

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33912

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700566

研究課題名(和文)筋線維核数の変化に着目した萎縮筋に対する筋力増強運動効果の検証

研究課題名(英文) Exercise training facilitates recovery from muscle atrophy by stimulating proliferation of myogenic satellite cells

研究代表者

伊東 佑太 (ITO, Yuta)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・助教

研究者番号：30454383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮に対する筋力増強運動の回復促進効果のメカニズムを、筋線維核数の増加という現象に焦点を置き検証した。まず筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進モデルマウスにおいて新生核が出現し、筋線維核数が増加することを確認した。次にその新生核の出現、筋線維核数の増加に筋衛星細胞の増殖、分化、融合といった現象が関与しているかどうかを免疫組織化学的に検証した。その結果、筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進過程の初期に筋衛星細胞から分化したと考えられる新生核の出現が確認できた。筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進効果には、筋衛星細胞から分化した細胞の融合により筋線維核が増加することが重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To know the cellular mechanism of exercise-dependent facilitating recovery of atrophied muscle, I examined the effects of exercise on the number of nuclei of individual myofibers in atrophied and normal muscles. Results, the exercise promoted recovery of atrophied myofiber CSA, and the number of newly generated myonuclei increases. And proliferation, differentiation and fusion of myogenic satellite cells were observed, suggesting that the activation of myogenic satellite cells induced by exercise effectively facilitate the recovery of size of myofibers from the muscle atrophy.

研究分野：総合領域

キーワード：リハビリテーション科学 運動療法学 動物 細胞生物学 骨・筋肉

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は可塑性に富んだ組織であり、過負荷により肥大し、負荷の減少により萎縮する。例えば、ラットのヒラメ筋は尾部懸垂などにより負荷が減少すると2週間で約半分の大きさになる。また、尾部懸垂による筋萎縮ラットにトレッドミル走などの運動を行い負荷を与えると、大きさの回復が早まることが報告されている。リハビリテーション医療の場で求められる筋萎縮の回復期間の短縮に、筋活動の増加が有用であると考えられる。しかし、筋萎縮からの回復促進を目的とした筋力増強運動の効果メカニズムや有効な強度については不明な点が多い。

これまでに、萎縮筋をもったマウスに対して高強度の筋力増強運動として立ち上がり運動を行わせる研究を行ってきた。その結果、運動が筋線維の太さの回復促進に有効なこと、この変化が健常筋肥大の変化よりも早く起こることを明らかにしてきた。さらには回復した筋線維に含まれる筋線維核の数が大幅に増加することを明らかにした。この結果から、筋力増強運動による萎縮筋の回復促進に筋線維核数の増加が重要な鍵を握っていると考えられる。

筋力増強運動により起こる正常な筋の個々の筋線維の肥大のメカニズムは一部が明らかになってきている。筋線維内の1つの核が転写、翻訳をする領域は限られているため、1本の筋線維の大きさとそこに含まれる筋線維核数とは正の相関があるといわれている。一般に哺乳類では、最終分化した筋線維核は分裂しないといわれており、筋線維あたりの筋線維核数が増加するためには、筋芽細胞が新たに融合する必要がある。実際に、筋線維の肥大が起こるときには、増殖した筋衛星細胞から分化した筋芽細胞が、既存の筋線維に融合するという報告がある。これらのことから、筋萎縮からの回復促進過程においても、未分化な細胞の筋線維への融合が起こっていると考えられる。しかし、正常な筋の筋線維の肥大と我々の研究で明らかとなった筋線維サイズの回復とでは要する期間が異なり、両者には異なるメカニズムが存在していると考えられる。実際に運動による萎縮筋の回復促進時に筋線維核数が増加するタイミングは、正常な筋の肥大時よりも早いことが示唆される結果を得ている。

以上のことから、運動による筋萎縮からの回復促進過程において、どのようなメカニズムが働き効果が現れるのか、また、そこに未分化な細胞や筋線維核数の増加がどのように関与するか詳細に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、筋力増強運動によって起こる筋萎縮からの回復促進過程において、筋線維核

数の大幅な増加に焦点を絞り、その時期や関与する因子を明確にすることで、萎縮筋に対する筋力増強運動の効果のメカニズムに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

10週齢のICR雄性マウスを対象とした。マウスは、実験期間中、25℃に設定した室内で、12時間毎の明暗サイクルで飼育し、餌や水を自由に与えた。

これらのマウスの後肢筋を萎縮させるために、Morey法を用いて2週間の尾部懸垂法を施した。尾部懸垂のための処置はisoflurane (1.4%) 吸入麻酔下で行った。尾部懸垂は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、餌や水の摂取は自由に行えた。これらのマウス萎縮筋の回復を促進させるため、尾部懸垂から解放後、筋力増強運動を行わせた (SE 群、n = 24)。対照群には尾部懸垂後運動を行わない群 (non SE 群)、尾部懸垂も運動も行わない正常な筋を持つ群 (CON 群) を作製した。まず、筋萎縮からの回復促進が起こっているかどうかを確認するために、筋線維横断面積を指標に評価した。また、筋線維核数の変化も確認した。次に、未分化な細胞の活性化状況をみるために、一定期間の細胞増殖を評価した。また、筋衛星細胞の活性化、分化の関与を調べるために、免疫組織化学的に組織切片を評価した。

(2) 筋力増強運動

筋力増強運動には、自発的な立ち上がり運動を行わせた。立ち上がり運動は、マウスが後肢のみで立ち上がり、前肢でケージ側面のスイッチレバーを押す行為として設定し、オペラント学習法により尾部懸垂前に学習させた。尾部懸垂から解放後、学習した立ち上がり運動を1セット25回、セット間を4時間以上空けて1日2セット、毎日行った。立ち上がり運動時のスイッチレバーの高さは、マウスの足関節底屈筋に負荷がかかるように、マウスがスイッチレバーに触れたときに踵部がグリッドから離れる (大腿骨と下腿骨がなす角度が約 80°、下腿骨と第5中足骨がなす角度が約 100°の肢位) 高さに調節した。

(3) 評価

筋線維横断面積

すべての群のマウスから麻酔下でヒラメ筋を採取した。採取したヒラメ筋から厚さ 8 μm の凍結横断切片を作製した。切片は、筋腹が最も太い領域から作製した。作製した凍結横断切片は、haematoxylin-eosin (H-E) 染色を施し、顕微鏡下で観察、画像解析ソフトに取り込んだ。取り込んだ画像から、1つの

切片に含まれるすべての筋線維の横断面積を測定した。

筋線維核数

と同様に作製した厚さ 8 μm の凍結横断切片に、筋線維細胞膜に局在する dystrophin と核の二重染色を施した。切片は、4% paraformaldehyde にて 10 分間固定し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、3% bovine serum albumin (BSA) で一晩ブロッピング処理を行った。PBS で洗浄後、1 次抗体である rabbit anti-dystrophin polyclonal antibody (1:400, Santa Cruz) をのせ、37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体である Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG antibody (1:400, Molecular Probers) と 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:10000, SIGMA) をのせ、遮光した上、37 $^{\circ}\text{C}$ で 45 分間インキュベートした。これを蛍光顕微鏡で観察、画像解析ソフト (Image J) に取り込んだ。取り込んだ画像から、筋線維細胞膜の位置に観察される dystrophin 染色像の内側に存在する DAPI 陽性核 (筋線維核) の数を測定した。

未分化な細胞の増殖

各群とも運動開始 3 日目にヒラメ筋を採取した。筋採取の 48 時間前には 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) を投与し、その間に増殖した核を標識した。採取したヒラメ筋の凍結横断切片は 4% PFA にて 10 分間固定、1% BSA で洗浄し、10 mM Alexa Fluor[®] 568 azide (Invitrogen) 1 μl に対し、1 mM copper () sulfate、100 mM ascorbic acid、1% BSA を、各々 500 μl 、200 μl 、300 μl の割合で混合した液をのせ、遮光して、37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間インキュベートした。さらにこの切片に dystrophin と核との多重染色を加え、EdU 陽性である核数を測定した。

筋衛星細胞の活性化

筋衛星細胞の活性化や分化が起きているかどうか確かめるため、運動開始 4 日目のヒラメ筋横断切片に、静止期の筋衛星細胞の指標である pax7、筋芽細胞や筋管細胞への分化ステージの指標である MyoD、myogenin の抗体を用いた免疫組織染色を施した。まず切片を 4% PFA にて 10 分間固定後、3% BSA in PBS で一晩ブロッピング処理を行った。その後、と同様に 1 次抗体、2 次抗体でインキュベートし、蛍光顕微鏡で観察した。一次抗体には、mouse anti-Pax7 antibody (1:250, Developmental Studies Hybridoma bank) と rabbit anti-MyoD antibody (1:200, Santa Cruz)、もしくは goat anti-MyoD antibody (1:200, Santa Cruz) と rabbit anti-Myogenin antibody (1:200, Santa Cruz) を用いた。2 次抗体には、前者に Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG (1:400, Molecular Probers) と Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG

(1:400, Molecular Probers)、後者に Alexa Fluor[®] 568 donkey anti-goat IgG (1:400, Molecular Probers) と Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (1:400, Molecular Probers) を用いた。2 次抗体の溶液には DAPI も加えた。

4. 研究成果

(1) 筋線維横断面積の回復促進と筋線維核数の増加

14 日間の尾部懸垂により約 43% 減少した筋線維横断面積は、尾部懸垂から解放して 7 日後、普通飼育のみであると $1315 \pm 153 \mu\text{m}^2$ までの回復に留まるところ、筋力増強運動を施すと $1843 \pm 194 \mu\text{m}^2$ まで回復し、CON 群の面積 ($2005 \pm 196 \mu\text{m}^2$) と差がなくなった (図 1)。以上のことより以前の結果同様、筋力増強運動によって筋萎縮からの回復が促進されることを確認できた。

この筋線維サイズの回復促進に伴って筋線維核数の大幅な増加も確認できた。SE 群の筋線維 1 本あたりの筋線維核数は 0.92 ± 0.14 であり non SE 群の筋線維核数 (0.57 ± 0.03) に比べて有意に多いのはもちろんのこと、CON 群の筋線維核数 (0.56 ± 0.11) に比べても有意に多かった (図 2)。以上の事から、7 日間で急激に起こる筋線維核数の増加が筋線維サイズの回復促進に関与しているであろうことが改めて確認できた。

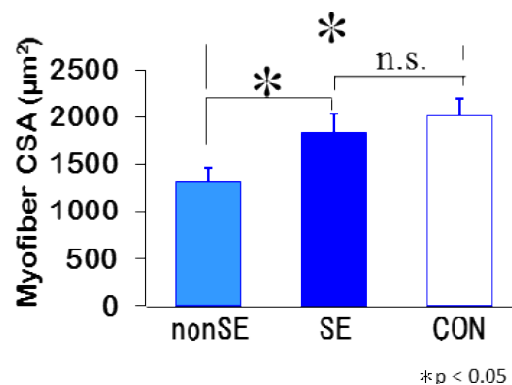


図 1 筋線維横断面積 (mean \pm SEM)

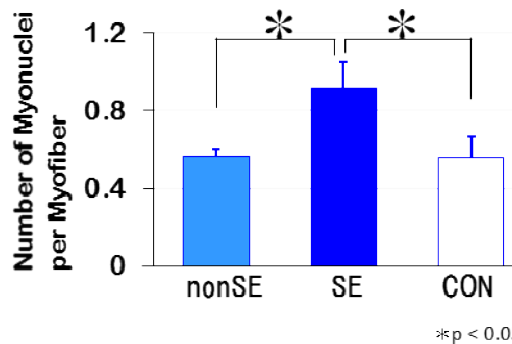


図 2 筋線維 1 本あたりの筋線維核数 (mean \pm SEM)

(2) 未分化な細胞の増殖

筋線維まで分化した核はその後分裂をしないといわれているため、(1)で確認された筋線維核数の大幅な増加は、筋衛星細胞などの未分化な細胞が増殖、分化し、筋線維へと融合した姿であると考えられる。そこでまず、この筋力増強運動による回復促進期間に未分化な細胞の増殖が生じているかどうか調べた。その結果、SE群の切片にEdU陽性の核が観察された。その数はnon SE群やCON群に比べ多かった(図3)。また運動を始めて2日目までに比べて、2日目以降の48時間でEdU陽性の筋線維核数は10倍多かった。筋線維核数は、この運動開始4日目の時点で7日目と同様の数まで増加していた。このことから未分化な細胞の増殖が運動開始2日目から4日目の間に未分化な細胞の急速な増殖が起こり、筋線維へと融合していることが考えられる。

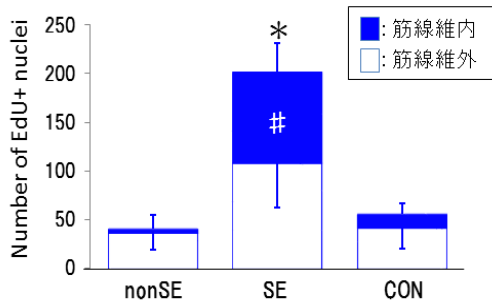


図3 EdU陽性核数 EdU陽性の核のうち筋線維内に存在するものを青色のバーで示している (Mean ± SD) *: EdU陽性核の総数に $p < 0.05$, vs. CON群; #: EdU陽性の筋線維核数に $p < 0.05$, vs. CON群

(3) 筋衛星細胞の活性化

(2)で確認された運動により急速に増殖する未分化な細胞の正体が筋衛星細胞である可能性を探るため、筋衛星細胞や筋分化のマーカーを用いて免疫組織化学的に検証した。その結果、運動を開始して4日目の筋にEdU陽性でかつ、筋衛星細胞のマーカーとして用いられるpax7が陽性の核が観察された(図4)。増殖した未分化な細胞は筋衛星細胞であると考えられる。さらに、Pax7と筋芽細胞への分化期に現れるMyoDの共染像、MyoDと筋管細胞への分化期に現れるmyogeninの共染像も観察された(図5)。このことから、筋萎縮後の運動による筋萎縮からの回復促進過程の初期には、増殖した筋衛星細胞が筋芽細胞へと分化し、筋線維への融合が生じていると考えられる。

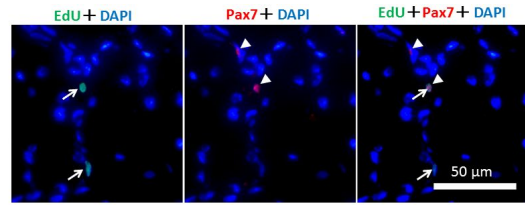


図4 EdUとPax7の共染像 EdU、Pax7、DAPIの染色像の一例を示す。矢印:EdU陽性の核、矢頭:Pax7陽性の核

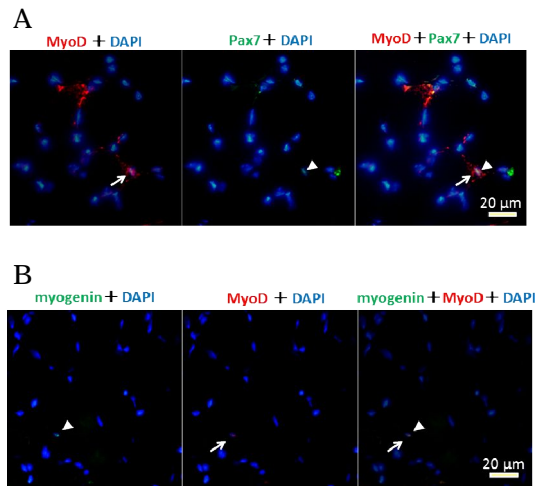


図5 Pax7とMyoD、myogeninの共染像 Pax7とMyoD、DAPI(A)およびMyoDとmyogenin、DAPI(B)の染色像の一例を示す。矢印:MyoD陽性の核、矢頭:Pax7陽性の核(A)・myogenin陽性の核(B)

以上のことより、筋力増強運動を行うと、筋衛星細胞の増殖、分化、融合が数日の間に起こり、筋線維核数を増加させると考える。これによって、筋線維サイズの増大が早められ、筋萎縮からの回復が促進すると考えられる。本成果は、臨床における筋萎縮からの回復促進方法を検討する上での礎となるデータとなる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Yuta Itoh・Kimihide Hayakawa・Tomohiro Mori・Nobuhide Agata・Nahoko Kimura・Masumi Inoue-Miyazu・Taro Murakami・Masahiro Sokabe・Keisuke Kawakami. Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell

proliferation in mice. Physiological Reports (査読有), e12185, 2 (11), 2014.

研究者番号 : 30454383

〔学会発表〕(計6件)

Yuta Itoh・Nobuhide Agata・Nahoko Kimura・Masumi Inoue-Miyazu・Takayuki Hirano・Kimihide Hayakawa・Taro Murakami・Keisuke Kawakami. The effective intensity of exercise load for facilitating recovery from muscle atrophy in mice. WCPT congress 2015 (World Confederation for Physical Therapy), 1-4 May 2015. Suntec (Singapore).

伊東佑太・縣信秀・木村菜穂子・宮津真寿美・平野孝行・河上敬介. 筋損傷を引き起こす強度の運動は筋萎縮からの回復促進効果を下げる. JPTA 第1回日本基礎理学療法学会学術集会・JPTF 日本基礎理学療法学会学術大会 合同学会(JPTA, JPTF), 2015. 11. 15-16. 名古屋学院大学(名古屋).

伊東佑太・吉岡潔志・森友洋・縣信秀・木村菜穂子・宮津真寿美・河上敬介. マウスヒラメ筋の筋萎縮からの回復促進効果と筋収縮負荷量との関係. 第3回日本基礎理学療法学会学術大会(日本基礎理学療法学会), 2013. 10. 27. 名古屋大学(名古屋).

Yuta Itoh・Kiyoshi Yoshioka・Nobuhide Agata・Masumi Inoue-Miyazu・Keisuke Kawakami. Isometric Contraction by Electrical Stimulation Facilitates Recovery from Muscle Atrophy. 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013 (AWP, ACPT), 5-9 September 2013. Taichung (Taiwan).

村田奈緒子・伊東佑太・吉岡潔志・河上敬介. 筋力増強運動による組織学的な回復促進効果は筋力の回復を伴うか?. 第48回日本理学療法学会学術大会(日本理学療法士協会), 2013. 5. 24-26. 名古屋国際会議場(名古屋).

伊東佑太・藤田佳菜子・縣信秀・宮津真寿美・平野孝行・河上敬介. 筋力増強運動による萎縮筋の筋線維核数増加の時期や量. 第47回日本理学療法学会学術大会(日本理学療法士協会), 2012. 5. 25-27. 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場(神戸).

〔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

(1) 研究代表者

伊東 佑太 (ITO, Yuta)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・助教