

〔原著〕

最終分化した筋細胞への筋衛星細胞の取り込みモデル

伊 東 佑 太¹, 伊 藤 晃 慎², 二之宮 宏 人³, 丹 羽 弘 貴⁴
名 和 礼 乃⁵, 原 田 志 保⁶, 富士井 里 紗⁷

要 旨

適切な負荷量で筋収縮を行うと筋肥大が生じる。しかし、筋収縮の何か引き金となり、どの細胞内シグナルを経て筋肥大に至るのか解明されていない。一方で、筋肥大や筋萎縮からの回復促進時に筋線維核数が大幅に増加することが知られている。この核数増加には既存の筋線維への筋衛星細胞の取り込みが関与すると考えられるが、成熟後の筋線維において筋衛星細胞が取り込まれるか否かは様々な報告により見解が分かれている。そこで本研究は、初代培養筋管細胞の筋収縮活動モデルを確立し、そのモデルにGreen Fluorescent Protein (GFP) 標識した筋衛星細胞を添加・共培養することで、筋管成熟後の筋衛星細胞取り込みを観察した。その結果、筋収縮を行うとGFP陽性の筋管細胞が多く観察され、刺激下の培養筋管細胞で筋衛星細胞の取り込みが再現できた。このモデルを用いれば、今後筋衛星細胞の取り込みのメカニズムの一端が解明できる。

キーワード：筋衛星細胞, 取り込み, 筋線維核数, 筋肥大

筋細胞は生体内の他の組織と比較し断続的に機能変化を起こすことで、可塑性に富むといわれている。具体的にはトレーニングなどによる活動量の増大は筋肥大を引き起こし、逆に不活動などによる筋活動量の低下は骨格筋に廃用性筋萎縮などの退行性変化をもたらす [13,

20, 21]。この筋細胞の可塑性には、1つの筋細胞に含まれる筋線維核の数が関係していると考えられている。すなわち筋細胞は多数の核を含む多核細胞であるが、この筋線維核1つの遺伝子情報によって支配・調節される細胞質の領域は一定であるため、筋線維核数と筋細胞のサ

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 聖隷福祉事業団 トライサポート和合

3 コジマ会 介護老人保健施設丸の内

4 としわ会 北区複合型介護施設

5 名古屋整形外科・人工関節クリニック

6 並木会 並木病院

7 桂名会 木村病院

Correspondence to: Yuta ITOH

E-mail: yuta.i@ngu.ac.jp

Received 19 November, 2019

Revised 23 December, 2019

Accepted 6 January, 2020

イズには比例関係があるといわれる [17]。つまり、筋細胞のサイズが増大するには、筋線維核数の増加が必要であると考えられる。

成熟した筋細胞において筋線維核はそれ以上分裂しないとされる [19]。従って、成熟した筋細胞の筋線維核数が増加するためには細胞外から取り込まれる必要がある。この役割を筋衛星細胞が担っていると考えられている。実際にラットヒラメ筋は共同筋切除による過負荷状態によって筋線維のサイズが増大するときには、筋衛星細胞が既存筋線維へ取り込まれ、筋線維核が増加すると報告されている [18]。一方で、この筋衛星細胞の分化・融合能を抑制し、筋線維核数の増加がなくても、筋線維サイズの肥大が生じるという報告 [9] もあり、意見が分かれる。リハビリテーションの対象に多い萎縮した筋細胞の回復においては、筋線維核数の増加は起こらず、筋構成タンパク量の変化のみが主に働くという考え方が主流である。実際に、ラット足関節底屈筋群の筋衛星細胞の増殖・融合を抑制した状態でも、筋線維サイズの筋萎縮からの回復が生じると報告されている [2]。一方、尾部懸垂により筋萎縮を誘導した後、再荷重に加えて積極的な運動刺激を与えると、筋線維サイズの回復が促進するとともに、筋線維核数が大幅に増加するという報告 [5] もある。すなわち、自然回復とは異なる筋線維サイズの早急な回復、変化が起こる環境下では、筋衛星細胞の取り込みによる筋線維核数の増加が鍵となっていると考えられる。しかし、その取り込み現象の決定的な証拠はなく、筋細胞へ筋衛星細胞が取り込まれるメカニズムや関与する因子は不明である。

このような筋衛星細胞取り込みのメカニズムが解明されていない理由の一つとして、分子・細胞レベルで詳細に検討できる *in vitro* モデル

が少なく、筋収縮による筋細胞サイズが増大時に起こる筋衛星細胞の取り込み現象を再現したモデルがないことがあげられる。例えば、培養心筋細胞に対して電気刺激を与えるモデルがあるが [8]、自己収縮能がある心筋細胞に対してペースング作用を見たモデルであり、骨格筋細胞のモデルとは異なる。同様に電気刺激によって筋収縮を起こす *in vitro* モデルでは、トリ胚胸筋由来の初代培養筋管細胞モデルがあるが [1]、鳥類の細胞であり、ヒトをはじめとする哺乳類の筋とは性質的に異なる部分がある。また、マウス骨格筋由来の細胞株である C2C12 に電気刺激や伸張刺激を与えるようなモデルも散見されるが [15]、C2C12 は腫瘍性細胞であり、正常な細胞の状況を反映しているとは言い難い。以上のように少なくとも我々が調べた限り、正常な哺乳類由来の細胞を用いて作製した筋収縮誘発モデルは見当たらない。

そこで本研究はこれらを解明する第1段階として、第1に健康な近交系マウスから単離した筋衛星細胞を筋管細胞まで初代培養し、電気刺激によって筋収縮を起こさせる *in vitro* モデルを確立すること、第2に確立したモデルを用いて筋収縮による筋細胞サイズが増大時に、筋衛星細胞の取り込みが生じるかどうかを確認し、その現象を観察可能な状態で再現することを目的とした。

材料と方法

1) 筋収縮による筋肥大モデルの確立

マウスヒラメ筋から筋衛星細胞を単離し、筋管細胞まで初代培養した後、電気刺激による筋収縮を惹起させ、筋肥大が起こるかどうかを評価した (Fig. 1)。本実験は名古屋学院大学動物実験委員会に諮り、承認を得た後に行った (承

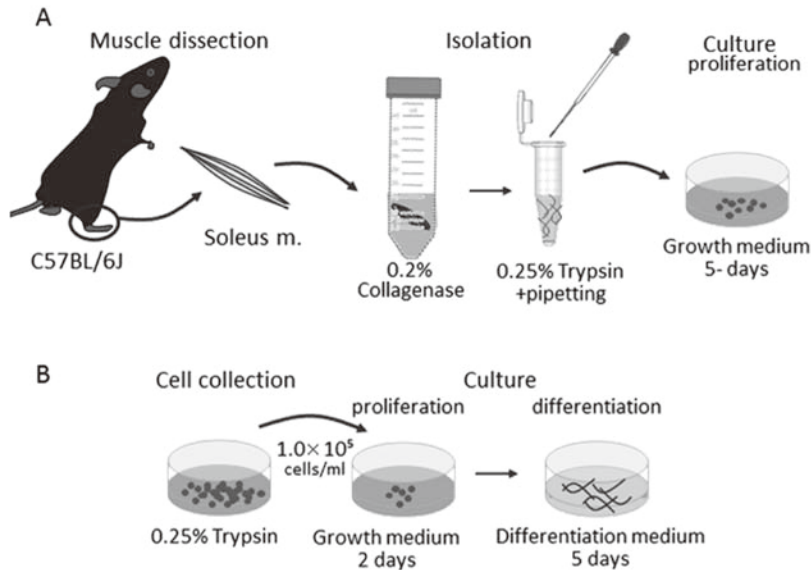


Fig. 1 筋衛星細胞の単離と分化誘導

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消化し筋線維に分離し，機械的に粉碎して筋衛星細胞を単離した。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。

認番号：2014-001)。

筋衛星細胞の単離と初代培養

6週齢のC57BL/6Jマウス(日本クレア)のヒラメ筋から単離した筋衛星細胞を使用した。マウスは筋を採取するまで、25℃に設定した室内で飼育し、餌と水は自由に与えた。マウスの両側後肢からヒラメ筋を腱一腱で採取した。筋衛星細胞を単離するために、採取したヒラメ筋を0.20% collagenase type I (Worthington Biochemical) in Dulbecco's modified eagle's medium-high glucose (DMEM, Life Tec.) に入れ、筋束をほぐすため37℃で100分間消化した。その後、1.0% penicillin-streptomycin (PS, Wako) in DMEMを入れた深皿ディッシュ (Thermo Fisher, 5.0% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in phosphate buffered

saline (PBS, T9182, Takara Bio) でコート) 内に移して洗浄し、さらにBSAコートしたガラスピペットでピペッティングすることにより機械的に筋束を分解して筋線維を単離した。単離した筋線維の浮遊液はBSAコートしたマイクロチューブに移し、同量(約200 μl)のtrypsin-EDTA (0.25%, Life Tec.) を入れ、インキュベート後(37℃, 10分間)、再度ピペッティングにより、筋衛星細胞を単離した。

単離した筋衛星細胞は、Matrigel® (Corning) コートした35 mmディッシュ (SPL Life Science) に播種し、5日間growth medium (GM) で増殖培養した(37℃, 5.0% CO₂)。GMの組成は、fetal bovine serum (30%, Sigma-Aldrich), chick embryo extract (1.0%, CEE, USBio), basic fibroblast growth factor (10 ng/ml, Wako), Penicillin-Streptomycin solution

(1.0%, PS, Wako) in DMEMとした。5日間の増殖培養後、trypsin-EDTA (0.25%) で細胞を回収し、Scepter2.0 Cell Counter (Merck, 40 μm フィルター使用) を用いて細胞数を測定した。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。再播種はディッシュ内でMatrigel[®] コートしたカバーガラス上に置いたシリコンリング (3.0 mm厚, 直径10 mm穴)内に行った。再播種から2日後、differentiation medium (DM) に培養液を切り替え分化誘導した。DMの組成はhorse serum (10%, Sigma-Aldrich), CEE (0.50%), PS (1.0%) in DMEMとした。培養期間中、GMおよびDMの交換は24時間毎に行った。

電気刺激による筋収縮誘起

DMに交換してから2日後の筋管細胞に対して電気刺激を与え、筋収縮を誘発した (MC群) (Fig. 2)。なお、予備的実験でDMによる分化誘導をして2日目には、筋衛星細胞が筋管細胞の形態まで分化し、部分的に自己収縮が観察できるまで成熟することを確認している。本研究は、この時期の筋管細胞を対象として用いた。

電気刺激は、C-PACE EP (Ion Optix) と35 mmディッシュ用の電極 (C-Dish, Ion Optix) を用いて行った。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 [15] に用いられた条件を参考にし、10 V, 60 Hzの電気刺激を、10秒間に1回の頻度で48時間連続的に与えた (電気刺激条件①)。また高周波数の電気刺激により細胞接着が破壊され、細胞が剥がれる可能性を考慮し、上記の条件よりも弱い10 V, 30 Hzの電気刺激を10秒間に1回の頻度で、48時間連続的に与える細胞群も作製した (電気刺激条件②)。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時間後に位相差顕微鏡 (DM IL LED, Leica) 下で観察した。なお、電気刺激によって筋収縮を誘発しない細胞群 (nMC群) も作製し比較することで、筋管細胞の自己収縮か、電気刺激による制御された筋収縮かを確認した。

筋収縮効果の評価—染色および筋管細胞横径の測定

48時間の電気刺激終了後、MC群、nMC群の筋管細胞を染色し、その横径を計測した。rhodamine phalloidinを用いて筋管細胞を構成するアクチンを標識し、筋管細胞の大きさの指標とした。具体的にはまず、4.0% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) in PBSにて10分間固定処理した。PBSで洗浄後 (3分, 3回), 3.0% BSA in PBSで、37°C, 45分間ブロッキング処理した。ブロッキング後、PBSで洗浄し (3分間, 3回), rhodamine phalloidin (1: 500, Molecular Probes) in PBSで、遮光しながら37°Cで60分間反応させた。PBSで洗浄後 (3分間, 3回), 90% glycerol (Kanto) in distilled water (DW) で封入し、観察に用いた。染色したサンプルは蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) 下で撮影し、画像分析ソフト (ImageJ) により、筋管細胞の横径を計測した。1視野で観察し得るすべての筋管細胞の横径を計測し、その内中央値10本の筋管細胞を比較データに用いた。各群合計7視野ずつ測定し平均値を算出した。群間の比較にはStudent's t検定を用い、有意水準は5.0%未満とした。

2) 筋衛星細胞の取り込み現象の再現

1) の筋収縮による筋管細胞サイズの増大に伴って筋衛星細胞が取り込まれるかどうかを可視化するため、電気刺激による筋収縮期間

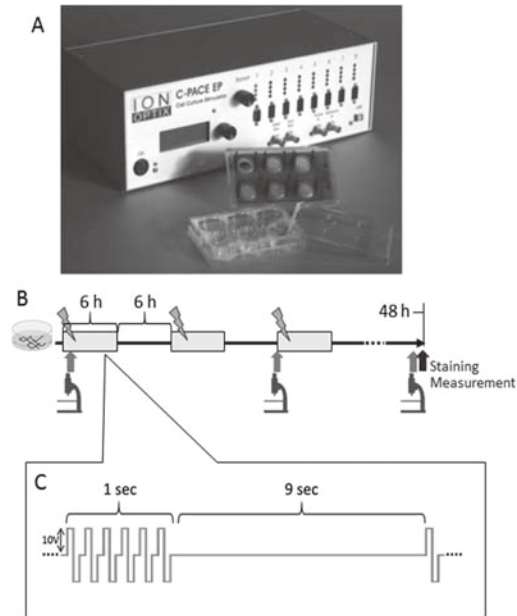


Fig. 2 電気刺激による筋収縮の惹起

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。刺激後0, 24, 48時間の時点で観察し、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, 30もしくは60 Hzのバイフェージック刺激で1回/10秒の頻度で与えた。

に Green Fluorescent Protein (GFP) 標識された筋衛星細胞を共培養し (Fig. 3), 筋衛星細胞取り込みを評価した。本実験は名古屋学院大学動物実験委員会および名古屋学院大学DNA組み換え実験安全委員会に諮り、承認を得た後に行った (承認番号: 2014-001, D2016-001, D2017-001)。

筋衛星細胞の単離と筋収縮活動モデルの作成

1) と同様の方法でC57BL/6Jマウス (WTマウス, 日本クレア) のヒラメ筋から筋衛星細胞を単離した。後に添加するGFP標識された筋衛星細胞は, C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 1310sb^{Ley SopJ}マウス (グリーンマウス, Jackson Lab.) のヒラメ筋から単離した。いずれのマウスも筋を採取するまで, 室温25°C,

12hの明暗サイクルに設定した室内で飼育し, 餌と水は自由に与えた。

WTマウスから単離した筋衛星細胞を1) と同様の方法で筋管細胞まで分化誘導した。この筋管細胞に対して, 1) と同様にC-Pace EPとC-Dishを用いて電気刺激し, 筋収縮を誘発した。電気刺激の条件は, 1)の結果を踏まえ, 10 V, 30 Hzの電気刺激を, 10秒間に1回の頻度で48時間連続的に与える条件とした (電気刺激条件②)。

筋収縮活動モデルとGFP陽性筋衛星細胞の共培養

DMに培養液を切り替えてから2日後のWTタイプの筋管細胞に対して, 1)の方法でグリーンマウスから単離した筋衛星細胞を添加し, 定

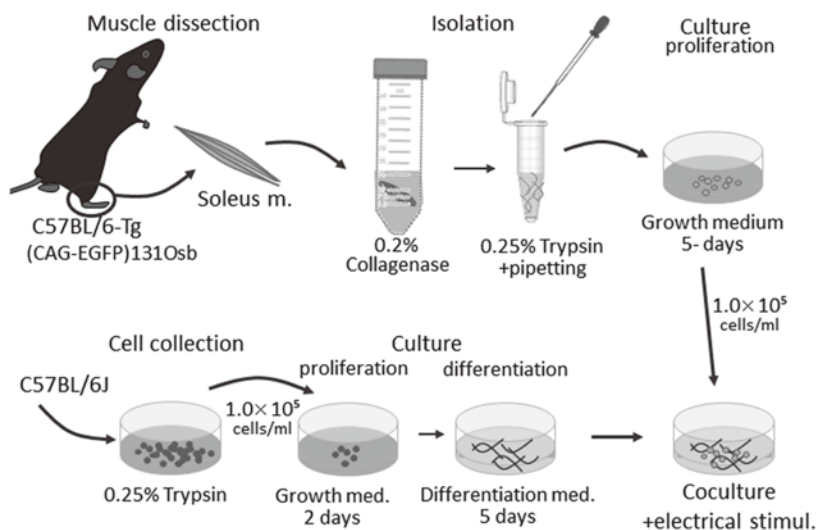


Fig. 3 GFP陽性筋衛星細胞と筋管細胞の共培養

グリーンマウスから採取した筋衛星細胞をWT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。

着させるため24時間同一ディッシュ上で培養した。その後、上述の方法で電気刺激による筋収縮活動を誘起した。

筋衛星細胞取り込みの評価

①位相差顕微鏡像での経時的観察

筋収縮活動により筋管細胞への筋衛星細胞の取り込みが誘起されているかどうかを確認するため、電気刺激開始3, 6, 12, 24, 36, 48時間後の時点において位相差顕微鏡 (DM IL LED, Leica) 下でブルーライトを照射し、観察した。なお、非電気刺激群も作製し比較することで、筋管細胞への筋衛星細胞の取り込みが電気刺激による筋収縮によって促進されたかどうかを確認した。

②免疫組織化学染色を用いたGFP陽性細胞の可視化

GFPの自己蛍光性質は比較的弱いため、そ

の位置を自己蛍光のみで検出し切れない可能性がある。そこで、電気刺激開始3, 6, 12, 24, 36, 48時間後の細胞に抗GFP抗体を用いた免疫組織化学染色を施した。この染色像から輝度を測定し、筋衛星細胞が取り込まれる時期や量を評価した。

免疫組織化学染色はすべて遮光下で操作した。まず、各時点の細胞群を4.0% PFA in PBSにて10分間固定処理した。PBSで洗浄後 (3分間, 3回), 3.0% BSA in PBSで, 37°C, 45分間ブロッキング処理した。PBSで洗浄後 (3分間, 3回), 一次抗体としてrabbit anti-GFP monoclonal antibody (1: 250, EPR14104, abcam) in PBSで, 37°C, 60分間反応させた。洗浄後, 二次抗体としてAlexa Flour[®] 488 goat anti-rabbit IgG antibody (1: 400, A11008, Thermo Fisher) in PBSで, 37°C, 45分間反応させた。なお、核染色のため4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1: 1000, Sigma-

Aldrich) を二次抗体反応液に混合した。二次抗体の反応後、1% BSA in PBS で2回、DW で1回の順で洗浄し、90% glycerol in DW で封入した。

染色したサンプルは蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) 下で撮影し、デジタルデータに取り込んだ。取り込んだ画像はImage Jを用いて、GFP陽性領域の輝度値を測定した。輝度値の測定は各時点の細胞群から6視野ずつ行い、視野領域全体の輝度値に対するGFP陽性領域の輝度値を求めた。求めた値は、各時点で平均値を算出し、比較した。群間の比較には一元配置分散分析を用い、多群間比較に Tukey 法を用

いた。有意水準は5.0%未満とした。

結果

1) 筋収縮による筋肥大モデル

①筋収縮活動を誘発するための電気刺激条件

電気刺激条件①で筋収縮を誘起させた細胞は、電気刺激開始24時間後の観察において、一部の細胞が死滅し、ディッシュ底から剥がれた像が観察された。一方、電気刺激条件②で筋収縮を誘起させた細胞は、48時間ディッシュ底から剥がれることなく形態を維持した。この条件での電気刺激開始直後には、顕微鏡下に

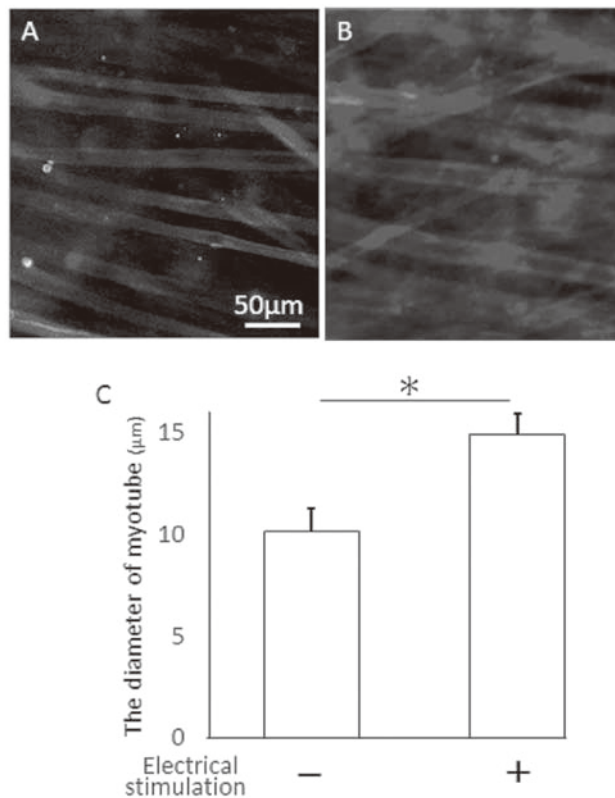


Fig. 4 電気刺激で誘導した筋収縮による筋幹細胞横径の変化

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±標準偏差をCに示す。電気刺激による筋収縮を行った方が行わなかった細胞に比べ横径が有意に太かった。

て筋管細胞の自己収縮とは異なる電気刺激に同期した筋収縮が観察できた。また、電気刺激開始24時間後の観察ポイントには電気刺激の頻度に合わせて細胞全体に筋収縮が観察され、この筋収縮は48時間途切れることなく確認された。以上のことから、本研究では電気刺激条件②を採用し、以降の実験に用いた。

②筋収縮活動による筋管細胞横径の増大

電気刺激条件②で48時間筋収縮を誘起させたMC群の筋管細胞の横径の平均値は $14.91 \pm$

$1.02 \mu\text{m}$ であり、電気刺激を与えずに培養したnMC群の横径($10.13 \pm 1.13 \mu\text{m}$)に比べ、有意に高値を示した。(Fig. 4)。

2) 筋衛星細胞の取り込み現象の再現

①位相差顕微鏡画像から見る筋衛星細胞の取り込み現象

筋管細胞にGFP陽性筋衛星細胞を添加して共培養すると、共培養開始3, 6時間程度までは、単核の筋衛星細胞であると考えられる直径 $5 \mu\text{m}$ 程の円形状にのみ、GFP陽性の領域が観

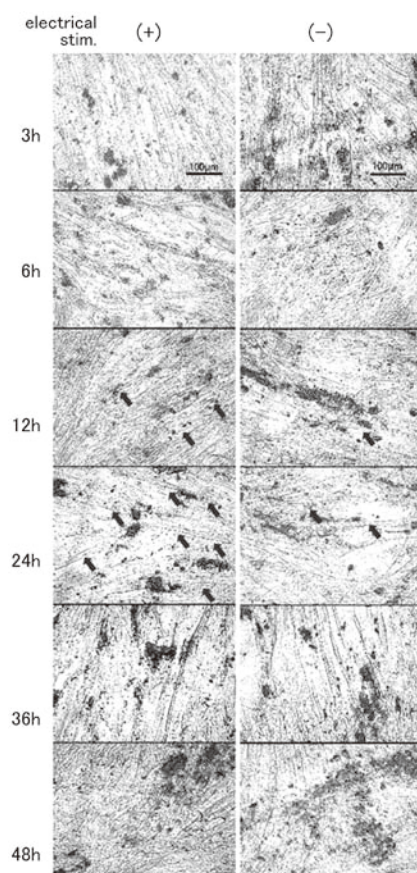


Fig. 5 各観察ポイントでの位相差顕微鏡像

左列は電気刺激による筋収縮を加えた細胞群で、右列は筋収縮を誘起させず共培養した細胞群の位相差顕微鏡像である。上から共培養開始3, 6, 12, 24, 36, 48時間後の代表的な画像である。矢印は筋管細胞内に観察されるGFP陽性の領域。電気刺激による筋収縮を加えると、加えない細胞に比べ、共培養開始12, 24時間後のポイントでGFP陽性の領域が多く観察された。

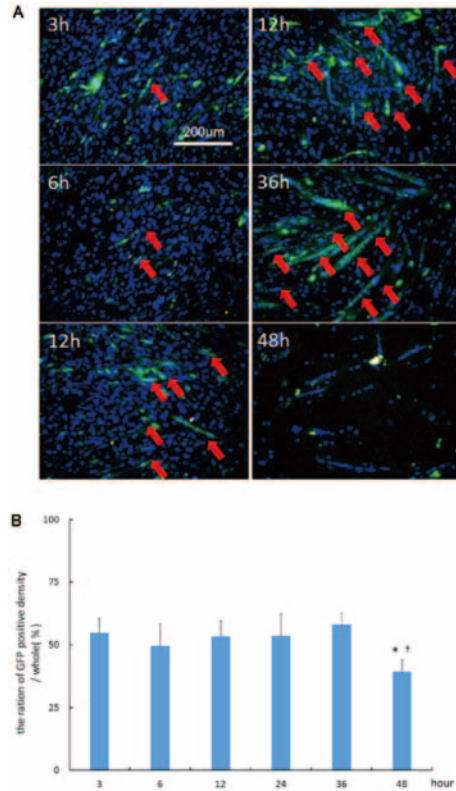


Fig. 6 免疫組織化学染色像とGFP陽性領域の輝度

A：電気刺激による筋収縮を加えた細胞群の代表的な免疫組織染色像を示す。赤矢印は筋管細胞内に観察されるGFP陽性の領域。B：Aの写真から算出した視野面積あたりのGFP陽性領域の輝度値。共培養開始3時間後から36時間後の細胞の間に有意な差はなく、48時間後のみ、3、12、24、36時間後の細胞との間に有意な差があった。 $*p < 0.01$ vs 3, 24, 36 h, $†p < 0.05$ vs 12 h.

察された (Fig. 5)。共培養開始12、24時間が経過すると徐々に線状の筋管細胞内にGFP陽性の領域が観察されるようになった。この筋管細胞に電気刺激を加えて培養すると、共培養開始12、24時間には、筋管細胞内のGFP陽性の領域が多く観察された。

②免疫組織化学染色画像から見る筋衛星細胞の取り込み現象

GFP陽性の領域を位相差像よりもより明確に検出するために、電気刺激開始3、6、12、24、36、48時間後の細胞群に免疫組織化学染色を施したところ、12、24、36時間後の時点で線状の筋管細胞の形状をしたGFP陽性の領

域が、3、6時間後の時点に比べ多く観察された (Fig. 6A)。電気刺激開始48時間後の時点では、他の時点に比べ、GFP陽性の領域が少なかった。

このGFP陽性の領域の視野面積あたりの輝度値は、電気刺激開始3時間後から36時間後の各時点の間に有意な差がなかった (Fig. 6B)。電気刺激開始48時間後の時点では、他群に比べ有意に低値を示した。

考察

マウス初代培養筋管細胞の電気刺激による筋収縮活動

本研究はまず、マウス筋衛星細胞由来の初代培養筋管細胞に対して適切に筋収縮を起こすための電気刺激条件を検討した。手始めにこれまでに報告のあるトリ胚胸筋由来の初代培養筋管細胞モデル [1] に用いられている電気刺激条件を参考に、15 V、60 Hzの電気刺激を分化培養2日目の筋管細胞に対して適用し、細胞の様子を観察した。その結果、電気刺激開始24時間後には、一部の細胞が死滅し、ディッシュから剥がれた。トリ由来の筋管細胞に比べマウス由来の筋管細胞では、高周波の電気刺激によって剥がれやすい性質があると考えられる。実際に、マウスの細胞であるC2C12由来の筋管細胞に対し電気刺激を行った研究 [22, 24] では電気刺激条件が0～15 Hz、10～50 Vの範囲と、トリ由来の細胞に対する条件よりも低周波の条件が設定されている。そこで本研究においても30 Hz、10 Vの電気刺激に設定し直し、細胞の様子を観察した。その結果、電気刺激を48時間与え続けても、細胞が剥がれることはなく、筋管細胞の形状を維持したまま培養することができた。また、これらの細胞群では電気刺激に同期して一斉に筋収縮が誘起された。前述したC2C12由来の筋管細胞は筋管細胞の形状は形成されていても、収縮能を持つ筋線維の形成は稀であるとされている。本研究の筋衛星細胞由来の初代培養筋管細胞モデルは、C2C12由来の筋管細胞とは異なり、自己収縮の発生に加え、電気刺激による筋収縮が誘起できる点で優れたモデルであると考えられる。

マウス初代培養筋管細胞は筋収縮により太くなる

本結果より、初代培養筋管細胞に対して電気刺激による筋収縮活動を誘起させて48時間後には、電気刺激を与えなかった細胞群に比べ、太い細胞が多く観察された。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明らかとなった。以上のことから、本モデルは、多くの筋細胞が動員される筋収縮活動を模擬した*in vitro*モデルとして利用できると考える。

本モデルは、ディッシュ上にMatrigel[®]をコートし、細胞を接着させた。Matrigel[®]は、Lamininやtype IV collagenなどを含む細胞基質を模擬したマトリックスである。つまり、電気刺激により筋収縮活動が生じると、収縮した細胞底面の膜上と基質との間に力学刺激が加わると推察される。力学刺激によるAkt-mTOR-p70S6K タンパク合成経路の活性化について、近年integrinやconnectinといった細胞骨格と細胞表面の基質にまたがる細胞接着分子の関わりが指摘されている [10]。我々の本モデルを用いれば、これらの分子をターゲットとした抑制実験にも応用でき、筋収縮活動による筋管細胞肥大のメカニズム解明につながると考える。

筋収縮により筋細胞サイズの増大が促進される ときには筋衛星細胞が取り込まれる

筋細胞サイズが増大するときには、筋衛星細胞が活性化し、筋細胞に取り込まれることで、筋線維核数を増やすメカニズムが働いていると考えられる [3, 6, 14, 16, 21]。例えば、ラットの前脛骨筋を切除して長指伸筋を4週間機能

的な過負荷状態に曝すと、筋細胞が肥大するのに伴って筋線維核数が増加するが、このとき放射線曝露により筋衛星細胞の増殖・分化能を抑制すると筋細胞の肥大が生じないことが報告されている [16]。また、Murachら [14] は、Tamoxifen (TMX) 投与により後天的に筋衛星細胞を不活性化できる組換えマウスに対して、腓腹筋およびヒラメ筋切除による足底筋の機能的過負荷を10日間行くと、筋肥大が生じず、筋線維核数の増加も起こらないことを報告している。以上のことから、筋細胞に負荷が加わりサイズが増大するときには、筋衛星細胞の活性化に続いて筋線維核数の増加が必要であると考えられる。一方、筋線維サイズの増大が起こるときに筋衛星細胞の活性化や筋線維核数の増加は伴わないとの報告もある [2, 4, 11, 12]。例えばLoweら [11] は、 γ 線照射により筋衛星細胞の増殖・融合を抑制したウズラの前広背筋であっても、3-7日間の過伸長ストレッチを負荷すると筋細胞の肥大を誘発できることを報告している。また、Bruusgaardら [2] によれば、尾部懸垂により後肢筋を萎縮させたマウスに再荷重を14日間行くと、筋細胞サイズが回復しても、筋線維核数が増加しなかった。さらにJacksonら [7] は、TMX投与による筋衛星細胞不活性化組換えマウスの後肢筋を尾部懸垂により萎縮させても、14日間の再荷重により筋細胞サイズを回復させることができると報告している。以上のように、筋細胞サイズが増大するとき、筋衛星細胞の取り込みが起こり、筋線維核数が増加するかどうかには相反する報告がある。ただし、前述の筋衛星細胞の活性化や筋線維核数の増加を伴わずして筋細胞サイズの増大が起こるとする報告 [2, 7, 11] は、いずれもストレッチや尾部懸垂後に単に再荷重するだけという比較的軽い負荷で筋細胞サイズ

の増大を誘発している。一方、筋衛星細胞の活性化や筋線維核数の増加を伴うとする報告 [4, 14, 16] は、協働筋切除による機能的過負荷や尾部懸垂後の再荷重に加えて高強度の運動を行うなど比較的重い負荷で、早い筋細胞サイズの増大を促している。実際に、尾部懸垂後の再荷重のみのBruusgaardら [2] の報告では筋細胞サイズの回復までに2週間かかるのに対し、積極的な運動刺激を加えた我々の報告 [5, 6] では、1週間で正常なサイズまでの回復を得ている。このように早く筋細胞サイズを増大させるような過酷な環境下では、筋衛星細胞の取り込みが必要であると思われる。

本研究はこの可能性を検証するために、マウス初代培養筋管細胞に対して、培養液交換による成長刺激だけでなく、電気刺激による筋収縮活動を加えるモデルを採用し、可視化した筋衛星細胞の取り込みを観察した。その結果、単に培養液交換のみで培養した筋管細胞群よりも、電気刺激による筋収縮を誘発した細胞群で筋衛星細胞が多く取り込まれていることが分かった。以上の結果からも、積極的に筋細胞サイズを増大する刺激下では、筋衛星細胞の取り込みと筋線維核数の増加が必須であると考えられる。我々の本共培養モデルは、この積極的な筋肥大刺激による筋衛星細胞の取り込みが再現でき、分子、遺伝子学的解析に有用であると考ええる。ただ、生体内環境の完全な再現とまでには至らない。*in vivo* モデルと併用してさらに詳細に検証していくことが課題である。

筋衛星細胞の取り込みが起こる時期

筋細胞を構成するタンパクは、核にある遺伝情報をもとに合成される [17]。そのため、前述のように積極的な運動刺激等で過酷な環境下に筋をおくと、筋細胞サイズの増大に先行し

て、筋衛星細胞の取り込み、筋線維核数の増加が起こると考えられる [3, 5, 16]。例えば、Bruusgaardら [3] は、前脛骨筋切除による長趾伸筋の機能的過負荷モデルマウスに対して筋線維核の *in vivo* イメージングを行い、筋細胞サイズの増大が確認される3日前（機能的過負荷開始6日後）に筋線維核数の増加が生じることを報告している。また、ウズラの前広背筋に過伸長ストレッチを断続的に加えると、3日後に筋線維核数が増加し、5日後に筋長の増加が生じると報告されている [23]。尾部懸垂により萎縮したマウスヒラメ筋でも、スクワット運動を加えると4日後に筋線維核数が大幅に増加し、正常レベルまでの筋細胞サイズの回復が7日後に起こることが報告されている [5]。このように平均して刺激開始から3-4日後、筋線維サイズの増大の2-4日前に筋線維核数の増加が生じており、筋衛星細胞が活性化して取り込みへの過程に入るのは刺激開始3-4日よりも前の時期であると考えられる。本共培養モデルでも、筋管細胞横径の増大が観察される筋収縮開始48時間後よりも前の、筋収縮開始12時間後から筋管細胞内に筋衛星細胞由来のGFP陽性領域が観察されはじめ、36時間後にピークとなった。このことから、筋細胞サイズの増大が起こる環境下に筋細胞を曝すと、数時間から1.5日間以内に筋衛星細胞の活性化、取り込みが生じ、2日から4日の間に筋線維核として生着することで合成できるタンパク量が増し、筋線維サイズの増大につながると考えられる。

しかし、本研究結果において、筋収縮開始3, 6時間にも添加した筋衛星細胞由来のGFP陽性領域が多く見られた。筋管細胞に取り込まれていない筋衛星細胞の蛍光が検出されたためと思われる。また、筋衛星細胞を単離する際に選別が甘く、混入した線維芽細胞などの蛍光が検出

された可能性もある。その形状（単核細胞か線状の筋管細胞の一部か）からある程度の鑑別はつくものの、輝度値を指標とした定量評価はかなわなかった。今後より有用なモデルとするため、取り込まれた後の細胞のみ標識するような工夫や、磁気細胞分離装置などで筋衛星細胞のみ厳格に選別して材料に供する工夫が必要である。

まとめると、本研究はマウス初代培養筋管細胞に電気刺激による筋収縮下で、蛍光標識された筋衛星細胞を共培養し、筋細胞サイズの増大時に起こる筋衛星細胞の取り込みを観察可能な状態で再現した。筋衛星細胞の取り込み現象が生じるメカニズムを解明するために有用な *in Vitro* モデルとなったが、その取り込みの程度を定量的に測ることに課題が残った。今後より有用なモデルへの発展を目指したい。

謝辞

本研究は2018年度名古屋学院大学研究助成を受けて実施した。

文献

- [1] Al-Dadah AS, Voeller RK, Schuessler RB, et al. (2007) Maintenance of myocyte volume homeostasis during stress by diazoxide is cardioprotective. *Ann Thorac Surg.* 84: 857-862.
- [2] Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, et al. (2012) No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *Journal of applied physiology.* 113: 290-296.
- [3] Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, et al. (2010) Myonuclei acquired by overload

- exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 15111–15116.
- [4] Egner IM, Bruusgaard JC, Gundersen K. (2016) Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development*. 143: 2898–2906.
- [5] Itoh Y, Hayakawa K, Mori T, et al. (2014) Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell proliferation in mice. *Physiological reports*. 2: e12185
- [6] Itoh Y, Murakami T, Mori T, et al. (2017) Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy. *Muscle & nerve*. 55: 243–253.
- [7] Jackson JR, Mula J, Kirby TJ, et al. (2012) Satellite cell depletion does not inhibit adult skeletal muscle regrowth following unloading-induced atrophy. *American journal of physiology Cell physiology*. 303: C854–861.
- [8] Kawakami K, Tatsumi H, Sokabe M. (2001) Dynamics of integrin clustering at focal contacts of endothelial cells studied by multimode imaging microscopy. *J Cell Sci*. 114: 3125–3135.
- [9] Kirby TJ, McCarthy JJ, Peterson CA, et al. (2016) Synergist Ablation as a Rodent Model to Study Satellite Cell Dynamics in Adult Skeletal Muscle. *Methods Mol Biol*. 1460: 43–52.
- [10] Lange S, Ehler E, Gautel M. (2006) From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol*. 16: 11–18.
- [11] Lowe DA, Alway SE. (1999) Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell Tissue Res*. 296: 531–539.
- [12] McCarthy JJ, Dupont-Versteegden EE, Fry CS, et al. (2017) Methodological issues limit interpretation of negative effects of satellite cell depletion on adult muscle hypertrophy. *Development*. 144: 1363–1365.
- [13] Mitchell PO, Pavlath GK. (2001) A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *American journal of physiology Cell physiology*. 281: C1706–1715.
- [14] Murach KA, White SH, Wen Y, et al. (2017) Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. *Skelet Muscle*. 7: 14.
- [15] Orfanos Z, Godderz MP, Soroka E, et al. (2016) Breaking sarcomeres by in vitro exercise. *Sci Rep*. 6: 19614.
- [16] Rosenblatt JD, Yong D, Parry DJ. (1994) Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle & nerve*. 17: 608–613.
- [17] Roy RR, Monke SR, Allen DL, et al. (1999) Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *Journal of applied physiology*. 87: 634–642.
- [18] Smith HK, Maxwell L, Rodgers CD, et al. (2001) Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 90: 1407–1414.
- [19] Stockdale FE. (1971) DNA synthesis in differentiating skeletal muscle cells: initiation by ultraviolet light. *Science*. 171: 1145–1147.
- [20] van der Velden JL, Langen RC, Kelders MC, et al. (2007) Myogenic differentiation during regrowth of atrophied skeletal muscle is associated with inactivation of GSK-

- 3beta. American journal of physiology Cell physiology. 292: C1636-1644.
- [21] Wang XD, Kawano F, Matsuoka Y, et al. (2006) Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. American journal of physiology Cell physiology. 290: C981-989.
- [22] Wehrle U, Dusterhoft S, Pette D. (1994) Effects of chronic electrical stimulation on myosin heavy chain expression in satellite cell cultures derived from rat muscles of different fiber-type composition. Differentiation. 58: 37-46.
- [23] Winchester PK, Davis ME, Alway SE, et al. (1991) Satellite cell activation in the stretch-enlarged anterior latissimus dorsi muscle of the adult quail. Am J Physiol. 260: C206-212.
- [24] 岩田全広 西浜かすりら (2013) 電気刺激による培養骨格筋細胞の肥大効果. 日本福祉大学健康科学論集. 16: 1-7.

[Original Article]

A model of myogenic satellite cell fusion to myotubes

Yuta Itoh¹, Akinori Ito², Hirohito Ninomiya³, Hirotaka Niwa⁴
Ayano Nawa⁵, Shiho Harada⁶, Risa Fujii⁷

Abstract

Exercise training facilitates the recovery of atrophied muscles and increases the number of myonuclei to levels above normal. This increase in myonuclei may occur through the fusion of myogenic satellite cells with myofibers, but the underlying mechanism is unclear. Therefore, we developed an *in vitro* model inducing muscle contraction by electrical stimulation of differentiated myotube cells with myogenic satellite cells. Moreover, we investigated the response of fusion between myogenic satellite cells and existing myofibers. We observed that myogenic satellite cells fused with existing myotube cells due to muscle contraction induced by electrical stimulation. This model could be used to further investigate the mechanisms underlying the response of fusion between myogenic satellite cells and existing myofibers.

Keywords: myogenic satellite cells, fusion; myonuclei, muscle hypertrophy

-
- 1 Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University
 - 2 Seirei Social Welfare Community Try support wago
 - 3 Kojima-kai Nursing Care Health facility Marunouchi
 - 4 Toshiwa-kai Kitaku care facility
 - 5 Nagoyaseikeigeka Jinkoukansetsu clinic
 - 6 Namiki-kai Namiki hospital
 - 7 Keimei-kai Kimura hospital