

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：33912

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560288

研究課題名(和文)筋衛星細胞が筋線維へと融合するメカニズムの解明

研究課題名(英文)The model of myogenic satellite cells fusion to myoibers

研究代表者

平野 孝行(HIRANO, Takayuki)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10440661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：萎縮した筋に対して筋力トレーニングを行うと、太さの回復が促進されるとともに、筋線維核数が正常以上に増加する。この核数の増加には筋衛星細胞の筋線維への融合が関わっていると考えられているが定かでない。そこで、筋衛星細胞の存在下で最終分化した筋管細胞に電気刺激により筋収縮を誘起して機械刺激を与えるin vitroモデルを作製し、成熟した筋線維への筋衛星細胞の融合応答を調べた。その結果、一定の条件の電気刺激で誘起する筋収縮によって、筋衛星細胞が既存の筋管細胞へ融合する像を捉えることができた。本モデルは生体環境を完全に再現できている訳ではないが、筋衛星細胞が融合する現象のメカニズム解明に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The exercise training cause facilitating recovery of atrophied muscles and increases the number of myonuclei above normal levels. These increases myonuclei numbers may through fusion of myogenic satellite cells with myofibers, but it is unclear. Therefore, we developed an in vitro model that induces muscle contraction by electrical stimulation to differentiated myotube cells with myogenic satellite cells, and investigated the fusion response of myogenic satellite cells to existing myofibers. As a result, we observed that myogenic satellite cells fusing to existing myotube cells with muscle contraction inducing by the electrical stimulation. This model could contribute to further investigations of mechanisms of fusion response of myogenic satellite cells to existing myofibers.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋衛星細胞 融合 筋収縮 理学療法学

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は過負荷により肥大し、負荷の減少により萎縮するといった可塑性をもつ組織である。例えば、ラットのヒラメ筋は尾部懸垂などにより筋にかかる負荷が減少すると2週間で約半分の大さまで萎縮する。また、尾部懸垂によって筋萎縮を起こしたラットの筋に、トレッドミル走などの運動を行い負荷を与えると、大きさの回復が早まることが報告されている。このためリハビリテーション医療の場で求められる廃用性筋萎縮の早期回復のために、筋力トレーニングが行われている。しかし、筋萎縮からの回復促進を目的とした筋力トレーニング効果の機序やメカニズムについて詳細に解明されていない。

これまでに我々は、尾部懸垂による後肢筋の筋萎縮モデルマウスに対して筋力トレーニングを行うと、単に再加重するよりも筋萎縮からの回復が早く生じることを明らかにした。この時驚くことに、筋新生核が既存の筋線維に加わり、筋線維核の数が正常の1.5倍にまで増えることも判明した。この新生核は、筋衛星細胞が分化し、筋線維に融合したものと考えられており、萎縮筋に対する筋力トレーニングの回復促進効果の鍵であると考えられる。筋線維内の1つの核が転写、翻訳をする領域は限られているため、1本の筋線維の大きさとそこに含まれる筋線維核数とは正の相関があるといわれている。一般に哺乳類では、最終分化した筋線維核は分裂しないといわれており、筋線維あたりの筋線維核数が増加するためには、筋芽細胞が新たに融合する必要がある。一方で、萎縮筋からの回復に筋衛星細胞から分化した細胞の融合は不要であるとの報告もある。これらの報告は単に再加重による回復を見た研究であり、積極的な筋力トレーニングによる検証ではない。総じて、積極的な筋力トレーニング、すなわち一定量以上の機械的な負荷が萎縮筋に加わると、筋衛星細胞の筋線維への融合が引き起こされると考える。

筋力トレーニングにより起こる正常な筋の筋線維肥大のメカニズムは一部が明らかになってきている。筋線維の肥大が起こるときにも、増殖した筋衛星細胞から分化した筋芽細胞が、既存の筋線維に融合するという報告がある。一方で、筋衛星細胞をノックアウトしたマウスであっても、筋力トレーニングにより筋線維構成タンパク質の合成が促進され、筋線維の肥大が生じるとの報告もある。しかし、正常な筋の筋線維の肥大と我々の研究で明らかとなった筋線維サイズの回復とは要する期間が異なり、両者には異なるメカニズムが存在していると考えられる。実際に運動による萎縮筋の回復促進時に筋線維核数が増加するタイミングは、正常な筋の肥大時よりも早いことを確認している。

しかし、正常な筋、萎縮筋の別に関わらず

筋衛星細胞が筋線維へと融合する仕組みは解明されておらず、どのような状態の筋にどのような強度・期間の刺激を与えると、筋衛星細胞へどのような効果をもたらすか検証するに至っていない。

2. 研究の目的

機械刺激に対する筋衛星細胞の筋線維への融合応答メカニズムを明らかにする手始めとして、分子・細胞学的に解析がしやすいマウス初代培養筋管細胞株を用いた *in vitro* モデルを作製する。そして、融合時に特異的に起こる現象や発現を示す因子を検索し、メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 単離筋衛星細胞からの筋管細胞形成の確認

6週齢のC57BL/6Jマウスからヒラメ筋、長指伸筋を剖出し、0.20% collagenase type I 溶液内でインキュベートして(37°C、60分間)、筋線維を単離した。単離した筋線維は0.25% trypsin-EDTA で反応させ、さらにピペティングにより機械的に粉碎して筋衛星細胞を取り出した。この筋衛星細胞をMatrigel®コートしたディッシュ上に播種し、増殖培地で数を増やした(図1A)。

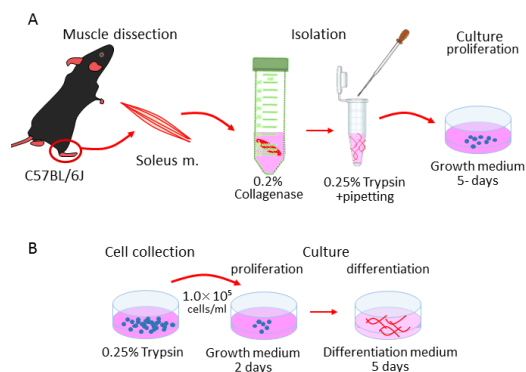


図1 筋衛星細胞の単離と分化誘導

採取した筋衛星細胞を筋管細胞まで分化誘導するまでの手順を模式図に示す。A: マウスから採取した筋を筋線維まで単離し、機械的に粉碎して筋衛星細胞を取り出した。これを5日間増殖培養した。B: 増殖培養した筋衛星細胞を回収、再播種し、筋管細胞まで分化誘導した。

増殖培地の組成は、fetal bovine serum (30%、FBS)、chick embryo extract (1.0%、CEE)、basic fibroblast growth factor (10 ng/ml、bFBS)、penicillin-streptomycin (1.0%、PS) in Dulbecco's modified eagle's medium-high glucose (DMEM) とした。5日間の増殖培養後、0.25% trypsin-EDTA で細胞を回収し、細胞数を測定した。そして1ディッシュあたり 1.0×10^5

個/ml の濃度で再播種し、再び増殖培養した。再播種から 2 日後、分化培地に切り替え分化誘導し、筋管細胞が形成されるまで培養した (図 1B)。分化培地の組成は horse serum (10%)、CEE (0.5%)、PS (1.0%) in DMEM とした。培養期間中、培地交換は 24 時間毎に行った。最終的に顕微鏡下で自発的筋収縮が生じるのを確認した。

(2) 電気刺激による定量的な筋収縮の確認

(1) で確認した筋管細胞に対して、培養液内に電気刺激を与え定量的な筋収縮を促した。電気刺激は、C-Pace EP (Ion optix、図 2A) を用いて周期的なバイフェージック電流を誘起し、炭素電極である C-dish を介して培養液中に通電した。電気刺激の条件はトリ胚胸筋由来の初代培養筋管細胞モデルに対する先行研究を参考に、10 V、30 Hz の電気刺激を、10 秒間に 1 回の頻度で 6 時間-6 時間のオンオフサイクルで与える条件とした (図 2B, C)。これらの条件の電気刺激によって、筋収縮が誘起できているかどうかを確認するために、電気刺激開始直後、24 時間後、48 時間後に顕微鏡下で観察した。また、電気刺激から 48 時間後の細胞を rhodamine phalloidin 染色して横径を測定し、この電気刺激による筋収縮によって、筋管細胞の成長が促されるかどうかを確認した。

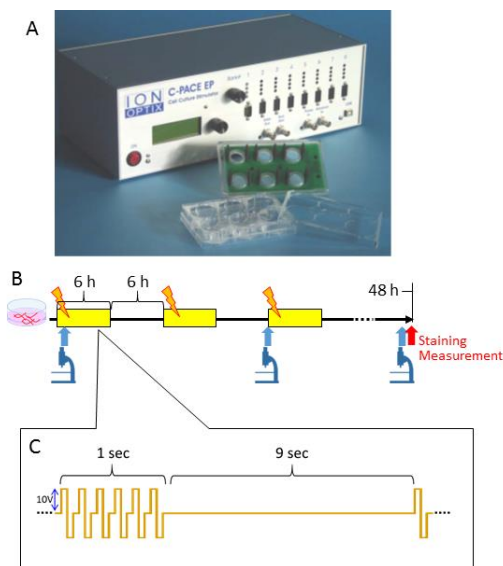


図 2 電気刺激による筋管細胞筋収縮の誘導
電気刺激による筋管細胞の筋収縮誘導のプロトコルを模式的に示す。A: 電気刺激のための刺激装置 (C-Pace EP, Ion optix) と培養細胞用電極 (C-Dish, Ion optix)。B: 培養した筋管細胞に対して 6-6 時間の周期で電気刺激を与えた。0, 24, 48 時間のタイミングで観察し、48 時間後の細胞は染色し横径を測定した。C: 電気刺激は 10V、30Hz のバイフェージック刺激で 1 回/10 秒の頻度で与えた。

(3) GFP マウスから単離した筋衛星細胞の添加

C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)1310sb マウスから、(1) と同様の方法で筋衛星細胞を取り出し、増殖培地で数を増やした。trypsin-EDTA で回収後、細胞数を測定した。この GFP マウス由来の筋衛星細胞を、(1) の方法で別に作製した WT マウス由来の筋管細胞群と同じディッシュに、 1.0×10^5 個/ml で播種し、共培養した (図 3)。この状態の筋管細胞群に (2) の方法で通電し、筋収縮による機械刺激を与えた。電気刺激開始から 3、6、12、18、24 時間後の細胞を固定、免疫組織化学染色を施し、モザイク状の筋管細胞の有無を確認することで、筋収縮による筋衛星細胞の融合の有無を確認した。

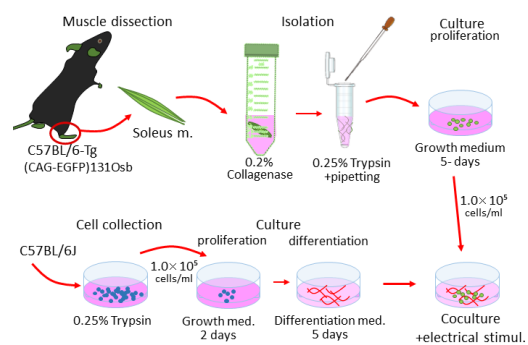


図 3 GFP-筋衛星細胞と WT-筋管細胞の共培養

グリーンマウスから採取した筋衛星細胞をワイルドタイプの筋管細胞とともに、電気刺激下で共培養するまでの手順を模式図に示す。

(4) 筋衛星細胞の融合に至適な筋収縮条件の検討

(3) の共培養下で与える電気刺激の条件を (2) と変えて加え、最も効率的に筋衛星細胞が融合する条件を検討した。具体的には周波数を 10 Hz、30 Hz、60 Hz にふった電気刺激条件や、刺激オンオフサイクルを 3-3 時間、6-6 時間、12-12 時間、48 時間連続にふった刺激条件で電気刺激を与え、細胞の状況を (3) の方法で確認した。

4. 研究成果

(1) 単離筋衛星細胞からの筋管細胞形成

単離した筋衛星細胞の増殖培養の結果、5 日間培養しても数が少なく (40% confluent 程度)、分化誘導しても十分な数、濃度の筋管細胞まで培養できなかった (図 4A)。そこで、一旦径の大きいディッシュで増殖培養した後回収し、細胞数を確保した上で再播種する方法に切り替えた。これによって、90% confluent 程度の細胞数から分化誘導し、均一な筋管細胞を得ることができた (図 4D)。

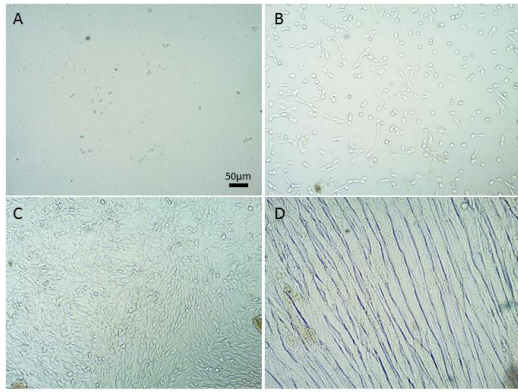


図4 筋衛星細胞の初代培養株

A:単離した筋衛星細胞を直接増殖培養した結果、十分な細胞数を得られなかった。B:一旦大型のディッシュで増殖培養後、再播種した時の位相差像。A に比べ多くの細胞が高密度で得られた。C:B の細胞を5日間増殖培養した結果、confluent に達し、一部筋芽細胞への分化が始まった。D:C から培養液を変え分化誘導して2日目の像。ほとんどのエリアで筋管細胞まで形成された。

(2) 電気刺激による定量的な筋収縮

電気刺激開始直後には、顕微鏡下にて自己収縮とは異なる筋管細胞の電気刺激に同期した筋収縮が観察できた。電気刺激開始24時間後にも同様であった。最終的に電気刺激開始48時間後まで筋管細胞は形態を維持し、筋収縮能を保った。

この細胞を染色し、横径を測定したところ、 $14.91 \pm 1.02 \mu\text{m}$ であり、電気刺激を与えずに培養した細胞の横径 ($10.13 \pm 1.13 \mu\text{m}$) に比べ、有意に高値を示した (図5C)。前述の通り、初代培養筋管細胞は電気刺激に曝されなくても自己収縮を生じる。しかし、電気刺激によって規則的、周期的な筋収縮活動を生じさせることで、より筋管細胞径の成長を促すことができることが確認できた。

(3) GFP マウスから単離した筋衛星細胞との共培養

グリーンマウスから採取した筋衛星細胞をワイルドタイプ由来の筋管細胞と電気刺激下で共培養した結果、48時間後であってもグリーンマウス由来の細胞が観察できた (図6A)。また、部分的に緑色の蛍光を発する筋管細胞も観察できた (図6B)。予めあったワイルドタイプ由来の筋管細胞にグリーンマウス由来の筋衛星細胞から分化した筋芽細胞が融合したところを捉えたと考える。ただし、筋衛星細胞、筋芽細胞、筋管細胞以外の緑色の蛍光を発する細胞も観察された (図6C)。線維芽細胞などのコンタミネーションがあったと考える。今後、グリーンマウスからの筋衛星細胞を、さらに厳密に選別し観察する必要がある。

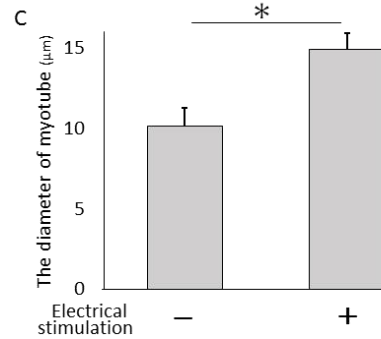
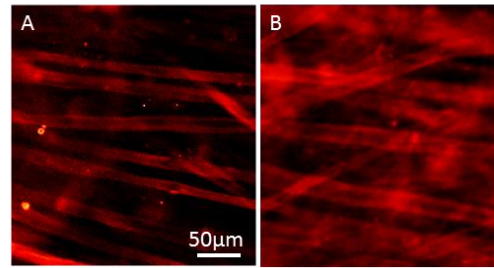


図5 電気刺激で誘導した筋収縮による筋幹細胞横径の変化

電気刺激による筋収縮を誘起した細胞(B)と電気刺激を与えなかった細胞(A)の rhodamine phalloidin 染色像を示す。これらの染色像から測定した筋幹細胞横径の平均値をCに示す。電気刺激による筋収縮を行った方が横径が有意に太かった。

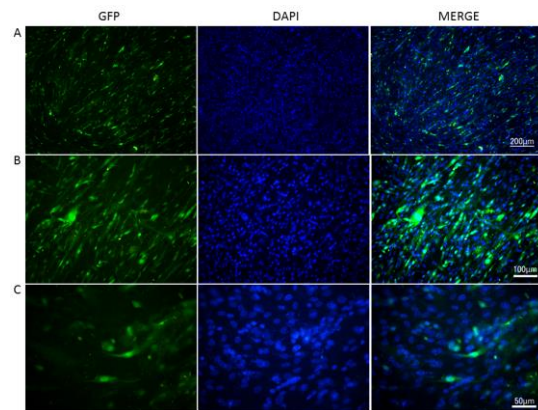


図6 電気刺激下の筋管細胞と共培養した GFP マウス由来の筋衛星細胞

グリーンマウスから採取した筋衛星細胞をワイルドタイプ由来の筋管細胞と電気刺激下で共培養したときの染色像を示す。A:グリーンマウス由来の緑色蛍光を発する細胞が観察できる。B:1本の筋管細胞の一部分にグリーンマウス由来の細胞が融合したと考えられる緑色蛍光を発する部分が観察できる。C:線維芽細胞と思われる細胞が緑色蛍光を発しており、コンタミネーションがあると考えられる。

(4) GFP マウス由来の筋衛星細胞が融合しやすい電気刺激による筋収縮条件

周波数 60 Hz の電気刺激はどの頻度においても、基質から筋管細胞が剥がれ、実験期間中維持することがかなわなかった。周波数 30 Hz の電気刺激は、3-3 時間、6-6 時間のオンオフサイクルで筋管細胞の横径が大きくなり、筋衛星細胞の融合が観察されたが、12-12 時間、48 時間連続の刺激条件では、筋管細胞の剥離が見られた。周波数 10 Hz の電気刺激は、48 時間連続の刺激条件でも筋管細胞が剥離せず維持されたが、3-3 時間のオンオフサイクルと 6-6 時間のオンオフサイクルの一部の細胞で筋管細胞の肥大が観察されず、筋衛星細胞の融合もほとんど見られなかった。結論として、当初の通り 30 Hz の電気刺激を 6-6 時間のオンオフサイクルで実施する方法が筋衛星細胞の融合を捉えやすい条件だと考える。また、長期的に連続する電気刺激下で観察する場合は、10 Hz の電気刺激が適していると考えられる。

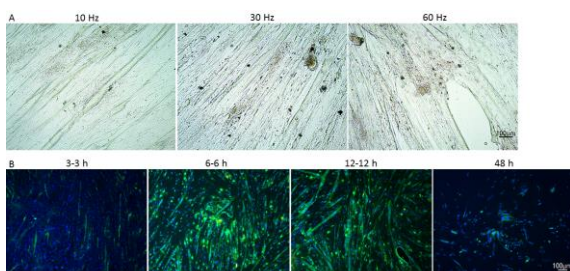


図 7 様々な電気刺激条件下での筋管細胞と筋衛星細胞の共培養

A:6-6 時間のオンオフサイクルで 10 Hz、30 Hz、60 Hz の電気刺激を与えた時の位相差像を示す。10 Hz では筋管細胞が細く、60 Hz では一部剥がれた像が観察できる。B:30 Hz の電気刺激を 3-3 時間、6-6 時間、12-12 時間、48 時間連続のオンオフサイクルで与えた時の染色像を示す。3-3 時間、48 時間連続でグリーンマウス由来の細胞が少なく、特に 48 時間連続では元々の細胞も少ない。

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 3 件)

- ① 伊東佑太・小倉峻・水谷健吾・磯野真. 筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進効果に関する研究. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇, 1-10, 5 (2), 2017. DOI:10.15012/00000923
- ② Yuta Itoh・Taro Murakami・Tomohiro Mori・Nobuhide Agata・Nahoko Kimura・Masumi Inoue-Miyazu・Kimihide Hayakawa・Takayuki Hirano・Masahiro Sokabe・Keisuke Kawakami. Training at non-damaging intensities

facilitates recovery from muscle atrophy. Muscle & Nerve, 243-253, 55 (2), 2017. DOI:10.1002/mus.25218

- ③ 伊東佑太・梶田知沙・粥川愛里・日紫喜雄斗. 筋力増強運動の効果が出現するまでの期間は萎縮筋と健常筋とで異なる. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇, 1-9, 4 (1), 2015. DOI:10.15012/00000612

[学会発表] (計 3 件)

- ① 伊東佑太・鈴木惇也・縣信秀・木村菜穂子・平野孝行・河上敬介. マウス足関節底屈筋群の遠心性収縮による筋損傷モデルの開発. 第 51 回日本理学療法学会大会 (日本理学療法士協会), 2016. 5. 27-29. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌).
- ② Yuta Itoh, Nobuhide Agata, Nahoko Kimura, Masumi Inoue-Miyazu, Takayuki Hirano, Kimihide Hayakawa, Taro Murakami, Keisuke Kawakami. The effective intensity of exercise load for facilitating recovery from muscle atrophy in mice. World Confederation for physical Therapy Congress 2015 (WCPT), 2015. 5. 2-4. Singapore (Singapore).
- ③ 伊東佑太・縣信秀・木村菜穂子・宮津真寿美・平野孝行・河上敬介. 筋損傷を引き起こす強度の運動は筋萎縮からの回復促進効果を下げる. JPTA 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・JPTF 日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会 合同学会 (JPTA, JPTF), 2014. 11. 15-16. 名古屋学院大学 (愛知・名古屋).

[その他]

名古屋学院大学 研究等業績一覧:
<http://www.ngu-kenkyu-db.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 孝行 (HIRANO Takayuki)
名古屋学院大学・リハビリテーション学部・教授
研究者番号: 10440661

(2) 研究分担者

伊東 佑太 (ITOH Yuta)
名古屋学院大学・リハビリテーション学部・講師
研究者番号: 30454383