

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650337

研究課題名（和文） 筋血流量の低下による廃用性筋萎縮誘導機構の解明と萎縮予防法の開発

研究課題名（英文） Relationship of blood flow and mechanism of disuse muscle atrophy.

研究代表者

津田 道雄 (MICHIO TSUDA)

東海大学・医学部・非常勤教授

研究者番号：00102848

研究成果の概要（和文）：

ラット (Wistar) のヒラメ筋 (SM)、長指伸筋 (EDL) を研究対象として、10 日間ギプス着用による血流変化と筋萎縮メカニズムの解明を目的とした。ギプス脚 SM では重量および血流で有意な変化が認められたが、EDL では有意な変化は認められなかった。

DNA アレイ解析では、いくつかの遺伝子群に特異的な変化を認めた。Sarcomere 遺伝子群をはじめとする骨格筋形成に関与する遺伝子発現がヒラメ筋で低下し、degradation や apoptosis などの分解系においては、ヒラメ筋での発現が高い傾向を示した。いくつかの対象となるものに関しては RT-PCR による分析もあわせて行った。

研究成果の概要（英文）：

We experimented on rat model to simulate disuse atrophy, analyzed the blood flow and the gene expression pattern in the model utilizing immobilization. Male Wistar rats, aged 20 weeks, were used in this study. 10days before the experiment day, right hind-limbs of all rats were immobilized in a plaster cast (left contra-lateral hind-limbs were analyzed as controls). On the experiment day, all rats were anesthetized and muscles (extensor digitorum longus muscle: EDL, and Soleus muscle: SM) were removed and weighed. Muscles were prepared by documented method and were analyzed for gene expression pattern difference on DNA arrays (Agilent Technology Inc.). 10days immobilization resulted in significant decrease of muscles weight in right (immobilized) muscles. This was more pronounced in SM than in EDL. This was also observed in DNA array analysis and Real-time PCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：リハビリテーション医学

1. 研究開始当初の背景

廃用性萎縮に関して Sandri 等の優れた研究が報告されている (2004, Cell)。彼らは培養筋肉系で萎縮のモデルとなる cell starvation あるいは dexamethasone 投与条件下での遺伝子発現解析により P13K/AKT 経路-FOXO-転

写因子制御によるユビキチンリガーゼが筋肉萎縮に重要な役割を果たしていると報告している。また Nikawa 等はユビキチン/プロテオソームによる筋肉タンパクの分解系が筋肉萎縮では亢進しており、その上流にある IGF-1 (insulin-like growth factor-から) の

制御にもユビキチン系が関与していることを報告している(2009, Mol. Cell. Biol)。しかしながらその変化を引き起こし、萎縮の方向に誘導させる **Trigger** は何かに関しては今なお未解決の問題である。

① 「血流障害が筋肉の廃用性萎縮の原因の一因である」との考えは、申請者の知る限り国内外で深く検討されていない。申請者の予備実験ではヒラメ筋と長指伸筋を用いた検討で、萎縮の程度と、血流低下の間には相関があること(前述)、萎縮組織の変化は虚血の障害の変化を示していること、また今のところ明確な有意差は示されていないが末梢血管拡張薬(ニトログリセリンパッチ)がある程度の萎縮予防の可能性を示している(左図)こと等から血流障害が萎縮の原因である可能性は高い。本研究により血流障害が萎縮の原因の一部であることが明らかになれば、血流低下から萎縮までの過程の分子レベルでの解明につながり、さらには一般的な萎縮のメカニズムの解明、その予防につながる学問的にも応用面でも興味のある研究となる。一方、更に根源的な問題であるギプス固定や重力解除により、血流低下が生じてくる機構の解明も予防や治療につながる重要な解決すべき基礎研究課題であると認識している。

さらに、同じギプス固定という状況下で萎縮する筋肉と萎縮しない筋肉があること、血流低下の程度が筋肉により異なるのはなぜか。筋肉組織の代謝の違いなのか、代謝以外の筋線維群(**type-IIa**、**type-IIb**、**type-I**)の違いなのか、各筋肉を支配する血管自身の環境等に対する反応に差があるのだろうか。これらの解明も将来の重要な研究課題になると考えている。

骨の動きを抑制するギプス固定が骨折後の回復に必須であるという基本的な考え方は100年来変わっておらず、迅速、かつ容易にギプス固定ができるようにとの目的でギプス素材の開発は行われてきた。しかしギプス固定の最大の問題である筋萎縮をできるだけ軽減する研究および萎縮を来さないギプスの開発はほとんど行われてこなかった。廃用性萎縮の効果的治療法はいまなおリハビリテーション以外にないのが実情であることを考えると、萎縮予防は非常に重要な意味を持っている。

② 本研究の成果として筋萎縮を予防する試み(たとえばギプスによる血流障害に対して末梢血管拡張薬の使用)や萎縮を予防できるギプスの開発を試みることは、骨折後の早期の現場復帰、社会復帰を可能にする意義のある挑戦である。これは一般人に対しては勿論であるが、障害後の筋萎縮を抑え少しでも

早く現場に復帰したいアスリートにとって非常に大きなメリットをもたらすことが期待できる。また超高齢化社会が進むにつれ、高齢者の寝たきり、急激な生活(運動)意欲の低下などが問題になっているが、骨折等をきっかけにギプス固定後の筋肉の萎縮からそのような状態を引き起こすことも多い。従って、廃用性萎縮のメカニズムの解明およびそれに基づいた予防は、高齢者の **QOL** を考えた場合もますます重要な、また意義のある課題になると考えられる。

2. 研究の目的

骨折後のギプス固定、宇宙空間などの重力負荷を与えないような状況および神経切断などで、筋萎縮が見られることはよく知られている。この廃用性筋萎縮に関する従来の研究は萎縮後の組織学的、生化学的変化の記載が主であり、最近になって最終的な萎縮を導く実行部隊は転写因子等の制御を受けたプロテアーゼの活性化によるものであるという研究が多く報告されている。しかし筋肉萎縮を誘導する転写因子発現の制御やプロテアーゼ発現の亢進に向かわせる真の意味での **Trigger** は今なお不明のままである。本研究の目的は、「血流量の低下が骨格筋の廃用性筋萎縮の引き金となる」という仮説を検討し、それに基づく筋萎縮誘導機構の解明と、萎縮の予防につながる方法を開発することである。筋萎縮の予防は一般人やアスリートは勿論、高齢者にとっては特に大きなメリットとなる。

① 我々の予備実験では、ギプス固定後10日目の赤筋(遅筋)であるヒラメ筋の重量はコントロール(非ギプス筋)に比べて55-65%に減少し、白筋(速筋)の長指伸筋は約90%と萎縮は非常に軽度であった。血流量に関しては、ヒラメ筋ではギプス固定後10日目には40-50%に減少した。ヒラメ筋での血流の低下はギプス固定直後60分ですでに10日目と同程度の減少が認められた。Barcroft & Dornhorst (J. Physiol., 1949)、McDoNald et al (J. Appl. Physiol., 1992)や我々の血流速度測定結果から筋血流速度と筋肉量の関係は以下のような関係になっていると考えられる。血流 相対筋肉重量(ml/100g) (通常生活時に対する%)

強い運動負荷	80
通常生活時	110-120
安静時(麻酔・睡眠)	20
ギプス固定	4-60

骨格筋の機能・働きから考えると、日常的な活動することが骨格筋にとって定常状態(動的平衡状態)であり、安静時、動かない時は

むしろ病的な状態（筋肉消耗）であるといえるのではないか。そのスイッチを切り替えるシグナルが血流の変化やそれにもとづくシグナル伝達の変化であるという想定で研究を進展させる。

② 研究期間に「廃用性筋萎縮の発現に血流量の低下が関与している」ことを確認するためにギプス固定、重力解除、血管の部分結紮、腱および坐骨神経切断等による筋萎縮と血流量変化との関連を比較検討する。同時に萎縮時に変化が報告されている中間代謝産物の変化、細胞・組織学的変化、更に情報伝達経路、特に IGF-1, P13K/AKT, Foxo 経路の変化も検討する。血流の変化が直接あるいは間接的に萎縮のトリガーであることが明確になれば、本来のギプス固定の意味（骨の固定）を損なわない、かつ血流を促進する可能性のある機械的刺激（低周波、超音波、磁場）を与え、萎縮の予防効果にどのような刺激が効果的であるかを検討し、新しい萎縮予防効果のあるギプスの開発につなげる。

③ 本研究は、国内外であまり原因として考えられていない「廃用性萎縮の引き金が血流障害によるものである」という可能性を検証するものである。血流障害が萎縮の少なくとも原因の一部であるとすると、血流低下から萎縮までの過程の分子レベルでの解明につながり、同時に萎縮の予防や萎縮を起こさない新しいギプスの開発にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋の萎縮と筋血流の変化、萎縮時の遺伝子発現の変化、中間代謝物質等の変化の検討ギプス固定ラットに末梢血管拡張薬を投与したとき、下肢筋肉（ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋、長指伸筋）の筋肉量（筋肉重量の測定）、各筋肉の血流量、中間代謝産物の変化、細胞・組織学的変化を経時的に追跡する。更に IGF-1, P13K/AKT, Foxo 経路の変化も検討する。

①血流量の測定

経時的に（2週間まで）Br 標識 microsphere を用いて、血流量の測定方法（Kuwahira et al, Oxygen Transport to Tissue XV, p877-884, Edited by P. Vaupel et al. Plenum Press, 1994）、近赤外光法（Near-infrared spectroscopy;NIRS）を用いた oxy-Hb, deoxy-Hb の測定方法に必要な測定機器は本研究機関にすでに設置しており、測定方法もすでに確立している。Br 標識 microsphere を用いた血流測定法によりギプス固定によりひらめ筋や長指伸筋での血流が低下することは一部確認済みである。

②筋肉内中間代謝物質の測定および非破壊的代謝産物および種々のパラメーターの測定：従来の生化学的方法を用い ATP, ADP, AMP, 乳酸、NADH/NAD などの中間代謝産物の測定に加えて ³¹P-NMR を使用してきわめて早期の組織のエネルギー状況の変化を in vivo の状態で測定する。この方法は微量な変化を経時的に繰り返し測定できる利点を持っている（Kutsuzawa et al. Med. Sci. Sports Exerc., 33, 901-906, 2001）。同時にホルモン・増殖因子を含めた血液成分の量的変化も継続的に定量する。

③組織学的検討：一般の組織学的変化に加えて抗速筋—ミオシン重鎖抗体(anti-fMHC)、抗遅筋—ミオシン重鎖抗体(anti-sMHC)を用いてミオシンのタイプ別発現や萎縮を laminin 抗体を用いて fiber-area の変化、Azan 染色で間質の変化を観察する。

④DNA チップを用いて特にギプス固定の早期の遺伝子発現の解析により IGF-1, P13K/AKT, Foxo 経路を含む標的遺伝子を絞り込む。

(2) 標的遺伝子の解析

筋タンパク質合成/分解のスイッチ on/off に関わる可能性のある遺伝子に対して遺伝子のノックアウト、過剰発現系を用いて真の目的遺伝子であるかどうかを検討する。

4. 研究成果

23年度は、(1)①③④について実験を行い、廃用性萎縮筋萎縮誘導の実験モデルとしてラット（Wistar 種および Fischer 種）の右下肢から末梢部をギプス固定することで廃用性萎縮を誘導した。研究対象筋は SO 線維や FG 線維の含有割合が多いヒラメ筋（SM）、長指伸筋（EDL）とした。本実験モデルは、先行研究を参考にした手法であり、経時変化や各筋の萎縮度に先行データとの相違は認められなかった。

筋血流測定に関しては、従来の経皮的な血流測定には限界があり、本研究の目的である”筋への血流量”の経皮的測定は実現できなかった。そこで、Br 標識 microsphere を用いた血流測定を採用した。尾動脈から血圧動態のためのルートを確認したうえで、頸動脈からカテーテルを右心室まで進入させ、microsphere を投与した。腎臓などの対象性臓器をコントロールとして、下腿筋群における左右差を分析した。

筋萎縮の実験モデルでは、10日間ギプス着用

した側のヒラメ筋で有意な筋萎縮が認められたが、長指伸筋での萎縮は軽微なものであった。比較はすべて左右の同じ筋について行った。同様に、ギブスを着用しないコントロール群との比較も行った。

萎縮時の遺伝子発現の変化について、DNA アレイ解析を試みた。対象筋は上記と同様三筋とした。Atf3, ubdなどに大きな発現が視られ、現時点での解析状況としては、萎縮には大きく2つの遺伝子発現のピークが認められている。1つ目はギブス固定初期、2つ目はギブス固定後期である。初期においては再分裂制御に関わる遺伝子群の発現にコントロールと比較して変動しており、後期は分解系の遺伝子発現が認められている。

24年度は特に(1)④および(2)の実験を行い、筋萎縮による遺伝子発現の変化を網羅的に分析するために、DNA アレイ解析を試みた。様々な遺伝子群での発現が認められ、10日ではSarcomere 遺伝子群をはじめとする骨格筋形成に関与する遺伝子発現がヒラメ筋で低下し、degradation や apoptosis などの分解系においては、ヒラメ筋での発現が高い傾向を示した。さらに、いくつかの対象となるものに関してはRT-PCRによる分析もあわせて行った。

期限内に筋血流と筋萎縮誘導機構まで解明することは困難であったが、筋血流の低下や停滞が遺伝子発現を変化させ、筋萎縮の1つの因子である可能性を示唆することができた。更なる筋萎縮と血流の関連性を検討していきたいと考えている。

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)

山門一平, 津田道雄, 廃用性萎縮と筋血流変化について, 日本体力医学会, 2012/9/14, 岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 道雄 (MICHIO TSUDA)
東海大学・医学部・非常勤教授
研究者番号: 00102848