

令和 3年 7月 2日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960209

氏名

土屋吉史

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: Institute of Sports Medicine Copenhagen (国名 デンマーク)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

腱による臓器間コミュニケーションを活かした運動器疾患に対する運動療法の確立3. 派遣期間: 平成・令和 1年 7月 1日 ~ 令和 3年 5月 25日 (695 日間)

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.部局名: Institute of Sports Medicine Copenhagen5. 所期の目的の遂行状況及び成果...書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

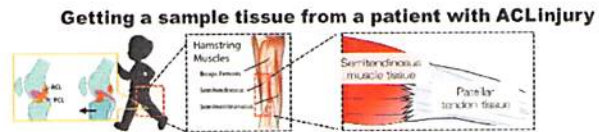
## 【所期の目的】

健康寿命の延伸には、加齢に伴う肥満や糖尿病などの「代謝疾患」だけでなく、筋萎縮症・骨粗鬆症などの「運動器疾患」への対策が重要である。これまで、運動療法などの対策が講じられてきているものの、これらの疾患の罹患率はいずれも増加しており (平成 28 年国民健康・栄養調査) 決定的な解決には至っていない。そこで私は、抗運動器疾患対策の突破口を切り開くべく、臓器間コミュニケーションを活かした運動療法に着目した。興味深いことに、同じ運動器でありながらこれまで殆ど注目されてこなかった人体で最も強靱で骨格筋と骨を繋ぐ「腱」でも、運動による筋量維持に重要な因子 (IL-6) や骨形成因子 (BMP) の産生が報告されている (Wang et al., *Dev. Cell.* 2010)。これは、腱が単なる結合組織ではなく筋萎縮を防ぎかつ骨形成を促すメッセージを送る内分泌器官であることを示唆している。腱が運動器疾患に効果的な内分泌因子を分泌することを証明することができれば、これまで知られることのなかった筋や腱のコミュニケーションを利用した、新たな予防医学的な理想の運動療法構築に繋がるとの着想に至った。

本研究課題では派遣先研究機関にて、骨格筋を正に制御する腱由来生理活性因子の同定とその機能を明らかにし、新たな運動療法を構築することを目的とした。

## 【成果】

ACL (anterior cruciate ligament) 損傷患者の再建手術により得られた、半腱様筋 (Semitendinosus muscle) あるいは半膜様筋 (Gracilis tendons-muscle) とこれらに付随する膝蓋腱 (Patellar tendon) をそれぞれ採取した。まず、得られた筋組織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 (Fig. 1)。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 (Giordani et al. *Mol Cell*. 2019)、筋芽細胞となる筋芽細胞前駆細胞を特異的に採取すべく我々は 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。単離後、筋芽細胞の指標である Desmin 抗体を用い 88% ~ 98% の割合で筋芽細胞を精製できていたことを確認した (Fig. 2)。本研究では同一被験者から両細胞を単離しその後共培養を行うことから、増殖スピードの速い筋芽細胞を凍結保存する必要があった。したがって、解凍後の細胞であっても Desmin 陽性を維持するか否かを検証した。そして凍結後の筋芽細胞でも Desmin 陽性を維持していることを確認した。次いで腱細胞の単離を行った。筋芽細胞の単離同様、培養後、得られた腱細胞は腱線維芽細胞および腱細胞の指標である TE7 および Scleraxis と Tenomodulin 染色にて、精製度を確認した (Fig. 2)。Scleraxis と Tenomodulin 陽性を示した腱細胞は、殆ど TE7 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ほとんど存在していないことを確認した (Fig. 3)。



### Isolation cell from each tissue, and expand

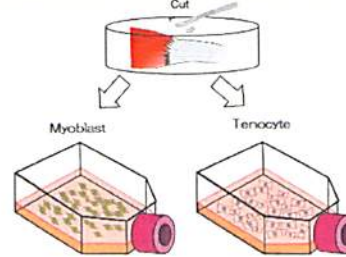


Figure 1. A schematic illustrating for cell isolations

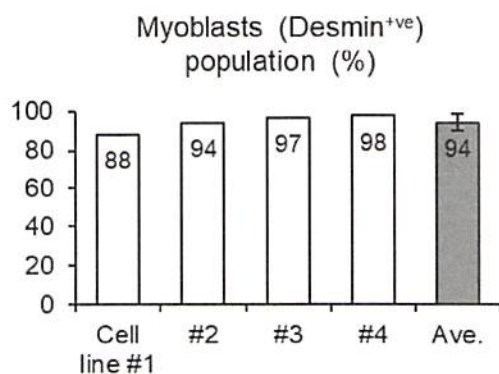


Figure 2. Desmin+ cells in the CD56+ selected myoblast populations of four cell lines (White bar) and the average (Gray bar).

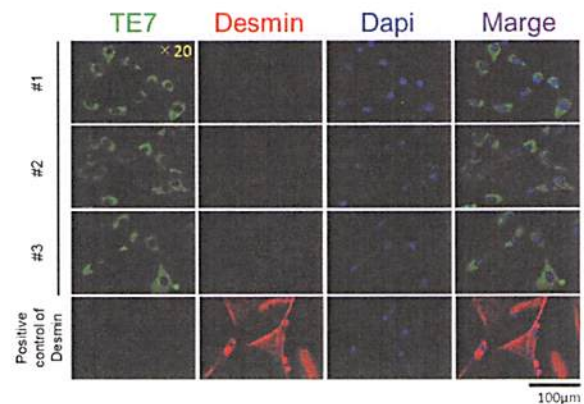


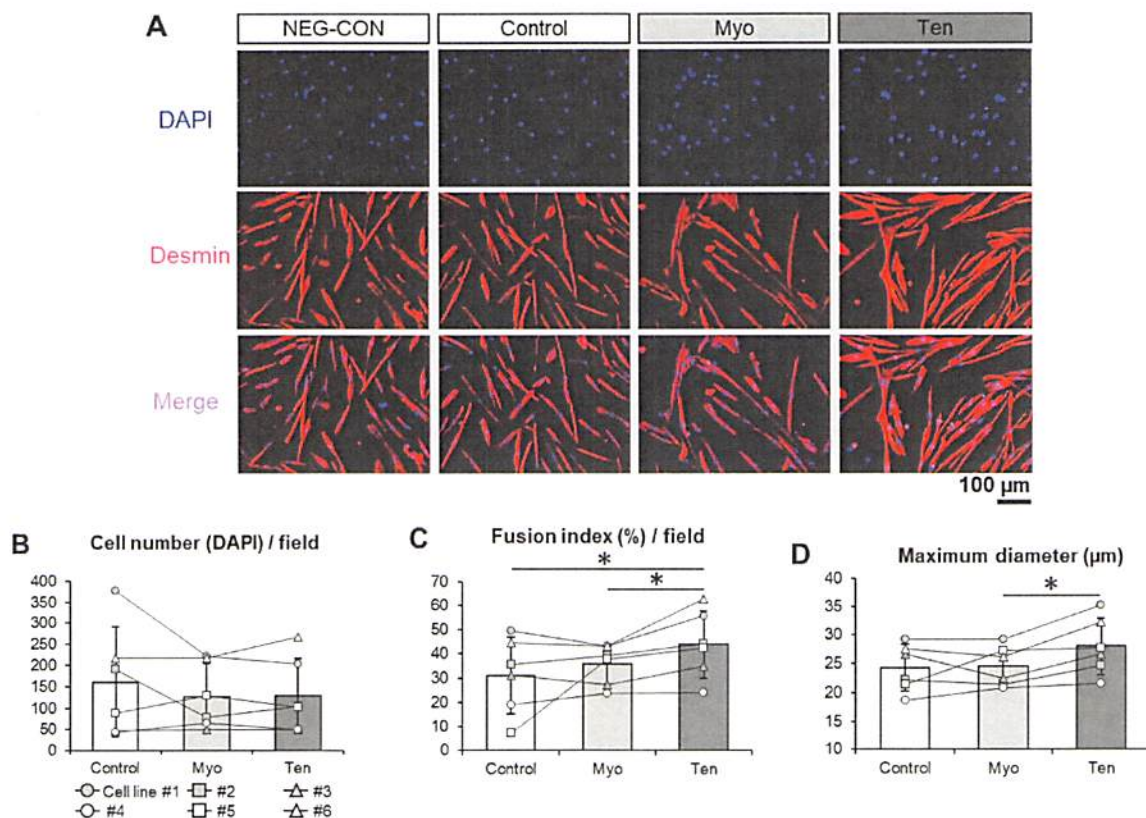
Figure 3. Immunostaining of myoblasts and tenocytes with Desmin and TE7 anti-bodies

ヒト由来の腱細胞と筋芽細胞の至適な培養条件をそれぞれ検討した後、これらの細胞を共培養し、腱細胞が筋芽細胞の分化制御に寄与するか否かを検証した。通常、休止期から活性化した筋幹細胞は筋芽細胞となり、増殖期を経たのちに筋分化し筋管を形成する。そこで先ず、腱細胞の存在下で筋芽細胞がどの程度増殖するのかを、増殖した細胞の絶対数、増殖能の評価によく用いられる細胞周期の指標である Ki67 や BrdU 染色による陽性細胞数の比較で評価した。しかし、総細胞数、Ki67 陽性細胞数、BrdU 陽性細胞数はいずれも、条件間で有意差は認められなかった。

筋分化の評価には、培地を筋分化専用の培地に変えて行い、Desmin を発現する筋管細胞の出現度



合いを定量し、比較した。この出現度合いは、筋管の細胞質にどの程度核が含まれているかにより評価する Fusion index (%) (形成された一つの筋管の中に 5 つ以上の核がある場合をカウント) や筋管の直径などにより評価を行った。その結果、腱細胞の存在下で培養した筋芽細胞 (Ten) は、細胞の無い条件 (Control) に比べ高い Fusion index 値を示した (Fig. 4A, C)。さらに興味深いことに、腱細胞存在下で認められたこの応答は、筋芽細胞の存在下でのそれ (Myo) より顕著にみられた (Myo vs. Ten) (Fig. 4A, C)。筋管の直径を測定してみると、筋芽細胞の存在下で培養した筋管の直径よりも腱細胞のそれの方が有意に長く、筋管の直径は Fusion index の値を反映するものであったことが分かった (Fig. 4D)。この応答を筋分化指標の遺伝子発現で調べてみると、腱細胞存在下で培養した筋幹細胞でミオシン重鎖 TypeIIx の有意な増加が認められた。なお、筋管形成能は細胞密度に依存することも考えられたが、条件間に細胞数の違いは観察されなかった (Fig. 4B)。この結果は、腱細胞が、筋分化を促す何らかの因子を放出していることを示唆するものである。



**Figure 4. Human derived tenocytes promote differentiation of myoblasts**

**(A)** Immunostaining of myotubes with DAPI and Desmin (quantified in **(B)** and **(C)** as cell number and fusion index (%), respectively). Scale bar, 100 μm.

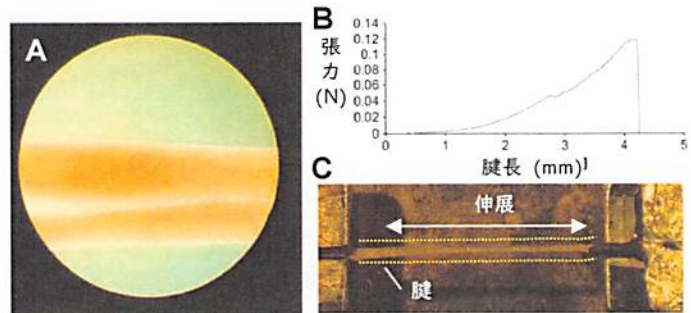
**(D)** Maximum diameters of myotubes.

n=6 in each condition, 5 images (Center, top, left, bottom and right sides) with 20x magnification were counted per well. \*P < 0.05. Values are means ± SD.

次いで、先の研究結果で見られた筋分化能は、腱細胞から生理活性因子が能動的に放出されたものによるのか、或いは受動的に放出されたものによるのかを検討した。ここでは、筋芽細胞・腱細胞をそれぞれ単独で培養し、その際に得られた培養上清をそれぞれ筋芽細胞に添加することで筋分化能を再び評価した。これにより、もし腱細胞培養上清を添加した際に筋分化が促進されれば、腱細胞は能動的に生理活性因子を放出していることが予想される。実験の結果、腱細胞培養上清のみならず筋芽細胞培養上清の添加時でも、筋分化は促進された。予想外に、筋芽細胞培養上清を添加した条件の方が腱細胞の条件よりも筋分化が促進されていた。これらの結果は、腱細胞・筋芽細胞の双方が筋分化に寄与する生理活性因子を能動的に放出していることを示している一方で、先の実験で見られたような腱細胞存在下での強い筋分化応答は、腱細胞と筋芽細胞の互いの存在が無い場

合発揮されないことを示唆するものである。つまり、筋分化制御に関わる腱細胞の生理活性因子の産生機構は、筋芽細胞の存在があって初めて誘発される可能性があるといえる。

現在は、腱様組織を生体外で培養・構築可能なラボオリジナル技術である腱の 3 次元培養法 (Bayer et al, *Biomaterials* 2010) を用い運動トレーニングを模倣するような力学的負荷をかけることで、今回得られたような筋分化を増強させることができるか否かを検証している。この方法は、腱細胞ニッチを組織様に再現することのできる技術である。さらに、この技術と腱の力学的刺激を加える装置を用いることで腱様組織の運動モデルを構築した。またこの腱の 3 次元培養技術を用い、2 次



**Figure 5. Tendon constructs by 3D culture methods**  
**(A) Image of tendon construct made by 3D culture**  
**(B) Strain test of tendon construct**  
**(C) Mechanical elongation equipment for strain test of tendon construct**

元培養 (通常の培養法) では不可能な腱の張力も測定することができ、機能評価も可能となる。今後はこのモデルを用い、腱の伸展で誘発される生理活性因子を特定し、筋や骨芽細胞に対する効果を検証していきたい。未だに十分なデータは得られていないが、このモデルに関する技術を習得することができた点は今回の派遣の成果であるといえる。

#### 【成果発表】

現在、派遣先研究室で実施した研究成果を学術論文として投稿中である。学会発表に関しては、2020年9月に日本体力医学会にて、12月に2度 Danish society for matrix biology annual meeting (デンマークを中心とした、ヨーロッパ数各国の研究者が参加するマトリックス生物学の研究会) と Lassemdargen annual meeting (デンマークにある病院に勤務する研究者や関係者で構成される、臨床から基礎研究のための研究会) にて成果発表をした。