

平成 21 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700524

研究課題名(和文) 血管形成とミトコンドリア発達のシンクロナイゼーション機構

研究課題名(英文) Synchronization mechanisms for angiogenesis and mitochondrial biogenesis during muscle regeneration

研究代表者

我妻 玲 (WAGATSUMA AKIRA)

東京大学・大学院総合文化研究科・リサーチ・レジデント

研究者番号：00347121

研究成果の概要：骨格筋の再生過程における血管新生およびミトコンドリアの発達の関連性について検討した。筋再生や血管新生、ミトコンドリアの発達に関わるほとんどの遺伝子の発現増強は、筋損傷 3 日目に見られる。しかしながら、再生筋繊維で損傷部位が修復されるのは 14 日目であり、このときにはまだ筋繊維周囲に毛細血管はほとんど存在せず、28 日目に損傷前に近い毛細血管の分布が見られる。また、ミトコンドリアの酵素活性は筋損傷 14 日目にほぼ回復する。これらの結果から、筋再生とミトコンドリアの発達はほぼ同期的に行われていると考えられるが、筋繊維周囲への毛細血管の分布は遅れることが明らかになった。つまり、毛細血管の組織内分布よりも筋再生とミトコンドリアの発達が早く生じる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,200,000 | 0 | 2,200,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 300,000 | 3,500,000 |

研究分野：スポーツ科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：血管形成、ミトコンドリア、筋再生

1. 研究開始当初の背景

骨格筋には優れた再生能力が存在することはよく知られている。その再生に重要な役割を果たすのが筋サテライト細胞と呼ばれる組織幹細胞である。運動による怪我等で筋損傷を起こすと、筋サテライト細胞は活性化され、増殖を繰り返した後、互いに融合することにより新しい筋繊維(再生筋繊維)を形成し、損傷部位を再生する。この過程では、再神経支配や血管新生も起こり、再生筋繊維の肥大化・成熟化が促進されると考えられている。これまで、骨格筋の再生過程における筋サテライト細胞の動態については研究が

盛んに行われているが、再生筋繊維における血管新生の役割については十分な検討がなされていない。また、血管新生により組織への酸素供給レベルが上がると、筋繊維のエネルギー供給系は無酸素性エネルギー供給系よりも有酸素系エネルギー供給系が優位に働くと考えられる。つまり、血管新生とミトコンドリアの発達には何らかの関連性があると想定されるが、十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、筋再生過程における、再生筋繊維の形成、血管新生、ミトコンドリアの発達過程を免疫組織化学的および生化学・分子生物学的に検討することにより、それぞれの関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物として C57BL6 マウスを用いた。ネブタール麻酔下で皮膚を切開、液体窒素で冷却したステンレスプローブを 10 秒間前頸骨筋に押し当てることにより凍傷を負わせ、筋変性/再生を誘発した。対照マウスは皮膚切開のみ行なった。この凍傷モデルにより 80 - 90% の筋繊維が壊死することを確認した (エバンスブルーを用いた生体染色法による)。

(2) 凍傷 1-28 日後に筋を採取し凍結切片を作成し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ヘマトキシリン・エオシン染色により骨格筋組織の構造 (再生筋繊維径や繊維化、脂肪組織化等) を調べた。また、2%BSA/0.1% TritonX-100 でブロッキングした後、血管内皮細胞のマーカーである CD31 を認識するヒツジ抗ヒト PECAM/CD31 ポリクローナル抗体を用いて血管内皮細胞を可視化し、毛細血管密度や筋繊維周囲の毛細血管数を調べた。

(3) 凍傷 1-28 日後に筋を採取し、ポリトロン型ホモジナイザーでホモジネートし、クエン酸合成酵素の活性を測定した。

(4) 凍傷 1-28 日後に筋を採取し、液体窒素内で粉砕し、TRIzol を用いて total RNA を抽出した。ランダムヘキサマーとオリゴdT プライマーを用いて cDNA を作成し、SYBRGreen によるリアルタイム PCR を行い、遺伝子発現の定量を行った。

(5) 凍傷 1-28 日後に筋を採取し、液体窒素内で粉砕し、ポリトロン型ホモジナイザーでホモジネートしてタンパク質を抽出した。SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、PVDF メンブレンにタンパク質を転写し、Odyssey Blocking Buffer でブロッキングした。ウサギ抗ヒト VEGF ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト KDR/Fik-1 ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト Flt-1 ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト Neuropilin-1 ポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングを行い、タンパク質の発現定量を行なった。シグナルの検出には、LI-COR's Odyssey Infrared Imaging System を用いた。

4. 研究成果

凍傷による筋損傷による再生過程はヘマトキシリン・エオシン染色の結果 (図 1) から、以下のように分類した。壊死繊維と炎症反応が見られる筋再生初期 (~3 日目)、筋サテライト細胞による再生筋繊維の形成が見られる筋再生中期 (3-14 日)、再生筋繊維が肥大・成熟する筋再生後期 (14-28 日) とした。

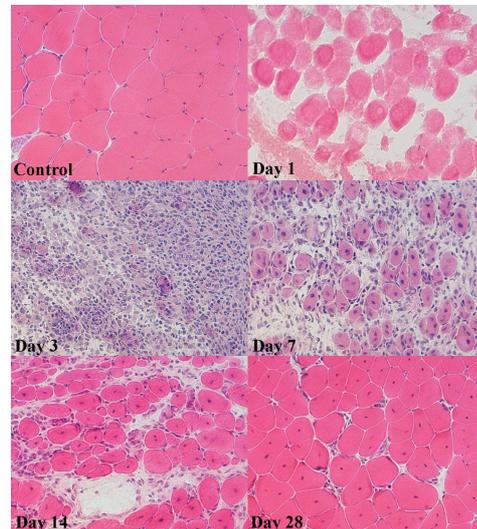


図 1. 骨格筋の変性・再生過程 ヘマトキシリン・エオシン染色による。中心に核をもつものが再生筋繊維。

図 2 に筋再生過程における筋繊維横断面積の変化を示す。概ね、筋損傷 14 日目には中心核をもつ再生筋繊維で損傷部位が占められ、14-28 日間に筋繊維が肥大する。

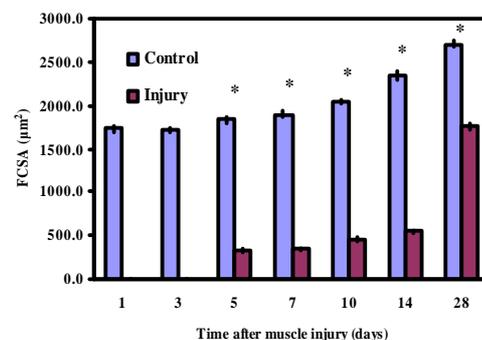


図 2. 骨格筋再生過程における筋繊維横断面積の変化

筋損傷 1 日後には血管内皮細胞はほとんど見られなくなるが、3 日後には急激な増殖が見られ (図 3、4)、14-28 日後にかけてやや減少傾向が見られた。これは、過剰に作られた毛細血管が整理された結果と考えられる。筋損傷 3 日目には血管新生制御因子である VEGF や angiopoietin-1、angiopoietin-2 とそれらの受容体 (Flt-1、KDR/Fik-1、Neuropilin-1、Tie-2) の発現増強が見られ

た。また、サテライト細胞の増殖及び再生筋繊維の形成、筋分化制御因子である MyoD、myogenin の発現増強が見られた (図 5)。

筋繊維周囲の毛細血管の分布に目を向けると、筋損傷後 3-14 日は損傷部位が徐々に再生筋繊維で占められてくるものの、毛細血管は筋繊維周囲にはほとんど形成されておらず、正常なまでに回復するのは筋損傷 28 日目であった (図 6)。

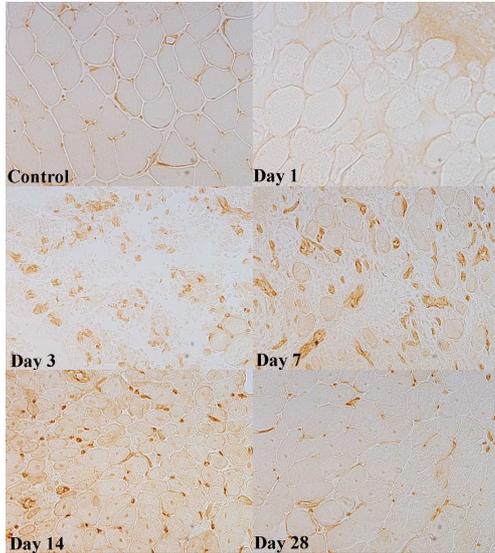


図 3. 骨格筋の再生過程における毛細血管の分布の変化 PECAM/CD31 抗体による染色。筋損傷直後では、PECAM/CD31 抗体によるシグナルが見られないが、3-7 日目になると不定形でやや大きなシグナルが観察できる。14 日目になると筋繊維周囲にシグナルが観察できるが、ほとんどの筋繊維の周囲には毛細血管は形成されていない。

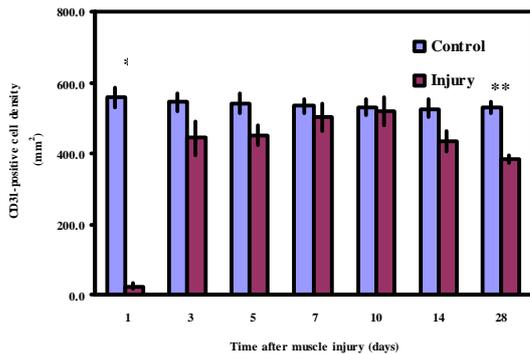


図 4. 骨格筋の再生過程における毛細血管密度の変化 筋損傷 3 日目に急激に毛細密度が増加し、14-28 日にかけて減少傾向を示す。

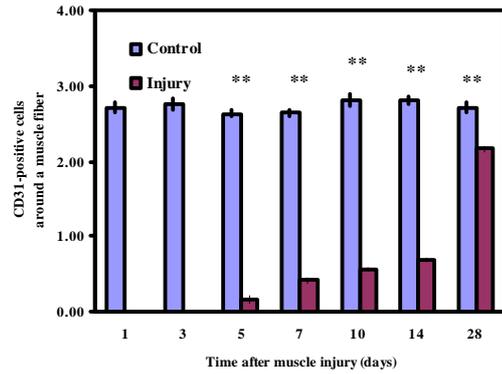


図 5. 骨格筋の再生過程における筋分化制御因子(MyoD、myogenin)の発現変化 筋損傷3日目に発現のピークを迎える。

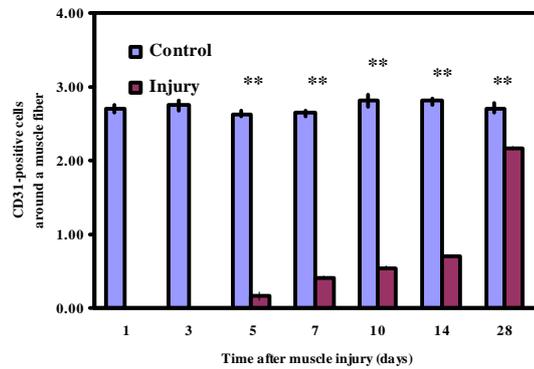


図 6. 骨格筋の再生過程における筋繊維周囲の毛細血管数の変化 筋損傷 14-28 日にかけて筋繊維周囲に毛細血管が形成されてくる。

VEGF とその受容体である (Flt-1、KDR/Flk-1、Neuropilin-1) の発現をタンパク質レベルで調べたところ、VEGF の発現は筋損傷 1 日後にピークを示し、Flt-1、KDR/Flk-1、Neuropilin-1 の発現は、7 日後にピークを示した。

ミトコンドリア酵素であるクエン酸合成酵素の活性は、筋損傷 3 日目にはほとんど活性が検出できなくなるまで低下するが、徐々に回復し 14 日目にはほぼ正常にまで回復した (図 7)。これは、再生筋繊維が損傷部位を占める時期とほぼ一致した。また、筋損傷 1-5 日後ミトコンドリア DNA 複製に関わる mtTFA と mtSSB (図 8)、ミトコンドリア酵素遺伝子の発現を制御する NRF-1 と NRF-2 (図 9)、ミトコンドリア発生に関わる PGC-1 と PRC、ミトコンドリアの分裂・融合を制御する fission1 と mitofusion-2 の発現増強が見られた。

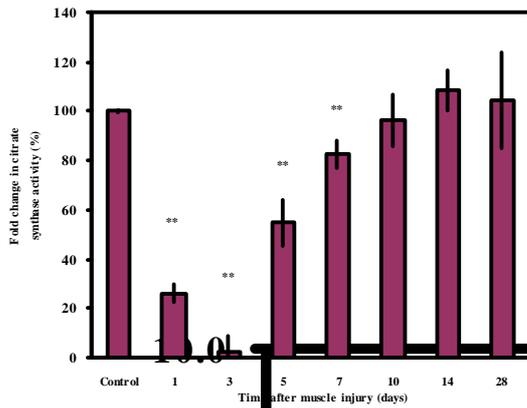


図7. 骨格筋の再生過程におけるクエン酸合成酵素の活性変化。筋損傷3日目にほとんど酵素活性ができなくなるが、その後急速に回復する。

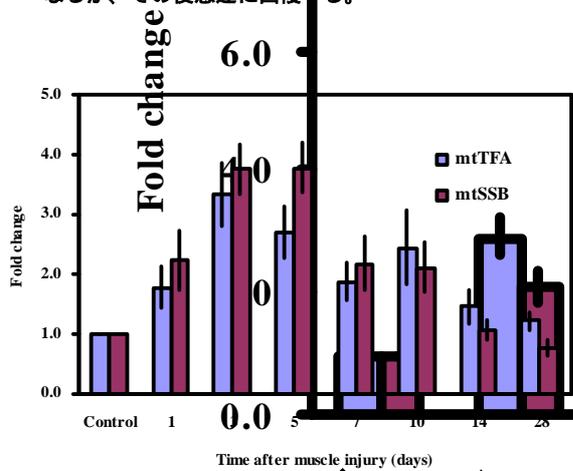


図8. 骨格筋の再生過程におけるミトコンドリア DNA複製に関わるmtTFAとmtSSBの発現変化。筋損傷3日目に発現のピークを迎える。

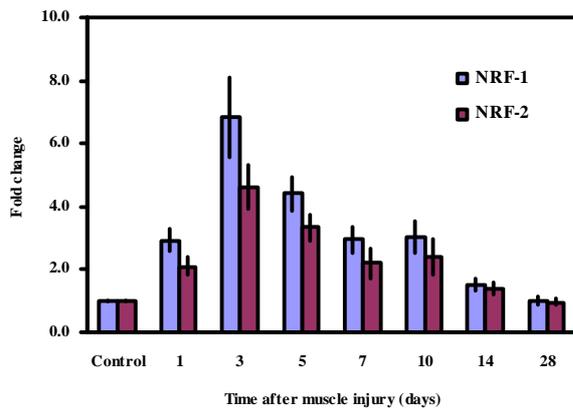


図9. 骨格筋の再生過程におけるミトコンドリア酵素遺伝子の発現を制御するNRF-1とNRF-2の発現変化

これらの結果から、筋再生とミトコンドリアの発達はほぼ同期的に行われていると考えられるが、筋繊維周囲への毛細血管の分布は遅れることが明らかになった。つまり、毛細血管の組織内分布よりも筋再生とミトコンドリアの発達が早く生じる可能性が示唆された。

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3件)

Wagatsuma A. Effect of hindlimb unweighting on expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, angiopoietin, and their receptors in mouse skeletal muscle. *Physiol Res.* 2008 57(4):613-620.

Wagatsuma A. Adipogenic potential can be activated during muscle regeneration. *Mol Cell Biochem.* 2007 304(1-2):25-31.

Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Mol Cell Biochem.* 2007 298(1-2):151-159.

[学会発表](計5件)

Shiozuka M, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Wagatsuma A, Nonomura Y, Matsuda R. Readthrough-inducing Ointment: The New Approach for the Treatment of Nonsense Mutation-mediated Disorders. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, 2008. San Francisco 12/13-12/17.

松田良一、塩塚政孝、我妻玲、平井康弘、高橋良和、野々村禎昭。「リードスルー薬開発の現状」および「胸腺内抗原注射によって免疫寛容を誘導したmdxマウスへの筋芽細胞移植」「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成20年度「砂田班」班会議、東京、都市センターホール、12/14-12/15, 2008.

塩塚政孝、川本忠文、我妻玲、嶋田健一、佐々木博之、野々村禎昭、松田良一。ナンセンス変異を無効化する経皮的薬剤投与の評価。日本動物学会第79回大会、福岡、福

● NRF-1
● NRF-2

28

岡大学七隈キャンパス、平成 20 年 9 月 5 日
9 月 7 日.

Shiozuka M, Sasaki H, Kawamoto T,
Wagatsuma A, Nonomura Y, and Matsuda R.
Readthrough-inducing ointment: the new
approach for the treatment of genetic
disorders caused by nonsense mutations.
New Directions in Biology & Disease of
skeletal muscle, 2008. New Orleans
4/27-4/30.

松田良一、塩塚政孝、我妻玲、佐々木博之、
野々村禎昭. リードスルー薬物の経皮的デ
リバリー法の開発. 「筋ジストロフィーおよ
びその関連する疾患の病態生理の解明と治
療薬物の開発に関する研究」平成 19 年度
「清水班」班会議、都市センターホール、東
京、12/7-12/8, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻 玲 (WAGATSUMA AKIRA)

東京大学・大学院総合文化研究科・リサー
チ・レジデント

研究者番号：00347121

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者