

【助成 40-55】

腱の三次元培養技術と力学的収縮を組み合わせた抗運動器治療戦略

同志社大学 スポーツ健康科学部 助教 土屋吉史

〔研究の概要〕

加齢は体重や脂肪量増加だけでなく筋骨格系組織の機能を惰弱にし、QOL 低下をもたらす。本研究課題では、「腱の臓器連関特性」に着目し、これを上手く利用することで筋肉へ負荷をかけることなく、加齢に伴う筋量低下に効果的な戦略構築に挑戦した。まず、エストロゲン減少をもたらす閉経後女性を模倣したマウスを作出し、筋肉と腱組織から細胞をそれぞれ単離した。その後、腱細胞の存在下で、筋芽細胞の増殖能がどのように変化するかを観察した。その結果、エストロゲンを減少させたマウス由来腱細胞の存在下では細胞増殖の指標である EdU 陽性の筋芽細胞数が減少していたことが示された。これは、エストロゲンが筋-腱臓器連関における筋芽細胞増殖に重要であることを示唆するものであった。

〔研究経過および成果〕

加齢に伴う筋量や筋力が減少するサルコペニアは、運動器機能低下症の主要因であり QOL 低下をも誘発する。そのため、サルコペニアを抑える試みは、心身ともに健康を維持する上で欠かせない。さらに、昨今の COVID-19 感染拡大の影響による外出機会の減少・活動量の低下が問題視されており、ますます運動器の惰弱性を軽減する研究の発展が求められている。しかし、筋量や骨量の減少により運動器に悩みを抱える高齢女性などは、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現状にある。そこで本研究課題では、これまで殆ど治療対象にされてこなかった臓器「腱」に着目し、腱の臓器連関特性を上手く利用することで筋肉へ負荷をかけることなく、サルコペニアの進行を遅らせる治療戦略構築を目的とした。

【成果 1: 後高齢女性モデルマウスの作出】

高齢女性は、女性ホルモン（主にエストロゲン）が著しく低下することで、体重および脂肪量の増加、筋

骨格系臓器の機能低下などを呈することが知られている。本研究では閉経後の高齢女性を模倣したマウスを作出することで、ヒトでは解明することのできないこれらメカニズムの解明に迫る。このためまず、エストロゲンが減少する閉経後女性モデルマウスを正確に作出することが求められた。

閉経後女性モデルマウスは 6 週齢の雌 C57BL/6 wild-type マウス (SLC, Shizuoka, Japan, n = 4) の卵巣切除 (ovariectomy: OVX) 手術により作出された。OVX 手術は、3 種混合麻酔を用い麻酔下にて行われた。まず、腹部を 1 cm 程度切開し、子宮の末端にある卵巣を完全に切除した。その後切開部を縫合し、覚醒までモニタリングを行った。対照群は、卵巣を切除しない Sham コントロールとした (n = 4)。OVX



図 1. 子宮サイズ
左: 通常のマウスの子宮
右: 卵巣切除マウスの子宮

後 24 週間までは通常飼育を行い、その後解剖を実施した。その際、子宮サイズと体重、そして内臓脂肪

量を測定した。その結果、OVX マウスの代表的な表現型である、子宮サイズの著しい減少が確認された(図 1)。また、体重および内臓脂肪量も OVX マウス群で大幅に増加していた (data not shown)。これは、本研究で実施した OVX 手術が、ヒトの閉経後女性を模倣し得ることを示している。

【成果 2: 細胞の単離】

OVX マウスの腱の臓器連関特性を理解するために、*in vitro* の実験を行った。まず、解剖で得られた筋および腱組織からそれぞれ筋芽細胞と腱細胞の単離・初代培養を行った。筋組織には筋芽細胞だけでなく様々な細胞が混在しているため、先行研究の方法に基づき CD56 磁器ビーズ抗体を用いた細胞単離法にて、筋芽細胞を特異的に単離した。次いで、単離した細胞の純度を確認を、筋芽細胞の指標である Desmin と、線維芽細胞の指標である TR-ER7 抗体を用いた蛍光免疫染色にて行った(図 2)。その結果、両群共に筋芽細胞分画において、筋芽細胞の指標である Desmin の陽性細胞が 88% ~ 98% の割合で存在していたことを確認した(図 2)。腱は両群ともに TR-ER7 陽性かつ、Desmin 陰性を示したことから、単離した腱細胞集団の中には筋系譜を有する細胞が殆ど存在していないことを確認した(図 2)。これらのことから、今回採取した筋芽細胞と腱細胞は純度よく単離することができたものと考えられる。

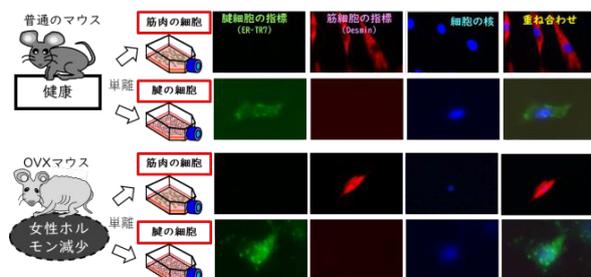


図 2. 免疫蛍光染色による筋芽細胞および腱細胞の精製度確認
上 2 列の画像: Sham コントロールマウスの筋芽細胞および腱細胞
下 2 列の画像: OVX マウスの筋芽細胞および腱細胞

【成果 3: 共培養実験】

OVX 由来の腱細胞と筋芽細胞を共培養し、エストロゲン減少が腱細胞存在下における筋芽細胞の増殖能に及ぼす影響を観察した(図 3)。

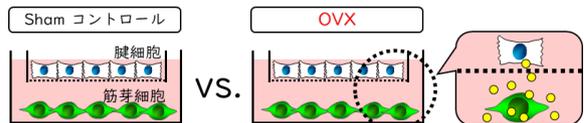


図 3. 腱細胞と筋芽細胞との共培養と、腱細胞が因子を放出するイメージ(右)

筋芽細胞は、筋分化制御過程で先ず増殖期に入る。そこで、腱細胞の存在下で筋芽細胞がどの程度増殖するのかを、細胞の増殖能評価に用いられる細胞周期(細胞分裂の過程)の指標である Ki67 や EdU の陽性細胞数を比較した。その結果、Ki67 陽性細胞数は両群とも差は認められなかったものの、EdU 陽性細胞数は OVX 群で有意に減少していた。これは、OVX マウス由来腱細胞が筋芽細胞の S 期(DNA 合成期)への移行を抑えていることを示唆するものであった。以上のことからエストロゲンの減少は、腱細胞存在下による筋芽細胞の増殖能を負に制御してしまうことが明らかになった。これにより、エストロゲンは筋量維持に重要な筋と腱の臓器連関に必要であることが示唆された。

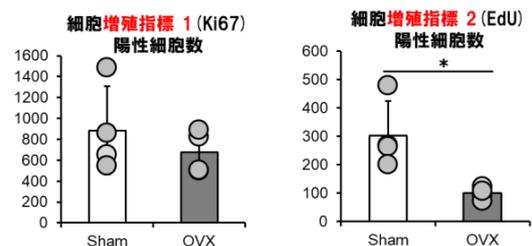


図 4. 左) ki67 陽性細胞数、右) EdU 陽性細胞数、平均±標準偏差

今後は、OVX マウス由来腱細胞の三次元培養、プロテオーム解析によるタンパク質の特定、筋-腱臓器連関の脆弱性が運動などによって回復させることができるか否かを明らかにしていきたい。

【発表論文】 該当なし