子像の観察では細長い突起をもった細胞がほとんどであった。

これらの細長い突起を持った細胞は連続写真を 3 次元再構築すると、平板状の細胞質を有する細胞である言葉ことが観察され、それぞれが筋組織間質中で相互作用を有するように再生筋線維周囲に取り囲む様に単核細胞同士が相互に連絡し、バスケット状の Cell to Cell Contact ネットワークを形成していた。(図 2B, C, D)。これらの細胞が相互に接触している像は確認出来たが、ギャップジャンクションやデスモゾームのような細胞接着装置については観察できなかった。

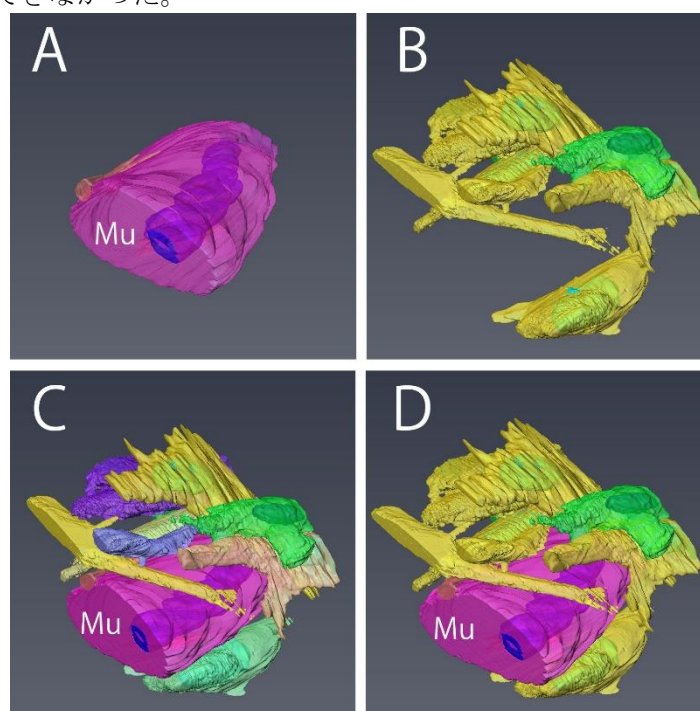


図 2. 損傷 7 日後の筋線維と間質細胞の相互関係

A ; 修復筋線維の 3 次元再構築像 B ; 筋組織間質の細胞の 3 次元再構築像

C, D; 修復筋線維と筋組織間質細胞との関係

修復筋線維 (Mu) を取り囲む様に筋組織間質に存在する単核細胞が相互に連絡し、Cell to Cell Contact ネットワークを形成している。

まとめ

筋損傷からの修復過程に筋間質に多くの細胞が移入することは知られていたが、これらの細胞がネットワークを形成していることは本研究で初めて明らかになったものである。特に損傷 7 日後には線維芽細胞様細胞が修復筋を相互に取り囲む様に存在していた。これら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、これらの細胞同士が何らかの情報交換を行い、細胞の形質転換や補充、筋線維に侵入する際に大変重要な意味を持つのではないかとということが示唆された。これらの観察・解析の結果から、液性制御だけでなく間質細胞相互のダイレクトコンタクトによる制御機構の存在を予想させるものである。

この研究は、平成 30 年度～令和 2 年度まで ABis(先端バイオイメーjing 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>

Tamaki T et al, Synchronized reconstitution of muscle fibers, peripheral nerves and blood vessels by murine skeletal muscle-derived CD34(-)/45(-) cells., *Histochem Cell Biol*, 128, 349-360 2007.

Motohashi N et al, Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblast., *Am J Pathol*, 173, 781-791, 2008.

小林ら, マウス骨格筋組織における骨髄由来細胞の分布., *久留米医学会雑誌*, 77(1), 33-34, 2014.

小林ら, 収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) 観察による筋損傷修復時に現れる骨格筋間質細胞の3Dネットワーク., *日本体育大紀要*, 43(1), 1-7, 2013.

Kami Ket al, Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.*, 25, 832-840, 1993.

Ohta K et al, Helical arrangement of filaments in microvillar actin bundles., *J Struct Biol*, 177, 513-519, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中村 桂一郎 (Nakamura Kei-ichiro) (20172398)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
連携研究者	太田 啓介 (Ohta Keisuke) (00258401)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関