

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15651

研究課題名(和文) 脂肪変性したヒト筋組織の再生能評価法の確立

研究課題名(英文) Myogenic potency of human satellite cells from torn muscles

研究代表者

萩原 嘉廣 (Hagiwara, Yoshihiro)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90436139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腱板断裂修復術において、術前の腱板筋の脂肪変性は術後成績の不良因子とされている。また、腱板断裂修復術後に脂肪変性が改善するかどうかは不明で、患者は治療後も日常生活動作の制限を強いられ、そのためにリハビリテーション期間も長くなっている。医療費抑制の観点からも早急に筋肉の脂肪変性の病因を解明し、効果的な治療法の開発が望まれる。本研究では、廃用萎縮・脂肪変性した筋組織から筋衛星細胞を単離し、筋再生能力の評価を行った。廃用萎縮し、脂肪変性した筋肉から得られた筋衛星細胞でも、十分な筋分化能をもっていることが示され、筋萎縮・脂肪変性の予防には、筋収縮刺激などが必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rotator cuff tear is a common disease in elderly patients that leads to shoulder weakness, pain, and disability in the activities of daily living. Some patients with massive rotator cuff tears have an unacceptable clinical outcome because of muscle atrophy and fatty infiltration. The satellite cell has central role of muscle regeneration, however, there are few reports about human muscle. The purpose of this study was to compare in vivo features of human myogenic and adipogenic precursors in the rotator cuff muscles in both torn supraspinatus (SSP) and intact subscapularis (SSC) tendons. The human satellite cells from the SSP muscle with fatty infiltration maintained intrinsic myogenic potentials.

研究分野：整形外科

キーワード：筋前駆細胞 脂肪浸潤 関節鏡手術 腱板断裂 脂肪前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

肩関節は上腕骨と肩甲骨から構成され、4つの筋肉(肩甲下筋、棘上筋、棘下筋、小円筋)からなる腱板によって連結されている。腱板は加齢とともに変性断裂を引き起こし、肩の疼痛や機能障害の原因となる疾患であり、1000万人以上が罹患しているものと考えられている。腱断裂後の自然治癒はなく、経過とともに断裂は拡大し、筋萎縮は進行する。また、時間の経過とともに廃用萎縮した筋組織は脂肪変性を起こす。肩の痛みや機能障害が高度になったものでは腱板を修復する手術が必要となるが、断裂が広範囲に及ぶ場合、肩関節鏡による修復術をおこなっても機能障害を残すことが多い。しかしながら、修復手術を行っても脂肪変性した組織は再生しないとの報告(Am J Sports Med. 2007 May 35;5:719-28)もあり、現在の治療法だけでは限界がある。筋サテライト細胞が筋再生の中心的な役割を担うと考えられているが、脂肪変性を引き起こすメカニズムについては今なお不明である。

近年、ヒト筋サテライト細胞や、筋組織中の脂肪前駆細胞の細胞表面マーカーが報告されており、フローサイトメーターによる細胞のソーティング、培養が可能となってきた。筋サテライト細胞はサルコメアと基底膜の間に存在する筋再生の幹細胞的な役割を担う細胞と考えられており、ヒトの場合ではCD56が特徴的な抗原マーカーとして使用できることが報告されている(PLoS One. 2014;9(2):e90398)。また、上住らは近年、ヒト脂肪前駆細胞の抗原マーカーとして、Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFR alpha)が脂肪再生の重要な役割を担うことを報告している(Cell Death Dis. 2014;5:e1186)。

筋再生、脂肪変性の前駆細胞の抗原マーカーは近年報告がされてきているものの、脂肪変性した腱板筋中のこれらの前駆細胞の細胞集団の割合や、前駆細胞が正常な筋再生能を保っているかどうかについてはこれまで報告がない。また、2光子顕微鏡による whole mount での組織の微細構造の観察も可能となり、動物での筋組織の報告が行われているが、ヒト筋組織での報告は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、廃用萎縮・脂肪変性したヒト腱板筋の筋組織から筋サテライト細胞、脂肪前駆細胞を単離し、それぞれの細胞集団の数や筋サテライト細胞の筋分化能、遺伝子発現を検討することである。また、2光子顕微鏡を用いて、正常な筋組織と脂肪変性を起こした筋組織の微細構造を観察する。

3. 研究の方法

(1) 筋サテライト細胞、脂肪前駆細胞の単離
東北大学、JR 仙台病院、松田病院、JCHO 仙台病院的倫理委員会の承認を得たのち、本研

究を開始した。2014年10月から2015年12月にかけて腱板断裂修復術を行った患者19名を対象とした。平均64.5歳(47-76歳)、男性10例、女性9例であった。肩関節鏡手術の際、断裂して脂肪変性を起こした棘上筋(断裂群)と、断裂していない正常な肩甲下筋(コントロール群)から筋組織を採取した。筋組織をはさみで粉々に粉碎した後、0.2% コラゲナーゼで37℃の条件下で1時間酵素処理を行い、細胞レベルまで分離した。70µmのメッシュシートでろ過したのち、遠心分離を行い、(700g×20min)、沈殿したペレットを回収した。1%BSAを付加したPBS bufferにペレットを溶解させたのち、Fc receptor blockを10分間行い(Human TruStain FcX, 1:20 in staining buffer; Biolegend, San Diego, CA)、先行研究(Cell Death Dis. 2014 Apr 17;5:e1186)より判明している細胞表面マーカーを用いて、筋サテライト細胞をCD11b-CD31-CD34-CD45-CD56+の細胞、脂肪前駆細胞をCD11b-CD31-CD45-PDGFR alpha+の細胞と定義し、抗原染色を行った。抗原マーカーによる染色を45分間行った後、bufferで2回洗浄、遠心(700g×5min)を行い、フローサイトメーター(BD FACS ARIA II flow cytometer, Becton, Dickinson and Company)により筋サテライト細胞と脂肪前駆細胞を分離、回収した。細胞表面マーカーの染色に用いた抗体と濃度は以下の通りである。

- FITC-conjugated anti-CD45 (1:20, Biolegend, clone HI30),
- FITC-conjugated anti-CD11b (1:20, Biolegend, clone ICRF444)
- FITC-conjugated anti-CD31 (1:20, Biolegend, clone WM59)
- PE/Cy7-conjugated anti-CD34 (1:20, Biolegend, clone 581)
- APC-conjugated anti-CD56 (1:20, Biolegend, clone MEM-188)
- PE-conjugated anti-PDGFR alpha (1:20, Biolegend, clone 16A1)

(2) 筋サテライト細胞の筋分化能

回収した筋サテライト細胞は20% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, 10% chicken embryonic extract (United States Biological, Inc., Salem, MA), 2.5 ng/ml bFGF (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA)を付加したDMEMとHam's F10の混合溶液の培養液にて、37℃、5%CO2の条件下で培養を行った。80~90% confluenceの状態では10cm dishに継代し、増殖を行った後、液体窒素で凍結保存を行った。

断裂群、コントロール群それぞれの凍結保存した筋サテライト細胞をmatrigelコートした6ウェルのプレートにまいた後、5% horse serum, 1% penicillin-streptomycinを添付したDMEM/Ham's F10培地で筋分化を誘導し

た。培養液は 24 時間ごとに交換を行い、免疫染色のため、ガラスカバースリップ (Matsunami C022221) を使用した。0.1 % Triton X-100 を添付した 2 %パラホルムアルデヒドで固定したのち、筋分化能評価のため、ミオシン重鎖、細胞核の免疫染色を行った。免疫染色に用いた抗体は下記の通りである。

- Anti-human myosin heavy chain antibody (R&D Systems, MAB4470,)
- Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Thermo Fischer Scientific)

共焦点顕微鏡(Olympus Fluoview FV-1000)で観察を行い、画像は Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Inc.)、Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.)で処理を行い、形成された筋管の数、筋管中の融合した細胞核の割合を数えて筋分化能の評価を行った。

(3) 脂肪浸潤と筋サテライト細胞・脂肪前駆細胞の細胞数の相関

Goutallier らは腱板断裂において、脂肪浸潤した筋肉の評価を 5 段階に分けて評価を行い、その分類の方法は臨床の現場においてはよく用いられている。腱板断裂修復術の前に撮像された MRI (Hitachi Medical Corporation) を用いて、Goutallier らのプロトコルに用いて脂肪浸潤の割合を算出した。肩峰、烏口突起、肩甲骨骨部がすべて見える矢状面で最外側のイメージ像と、その像に引き続く前後二つのイメージ像の、断裂群・コントロール群の筋肉の筋/脂肪の割合を平均した。フローサイトメーターによって得られた筋サテライト細胞、脂肪前駆細胞の細胞数を算出し、その相関の評価を行った。

(4) 筋サテライト細胞の遺伝子発現評価

回収した筋サテライト細胞のうち、二つのペアのサンプルを DNA マイクロアレイによって解析を行った。DNase I (Invitrogen) による酵素処置を行った後、RNA を Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Ambion) を用いて増幅し、Cy3, Cy5 によるラベル付けを行った。Whole Human Genome Microarray Kit 4 × 44 K (Agilent) を用いて 65、17 時間ハイブリダイゼーションを行い、GenePix 4000B (Molecular Devices) を用いて DNA マイクロアレイを行った。スキャンされた画像は GenePix Pro 6 software (Molecular Devices) を用いて解析を行った。2 倍以上の増幅、あるいは減少が得られた遺伝子を有意と定義し、Gene Ontology analysis を行った。

(5) 2 光子顕微鏡による脂肪浸潤した筋の微小構造評価

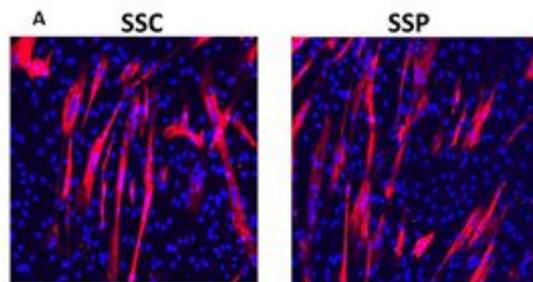
断裂群、コントロール群から得られた 6 人の患者のサンプルを 2 光子顕微鏡による組織評価に使用した。筋サンプルは鏡視下手術で採取されたのち、すぐに 4%パラホルムアルデ

ヒドで固定した。一晩おいた後、PBS で 3 回洗浄後、BODIPY 558/568 C12 (最終濃度: 5 μ M, Life Technologies), Hoechst 33342 (最終濃度: 40 μ M, Dojindo Molecular Technologies, Inc.) Alexa Fluor 488-conjugated isolectin GS-IB4 (最終濃度: 10 μ g/ml, Life Technologies) で 30 分、4 °C で染色を行い、whole mount の状態で 2 光子顕微鏡 (A1R-MP+, Nikon Corporation, equipped with a Ti-sapphire laser (Mai-Tai DeepSee, Spectra-Physics, Santa Clara)) で観察を行った。920nm で励起を行い、425-475nm を second harmonic generation と Hoechst 33342、500-550 nm を Alexa Fluor 488、601-657 nm を BODIPY 558/568 のシグナルの波長のチャンネルとして検出を行った。3D 構築画像は NIS element (Nikon) を使用し、2 μ m のスライス厚で撮像を行った。

4. 研究成果

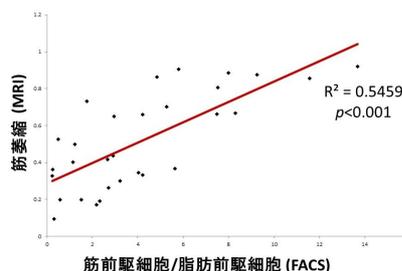
(1) 筋サテライト細胞の筋分化能

断裂群から得られた筋サテライト細胞とコントロール群から得られた筋サテライト細胞のミオシン重鎖の形成能・細胞核癒合率に大きな差はみられなかった。このことから、脂肪浸潤した筋サテライト細胞も正常な筋肉中の筋サテライト細胞と同等の筋管形成能をもっている可能性が示唆された。



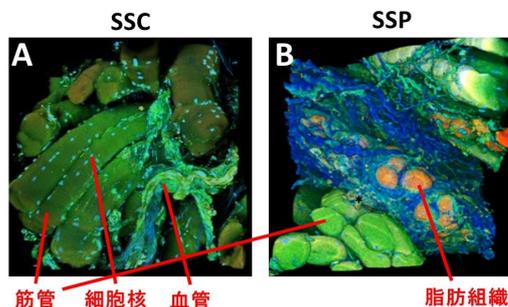
(2) 筋サテライト細胞/脂肪前駆細胞と脂肪浸潤の相関

脂肪前駆細胞と筋サテライト細胞の割合は、脂肪萎縮した棘上筋で有意に上昇が認められ、術前の MRI による筋萎縮の割合と相関関係がみられた ($r^2 = 0.5459$)。脂肪浸潤がすすむにつれて、筋サテライト細胞が減少し、脂肪前駆細胞が増加することが示された。適切な治療により、筋サテライト細胞の増殖を促し、脂肪前駆細胞を減少させることが重要であると考えられた。



(3) 筋サテライト細胞の遺伝子発現
断裂群の筋サテライト細胞において、MYH2, MYL1 などの筋分化関連の遺伝子発現が上昇し、HOXC4 や HOXC6 などの発生関連の遺伝子が減少傾向であった。断裂群の筋サテライト細胞が十分な筋分化を得るためには、微小環境などを調整し、適切な筋分化の刺激を与える必要があると考えられた。

(4) 2光子顕微鏡による組織評価
3次元構築による2光子顕微鏡画像により、筋間への脂肪組織の沈着や、筋管構造、蛇行したコラーゲン線維などが明瞭に観察された。脂肪萎縮した筋組織では、脂肪組織の沈着は血管周囲に多く見られた。2光子顕微鏡は深い組織の観察が可能であり、詳細な3次元構造の観察に有用であった。血管周囲の脂肪組織は、脂肪組織の増殖と血管新生との関連を示唆するものであり、脂肪前駆細胞の増加に深く関与している可能性が考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

1. Koide M, Hagiwara Y, Tsuchiya M, Kanzaki M, Hatakeyama H, Tanaka Y, Minowa T, Takemura T, Ando A, Sekiguchi T, Yabe Y, Itoi E. Retained Myogenic Potency in Human Satellite Cells from Torn Rotator Cuff Muscles Despite Fatty Infiltration. *Tohoku J Exp Med*, Volume 244 (2018) Issue 1 Pages 15-24 DOI <https://doi.org/10.1620/tjem.244.15>. 査読有.

[学会発表](計 3件)

1. 腱板断裂における脂肪変性を伴う筋組織中のヒト筋衛星細胞の分化
小出将志、萩原嘉廣、安藤晃、関口拓矢、金澤憲治、土谷昌広、神崎展、井樋栄二
第44回日本肩関節学会 / The 1st Asia-pacific Shoulder & Elbow Symposium (東京), 2017.10.6-8
2. 廃用萎縮・脂肪変性した筋組織中の筋・

脂肪前駆細胞の分化能の評価

小出将志、萩原嘉廣、安藤晃、矢部裕、金澤憲治、関口拓矢、板谷信行、吉田新一郎、神崎展、畠山裕康、土谷昌広、井樋栄二

第31回日本整形外科学会基礎学術集会(福岡) 2016.10.13-14

3. Koide M, Hagiwara Y, Ando A, Yabe Y, Kanazawa K, Sekiguchi T, Itaya N, Yoshida S, Itoi E, Kanzaki M, Hatakeyama H, Tsuchiya M: The human satellite cells can form the myotube even in the atrophic fatty muscle of rotator cuff tear. Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, Orlando, Florida 3/5-8, 2016.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
萩原 嘉廣(HAGIWARA YOSHIHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号:90436139

(2)研究分担者
神崎 展(KANZAKI MAKOTO)
東北大学・医工学系研究科・准教授
研究者番号:10272262

土谷 昌広(TSUCHIYA MASAHIRO)
東北福祉大学・健康科学部・准教授
研究者番号:60372322

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()