

92. 腱への伸展刺激で筋萎縮は予防出来るのか？

土屋 吉史

同志社大学 スポーツ健康科学部

Key words : 腱細胞, 筋芽細胞, 筋萎縮, 伸展刺激, 3次元培養

緒言

健康寿命延伸には、筋萎縮症への対策が重要である。「健康寿命の長さ」は「骨格筋量」と強く正相関することから [1]、運動療法が注目を集めてきた。しかし、これらの取り組みは魅力的な戦略である一方、しばしば強度の高い運動の実施が求められる。このため、筋量や骨量減少により運動器に悩みを抱える高齢者は現状を打開し難く、結局、効果の現れにくい低用量の運動を繰り返さざるを得ない状況に直面している。この現状を物語るように様々な治療対策が講じられてきているものの、筋萎縮症の罹患率は未だに高く、決定的な解決には至っていない。

そこで著者はこの打開策として「腱」に着目した。2018年頃から、運動器に属しながらこれまで注目されてこなかった「腱」でも運動による筋や骨量維持に重要な因子 (IL-6/BMP) の産生や血管新生が報告されるようになった [2]。また、複数の系譜をもつ細胞集団やコラーゲンタンパク分泌・合成の概日リズム、オートファジー機構の存在も明らかにされ始めている [3~4]。さらに2022年に我々は、腱細胞が筋芽細胞の筋分化を何かしらの因子を介して促進することを示し、腱にも臓器連関特性が存在する可能性を提唱した [5]。しかし、複数の報告により腱の知られざる生理特性が徐々に明らかにされているものの腱の分子生物学研究分野の歴史は未だに浅く、腱の多臓器連関特性を増強させる試みは無い。そこで本研究では、腱も筋と同様に伸展刺激を加えることで近傍の筋の分化を促し筋量維持に貢献するか否かを検証することとした。

方法

1. 細胞の単離と培養

まず、ヒト組織から筋芽細胞と腱細胞を単離し、培養を行った。筋芽細胞を採取するために、筋組織から筋以外の組織 (脂肪、結合組織など) をすべて除去し、インキュベータ内で1時間消化した。その後、濾過した細胞に骨格筋増殖培地 (mGM) を添加し、細胞が十分な数 ($\leq 80\%$ コンフルエント) になるまで培養した。この段階では、非筋芽細胞も多くの割合で存在しているため、さらに純度の高い筋芽細胞を得るために、抗 CD56 磁気ビーズを用いて筋芽細胞を精製した。

腱細胞を採取するために、腱組織に付着する非腱組織をすべて取り除いた後一晩消化した。その後、腱細胞増殖培地を添加し十分な細胞数 ($\leq 80\%$ コンフルエント) になるまで培養した。細胞の精製度は蛍光免疫染色にて行った。

2. 腱3次元培養

Flexcell Tissue Train 培養システム (Flexcell International Corporation, Burlington, USA; FX-6000TT) を用いて、培養した腱細胞からコンストラクト (腱組織様構成物) を作製した。シリコン培養表面とフォームアンカー付きの専用 Flexcell 6 ウェルプレートと付属のリニアトラフローダー (Flexcell International Corporation, TT-4000TL) を組み合わせ、腱細胞を播種した後、腱分化培地を加え培養を行った。1週間の培養により、

幅 2 mm、長さ 15 mm のコンストラクトを作製した。

3. 3D 腱コンストラクトへの伸展刺激、コンディショニング培地の収集

細胞培養可能な環境下で伸展刺激を加えることのできる専用の培養システム (Flexcell Tissue Train) を用いて、腱コンストラクトに機械的な伸展刺激を施した。腱コンストラクトの入った専用の 6 ウェルプレートにローディングポストの上に置き、すべてのコンストラクトを無血清培地 (SFM) で 3 回洗浄した後、各ウェルに 3 mL の SFM を添加した。ウェル内の腱コンストラクトに取り付けたフォームアンカーを真空で下方に引っ張ることで、コンストラクトに機械的な伸展張力を負荷した。伸展刺激は 37°C のインキュベータ内で行った。腱コンストラクトは、0.5 Hz・4% の張力で 4 時間伸展を繰り返した (Load 条件) (図 1)。コントロールとして、同じプレートに繰り返し負荷をかけない腱コンストラクトを、ゴム栓を使って真空誘導負荷を遮断することで作製した (Control 条件)。伸展刺激の直後に、Control 条件、および Load 条件から上清を回収した (図 1)。回収したコンディショニング培地は、筋芽細胞に添加する前に mGM または筋分化培地 (mDM) で 1:1 に希釈した (図 1)。

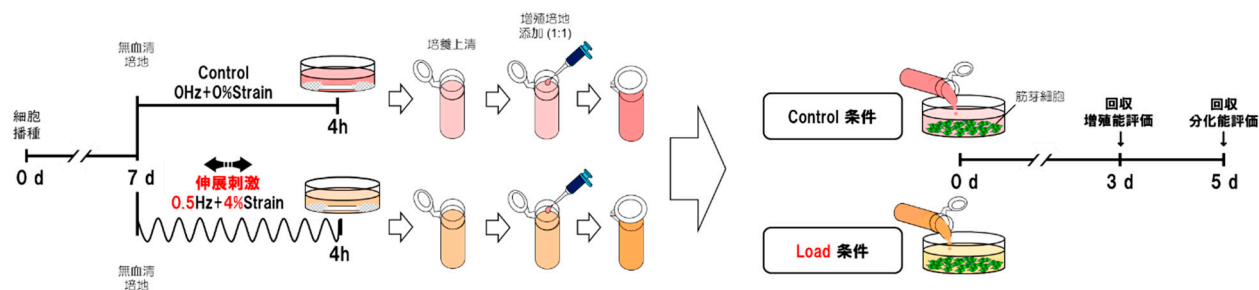


図 1. 実験プロトコール

伸展刺激を加えていない条件の培養上清 (Control) と、加えた条件の培養上清 (Load) を回収する。その後、筋芽細胞に添加させた際、筋分化が正に制御されるか否かを検証。

4. コンディショニング培地の準備と添加

増殖実験 (どれくらいのスピードで筋芽細胞が増えるかの評価系) では、筋芽細胞を滅菌済み 12 mm ガラスカバースリップを含む 24 ウェルプレートに 6×10^3 個/ウェルの密度で播種した。すべての細胞は最初に mGM を用いて 12 時間静置し筋芽細胞の十分な接着後、mGM で洗浄した後にコンディショニング培地を添加した。トータルのインキュベーションは 3 日間とし、コンディショニング培地は 1.5 日目に交換した。3 日目に、蛍光免疫染色解析のために細胞を回収した。

筋分化実験 (どれくらいのスピードで筋が成熟していくかの評価系) では、筋芽細胞を 24 ウェルプレートに 1.5×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。その後、すべての細胞は最初に mGM を用いて 12 時間静置し筋芽細胞十分な接着後、DM で洗浄し、その後コンディショニング培地に置換した。すべてのコンディショニング培地は 2 日目と 4 日目に交換した。5 日目に、蛍光免疫染色解析のために細胞を回収した。

5. 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色を施す細胞はすべて、固定、透過処理を行った。細胞は 4°C で一晩、適切な一次抗体 (下記参照) とインキュベートし、Alexa Fluor ヤギ抗マウス 488 標識およびヤギ抗ウサギ 568 標識二次抗体を用いて可視化した。核染色には、DAPI を用いた。すべての画像は、オリンパス製顕微鏡 BX51 のカメラを用いて記録撮影した。画像は、各ウェル 10 倍の倍率 ($1,700 \mu\text{m} \times 1,300 \mu\text{m}$) で 5 枚 (カバーガラスの中央、上、左、下、右側) 重ならないよう撮影された。取得したデジタル画像は、Fiji ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA; version

1.52) を用いて定量化した。使用した抗体は以下のとおりである。ウサギ抗 Desmin 抗体 (Abcam, Cambridge, UK; AB32362)、マウス抗 TE7 抗体 (Merck, Darmstadt, Germany; CBL271)、マウス抗 Myogenin 抗体 (Hybridoma bank, Iowa, USA, F5D)。筋分化の評価は、Desmin 陽性細胞 (+) かつ Myogenin (+) の核数を全核数で割った値を用いた。

6. リアルタイム RT-PCR

腱コンストラクトから RNA を抽出した。まず、サンプルを機械的にホモジナイズした後、抽出した RNA を、逆転写酵素を用いて cDNA に変換した。各標的 mRNA について、cDNA と 100 nM のフォワードプライマーおよびリバープライマーを含む 25 μ L の SYBR Green PCR で増幅した。増幅は、リアルタイム PCR 装置を用いてリアルタイムでモニターした。Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0) mRNA は標準化のために選択された。

結 果

1. 筋芽細胞と腱細胞の精製

筋芽細胞と腱細胞の精製度合を蛍光免疫染色で確認した (図 2)。単離された CD56⁺筋芽細胞と腱細胞は、それぞれ Desmin (筋芽細胞マーカー) と TE7 (線維芽細胞マーカー) の免疫染色により確認された (図 2)。

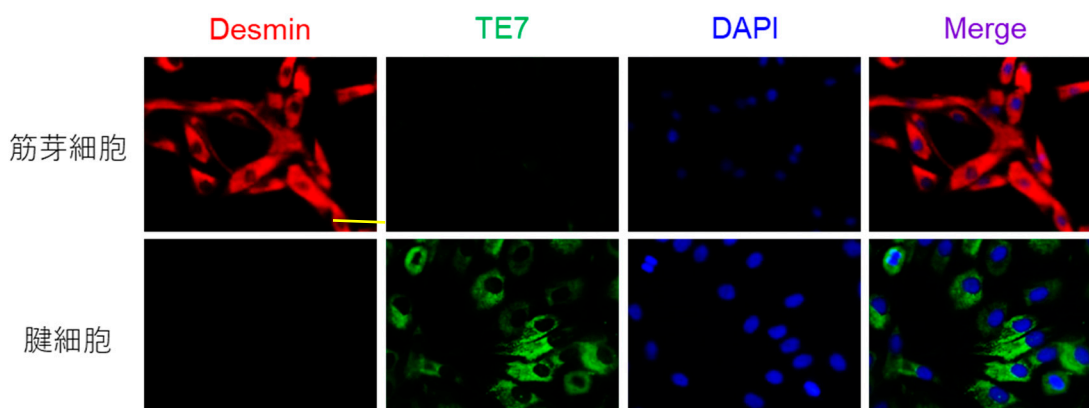


図 2. 蛍光免疫染色による、単離後の筋芽細胞と腱細胞の確認

(上) 単離した筋芽細胞は、筋芽細胞の指標である Desmin 陽性、線維芽細胞 (腱細胞は線維芽細胞の性質ももつ) の指標である TE7 陰性であった。

(下) 単離した腱細胞は、筋芽細胞の指標である Desmin 陰性、線維芽細胞の指標である TE7 陽性であった。

スケールバー : 50 μ m。

2. 伸展刺激を加えた腱コンストラクトの遺伝子発現

ここでは、腱コンストラクトを 0.5 Hz・4%の張力で 4 時間負荷した際の腱コンストラクト自身の腱関連遺伝子発現を調べた。腱のマスターレギュレーターである SCX は、Load 条件が Control 条件より有意に高値を示したが、COX-2 (シクロオキシゲナーゼ 2) は Load 負荷条件で有意に低値を示した。その他、腱関連遺伝子である COL1A1 (Collagen type I, alpha 1)、COL3A1 (Collagen type III, alpha 1)、FN (Fibronectin)、DCN (Decorin)、TGFB1 (Transforming Growth Factor beta 1)、ITGA2 (Integrin alpha 2)、MKX (Mohawk Homeobox)、IL6 (Interleukin 6)、または COX-1 (Cyclooxygenases 1) は、条件間で差が認められなかった。これらの結果は、本研究で用いた負荷プロトコールが SCX 発現を亢進させ、炎症作用を誘導しなかったことを示している。

3. 伸展刺激を加えた腱コンストラクト由来のコンディショニング培地は筋芽細胞の分化を促進する

筋芽細胞は分化が進むと、互いに融合する。そこで、伸展刺激を加えた腱コンストラクト由来のコンディショニング培地が筋分化能に影響を及ぼすかどうかを検証した。蛍光免疫染色解析により、核数（細胞数）の差は観察されなかったが、Load 条件は Control 条件に比べ高い分化能（Desmin⁺と Myogenin⁺の細胞数）を示した（図 3）。筋管の最大径は条件間で差は認められなかった（data not shown）。これらの結果は、腱コンストラクトの伸展刺激に由来する何らかの因子が筋芽細胞の融合過程に正の影響を与えたことを示している。

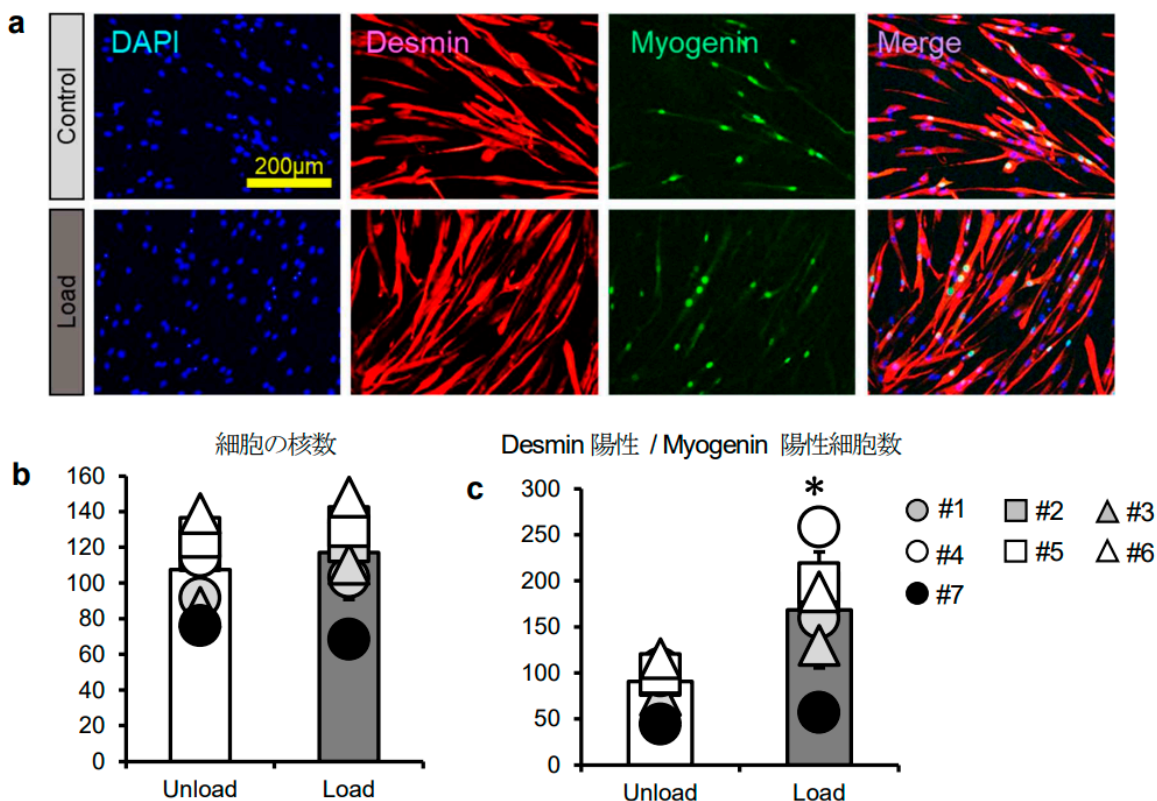


図 3. 腱コンストラクト伸展刺激由来培養上清の添加による筋分化制御の解析
腱コンストラクトは、伸展刺激により筋分化を促進させる因子を放出している可能性が考えられる。

- a) 両条件における蛍光免疫染色画像。
b) 細胞の核数（DAPI）。
c) Desmin 陽性 / Myogenin 陽性細胞。
スケールバー：200 μ m。

考 察

骨格筋や腱組織の細胞は、日常的に機械的負荷にさらされている。従って機械的負荷が加わる環境下で各組織の細胞がどのように振る舞うかを理解することは、筋-腱間のホメオスタシス、治癒、再生能力を維持するために重要である。

我々は、腱コンストラクトと Flexcell 負荷システムを使用し、機械的負荷を加える条件と加えない条件で得られた培養上清が筋芽細胞の分化制御に及ぼす影響を観察した。

本研究で使用したプロトコールは、微細な溝をつけた基質上にヒト腱細胞を播種して伸展を加えた研究を模倣した。この研究では I 型コラーゲンと TGF- β 1 タンパク質の合成を促進することが観察されている。本研究では、COL1A1、TGFB1 の発現増加は観察することはできなかったが、SCX 遺伝子の発現の亢進は Load 条件で認められた。SCX は機械的な刺激により発現が亢進するため、伸展刺激を加えることによって腱コンストラクトが力学的な刺激を受けていたことを示唆している。

我々は、伸展刺激を加えた腱コンストラクトのコンディショニング培地が筋芽細胞の分化融合を刺激することから、腱細胞が放出する機械的負荷誘発因子が筋管形成に寄与していることを示した。多くの *in vitro* 研究で、腱細胞は機械的負荷に反応して、インターロイキン-6 (IL-6)、TGF- β 1、アンジオポエチン様 4、プロスタグランジン E2 など、いくつかのサイトカインや内因性因子を産生することまでは報告されているが、放出している因子のすべては未だ明らかにされていない。腱コンストラクト伸展刺激によって誘発された因子の候補として、ミトコンドリア 12 S rRNA-c のオープンリーディングフレーム (MOTS-c)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、または IGF1 が予想される。MOTS-c はミオスタチンの作用を阻害する循環ホルモンであり、TNF α はミオスタチン遺伝子を刺激するサイトカインである [6]。IGF1 はミオスタチンの作用に拮抗することが示されており、さらに腱組織における IGF1 遺伝子の発現は、筋-腱ユニットの反復収縮によって増加することが報告されている [7]。しかしながら、これらの因子が実際に腱コンストラクトの伸展刺激により放出されるかどうかは不明であり、関与する因子を同定するためにはさらなる研究が求められる。

今回のような細胞実験による筋分化と実際ヒトで起こっている筋萎縮を同一視して評価することは難しいかもしれないが、筋芽細胞の分化制御と筋萎縮との関係性は深い。したがって、本研究で明らかにした「腱細胞の伸展刺激誘発性因子が筋萎縮の進行抑制に貢献している可能性」が、筋萎縮の抑制のみならず筋疾患の病態改善に繋がることを期待している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、コペンハーゲン大学病院の Rene' B. Svensson 博士、Ching-Yan Chloe' Yeung 博士、Peter Schjerling 博士、Michael Kjaer 博士である。

文 献

- 1) J.R. Ruiz, X. Sui, F. Lobelo, J.R. Morrow, Jr., A.W. Jackson, M. Sjostrom, S.N. Blair, Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study, *BMJ*, 337 (2008) a439, PMID: 18595904, DOI: 10.1136/bmj.a439.
- 2) N.L. Millar, K.G. Silbernagel, K. Thorborg, P.D. Kirwan, L.M. Galatz, G.D. Abrams, G.A.C. Murrell, I.B. McInnes, S.A. Rodeo, Tendinopathy, *Nature reviews. Disease primers*, 7 (2021) 1. PMID: 33414454, DOI: 10.1038/s41572-020-00234-1.
- 3) K.T. Best, A.E. Loiselle, Scleraxis lineage cells contribute to organized bridging tissue during tendon healing and identify a subpopulation of resident tendon cells, *FASEB J*, 33 (2019) 8578-8587, PMID: 30951381, DOI: 10.1096/fj.201900130RR.
- 4) C.C. Yeung, F. Dondelinger, E.M. Schoof, B. Georg, Y. Lu, Z. Zheng, J. Zhang, J. Hannibal, J. Fahrenkrug, M. Kjaer, Circadian regulation of protein cargo in extracellular vesicles, *Science advances*, 8 (2022) eabc9061, PMID: 35394844, DOI: 10.1126/sciadv.abc9061.
- 5) Y. Tsuchiya, M.L. Bayer, P. Schjerling, C. Soendenbroe, M. Kjaer, Human derived tendon cells contribute to myotube formation in vitro, *Experimental cell research*, (2022) 113164. PMID: 35526568, DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113164.

- 6) H. Kumagai, A.R. Coelho, J. Wan, H.H. Mehta, K. Yen, A. Huang, H. Zempo, N. Fuku, S. Maeda, P.J. Oliveira, P. Cohen, S.J. Kim, MOTS-c reduces myostatin and muscle atrophy signaling, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 320 (2021) E680-E690, PMID: 33554779, DOI: 10.1152/ajpendo.00275.2020.
- 7) K.M. Heinemeier, J.L. Olesen, P. Schjerling, F. Haddad, H. Langberg, K.M. Baldwin, M. Kjaer, Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types, *J Appl Physiol* (1985), 102 (2007) 573-581, PMID: 17038487, DOI: 10.1152/jappphysiol.00866.2006.