

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10793

研究課題名(和文) 外眼筋は何故萎縮を免れるのか__筋衛星細胞を活性化する神経シグナルの解明と検証

研究課題名(英文) Study on the atrophy-resistance of the satellite cell in the extraocular muscle

研究代表者

山口 真紀 (Yamaguchi, Maki)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30271315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：外眼筋では固視微動として知られるように、視覚機能を保ちつつ外界情報を網膜の中心窩でとらえるために、常に神経刺激を受け収縮し、眼球を動かしているという特徴を持っている。力学的伸展を与えた骨格筋からの抽出液は単離サテライト細胞の増殖に影響を与えなかったが、能動的収縮刺激を与えた骨格筋からの抽出液は単離サテライト細胞の増殖を促進したことから、経神経的な収縮刺激がサテライト細胞を活性化する因子の放出を骨格筋細胞またはサテライト細胞に促し、自己分泌または傍分泌的に常に新しい筋線維を再生する刺激を与えていることが外眼筋の萎縮耐性の起源である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経神経的収縮刺激を与えた骨格筋からの抽出液が単離サテライト細胞の増殖を促進したことから、経神経的な収縮刺激が筋のサテライト細胞を活性化する因子の放出を骨格筋細胞またはサテライト細胞に促し、自己分泌または傍分泌的に常に新しい筋線維を再生する刺激を与えていることが萎縮耐性の起源ではないかと示唆された。このことはリハビリテーション戦略において、受動的伸展よりも中枢神経を介した経神経的な刺激がサテライト細胞の数と活性を維持する効果があることの科学的基盤となる。また、経神経的な刺激が自己分泌または傍分泌性に起こることは、収縮負荷を与えた筋から有効成分を精製することで治療への応用の道も示すこととなる。

研究成果の概要(英文)：The extraocular muscles are characterized by constantly contracting under nerve stimulation and continuing to move the eyeball. Extracts from skeletal muscle subjected to mechanical extension did not affect the proliferation of isolated satellite cells, whereas extracts from skeletal muscle given active contraction stimulation promoted proliferation of isolated satellite cells. Therefore, transneuronal contractile stimulation stimulates the release of factors that activate muscle satellite cells to skeletal muscle cells or satellite cells, and stimulates skeletal muscle cells or satellite cells to constantly regenerate new muscle fibers in a manner of autocrine or paracrine. It was suggested that this might be the origin of atrophy resistance.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：外眼筋 サテライト細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外眼筋は癌性悪液質や慢性消耗性疾患などで全身性に骨格筋に萎縮が誘発される状況下でも機能を保持することが古くから知られている。この理由として、外眼筋では組織幹細胞の一つである筋原性前駆細胞(サテライト細胞)の数が多く活性が高いことが報告されている。しかし、なぜ外眼筋でサテライト細胞の数が多く活性が高いのかについての理由は明らかではない。

2. 研究の目的

外眼筋組織が萎縮耐性を持つ理由に関して、筋原性前駆細胞に与える神経性要因を中心に解析し明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1)グリセロール電気泳動によるミオシン重鎖解析:外眼筋に含まれるミオシン重鎖の発現パターンを、Talmage and Roy[1]の方法を改良したグリセロール電気泳動により解析した。

2)骨格筋抽出液の作成;マウスまたはウサギより骨格筋を摘出し、Matsuoka & Inoue[2]の方法に基づきホモジェナイズ後に遠心分離し、上清分画を採取してタンパク濃度を測定した後に適切な濃度に希釈して凍結保存し、筋抽出液を作成した。

3)マウスの骨格筋サテライト細胞の採取と培養;マウスまたはウサギの骨格筋より以下のプロトコルにてサテライト細胞を採取した。安楽死後の動物から外眼筋または下肢筋を摘出し、蛋白分解酵素を加えて37度で2時間処理した。その後、遠心操作により上清を取り除き細胞分画を培養用ディッシュに播種して培養器中で一晩おき、接着性の高い線維芽細胞をディッシュに吸着させた。翌日非接着性細胞を採取して細胞数を計測後、iMATRIX(nippi, i221)をコートしたディッシュで培養した。増殖培地に播種する際に、2)で作成した抽出液を添加した。

4)外眼筋組織の免疫染色

外眼筋を急速凍結することにより凍結切片を作成し、各種抗体で染色してこれらのタンパクの組織内での分布を観察した。

5)抽出液に含まれるタンパク成分の質量分析;質量分析計(Bruker社製)を用いて抽出液中に含まれるペプチド断片のスペクトルデータを取得し、Swiss-plot データバンクを利用した Mascot Ion Search により各抽出液の主たるタンパク成分を比較した。

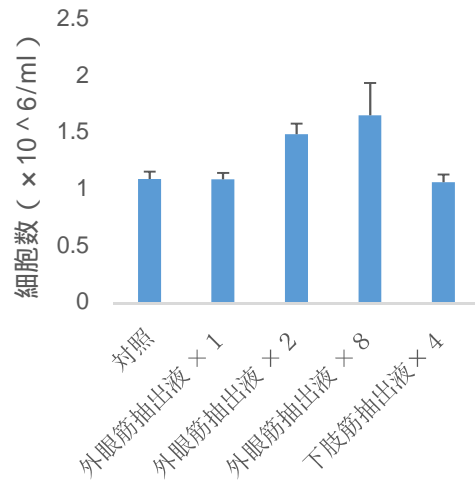
4. 研究成果

外眼筋に含まれるサテライト細胞増殖因子活性に対する物理的刺激および収縮刺激の効果

1)下肢骨格筋および外眼筋からのサテライト細胞の単離と培養

マウス下肢骨格筋および外眼筋からサテライト細胞を単離培養した。同じ質量の骨格筋から単離培養されたサテライト細胞は外眼筋のほうが明らかに多く、先行研究[3]の結果が確かめられ

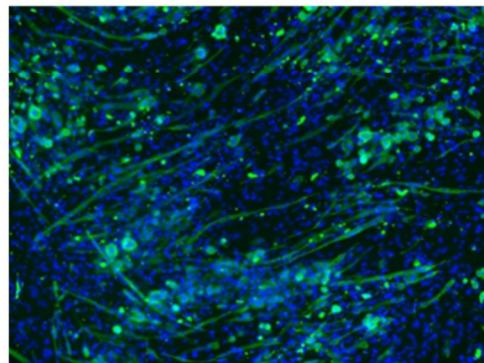
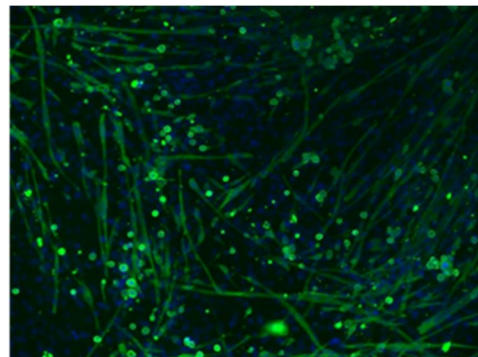
た。そこで次に、これらの筋から抽出液を作成し、マウス下肢筋から作製したサテライト細胞の増殖に与える影響を調べた。播種後 6 日目に細胞をトリプシンにより剥離し、細胞計測板にて計測したところ、細胞数は外眼筋抽出液を加えた場合に加えない場合に比べて有意に増加したが下肢筋抽出液を加えた場合は有意な効果は認められなかった(右図: ×1, ×2, ×8 は基準濃度 0.5mg/ml に対する量比を示す)



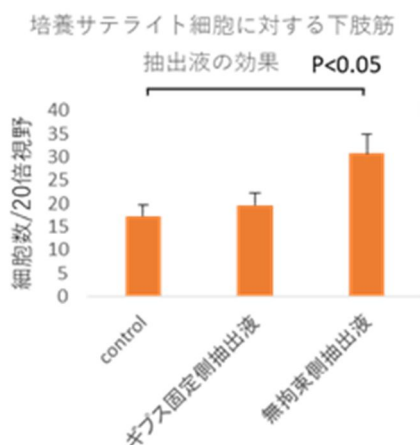
この効果は、下肢筋から単離したサテライト細胞に対しても外眼筋から単離したサテライト細胞に対しても同様だった。これより、**外眼筋のサテライト細胞を細胞外から活性化する物質が、外眼筋組織液中に含まれていることが示唆された。**また、外眼筋抽出液の有無による筋管生成度の違いを免疫染色法により調べたところ、外眼筋抽出液を加えた場合は明らかに筋管生成が促進されていることが確かめられた(下図上: 対照 下図下: 外眼筋抽出液添加)

次に、この外眼筋抽出液のサテライト細胞増殖を促進する因子は、外眼筋の高い収縮活性に由来するのではないかという仮説のもとに、以下の実験を行った。

マウス下肢筋の片側を 3 日間ギプス固定し、伸展または屈曲位に固定することにより物理的摂動を与えられた筋と、ギプス固定の影響を庇うために過剰な収縮負荷をかけられた無拘束側の骨格筋について、上記の方法で筋抽出液を作成した。受動伸展された筋ではサテライト細胞が活性化されるという知見があるにも関わらず、対照筋と比較して受動伸展した筋からの抽出液に増殖促進効果は認められなかった。骨格筋が in vivo で受動的に伸展をうけることはサテライト細胞増殖を細胞外から刺激する因子にはならないと考えられた。そこで「ギプス固定側の筋から作成した抽出液を加えた群」と「無拘束側の筋から採取した抽出液を加えた群」に二別して比較をすると(左図)、「ギ



マウス下肢筋から単離したサテライト細胞の増殖・分化に対する外眼筋抽出液の効果: 上図; 対照, 下図; マウス外眼筋抽出液を培地に1/400量添加したもの



プス固定側の筋から採取した抽出

液を加えた群」より「無拘束側の筋から採取した抽出液を加えた群」の方がサテライト細胞の増殖が有意に活性化されていることがわかった(p<0.05)。これより、**経神経的な収縮負荷は、細胞外から作用するサテライト細胞増殖刺激因子の骨格筋組織内分泌での分泌を増やすことが示唆された。**同様の傾向は、ウサギの外眼筋においても観察された。

次に、運動負荷が加えられた筋からの抽出液中の成

分を化学的に分画するために、抽出液を分子量 3 万のフィルターにより分画し、それぞれの効果を調べた。3 万以上の分画では、分画しないものに対して増殖効果が大きい傾向がみられた ($p < 0.06$) が、既知の細胞外からのサテライト細胞刺激因子である HGF(分子量 8 万 5 千)に対する抗体を用いたウェスタンブロッティング解析では陽性反応は見られなかった。

2) 抽出液の質量分析

抽出液の質量分析からは、骨格筋を構成する構造タンパクや血液中の種々の生理活性物質が高濃度に含まれることが確認されたが、抽出液の効果と連動するものは検出されなかった。増殖促進因子は、抽出液中の微量成分または、複数の成分の組み合わせから成る可能性が考えられた。

外眼筋が萎縮を免れる機構についての構造的側面からの検討

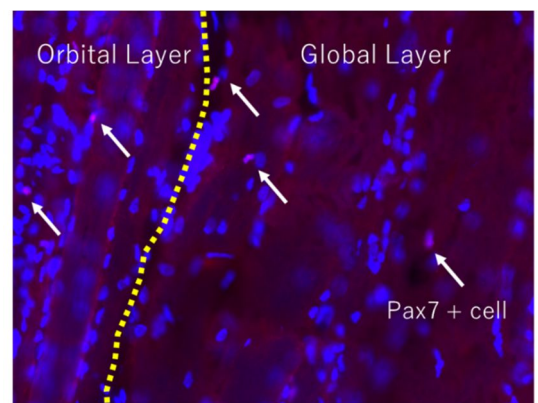
外眼筋が萎縮を免れる機構について、以下の方法で構造的側面から検討した。

1) 外眼筋の光学顕微鏡観察

ウサギ外眼筋を光学顕微鏡にて観察した。抗 Pax7 抗体による免疫染色画像からは、眼窩層と眼球層のどちらにもサテライト細胞が豊富に存在することが確認された。

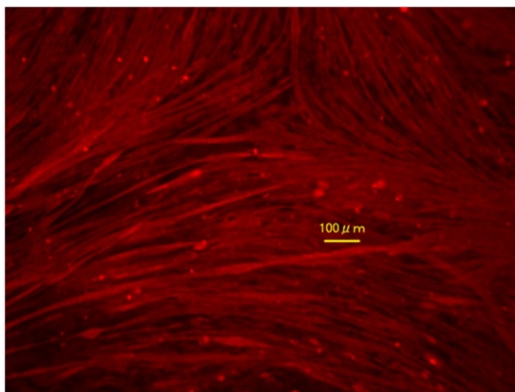
2) ミオシン重鎖発現パターン

外眼筋は眼窩層と眼球層にわかれているが、それらではミオシン重鎖発現パターンが異なることが報告されている。そこで、ウサギ外眼筋の眼窩層と眼球層を注意深く分離し、それぞれのミオシン重鎖成分を解析した。その結果、眼窩層では胎児型ミオシン重鎖発現が有意に多いことが示された。(下図右：眼窩層、左：眼球層；IIx/a :



ウサギ外眼筋の免疫染色画像；magenta:Pax7陽性のサテライト細胞, blue:Dapiによる核染色

type IIx/a, emb : embryonic type, IIb : type IIb, EO : extraocular

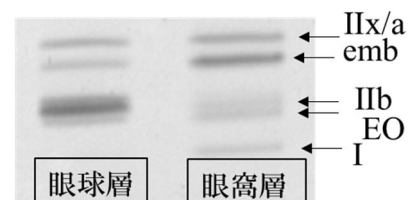


マウスから単離した筋原性前駆細胞の免疫染色画像 (赤:抗embryonic myosin heavy chain抗体陽性筋管)

type, I : type I)。

そこでこの「胎児型ミオシン重鎖」が多いという特徴が何を示すのかについて確か

めるために、単離サテライト細胞から分化させた筋管の免疫染色を行ったところ、ほぼすべての細胞で胎児型ミオシンが発現していることが示された(左図)。このことから、外眼筋では眼窩層で常に新しい筋線維が生み出されている可能性が考えられた。



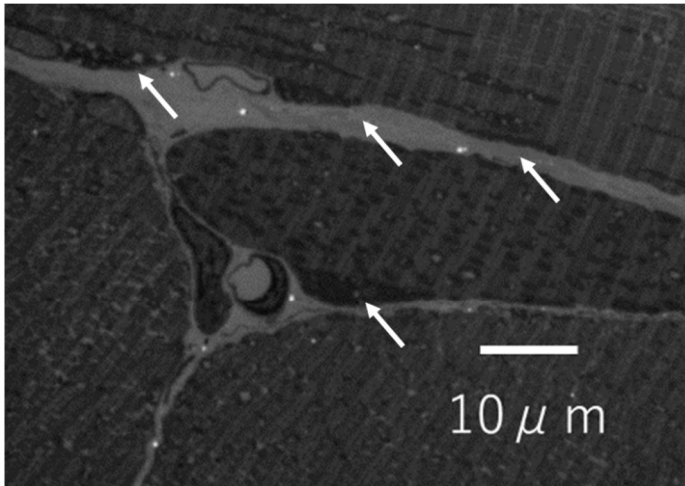
外眼筋 (眼球層/眼窩層) のミオシン重鎖発現パターン

3) 電子顕微鏡像

ウサギ上直筋および下直筋の電子顕微鏡画像を取得した。眼窩層においても眼球層においても四肢体幹筋と同様のサルコメア構造が認められたが、ミトコンドリアが豊富な線維が数多く認められた。また、それらの線維では、筋線維の表層に、ミトコンドリアが密集した領域が見られ

た(下図矢印)。

以上より、外眼筋では、常に神経刺激を受け収縮し、眼球を動かし続けているという特徴がある



ウサギ外眼筋の電子顕微鏡像：筋原線維の間や細胞膜直下に豊富なミトコンドリアが観察される。

が、それが外眼筋のサテライト細胞を自己分泌または傍分泌的に活性化し、眼窩層から常に新しい筋線維を再生していることが萎縮耐性の起源ではないかと考らる。外眼筋は慢性疾患や神経性疾患では萎縮を受けにくい一方で、ミトコンドリア遺伝子の異常によるいわゆる「ミトコンドリア病」では障害を受けやすいことが臨床的に知られている。電子顕微鏡像で観察されたミトコンドリアの密集所見は、

外眼筋が絶えず収縮刺激を受けていることの顕れであると同時に、活発なサテライト細胞の増殖・分化のためのエネルギー源となっている可能性を示唆するものと考えた。

参考文献

- [1] Talmage R.J. and Roy R.R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Am. J. Physiol.* 1993, 2337-2340
- [2] Matsuoka Y. and Inoue A., Controlled differentiation of myoblast cells into fast and slow muscle fibers. *Cell Tissue Res.* 2008, 332:123-132
- [3] Kallestad K.M., Hebert S.L., McDonald A.A., Daniel M.L., Cu S.R., and McLoon L.K. Sprouting of Extraocular Muscle in Aging and Muscular Dystrophies: A Myogenic Precursor Cell Hypothesis. *Exp Cell Res.* 2011 April 1; 317(6): 873-885.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口眞紀、河原巧紘、飯田貴絵、山澤徳志子、秋山暢丈、竹森重
2. 発表標題 骨格筋サテライト細胞の増殖・分化過程に対する骨格筋抽出液の効果
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原巧紘、山口眞紀、山澤徳志子、秋山暢丈、竹森重
2. 発表標題 マウス骨格筋サテライト細胞から分化誘導した骨格筋のミオシン重鎖発現パターン
3. 学会等名 成医会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口眞紀、栗原貴、中原直哉、河原巧紘、大野哲生、山内秀樹、平野和宏、山澤徳志子、竹森重
2. 発表標題 外眼筋のX線回折像に対するBDMの効果
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	竹森 重 (Takemori Shigeru) (20179675)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	山内 秀樹 (Yamauchi Hideki) (60220224)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

	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
研究 協力者	奥山 博司 (Okuyama Hiroshi)		
研究 協力者	山澤 徳志子 (Yamazawa Toshiko)		

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