

生体における筋損傷後の筋衛星細胞の動態観察

宇土 泰希

In vivo observations of muscle satellite cells migration after muscle injury

Taiki UTO

1. 背景

近年「iPS細胞」を始めとした再生医療分野に大きな期待が寄せられている。しかし、必ずしもそれらに頼らなくとも、私たちの身体には壊れた組織を再生する能力がもともと備わっている。例えば、大量のエネルギーを使い、ダイナミックな動きをする骨格筋は、損傷が発生しやすい。この骨格筋の再生過程では「筋衛星細胞」が中心的な役割を果たすことが知られている。筋衛星細胞とは、筋線維の基底膜と形質膜の間に散見される単核の細胞で、未分化な骨格筋細胞である。普段は休止状態にあるが、トレーニングや損傷などにより生じた各種ストレスに応じて活性化し、増殖・分化を経て新たな筋線維を形成したり、すでに存在する筋線維に融合したりすると考えられている¹⁾。

しかし、筋衛星細胞がその役割を果たすためには、新たな筋核が求められている部位までの移動が不可欠である。筋衛星細胞の遊走性については、細胞を対象としたin vitroでの研究はされているものの、個体を対象としたin vivoでの研究、すなわち生きた身体の中で筋衛星細胞がどのように動くのかは明らかにされていない。

そこで本研究室では筋衛星細胞の生体内での動態に注目した研究を行っている。そして筋衛星細胞を生体内でリアルタイムイメージングすることに成功した²⁾。しかし、この実験で用いられた方法では、観察前に生体内で免疫染色を行うことで筋衛星細胞を識別していたため、大きく二つの問題を抱えていた。一つ目は生体の浄化作用によって染色性が下がってしまうため特別な試薬が必要となること。二つ目は観察開始まで時間がかかるためラットへの負担が考えられること。遊走という現象を捉えるためには有効な方法である反面、

実験回数を重ねて遊走の実態を定量化するには不向きであった。

2. 目的

そこで本研究では、より簡易でより広範囲、より長時間にわたる観察が可能な方法を検討するとともに、骨格筋が損傷より回復する際の筋衛星細胞の動態を生体上でイメージングすることによって定量化し、骨格筋の再生のしくみを解明する一翼を担うことを目的とした。

3. 方法

実験には6週齢以降のFischer344系雌性ラットを用い、被験筋はヒラメ筋(SOL)とした。通常、休止期にある筋衛星細胞を活性化させるために、挫滅損傷処置を行った。挫滅損傷は、完全麻酔下にてアキレス腱上付近を1.5cm程度切開してSOLを露出させ、0.5mm幅のピンセット先端にて強く圧迫することで惹起した。その後速やかに切開部を縫合し、保護して通常飼育へと戻した。

左脚SOLは外科的手法を用いて挫滅損傷処置を行う損傷群(D群)とし、右脚SOLは筋損傷を伴わない疑似手術を行う非損傷群(ND群)とした。また対照群(C群)として未処置のSOLに対しても観察を行った。

観察は処置後1~7日の間に行った。完全麻酔下の血流維持状態のままSOLを再度露出させて実験台に固定し、DNAと特異的に結合するDAPI蛍光色素を滴下することで核染色を行った。その後実験台とラットを落射蛍光顕微鏡にセットし、被験筋表面の細胞核の動態をイメージングした(図1)。観察終了後は速やかにラットを実験台から解放し、致死量の麻酔によって屠殺した。

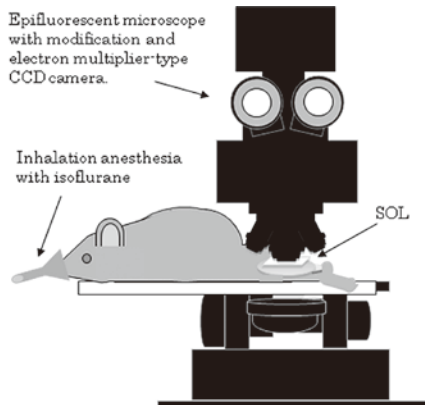


図1 生体観察模式図

摘出したSOLに対しては免疫抗体染色を行った。通常、染色は対象物を切片化して行うが、本実験では筋の形態を保つ必要があるため、摘出した筋を丸ごと染色することを試みた。筋衛星細胞マーカーには筋衛星細胞特有の接着タンパク質であるM-cadherinを用いた。

染色完了後、落射蛍光顕微鏡によって得られた蛍光染色像を用い、生体観察において遊走が確認された核が筋衛星細胞のものであるか否かを判断した。また、画像分析によって核密度や遊走核数、遊走速度を数値化し、統計処理を行った。本実験における有意水準は5%とした。

4. 結果及び考察

生体観察は、損傷部周辺の筋衛星細胞が損傷部へと遊走するという仮説のもと、損傷部から筋中央部にかけて観察を行った。その結果、C群では見られなかった遊走する核を、ND群では一例のみ、D群においては全観察日で多数確認した。

摘出後の筋衛星細胞の同定では、生体観察後に筋を摘出し、さらに蛍光抗体染色の工程を経ている、特徴的な核の配置や付着した塵等から、生体観察時に遊走性の認められた核を再度見つけ出すことが可能であることが分かった。

また、摘出筋を切片化せずに丸ごと免疫抗体染色することによって、筋表層部のM-cadherinを染めることにも成功した(図2)。これにより、生体観察で遊走の確認された核が筋衛星細胞のものであるか否かを摘出後に判別できることが明らかになった。

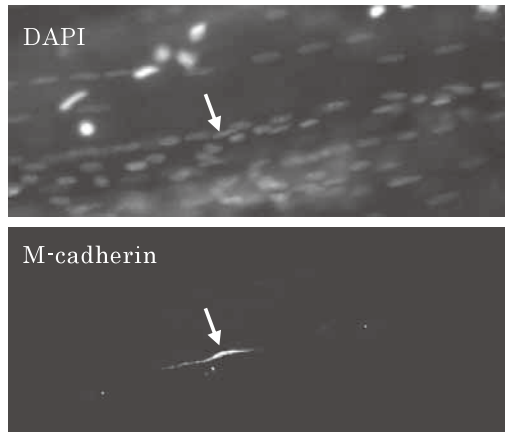


図2 免疫抗体染色による筋衛星細胞染色像

核密度の変化は挫滅損傷の影響を明確に表していた。ND群においてはC群との間に有意差が見られたのは2日後のみだったのに対し、D群においては1、2、3、4、5、7日後でC群より有意に高い値であった。特に損傷部においてその変化は激しく、1日目に大きく増加した核密度は2日目に大きく低下し、3日目以降で再び高い値を示した。これは損傷部において炎症反応が起り、体液や血漿タンパク、マクロファージなどの細胞の浸潤が発生して核密度が上昇し、続いて形態的損傷の進行により筋タンパクが筋外流出することによって核密度が低下、その後再生過程が進行して核密度が再び高まったものと考えられる。損傷部ではこれらの筋衛星細胞以外の細胞の遊走も考えられるため、分析対象から除外した。それに対し、損傷部から6mm 膝関節側へ離れた部位では1・2日目を除くとControlと同水準であり、損傷の影響が少ないものと考えられた。

遊走核数については、まず損傷部より2mm 膝関節側の部位にて1・2日目に活発に見られた(図3)。その後2mmの部位では遊走が沈静化するが、代わりに4mmの部位で3日目に遊走数の増加が見られた。

遊走速度においても遊走核数と似た推移が見られた。まず2mmの部位で1日目に遊走速度が高まり、その後3日目に4mmの部位の遊走速度が高い値を示した。

さらに遊走の方向別に見てみると、全ての日に於いて損傷部方向へと遊走する核が観察された遊

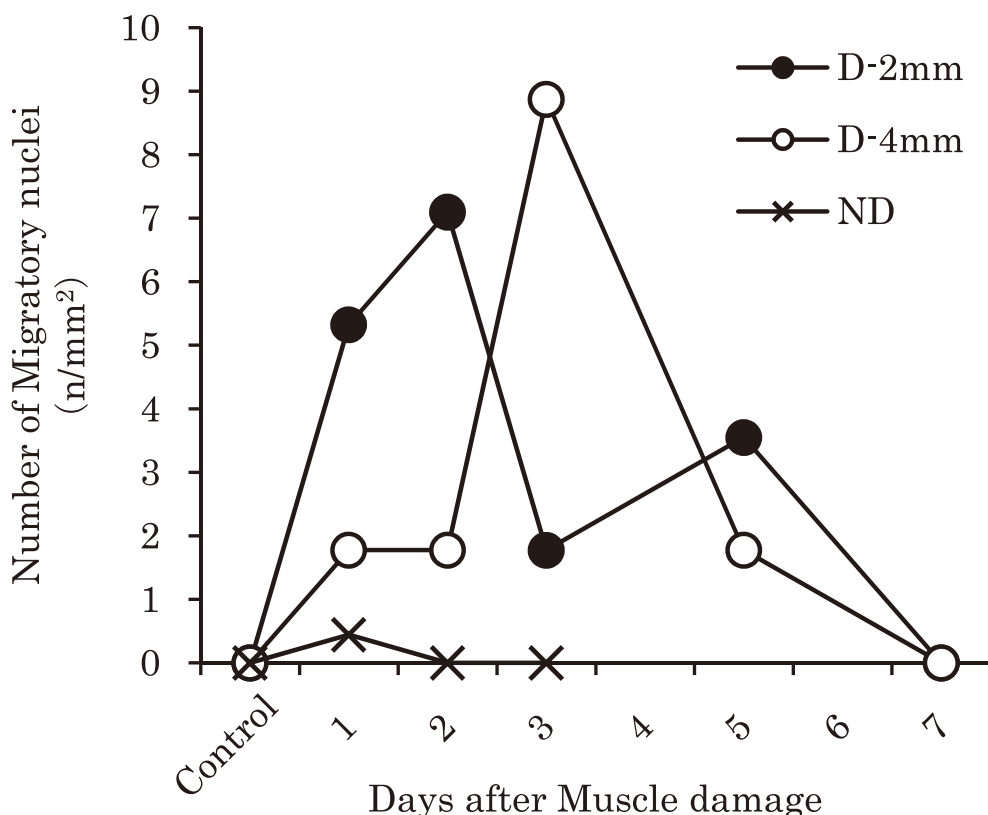


図3 D群とND群の観察部位別遊走核数

走核数の30～50%を占め、10～30%であった逆方向への遊走よりも多く見られた。この傾向は損傷部に近いほど強くなった。

これらのことから、損傷後の3日間を中心に損傷部から離れた箇所でも損傷部方向へと進む遊走性が高まり、その傾向は損傷部に近いほど強まることが明らかとなった。

林³⁾の報告によると損傷部においては損傷1日後2日後に炎症反応が進行して3日後に最大に達し、筋衛星細胞の活性は2日後から見られ、3日後に筋分化制御因子の発現数が最大となるとしている。今回の実験結果から、損傷部から離れた部位においては損傷直後から筋の再生に向けた動きが始まっていることが示唆された。

5. 結論

本実験により、損傷回復期に損傷部から離れた正常部において活発な遊走能を示す核を生体上の筋表層部で捉えることができた。また、摘出後の

筋全体に対する免疫抗体染色によって筋衛星細胞の同定することが可能であった。損傷部から離れた部位での核の遊走は損傷直後3日間に活発に見られ、損傷部に近いほど損傷部方向への遊走性が強まることが明らかとなった。

6. 参考文献

- 1) Hawke, T. J. and Garry, D. J. : Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 91: 534-551, 2001
- 2) Ishido, M. and Kasuga, N. : In situ real-time imaging of the satellite cells in rat intact and injured soleus muscles using quantum dots. *Histochem. Cell Biol.* 135: 21-26, 2011
- 3) 林亜矢 : 損傷後の回復過程における筋衛星細胞の活性と変化 : 愛知教育大学卒業論文, 2008

(指導教員 春日 規克)