

令和元年6月17日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01837

研究課題名(和文) 組織酸素分圧上昇が筋サテライト細胞の増殖・分化と筋損傷治癒に及ぼす効果

研究課題名(英文) Effects of hyperoxia on proliferation and differentiation of muscle satellite cells

研究代表者

川田 茂雄 (Kawada, Shigeo)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：20376601

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)：骨格筋の損傷治癒過程において、損傷組織を高酸素分圧環境に暴露すると、その治癒が促進されることが知られている。しかし、高酸素分圧環境が直接的に骨格筋の基になる筋サテライト細胞の増殖能を高めるかどうかは不明であった。そこで、マウスの筋サテライト細胞由来であるC2C12細胞株を高酸素環境に暴露したところ、暴露時間の長短に関わらず増殖能は高まらなかった。このことは、高酸素分圧が骨格筋の損傷治癒を促進する際は、少なくとも高酸素分圧環境が直接的に筋サテライト細胞に影響を与えているのではないことを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋はヒトが移動する際には必須の組織であるため、この損傷はヒトの生活の質を極めて低下させる。そこで、仮に骨格筋を損傷してしまった場合は、可能な限り早期に回復させることが望ましい。高気圧高酸素環境が骨格筋損傷を促進させるという報告はあるが、そのメカニズムについては詳細には明らかになっていない。そこで、マウス筋幹細胞であるC2C12細胞を用いて、高酸素環境が細胞増殖能を直接的に刺激するのかどうかを検討したところ、高酸素環境は直接的には細胞増殖能を高めないことが明らかとなった。このことは、高酸素環境が骨格筋損傷の回復を促進させる際には、他の要因を介した間接的効果である可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Injured skeletal muscles can be regenerated resulting from enhanced proliferation of muscle satellite cells which are stem cells for skeletal muscle. It has been reported that hyperoxic conditions accelerate regeneration of injured skeletal muscles. However, it is not well understood whether hyperoxic conditions directly stimulate muscle satellite cell proliferation. To resolve this issue, C2C12 cells, a stem cell line of mouse skeletal muscle, were exposed to hyperoxic conditions in this study. The hyperoxic conditions did not stimulate muscle proliferation regardless of duration of exposure to hyperoxia. This result indicates that hyperoxic conditions at least do not directly enhance muscle satellite cell proliferation.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格筋 再生 高気圧高酸素

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

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い高齢者では転倒事故件数が増加する。転倒による骨折の場合、怪我の程度によっては骨だけではなく周囲の組織(骨格筋・血管等)も損傷する。申請者はこれまで、骨折の早期治癒法として、高気圧高酸素(HBO: Hyperbaric Hyperoxia)環境への暴露が有効な手段になり得ることを報告してきた。我々は約 760 mmHg という大気圧環境下で生活しており、極端にその環境が変化することはない。そのため、細胞内酸素分圧は極めて狭い範囲で制御されており、その逸脱は細胞の機能に様々な影響を与える。実際に我々の研究でも、細胞内の高酸素分圧は様々な遺伝子、タンパク質発現を変化させることを確認している。このような理論的背景から、高酸素分圧環境を積極的に人々の研究に役立たせることが可能との判断に至った。その応用分野の一つとして損傷骨格筋の治癒促進に応用することとした。高気圧高酸素環境の骨格筋損傷治癒への効果については、未だ明らかになっていない点が数多く存在する。骨格筋損傷は生活の質を極めて低下させることから、損傷治癒の促進を促す方法の開発が期待される。

2. 研究の目的

ヒトは移動が制限されると、生活の質は極めて低下する。ヒトの動力源は骨格筋であることから、骨格筋が損傷した場合は生活の質が低下することになる。骨格筋は筋細胞から構成されるが、筋細胞は一つの細胞の中に複数の核を持つ多核細胞である。多核細胞の特徴として、細胞分裂能が失われていることが挙げられる。そのため、仮に骨格筋が事故等で損傷してしまった場合は、既存の筋細胞が増殖して筋再生を行うということが不可能である。そこで、実際に損傷筋において筋再生が起こる際には、筋細胞とは別の再生能を持った筋幹細胞である筋サテライト細胞が増殖、融合し、新たな筋細胞になり骨格筋を再生する。そのため、骨格筋の再生には、最初のステップとして、筋サテライト細胞の増殖が必須であり、骨格筋損傷の治癒を促進するためには筋サテライト細胞の増殖能を高めることが重要となる。これまで、動物実験において、高気圧高酸素(HBO)環境が損傷骨格筋治癒を促進させることが報告されている。しかし、組織損傷では筋サテライト細胞の増殖と伴に、白血球が主体となる炎症反応も生じる。組織損傷により損傷部位に白血球の浸潤が認められるが、浸潤した白血球は様々な成長因子等を産生し、損傷部位の再生を促す。そのため、仮に HBO 環境が損傷部位の再生を促進するとしても、HBO 環境が直接的に筋サテライト細胞の増殖を促すのか、あるいは、白血球の作用を増強することにより、間接的に損傷治癒を促進させているのかどうかは不明であった。そこで、本研究では HBO 環境が、直接的に筋サテライト細胞の増殖を促すのかどうかを検討することを目的とした。また、培養細胞だけではなく、個体での研究を遂行するために、マウスを用いて筋損傷、再生のための動物実験モデルの構築を行った。

3. 研究の方法

(1)研究材料

本研究では、細胞を用いた研究ではマウス筋サテライト細胞由来の C2C12 細胞株を用いた。実験動物は、マウス(Sic:ICR)を用いた。

(2)HBO 暴露

細胞を暴露する HBO 環境は、窒素、酸素、二酸化炭素を任意に混合できる装置を用いて実現した。HBO 環境下で細胞を培養する際の条件は、80% O₂、5% CO₂、37 °C とした。設定した酸素濃度が実現できているかどうかは、酸素濃度計により確認した。

(3)HBO 暴露による細胞増殖能の検討

C2C12 細胞を 1 型コラーゲンでコーティングした直径 60 mm のシャーレに 5 × 10⁴ 細胞播種し、播種 24 時間後に 80% O₂、5% CO₂ 環境下に、1、2、6、12 時間暴露し、細胞数がどのように変化するかを検討した。

C2C12 細胞は付着性の細胞のため、細胞死が生じればシャーレから剥離されるが、細胞死が起こってから実際に剥離されるまでの細胞を検出するためにトリパンブルー染色を行い、生細胞におけるこの細胞死の割合を検討した。

HBO 暴露による細胞増殖能を、より詳細に検討するために細胞播種 24 時間後に、培地に修飾チミジンアナログ EdU を添加した。細胞が分裂する際に、この修飾チミジンアナログ EdU が DNA に取り込まれるため、取り込まれた細胞は細胞分裂を起こしたものと特定できる。修飾チミジンアナログ EdU 添加後に細胞を HBO 環境下に 4 時間暴露し細胞全体のうちどれだけの割合が修飾チミジンアナログ EdU を取り込むかにより細胞増殖能を検討した。

(4)低酸素暴露による細胞増殖能の検討

ヒトで骨格筋損傷を生じるような場面では、損傷は骨格筋のみに起こるわけではなく、周囲の血管も損傷すると考えられる。血管も同時に損傷した際には、損傷部位が一時的に低酸素環境下に置かれることになる。そのため、損傷治癒時の組織酸素分圧環境の影響を明らかにするためには、低酸素環境が細胞増殖能にどのような影響を与えるかを検討する必要がある。そのため、細胞を 7.5% O₂、5% CO₂ 環境下に、1、2、6、12 時間暴露し検討した。

(5)動物実験モデルの構築

マウスを用いた骨格筋の損傷・再生研究では、従来、薬剤であるカルディオトキシンを骨格筋に注入する方法が用いられている。この方法は、ほぼ骨格筋のみを損傷させるもので、それ以外の組織にはほとんど影響を与えない。骨格筋のみの損傷による筋再生について研究するには非常に優れた研究モデルではあるが、実際のヒトの事故等による筋損傷では、既存の成熟筋線維のみではなく、筋線維の周囲にある血管や、筋線維に付着している筋幹細胞である筋サテライト細胞も損傷すると考えられる。そこで、本研究では、薬剤を用いた筋損傷ではなく、物理的に筋損傷を起こし、筋再生を生じさせるようなモデルを構築した。また、その際の筋再生における筋サテライト細胞の重要性を検討した。

4. 研究成果

(1)HBO 環境の影響

HBO 暴露への結果、HBO 非暴露細胞と比較して、細胞数に有意な差は認められなかった。また、トリバンプルーによる分析でも、死細胞の割合に差は認められなかった。本研究では、80% O₂ 環境という極めて高濃度の酸素環境に筋サテライト細胞を暴露したが、少なくとも暴露 12 時間までは酸化障害の影響はないと考えられる。細胞の膜は脂質が主成分のため、高酸素環境では脂質が酸化されることにより細胞膜の酸化が生じ、ある程度の細胞毒性が生じると予想していたが、12 時間程度までの暴露であれば、細胞死を誘発させるような影響はないようであった。

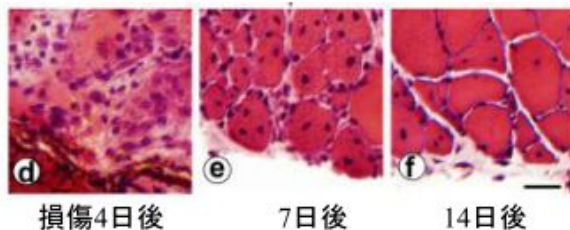
(2)HBO 環境の細胞増殖能への効果

HBO 暴露によって修飾チミジンアナログ EdU の取り込み量には有意な変化が認められなかったことから、HBO 暴露によって細胞の増殖能は影響を受けないことが明らかとなった。この結果は、HBO 暴露による細胞数計測を行った研究成果(1)の結果を支持するものであった。

組織損傷では、損傷部位に免疫細胞である白血球が浸潤し、様々な成長因子等を産生し組織再生を促す。このことは、組織再生を考える際には、白血球や、白血球が産生する成長因子との共存を考慮する必要性を意味している。本研究では、HBO 暴露単独の効果しか検討できていないため、様々な成長因子を加えた状況で HBO 暴露を行った場合に細胞増殖能に相乗効果があるかどうかを検討する必要がある。また、骨格筋の再生には筋サテライト細胞が増殖するだけでなく、増殖した筋サテライト細胞が互いに融合し、筋管細胞へと分化する必要がある。そのため、たとえ HBO 暴露が筋サテライト細胞増殖能を直接的に高めなかったとしても、それは直ちに筋再生に影響しないと断言できない。今後は、HBO 暴露が筋分化へ与える影響も併せて検討する必要がある。

本研究では、筋損傷モデルとして、凍結損傷モデルを試みた。この方法では、液体窒素で冷却したステンレス板(幅 3 mm、厚さ 2 mm)を対象筋(大腿部外側筋)に 10 秒間当てて凍結破壊させた。その後、経時的に損傷部から組織切片を作製し、再生過程を確認したところ、損傷 4 日後には中心核を伴った再生筋が出現し始め、損傷 1 週間後には損傷部位は中心核を伴った再生筋で再生され、14 日後には、ほぼ再生が完了していた(図 1,文献 1)。一方、本実験モデルにおける筋再生時の筋サテライト細胞の重要性を確認するために、マウスに窒素含有ビスフォスフォネート製剤(N-PB)を投与し、筋損傷部位と接している大腿骨を骨折させると、筋サテライト細胞の増殖が抑えられ、筋再生も阻害されることが明らかとなった。N-PB 製剤は、筋管細胞のような分化した細胞には毒性は示さないが、筋サテライト細胞のような分裂中の細胞には取り込まれ、細胞内のメバロン酸経路を阻害することにより細胞毒性を示すことが知られている。このことは、先行研究と同様、筋再生の初期に起こる、筋サテライト細胞の増殖が筋再生には必須であることを示している。また、本研究で構築した凍結損傷による動物モデルは、筋損傷・再生研究において有用なモデルであることが明らかとなった。

(図 1)凍結損傷による骨格筋損傷の治癒過程(ヘマトキシリン・エオジン染色)



(3) 低酸素暴露による細胞増殖能の検討

C2C12 細胞を 7.5% O₂ 環境という極めて低い酸素環境下に 1、2、6、12 時間暴露したところ、トリバンプルーによる分析では死細胞の割合は非暴露細胞と比較して差は認められなかった。細胞数では、暴露 6 時間の細胞のみ細胞数が増加するという結果が見られた。このことは、骨格筋組織損傷初期に生じていると考えられる損傷組織における低酸素環境が筋サテライト細胞

の増殖能を刺激する可能性を示唆している。本研究では、HBO 暴露のみでは細胞増殖能を高めることはなかったが、今後は、一度低酸素環境に暴露した細胞を、続けて HBO 環境に暴露した場合に細胞増殖能が亢進するかどうかを検討する必要がある。

参考文献

- (1)Kawada S, Harada A, Hashimoto N. Impaired of cold injury-induced muscle regeneration in mice receiving a combination of bone fracture and alendronate treatment. PLoS ONE 2016, 11(1): e0147284.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1)Kawada S, Harada A, Hashimoto N. Impaired of cold injury-induced muscle regeneration in mice receiving a combination of bone fracture and alendronate treatment. PLoS ONE 2016, 11(1): e0147284. 査読あり。

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

- (1)川田茂雄 「スポーツ医科学トピックス 2」ブックハウス HD (2018)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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

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。