

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750205

研究課題名(和文) 超音波刺激が筋衛星細胞，マクロファージ，筋細胞間のクロストークに与える影響

研究課題名(英文) Influence of ultrasound on cross-talk between satellite cells, muscle fiber and macrophages

研究代表者

縣 信秀 (AGATA, Nobuhide)

常葉大学・保健医療学部・講師

研究者番号：00549313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：超音波刺激は、筋損傷からの回復を促進させることが明らかになりつつある。しかし筋損傷からの回復促進の治療戦略を設計するためには、超音波刺激による筋損傷からの回復促進効果と、そのメカニズムを明らかにする必要がある。そこで本研究の目的は、超音波刺激による筋損傷からの回復促進に、各細胞間のCross-Talkがどのように関与しているのかを明らかにすることとした。本研究の結果から、マウス培養筋衛星細胞を用いて、超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖が促進することを明らかにした。また、刺激強度依存的に筋衛星細胞の増殖が促進することも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is becoming clear that ultrasound stimulation promotes recovery from muscle damage. However, to design a therapeutic strategy for promoting recovery from muscle damage, it is necessary to clarify the effect of promoting recovery from muscle damage by ultrasound stimulation and its mechanism. Therefore, the purpose of this study was to clarify how Cross-Talk between each cell is involved in promoting recovery from muscle damage by ultrasound stimulation. The result of this study revealed that ultrasound stimulation promotes muscle satellite cell proliferation using mouse cultured muscle satellite cells. It was also revealed that proliferation of muscle satellite cells promoted dependently on stimulation intensity.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋損傷 筋衛星細胞 超音波

1. 研究開始当初の背景

筋損傷を受けた理学療法対象者が、早期に ADL 能力を獲得するためには、できるだけ早く筋損傷を回復させる必要がある。治療的超音波には、皮膚潰瘍、腱損傷、骨折の治療促進効果があると報告されており、骨格筋への応用も期待されているが、詳細なメカニズムは不明である。これまでに我々は、遠心性収縮による前脛骨筋の筋損傷モデルラットを用いて、損傷 2 時間後に 10 分間の超音波刺激を 1 度だけ行うと組織学的、機能的に筋損傷からの回復を促進することを明らかにしている。一方、近年の研究から炎症性細胞、筋衛星細胞と筋細胞の間での複雑な Cross-Talk によって筋再生が生じていることが明らかになってきている。筋損傷の初期において、好中球やマクロファージによる貪食作用は周知のことであるが、一部のマクロファージは、筋前駆細胞の供給や筋衛星細胞の活性化に寄与するケモカインやサイトカインを分泌する炎症性マクロファージへ分化する。一方、筋前駆細胞、筋衛星細胞、筋細胞は抗炎症性マクロファージへ分化させるメディエーターを分泌する。以上のように筋損傷からの回復過程において、各種の細胞がそれぞれ相補的に働いている。よって、超音波刺激による筋損傷からの回復促進の治療戦略を設計するためには、超音波刺激が炎症性細胞、筋衛星細胞、筋細胞の間での Cross-Talk に与える影響を明らかにする必要がある。しかし、このような細胞の反応を明らかにするためには、動物モデルでは限界がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、筋衛星細胞、マクロファージ、筋管細胞の単一培養、それぞれの細胞の共培養モデルを用いて、超音波刺激による細胞応答の詳細を明らかにし、超音波刺激による筋損傷からの回復促進に、各細胞間の Cross-Talk がどのように関与しているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 筋衛星細胞の単一培養を用いて、超音波刺激による細胞応答を解析する。

筋衛星細胞の培養方法

麻酔下にてマウス長趾伸筋を採取した。採取した筋を Collagenase 溶液にいれ、37 で 1.5 時間インキュベートした。その後、余分な Collagenase 溶液を捨て、長趾伸筋を DMEM 溶液が入ったシャーレに移し、パスツール管を使用して筋線維をほぐした。これを数回繰り返し、単一筋線維のみを採取する。回収した単一筋線維をトリプシン処理することで筋衛星細胞を剥離し、ディッシュに播種した。

4 日間増殖培地 (30% FBS、1% CEE、10ng/ml bFGF、1% PS) で増殖させた後、growth factor を除いたコンディション培地 (20% FBS、1% CEE、1% PS) に交換し、その 2 時間後に 10

分間の超音波刺激を行った。

超音波刺激の方法

超音波治療器 (UST-750、伊藤超短波) を用いて、S プローブ (直径 1.8cm) の上にゲルを塗布し、筋衛星細胞を培養したディッシュを乗せて固定した。筋衛星細胞の増殖に効果的な超音波の条件を探索するために、刺激強度、周波数、duty cycle の条件をいくつか試した。刺激強度: 0.1、0.5、1.0 w/cm²、周波数: 1、3 MHz、duty cycle: 10%、20%、50% とした。また、刺激時間は 10 分間とした。

細胞応答の解析

増殖マーカーである EdU (10 μM) を超音波刺激前に投与した。投与 4 時間後に細胞を 4% PFA で固定した。EdU 抗体を用いて増殖した細胞を染色し、Hoechst33342 を用いてすべての細胞核を染色した。染色画像を PC に取り込み、500 μm 四方に存在する EdU 陽性細胞数と Hoechst33342 陽性細胞数を測定した。Hoechst33342 陽性細胞数に対する EdU 陽性細胞数を算出し、増殖率とした。

(2) マクロファージの単一培養を用いて、超音波刺激による細胞応答を解析する。

マクロファージの培養方法

麻酔下でマウス腹腔内に 5ml の PBS を注入し、腹部をマッサージし、PBS を回収する。回収した細胞懸濁液を遠心し、ペレットをディッシュに播種した。

細胞の解析

マクロファージを同定するために、CD11b、F4/80、CD68、CD163、CD206 抗体を用いて染色を行った。

4. 研究成果

まず、筋衛星細胞の増殖に対する超音波刺激の効果を確認した。3MHz、0.5W/cm²、50% duty cycle で 10 分間の超音波刺激を加えた群 (US 群)、超音波を加えない群を nonUS 群とした。また、マウスから採取した長趾伸筋をコンディション培地中に浮遊させた状態で超音波刺激を 10 分間加え、その培地を筋衛星細胞に添加した群 (Med 群)、筋衛星細胞を培養したディッシュに超音波刺激を加えたメEDIUM を添加した群 (SateMed 群) を作成した。超音波刺激を加えた US 群の核数に対する EdU 陽性細胞数は 37.5%、超音波を加えなかった nonUS 群では 28.9% で、超音波刺激を実施すると有意に EdU 陽性細胞が増加した ($p < 0.05$)。また、筋組織に超音波刺激を行った培地を、筋衛星細胞に添加した Med 群の EdU 陽性細胞数の割合は、41.5% で nonUS 群に比べ有意に増加した。さらに、筋衛星細胞に超音波刺激を行った培地を、筋衛星細胞に添加した sateMed 群の EdU 陽性細胞数の割合は、34.0% で nonUS 群に比べ有意に

増加した。この結果から、超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖が促進されることがわかった。また、その増殖促進効果は、筋組織や筋衛星細胞から分泌される液性因子の影響が考えられた。

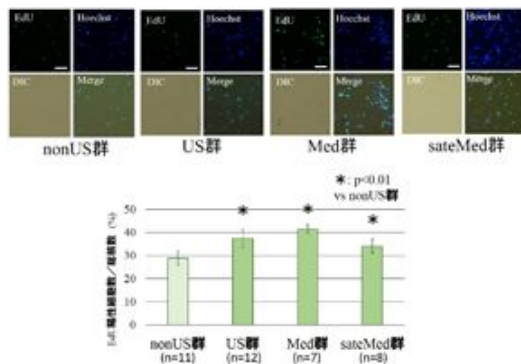


図 1. 筋衛星細胞の増殖に対する超音波刺激の効果

次に、筋衛星細胞の増殖に効果的な超音波刺激の条件を探索するために、周波数の違いによる効果を確認した。筋衛星細胞に 1MHz で超音波刺激を行う群 (1MUS 群)、3MHz で行う群 (3MUS 群) を作成した。周波数以外の条件は、刺激強度 0.5W/cm²、50% duty cycle、刺激時間 10 分間とした。1MUS 群の EdU 陽性細胞数の割合は、33.2% で nonUS 群の 29.1% と差がなかった。一方、3MUS 群は 38.5% で nonUS 群に比べ有意に増加していた。この結果から、3MHz の周波数の方が筋衛星細胞の増殖に効果的であることがわかった。

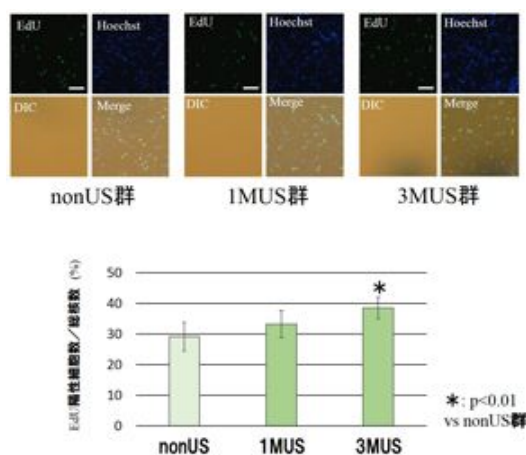


図 2. 超音波刺激の周波数の違いによる筋衛星細胞の増殖効果の検討

さらに、筋衛星細胞の増殖に効果的な超音波刺激の条件を探索するために、刺激強度の違いによる効果を確認した。筋衛星細胞に対して刺激に強度が 0.1 W/cm²、0.5 W/cm²、1.0 W/cm² で超音波刺激を行う群を作成した。刺激強度以外の条件は、周波数 3MHz、20% duty cycle、刺激時間 10 分間とした。EdU 陽性細胞数の割合は、0.1 W/cm² では 26.5%、0.5

W/cm² では 28.2%、1.0 W/cm² では 29.0% と刺激強度依存的に増加する傾向がみられた。また、1.0 W/cm² は、nonUS 群の 22.3% に比べ有意に大きかった。この結果から、刺激強度が大きい方が筋衛星細胞の増殖に効果的であることがわかった。

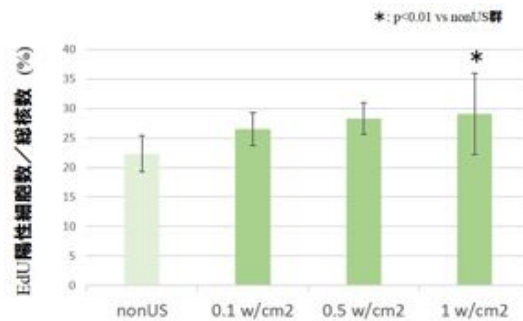


図 3. 超音波刺激の刺激強度の違いによる筋衛星細胞の増殖効果の検討

さらに、筋衛星細胞の増殖に効果的な超音波刺激の条件を探索するために、duty cycle の違いによる効果を確認した。その結果、duty cycle 依存的に筋衛星細胞の増殖が促進されることが示唆されたが、duty cycle が高いと細胞が剥離し、正確な比較が行えなかった。

マウスの腹腔マクロファージの初代培養を試みた。回収した細胞をマクロファージの抗体を用いて染色したところ、CD68 陽性であったことから、マクロファージを培養できることがわかった。超音波刺激によるマクロファージの細胞応答までは確認できていない。

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 2 件)

Itoh Y, Murakami T, Mori T, Agata N, Kimura N, Inoue-Miyazu M, Hyakawa K, Hirano T, Sokabe M, Kawakami K. Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy. *Muscle and Nerve*. 55(2), pp243-253, 2017. 査読有

Mori T, Agata N, Itoh Y, Miyazu-Inoue M, Sokabe M, Taguchi T, Kawakami K. Stretch speed-dependent myofiber damage and functional deficits in rat skeletal muscle induced by lengthening contraction. *Physiol Rep*. 2, e12213, 2014. DOI:10.14814/phy2.12213. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

縣 信秀、宮津 真寿美、河上 敬介、

超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖は促進される、第 51 回日本理学療法学会、2016 年 5 月 28 日、札幌

縣 信秀、外村 和也、森下 紗帆、熊田 竜郎、梅村 和夫、筒井 祥博、光増感 (PIT) 法による中大脳動脈血栓モデルラットにおける運動機能回復と神経新生、第 121 回日本解剖学会全国学会、2016 年 3 月 30 日、郡山

柴田 篤志、森 友洋、縣 信秀、宮本靖義、宮津 真寿美、河上 敬介、筋損傷からの回復を促進させる超音波刺激は MyoD, Myogenin 量を亢進させる、第 50 回日本理学療法学会、2015 年 6 月 6 日、東京

柴田 篤志、森 友洋、縣 信秀、宮本靖義、宮津 真寿美、河上 敬介、筋損傷後の超音波刺激は筋衛星細胞の活性と損傷からの回復を促進させる、第 1 回日本基礎理学療法学会、2014 年 11 月 15 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

縣 信秀 (AGATA, Nobuhide)
常葉大学・保健医療学部・講師
研究者番号：00549313