

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：33912

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01436

研究課題名(和文) 運動による筋萎縮からの回復促進に筋損傷は必要か？

研究課題名(英文) The exercise intensities causing muscle injury inhibits recovery from muscle atrophy

研究代表者

伊東 佑太 (Itoh, Yuta)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・講師

研究者番号：30454383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮を起こした筋の回復を促すための運動負荷強度に健常筋肥大のための運動負荷と同様に筋損傷が必須であるかどうか確かめるために、筋萎縮モデルマウスに強度が異なる運動負荷をし、筋損傷発生と筋萎縮回復との関係を検証した。その結果、一定強度以上の運動負荷に筋力や筋線維の太さの回復促進がみられたが、筋損傷を引き起こすことは必須ではなかった。また筋損傷の程度が大きくなると筋萎縮からの回復促進効果は弱まった。筋損傷の発生は筋衛星細胞の活性化に關与するが、活性化した筋衛星細胞は筋損傷の再生に動員され筋萎縮からの回復が遅れたと考える。つまり、損傷を起こさない強度の運動が筋萎縮からの回復促進に有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between muscle injury and the facilitating recovery of atrophied muscles, mice recovering from atrophied muscles underwent repeated isometric training with varying joint torques using electrical stimulation. As a result, the functional and histological effect from the muscle atrophy were worked on by applying exercise equal to or greater than a definite intensity level. However, the application of intense exercise caused vicious muscle injury inhibited recovery of muscle strength and myofiber size. These data indicate that resistance training without muscle damage facilitates efficient recovery from atrophy.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋萎縮 筋損傷 炎症反応 運動負荷強度

1. 研究開始当初の背景

健常筋を肥大させるためには 1RM の 60～80% の強度の運動負荷が必要であるといわれ、アスリートや健常者スポーツの場面で用いられる (ACSM, 2006)。また、健常筋に対して 1RM の 70% の強度で運動負荷すると筋損傷を引き起こすことが知られる。このように筋肥大に有効な強度と筋損傷を引き起こす強度に同等の報告があることから、筋肥大のためには、筋損傷を引き起こす強度の運動負荷が有効であると考えられる。一方、リハビリテーションにおいても、萎縮筋の回復促進のために健常筋の肥大に有効とされる強度の運動負荷が用いられているが、筋萎縮などの病態をもった患者や高齢者に痛みや機能障害を伴う筋損傷を生じさせる運動負荷が現実的とはいえず、その効果の検証は不十分であった。

そこでこれまでに我々は、尾部懸垂による後肢筋の筋萎縮モデルマウスに対して立ち上がり運動を負荷する実験を行い、運動負荷が筋萎縮からの回復促進に有効であることを明らかにした (図 1)。この萎縮筋の回復変化は、健常筋の肥大時よりも出現時期が早く、変化量が大きいことから、萎縮筋の回復時と健常筋の肥大時とは異なるメカニズムが働いていると考える。従って、健常筋の肥大に有効とされる運動負荷方法をそのまま萎縮筋に対して用いることは適切でないと考えられるが、萎縮筋に対してどのような運動負荷が最も有効かはわかっていない。

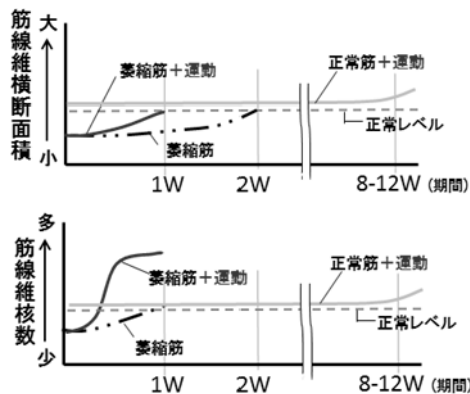


図 1 運動による筋線維横断面積と筋線維核数の変化を示す。運動により健常筋が肥大するには 8-12 週間かかるのに対し、尾部懸垂により萎縮した筋はわずか 1 週間で正常レベルまで回復する。萎縮筋に運動を負荷すると短期間の間に正常値の 1.5 倍に増加する。

また、この運動による筋萎縮からの回復促進時、筋衛星細胞由来と考えられる新生細胞が既存の筋線維に融合し、筋線維核の数が正常の 1.5 倍にまで増えることも判明した (図 1)。筋衛星細胞の活性化、分化、融合といった現象は、筋損傷からの再生時にも報告されている。以上のことから運動による筋萎縮からの回復促進効果にも筋損傷や炎症反応の発生が関与していると予想されるが、正常

な筋の肥大時と同様に、筋損傷を引き起こす強度の運動負荷が萎縮筋の回復促進に有用もしくは必須であるかどうか不明である。

2. 研究の目的

筋萎縮を起こしたマウスに対して、電気刺激により強度をコントロールした等尺性筋収縮運動を負荷し、筋損傷を引き起こす強度と起こさない強度の運動負荷を与える。そしてこのときの筋の形態の変化を中長期的に観察し、筋萎縮からの回復促進に対する筋損傷の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

筋損傷を引き起こす運動強度の確認

C57BL/6J 雄性マウス (10 週齢) に対して、2 週間の尾部懸垂を施した後肢筋を萎縮させた。なお、実験期間中マウスは、12 時間毎の明暗サイクルで飼育し、餌や水は自由に与えた。また、本研究は所属機関の動物実験委員会の承認を得た後 (名古屋学院大学: 2007-007、2014-001)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省) に則って行った。

この筋萎縮モデルマウスに、すでに開発してあるマウス用等尺性筋収縮運動装置 (図 2、伊東, 2013) を用いて異なる強度の運動負荷を与え、筋損傷を引き起こす強度と起こさない強度の境界を確認した。なお、与える運動負荷強度は、各々最大足関節底屈トルクの 10%、40%、60%、90% を初回の収縮に発揮する運動とした。運動開始 3、7 日目に各々の強度で運動負荷したマウスからヒラメ筋を採取し、筋線維の損傷の有無、程度を確認した。

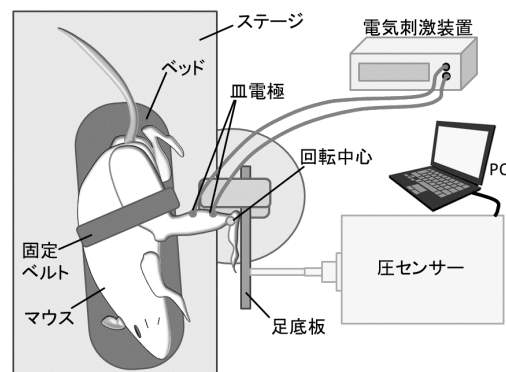


図 2 マウス用等尺性筋収縮運動装置の模式図を示す。麻酔下のマウス下腿後面への電気刺激時に、足底板に加わる力から足関節底屈筋群が発揮するトルクを算出し、モニターする。電気刺激の電流値を変化させることで、運動開始時に発揮されるトルクを調整し、強度に再現性をもって運動負荷を与えることができる。

筋線維の損傷の有無、程度の確認は、麻酔下にて剖出したヒラメ筋を厚さ 8 μm に薄切し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を施し

て、マクロファージが浸潤した線維、すなわち筋線維の損傷像の有無を観察することで行った。また、同様に作製した凍結横断切片に、抗 developmental myosin heavy chain (dMHC) 抗体を用いた免疫組織染色を施し、再生した筋線維を観察した。具体的には、切片を 4% paraformaldehyde 溶液で固定処理し、3% bovine serum albumin in PBS でブロッキング処理した後、1 次抗体 (マウス抗 dMHC 抗体; 1:40, Vector、ウサギ抗 laminin 抗体; 1:1000, Sigma-Aldrich) でインキュベートした。洗浄後、2 次抗体 (Alexa Fluor 568® 抗ウサギ IgG 抗体 1:400, Molecular Probes、Alexa Fluor 488® 抗マウス IgG 抗体; 1:400, Molecular Probes) と DAPI (10 µg/mL) のカクテルでインキュベートし、洗浄、封入後、顕微鏡下で観察した。さらに、新生、再生した筋線維に特徴的な中心核を持つ線維の数を同じ染色像から計測し、その割合を群間で比較した。

異なる強度の運動負荷による筋損傷発生と筋萎縮からの回復促進効果との関係解析

筋萎縮モデルマウスに、確認した筋損傷を引き起こす強度 (最大足関節底屈トルクの 10%、40%) と引き起こさない強度 (最大足関節底屈トルクの 60%、90%) 各々で運動負荷を与え、日々の最大足関節底屈トルクの回復変化を比較した。また、運動開始から 7 日目の筋の横断切片に免疫組織染色を供し、筋線維横断面積の回復程度、筋線維核数の変化を評価することで、筋萎縮からの回復促進効果を検証した。

最大足関節底屈トルクは、運動負荷に用いたものと同じ装置を用いて測定した。測定は尾部懸垂から解放後毎日実施し、運動負荷の影響を軽減するため、間隔を 4 時間以上空けた。筋線維横断面積は、薄切切片に H-E 染色を施して画像解析ソフトにて測定した。筋線維核数は、同様に作製した凍結横断切片に抗 dystrophin 抗体を用いた免疫組織染色と DAPI を用いた核染色を施し、筋線維の核を識別しながら測定した。具体的には、切片を 4% paraformaldehyde 溶液で固定処理し、3% bovine serum albumin in PBS でブロッキング処理した後、1 次抗体には、ウサギ抗 dystrophin 抗体 (1:400, Santa Cruz)、2 次抗体には Alexa Fluor 568® 抗ウサギ IgG 抗体を用いて DAPI (10 µg/mL) とともにインキュベートした。洗浄、封入後、顕微鏡下で観察し、筋線維 1 本あたりの筋線維核数を計測して群間で比較した。

4. 研究成果

萎縮筋に筋損傷を引き起こす運動強度

尾部懸垂から解放して運動負荷を 3 日間行うとヒラメ筋 H-E 染色像において (図 3A)、最大足関節底屈トルクの 40% と 60% の運動負荷強度を境に、損傷したと考えられる単核細胞が浸潤した筋線維の有無が分かれた。2 週

間の尾部懸垂によって筋萎縮を起こしたヒラメ筋には、最大足関節底屈トルクの 60% 以上の運動負荷強度で運動を負荷すると筋損傷を生じることが分かった。

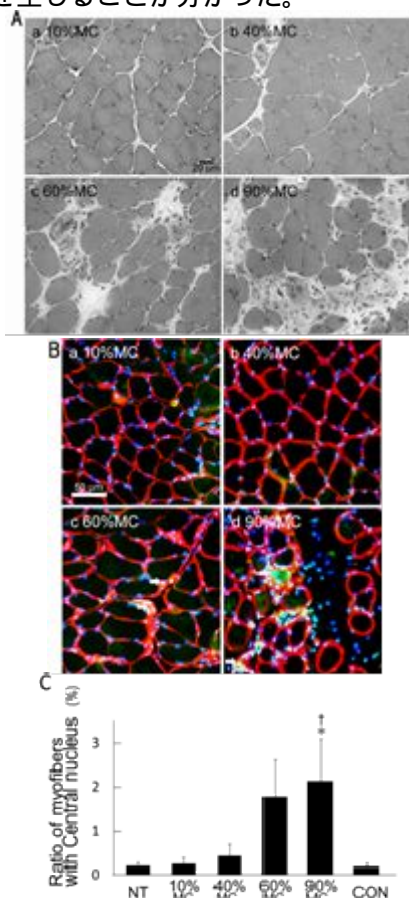


図3 運動開始3日目のヒラメ筋H-E染色像(A)とdMHC(緑)、laminin(赤)、DAPI(青)の免疫組織染色像(B)を示す。60、90%の負荷強度で運動した筋で多くの単核細胞の浸潤、dMHC陽性である新生筋線維が観察された。運動開始7日目の中心核線維の割合(C)は、90%の負荷強度で運動した筋で有意に多かった。* $p < 0.05$ vs. 運動なし、† $p < 0.05$ vs. 萎縮なし。

また上述の筋損傷を裏付けるように、尾部懸垂から解放後3日目のdMHCの免疫組織化学染色では(図3B)、最大足関節底屈トルクの60%以上の運動負荷強度で運動を負荷した筋で、新たに生まれたと考えられるdMHC陽性の筋線維が観察された。さらには、尾部懸垂解放後7日目の筋の筋線維膜と核の染色では、中心核を持った筋線維; 数日以内に新生したと考えられる線維が観察され、これらの線維の割合が最大足関節底屈トルクの90%の運動負荷強度で運動を負荷した筋でのみ多い割合で存在した(図3C)。以上のことから、最大足関節底屈トルクの60%以上の運動負荷強度で運動を負荷すると筋損傷を生じ、筋線維の再生が多く生じると考えられる。

運動負荷による筋損傷発生と筋萎縮からの回復促進効果との関係

足関節最大底屈トルクの回復

2週間の尾部懸垂により筋を萎縮させると、足関節最大底屈トルクは筋萎縮を起こしていないマウスのトルクに比べて約40%小さくなる(図4)。このマウスに筋損傷を生じない最大足関節底屈トルクの40%の強度で運動負荷を行うと、10%の強度で行った場合よりも早く、筋萎縮を起こしていないマウスのトルクの値に近づいた。筋損傷を生じさせる最大足関節底屈トルクの60%の強度で運動負荷を行った場合も、筋萎縮を起こしていないマウスのトルクの値に早く近づいた。つまり、筋損傷を引き起こす強度の運動を負荷しなくても、萎縮を起こした筋の筋力回復を促進できることが分かった。

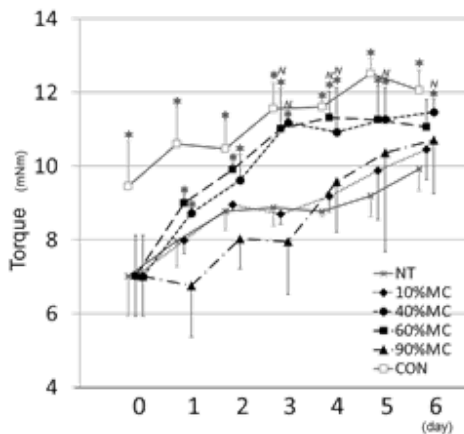


図4 40、60%の負荷強度で運動したマウスの足関節最大底屈トルクは、トレーニング開始1-4日目、運動負荷しなかったマウスのトルクよりも有意に大きかった。また、トレーニング開始4日目には筋萎縮を起こしていないマウスのトルクとの間に有意な差がなくなった。 $*p < 0.05$ vs. 運動なし, N not significant from 萎縮なし。

筋線維横断面積の回復

2週間の尾部懸垂により筋線維横断面積は約2/3のサイズまで萎縮した。そこから、60%の強度で運動負荷を行うと筋線維の損傷像が観察され始める3日目では、筋線維横断面積が運動しなかったマウスの筋の面積と有意な差がなく(図5A)筋萎縮からの回復が促進されている様子はなかった。この傾向は筋損傷を生じていない10%、40%の強度で運動負荷を行ったマウスの筋、より損傷の程度が大きい90%の強度で運動負荷を行ったマウスの筋でも同様であった。ただし、2000 μm^2 前後の横断面積をもつ筋線維の割合は、40%、60%の強度で運動負荷を行ったマウスの筋で多く、筋萎縮からの回復促進効果の始まりは捉えられたと考える。ただし、この時点での40%、60%の強度の間では、筋損傷の有無による筋萎縮からの回復促進効果の差異は見られなかった。

尾部懸垂から解放後7日目の筋では、60%の強度で運動負荷を行った場合、筋線維横断面積が運動しなかったマウスの筋の面積よりも有意に大きく、萎縮していないマウスとの間に有意な差がなかった(図5B)。一方、10%の強度で運動負荷したマウスの筋の筋線維横断面積

で、運動しなかったマウスの筋の面積との間に有意な差がなく、同じようなヒストグラム分布を示した。つまり、筋萎縮からの回復促進効果は40%以上の強度で運動負荷を与えた時に現れたが、筋萎縮からの回復促進効果を得るために、必ずしも筋損傷を発生させる強度の運動負荷は必要ないことが分かった。さらに、90%の強度で運動負荷を行ったマウスの筋では、運動しなかった場合に比べて筋線維横断面積が有意に大きかったものの、萎縮していない健常なマウスの筋の面積までには届かなかった。また、ヒストグラムは10%の強度での運動負荷の場合や運動負荷をしていないマウスと近い分布であった。特に径が小さい筋線維(100-500 μm^2)が観察された。60%の強度の運動負荷の場合に比べ、90%の強度では筋損傷の程度が大きく、筋萎縮の回復促進効果が大きく得られなかったと考える。

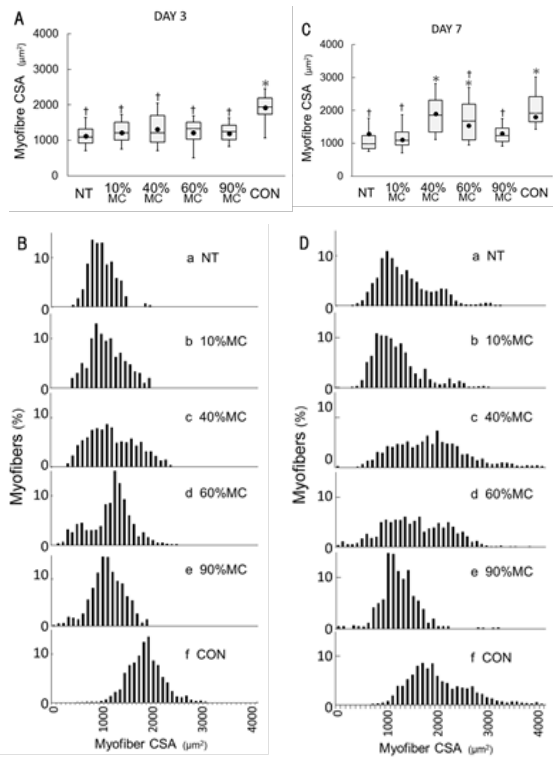


図5 A: 尾部懸垂から解放後3日目の各群の筋線維横断面積の箱髴図。箱中の線は中央値、箱の上下辺は各々四分位値、髴は各々10%、90%位値を示す。 $*p < 0.05$ vs. 運動なし, $^{\dagger}p < 0.05$ vs. 萎縮なし。B: 尾部懸垂から解放後3日目の各群の筋線維横断面積のヒストグラム。40%・60%の強度で運動負荷を行ったマウスで健常な筋に多い径が大きい線維が見られた。C: 尾部懸垂から解放後7日目の各群の筋線維横断面積の箱髴図。箱中の線は中央値、箱の上下辺は各々四分位値、髴は各々10%、90%位値を示す。 $*p < 0.05$ vs. 運動なし, $^{\dagger}p < 0.05$ vs. 萎縮なし。D: 尾部懸垂から解放後7日目の各群の筋線維横断面積のヒストグラム。40%・60%の強度で運動したマウスの筋は健常なマウス筋の分布と似ており、10%と90%の強度の運動負荷では運動を行わなかったマウスと近かった。

筋線維核数の変化と筋衛星細胞の活性化
筋線維サイズと筋線維核数の間には正の相関があるといわれている。また、成熟した筋線維の核は分裂しないため、筋線維核を増加させるには外から取り込む必要があると考える。この筋線維核の補充に関わると考えられるのが筋基底膜に存在する筋衛星細胞である。一方、筋損傷が生じたときにも壊された筋線維の再生のため、筋衛星細胞が関与する。そこで、尾部懸垂後に運動負荷し筋線維横断面積が変化する過程での筋線維核数と筋衛星細胞に変化が生じるかどうかを解析した。その結果、尾部懸垂から解放して7日目には40%、60%、90%の強度で運動負荷を行ったマウスの筋の筋線維核数が、筋萎縮を起こしていないマウスの筋と比べ有意に多くなった(図6A)。中でも40%の強度の時が最も多かった。さらに、静止期の筋衛星細胞と考えられる Pax7 陽性の細胞の数が多く見られ、Pax7 と分化が進行した時に発現される MyoD、myogenin との共染像が観察された。以上のことから、40%以上の強度で運動負荷を行うと、筋線維横断面積の回復促進に伴って、筋衛星細胞が活性化し筋線維核数が増加することが示唆された。

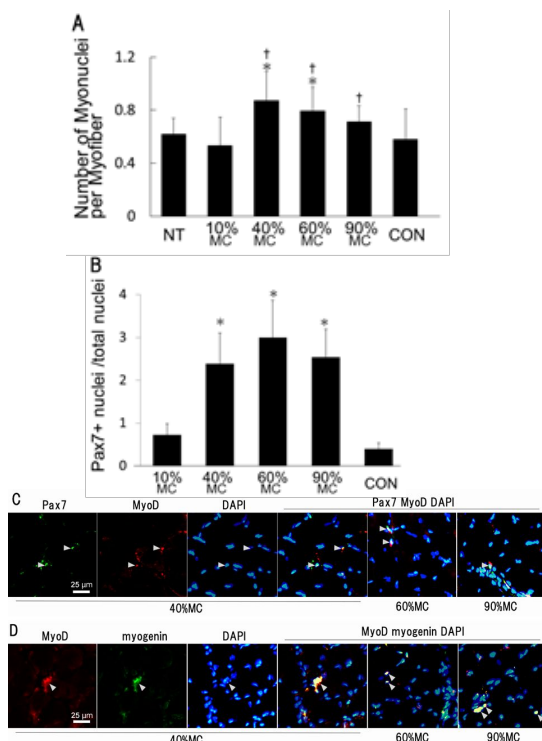


図6 A:トレーニング開始7日目の各群の筋線維1本当たりの筋線維核数。40%、60%、90%の強度で運動負荷したマウスの筋で多かった。 $*p<0.05$ vs 運動なし、 $†p<0.05$ vs. 萎縮なし。B:トレーニング開始7日目の各群のPax7陽性細胞の割合。40%、60%、90%の強度で運動負荷したマウスの筋で多かった。 $*p<0.05$ vs. 運動なし、 $†p<0.05$ vs. 萎縮なし。Pax7とMyoD(C)、MyoDとmyogenin(D)の免疫組織染色像。40%、60%、90%の強度で運動負荷したマウスの筋で共染像が多く観察された。

尾部懸垂による筋萎縮後に強度が異なる等尺性筋収縮運動を負荷し、筋損傷を引き起こす強度が否かに着目して、その筋萎縮からの回復促進効果を検証した。その結果、最大発揮トルクの40%以上の強度で運動負荷を行うと、筋萎縮後に運動を行わない場合、最大発揮トルクの10%の強度で運動した場合に比べ、最大等尺性筋収縮時のトルクが早く回復し、筋線維横断面積の回復促進と筋線維核数の増加が著明であった。この最大発揮トルクの40%の強度で運動負荷を行ったときには、筋損傷を起こした様子は観察できなかった。一方で、60%、90%の強度で運動負荷を行ったマウスの筋では、筋損傷像や新生したと考えられる径が小さい筋線維像が観察され、筋損傷を起こすか否かの強度の境は最大発揮トルクの40%と60%の間にあると考えられた。なお、60%の強度の時に比べ90%の強度で運動負荷を行うと、より広い範囲で筋線維の損傷が起きることが分かった。

最大等尺性筋収縮時のトルクや筋線維横断面積の回復促進効果は、40%の強度で運動負荷したときに最も大きかった。つまりほとんど筋損傷が起きていなくとも筋萎縮からの回復が促進されることがわかった。正常筋の肥大には、強い運動強度でおこる筋損傷が必要であるという報告があるが、必ずしも筋損傷が必要ではないという報告もある。萎縮筋の回復促進に関しては、少なくとも早い段階での筋損傷は、回復促進を遅くすることが本実験で判明した。その理由には、筋損傷後に起こる筋線維の新生から、その太さの成長過程に要する時間が加わったことが考えられる。前述の通り、筋線維をサイズと筋線維核数には関係性があり、筋線維核数の変化には筋衛星細胞が関与すると考えられる。活性化した筋衛星細胞は既存の筋線維に融合することで筋線維核数を増やし、筋線維サイズの増大に関わるタンパク合成を効率化させると考えられる。他方筋損傷の発生は筋衛星細胞を活性化させることが報告されている。ところが、筋損傷が存在すると再生のため損傷した筋線維の新生のため活性化した筋衛星細胞が動員されなければならない。具体的に本研究結果を例に挙げると、60%、90%の強度の運動負荷では、萎縮した筋線維の太さの回復を促進させるのと同時に、筋線維を損傷させ、そこから再生する経過を辿る。そのため、筋全体として1週間の期間で増殖、活性化した筋衛星細胞の範囲では、筋損傷の再生に役割が割かれ、筋線維が正常な太さまで回復しなかったと考える。ただ、損傷量が少なかった60%の強度の運動負荷では、尾部懸垂後1週間の底屈トルクが、最も効果のあった40%の強度の運動負荷の時と同等のトルクまで回復していた。また、筋線維横断面積はコントロールに比べて小さく40%の強度の運動負荷の効果に及ばなかったものの、そのサイズ分布は40%の強度の運動負荷やコントロールに近い分布を示した。筋損傷が微細な範囲、

程度に収まれば、ある程度の筋萎縮からの回復促進効果は得られるのかもしれない。ただしやはり、筋損傷の発生は必ずしも筋萎縮からの回復促進効果を得るためには必要ではないと考えられる。

まとめると、筋損傷の発生と筋萎縮からの回復促進効果との関係を調べるため、再現性のある強度での等尺性筋力トレーニングを筋萎縮マウスに加え、筋損傷を発生させる強度の運動負荷が否かで筋萎縮から回復の程度を比較、検証した。筋萎縮からの回復促進には、筋損傷を引き起こす強度の運動負荷を行っても効果が弱まるのがわかった。萎縮したマウスの筋に対しては、筋損傷を起こさない最大筋力の40%程度の運動負荷が回復を促進させるために至適であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Y Itoh, T Murakami, T Mori, N Agata, N Kimura, M Inoue-Miyazu, K Hayakawa, T Hirano, M sokabe, K Kawakami. Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy. Muscle & Nerve (査読有), 55 (2), 243-253, 2017. DOI:10.1002/mus.25218

伊東佑太, 小倉峻, 水谷健吾, 磯野真. 筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進効果に関する研究. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇 (査読有), 5 (2), 1-10, 2017. DOI: 10.15012/00000923

[学会発表](計5件)

伊東佑太. 運動刺激下の既存筋線維への筋衛星細胞の取り込み. 第2回 基礎理学療法学 夏の学校(特別研究者講演). 2017. 矢太樓南館, 長崎.

大来田智也, 須藤佑太, 伊東佑太, 肥田朋子. 不活動初期の腓腹筋におけるマクロファージと NGF の発現. コ・メディカル形態機能学会 第16回学術集会 2017. 名古屋大学, 愛知.

西尾紗央里, 佐々木志織, 鈴木惇也, 伊東佑太. 老化性筋萎縮に対する定量的な伸張刺激の効果. 第52回日本理学療法学術大会. 2017. 幕張メッセ, 千葉.

伊東佑太, 鈴木惇也, 縣信秀, 木村菜穂子, 平野孝行, 河上敬介. マウス足関節底屈筋群の遠心性筋収縮による筋損傷モデルの開発. 第51回日本理学療法学術大会. 2016. 札幌コンベンションセンター, 北海道.

Y Itoh, N Agata, N Kimura, M Inoue-Miyazu, T Hirano, K Hayakawa, T Murakami, K

Kawakami. The effective intensity of exercise load for facilitating recovery from muscle atrophy in mice. World Confederation for physical Therapy Congress 2015, 2015. Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre, Singapore.

[その他]

ホームページ等

・名古屋学院大学 研究業績等一覧

<http://www.ngu-kenkyu-db.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 佑太 (ITOHI YUTA)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・講師

研究者番号: 30454383

(2)連携研究者

早川 公英 (HAYAKAWA KIMIHIDE)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号: 60467280