

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18484

研究課題名(和文) ヒト筋衛星細胞の収縮培養系の確立

研究課題名(英文) Feeder-supported in vitro exercise model using human satellite cells

研究代表者

小出 将志 (Koide, Masashi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70804706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：萎縮・脂肪変性したヒト筋組織と正常筋組織を採取し、その中から筋衛星細胞を単離する鏡視下腱板断裂の手術の際に、断裂している棘上筋(断裂群)と断裂していない肩甲下筋(正常群)から小指頭大の筋サンプルを採取した。小指頭大の筋サンプルをコラゲナーゼ処理し、細胞を単離することのできるFACS(Fluorescence activated cell sorting)の装置を用いて、筋衛星細胞(CD11b-CD31-CD34-CD45-CD56+ cell)を分離した。分離した筋衛星細胞を培養増殖させ、凍結保存を行った。筋衛星細胞に電気刺激を加えて分化させる収縮筋培養系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化率が世界最速の本邦において、筋力・筋量を保持し、自活的な生活習慣を維持することが健康寿命を引き伸ばすために重要である。筋力維持のためには効果的な運動が必要であるが、一度廃用萎縮した筋組織が正常に再生するかどうかは今なお不明である。本研究の意義は廃用萎縮した筋組織の効果的な再生方法を検討することである。

研究成果の概要(英文)：Collecting atrophic and adipose-degenerated human muscle tissue and normal muscle tissue during arthroscopic shoulder surgery and isolating muscle satellite cells from them. A small fingertip-sized muscle sample was taken from the un-ruptured subscapularis muscle (normal group), and ruptured supraspinatus muscle (torn group). Muscle satellite cells (CD11b-CD31-CD34-CD45-CD56 + cells) were isolated using a FACS (Fluorescence activated cell sorting) device following collagenase treatment of small fingertip-sized muscle samples. The separated muscle satellite cells were cultured and proliferated, and cryopreserved. We constructed a contractile muscle culture system that differentiates into myotube by applying electrical stimulation.

研究分野：整形外科

キーワード：筋衛星細胞 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦においては、要介護者・要支援者が530万人を超え、筋力・筋量を保持し、自活的な生活を維持することが極めて重要である。特に上肢帯の機能障害は日常生活に密接に関わり、下肢と比較して代替手段も乏しく、生活の質を著しく低下させる。

「腱板断裂」は肩の疼痛や機能障害を引き起こす代表的な疾患であり、肩関節を構成する腱板筋群(肩甲下筋、棘上筋、棘下筋、小円筋)が断裂して起こる。本邦では1000万人以上が罹患しているものと推定され、加齢とともに罹患率は上昇する(50代:10.7%, 60代:25%, 70代:44%, 80代:63%)。腱板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・脂肪変性が進行する。保存療法で効果がない場合、鏡視下腱板修復術を行う。しかし断裂が広範囲に及ぶ場合、筋組織の萎縮・脂肪変性が強く、十分な筋力の回復が得られずに機能障害を残す。筋組織はヒトにおいても再生しやすい組織と考えられているが、萎縮・脂肪変性した筋組織が正常に再生するかは今なお不明である。筋組織の脂肪化は手術成績の予後不良因子であり、手術を行っても脂肪変性した組織は再生しないと報告され、萎縮・脂肪変性した筋組織の効果的な再生を促す治療法が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)ヒト筋組織からの筋衛星細胞の単離法・ヒト筋衛星細胞の収縮培養系を確立するとともに、(2)廃用・脂肪萎縮した筋組織中における筋衛星細胞の筋再生能力を評価し、筋組織の効果的な再生による治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 2光子顕微鏡での観察

対象と方法: 断裂腱(断裂群、棘上筋・棘下筋、萎縮・脂肪変性)と正常腱(コントロール群、肩甲下筋)から筋組織を採取し、2光子顕微鏡で組織の立体構造を把握する。

(2) 筋衛星細胞・脂肪前駆細胞の単離

対象: ヒト筋サンプル(断裂群、正常群)

方法: 小指頭大の筋サンプルをコラゲナーゼ処理し、細胞を単離することのできるFACS(Fluorescence activated cell sorting)の装置を用いて、筋衛星細胞(CD11b-CD31-CD34-CD45-CD56+ cell)と脂肪前駆細胞(CD11b-CD31-CD34-CD45-PDGFR + cell)を分離する。

(3) ヒト収縮筋培養系の確立

対象: ヒト筋衛星細胞

方法: 筋衛星細胞に電気刺激を加えながら筋細胞に分化させ、*in vitro*で筋収縮能を比較する。「運動できる培養筋細胞系(マウス)」のヒト筋細胞用への改良に主眼を置いた研究を行う。具体的には適切な電流強度、周波数、パルス幅、on-off頻度の設定を行う。

ヒト筋細胞に対して電気刺激培養を行った報告はなく、至適な刺激条件の設定を検討する。

4. 研究成果

(1) 2光子顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡が不得意とする不透明標本の深部観察が可能で、生体組織の深部をブロックの状態を観察することが可能である。観察した筋サンプルを3次元

構築し、脂肪浸潤の状態や結合織の増生の状態を立体的に観察することが可能であった。

(2) FACS 装置を用いて、ヒト腱板断裂の断裂した棘上筋と断裂していない肩甲下筋からそれぞれ筋衛星細胞、脂肪前駆細胞を単離することに成功し、凍結保存を行った。

(3) 断裂群とコントロール群から FACS で筋衛星細胞を単離し培養を行った。マウスフィーダー細胞下でのヒト筋衛星細胞の培養に成功し、電気刺激培養系である「運動できる培養筋細胞系」を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Weijian, Nyasha Mazvita R., Koide Masashi, Tsuchiya Masahiro, Suzuki Naoki, Hagiwara Yoshihiro, Aoki Masashi, Kanzaki Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48316-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------