

平成22年5月13日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700423

研究課題名（和文） 神経筋相互作用の解明

研究課題名（英文） Study of neuromuscular interaction

研究代表者

田中 正二（TANAKA SHOJI）

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：70422657

研究成果の概要（和文）：医学的リハビリテーションの基盤研究として、筋収縮による骨格筋、運動神経、神経筋接合部の適応現象を明らかにするために、ラット坐骨神経への電気刺激により足底筋の収縮を惹起し、関連する因子について分子生物学的、免疫組織学的解析を行った。その結果、筋肥大、筋修復に関連する因子や神経筋接合部の成熟に関与する因子の増加、その因子の局在およびシグナル伝達の一部が示された。

研究成果の概要（英文）：This scientific research in rehabilitation medicine was performed in order to clarify the adaptation phenomenon of skeletal muscle, motor neuron and neuromuscular junction followed by muscle contraction induced by electric stimulation of sciatic nerve in rats. Related factors of the adaptation phenomenon were studied by immunohistological observation and molecular biology analysis. As a result, there were increased expression of a factor relevant to muscle hypertrophy and repair and a factor participant in maturity of neuromuscular junction, which location and partial signal transfer were revealed in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：理学療法学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学

1. 研究開始当初の背景

リハビリテーションの臨床場面において、外傷後のギプス固定や慢性疾患による不動を契機とした二次的な廃用性筋萎縮にしば

しば遭遇するが、廃用性筋萎縮を予防することは、患者の日常生活への復帰を支援する上で非常に重要である。廃用性筋萎縮では、筋線維径の減少のみならず、筋原蛋白質の減少、筋線維タイプの速筋化、毛細血管数の減少、

運動単位の減少といった質的な変化も招来する。特に運動単位の減少は神経筋伝達機構における耐疲労性に関与すると考えられる。神経筋伝達において最も重要な物質はアセチルコリン(ACh)であり、AChは運動神経終末のシナプス小胞からシナプス間隙に放出され、筋細胞膜に存在するACh受容体(AChR)に結合して刺激を伝達した後、AChエステラーゼ(AChE)により酢酸とコリンに加水分解される。分解されたコリンの約半分はコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の作用によりAChに再合成されて再び利用される。筋収縮にはこのようなAChの合成と分解が迅速に行われなければならない。培養運動ニューロンのChAT mRNAの活性調節やAChRの凝集に肝細胞増殖因子(HGF)が関与するとともに、脊髄運動ニューロンに対する誘導や胎生期における介在ニューロンの遊走にも関与している。HGFはその受容体であるc-Metに結合してリン酸化することで、肝臓、腎臓、肺、骨、皮膚、心臓、血管内皮、膵臓等の器官形成や再生および骨格筋再生に関与する多機能因子である。筋衛星細胞は成熟骨格筋において、休止した状態で筋基底膜と筋線維細胞膜の間に存在し、骨格筋の損傷や伸張刺激により増殖、分化することで筋再生に寄与している。HGFは骨格筋の損傷や伸張刺激によって筋衛星細胞自体から産生され、オートクリン、パラクリンとしてその増殖活性に作用している他に、筋損傷時における筋衛星細胞の遊走にも関与している。つまり、HGFは筋修復過程において、筋衛星細胞を筋損傷部位へ遊走させ、増殖を開始させるとともにAChRの凝集を誘導し、シナプスの成熟に寄与しているものと考えられる。廃用性萎縮に対しても、運動負荷や伸張刺激を加えることで、このような筋修復過程と同様の現象が生じる可能性が考えられる。我々の研究において、尾部懸垂によって廃用性萎縮を惹起したヒラメ筋に、再荷重負荷を加えることでHGFが増加すること、運動負荷によって活性化した筋衛星細胞数が増加することを確認している。

2. 研究の目的

筋収縮によるHGF発現とAChR凝集との関連を調査し、効果的リハビリテーションを検討する。

3. 研究の方法

9週齢Sprague Dawley雄ラットを使用し、無作為に電気刺激群と非電気刺激群の2群に振り分けた。麻酔科にて、すべてのラット右大腿外側に切開を加え、坐骨神経に刺激電飾を設置した。実験群にのみ電気刺激装置を用

いて、100Hz、5V、5分間の刺激を1回のみ与えた。その後、筋膜および皮膚を縫合した。1、3、7日後に右足底筋を採取し、遺伝子発現解析および免疫組織学的解析に供した。

遺伝子発現解析として、採取した足底筋は即座に、RNA安定化試薬に浸漬し、RNAの安定化を図った。次にTotal RNAを抽出し、Random 6 mers primerを用いて逆転写反応を行い、1st strand cDNAを合成した。HGF、c-Met、MyoD、myogenin、MMP2、MuSK、Dok7、AChR-alpha、AChR-gamma、AChR-epsilon mRNA発現量はReal-time PCR法にて半定量を行った。なお、Real-time PCRはLightCycler ST300および遺伝子特異的 custom primer pairを用いて、インターカレーター法により行った。リファレンス遺伝子としてGlyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。

統計学的解析として student's t-test および Welch's testを用いた。なお、有意水準を5%未満とした。

免疫組織学的解析として、採取した足底筋は液体窒素で冷却したイソペンタン内で、即座に凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。組織はクリオスタットを用いて横断切片が得られるように薄切し、シランコートスライドグラスに貼付した。それぞれの抗原に適する固定を行った後、正常ヤギ血清もしくは正常ロバ血清を用いてブロッキングを行った。次にHGF抗体、リン酸化チロシン抗体、MuSK抗体を反応させた後、それぞれに対応する蛍光標識抗体およびα-bungarotoxin conjugate Alexa Fluor 555を反応させた。洗浄後、Prolong Gold Antifade Reagent with DAPIを用いて封入した。蛍光顕微鏡(Biozero; キーエンス)を用いて観察、撮影を行った。

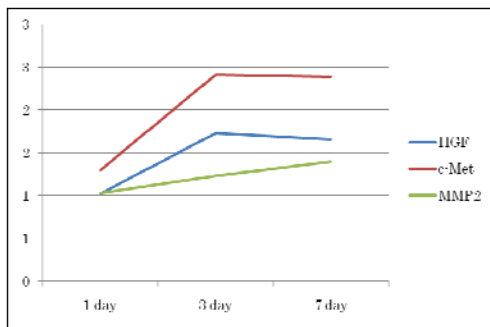
なお、本研究は本学動物実験委員会承認のもと実施した。

4. 研究成果

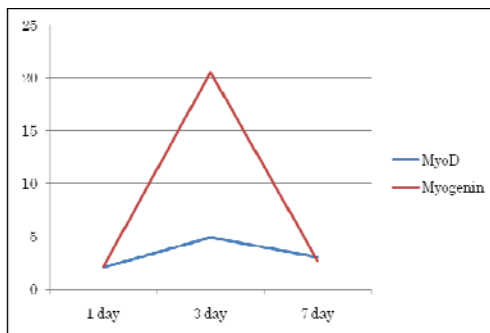
刺激群におけるHGF mRNA、MMP2 mRNA およびDok7 mRNA発現量は、刺激後徐々に増加し、7日後に非刺激群に対して有意に高値を示した(図1)。C-Met mRNA、MyoD mRNA、myogenin mRNA、MuSK mRNA、AChR-alpha mRNA発現量は、非刺激群に対して、刺激1日後から有意に増加し、3日にピークに達し、7日まで有意に高値を示した(図1, 2, 3, 4)。AChR-gamma mRNA発現量は、刺激3日後をピークに非刺激群に対して7日まで有意に高値を示した(図3)。AChR-epsilon mRNA発現量は、刺激後徐々に増加し、非刺激群に対して、3日から7日まで有意に高値を示した(図4)。

免疫組織学的解析を行ったところ、HGFとリン酸化チロシンが局所的に近似した部位に確認された(図5; HGF: 緑。リン酸化チロ

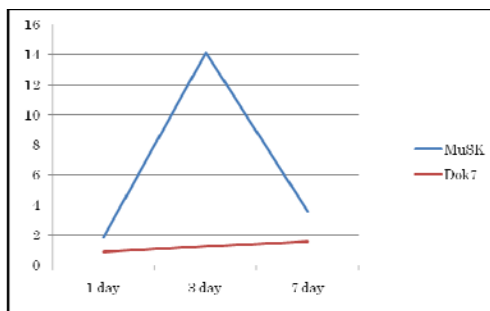
シン：赤、核：青)。また、MuSK と AChR は同一部位に確認された (図 6)。さらに AChR とリン酸化チロシンが近似した部位に発現していることが確認された。



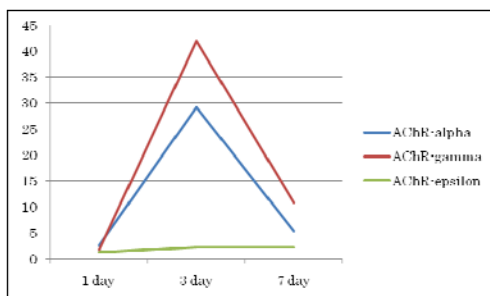
(図 1)



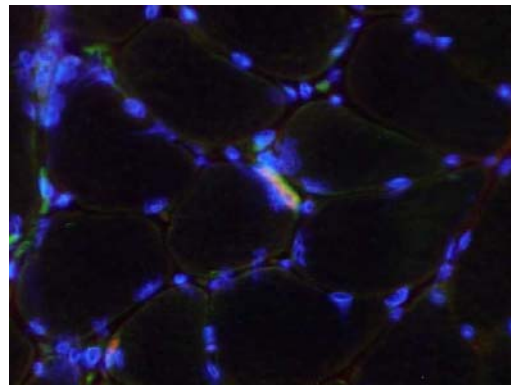
(図 2)



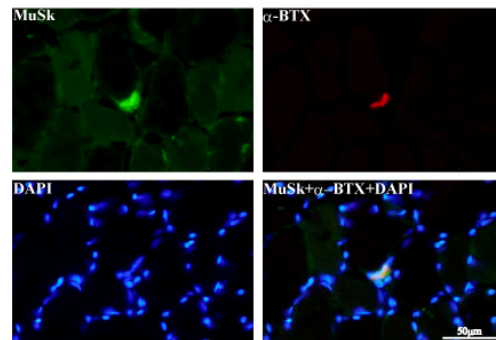
(図 3)



(図 4)



(図 5)



(図 6)

今回、ラット坐骨神経に対する一回の電気刺激によって、その支配下にある足底筋において、HGF、c-Met、MyoD、myogenin、MuSK、Dok7、AChR-alpha、AChR-gamma、AChR-epsilon mRNA の増加が確認された。発現量の変化やピークは様々であるが、一回の刺激においても、骨格筋および運動単位の適応現象が生ずる可能性が示された。

今回、刺激 1、3 日後の HGF mRNA 発現量の変化は有意ではなかったが、MyoD、myogenin mRNA 発現は 1 日後より有意に増加していた。また、免疫染色から、1 日後より HGF のチロシンリン酸化の可能性が示唆された。このことから、HGF mRNA 発現の変化は急激に生じる必要がないのかもしれない。

免疫染色において、MuSK のリン酸化については明確にはできなかったが、MuSK と AChR、AChR とリン酸化チロシンの局在が類似していたこと、MuSK、Dok7、AChR mRNA 発現量の増加から、運動単位の適応が生じる可能性が示された。

今後、神経筋相互作用を解明するためには、介入方法や解析方法を検討する必要がある。さらに、効果的なリハビリテーションを行う上でも、神経筋の環境適応に関する研究が必要である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

田中正二, 立野勝彦, ラット坐骨神経に対する電気刺激が筋衛星細胞活動に与える影響, 第 44 回日本理学療法学会大会, 2009 年 5 月 29 日, 東京国際フォーラム (東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://mhs3.mp.kanazawa-u.ac.jp/eng/staff/rihabiri/tanaka.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正二 (TANAKA SHOJI)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号 : 70422657