

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号： 13902
 研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2009～2012
 課題番号： 21300236
 研究課題名（和文） 運動性筋損傷後の再生に働く筋衛星細胞のバイオイメージング
 研究課題名（英文）
 BIO-IMAGING OF SATELLITE CELL IN REGENERATING MUSCLE
 研究代表者
 春日 規克（KASUGA NORIKATSU）
 愛知教育大学・教育学部・教授
 研究者番号：60152659

研究成果の概要(和文)：

筋衛星細胞(サテライトセル)は筋線維の基底膜と形質膜の間に局在する幹細胞の一種であり、骨格筋の再生や発育に重要な役割を担っている。しかし、今まで生体内の骨格筋内に局在するサテライトセルを直接可視化することは技術的に困難であった。本研究において発育や再生時の骨格筋のサテライトセルの移動を観察することができ、生体の骨格筋内のサテライトセル移動の制御メカニズムをリアルタイムで検討する上で有効な研究モデルを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：

The recruitment of satellite cells, which are located between the basement membrane and the plasma membrane in myofibers, is controlled by muscle injury or overload, several growth factor. It is poorly understood how the satellite cell migration is involved in muscle regeneration after injury because in vivo it has been technically very difficult to visualize the living satellite cells localized. In the present study, by using quantum dots conjugated with an anti-M-cadherin antibody, we first demonstrated that the satellite cell migration toward the injured site was induced in the injured muscles, and toward the end of myofibers in early developing stage muscle. Thus, it was suggested that the satellite cell migration may be play important roles to regulate the muscle regeneration and development.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野:総合領域

科研費の分科・細目:健康・スポーツ科学

キーワード:スポーツ生理学, 再生筋

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は適応性に優れた組織であり、その形態のみならず代謝特性や収縮特性などがスポーツ(筋)活動量により、ダイナミックに変化する。一方、スポーツでの激しい筋収縮は常に筋細胞自体にも傷害を発生させる。筋損傷は一般に経験する筋痛時に起きている(Asmussen E,1948)。筋損傷後の修復機構は筋の発生 (Kami K, Senba E, 2005)や筋肥大と同じプロセスを辿ると考えられている。また、修復という現象が短期間にダイナミックな変化として生体内で現れることから、筋の発育変化や可変性を観るのに適したモデルとなり得る。筋修復に主要な働きをするのが、サテライトセル(サテライトセル)である。近年では、培養実験等による in vitro の系において、筋核やサテライトセルによる筋修復期の分子生物学的制御機構に関して多くの知見が得られ(Lowe et al,1999, Hawke et al,2001)ており、それを基点とした in vivo の系においてもサテライトセルを活性化から分化に導く制御遺伝子・シグナル伝達因子が数多く確認されている。しかし、損傷部修復に働くサテライトセルの筋組織内細胞部位での移動・融合という、空間的・時間的動態に関する知見は得られていない。

2. 研究の目的

筋損傷時におこるサテライトセルの活性化と、それに続く増殖、分化から融合といった一連の過程を示す多くの所見は未だ培養実験結果に頼った予測に過ぎない。再生筋でサテライトセルの核に発現する筋形成制御因子(MyoD や myogenin 等)の観察は生体の実験で確認されている。しかし、生体で解決していないこととしては、サテライトセルがどこで活性化され、どのぐらいの増殖・分化の量を持って、また、いつ移動し筋損傷部にいかに融合し修復するか、といった動態やその制御機構である。

本申請研究では、再生筋で修復に働くサテライトセルの細胞レベルの動態を調べる事を目的とする。実験として「損傷」という原因を与え、「回復」という結果の観察からのみ再生機構を推察するのではなく、生命現象の姿をリアルタイムで直に観察することで、再生メカニズムの解明に著しく近づくことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 摘出筋によるサテライトセルの動態; 生後7週齢から10週齢のFischer344系雌ラットの長指伸筋・ヒラメ筋を被験筋とした。麻酔下にて露出し

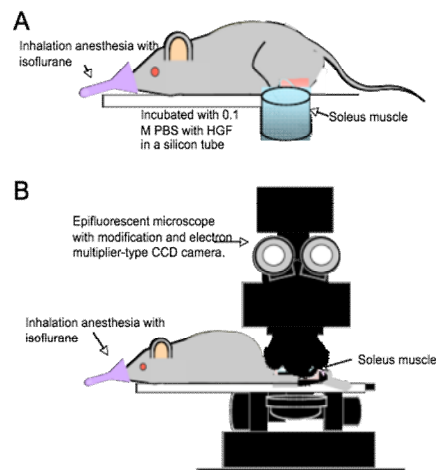


図1. In vivo イメージング: 麻酔下にて、A:Qdot-M-cadherin複合体のインキュベート、B:落射蛍光顕微鏡を用いた観察

た筋を強く圧迫することで挫滅損傷を誘発した。その後、切開部を縫合し通常飼育に戻し、1,2,3,5日後に筋を摘出した。0.2% type I collagenase / DMEMにて筋を処理(35°C, 30min)後に固定・洗浄後に、実体顕微鏡下で損傷部に触れぬよう単一筋線維を取り出しスライドガラスに添付した。次に、活性期に入ったことを知る目的でMyoD, 細胞周期に関与するKi67, p21, また筋分化のマーカーとしてmyogenin, またM-cadherinをサテライトセルのマーカーとして1次抗体により免疫化学染色を施し、顕微鏡観察に供した。染色画像

を基に筋線維の損傷端から200 μ mごとにサテライトセルと筋核の数を算出した。また、Tunel法にてサテライトセルのアポトーシスを観察した。別の摘出筋において、損傷部から100–800 μ m離れた部位から筋横断切片を作成し、蛋白新生の指標としてdevelopment-MHC一次抗体による免疫蛍光染色を行った。

(2) 生体内でのサテライトセルの移動性を量子ドット(Qdot)により測定

①運動性損傷モデルによる再生筋でのサテライトセルの動態；ラットに対し吸引麻醉下において、生体のヒラメ筋に局在する M-cadherin に M-cadherin-Qdot(蛍光波長 655)複合体が適切に結合するかを最初に調べた。ラットを吸引麻醉下においてヒラメ筋を露出させ、M-cadherin-Qdot 複合体/0.1M PBS により 3 時間の incubation を行った。その後、筋を摘出し4%PFAにて固定し、次に 0.1M PBS で洗浄後に DAPI による核染色を行い顕微鏡観察に供した。次に、ラットを吸引麻醉下においてヒラメ筋を露出させ、複合体により 3 時間の incubation を行った。次に、0.1M PBS で洗浄、DAPI による核染色を生体上で行った後に、麻醉を継続したラットヒラメ筋上のサテライトセルの動態を落射顕微鏡下でバイオイメージングすることとした(図 1)。

②成長筋のサテライトセルの動態；発生過程における形態形成ばかりでなく、生後の筋細胞の成長(伸長肥大)にともなう筋核の増加などは、骨格筋内に局在するサテライトセルの増殖に頼っている。新たな筋節が線維端に形成されながら細長く成長する筋線維において、長軸構造内の均等配置を保った筋核数の増加は、筋線維上に分布はサテライトセルの増殖・遊走(細胞運動)・分化によっていると考えられる。そこで、①同様に M-cadherin-Qdot 複合体を用い、生体筋上のサテライトセルを同定した。実験動物には生後 7,14,21,35 日齢の Fischer 系ラットを用いた。

③ 生体内でのサテライトセルの移動性を誘引するメカニズムの検討；培養実験において筋芽細胞移動を誘発する主な因子として肝細胞増殖因子(HGF)がある。そこで、本研究でも生体の骨格筋内に局在するサテライトセル移動の誘発因子として外因性 HGF を用いた。吸引麻醉下にてラットの下肢の皮膚を切開し、骨格筋を無傷のまま露出させた後、HGF を 25,50,100nmole に調整し添加したリンゲル-ロック溶液中にて下肢骨格筋を incubation した。その後、麻醉を維持し、生体内の骨格筋に局在する細胞動態を観察した。また incubation 後、ヒラメ筋を摘出し、免疫組織化学染色により MyoD/M-cadherin/DAPIによる三重染色を行い、外因性 HGF によりサテライトセルの活性化が誘発されたかを検討した。

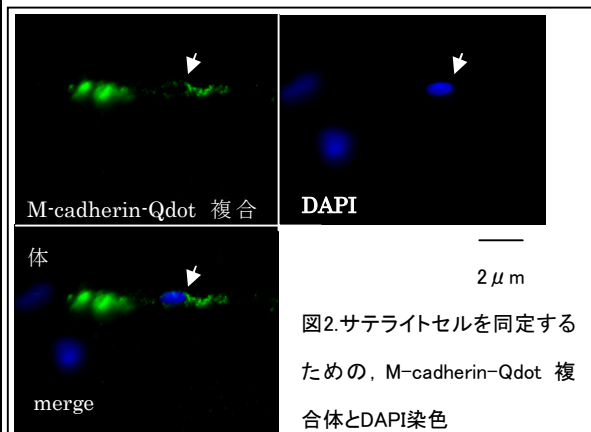


図2.サテライトセルを同定するための、M-cadherin-Qdot 複合体とDAPI染色

4. 研究成果

(1) 摘出筋によるサテライトセルの動態；損傷前にはヒラメ単一筋線維上長軸上 200 μ m 毎に 1 個以下であったサテライトセルは、損傷部付近を中心に 1 日後から増加し、損傷 3 日には総数で 5 倍以上に増加した。また、損傷部から離れた 2000 μ m 以上離れた部位でも 2-3/200(μ m) の Ki67 陽性を示すサテライトセルが観察された。また、TUNEL 染色の結果から、いずれの測定日においても、サテライトセルの壊死は観察されなかった。次に、分化期にあるサテライトセルの分

布を調べた結果、損傷部から 800-1000 μm 以上の遠位部に myogenin+サテライトセルは観察されなかった。さらに、筋横断切片により損傷 5・7 日後の切片において、損傷部から 500 μm 以内において development ミオシンの発現が見られた。以上の結果は、①筋損傷は筋線維長軸上のかなり広範囲においてサテライトセルを増殖させ、②増殖したサテライトセルの壊死は起こらず、③増殖から分化、融合と進む過程で遠位で増えたサテライトセルは損傷部へ移動の可能性があることを示すものであった。

(2) 生体内でのサテライトセルの移動性を量子ドット(Qdot)により測定

①運動性損傷モデルによる再生筋でのサテライトセルの動態; M-cadherin-Qdot 複合体で incubation を行い in vivo にて観察した結果、生体上においても Qdot が導入されることが確認され、サテライトセルの in vivo real-time

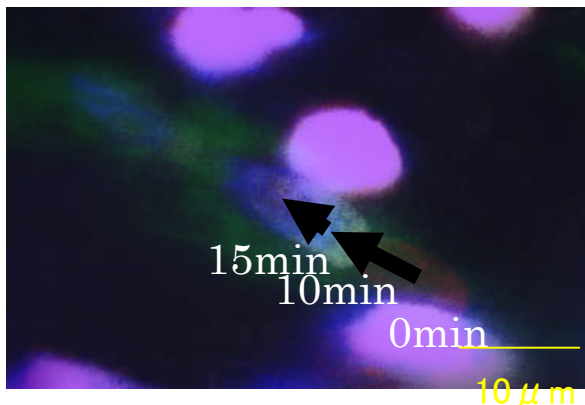


図 3. 損傷 3 日後のひらめ筋におけるサテライトセルの動態. 赤;0 分時の衛星細胞, 白; 10 分時の衛星細胞, 青; 15 分時の衛星細胞, ピンク;筋核, 緑;M-cadherin

imaging が可能となった(図 2). しかし、損傷を与えない無処置の筋では、サテライトセルの変化は見られなかった。一方、損傷 3 日後の筋に対して複合体で incubation を行い in vivo にて観察した結果、経時的に移動する、M-cadherin+ サテライトセルを確認することが

出来た(図 3). 15 分間の観察で 13 μm の移動であった(速度;14nm/sec).

②成長筋のサテライトセルの動態; 発育初期、生後 14 日齢のヒラメ筋に対して複合体で incubation を行い in vivo にて 80 分間の連続観察した結果、経時的に移動する、サテライトセルを確認することが出来た。遊走は筋線維中央側から筋節が新生される筋端方向に起きており、観察できたサテライトセルの平均移動速度は 105nm/min であった。

損傷を受けた筋線維上また成長期の筋線維上に局在するサテライトセルに対して、積極的な細胞運動を誘発する機構があり、損傷を受けた欠損部の修復や筋細胞の成長(伸長・肥大)は、骨格筋内の広範囲に局在するサテライトセルの増殖、続いて遊走(細胞運動)によって可能となる事が本結果より示された。

③生体内でのサテライトセルの移動性を誘引するメカニズムの検討; HGF を添加しない溶液で incubation された生体内の骨格筋では、サテライトセルの時空間的变化が観察されなかった。これに対し HGF を添加した(25-100nmole)溶液で処理された筋では HGF 濃度に依存性の移動速度を示す DAPI+核が見られた。さらに、HGF incubation 筋では、活性期に入ったことを示す MyoD+のサテライトセルが多数観察された。

このことから、外因性 HGF により生体の骨格筋内での細胞移動の誘発が可能である事が明らかとなった。In vitro の実験において HGF が筋サテライトセル移動を誘発する主要因子として明らかになっている。また、骨格筋内で HGF のレセプターである c-met を恒常的に発現しているのがサテライトセルだけであり、HGF 処理で活性化されていた点からも、移動している DAPI+核の細胞がサテライトセルである可能性が高い。今後は、実験方法を改善し、Qdots-Mcad 抗体によるバイオイメージング法によりサテライトセ

ルを直接同定するとともに移動を制御できる手法の開発が望まれる。

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 14 件)

- ①春日規克, 石道峰典, 幸篤武, 西沢富江筋損傷を伴う走トレーニングが骨格筋の形態的, 機能的特性に及ぼす影響, 愛知教育大学研究報告. 62 : 27-33. 2013.(査読 無)
- ②幸 篤武, 與谷謙吾, 石道峰典, 田巻弘之, 春日規克, ジャンプトレーニンング並びに持久走トレーニングによるラット下肢骨及び骨格筋の発達変化とその関連性. 日本運動生理学雑誌. 19 (2) : 65-73. 2012.(査読 有)
- ③Ishido M and Kasuga N, In Vivo Real-Time Imaging of Exogenous HGF-Triggered Cell Migration in Rat Intact Soleus Muscles, Acta Histochem. Cytochem. 45 (3) : 193-199. 2012. (査読 有)
- ④Kurosaka M, Naito H, Ogura Y, Machida S, Katamoto S Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. Acta Physiologica. 205 (1) :159-166. 2012(査読 有)
- ⑤Ishido M, Kasuga N, In situ real-time imaging of the satellite cells in rat intact and injured soleus muscles using quantaum, Histochem. Cell Biol. 135 (1) : 21-6. 2011(査読 有)
- ⑥Okamoto T, Torii S, Machida S. Differential gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase MAFbx / Atrogin-1 and MuRF1 in response to immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. J Physiol. Scie, 61(1) : 537-546. 2011(査読 有)
- ⑦幸篤武, 春日規克, 石道峰典, 鈴木英樹, 運動様式と筋損傷, 愛知教育大学研究報告, 59 : 35-41. 2010.(査読 無)
- ⑧Yuki A, Yotani K, Tamaki H, Kasuga N, Takekura H Upregulation of osteogenic factors induced by high-impact jumping suppresses adipogenesis in marrow but not adipogenic transcription factors in rat tibiae. Eur J Appl Physiol., 109 (4) : 641-50. 2010(査読 有)
- ⑨春日規克, 石道峰典, タイプ移行した筋線維の特性. 愛知教育大学研究報告, 59:35-41,2010.(査読 無)
- ⑩町田修一, 黒坂光寿, 骨格筋を分子レベルで紐解く, 体育の科学 60:575-579. 2010.(査読 無)
- ⑪Fujimoto E, Machida S, Higuchi M, Tabata I Effects of nonexhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4

expression in rat skeletal muscle. The Journal of Physiological Sciences, 60: 95-101. 2010.(査読 有)

- ⑫Ogawa K, Sanada K, Machida S, Okutsu M, Suzuki K. Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women, Mediators of Inflammation, 2010: Article ID 171023. 2010. (査読 有)
- ⑬Ogata T, Machida S, Oishi Y, Higuchi M and Muraoka I. Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. Mechanisms of Ageing and Development, 130 : 328-336. 2009.(査読 有)
- ⑭Minenori Ishido, Norikatsu Kasuga, Mitsuhiko Masuhara, The expression patterns of Pax7 in satellite cells during overload-induced rat adult skeletal muscle hypertrophy. Acta Physiologica, 195 (4) : 459-469. 2009. (査読 有)

〔学会発表〕(計 22 件)

- ①西沢富江, 鈴木英樹, 春日規克.「不活動がラット骨格筋神経筋接合部形態に及ぼす影響」(岐阜) 2012.9.15
- ②黒坂光寿, 町田修一.「高濃度 IL-6 は JAK/STAT3/ SOCS 系を介して筋サテライト細胞の増殖能を負に制御する」第 6 回日本体力医学会 (岐阜) 2012.9.15
- ③町田修一.「骨格筋のアロスタシスー筋の可塑性と老化制御ー, 第4回脳・神経・内分泌から運動の意義を考える会, (山口), 2011.9
- ④黒坂光寿, 町田修一.「インターロイキン 6 は JAK/STAT3/Cyclin D1 系を介して筋サテライト細胞の増殖能を調整する」第 66 回日本体力医学会 (山口) 2011.9.18
- ⑤西沢 富江, 幸篤武, 鈴木英樹, 春日規克. 「不活動が神経栄養因子、神経成長因子、ミオシン重鎖 mRNA 発現量および神経筋接合部形態に及ぼす影響」第 66 回日本体力医学会 (山口) 2011.9.18
- ⑥黒坂光寿, 町田修一.「インターロイキン 6 は JAK/STAT3/Cyclin D1 系を介して筋サテライト細胞の増殖能を調整する」第 66 回日本体力医学会 (山口) 2011.9.18
- ⑦町田修一.「サルコペニア発症の分子メカニズ

ムとその抑制策としての運動の有用性, 第 10 回抗加齢医学会総会, (京都), 2010.6.10

⑧ 町田修一.「サルコペニアの分子機構の解明と筋の可塑性の限界」, 第 18 回日本運動生理学会大会, (鹿児島) 2010.7.25

⑨ 町田修一.「骨格筋老化-高齢者の介護・寝たきりを防止するための基礎知識」, 第 34 回岡山スポーツ医科学研究会, (岡山), 2010.7.2

⑩ 春日規克.「発育初期のサテライトセルの動態」第 65 回日本体力医学会 (千葉) 2010.9.17

⑪ 竹倉宏明, 春日規克.「Ca²⁺チャンネル開閉に伴う骨格筋細胞内膜系の可逆的形態的」第 65 回日本体力医学会(千葉) 2010.9.18

⑫ 加藤悟, 町田修一.「筋損傷後のギプス固定が損傷部位へのマクロファージの動員に及ぼす影響」第 65 回日本体力医学会大会, (千葉) 2010.9.18

⑬ 黒坂光寿, 町田修一.「インターロイキン 6 が筋サテライト細胞の増殖能に及ぼす影響とその分子機序の解明」第 65 回日本体力医学会大会(千葉) 2010.9.17

⑭ 春日規克, 竹倉宏明, 北浦孝, 的場秀樹.「スポーツ科学における骨格筋の研究の動向と今後の展開」第 65 回日本体力医学会ワークショップ (千葉商科大学) 2010.9.18

⑮ 石道峰典, 春日規克.「骨格筋における外因性 HGF 誘発性細胞移動のバイオイメージング」, 第 66 回日本体力医学会 (山口) 2011.9.17

⑯ 幸篤武, 春日規克.「加齢に伴う骨髄脂肪細胞の分布様式並びに形態の変化」第 66 回日本体力医学会 (山口) 2011.9.17

⑰ 町田修一.「加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)に関する分子メカニズムの解明 一組織幹細胞からのアプローチ」, 日本農芸化学 2010 年度会シンポジウム, (東京), 2010.3.30

⑱ 町田修一.「加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)に関する分子メカニズムの解明 一組織幹細胞からのアプローチ」, 日本農芸化学 2010 年

度会シンポジウム, (東京,)2010.3.25

⑲ 町田修一.「老化に伴う骨格筋萎縮の分子機構の解明とその抑制策としての運動の有用性」産学官連携プロジェクト・健康医科学研究」公開シンポジウム(東京), 2009.10.7

⑳ 石道峰典, 春日規克.「The Myogenesis -骨格筋の発生・分化・再生・適応の分子機構- 生体における骨格筋肥大時のサテライトセル動態の制御メカニズムに関して」, 第 64 回日本体力医学会シンポジウム発表(新潟大会) 2009.9.18

㉑ 竹倉宏明, 春日規克.「筋疲労が異なるタイプの骨格筋細胞内膜系の形態的特徴に及ぼす影響」第 64 回日本体力医学会(新潟) 2009.9.19

㉒ 春日規克.「筋損傷回復期のサテライトセルの動態」第 64 回日本体力医学会 (新潟) 2009.9.19

[図書](計 2 件)

① 町田修一, 畑山元政, 黒坂光寿. 筋再生の分子メカニズム, 体育の科学, 61: 203-209 (2011)

② 町田修一. (分担執筆): 老化制御・運動, 新老年学第 3 版 (大内尉義・秋山弘子編集代表), 東京大学出版会, 291-296 頁(2010)

6. 研究組織

(1)研究代表者

春日 規克(KASUGA NORIKATSU)
愛知教育大学・教育学部・教授
研究者番号:60152659

(2)研究分担者

町田 修一(MACHIDA SYUICHI)
東海大学・体育学部・准教授
研究者番号:40424226

(3)研究協力者

石道 峰典(ISHIDO MINENORI)
愛知教育大学・教育学部・研究補佐員
研究者番号:未取得