

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18500538

研究課題名（和文） 骨格筋萎縮における細胞外基質の役割—3次元細胞培養と廃用筋萎縮動物での検討

研究課題名（英文） Role for extracellular matrix in skeletal muscle atrophy—Studies in three-dimensional cell culture and rat models

研究代表者

小池 晃彦 (Koike Teruhiko)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授

研究者番号：90262906

研究成果の概要：骨格筋萎縮は、増加しつつある虚弱高齢者にとって深刻な問題であり、そのメカニズム解明は介護予防に貢献する。筋芽細胞は骨格筋再生を担う細胞であり、本研究では様々な細胞外基質や生体内細胞環境により近い3次元培養が筋芽細胞に及ぼす影響を検討した。また、ラットで、骨格筋萎縮モデルや運動、カロリー制限による予防モデルを用い、蛋白分解酵素や糖代謝に与える影響を調べた。さらに、人における骨格筋萎縮に関し、無重力状態である宇宙空間を模したモデルを用い、運動が骨格筋の形態や機能へ及ぼす影響や肥大・萎縮関連シグナルの変化について調べた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：老化、骨格筋萎縮、細胞外基質、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

加齢による筋肉量の減少は、40-50歳代にはじまり年間1%程度の割合でおこることから超高齢者(85歳以上)では生理的に筋肉量が約半分になると考えられる。さらに、不動による廃用、病気、絶食などの要因が病的な筋肉の萎縮をおこすと、日常生活の継続が不可能になる。したがって、高齢社会においては骨格筋機能低下予防のための基礎的な研究は重要性を増しつつある。

申請者は、上皮細胞などにおいて、細胞を取り囲む環境にある細胞外基質が細胞機能に様々な影響を与えることを細胞生物学的に

近年研究してきたが、骨格筋と細胞外基質との関連の報告がごく少数に限られていたため、この点に着目した。また、研究代表者の研究室では、運動、栄養介入と糖代謝との関連を主なテーマとしてきており、骨格筋萎縮のメカニズムと代謝変化との関連という視点も重要と考えられた。

2. 研究の目的

(1)骨格筋芽細胞を用い、細胞生物学的なアプローチで、細胞外基質とマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)活性化との関連や筋細胞分化への影響を明らかにする。また、ラ

ットモデルにおいて、骨格筋委縮、運動、栄養（カロリー制限）が MMP に与える影響を明らかにする。

(2) 人において骨格筋委縮を誘導し、運動の予防効果を明らかにする。また、骨格筋における肥大・委縮関連シグナル分子への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋細胞としては、筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。C2C12 細胞は、培養中の血清濃度を下げることによって筋管細胞に分化し、骨格筋再生のモデルとして用いられる。また、ラットモデルにおいて、坐骨神経切断による骨格筋委縮誘導、水泳やトレッドミル運動、栄養（カロリー制限や肥満を誘導する高果糖食）介入を行い、ラット骨格筋での MMP や糖代謝に与える影響を検討した。

(2) 無重力状態のモデル（片足サスペンションモデル）では、20 日間の片足の不動を行った。一部の被験者では、エルゴメーターによる運動負荷を行った。

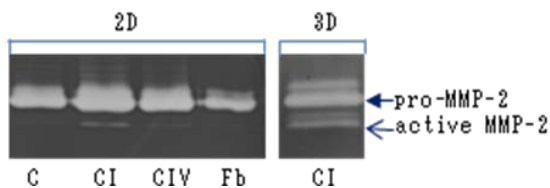
4. 研究成果

(1) 骨格筋細胞での細胞外基質の影響

骨格筋に分化する能力をもつ筋芽細胞を、通常の培養皿 (C) またはコラーゲン I (CI)、コラーゲン IV (CIV)、フィブロネクチン (Fb) で処理した培養皿上で培養する (2D) とコラーゲンでの培養ではマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2 の産生が亢進し、フィブロネクチン上では産生が低下した。さらに、細胞をコラーゲン I 重合 3 次元マトリックス内で培養したところ (3D)、MMP-2 の活性化がみられた。(図) 一方、分化に関しては、フィブロネクチン上で促進が観察された。

筋芽細胞は、骨格筋以外の細胞への分化能を持つ可能性も示唆されており、細胞を用いた治療において重要な役割を果たす可能性がある。細胞は接着する細胞外基質の性質により異なった反応を示すが、筋芽細胞に関する情報は少なく、重要な知見となりうると考えられる。

図 MMP-2 発現と活性化 (ザイモグラム)



(2) ラット骨格筋での MMP-2 と糖代謝

ラット下肢筋（腓腹筋）抽出液を用い、ザイモグラムを行い、MMP 活性を、坐骨神経切断後経時的に観察したが、神経切断側と健側との比較においては、MMP-2 の発現および活性化に差を認めなかった。同様の方法で、低強度トレッドミル運動（週 5 日）や、寿命延長効果があるカロリー制限（餌を隔日投与）を行いその効果を検討したが、MMP-2 の発現・活性化に差を認めなかった。上記モデルにおいて、糖代謝に関しても検討をした。委縮骨格筋では糖取り込みの低下が認められたのに対し、低強度運動やカロリー制限では、インスリンランプ法により、骨格筋でのインスリン抵抗性の改善が明らかになった。

本研究で用いた介入方法では、ラット骨格筋での MMP-2 プロファイルに関しては、影響を与えなかった。これまでの国内外の研究においても、骨格筋における MMP の意義については、ほとんど明らかになってきていない。しかしながら、骨格筋が損傷を受けるような状況においては、MMP が中心的な役割を果たす可能性が強く、MMP の他のアイソザイムの役割などに関する検討が今後必要と考えられる。

(3) 片足サスペンションモデルでの解析

人での片足サスペンションモデル (20 日間) では、大腿骨格筋の委縮と下肢最大収縮力の低下を起す。このモデルにおいて隔日に高強度のインターバルトレーニングを行うと骨格筋量が維持され機能も有意に改善することが MRI を用いた解析などから明らかになった。また、本モデルにおける生検筋を生化学的に解析し、AKT リン酸化の低下とミオスタチンの増加を明らかにした。

本モデルは宇宙での無重力状態を想定したものであるが、加齢による骨格筋量の減少や廃用性筋委縮におけるメカニズムに関する重要な知見を提供するものである。人における研究は、国内においては限られている。

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 6 件)

- ① K. Sakuma, W Kohei, N Norio, T Koike, K Ishida, K Katayama, H Akima. The adaptive responses in several mediators linked with hypertrophy and atrophy of skeletal muscle after lower limb unloading in humans. Acta Physiologica (in press) 査読有

- ② H. Akima, N Hotta, K Sato, K Ishida, T. Koike. Cycle ergometer exercise to counteract muscle atrophy during unilateral lower limb suspension. *Aviat Space Environ Med* (in press) 査読有
- ③ T. Koike, M. Miyamoto, Y. Oshida. Waist circumference is positively associated with insulin resistance but not with fasting blood glucose among moderately to highly obese young Japanese men *Obesity Research & Clinical Practice* (in press) 査読有
- ④ 小池晃彦、押田芳治 肥満若年男性におけるウエスト周囲径とインスリン抵抗性との関連 - 臍レベルウエスト周囲径と最小ウエスト周囲径の比較 - 総合保健体育科学: 31(1), 39-42, 2008 査読無
- ⑤ P. Li, T. Koike, B. Qin, M. Kubota, Y. Kawata, Y. J. Jia, Y. Oshida. 2008 A High-fructose diet impairs Akt and PKC ζ , Phosphorylation and Glut4 translocation in rat skeletal muscle. *Horm Metab Res* 40(8):528-532 査読有
- ⑥ M. Kubota, K. Koshinaka, Y. Kawata, T. Koike, Y. Oshida. 2008 Effects of Continuous Low-carbohydrate Diet after Long-term Exercise on GLUT-4 Protein Content in Rat Skeletal Muscle. *Horm Metab Res* 40(1):24-28 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 秋間広、渡邊航平、片山敬章、石田浩司、小池晃彦 片足サスペンション中のインターバルおよびレッグプレストレーニングが筋機能・形態に及ぼす影響 第63回日本体力医学会大会(2008年9月18日岡山)
- ② 川田裕樹、小池晃彦、姜海英、押田芳治 カロリー制限と運動負荷が体重、脂肪量、糖代謝に及ぼす影響 第63回日本体力医学会大会(2008年9月18日岡山)
- ③ Y Kawata, T Koike, M Kubota, Y Jia, P Li, Y Oshida *In vivo* regulation of glucose uptake in denervated rat skeletal muscle. 7th World Congress on Aging and Physical Activity (July 28th, 2008, Tsukuba)
- ④ 秋間広、渡邊航平、白斯琴函雅、片山敬章、石田浩司、小池晃彦 片足サスペンション中の低頻度インターバルトレーニングが筋機能・形態に及ぼす影響 第62回日本体力医学会大会(2007年9月14日秋田)
- ⑤ 川田裕樹、小池晃彦、久保田正和、押田芳治 カロリー制限と運動負荷がラットの体重と副睾丸脂肪量に及ぼす影響 第62回日本体力医学会大会(2007年9月14日秋田)
- ⑥ 川田裕樹、久保田正和、李萍、小池晃彦、押田芳治 坐骨神経切断による筋萎縮が *in vivo* における骨格筋への糖取り込みおよびインスリンシグナル分子に及ぼす影響 第50回日本糖尿病学会大会(2007年5月25日仙台)
- ⑦ 李萍、小池晃彦、川田裕樹、押田芳治 高果糖摂取ラットでの非拘束覚醒下グルコースクランプ時のインスリンシグナル解析 第50回日本糖尿病学会大会(2007年5月25日仙台)

[図書] (計1件)

- ① 押田芳治、川田裕樹、小池晃彦 メタボリックシンドロームに対する運動・スポーツの有効性-耐糖能異常 体育の科学;58(7), 461-467, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 晃彦 (Koike Teruhiko)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・
准教授
研究者番号：90262906

(2) 研究分担者

押田 芳治 (Oshida Yoshiharu)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・教
授

研究者番号：10169295

葛谷 雅文 (Kuzuya Masafumi)

名古屋大学・医学部・准教授

研究者番号：10283441