

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05896

研究課題名（和文）筋損傷回復時の筋線維タイプ決定における運動神経の重要性

研究課題名（英文）Importance of motor neuron in determining muscle fiber types during muscle injury recovery

研究代表者

澤野 祥子（Sawano, Shoko）

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：60403979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋は高い再生能力を有し、損傷を受けても速やかに回復する。筋線維タイプ組成は運動トレーニングなどの環境的要因で後天的に変化しうることが知られているが、筋再生後の筋線維タイプ組成および運動神経の関与については明らかではない。そこで本研究では、複数種の筋損傷を誘導したマウスの前脛骨筋の、損傷後の筋線維タイプ組成を経時的に観察し、筋再生後の筋線維タイプ組成がどのように変化するかを調べた。損傷後、筋線維タイプ組成は2Bから2Xに一過性に变化し、時間の経過とともに非損傷区と同様の組成に戻ることが明らかになった。運動神経との関連性については今後も検討の継続が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は筋損傷後の回復過程における骨格筋再生について、その挙動の一端を明らかにしたものである。本研究成果を起点として、筋線維タイプの細胞レベルでの変化と、それに続く運動神経支配による筋線維タイプ移行機構のしくみが明らかになることで、将来的に、食味の高い良質な食肉を創出できるだけでなく、ヒトにおいても高齢者の自立歩行のための筋持久力の向上など、様々な分野に応用されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle has a high regenerative capacity and recovers quickly after injury. It is known that myofiber type composition can be altered by environmental factors such as exercise training. However, the involvement of myofiber type composition and motor innervation after muscle regeneration is still unknown. In this study, we investigated how myofiber type composition changes after muscle regeneration by observing myofiber type composition over time in the post-injury tibialis anterior muscle of mice with multiple types of induced muscle injury. We found that after injury, myofiber type composition transiently changed from 2B to 2X and returned to a composition similar to that of the non-injured zone over time. The relevance to motor neurons needs to be further investigated.

研究分野：食品科学

キーワード：損傷筋 マウス 筋線維 回復

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食肉として利用される家畜・家禽の筋肉は、収縮特性や代謝特性の違いから遅筋タイプ (1 型)、速筋タイプ (2B 型)、その中間の 2A、2X 型に分類される。「ロース」、「ヒレ」、「肩」など、食肉の肉質や呈味性が部位により異なることを考慮すると、食肉の特性を決定する上で、筋線維タイプ組成は非常に重要な因子となる。実際に、遅筋タイプが優勢な食肉は速筋タイプ優勢な食肉に比べ、軟らかく、ジューシーであり¹⁾、タウリン²⁾・カルニチン³⁾・鉄分を多く含むことが報告されている。肉のジューシーさ・呈味性などの食味性を決定する上で、筋線維タイプ組成は非常に重要な因子である。運動などの後天的な外的因子により骨格筋線維タイプが変化することが明らかになっているが、そのタイミングについては明らかではない。また、単一筋線維レベルでタイプ変化を遂げる際、筋線維を支配する運動神経がタイプ変化にどの程度影響を及ぼすのかほとんど分かっていない。筋線維は各々特定のタイプの運動神経からの支配を受けているため、線維タイプ移行成立の際にも各々のタイプに呼応する運動神経の再神経支配が必須であると予想される。

「食肉=骨格筋」	哺乳類の骨格筋線維は4つのタイプに分かれる		
	MyHC1	MyHC2A MyHC2X (2種)	MyHC2B
	遅筋型	中間型	速筋型
ミオグロビン量	多(赤)	中等度	少(白)
タウリン、鉄、カルニチン	多	不明	少
収縮速度	遅	中等度	速
代謝特性	酸化的	中等度	嫌氣的
中性脂肪含量	多	中等度	少

図1 骨格筋の特性

2. 研究の目的

骨格筋は高い再生能力を有し、損傷を受けても速やかに回復する。一方で、遅筋型と速筋型で構成される筋線維タイプ組成は、筋再生後にどのように変化するかほとんどわかっておらず、筋損傷から回復過程の筋線維タイプの再形成については、これまで詳しい検証はなされてきていない。筋線維と運動神経の接合が筋損傷などでいったん途切れた後、まず筋線維(細胞)主体のタイプ変化が起こり、移行の皮切りとなるハイブリッド筋線維が出現し、続いて特定のタイプの運動ニューロンが筋線維に接合することで筋線維タイプ移行が確立・完了すると予想される。

そこで本研究では、筋損傷から骨格筋再生途上で増加する因子とそれに呼応する運動神経の役割を明らかにすることを目的とし、筋損傷を誘導したマウスの前脛骨筋の損傷後の筋線維タイプ組成を経時的に観察し、筋再生中の骨格筋線維の動態および筋再生後の筋線維タイプ組成について検討した。

3. 研究の方法

C57BL/6J 雄性マウスの左脚前脛骨筋部に麻酔下で 10 μ M カルディオトキシン (CTX) を 50 μ l 注入し筋損傷を誘導した。筋損傷処理後、10, 14, 110 日後の前脛骨筋を摘出した (各 n=4)。対照群には、皮膚切開のみの sham 手術を施した (n=4)。CTX 処理 10 日後に採取したマウス前脛骨筋からタンパク質を抽出し、筋分解において発現が上昇するユビキチンリガーゼである atrogen-1 および MuRF-1 発現量をウェスタンブロッティングにより評価した。また、CTX 処理後 14、110 日目に採取した筋の横断切片および縦断切片を作製後、HE 染色により回復の程度を確認した。その後、ミオシン重鎖 (MyHC) 組成を筋縦断切片の蛍光免疫染色および SDS-PAGE により解析した。蛍光免疫染色時にはハイブリッド線維の出現についても評価した。さらに、リアルタイム RT-PCR により MyHC の mRNA 発現の差異を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス前脛骨筋横断切片の損傷状態

マウス前脛骨筋の筋損傷からの回復過程について検討するため、CTX 処理を施し経時的に組織損傷の度合いを評価した。損傷後 14 日目の横断切片の HE 染色結果を図 2 に示す。

損傷後 14 日目において、筋損傷処理群 (CTX 群) では筋再生の指標である中心核を確認することができ (青色の染色: 矢印部)、筋損傷が誘導され回復過程にあることが示唆された。また、筋線維の形態に関しても、単一筋線維の分布が CTX 処理群においても確認でき、筋損傷時の筋線維の破壊から回復していることが確認された。

損傷後 110 日目の筋線維横断切片を解析したところ、対照群とほとんど差が認められなくなるほど筋線維は回復していることが確認された。

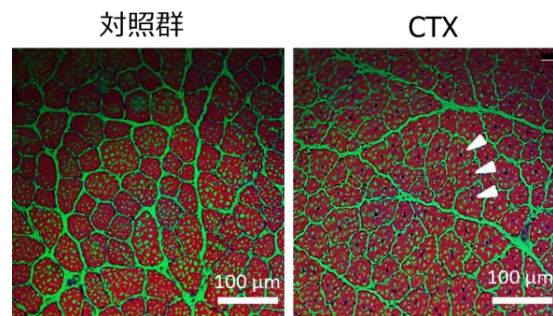


図2 筋損傷後のマウス前脛骨筋横断切片 (HE 染色)

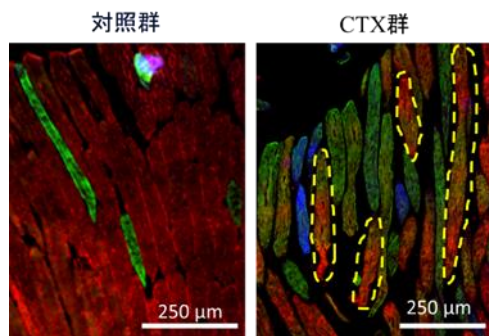


図3 筋損傷 14 日後のマウス前脛骨筋縦断切片における MyHCs 分布およびハイブリッド筋線維の出現(MyHC2A:青, MyHC2X:緑, MyHC2B:赤で表示)

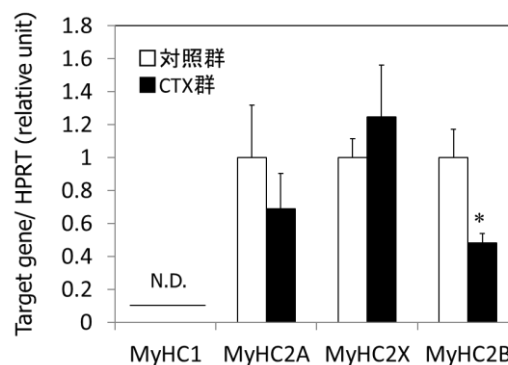


図4 RT-PCR 解析による筋損傷 14 日後のマウス前脛骨筋縦断切片における MyHCs 分布 (n=4, *p<0.05 vs 対照群)

(2) 筋再生過程でのマウス前脛骨筋における筋分解マーカの挙動

CTX による筋損傷 10 日後の筋分解の挙動を評価するため、損傷 10 日目の前脛骨筋をマウス脚から摘出し、タンパク質抽出後 SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングにより、atrogen-1 および MuRF-1 の発現量を解析した。atrogen-1 および MuRF1 は筋分解により発現が上昇するユビキチンリガーゼであり、筋萎縮のマーカースとして頻用される因子である。これら両因子の発現量を解析したところ、CTX 処理群において、筋萎縮マーカース atrogen-1 および MuRF1 の有意な発現上昇が認められた (data not shown)。損傷 110 日目の前脛骨筋においてはこれらの上昇は認められなかった。したがって、筋損傷後の筋再生時において、筋分解マーカのタンパク質発現の上昇が一過性に認められることが示唆された。

(3) 筋再生過程でのマウス前脛骨筋における筋線維タイプ分布

CTX による筋損傷後 14 日目のマウス前脛骨筋線維の筋線維タイプをミオシン重鎖アイソフォーム (MyHC1, MyHC2A, MyHC2X, MyHC2B) を指標として検討した。図3は傾向免疫染色結果を示したものである。MyHC2A を青色、MyHC2X を緑色、MyHC2B を赤色で可視化した。1本の筋線維中に複数のミオシン重鎖アイソフォームが存在するハイブリッド筋線維の有無を評価したところ、対照群ではほとんど見られなかったハイブリッド筋線維が CTX 群では複数出現した (図3, 黄色点線)。また対照群と比較して、CTX 群では MyHC2B (赤色) の分布割合が減少し、MyHC2X (緑色) 線維の分布が多数みられるようになった (図3)。前脛骨筋から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行ったところ、超速筋型の MyHC2B 遺伝子発現が有意に減少していることが認められた (図4)。一方、損傷後 110 日目の筋損傷処理群の筋線維タイプ組成は、対照群と差がなかった。以上の結果から、筋損傷後 14 日目の筋再生時にはハイブリッド線維が複数出現し、筋線維タイプ分布が変わりうることが示唆された。

以上の結果より、筋損傷により筋線維タイプは一時的に MyHC2B から MyHC2X の変化が生じ、筋線維内で複数のタイプが出現するハイブリッド筋線維が一過性に多数出現することが明らかとなった。しかしながら、この変化は、時間の経過とともに落ち着き、損傷を受けていない筋線維タイプに戻ることが示唆された。本検討では、110 日目には筋タイプが変化しなかったが、リンゴポリフェノールなどの食品成分などの摂取により、ラット筋タイプの変化が生じる事例も報告されている⁴⁾。今回、この変化の有無の差異および、それに関与する運動神経の役割については明確なデータが得られなかったことから、今後さらなる検討が必要である。

- 1) Y.K. Kang, Y.M. Choi, S.H. Lee, J.H. Choe, K.C. Hong and B.C. Kim. Effects of myosin heavy chain isoforms on meat quality, fatty acid composition, and sensory evaluation in Berkshire pigs. *Meat Sci.* 89(4): 384-389, 2011
- 2) M. Cornet and J. Bousset. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Sci.*,51(3): 215-219,1999
- 3) K. Shimada, Y. Sakuma, J. Wakamatsu, M. Fukushima, M Sekikawa, K. Kuchida and M. Mikami. Species and muscle differences in L-carnitine levels in skeletal muscles based on a new simple assay. *Meat Sci.* 68(3):357-362, 2004
- 4) W. Mizunoya, S. Okamoto, H. Miyahara, Mariko Akahoshi, Takahiro Suzuki, Mai-Khoi Q. Do, Hideaki Ohtsubo, Yusuke Komiya, Mulan Qahar, Toshiaki Waga, Koichi Nakazato, Yoshihide Ikeuchi, Judy E. Anderson, Ryuichi TatsumiFast-to-slow shift of muscle fiber-type composition by dietary apple polyphenols in rats: Impact of the low-dose supplementation

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Elgaabari Alaa, Imatomi Nana, Kido Hirochika, Seki Miyumi, Tanaka Sakiho, Matsuyoshi Yuji, Nakashima Takashi, Sawano Shoko, Mizunoya Wataru, Suzuki Takahiro, Nakamura Mako, Anderson Judy E., Tatsumi Ryuichi	4. 巻 31
2. 論文標題 A pilot study on nitration/dysfunction of NK1 segment of myogenic stem cell activator HGF	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101295 ~ 101295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101295	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 該当する

1. 著者名 Sawano Shoko, Kobayashi Yuya, Maesawa Suzuka, Mizunoya Wataru	4. 巻 27
2. 論文標題 Egg components reverse the atrophy induced by injury in skeletal muscles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 138 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12915	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 該当する

1. 著者名 Shoko Sawano, Wataru Mizunoya	4. 巻 37
2. 論文標題 History and development of staining methods for skeletal muscle fiber types	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histology and histopathology	6. 最初と最後の頁 493-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-422	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 該当する

1. 著者名 Sawano Shoko, Fukushima Misaki, Akasaka Taiki, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Ikeuchi Yoshihide, Mizunoya Wataru	4. 巻 13
2. 論文標題 Up- and Downregulated Genes after Long-Term Muscle Atrophy Induced by Denervation in Mice Detected Using RNA-Seq	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1111 ~ 1111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life13051111	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 該当する

1. 著者名 Komiya Yusuke, Sakazaki Yuka, Goto Tsuyoshi, Kawabata Fuminori, Suzuki Takahiro, Sato Yusuke, Sawano Shoko, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Ikeuchi Yoshihide, Arihara Keizo, Mizunoya Wataru	4. 巻 27
2. 論文標題 Eicosapentaenoic acid increases proportion of type 1 muscle fibers through PPAR and AMPK pathways in rats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109816 ~ 109816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.109816	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 -

1. 著者名 Misawa Hidemi, Kamishima Kai, Koyama Tenkei, Ohgaki Lisa, Morisaki Yuta, Yamanaka Tomoyuki, Itohara Shigeyoshi, Sawano Shoko, Mizunoya Wataru, Ogihara Naomichi	4. 巻 376
2. 論文標題 Type selective ablation of postnatal slow and fast fatigue-resistant motor neurons in mice induces late onset kinetic and postural tremor following fiber-type transition and myopathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114772 ~ 114772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2024.114772	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 -

1. 著者名 Elgaabari Alaa, Imatomi Nana, Kido Hirochika, Nakashima Takashi, Okuda Shoko, Manabe Yoshitaka, Sawano Shoko, Mizunoya Wataru, Kaneko Ryuki, Tanaka Sakiho, Maeno Takahiro, Matsuyoshi Yuji, Seki Miyumi, Kuwakado So, Zushi Kahona, Daneshvar Nasibeh, Nakamura Mako, Ryuichi Tatsumi, et al	4. 巻 23
2. 論文標題 Age related nitration/dysfunction of myogenic stem cell activator HGF	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/accel.14041	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 該当する

1. 著者名 Komiya Yusuke, Iseki Shugo, Ochiai Masaru, Takahashi Yume, Yokoyama Issei, Suzuki Takahiro, Tatsumi Ryuichi, Sawano Shoko, Mizunoya Wataru, Arihara Keizo	4. 巻 14
2. 論文標題 Dietary oleic acid intake increases the proportion of type 1 and 2X muscle fibers in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-50464-y	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久野萌花、森川里久、良永裕子、齊藤千佳、澤野祥子、竹田志郎、水野谷 航
2. 発表標題 牛肉の風味を構成する化合物群の分画および呈味性に関する研究
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中咲帆、Alaa Elgaabari、圖師歌歩乃、澤野祥子、水野谷航、松吉祐児、鈴木 貴弘、中村真子、辰巳隆一
2. 発表標題 筋幹細胞活性化因子HGFのニトロ化による不活化に関する研究： 抗HGFモノクローナル抗体のニトロ化抑制効果の検証
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村洸太、澤野祥子、竹田志郎、水野谷航
2. 発表標題 抗ミオシン重鎖モノクローナル抗体の精製と豚肉の筋線維タイプ組成の解析
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小宮佑介、伊関柊吾、鈴木貴弘、辰巳隆一、澤野祥子、水野谷航、長竿淳、有原圭三
2. 発表標題 オレイン酸摂取はマウス骨格筋において 1および2X型筋線維を増加させる
3. 学会等名 第77回日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤野 祥子、豊田 来美、雑賀 健太、永月 翔、藤澤 莉沙
2. 発表標題 ショウガ成分の炎症・アレルギー抑制効果に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2023年度広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤野 祥子、小林 佑哉、前澤 涼香、水野谷 航
2. 発表標題 鶏卵成分の骨格筋損傷回復及び筋萎縮抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------