

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月17日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700558

研究課題名（和文） 萎縮筋における機械刺激による収縮機能改善のメカニズム解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism ameliorating contractile ability of atrophied skeletal muscle

研究代表者

笹井 宣昌（SASAI NOBUAKI）

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授

研究者番号：20454762

研究成果の概要（和文）：骨格筋に加わる機械刺激の変化に応じて、その細胞内タンパク質合成系の働きが制御されて、筋が萎縮・肥大することが示唆された。これは、ラットの除神経筋萎縮や培養骨格筋細胞の実験結果によるものである。さらなるメカニズム解明に必要な、マウスの廃用性筋萎縮モデルを確立できた。これらの成果を、筋の萎縮・肥大に関連する細胞・分子メカニズムと筋収縮力改善との関連を解明することに繋げたい。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle atrophy and hypertrophy involve the regulation of protein synthesis which is caused by alterations in mechanical stress against the muscle, which is indicated from data of denervation atrophy in rat and stretch-induced hypertrophy of cultured cell in this project. Furthermore, the disused-atrophy model of mouse tail-suspension has been established in our laboratory. This model will allow for more detail analyses on the relation between cell signaling and the recovery of muscle force generating capacity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

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：理学療法学、筋収縮力の回復

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋は、廃用や加齢により萎縮する。これらの萎縮は、筋力低下に直結するので、臨床的意義は重大であり、関心を集めている。

(2) それらの筋萎縮や筋力低下を予防・改善する為に、療法士の徒手、重錘、あるいはトレーニング・マシンを用いた負荷運動が活用されている。これは、その様な運動により、

萎縮で減少した筋量が回復することが、経験的に知られると共に、筋量が増えれば筋収縮力も増強されることも知られているからであろう。

(3) その様な運動で、筋に機械刺激が加わることが、筋量を増やすことに重要であると考えられる。例えば、宇宙飛行などにより微小重力環境へ曝すことや、下肢を懸垂して非加

重にすることで、下肢筋に働く力学的負荷（収縮に対抗する力）を減少させると、筋内でタンパク質の分解を促す分子メカニズムが活性化して、筋が萎縮する (Ikemoto et al. 2001, Tidball 2005)。逆に、筋に伸張力などの力学的負荷を加えると、タンパク質の合成が促され、筋が肥大すると考えられている (Kubica et al. 2004)。よって、機械刺激によりタンパク質の代謝が調節されることが、筋量の調節に関連する可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究は、廃用性に萎縮した骨格筋における萎縮・収縮力の回復に、機械刺激が有効であることを細胞・分子レベルで明らかにすることに挑む。収縮力が、どれくらいまで回復するかという点には、萎縮回復の他に、筋線維タイプ構成の変化も影響すると推測できる。

## 3. 研究の方法

(1) 【実験倫理】 本研究は、所属施設の動物実験委員会の承認を得た上で、その指針、規定、指示などに従いながら実験を実施した。さらに「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 年文部科学省告示第 71 号)、及び「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会、平成 15 年 12 月 5 日) を順守し、動物苦痛軽減に配慮した。

(2) 【除神経ラット】 ウィスター系雄性ラット 24 匹 (8 週令、体重  $251 \pm 12$  g) を、除神経群 (DENr)、除神経+他動的伸張群 (STRr)、シャム群 (CONr) の 3 群、各 8 匹に任意に分けた。DENr, STRr には、左坐骨神経を、後肢付け根付近で約 1 cm 切除することで除神経を施した。CONr には、除神経しない擬似術を施した。さらに STRr には、手術の 24 時間後から、除神経されたヒラメ筋に対して他動的伸張を徒手で加えた。伸張の手順は、麻酔下で足関節を最大背屈位で 5 秒間維持を 15 分/日を繰り返した。2 週間後、全群のヒラメ筋を採取し、液他窒素により迅速に凍結した。

(2) 【尾部懸垂マウス】 ICR 雄性マウス 8 匹 (12 週令) を尾部懸垂群 (TSM) と通常飼育群 (CNM) の 2 群、各 4 匹に任意に分けた。TS は、Morey ら (1979) の方法を参考に、尾部を懸垂した (図 1)。懸垂は、体幹が水平より約  $30^\circ$  傾き、後肢が完全免荷されるように設定した。懸垂以外の行動制限は排除した。2 週間後、両群の長指伸筋、ヒラメ筋、腓腹筋を採取し、液他窒素により迅速に凍結した。

(3) 【トリ骨格筋初代培養細胞】 ニワトリ

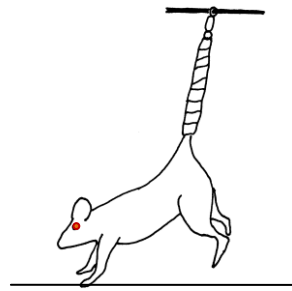


図 1. 尾部懸垂マウス 後肢を免荷するので、後肢筋に顕著な廃用性萎縮が惹起される。

(ホワイトレグホン種) の 12 - 13 日胚から胸筋を採取して、機械的破碎により単核の筋芽細胞を抽出した。筋が細胞を、伸張用シリコン膜 (直後 (4) 項を参照) 上に播種して、初代培養した ( $5\% \text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ )。予めシリコン膜の表面にコラーゲン・タイプ I をコーティングすることで、細胞が良好に接着した。市販の細胞培養用最少培地に  $10\%$  ウマ血清と  $4\%$  ニワトリ胚抽出物を添加して培養液とした。培養液を、2-3 日に 1 回の頻度で新鮮にした。播種後、2-3 日で筋芽細胞が融合して、多核の筋管 (細胞) を形成した。5 日後で細胞が、横紋や自己収縮が観察できるくらいの線維に成長した。これを実験に用いた。

(4) 【培養細胞の他動的伸張】 細胞を薄いシリコン膜上に培養して、そのシリコン膜を、自作装置により周期的に伸張した (図 2)。伸張条件は、Adachi ら (2003) を参考に頻度  $1/6\text{Hz}$ 、伸長率  $110\%$ 、72 時間とした。シリコン膜に接着している細胞も、シリコン膜の伸張に伴い他動的に伸張された。伸張を加えた細胞 (STRc) に対して、同期間通常に培養した細胞 (CONc) を実験対照とした。

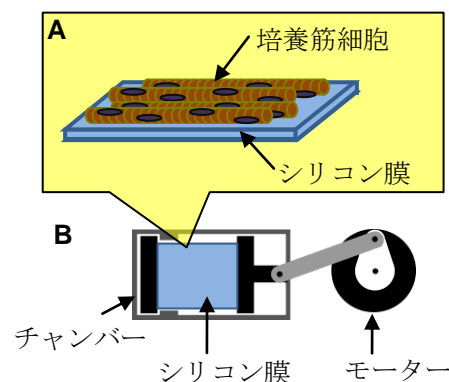


図 2. 培養筋細胞の他動的伸張 A はシリコン膜上での細胞培養、B は伸張装置の模式図。B のチャンバー内で、シリコン膜は、モーターの回転に従う単振動により周期的に伸張される。

(5) 【筋組織の横断面積計測】 凍結した筋

組織より厚さ 8  $\mu\text{m}$  の横断切片を作成して、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を施した。切片の顕微鏡観察像を CCD カメラによりデジタル撮影した後、画像解析ソフトにより筋線維の横断面積を計測した。

(6) 【培養細胞の筋線維直径計測】 細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定した後、筋特異的タンパク質であるトロポニン T に対する抗体、及び細胞核を染色する DAPI で染色した。その後、顕微鏡観察像を CCD カメラによりデジタル撮影した後、画像解析ソフトにより筋線維の太さを計測した。

(7) 【タンパク分子の検出】 筋組織や培養細胞のタンパク分子を、ウェスタンブロット法により検出した。検出には、凍結組織もしくは細胞のホモジェネート (全抽出物) を用いた。標的分子に対する抗体は市販品を用いた。細胞シグナル分子で、リン酸化型を有するものについては、全分子とリン酸化型を検出して、リン酸化水準を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 【除神経ラットの萎縮筋】 2 週間の除神経によりヒラメ筋は顕著に萎縮した。除神経群 (DENr) の筋線維横断面積  $790 \pm 147 \mu\text{m}^2$  は、シャム群 (CONr)  $2446 \pm 252 \mu\text{m}^2$  の約 3 分の 1 であった (図 3,  $p < 0.05$ )。一方、除神経+他動的伸張群 (STRr) では、 $1127 \pm 128 \mu\text{m}^2$  であり、ストレッチをすることにより除神経筋萎縮が緩和されることが示唆された (図 3,  $p < 0.05$ )。

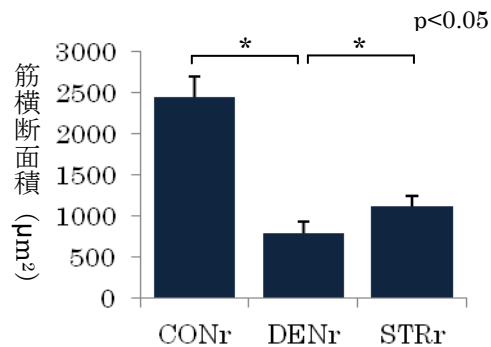


図 3. ラット・ヒラメ筋の横断面積

(2) 【除神経筋に関連する細胞内シグナル】 今回の除神経による筋萎縮や、その他動的伸張による緩和に、タンパク質合成系の細胞シグナルである phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の関連が示唆された。除神経群では、シャム群より Akt のリン酸化水準が半減しており、活性が低下していたと考えられた。さらに除神経後のヒラメ筋に他

動的伸張を加えると、そのリン酸化水準が約 3 倍に亢進した ( $p < 0.05$ )。

さらに mTOR の阻害剤 rapamycin を投与した実験において、STRr 群における萎縮緩和効果が消失した。本薬剤による他群の変化は見られなかった。

(3) 【培養筋細胞の他動的伸張による肥大】 他動的伸張により筋細胞は肥大した。伸張を加えた細胞 (STRc) の太さ  $30 \pm 1.91 \mu\text{m}$  は、通常に培養した細胞 (CONc) の  $20 \pm 0.66 \mu\text{m}$  に比べ、約 1.5 倍であった (図 4 B,  $p < 0.05$ )。

さらに、この肥大には細胞内の実質である収縮構造の増大を伴うことが示唆された。STRc 群では、CONc 群に比べトロポニン T が約 1.5 倍強く検出された (図 4 A,  $p < 0.05$ )。

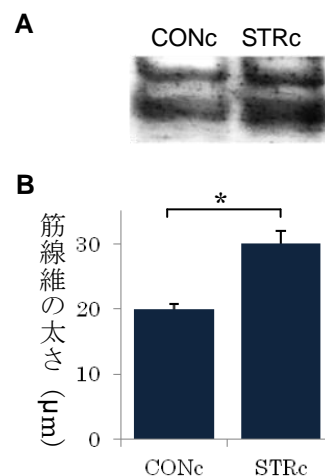


図 4. 培養筋細胞の他動的伸張による肥大  
A はトロポニン T の検出、B は筋線維の太さを表す。\*:  $p < 0.05$

(4) 【培養筋細胞に関連する細胞シグナル】 除神経筋と同様に PI3K/Akt/mTOR 経路の関連が示唆された。他動的伸張により、Akt のリン酸化水準が 2-3 倍程度に亢進した ( $p < 0.05$ )。この亢進は、PI3K の阻害剤 wortmannin により元の水準以下に抑制された。さらに本剤により伸張による肥大も顕著に抑制された ( $p < 0.05$ )。mTOR の阻害剤 rapamycin でも同様に肥大が抑制された ( $p < 0.05$ )。また PI3K/Akt/mTOR 経路を活性化することが明らかにされている、成長因子 insulin-like growth factor-1 により筋細胞は肥大した ( $p < 0.05$ )。

一方、タンパク質合成系に働く extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase 経路は、伸張による肥大効果には関連しないことが示唆された。同経路の阻害剤 U0126 により、両群において同程度の肥大効果が見られた ( $p < 0.05$ )。ただし伸張による肥大効果は全く変わらなかった。

(5) 【尾部懸垂マウスの筋萎縮】 2週間の尾部懸垂によりヒラメ筋、長趾伸筋、腓腹筋は顕著に萎縮した。筋湿重量について、いずれの筋においても通常飼育群 (CNm) より尾部懸垂群 (Tsm) が低値であった (図5)。さらに、それらの筋湿重量は、体重当たりの相対値においても CNm より Tsm が低値であった (図6)。

概ね当研究室における本動物モデルが確立できたと考える。廃用性筋萎縮モデルという点では、尾部懸垂モデルの方が、除神経モデルより適切である。末梢神経が温存した免荷である。また関連する遺伝子発現メカニズムの解明という点では、一般にマウスが優れた動物である。さらに組織学的評価において、組織サイズが小さいため全貌を把握し易い。これらを勘案して、尾部懸垂マウスを新たに導入した。

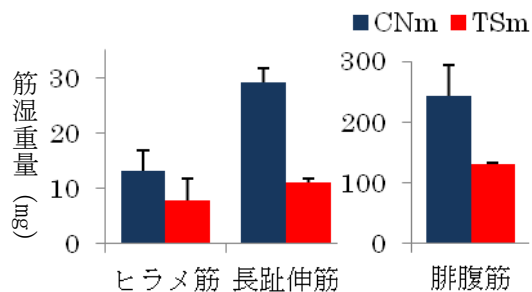


図5. 尾部懸垂マウスの筋湿重量

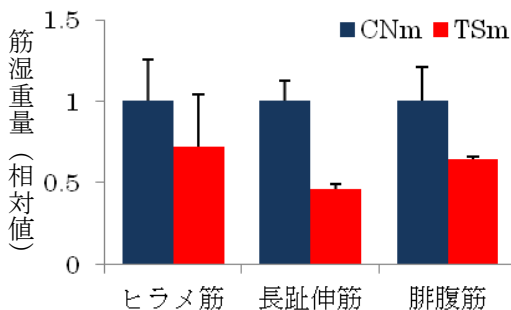


図6. 尾部懸垂マウスの体重当たり筋湿重量筋ごとに、CNm群を1とする相対値で表した。

(6) 【今後の展望】 今回確立できた尾部懸垂マウスについて、筋張力測定や筋線維タイプ組成解析のシステム構築を進めている。また尾部懸垂後に再荷重する群の作製に着手した。これらの取り組みにより、機械刺激に応じた筋量の変化にともなう、筋線維タイプ構成比や筋長張力の変化を明確にする。それらの現象に働くメカニズムを解明したい。メカニズムという点で、今回、除神経筋や培養筋細胞で関連が示唆された PI3K/Akt/mTOR 経路は、有力な候補の一つといえる。

## 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)

- ① Sasai N, 他6名. Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes. Muscle Nerve, 査読有, 41巻, 2010, 100-106.
- ② Agata N, Sasai N, 他5名, Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats. Muscle Nerve, 査読有, 39巻, 2009, 456-462.

[学会発表] (計7件)

- ① 吉岡潔志、初代筋管培養細胞に対する電気刺激による形態応答、コ・メディカル形態機能学研究会第10回学術集会、2011年9月17日、愛知県春日井市
- ② 笹井 宣昌、Association between PI3K/Akt/TOR pathway and stretch-induced hypertrophy in primary cultured chick myotubes. 第8回国際比較生理生化学会議、2011年6月2日、愛知県名古屋
- ③ 縣信秀、除神経による機械刺激の減少がコスタメア構造に及ぼす影響、第18回日本物理療法学会学術大会、2010年10月16日、東京都大田区
- ④ 笹井 宣昌、Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of primary cultured myotubes. 第87回日本生理学会大会、2010年5月20日、岩手県盛岡市
- ⑤ 縣信秀、除神経ヒラメ筋におけるpaxillinの局在とFAKリン酸化、第115回日本解剖学会全国学術集会、2010年3月29日、岩手県盛岡市
- ⑥ 縣信秀、Repetitive Stretching Suppresses Muscle Atrophy in Denervated Soleus Muscle via Akt/mTOR pathways. 第36回国際生理学会世界大会、2009年7月29日、京都府京都市
- ⑦ 縣信秀、筋萎縮に伴うコスタメア構造の変化とFAKリン酸化、第44回日本理学療法学術大会、2009年5月29日、東京都千代田区

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 宣昌 (SASAI NOBUAKI)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生・准教授

研究者番号：20454762

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :