

【研究資料】

収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) による
骨格筋間質細胞の観察小林正利¹⁾, 太田啓介²⁾, 東 龍平³⁾, 中村桂一郎²⁾, 櫻井忠義¹⁾¹⁾ 日本体育大学健康教育学研究室²⁾ 久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門³⁾ 久留米大学電子顕微鏡室Observation of stromal cells of mice skeletal muscle with focused
ion beam scanning electron microscope (FIB/SEM)Masatoshi KOBAYASHI, Keisuke OHTA, Ryuhei HIGASHI, Kei-ichiro NAKAMURA
and Tadayoshi SAKURAI

Abstract: The interstitial space of mice skeletal muscles were observed with focused ion beam scanning electron microscope (FIB-SEM) into 600 slice pictures and were reconstructed in 3D images by computers program to develop the localization and formation of stromal cells in the interstitial spaces. The stromal cells in interstitial spaces area is muscle spindle were existed along peridermal nucleus lateral pericyte of muscle spindle outer capsule and contacted to pericyte with their tentacles in there observation. It was considered that there are some communication between stromal cells and pericyte of muscle spindle. Therefore, it was suggested that stromal cells were some rolls in repairing of muscle damage or muscle spindle damage, or functional maintenance of them, including the possibility that they are niche.

(Received: May 8, 2012 Accepted: July 16, 2012)

Key words: FIB-SEM, muscle stromal cells, muscle spindle

キーワード : FIB-SEM, 筋線維間質細胞, 筋紡錘

1. 緒 言

従来から骨格筋には筋衛星細胞が存在し、組織幹細胞としての働きを持つことが知られてきた。また、骨格筋間質にはマクロファージ、線維芽細胞等の単核細胞が存在することも知られている。一方で骨格筋組織間質に存在するこれらの細胞を含む単核細胞が筋線維の修復に荷担するという報告¹⁻³⁾がある。損傷した骨格筋の再生には筋衛星細胞だけではなくマクロファージ自身やマクロファージから分泌されるサイトカイン⁴⁾が重要であることも知られており、筋線維間質に存在する単核細胞は組織再生に重要な役割を演じていると考えられている^{2,3)}。

再生医療との関連においてES細胞、iPS細胞⁵⁻⁷⁾、骨髄由来細胞⁸⁾、Muse細胞⁹⁾等の幹細胞が注目され、様々な研究が行われている。末梢組織には、脂肪組織由来幹細胞¹⁰⁾や心臓由来幹細胞¹¹⁾等の様々な組織幹細胞が

存在し、これらの細胞が多分化能を有することも報告されている。我々はGFPマウスから骨髄を移植した動物(以下骨髄移植キメラマウス)を用いて骨髄由来細胞とその他の細胞の相互関係について研究してきた¹²⁻¹⁵⁾。しかしながら、骨格筋組織においては間質に存在する単核細胞が正常筋線維の周囲にどのように存在するか、また、筋修復過程において筋線維や筋衛星細胞と如何なる相互関係を有するのか等については未だ不明瞭な点が多く、この問題を解き明かすことにより有効な筋損傷治療に貢献するだけでなく、スポーツやリハビリ過程での効果的なトレーニング法の開発や更には今まで治療困難であった難病の治療法の確立の為に極めて重要であると考えられる。

また、近年電子顕微鏡観察法の発展およびコンピュータ計算速度の発達に伴い電子顕微鏡観察による微細構造の3次元再構築も盛んに行われるようになってきた^{16,17)}。収束ガリウムイオンビームを用いて試料

表面を切削しながら走査型電子顕微鏡 (focused ion beam scanning electron microscope ; 以下 FIB-SEM) で連続的に反射電子像を撮影し 3 次元再構築を試みた報告¹⁷⁾も見られ、特にこの方法は比較的広範囲な試料面の観察と深さ方向の情報取得に優れており細胞、組織レベルでの構造を解析するために有利であると考えられる。

そこで本研究はこれら骨格筋組織間質に存在する細胞同士の相互関係を明確にするため FIB-SEM を用いてマウスの骨格筋を観察し、取得した画像を 3 次元再構築して検討をおこなった。

2. 方 法

1) 試料の採取

実験は日本体育大学倫理委員会により審査、承認を請け (承認番号第 011-A01 号)、日本体育大学動物実験規定ならびに久留米大学動物実験規定に基づいて行った。

実験動物は 10 週齢 C57BL/6J マウスを用いた。

電子顕微鏡観察のための試料は、Ohta ら¹⁷⁾の方法に従い動物をペントバルビタールナトリウム麻酔下で開胸、開腹し、心臓左心室より生理食塩水を灌流後、2%パラフォルムアルデヒド/2.5%グルタルアルデヒド/0.1 M カコジleit buffer により灌流固定を行った。その後、後肢からヒラメ筋を摘出した。摘出したヒラメ筋は 1 mm³ 角に細切し、上記固定液にて 4°C で 2 時間浸漬固定を行い 0.1 M カコジleit buffer にて 3 回洗浄後、2% OsO₄ と 1.5% フェロシアン化カリウムを 0.1 M カコジleit buffer に混和した溶液に 4°C で 1 時間浸漬した。さらに蒸留水で 5 回洗浄後、1% チオカルボヒドライド水溶液に室温で 1 時間浸漬した。またさらに蒸留水で 5 回洗浄後、2% OsO₄ 水溶液に浸漬し蒸留水にて 5 回洗浄の後、電子顕微鏡観察時のコントラストを上げるために 4% 酢酸ウラン・25% メタノール溶液で一晩ブロック染色を行い、その後蒸留水にて洗浄した。試料はさらに Walton¹⁸⁾ のアスパラギン酸鉛水溶液にて 2 時間浸漬した。試料はエタノールの上昇脱水系列 (25%, 30%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, 各 10 分間) で脱水の後、エポキシ樹脂 (Epon 812, TAAB 社製) 包埋し 60°C で 72 時間重合させた。完全に重合した樹脂は 1.5 mm 角にトリミングし、Ultracut E microtome (Leica 社) 上にセットしたダイヤモンドナイフで表面を切削後に走査型電子顕微鏡 (以下 SEM) 用試料ホルダーにセットした。

2) 収束イオンビーム搭載型走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) による観察および 3 次元再構築

SEM 用試料ホルダーに乗せた試料はチャージング

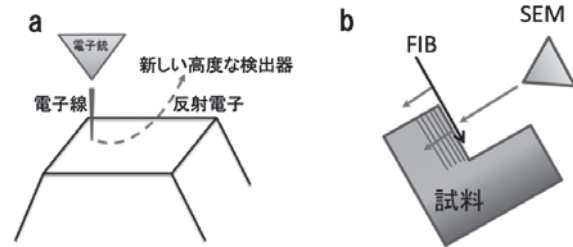


図 1 FIB-SEM による試料の観察。高度な検出器で反射電子を検出しブロック表面の試料の構造を観察する (a)。試料を FIB で 0.1 μm ずつ切削しながら反射電子像を走査検出していく (b)。(久留米医学会雑誌 vol. 75 P 1-10, 2012 の図を改変)

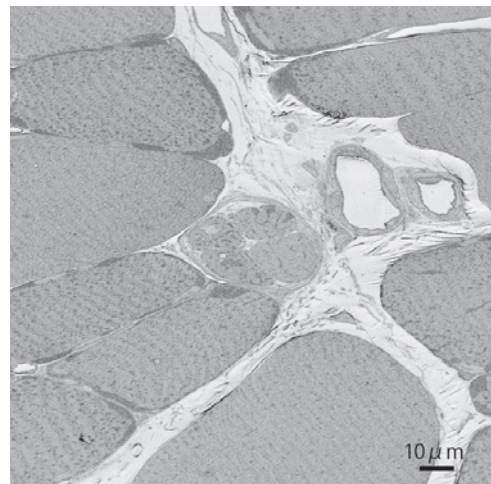


図 2 FIB-SEM によるブロック表面の観察

を防ぐために表面にカーボン蒸着し FIB-SEM (Quanta 3D FEG, FEI 社製) にセットした。その後、図 1a に示すように試料表面を加速電圧 5.0 KV bias 2.5 KV の条件で反射電子像を撮影し、FIB で切削しながら観察していく場所を確定の後 69.1 μm × 50 μm の領域を収束ガリウムイオンビーム (加速電圧 30 KV, 3.0 nA) (以下 FIB) で 0.1 μm ずつ切削しながら Slice & View G2 operating software (FEI 社製) にて連続的に 600 枚の反射電子像の自動撮影を行った (図 1b)。得られた画像は Avizo 6.3 software (VSG 社製) にて image stacking を施すとともに 3 次元再構築像を作製した。

3. 結 果

1) ブロック表面の観察

通常の SEM 観察では試料表面の凹凸のみが観察可能であるが、Quanta 3D FEG に搭載してある反射電子検出器を用いて観察を行うと図 2 に示すように、透過型電子顕微鏡で観察するような像を得ることができる。この像から筋紡錘を含む骨格筋組織間質領域を選択し、試料側面をガリウムイオンビームで試料側面を切削しながら反射電子像撮影をおこなった。

2) FIB 切削面の観察

Quanta 3D FEG では Ohta ら¹⁷⁾ が示しているように試料表面に対して直行する側面を FIB で切削したあと

に試料面を電子銃で撃ち、得られた反射電子を検出器で走査し映像を取得していくことから、得られた画像も図 2 の写真とは直行したものであった (図 3a, 4)。

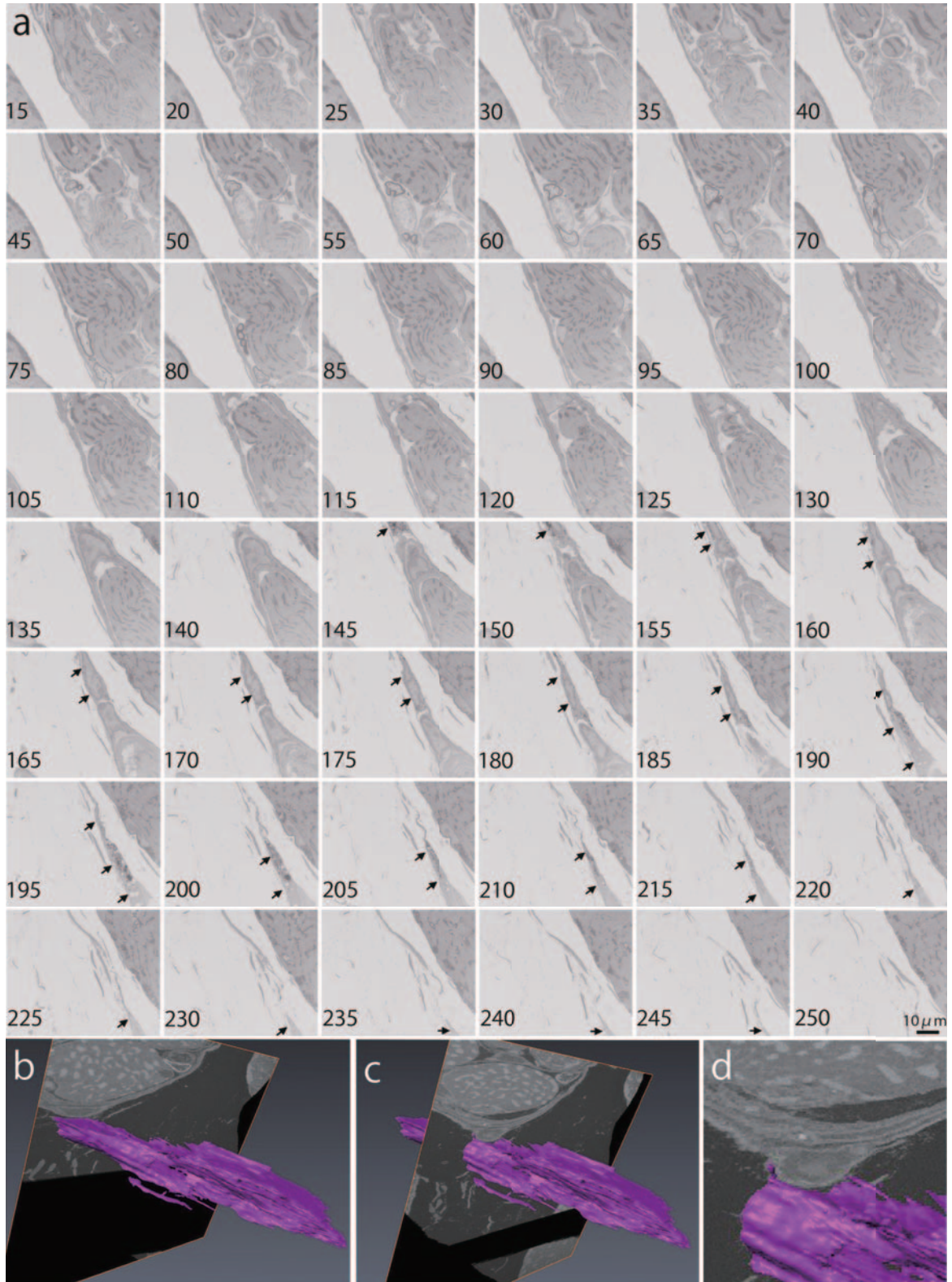


図 3 FIB-SEM による連続画像の観察と 3D 再構築像。600 枚連続撮影を行ったもののうち 15 枚目から 250 枚目の画像を 5 枚ごとに表した (a)。各写真の左上の番号は撮影順を示す。145 から 250 枚目の矢印 (↑) は骨格筋組織間質細胞を示す。連続撮影した画像の 3 次元再構築像 (b-d)。筋紡錘および間質細胞 (ピンク)。d は c の周皮細胞核周辺の拡大像。

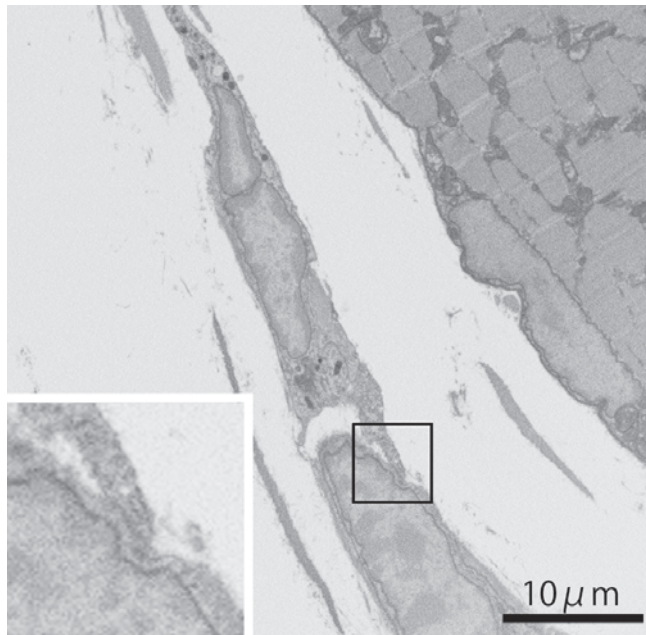


図4 骨格筋間質細胞から伸びる触手 (178 枚目)。左下は□部の拡大。触手と周皮細胞間にはギャップ結合等は見当たらないが接触していることがわかる。

また FIB で切削した表面はダイヤモンドナイフで切削された試料と同様に試料表面が滑らかで、観察像も透過型電子顕微鏡像に比しても遜色が無い画像が得られるとともに骨格筋組織の微細構造についても詳細に観察することができた。

3) 連続観察像による筋紡錘周辺の骨格筋間質細胞の観察

試料を FIB で $0.1 \mu\text{m}$ ずつ切削しながら 600 枚の反射電子像を取得したもののうち、筋紡錘と間質細胞の像が確認できた 15 枚目から 250 枚目の写真を 5 枚おきに表したものを示す (図 3a) とともに連続撮影により得られた画像から 3 次元再構築像を作製したものの (図 3b-d) を示した。試料を $0.1 \mu\text{m}$ ずつ連続的に観察することで骨格筋線維、間質中の筋紡錘、骨格筋間質細胞の形態学的相互関係を詳細に検討することができた。

骨格筋間質細胞の 3 次元再構築像は全体として紡錘形をしており (図 3b, c)、筋紡錘の外鞘を構成している細胞のうち、最外層にある周皮細胞の核に沿うように局在し、細い触手様の突起を核周辺に伸ばしていることが確認できた (図 3d)。また、この突起と周皮細胞間にはギャップ結合等の細胞接着分子は見あたらなかったものの密接している事が確認できた (図 4)。

4. 考 察

本研究は FIB-SEM を用い骨格筋組織間質細胞の局在と周辺の細胞との相互関係を観察し検討したものである。従来から電子顕微鏡で連続超薄切片を観察する

ことにより 3 次元再構築することは行われてきているが、 50 nm 程度の切片を数百枚から数千枚連続超薄する必要がある上に大変な時間を要する。また、得られた切片を観察・撮影するのも更に多大な労力を有していた。近年はコンピュータ精度の発達もあり、透過型電子顕微鏡の鏡筒中で切片を傾けながら自動的に透過電子像を撮影し、その画像から切片中に含有する構造物についてコンピュータを用いて 3 次元再構築を行うという研究¹⁶⁾も行われている。この方法は電子線が試料を通過する加速電圧に依存するため生物試料の観察で通常用いられる 100 KV 前後の加速電圧での観察であれば切片中に含まれる構造物の内、直径 $50 \sim 100 \text{ nm}$ 程度の構造物の再構築に限定されていた。しかしながら、本研究で使用した Quanta 3D FEG では切片の観察ではなく、試料ブロック表面を FIB で切削しながら撮影していくのでイオンビームで $0.1 \mu\text{m}$ ずつ切削しながら自動的に撮影していくことが可能であることから $60 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 程度の深さ方向の情報が取得可能である。しかも SEM 撮影の特徴を生かした比較的広範囲にわたって試料表面の観察が可能である。そのため細胞相互間関係を探索を行うのに有利であり、組織としての構築の観察にも優れている。一方で共晶点レーザー顕微鏡を使用して細胞間相互関係を探索した研究^{12,14)}も見られるが、共晶点レーザー顕微鏡は光学顕微鏡であるため電子顕微鏡よりも分解能の面で劣ってしまう。そのため高分解能で高精細に細胞全体や細胞同士の相互関係を探索する方法は現在のところ FIB-SEM を用いて観察することが最も有効な方法

であると考えられる。

本研究においては、マウスヒラメ筋の骨格筋組織間質を観察し、筋紡錘とその周囲の間質細胞の関係について検討を行った。通常、骨格筋組織間質にはマクロファージ、肥満細胞、線維芽細胞などの単核細胞が存在している。筋損傷を起こした場合には骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞ばかりが筋修復に係わるのではなくこれらの間質細胞が筋の修復に係わり、その修復ステージによって同じ細胞種でも働きの異なる細胞が患部に侵出し、組織再生に荷担していることが知られている¹⁹⁾。また、骨格筋組織間質に存在する単核細胞の中にはsp細胞等¹⁾の間葉系幹細胞が含まれており、これらの細胞は骨格筋や神経、血管への分化能を有することが報告されている^{1,2)}。しかしながら、これらの間葉系細胞が生体内では間質中の何処に局在し、どのような形状の細胞なのかは明確ではなかった。本研究においてFIB-SEMで観察した間質細胞(図3, 4)は、筋線維および筋紡錘の間隙で筋紡錘外鞘の周皮細胞核に沿うように存在していた。この間質細胞は細胞全体の形状が紡錘状であること、細胞質中に粗面小胞体が豊富であることから、線維芽細胞に分類される細胞であると考えられる。正常組織中の線維芽細胞の機能については、コラーゲンや各種生理活性物質の産生分泌能を有すること、組織の骨格形成、組織の運動および微小機械受容器であることが従来から知られていた^{15,20,21)}が実際には多様な形態や機能を有する細胞群の総称²⁰⁾であると考えられている。Iinoら²²⁾は小腸の特定の層において線維芽細胞様の細胞が細胞間ネットワークを形成している事を報告している。また、皮下組織においては線維芽細胞同士がギャップ結合で連結し、皮下全体にわたるネットワークを作っているという報告²³⁾がある他、骨格筋線維周辺にはtelocyteと呼ばれる細長い突起を有する線維芽細胞様の細胞がネットワークを形成しているという報告もある^{24,25)}。Takayamaら¹²⁾は角膜中の組織内で、線維芽細胞とマクロファージ様の骨髄由来細胞が密接して存在していることを報告し、中村ら¹⁵⁾は皮下組織にもこの線維芽細胞とマクロファージ間の接触があり細胞間の密なシグナル伝達があるのではないかと予想している。

筋紡錘は、核鎖線維と核囊線維の2種類の紡錘内筋線維、 γ 運動神経、知覚神経、内鞘、外鞘から構成され、筋の伸張度を検知する器官であることが知られている。図4に示すように、本研究では線維芽細胞様の間質細胞が突起様の触手を周皮細胞の核周囲に伸ばしていることが観察された。この間質細胞と筋紡錘外鞘の周皮細胞との関係についてはこれまであまり注目されておらず、この関係について述べられた報告は見あたらない。本研究で観察された間質細胞の突起様の

触手と周皮細胞との関係はFIB-SEMで深さ方向の情報を連続的に検索し3次元再構築した結果得られた所見であると考えられる。本研究の観察ではこの突起様の触手と周皮細胞の間にはギャップ結合等の構造物は観察されなかったが、何らかの細胞間の情報伝達が行われていることが考えられる。これらの細胞間には線維芽細胞とマクロファージ間で考えられているシグナル伝達等¹⁵⁾と同様な密な連絡があるのではないかと推察される。また、近年再生医療の分野で注目されているiPS細胞やMuse細胞は結合組織中の線維芽細胞から作製^{5-7,9)}されていることを考えれば、線維芽細胞を含む間質細胞には従来から知られている機能の他に新たな機能を有することが予想される。さらにtelocyteや線維芽細胞が筋再生の際に筋衛星細胞や他の前駆細胞のニッチ(niche)として働く可能性を示唆する報告^{24,26,27)}もある。今回観察された骨格筋間質細胞は周皮細胞の核に沿って存在し、且つ触手を伸ばしていることからこのニッチとしての働きや周皮細胞の前駆細胞としての働きを有する可能性も示唆される。しかしながら、筋全体の伸張・収縮に伴った筋紡錘の微少な損傷の修復に荷担しているという可能性も推察される。いずれにしても外鞘周皮細胞の機能維持のためだけではなく、筋紡錘の正常な機能維持のために何らかの重要な役割を演じているのではないかと推察された。

5. 結 論

本研究は、FIB-SEMを用いマウスヒラメ筋の間質について連続600枚の画像を観察し、コンピュータで3次元再構築して間質細胞の局在、形態について検討を行った。

筋紡錘近傍の間質で線維芽細胞様の間質細胞が筋紡錘外鞘最外層の周皮細胞核に沿って存在し、間質細胞から周皮細胞に向かって触手を伸ばし、接触していることが観察された。

このことから、この筋組織間質細胞と筋紡錘周皮細胞の間には何らかの細胞間の連絡があることが示唆され、これらの間質細胞がニッチ niche である可能性を含め、筋紡錘や骨格筋組織の微少な損傷の修復や機能維持に何らかの役割を有するのではないかと推察されたものである。

本研究は、平成23年度日本体育大学学術研究補助費「骨格筋組織間質細胞の形態及び新たな機能の解明」に基づいて行ったものである。

6. 参考文献

- 1) Motohashi, N., et al., Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol*, 2008. 173(3): p. 781-791.
- 2) Tamaki, T., et al., Synchronized reconstitution of muscle fibers, peripheral nerves and blood vessels by murine skeletal muscle-derived CD34(-)/45(-) cells. *Histochem Cell Biol*, 2007. 128(4): p. 349-360.
- 3) Tamaki, T., Y. Uchiyama, and A. Akatsuka, Plasticity and physiological role of stem cells derived from skeletal muscle interstitium: contribution to muscle fiber hyperplasia and therapeutic use. *Curr Pharm Des*, 2010. 16(8): p. 956-967.
- 4) Robertson, T. A., et al., The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res*, 1993. 207(2): p. 321-331.
- 5) Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*, 2007. 2(12): p. 3081-3089.
- 6) Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-872.
- 7) Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-676.
- 8) Dezawa, M., et al., Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 2005. 309(5732): p. 314-317.
- 9) Wakao, S., et al., Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011. 108(24): p. 9875-9880.
- 10) Strem, B. M., et al., Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 2005. 54(3): p. 132-141.
- 11) Takehara, N., et al., Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardio-sphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 52(23): p. 1858-1865.
- 12) Takayama, T., et al., Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009. 292(5): p. 756-763.
- 13) 中村桂一郎, 末梢組織に分布する骨髄由来細胞の解析 間葉系細胞ネットワーク? 久留米医学会雑誌, 2006. 69(7-8): p. 229-236.
- 14) 中村桂一郎, 末梢組織における骨髄由来細胞の形と分布様式. 細胞, 2007. 39(9): p. 394-398.
- 15) 中村桂一郎, et al., 医学・医療の最前線シリーズ Circulating fibroblast!? 線維芽細胞再考. 久留米医学会雑誌, 2009. 72(7-8): p. 219-226.
- 16) Ohta, K., et al., Helical arrangement of filaments in microvillar actin bundles. *J Struct Biol*, 2012. 177(2): p. 513-519.
- 17) Ohta, K., et al., Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron*, 2012. 43(5): p. 612-620.
- 18) Walton, J., Lead asparate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology. *J Histochem Cytochem*, 1979. 27(10): p. 1337-1342.
- 19) Tidball, J. G. and S. A. Villalta, Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010. 298(5): p. R1173-1187.
- 20) Komuro, T., Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol (Berl)*, 1990. 182(2): p. 103-112.
- 21) Furuya, S. and K. Furuya, Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *Int Rev Cytol*, 2007. 264: p. 165-223.
- 22) Iino, S., et al., c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature. *Histochem Cell Biol*, 2009. 131(6): p. 691-702.
- 23) Langevin, H. M., C. J. Cornbrooks, and D. J. Taatjes, Fibroblasts form a body-wide cellular network. *Histochem Cell Biol*, 2004. 122(1): p. 7-15.
- 24) Popescu, L. M., et al., Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. *J Cell Mol Med*, 2011. 15(6): p. 1379-1392.
- 25) Suciu, L. C., et al., Platelet-derived growth factor receptor-beta-positive telocytes in skeletal muscle interstitium. *J Cell Mol Med*, 2012. 16(4): p. 701-707.
- 26) Mathew, S. J., et al., Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development*, 2011. 138(2): p. 371-384.
- 27) Murphy, M. M., et al., Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*, 2011. 138(17): p. 3625-3637.

〈連絡先〉

著者名：小林正利
 住 所：東京都世田谷区深沢 7-1-1
 所 属：日本体育大学健康教育学研究室
 E-mail アドレス：m-kobayashi@nittai.ac.jp