

| | |
|------------------|---|
| Title | 脱神経により廃用性萎縮をきたしたラット骨格筋に対する培養筋芽細胞の移植 |
| Sub Title | Myoblasts transplantation into denervated rat muscles |
| Author | 小山, 太郎(Koyama, Taro) |
| Publisher | 慶應医学会 |
| Publication year | 2006 |
| Jtitle | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.4 (2006. 12) ,p.251- 255 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | The purpose of this investigation is to observe whether cultured myoblasts take in denervated muscle and differentiate myofiber without reinnervation. Cultured myoblasts survived in not only intact muscle but also denervated muscle without reinnervation at 1 week after transplantation. The cells differentiated myofibers in both intact and denervated muscles at 2 weeks and 4 weeks after transplantation. The ratio of denervated muscle weight to intact muscle weight decreased from 1 week to 4 weeks after myoblasts transplantation, but the decrease is not significant for first 2 weeks. These data suggest that transplanted myoblasts could survive and differentiate myofibers in denervated muscle and myoblasts transplantation before reinnervation may prevent denervated muscle atrophy and improve muscle regeneration after nerve repair. |
| Notes | 原著 |
| Genre | Journal Article |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20061200-0251 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

原 著

脱神経により廃用性萎縮をきたしたラット骨格筋に対する
培養筋芽細胞の移植

慶應義塾大学医学部形成外科学教室

こやま たろう
小山太郎

ABSTRACT

Myoblasts transplantation into denervated rat muscles

Taro Koyama, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keio University School of Medicine

The purpose of this investigation is to observe whether cultured myoblasts take in denervated muscle and differentiate myofiber without reinnervation. Cultured myoblasts survived in not only intact muscle but also denervated muscle without reinnervation at 1 week after transplantation. The cells differentiated myofibers in both intact and denervated muscles at 2 weeks and 4 weeks after transplantation. The ratio of denervated muscle weight to intact muscle weight decreased from 1 week to 4 weeks after myoblasts transplantation, but the decrease is not significant for first 2 weeks. These data suggest that transplanted myoblasts could survive and differentiate myofibers in denervated muscle and myoblasts transplantation before reinnervation may prevent denervated muscle atrophy and improve muscle regeneration after nerve repair.

Key Words : skeletal muscle, satellite cells, myoblasts, denervation, cell transplantation

緒 言

脱神経された骨格筋は筋線維が縮小し、廃用性萎縮が進行し筋力は急速に低下する^{1, 2)}。骨格筋の筋線維の基底膜下には筋原性幹細胞である筋衛星細胞が存在し、筋損傷時にはこの筋衛星細胞が増殖し、損傷部位の筋再生が起こる^{3, 4)}。ラットの骨格筋を脱神経すると、3ヶ月間は筋衛星細胞は増殖し続けるが、筋肉への神経再支配が起こらない限り増加した筋衛星細胞による筋再生は起こらず、やがて筋衛星細胞は枯渇していく^{4, 9, 10)}。よって脱神経後、神経再支配までの期間が長くなるほど、筋衛星細胞の減少は進行し、神経筋接合部位の退行変性もあわせて、神経再支配後の筋力の回復は低下する^{9, 11)}。われわれは筋芽細胞を移植することで脱神経後の萎縮筋

内における筋衛星細胞の減少を補充することができれば、神経再支配後の筋再生、筋力改善を向上させられるとの仮説を立てた。

筋芽細胞を用いた細胞移植治療としてはデュシェンヌ型筋ジストロフィー^{12, 13)}や心筋梗塞後の心不全に対する治療報告がある^{14, 15)}。筋ジストロフィー mdx マウスの筋内に、ジストロフィン産生能をもった正常マウスの筋芽細胞を注射したところ、移植筋芽細胞がジストロフィンの欠損した筋細胞と融合し、筋細胞膜にジストロフィンを発現することに成功している¹²⁾。また虚血性心疾患の患者に対して、自家培養筋芽細胞を移植して心機能が改善したという報告もある^{14, 15)}。しかしながら、廃用性萎縮骨格筋に対する筋芽細胞移植の報告は少なく、移植した筋芽細胞が神経再支配の起きていない脱神経下の筋

肉に生着しうるのか否かは不明である。われわれは、green fluorescent protein (GFP) transgenic ラットの 下腿筋から筋芽細胞を採取、培養した。この培養筋芽細胞を脱神経による廃用性萎縮骨格筋に移植し、移植した筋芽細胞が神経再支配なしに生着しうるか、さらに筋線維に分化しうるのか否かを検討した。

材料と方法

雄の5週齢の Jcl/ Sprague-Dawley (SD) ラット (日本クレア) 11匹を用いた。手術操作はネブタール腹腔内麻酔下 (60 mg/kg) で無菌的に行った。手術操作後、ラットは別々のゲージで飼育した。ラットの手術及び飼育は本大学の動物実験倫理規定を遵守し行った。

脱神経：顕微鏡下にて右坐骨神経を膝窩で切断した。切断した神経の筋肉への再支配を防ぐ為に両断端を8-0 ナイロン糸で結紮した。

筋芽細胞移植：神経切断から40日後に、あらかじめ培養しておいた雄の成獣 green fluorescent protein (GFP) transgenic Sprague-Dawley (SD) ラット (関西医科大学第一病理学教室足立靖先生よりご提供いただいた) 由来の筋芽細胞を脱神経した右腓腹筋と、健側の左腓腹筋に移植した。Preplating 操作^{16), 17), 18)}を7回行った筋芽細胞、約 1×10^6 個を300 μ l の PBS に浮遊させ 26 G インスリンシリンジを用いて直視下で注射した。

筋芽細胞の採取と培養：筋芽細胞の採取、培養には Yaffe らが報告した preplating technique を用いた^{16), 17), 18)}。雄の成獣 GFP トランスジェニック SD ラットの下腿筋を切除し、結合織を取り除いた後にメス刃で細切し、0.25%トリプシン EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と0.5 mg/ml コラゲナーゼ (和光純製薬、日本) にて37°Cの恒温器内で処理し細胞を遊離させた。細胞浮遊液を培養皿に移し、細胞を培養した。培地は Ham's F10 nutrient mixture (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) に20%牛胎児血清、5 ng/ml bFGF、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加して用いた。Preplating 操作により7継代した細胞を用意した。

免疫組織化学評価：細胞移植から1週、2週、4週目にラットの下腿筋 (右：脱神経、左：正常) を採取した。採取した腓腹筋は湿重量を計測した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し OCT コンパウンドを用いて包埋し、液体窒素 (-160°C) で凍結して -80°C で保存した。凍結保存した腓腹筋からクライオスタットを用いて長軸方向に 8 μ m の厚さで切片を作成し空気乾燥した後

にアセトンに5分間浸漬し切片を固定した。蛍光免疫染色には以下の抗体を用いた。ウサギ Alexa Fluor 488 化抗 GFP 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、マウス抗 vimentin 抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギ抗 desmin 抗体 (Sigma-Aldrich)、マウス抗 skeletal myosin (FAST) 抗体 (Sigma-Aldrich)、マウス抗 α smooth muscle actin 抗体 (Sigma-Aldrich)、ヤギビオチン化抗ウサギ IgG (VECTOR, Burlingame, CA)、ウマビオチン化抗マウス IgG (VECTOR)。核染色には Hoechst 33258 solution (DOJINDO, 日本) を用いた。発色には Streptavidin texas red (Amrsham pharmacia biotech, UK) を用いた。

検体を PBS で希釈したそれぞれの一次抗体 (マウス抗 vimentin 抗体、ウサギ抗 desmin 抗体、マウス抗 skeletal myosin (FAST) 抗体、マウス抗 α smooth muscle actin 抗体) と1時間反応させた。その後 PBS で5分間、3回洗浄した後に二次抗体と (ウサギ抗 desmin 抗体にはビオチン化抗ウサギ IgG を、マウス抗 vimentin 抗体、マウス抗 skeletal myosin (FAST) 抗体、マウス抗 α smooth muscle actin 抗体にはビオチン化抗マウス IgG を用いた) 30分間反応させ、再び PBS で3回洗浄した。最後に Streptavidin texas red, Hoechst, ウサギ Alexa Fluor 488 化抗 GFP 抗体の混合液で30分間反応させた。各抗体は添付文書に記載された推奨濃度で使用した。標本は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS SYSTEM MICROSCOPE BX51) にて鏡検した。vimentin 陽性細胞は fibroblastic cell, desmin 陽性細胞は myogenic cell と判断した。

結果

免疫組織化学評価：細胞移植後、1週、2週および4週で、右腓腹筋 (脱神経) と左腓腹筋 (正常) の両側に GFP または抗 GFP 抗体で発色される移植細胞が認められた。

移植後1週では、筋線維の周囲に GFP 陽性の単核細胞が多数観察された (図1)。これらの GFP 陽性細胞は vimentin 陰性、desmin 陽性を示した。また、移植後1週の時点では、GFP 陽性の筋線維は認められなかった。

細胞移植後2週では GFP 陽性の筋線維が観察された。これら GFP 陽性の筋線維は vimentin 陰性、desmin 陽性、skeletal myosin 陽性、 α smooth muscle actin 陰性であった (図2、図3)。移植細胞が筋原細胞で、筋線維に融合し骨格筋として分化したことが示唆された。

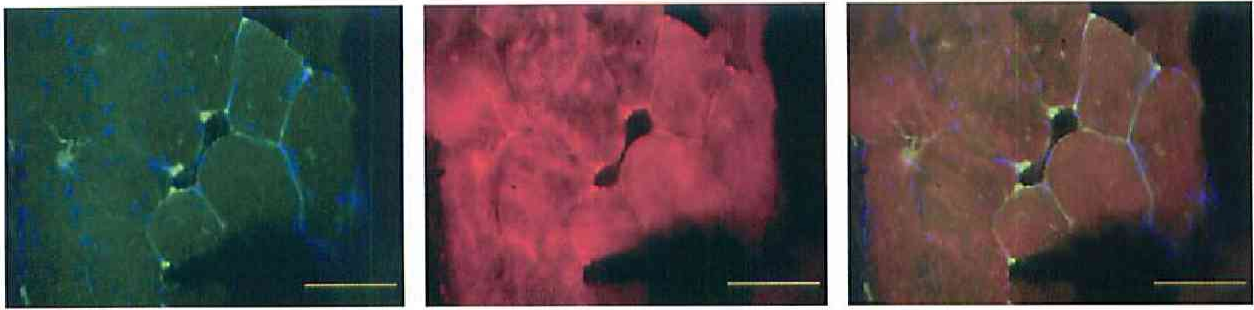


図1 細胞移植1週後の右腓腹筋（脱神経）の横断面
筋線維周囲に緑色に強く蛍光した GFP 細胞が確認できた（左）、筋線維と GFP 細胞は desmin 陽性であった（中央）、画像を重ねて GFP 細胞が desmin 陽性であることが確認できた（右）、スケールバー（黄色線）は100 μm 。

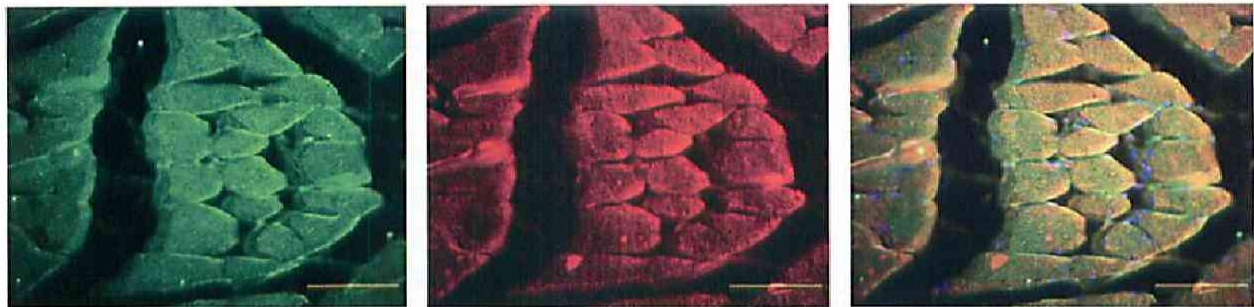


図2 細胞移植2週後の左腓腹筋（正常）の横断面
筋線維内に GFP が認められた（左）、筋線維は myosin 陽性であった（中央）、画像を重ねて筋線維内の GFP が myosin 陽性であることが確認できた（右）、スケールバー（黄色線）は100 μm 。

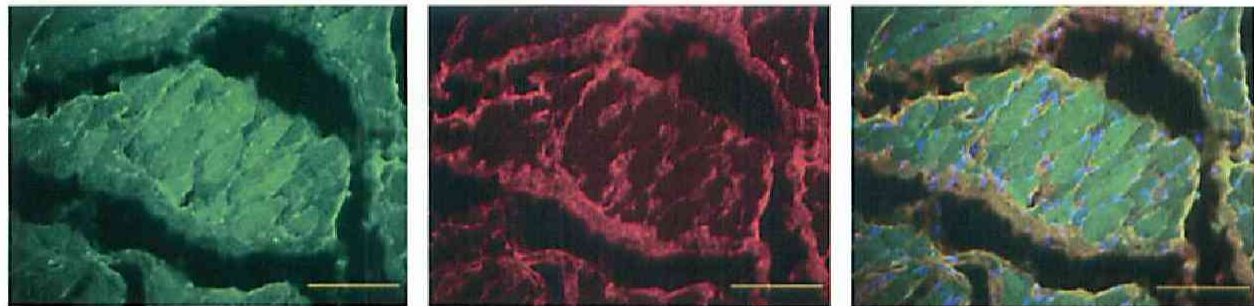


図3 細胞移植2週後の右腓腹筋（脱神経）の横断面
筋線維内に GFP が認められた（左）、筋線維は vimentin 陰性であった（中央）、画像を重ねて筋線維内の GFP が vimentin 陰性であることが確認できた（右）、スケールバー（黄色線）は100 μm 。

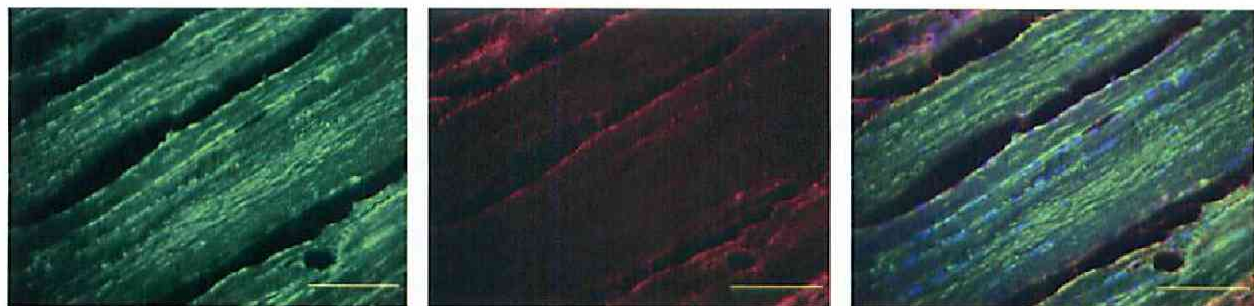


図4 細胞移植4週後の右腓腹筋（脱神経）の縦断面
筋線維内に GFP が認められた（左）、筋線維は α smooth muscle actin 陰性であった（中央）、画像を重ねて筋線維内の GFP が α smooth muscle actin 陰性であることが確認された、スケールバー（黄色線）は100 μm 。

表 1

| | group 1 cell+(n=4) | group 2 cell+(n=4) | group 3 cell+(n=3) |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 体重 (g) | 327±33 | 346±26 | 434±31 |
| 右 (脱神経) 腓腹筋湿重量 (g) | 0.59±0.07 | 0.6±0.1 | 0.66±0.10 |
| 左 (正常) 腓腹筋湿重量 (g) | 2.13±0.12 | 2.29±0.36 | 2.96±0.22 |
| 右 (脱神経) 腓腹筋湿重量/体重×1000 | 1.85±0.27 | 1.71±0.26 | 1.50±0.15 |
| 左 (正常) 腓腹筋湿重量/体重×1000 | 6.68±0.54 | 6.50±0.57 | 6.80±0.15 |
| 右腓腹筋湿重量/左腓腹筋湿重量 | 0.27±0.02 | 0.26±0.03 | 0.22±0.02 |

group 1, 1 week after cell transplantation ; group 2, 2weeks after cell transplantation ; group 3, 4 weeks after cell transplantation. Data are means±SEM. n. number of rats

細胞移植から4週後ではGFP陽性の筋線維が多数認められ(図4), 移植2週後の免疫染色結果と同様にvimentin陰性, desmin陽性, skeletal myosin陽性, αsmooth muscle actin陰性であった。移植細胞は筋線維に融合し, 4週後においても生着していることが確認できた。

筋重量評価: 筋芽細胞移植後1週, 2週, 4週の各時点で, ラットの体重は増加しており, これに比例して左腓腹筋(正常)の湿筋重量も増加していった。各時点での左腓腹筋湿重量/ラット体重の比は, ほぼ一定であった。しかしながら右腓腹筋湿重量/ラット体重の比は, 時間経過とともにわずかに減少していった。右腓腹筋湿重量(脱神経)と左腓腹筋湿重量(正常)の比も移植後1週から4週の間減少していったが, 移植後2週においてはその減少はわずかであった(表1)。

考 察

脱神経された筋では, 筋衛星細胞が一過性に増加するものの, 代償的に働くことができないまま廃用性萎縮が進行し, やがて筋衛星細胞は枯渇してしまう^{4, 9, 10)}。脱神経後の筋衛星細胞の変化については様々な報告がある。脱神経により筋衛星細胞はアポトーシスを起こしやすくなる¹⁰⁾, という報告や, 脱神経後の筋衛星細胞内では細胞周期の抑制因子であるGADD45およびp21のmRNAの発現が大幅に増加する²⁰⁾という報告がある一方で, 脱神経後も筋衛星細胞自体の再生能, 分化能は維持されており, 周囲の細胞環境により融合が阻害されているだけであるとの報告もある^{6, 10)}。このように, 脱神経後の筋肉内の筋衛星細胞については不明な点が多く, 培養筋芽細胞を移植した場合, どのようなことになるのかといった報告は現時点ではない。

われわれが渉猟した限りでは, 今回の実験が廃用性萎縮骨格筋に対する脱神経下での筋芽細胞移植の初めての報告である。今回, われわれは脱神経後の廃用性萎縮骨

格筋に移植した培養筋芽細胞が, 神経再支配がなくとも, 移植後4週までは廃用性萎縮骨格筋内で生着し, 筋線維に融合していることを確認した。

血管柄なしの遊離の筋移植片が筋芽細胞の供給源となりうると考えたChammasらは坐骨神経切断から3ヵ月後に神経縫合を行い, この3週間後に下腿三等筋に血管柄なしの遊離筋芽移植を行い, 筋力の大幅な改善を報告している²¹⁾。Lazergesらはウサギの脱神経廃用性萎縮骨格筋に神経縫合を行い, 神経再支配後に筋芽細胞を移植することで筋力の改善を報告している²²⁾。このように, 筋芽細胞移植は脱神経による廃用性萎縮を抑制し神経再支配後の筋力を改善する可能性がある。今回, われわれの実験では筋芽細胞移植のみで神経縫合を行っていないが, 移植後2週までは脱神経による筋重量の減少はわずかであった。この結果から脱神経後の神経縫合前の時期に筋芽細胞を移植することで廃用性萎縮の進行を抑制し, 神経縫合後の筋力回復結果を改善できる可能性が示唆された。

総 括

廃用性萎縮骨格筋に対する筋芽細胞移植の報告は少なく, 移植した筋芽細胞が神経再支配の起きていない脱神経下の筋肉に生着しうるかかどうかは不明である。われわれは, green fluorescent protein transgenicラットの下腿筋から筋芽細胞を採取, 培養し, この培養筋芽細胞を脱神経により廃用性萎縮をきたした腓腹筋に移植し, 移植した筋芽細胞が神経再支配なしに生着しうるか, さらに筋線維に分化しうるかを検討した。脱神経後に移植した筋芽細胞は, 神経再支配がなくとも移植後1週で生着しており移植後2週には筋線維への融合が確認された。移植後4週においても筋線維に融合した移植細胞が確認できた。筋重量の計測では, 脱神経後, 筋重量は減少していったが, 移植後2週までは筋重量の減少はわずかであった。これらの結果から脱神経後の神経縫合前の時期

に筋芽細胞を移植することで廃用性萎縮の進行を抑制し、神経縫合後の筋力回復結果を改善できる可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、また御指導御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部形成外科学教室、中島龍夫教授に深甚なる謝意を表します。また直接研究の御指導をいただきました慶應義塾大学医学部形成外科学教室貴志和生講師に深謝いたします。さらに、本研究に御協力していただいた国立病院機構東京医療センター形成外科佐藤博子先生、慶應義塾大学医学部形成外科学教室玉田一敬先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Schmalbruch H. : Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats. *Muscle Nerve* 13 : 421-32, 1990
- 2) al-Amood WS, Lewis DM, Schmalbruch H : Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term denervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 441 : 243-56, 1991
- 3) Schmalbruch H, Lewis DM : A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat. *J Muscle Res Cell Motil* 15 : 256-266, 1994
- 4) Rodrigues A de C, Schmalbruch H : Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *The Anat Rec* 243 : 430-437, 1995
- 5) Isfort RJ, Hinkle RT, Jones MB, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Anderson NL, Sheldon RJ : Proteomic analysis of the atrophying rat soleus muscle following denervation. *Electrophoresis* 21 : 2228-2234, 2000
- 6) Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. : Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle : differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation. *Anat Embryol* 209 : 269-279, 2005
- 7) Hawke TJ, Garry DJ : Myogenic satellite cells : physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91 : 534-551, 2001
- 8) Morgan JE, Partridge TA : Muscle satellite cells. *Intern J Biochem Cell Biol* 35 : 1151-1156, 2003
- 9) Carlson BM, Faulkner JA : Reinnervation of long-term denervated rat muscle freely grafted into an innervated limb. *Exp Neurol* 102 : 50-56, 1988
- 10) Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM : Differentiation of activated satellite cells in denervated muscle following single fusions in situ and in cell culture. *Histochem Cell Biol* 124 : 13-23, 2005
- 11) Ijkema-Passen J, Meek MF, Gramsbergen A : Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve* 25 : 891-897, 2002
- 12) Jankowski RJ, Haluszczak C, Trucco M, Huard J : Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique : potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells. *Hum Gene Ther* 12 : 619-628, 2001
- 13) Lynch GS : Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders. *Exerc Sport Sci Rev* 29 : 141-148, 2001
- 14) Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N, Fabiani JN, Carpentier AF : Cellular cardiomyoplasty : clinical application. *Ann Thorac Surg* 77 : 1121-30, 2004
- 15) Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, Dismore JH, Wright S, Aretz TH, Eisen HJ, Aaronson KD : Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol* 41 : 879-888, 2003
- 16) Richler C, D.Yaffe : The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol* 23 : 1-22, 1970
- 17) Rando TA, Blau HM. : Primary Mouse Myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol* 125 : 1275-1287, 1994
- 18) Qu Z, Balkir L, Van Deutekom JCT, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J : Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol* 142 : 1257-1267, 1998
- 19) Jejurikar SS, Marcelo CL, Kuzon WM Jr : Skeletal muscle denervation increases satellite cell susceptibility to apoptosis. *Plast Reconstr Surg* 110 : 160-168, 2002
- 20) Caiozzo VJ, Wu YZ, Baker MJ, Crumley R : Effects of Denervation on cell cycle control in laryngeal muscle. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130 : 1056-1068, 2004
- 21) Chammas M, Rabischong E, Picot MC, Gaviria M, Roger P, Micallef JP, Prefaut C, Allieu Y : Functional and histologic effects of a free nonvascularised muscle graft implanted into a reinnervated muscle after prolonged denervation. *Microsurgery* 17 : 545-50, 1996
- 22) Lazerges C, Daussin PA, Coulet B, Boubakerel Andaloussi R, Micallef JP, Chammas M, Reyne Y, Bacou F : Transplantation of primary satellite cells improves properties of reinnervated skeletal muscles. *Muscle Nerve* 29 : 218-226, 2004