

研究題目:肥大筋における筋衛星細胞の活性化と self-renewal の制御機構～筋肥大時の筋衛星細胞における Pax7 の発現様式の変化～

研究代表者:石道峰典

目次

要約	1
I・緒言	2－3
II・方法	4－5
III・結果	6－7
IV・考察	8－9
V・参考文献	10－11
VI・図表	12－18

研究題目:肥大筋における筋衛星細胞の活性化と self-renewal の制御機構～筋肥大時の筋衛星細胞に
おける Pax7 の発現様式の変化～

研究代表者:石道峰典

要約:過負荷にさらされた骨格筋が顕著に肥大する際、筋線維の基底膜と形質膜の間に局在する筋衛星細胞が極めて重要な役割を果たす。In vitro において筋衛星細胞動態には、筋形成制御因子である MyoD や myogenin 及び細胞周期に関与する proliferating cell nuclear antigen (PCNA)や cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (p21)が相互作用することで、筋細胞系譜の決定、筋芽細胞の増殖、分化に関与していることが知られている。また近年では増殖後、未分化のまま静止状態に戻る筋衛星細胞の self-renewal の制御に Pax 7 が関与していることが示されている。本研究では、成熟骨格筋の筋衛星細胞動態に対する理解を深めるため、過負荷にさらされた骨格筋の筋衛星細胞に発現する MyoD とその関連因子との相互作用や Pax 7 の発現様式について検討した。実験動物に Fischer 系の雌ラット(8 週齢)を用いた。免疫組織化学染色法を用いて、過負荷にさらした足底筋より MyoD, myogenin, PCNA, p21 及び Pax 7 の局在と発現様式を観察した。過負荷足底筋では、筋衛星細胞で初めに MyoD と myogenin の発現が検出された。その後、筋衛星細胞で細胞周期の開始及びその後の停止が、PCNA と p21 の発現によって示された。これらの結果は、筋衛星細胞での MyoD, myogenin, PCNA, p21 の相互作用が筋肥大の誘導において重要な要因であることを示唆している。一方、過負荷にさらされた骨格筋の筋衛星細胞における Pax 7 の発現が検出された。筋衛星細胞で発現する myogenin, PCNA, p21 及び Pax 7 の発現様式の特徴から、Pax 7 を発現した筋衛星細胞は、未分化のまま self-renewal されている可能性が示唆された。本研究では、過負荷にさらされた骨格筋で適応変化が引き起こされる際に、筋衛星細胞における MyoD と他の関連因子との相互作用が筋肥大を誘導する上で重要な役割を演じていると同時に Pax 7 による筋衛星細胞の self-renewal が引き起こされている可能性を示した。

勤務先:大阪体育大学大学院

〒 590－ 0496 大阪府泉南郡熊取町朝代台 1-1

TEL: 072-453-8948 FAX: 072-453-7028

I・緒言

成熟骨格筋を構成する筋線維の基底膜と形質膜の間に筋前駆体細胞, つまり筋衛星細胞が局在している. 筋衛星細胞が筋芽細胞にコミットされ, 増殖, 分化の過程を経て, 既存筋線維と融合することが過負荷による筋肥大時には必要である(6, 14). 先行研究では, γ 放射線によって筋衛星細胞の増殖能を阻害した骨格筋を過負荷にさらした場合, 筋肥大は起きるもののその肥大率が極めて小さいことが報告されている(9). このことから十分な筋肥大を引き起こす上で筋衛星細胞の働きが重要な役割を担っていることがわかる. しかし, 過負荷にさらされた骨格筋で活性化した筋衛星細胞動が全て分化し既存筋線維と融合するののかも含め, 筋肥大時における筋衛星細胞動態を制御している分子生物学的機構に関しては, 未だに十分な見解は得られていない.

筋形成制御因子は MyoD, Myf5, myogenin, MRF4 から成る. MyoD は, ミオシン軽鎖, ミオシン重鎖, トロポニン I など複数の筋特異的遺伝子に対する中心的な転写因子である(8, 22, 23). さらに proliferating cell nuclear antigen (PCNA)の down-regulator である cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (p21)もまた MyoD の標的因子である(4, 21).

一般に線維芽細胞のような非筋細胞では MyoD は発現しない. しかし, 線維芽細胞で強制的に MyoD を発現させた場合, 筋芽細胞へと移行する. このことは, MyoD が筋細胞系譜を決定する上で極めて重要な役割を演じていることを示唆する(20).

PCNAは細胞周期の制御因子の1つであり, 特にS期において著しく発現する(2). 筋原性細胞の増殖時において MyoD は PCNA より先に発現するため, 筋衛星細胞の増殖を引き起こすための調整因子であると考えられている(19). 逆に筋芽細胞の増殖は, p21 の発現によって抑制される. p21 は PCNA の活性を抑制することによって細胞周期を停止させ(21), MyoD は p21 を直接発現させることにより筋芽細胞の増殖停止及び分化の誘導に関与する(5). MyoD^{-/-}筋原性細胞は筋芽細胞にコミットし増殖を開始するが, 分化の段階で筋管細胞形成遅延や不完全な細胞周期停止や融合不全などの異常をきたすことが報告されている(15, 24)また in vitro において myogenin は分化筋芽細胞で発現することが報告されている(7, 19). 従って, MyoD や myogenin や PCNA や p21 が成熟骨格筋における筋衛星細胞動態に深く関与していると考えられるが, 過負荷による筋肥大時の筋衛星細胞におけるこれらの蛋白質の発現様式に関しては十分な知見が得られていない.

さらに近年, 筋衛星細胞の self-renewal が注目されている. 増殖停止した筋衛星細胞が全て分化するわけではなく, 未分化のまま静止状態に戻り, 再び増殖能力を保持したまま保存される筋衛星細胞が存在する(3). この筋衛星細胞の self-renewal の制御機構に関しては不明瞭な点が多いが, Pax 7 と呼ばれる蛋白質が深く関与していると考えられている(3, 18). しかし, 過負荷による筋肥大時に増殖した筋衛星細胞

においても self-renewal が引き起こされているのかどうかに関しては明らかにされておらず, Pax 7 の発現様式に関しても不明瞭なままである.

本研究では, 過負荷にさらされた骨格筋の筋衛星細胞における MyoD, myogenin, PCNA, p21 そして Pax 7 の発現様式を検討した.

II・方法

実験概要

実験動物には 8 週齢の Fischer344 系雌ラット(n = 3/group)を用いた。実験に用いた被験筋は足底筋 (plantaris muscle, EDL)とした。実験動物は昼夜逆転した 12 時間の明暗サイクルの飼育小屋にて餌、飲水共に自由摂取の環境下で飼育した。動物実験の施行にあたっては、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)および日本学術会議によりまとめられた「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守した。

PLA に対する過負荷は、協働筋である腓腹筋及びヒラメ筋を切除することによって実現した。十分な麻酔(Pentobarbital sodium; 60 mg/kg body weight)下にて、実験脚の背面部を十分に暴露するために皮膚切開を行った。電気メスにてヒラメ筋をわずかな近位部を除いて完全に切除した。腓腹筋は、電気メスにて外側、内側ともに完全に切除した。反対脚に対しては擬似手術を施し、sham control とした。術後、1, 3, 5, 7 日目に麻酔下にて屠殺し、被験筋を摘出した。摘出された被験筋は速やかに液体窒素にて急速凍結し、分析に使用するまで -80 °C で保管した。

免疫組織化学染色

本研究で使用した一次抗体は以下の通りである。rabbit polyclonal anti-laminin (a marker molecule for the basement membrane; 1:3000; Sigma, St Louis, MO), goat polyclonal anti-M-cadherin (a marker molecule for SCs (1:200; Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA), mouse monoclonal anti-MyoD (1:100; DAKO, Carpinteria, CA), mouse monoclonal anti-Dystrophin (a marker molecule of the plasma membrane) (1:100; Sigma), mouse monoclonal anti-myogenin (1:100; BD PharMingen, San Diego, CA), rabbit polyclonal anti-Dystrophin (1:100; Lab Vision UK, Ltd.), mouse monoclonal anti-Pax7 (1:100; R&D systems, Inc. MN), mouse monoclonal anti-cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (1:100; BD PharMingen)。

免疫組織化学染色のために、筋腹より厚さ 10 μ m の連続縦断切片をクリオスタットにより作成した。切片を 4% paraformaldehyde/ 0.1 M phosphate-buffer (pH 7.4)で 15 分間固定した後、phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4)で洗浄した。非特異的反応を防ぐために、ブロッッキング溶液(10% normal serum, 1% triton X-100/ 0.1 M PBS)に 1 時間、インキュベートした。一次抗体は、5% normal serum と 0.3 % triton X-100 を含む 0.1 M PBS で適切な濃度に希釈した。二次抗体は、5% normal serum と 0.1% triton X-100 を含む 0.1 M PBS で適切な濃度に希釈した。

三重蛍光染色のため、4 °C 下で 16~48 時間、切片を一次抗体にインキュベートさせた後、16~24 時

間, 二次抗体でインキュベートさせた. 本研究で用いた二次抗体は, fluorescein-labeled horse anti-mouse IgG (1:300; Vector Labs), rhodamine-labeled goat anti-rabbit IgG (1:300; Chemicon, Temecala, CA) or the Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-goat IgG (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR)である. 切片を 0.1 M PBS で洗浄後, 核を可視化するために Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Labs)にて封入した. 画像分析は全て蛍光顕微鏡 (Bx51, Olympus Co., Tokyo, Japan) 及び RS image (Roper Scientific Inc., Chiba, Japan)を用いて行った.

統計処理

全ての数値は, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. 統計的有意差の検定は, unpaired t test を行った. 全ての検定において有意水準は 5%($p < 0.05$)とした.

Ⅲ・結果

協働筋切除による過負荷にさらされた骨格筋の相対筋重量は、全実験期間で sham-operated control に比べ著しい増加を示した。術後 1, 3, 5, 7 日目の筋肥大率は、それぞれ 49.7, 45.7, 43.3, 41.0%であり、有意な筋肥大を示した (Fig.1)。これらの結果は、先行研究による報告と一致していた (12, 16)。従って、これらの結果は、本研究で行った過負荷処置が過負荷による代償性筋肥大を引き起こす上で適切であったことを示す。

Expression of MyoD and myogenin in satellite cell nuclei

Sham-operated control 筋では、MyoD 及び myogenin の陽性反応は検出されなかった。術後 1 日目の骨格筋で MyoD (Fig. 2A)及び myogenin (Fig. 3A)の陽性反応が検出されたため、本研究では、筋衛星細胞核において MyoD 及び myogenin が発現しているかどうかの検討を行った。MyoD 及び myogenin, M-cadherin 抗体, DAPI を用いた重染色により、M-cadherin 陽性反応と MyoD (Fig. 2B-E)及び myogenin (Fig. 3B-E)陽性反応が共存することが示された。これらの結果は、過負荷初期の段階から M-cadherin 陽性筋衛星細胞の核で MyoD 及び myogenin が発現していることを示す。

Entry into and withdrawal from the cell cycle in satellite cells during functional overload

術後 3 日目の過負荷筋において PCNA の陽性反応を検出した (Fig. 4A)。さらに PCNA, M-cadherin 及び DAPI による重染色を行った結果、PCNA 陽性反応が M-cadherin 陽性筋衛星細胞核で検出された (Fig. 4B-E)。一方、sham-operated control や術後 1 及び 7 日目の骨格筋では PCNA の陽性反応は検出されなかった。これらの結果は、筋衛星細胞核における PCNA の発現は、MyoD 発現より遅れて引き起こされることを示す。

増殖筋衛星細胞の細胞周期停止は、筋芽細胞の分化のために必要である 6。本研究では細胞周期の停止に関与する p21 の発現様式を検討した。その結果、術後 5 日目で過負荷にさらされた骨格筋で p21 の陽性反応が検出された (Fig. 5A)。しかし、この発現は、sham-operated control や術後 1, 3, 7 日目の骨格筋では検出されなかった。p21, laminin, DAPI による重染色によって筋線維を取り囲む laminin 陽性基底膜の内側の核で p21 の陽性反応が検出された (Fig. 5B-E)。さらに p21 陽性の核は、M-cadherin と共存していた (Fig. 5F-I)。従って、これらの結果は、p21 が過負荷 5 日目の筋衛星細胞の核で発現していることを示す。

Expression of Pax 7 in satellite cell nuclei

本研究では過負荷筋における Pax 7 の発現様式を検討した. 術後 1 日目の過負荷筋において Pax 7, laminin, DAPI による重染色によって筋線維を取り囲む laminin 陽性基底膜の内側の核で Pax 7 の陽性反応が検出された (Fig. 6A-D). さらに Pax 7 陽性の核は, M-cadherin と共存していた (Fig. 7A-D). 従って, これらの結果は, Pax 7 が過負荷筋の筋衛星細胞の核で発現していることを示す.

IV・考察

先行研究では、骨格筋の肥大には、筋衛星細胞の活性化、増殖、分化及び筋管や既存筋線維との融合が必要であると報告されている(6, 14). 本研究の所見は、過負荷にさらされた骨格筋の筋衛星細胞における MyoD 発現は、PCNA の発現より先に生じることを示す. これらの結果は、先行研究での報告と一致した(7, 19). さらに本研究では、筋衛星細胞において p21 は術後 5 日目で初めて発現し、術後 7 日目には消失することを明らかにした. これらの結果は、Schiaffino et al. (17) の報告と一致した. 従って、本研究により過負荷にさらされた初期の骨格筋の筋衛星細胞で発現する MyoD は、その後の増殖を引き起こすためのトリガーの1つであるかもしれないという可能性が示唆された.

一方、本研究では、筋衛星細胞における myogenin の発現に関して、興味深い知見が得られた. 培養実験において、myogenin は筋芽細胞の分化の段階で初めて発現する. これは、MyoD の発現よりも遅れて myogenin が発現することを意味する(10, 19). しかし、本研究では、術後 1 日目に MyoD 同様に筋衛星細胞における myogenin の発現を検出している. 術後 1 日目では、筋衛星細胞における PCNA 及び p21 の発現は、検出されていないため、筋衛星細胞が術後 1 日目の段階で増殖期から分化期に移行したとは考えにくい. さらに、本研究結果は、足底筋を過負荷にさらした 12 時間後に myogenin mRNA がピーク値を示したことを報告している先行研究と一致する(1). 従って、筋衛星細胞における MyoD 及び myogenin の発現は、細胞周期の前に引き起こされている. 筋衛星細胞の増殖前に発現する MyoD 及び myogenin の役割に関しては未だに不明瞭であるが、成熟骨格筋には 2 種類の異なる筋衛星細胞群が存在することが報告されている. 1 つは、細胞増殖なしに即座に分化するタイプであり、もう一方は細胞増殖後に分化するタイプである(13). 従って、本研究で術後 1 日目に myogenin を発現した筋衛星細胞は、増殖なく即座に分化するタイプの筋衛星細胞群であったかもしれない. 筋衛星細胞における MyoD 同様に myogenin の急速な発現も、十分な筋肥大を引き起こす上で重要な要因であるのかもしれない.

術後 1 日目から 7 日目までの全ての実験期間において骨格筋の筋衛星細胞において Pax 7 の発現が検出された. 筋衛星細胞の増殖を停止させる p21 の発現が術後 5 日目に確認されたことから、術後 5 日目に以降に検出された Pax 7 は、増殖を停止した筋衛星細胞の self-renewal に関与しているものと考えられる. 一方、同時期に分化を誘導する因子である myogenin の発現も確認されている. Olguin & Olwin (11) は、増殖を停止した筋衛星細胞において、myogenin を発現した筋衛星細胞はその後、分化するのに対し、Pax 7 を発現した筋衛星細胞は未分化のまま再び静止状態に戻り self-renewal されると報告している. 従って、本研究においても筋肥大時の筋衛星細胞において増殖停止後、myogenin を発現した筋衛星細胞は分化し、その後に既存筋線維と融合した可能性が考えられる. 一方、p21 による増殖停止後、Pax 7 を発現した筋衛星細胞は未分化のまま静止状態にもどり self-renewal された可能性が示唆される.

さらに本研究では、細胞増殖の誘導や停止に関与する PCNA や p21 が発現する前である術後 1 日目にはすでに筋衛星細胞における Pax 7 の発現が認められた。増殖停止後の筋衛星細胞の分化及び未分化の決定に Pax 7 が関与していると考えられているが³、本研究のこれらの所見より、過負荷による筋肥大時に発現した Pax 7 が活性化筋衛星細胞を増殖させることなく再び静止状態に戻している可能性が示唆された。本研究により、過負荷による筋肥大時の筋衛星細胞の self-renewal に Pax 7 が関与している可能性が明らかとなったが、その制御機構の解明には、さらなる研究が必要である。

V·参考文献

1. Adams GR, Haddad F, Baldwin KM. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* 87:1705–1712, 1999
2. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326:515–517, 1987
3. Collins CA. Satellite cell self-renewal. *Curr Opin Pharmacol.* 6: 301–306, 2006
4. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21 ((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 246:280–289, 1999
5. Guo K, Wang J, Andres V, Smith RC, Walsh K. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol* 15:3823–3829, 1995
6. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91:534–551, 2001
7. Johnson SE, Allen RE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 154:39–43, 1993
8. Lin H, Yutzey KE, Konieczny SF. Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. *Mol Cell Biol.* 11:267–280, 1991
9. Lowe DA, Alway SE. Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell Tissue Res* 296:531–539, 1999
10. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73:723–732, 1995
11. Olguin HC, Olwin BB. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol.* 275:375–388, 2004
12. Plyley MJ, Olmstead BJ, Noble EG Time course of changes in capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle. *J Appl Physiol* 84:902–907, 1998
13. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 72:341–347, 1995

14. Rosenblatt JD, Yong D, Parry DJ Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve* 17:608–613, 1994
15. Sabourin LA, Girgis–Gabardo A, Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{–/–} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 144:631–643, 1999
16. Sakuma K, Watanabe K, Totsuka T, Uramoto I, Sano M, Sakamoto K. Differential adaptations of insulin–like growth factor–I, basic fibroblast growth factor, and leukemia inhibitory factor in the plantaris muscle of rats by mechanical overloading: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 95:123–130, 1998
17. Schiaffino S, Pierobon Bormioli S, Aloisi M. Cell proliferation in rat skeletal muscle during early stages of compensatory hypertrophy. *Virchows Arch.Abt.cell Pathol.* 11:268–273,1972
18. Seale P, Sabourin LA, Girgis–Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 102:777–786, 2000
19. Smith CK, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 159:379–385, 1994
20. Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science.* 242:405–411, 1988
21. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin–dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574–578, 1994
22. Wentworth BM, Donoghue M, Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Paired MyoD–binding sites regulate myosin light chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:1242–1246, 1991
23. Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN, Swoap SJ. An E–box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol.* 276:C1069–C1078, 1999
24. White JD, Scaffidi A, Davies M, McGeachie J, Rudnicki MA, Grounds MD. Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD–deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice. *J Histochem Cytochem.* 48:1531–1544, 2000

VI·图表

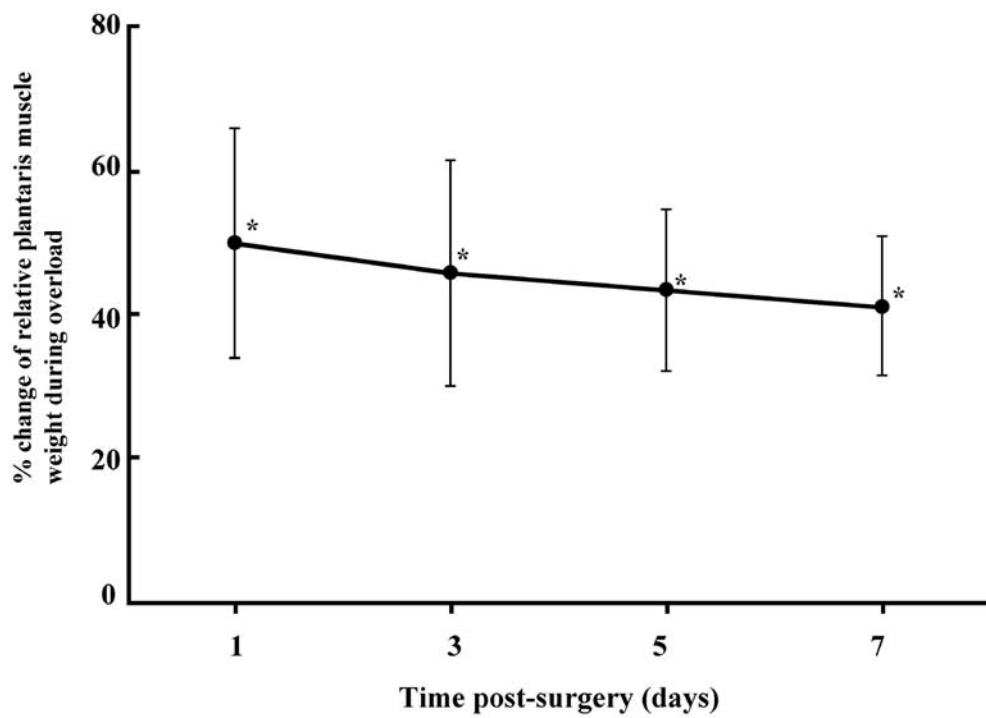


Fig 1 The percent changes of relative plantaris muscle weight during functional overload relative to each contralateral sham-operated muscle. Values indicate the means $\pm$ S.D. * Significantly different compared with contralateral sham-operated muscles ($p < 0.05$).

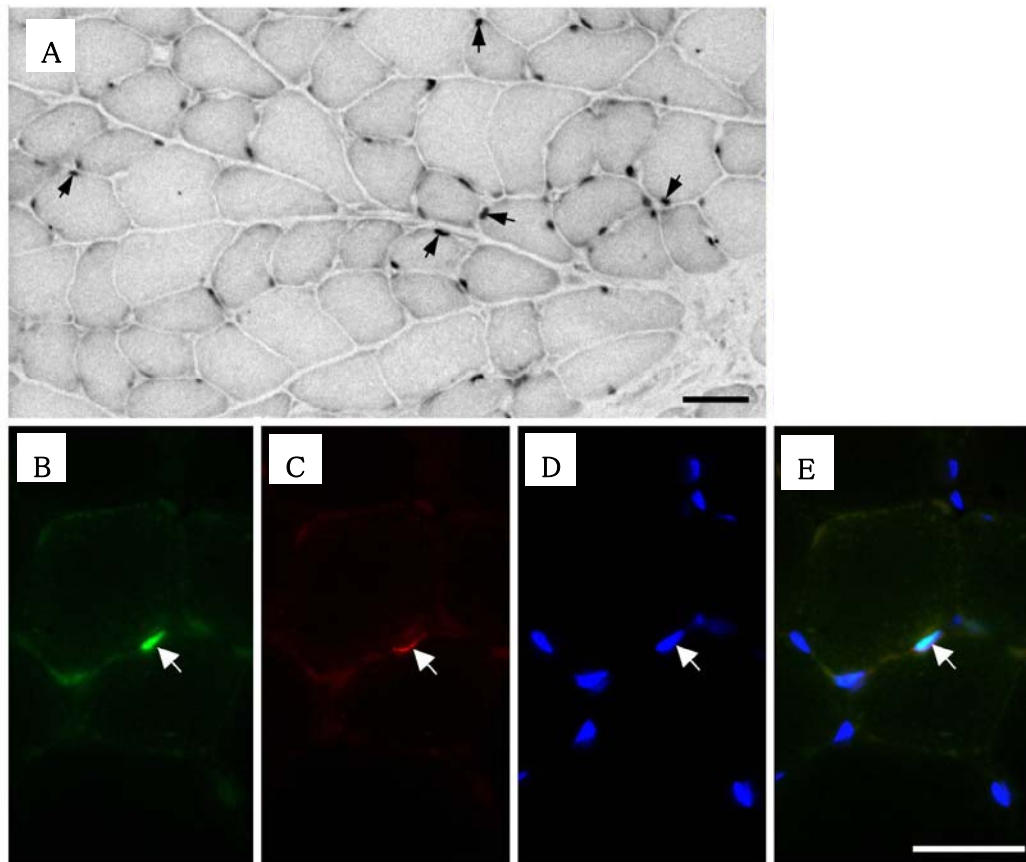


Fig 2 Photomicrographs showing localization of MyoD on day 1 after overload. Single immunohistochemical staining (A) was performed to detect MyoD in overloaded plantaris muscle. Arrows in (A) indicate MyoD-positive immunoreactivities. Triple immunostaining to view localization of MyoD (B), m-cadherin (C) and nuclei (D) was performed and the three images were merged (E). Arrows in (B)–(E) indicate a MyoD-positive nucleus expressed in an M-cadherin-positive satellite cell. Bar =50 μ m (A), 30 μ m (B–E).

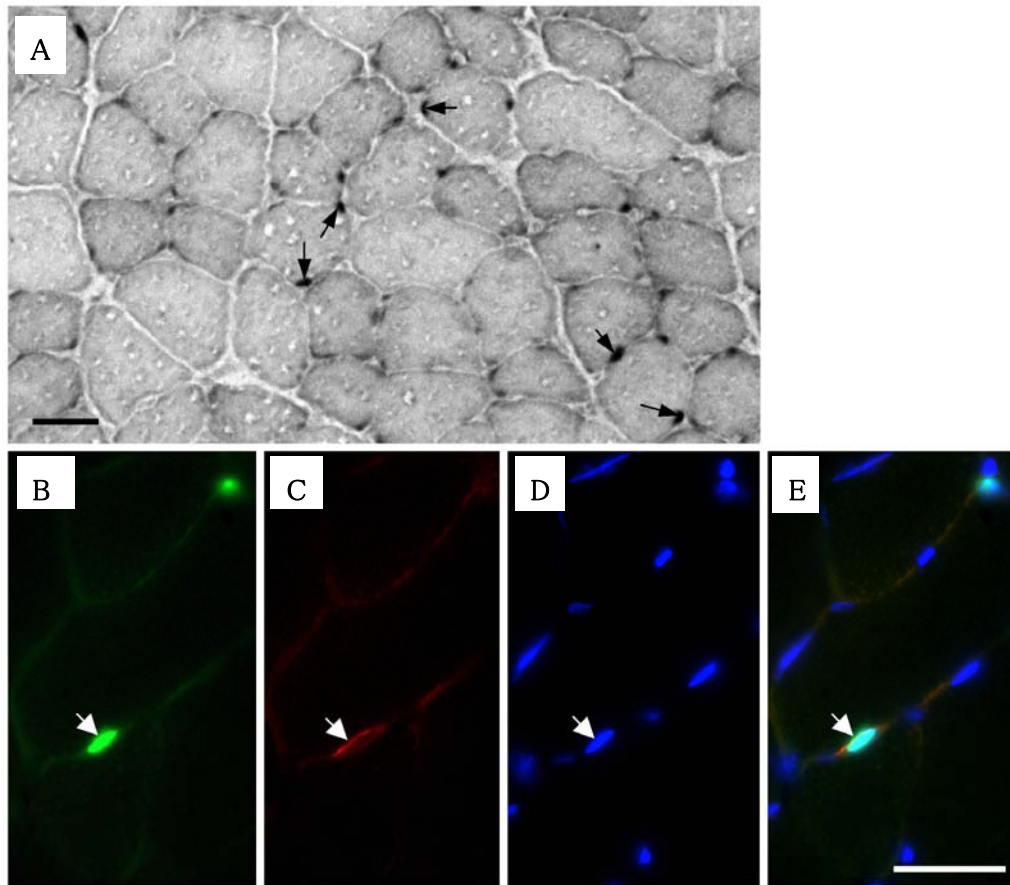


Fig 3 Photomicrographs showing localization of myogenin on day 1 after overload. Single immunohistochemical staining (A) was performed to detect myogenin in overloaded plantaris muscle. Arrows in (A) indicate myogenin-positive immunoreactivities. Triple immunostaining to view localization of myogenin (B), M-cadherin (C) and nuclei (D) was performed and the three images were merged (E). Arrows in (B)–(E) indicate a myogenin-positive nucleus expressed in an M-cadherin-positive satellite cell. Bar =50 μ m (A), 30 μ m (B–E).

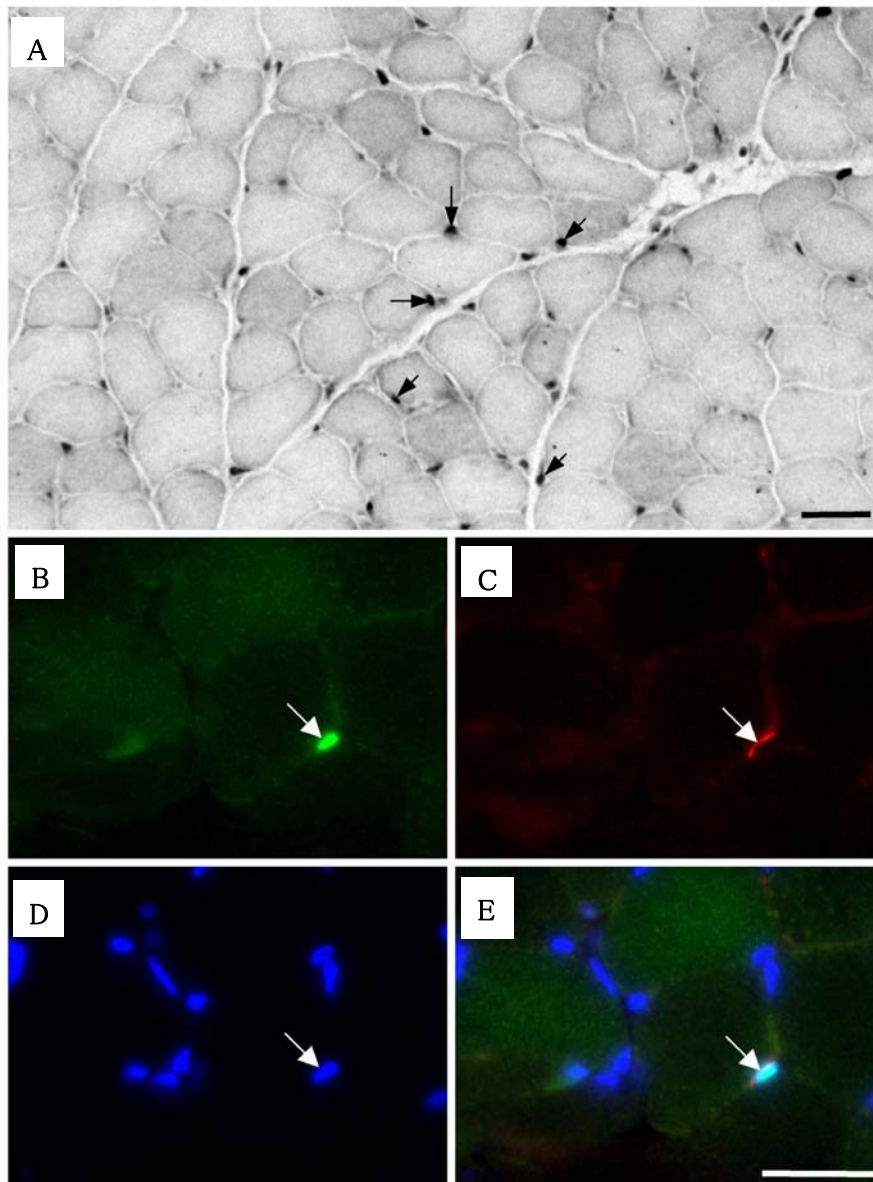


Fig 4 Photomicrographs showing localization of PCNA at day 3 after overload. Single immunohistochemical staining (A) was performed to detect PCNA in overloaded plantaris muscle. Arrows in (A) indicate PCNA-positive immunoreactivities. Triple immunostaining to view localization of PCNA (B), m-cadherin (C) and nuclei (D) was performed and the three images were merged (E). Arrows in (B), (D) and (E) indicate a PCNA-positive nucleus expressed in an m-cadherin-positive satellite cell. Bar =50 μ m (A), 30 μ m (B-E).

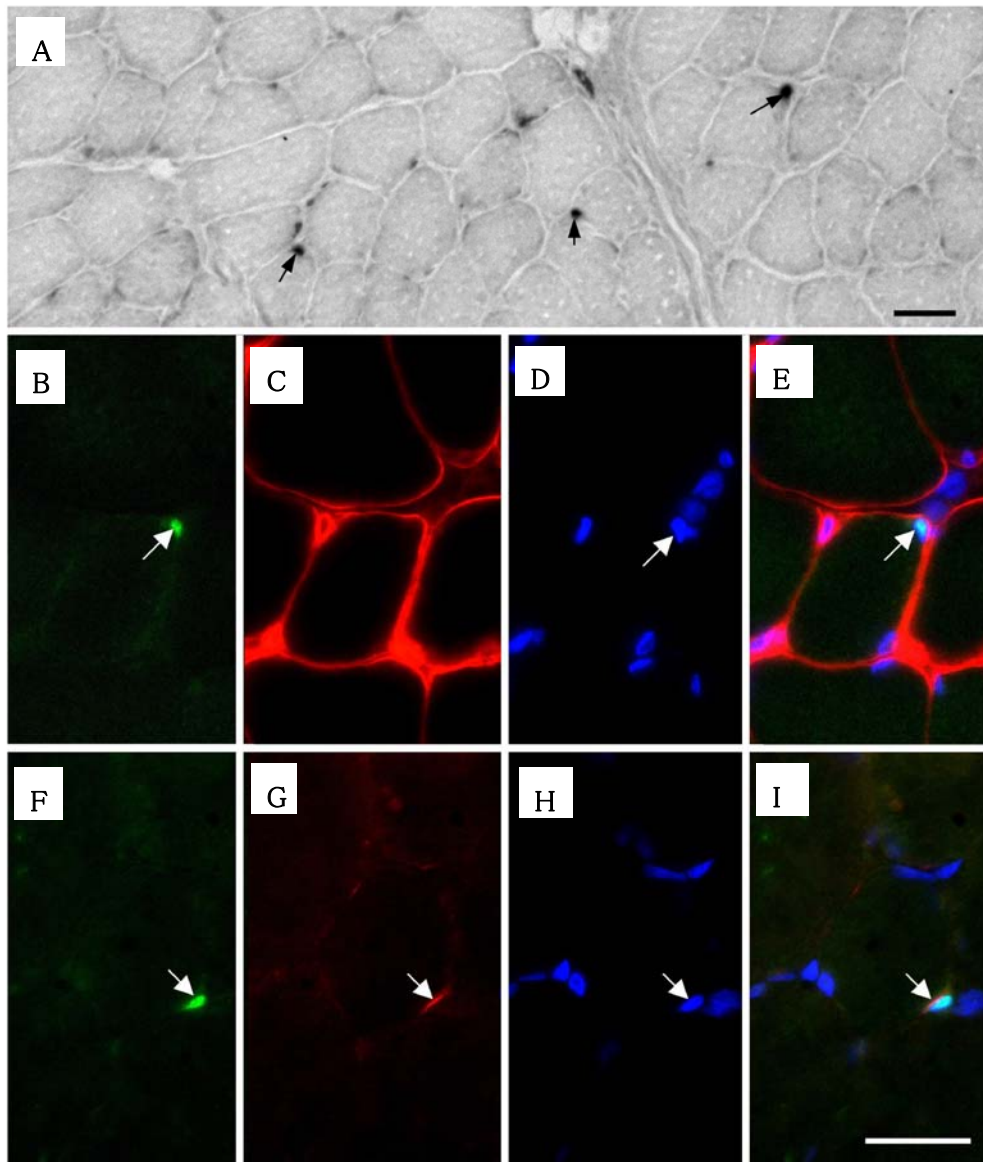


Fig 5 Photomicrographs showing localization of p21 on day 5 after overload. Single immunohistochemical staining (A) was performed to detect p21 in overloaded plantaris muscle. Arrows in (A) indicate P21-positive immunoreactivities. Triple immunostaining to view localization of p21 (B), laminin (C) and nuclei (D) was performed and the three images were merged (E). Arrows in (B), (D) and (E) indicate a p21-positive nucleus located inside of the laminin-positive basement membrane of myofibers. Triple immunostaining to view localization of p21 (F), m-cadherin (G) and nuclei (H) was performed and the three images were merged (I). Arrows in (F)–(I) indicate a p21-positive nucleus expressed in an M-cadherin-positive satellite cell. Bar =50 μ m (A), 30 μ m (B–I).

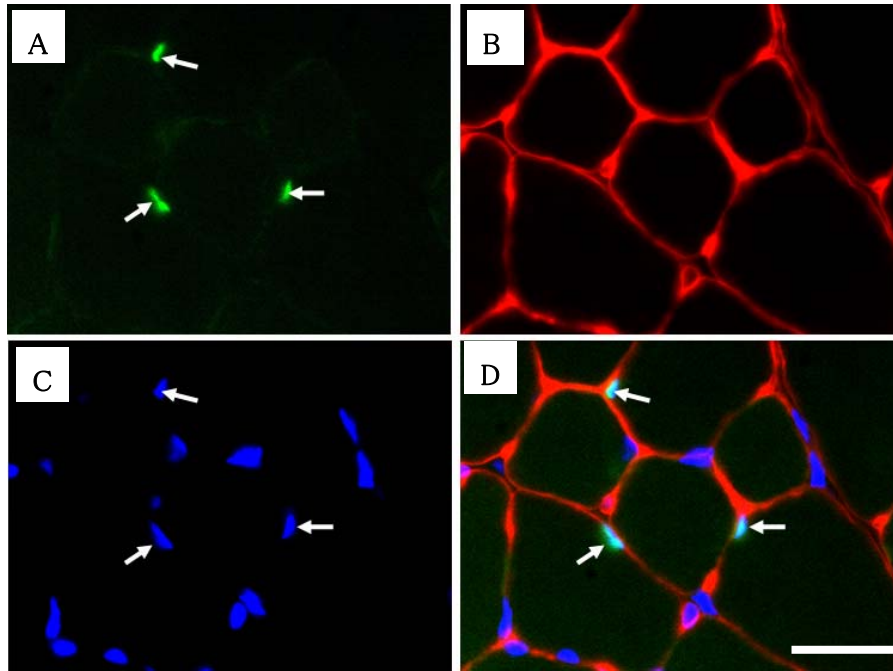


Fig 6 Photomicrographs showing localization of Pax 7 at day 1 after overload. Triple immunostaining to view localization of Pax 7 (A), laminin (B) and nuclei (C) was performed and the three images were merged (D). Arrows in (A), (B) and (C) indicate Pax 7-positive nuclei located inside of the laminin-positive basement membrane of myofibers. Bar =30 μ m.

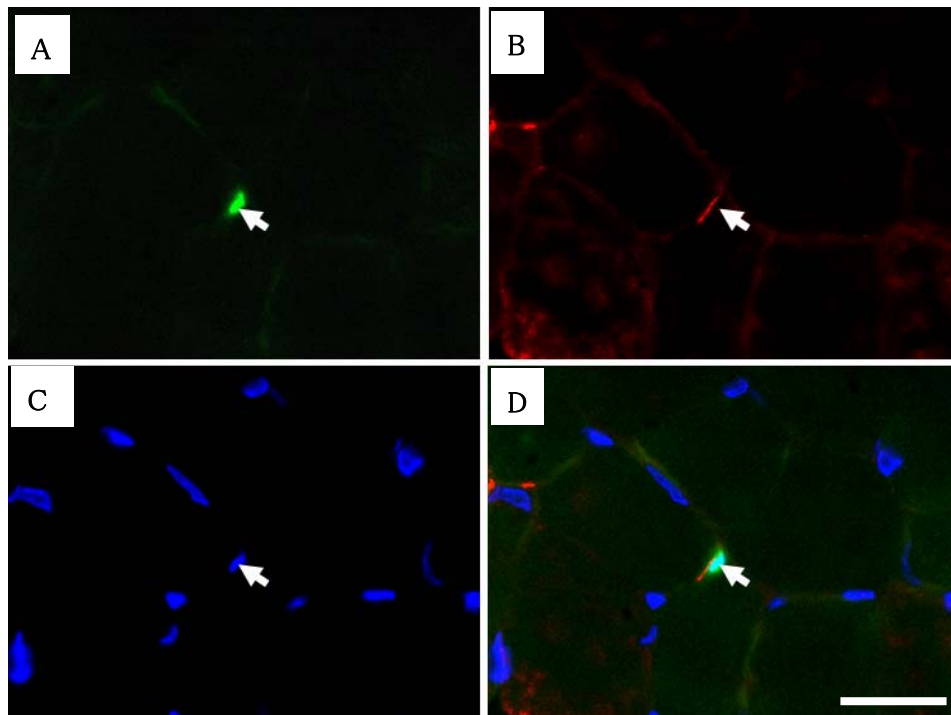


Fig 7 Photomicrographs showing localization of Pax 7 at day 1 after overload. Triple immunostaining to view localization of Pax 7 (A), M-cadherin (B) and nuclei (C) was performed and the three images were merged (D). Arrows indicate a Pax 7-positive nucleus expressed in an M-cadherin-positive satellite cell. Bar =30 μ m.