

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：33912

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11398

研究課題名(和文)筋力トレーニングによる廃用性筋萎縮回復促進に筋衛星細胞の取り込みは必要か？

研究課題名(英文) Satellite cell fusion necessity to facilitating recovery from disuse muscle atrophy by resistance training.

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・准教授

研究者番号：30454383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筋力トレーニングにより廃用性筋萎縮からの回復を促進する過程には、再荷重などによる自然回復とは異なり、筋線維核の数が大幅に増加する。今回、この筋萎縮からの回復促進過程に起こる筋線維核数の増加のメカニズムを、筋衛星細胞を後天的に標識する遺伝子組み換えマウスに尾部懸垂、筋力トレーニングを行わせ、その筋組織の観察により解析した。その結果、筋損傷後の再生過程に見られる筋線維の新生ではなく、既存筋線維への筋衛星細胞の取り込みが筋線維核数の増加に関与している決定的証拠を掴んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

廃用性筋萎縮はリハビリテーションにおいてよく遭遇する病態である。筋の大きさは発揮される筋力と比例するため、筋萎縮は最終的に早期日常生活復帰の妨げとなり、より早い回復が求められる。本研究ではこの廃用性筋萎縮が筋力トレーニングによって回復促進するときに、健全な筋の肥大や筋萎縮からの自然回復時には生じない筋線維核の数の増加が起こり、そこに筋衛星細胞の既存筋線維への取り込みが関与していることを明らかにした。この結果は、より効率よく廃用性筋萎縮を回復させる方法を開発するための指標となり、異なる筋萎縮の形態、病態の治療法開発へと萌芽する。

研究成果の概要(英文)：When resistance training 'facilitate' recovery from disuse muscle atrophy, the number of myonuclei increases above normal level. This phenomenon does not occur with spontaneous recovery. In this study, we observed the muscle tissue of transgenic mice labeling muscle satellite cell, and analysed the mechanism of the increase in the number of myonuclei that occurs in the process of facilitating recovery from muscle atrophy. As a result, we found conclusive evidence that the fusion of muscle satellite cells into existing muscle fibers is involved in the increase of the number of myonuclei.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：筋衛星細胞 筋力トレーニング 取り込み マウス

1. 研究開始当初の背景

健全な筋の肥大のための筋力トレーニング方法には蓄積されたエビデンスがある (ACSM, 2013)。このトレーニング条件がリハビリテーション医療において萎縮した筋の回復を促進するためにも用いられている。これまでに、尾部懸垂により廃用性筋萎縮を起こしたマウスの筋線維は、再荷重を2週間行うことで元のサイズに回復することが報告されている (Velden, et al, 2007)。一方我々は、尾部懸垂後のマウスに積極的な筋力トレーニングを行うと、元の筋線維サイズまでの回復期間が1週間に短縮できることを明らかにしてきた(図1)。健全な筋の筋線維がトレーニングにより肥大するまでには8-12週間かかるといわれるため、健全筋の肥大と萎縮筋の回復とは異なるメカニズムが働いていると考えられる。従って、萎縮筋の回復を促すためには、健全筋の肥大のためのトレーニングと異なった条件で行われるべきであるが、萎縮筋を対象として詳細に検討した報告は少ない。

筋組織の胎生発達時や筋損傷後の再生には、筋衛星細胞をはじめとする筋前駆細胞の融合が関与し、筋線維を新生することが明らかである。例えば胎生期の筋前駆細胞である Pax3 /Pax7 陽性細胞に由来する筋芽細胞が互いに融合し筋線維を形成するとともに、筋衛星細胞の起源となることが示されている (Pownall, et al, 2002)。また、壊死して基底膜のみとなった筋線維跡では筋衛星細胞が活性化、増殖、融合し筋線維を再生することが知られている (Charge, Et al, 2004)。

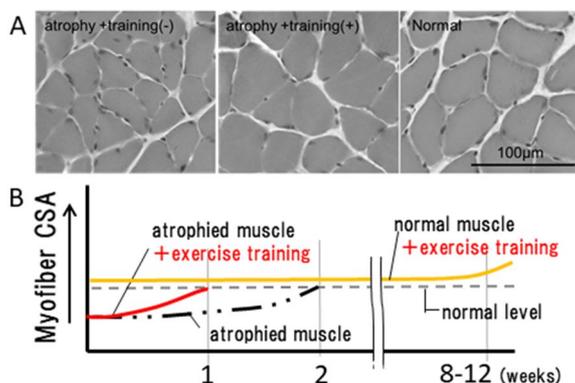


図1 A 尾部懸垂により筋線維を萎縮させた後、筋力トレーニングを行うとサイズの回復が促進する。B 筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進期間は、正常な筋が筋力トレーニングにより肥大するまでの期間に比べ極めて短い。

この筋衛星細胞は、健全な筋が共働筋切除による過負荷状態にさらされて、筋線維のサイズが増すときに、既存筋線維へ取り込まれ、筋線維核を増加させると報告されている (Murach, et al, 2017)。一方で、この筋衛星細胞の分化・融合能を抑制し筋線維核数の増加がなくても、筋線維サイズの肥大が生じるという報告 (Kirby, Et al, 2016) もあり、意見が分かれる。

萎縮した筋の回復に至っては、筋線維核数の増加は起こらず、筋構成タンパク量の変化のみが主に働き、筋衛星細胞の融合を抑制した状態でも回復が生じると考えられている (Bruusgaard, et al, 2012)。しかし我々は、尾部懸垂により筋萎縮を起こしたマウスに筋力トレーニングを行わせ、筋線維サイズの回復が「促進」されるときには、筋線維核数が健全な筋線維の1.6倍に増加することや筋衛星細胞の活性化が生じていることを明らかにしてきた(図2)。つまり、筋萎縮からの回復を「促進」するような刺激の基では単に自然回復するだけの環境とは異なり、筋構成タンパク量の変化のみならず、既存筋線維の筋衛星細胞の取り込みによる筋線維核数の増加が鍵を握っていると考えられる。筋線維を構成するタンパク質は核内の遺伝子情報を基に合成されるため、筋線維核数と筋線維サイズとの関連性は高いといわれる (Roy, et al, 1999)。また、筋線維まで最終分化した筋線維

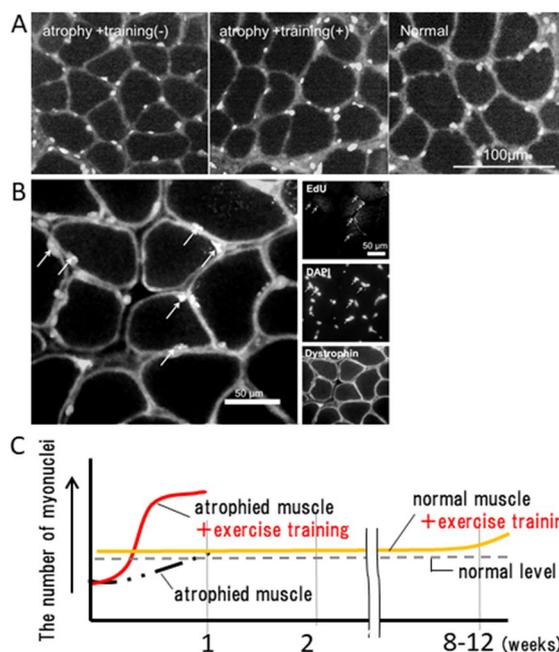


図2 A 尾部懸垂後の筋力トレーニングで筋線維核数の増加が見られる。B 一定期間に増殖したことを示すEdU陽性の核が観察された。C 筋萎縮後に筋力トレーニングを行うと数日のうちに筋線維核数が正常値以上に増加する。

核はそれ以上の増殖を生じないため、この筋萎縮からの回復促進時に起こる筋線維核数の増加は発達時や筋損傷再生時と同様に筋衛星細胞の融合が関与していると考えられる。これを確かめるためにこれまで、EdUのClick-iT法を用いて細胞増殖を検出したり、筋衛星細胞(Pax7)および筋分化(MyoD、Myogenin)のマーカを用いた免疫組織化学染色により筋衛星細胞の活性化や増殖、分化の証拠を揃えてきた。しかし、廃用性筋萎縮の回復が筋力トレーニングにより促進されるときに、筋衛星細胞が関与して筋線維核数が増加する決定的な証拠は捉えられていなかった。

2. 研究の目的

臨床医療においてよく直面する廃用性筋萎縮という病態に焦点を絞り、その回復促進に効果的な筋力トレーニングに、既存筋線維の筋衛星細胞取り込み、筋線維核数の増加が関与する証拠を押しやる。そして、既存筋線維への取り込みがどのような刺激をトリガーに、どのようなシグナルの上で生じているのかを網羅的に検索し明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

対象動物

B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}/J マウスと B6.Pax7^{tm2.1(cre/ERT2)Fan}/J マウスを交配して作出した雄性マウスを12週齢まで育成し実験に供した。このマウスに2週間尾部懸垂を行い、後肢筋を萎縮させた(図3A)。この尾部懸垂期間の後半5日間Tamoxifenを腹腔内投与し、Pax7陽性細胞にYellow Fluorescent Protein(YFP)を発現させた。なおこのPax7陽性細胞は、以降分化が進み筋線維となってもYFPを発現する。その後筋萎縮の回復を促進させるために1週間筋力トレーニングを行った(Tra群)。筋力トレーニング後、ヒラメ筋を組織学的に評価し、尾部懸垂後に筋力トレーニングを行わず普通飼育したマウス(nTra群)、Tamoxifen投与後、尾部懸垂も筋力トレーニングも行わないマウス(con群)の筋と比較した。

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。またすべての実験は、名古屋学院大学動物実験委員会(2014-001)および遺伝子組換え実験安全委員会(D2017-001)の承認を得て実施した。

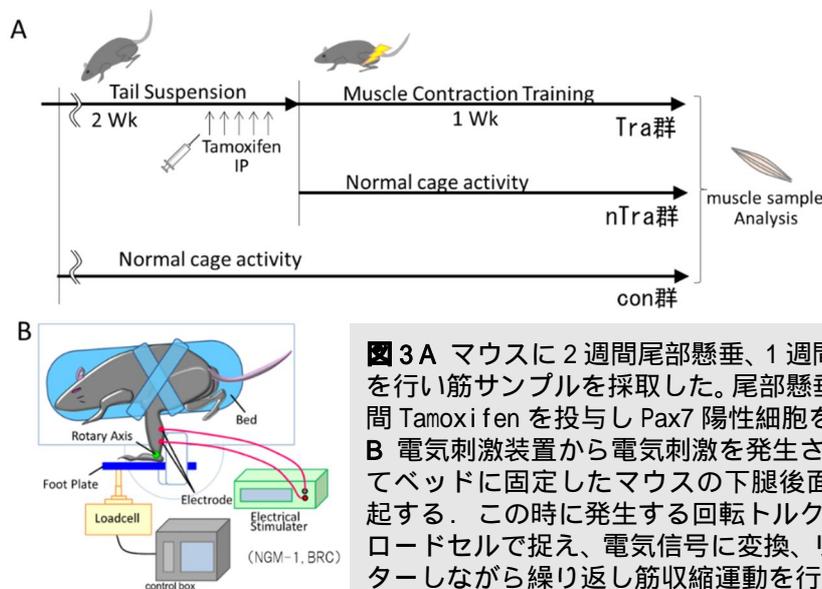


図3A マウスに2週間尾部懸垂、1週間筋力トレーニングを行い筋サンプルを採取した。尾部懸垂期間後半には5日間Tamoxifenを投与しPax7陽性細胞を蛍光標識した。
B 電気刺激装置から電気刺激を発生させ、表面電極を介してベッドに固定したマウスの下腿後面の筋に筋収縮を惹起する。この時に発生する回転トルクは足底板を介して、ロードセルで捉え、電気信号に変換、リアルタイムにモニターしながら繰り返し筋収縮運動を行うことができる。

尾部懸垂

尾部懸垂はMorey法を改変して行った。尾部懸垂のための処置はイソフルラン吸入麻酔下で行い、舌根沈下による窒息死を避けるため、麻酔からの覚醒を確認した後に懸垂を開始した。なお、尾部懸垂期間中でもマウスの前肢は接地しており、ケージ内の移動は可能で、餌や水も自由に摂取できた。

筋力トレーニング

筋力トレーニングには、マウス用足関節底屈筋力測定装置(NGM-1, BRC, 図3B)を用い、定量的な等尺性筋収縮を惹起することで行った。具体的にはまず、マウスをイソフルラン吸入麻酔下(濃度1.5%)で後肢下腿後面を剃毛し、マウス用固定ベッド(mBED, BRC)に固定した。その後、剃毛したマウスの下腿後面には、アキレス腱移行部とそこから4mm近位方の皮膚上に表面電極(EK-1510SUS, BRC)を貼付し粘着テープで固定した。次に接着剤及び粘着テープで足底板にマウス足底を固定した。マウスの後肢は下腿と足底のなす角度が90°になるよう調整し、装置の回転軸とマウス足関節軸(腓骨外果より1mm前方の点)が一致するように装置に付帯するレーザーポインタを利用して設置した。この状態で、装置に付帯する電気刺激装置(SEN-3401,

Nihon Koden)より、表面電極を介して電気刺激を与え、マウス足関節底屈筋群を収縮させた。なお、この時に発揮されたトルクは足底板を介してロードセルで記録され、リアルタイムに強度を確認しながら等尺性収縮することができる。電気刺激の条件は以前明らかにした筋萎縮からの回復を促進させる強度に倣い、40 Hz, 2.0 ms, train duration 100 ms, main interval 1.0 s; 1 Hz とし、足関節が最終的に発揮するトルクが最大収縮時の 40%となるように調節した。この定量的な等尺性筋収縮運動を 50 回行った。

評価

廃用性筋萎縮と筋力トレーニングによる回復の程度の確認

筋力トレーニング後のマウスからヒラメ筋からを採取し、4% Paraformaldehyde in PBS で固定処理をし、続いて Sucrose 水溶液で置換処理した。そして、液体窒素で冷やしたイソペンタン内で凍結させた。凍結サンプルから 10 μm 厚の横断切片を作成した。横断切片は、抗 Dystrophin 抗体や DAPI を用いて染色した。具体的には、横断切片を PBS で洗浄後、3% Bovin serum albumin(BSA)と M.O.M. mouse Ig blocking reagent (MKB-2225, Vector) in PBS で 4 晩、一晩ブロッキング処理をした。ブロッキング処理後、一次抗体である anti-dystrophin antibody (1:200, GTX27164, GeneTex) in PBS をのせ、37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させた。反応後 1% BSA in PBS で洗浄し、次に二次抗体として、Alexa fluor 568[®] anti-mouse IgG antibody (1:400, A11004, Thermo Fisher)、DAPI (1:1000, 268298 Merck)の混合液をのせ、遮光した状態で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分間反応させた。洗浄後、蛍光染色用封入材(TA-030-FM, Thermo Fisher)で封入した。染色した横断切片は蛍光顕微鏡下で撮影してデジタル画像を得た。得られた画像から ImageJ ver.1.51 を用いて筋線維横断面積、筋線維あたりの核の数を測定し、群間で比較した。

筋線維による筋衛星細胞取り込みの有無と程度の検証

筋力トレーニング後のマウスから上述の方法で作成した横断切片に、抗 YFP 抗体および抗 Dystrophin 抗体を用いて免疫組織化学染色を施した。具体的には、3% BSA と M.O.M. mouse Ig blocking reagent でブロッキング処理を行った後、1 次抗体として anti-GFP antibody (1:200, ab183734, abcam)、anti-dystrophin antibody (1:200, GTX27164, GeneTex)をそれぞれ 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させた。反応後 1% BSA in PBS で洗浄し、次に二次抗体として、Alexa fluor 488[®] anti-rabbit IgG antibody (1:400, A11008, Thermo Fisher)、Alexa fluor 568[®] anti-mouse IgG antibody (1:400, A11004, Thermo Fisher)、DAPI (1:1000, 268298 Merck)の混合液をのせ、遮光した状態で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分間反応させた。蛍光顕微鏡下で撮影してデジタル画像を得た。得られた画像から、YFP 陽性領域(単核細胞上か筋線維上か)や YFP 陽性筋線維の核の位置関係を観察した。また ImageJ ver.1.51 を用いて YFP 陽性の筋線維の割合を測定し、群間で比較した。

4. 研究成果

廃用性筋萎縮と筋力トレーニングによる回復の程度

導入した遺伝子組み換えマウスにおいて、これまでに確認してきた筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進が生じるか、その時に筋線維核の増加が生じるかどうかをまず確認した。nTra 群の平均筋線維横断面積は $1361 \pm 535 \mu\text{m}^2$ であり、con 群の面積 $1867 \pm 203 \mu\text{m}^2$ と比べ有意に低値であったのに対し、Tra 群の面積は $1637 \pm 656 \mu\text{m}^2$ であり、以前の報告と同様に con 群との間に有意な差はなかった(図 4)。筋線維 1 本あたりの筋線維核数も以前の報告と同様に Tra 群で有意に高値を示した(nTra 群 0.55 ± 0.22 、Tra 群 0.82 ± 0.42 、con 群 0.46 ± 0.18)。これらの結果はいずれも以前、筋力トレーニングによる廃用性筋萎縮からの回復促進効果として報告した現象と同様であり、導入した遺伝子組み換えマウスにおいても再現できることが確認された。

筋線維による筋衛星細胞取り込みの有無と程度

筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進時に、筋線維核が大幅に増加する現象のメカニズムを明らかにするために、Pax7 陽性細胞すなわち筋衛星細胞由来の YFP が陽性となる筋線維有無と割合を観察した。Con 群では YFP 陽性の筋線維が全く観察されなかったのに対し、Tra 群で多く観察された(図 5A)。Tra 群の縦断切片においても、筋線維長軸に渡って YFP 陽性の領域を持つ筋線維が観察された(図 5B)。nTra 群では YFP 陽性の単核細胞の数が多い傾向にあったが筋線維に YFP はほとんど観察されなかった。これらの YFP 陽性の筋線維の割合を計測すると、Tra 群で高かった(図 5C、nTra 群 $0.67 \pm 0.86\%$ 、Tra 群 $3.42 \pm 2.71\%$ 、con 群 $0.01 \pm 0.00\%$)。

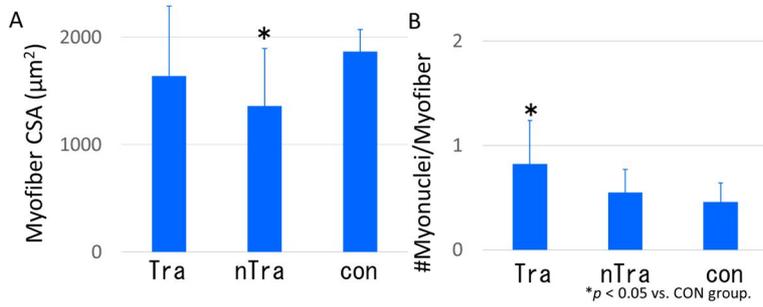


図4 A 各群の筋線維横断面積の平均値を示す。尾部懸垂後に普通飼育したのみのnTra群は尾部懸垂を行っていないCON群に比べ有意に小さい値だったが、尾部懸垂後筋力トレーニングを行ったTra群はCON群と比べ有意な差はなかった。**B** 各群の筋線維あたりの筋線維核数の平均値を示す。nTra群とCON群の筋線維あたりの筋線維核数の間には有意な差はなかったが、Tra群の数はCON群に比較して有意に大きかった。

損傷後のマウス筋再生において、筋衛星細胞同士が融合した新生筋線維の核は、新生後1年近くにわたって、筋線維の中心部に数珠状をなして存在する（中心核線維）。本研究で観察されたYFP陽性筋線維の核は、細胞膜に近接して存在し、中心核線維ではなかった。そのため、衛星細胞同士の融合ではなく、既存の筋線維に筋衛星細胞が取り込まれた証拠であると考えられる。すなわち、廃用性筋萎縮を起こした筋に筋力トレーニングを行い、その回復が促進されるときには、既存の筋線維に筋衛星細胞が取り込まれ、筋線維核を増加されたと考えられる。

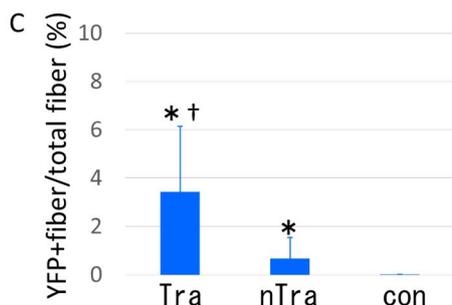
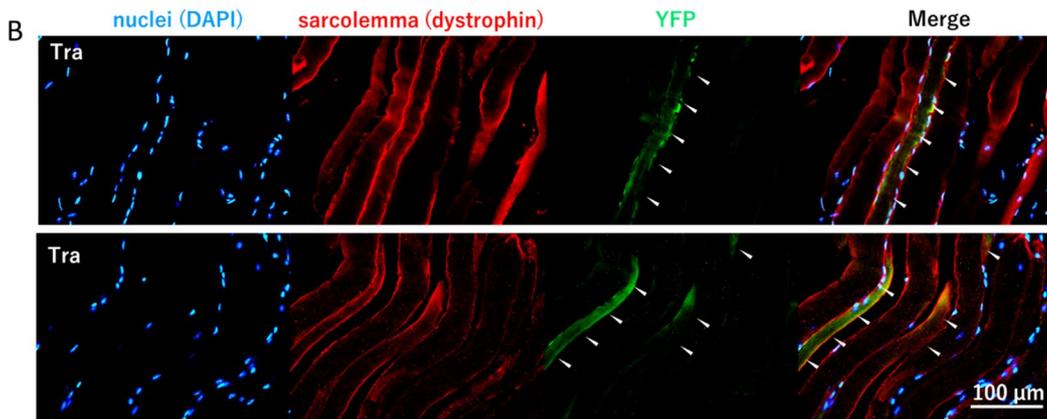
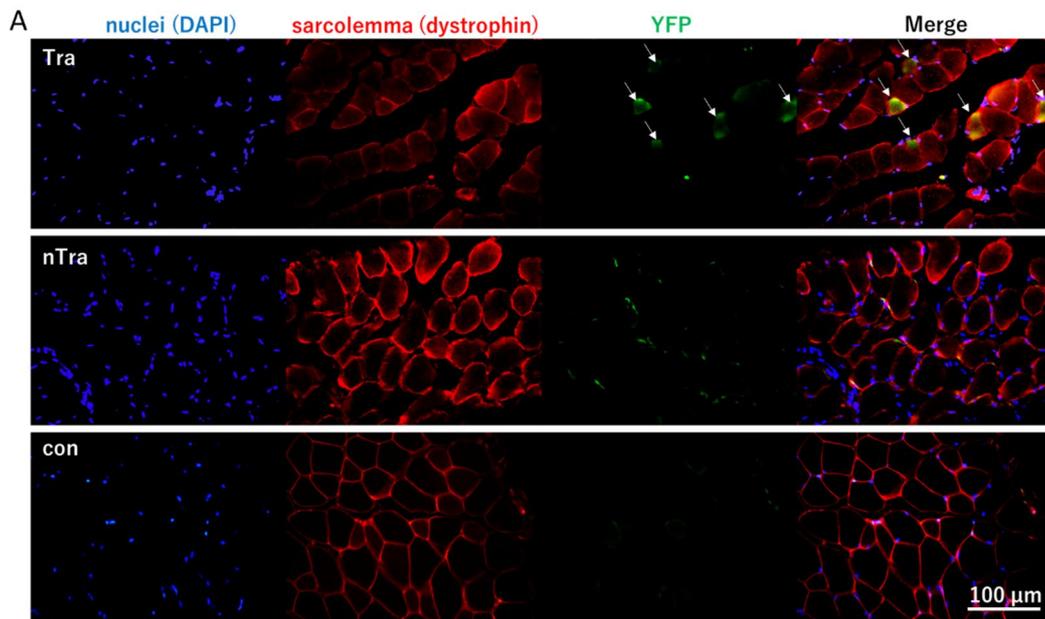


図5 A 各群の代表的なヒラメ筋横断切片の染色像を示す。青:DAPI、赤:dystrophin、緑:YFP、:YFP陽性筋線維。YFP陽性筋線維はTra群に多く観察された。**B** 代表的なヒラメ筋縦断切片の染色像を示す。青:DAPI、赤:dystrophin、緑:YFP、:YFP陽性筋線維。YFP陽性領域は筋線維長軸にわたって観察された。**C** Aの画像から測定した各群のYFP陽性筋線維の割合を示す。CON群、nTra群に比べTra群で有意に多かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T Kawashima, R Ji, Y Itoh, N Agata, N Sasai, T Murakami, M Sokabe, F Hamada, K Kawakami	4. 巻 64
2. 論文標題 Morphological and biochemical changes of lymphatic vessels in the soleus muscle of mice after hindlimb unloading	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 620-628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mus.27402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K Yoshioka, N Sasai, Y Kurogi, K Hayakawa, Y Itoh, N Agata, T Murakami, M Inoue-Miyazu, M Sokabe, K Kawakami	4. 巻 553 (3)
2. 論文標題 Cessation of electrically-induced muscle contraction activates autophagy in cultured myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 410-416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊東佑太, 伊藤晃慎, 二之宮宏人, 丹羽弘貴, 名和礼乃, 原田志保, 富士井里紗	4. 巻 8-2
2. 論文標題 最終分化した筋細胞への筋衛星細胞の取り込みモデル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15012/00001239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村悠磨, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介
2. 発表標題 骨格筋損傷後のリンパ管応答
3. 学会等名 コ・メディカル形態機能学会第19回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島隆史, 田村悠磨, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 濱田文彦, 河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮時に生じるマウスヒラメ筋内リンパ管の分布応答
3. 学会等名 日本解剖学会 第77回九州部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村悠磨, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介
2. 発表標題 骨格筋損傷後のリンパ管の分布・形態変化 -伸長性収縮による筋損傷モデルマウスを用いて-
3. 学会等名 日本解剖学会 第77回九州部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 悠磨、川島 隆史、紀 瑞成、縣 信秀、伊東 佑太、河上 敬介
2. 発表標題 マウス骨格筋損傷からの回復過程におけるリンパ管の変化
3. 学会等名 第26 回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 骨格筋損傷初期における筋内リンパ管の変化
3. 学会等名 第44回日本リンパ学会総会（日本リンパ学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 筋損傷初期において、筋内リンパ管は拡張する
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会 (JSPT)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村悠磨、縣信秀、野村篤、河上敬介、伊東佑太
2. 発表標題 廃用性筋萎縮からの回復を促進させるための至適運動頻度の検討
3. 学会等名 コ・メディカル形態機能学会第18回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村悠磨、縣信秀、野村篤、河上敬介、伊東佑太
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に対する1日2回の筋力トレーニング効果
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東佑太、吉岡潔志、田村悠磨、縣信秀、清島大資、河上敬介
2. 発表標題 筋力トレーニングによる筋萎縮回復促進効果への筋衛星細胞取り込みの関与
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 筋損傷後のリンパ管は毛細血管よりも早く変化する
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋学院大学 研究等業績一覧 http://www.ngu-kenkyu-db.jp/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	縣 信秀 (Agata Nobuhide) (00549313)	常葉大学・保健医療学部・准教授 (33801)	
研究分担者	清島 大資 (Kiyoshima Daisuke) (80756370)	東海大学・医学部・講師 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------