

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580323

研究課題名（和文） ウシ骨格筋細胞の筋細線維ターンオーバー機構の解明

研究課題名（英文） Myofibrillar turnover mechanism of fast-to-slow transformation of bovine myofiber types by chronic low-frequency stimulation

研究代表者

渡辺 康一（WATANABE KOUICHI）

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80261494

研究成果の概要：

ウシ腰最長筋への持続的低周波電気刺激により、筋線維を速筋線維から遅筋線維へ誘導させる実験系を確立した。この筋線維型変移ではミオシンの変移が先行して起こり、調節蛋白質の変移は続いて進行することが示された。この時、筋形成抑制因子であるミオスタチン発現が抑制されることが明らかとなった。また、筋細胞がケモカインを産生することを明らかにし、ミオスタチンがその発現を誘導することを見出した。筋線維型変移では筋衛星細胞に加え、外来の筋原細胞の動員によって、筋細線維ターンオーバーが促進されることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：筋線維型、持続的低周波電気刺激、Fast-to-Slow 変化、ミオシン重鎖、トロポニン、ミオスタチン、ケモカイン、筋原細胞

1. 研究開始当初の背景

ウシの骨格筋を構成する筋細胞（筋線維）は、I 型（Slow-twitch-Oxidative）、II A 型（Fast-twitch-Oxidative-Glycolytic）および II B 型（Fast-twitch-Glycolytic）筋線維の3種類の筋線維型に分類され、それぞれ異なったミオシン重鎖（MyHC）アイソフォーム〔I 型：Slow MyHC、II A 型：Fast 2a MyHC、II B 型：Fast 2x MyHC〕を有する筋細線維に

よって構成されている。骨格筋では未熟な筋線維型（Embryonic および Fetal MyHC）が成長過程を経て成熟型の筋線維型に分化する。また成熟後も筋線維は可変性を有し、機能的要求に適応した筋線維型に変化し得る。この筋線維型の変移は、筋細線維を構成する筋構成蛋白質全体が置換され、筋細線維が再構成されるドラスティックな生体現象である。

持続的低周波電気刺激（CLFS）は効果的に筋線維型の Fast-to-Slow 変移を誘導する実

験系である。この時、筋細線維に異なる MyHC アイソフォームが共存する中間型筋線維が出現することが数多く報告されている。しかしながら筋線維型の移行過程において、筋線維における MyHC アイソフォームおよび遺伝子発現の変移が筋線維全体で同調して起きるのか、散発性の局所の変移から始まるのかは明らかではない。この機序を解明することが筋線維型変移の完全理解をもたらすと考えられる。また、筋線維型移行のトリガーとなる因子が想定されているが、その詳細な機序は確定していない。

さらに、筋線維型の移行においては、筋細線維の構成蛋白質のターンオーバーが劇的に進行して筋細線維が置換されることになるが、筋蛋白質分解系のコントロールが生体内でいかにしてなされるのかについても十分な情報は無い。

加えて、これらの筋線維型移行過程において、筋細胞内での新たな MyHC アイソフォームの発現が既存の筋線維核によるものか、新しく融合する筋衛星細胞核に依存するものかは不明である。

2. 研究の目的

筋線維型の変移はミオシンなどの筋細線維の構成蛋白質全体の変化を伴うドラステックな生体現象である。本研究では筋線維型変移過程における MyHC アイソフォームおよび筋蛋白質分解酵素の発現動態の関連に注目する。持続的低周波電気刺激 (CLFS) が誘導する II 型から I 型への Fast-to-Slow 筋線維型変移において、筋線維全体にわたる PGC-1 α 、MyHC アイソフォーム、蛋白質分解系および制御因子の空間的局在を解析する。また、対象とする各因子の mRNA 発現の空間的局在性はマイクロダイセクション法を用いた RT-PCR によって確定する。これらの結果により、筋線維型変移過程における筋細線維ターンオーバーの機序が、巨大細胞である筋線維全体での空間的变化として明らかとなる。さらに筋衛星細胞の活性化と筋線維型変移との関与を探ることにより、筋線維型の決定メカニズムが解析できる。

3. 研究の方法

(1) 持続的低周波電気刺激による筋線維型移行モデル (CLFS モデル) の確立

ウシの背部に局所麻酔下で鍼灸針による電極を経皮的に腰最長筋に装着し、簡易型電気刺激装置によって、5 Hz の低周波電気刺激を 24 時間持続して、30 日間 (d30) および

50 日間 (d50) 連続して実施した (持続的低周波電気刺激: CLFS)。対照区, d30 区および d50 区は各 3 頭とし、それぞれ安楽死の後に腰最長筋の CLFS 処置部位より筋材料を採取し、ドライアイス・アセトンで急速凍結した。筋材料から凍結切片を作製し、免疫組織化学的染色を行なった。一次抗体は、抗 Slow MyHC 抗体 (Sigma 社) と抗 Fast MyHC 抗体 (Sigma 社)、抗トロポニン T slow 亜型および抗トロポニン I slow 亜型を用いた。二次抗体には酵素ポリマー法 (シンプルステイン, MAX-PO, ニチレイ社) により可視化して、筋線維型変移の挙動を免疫組織化学的に解析した。

(2) 筋線維型変移過程における筋分化関連因子の発現解析

CLFS モデルの骨格筋凍結切片への免疫組織化学的染色結果より、筋線維型変移部位を特定した後、変移部位のみを組織切片上からマイクロダイセクション法で採取し、変移部位での筋分化関連因子 mRNA の発現を RT-PCR 法によって解析した。

解析した筋分化関連因子は MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, Pax7, HGF, ミオスタチン, アクチビンレセプター II 型およびフォリス タチンとした。内部標準には RPL7 を用いた。

(3) 筋線維型移行における筋細線維ターンオーバーに関する筋原細胞の動態解析

CLFS によって筋線維型移行が進行している筋組織における筋原細胞の動態を解析するため、筋衛星細胞マーカー Pax7 と細胞増殖核抗原 PCNA について免疫組織化学的染色を行ない、血管周皮細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼについて酵素組織化学的染色を行なった。

また、連続切片による三次元再構築法および筋線維型単離法によって、筋線維型変移における空間局在の解析を試みた。

(4) 筋線維分化過程におけるケモカインの発現解析

筋再生では筋組織中に貪食能を持った細胞が遊走して来ることが良く知られる。一方、CLFS によって筋組織に多数の核が組織標本上に観察されることがある。筋組織内でのケモカイン発現の有無と筋分化制御因子の関与を RT-PCR 法によって解析した。本実験には日本短角種牛とミオスタチンを自然欠損した日本短角種牛 (草原短角牛) を用いた。解析したケモカインは CXCL1, CXCL2, CXCL6, CCL2 および CCL8, レセプターは CXCR1 と CXCR2, 内部標準は G3PDH とした。

4. 研究成果

(1) 持続的低周波電気刺激による筋線維型移行モデル (CLFS モデル) の確立

持続的低周波電気刺激 (CLFS) によって、ウシ腰最長筋の筋線維型に Fast-to-Slow 変化が誘導される過程を免疫組織学的に解析したところ、30 日間の CLFS によって Fast 型ミオシン重鎖 (MyHC) 陽性の筋線維割合が 73% から 49% に減少し、一方 Slow 型 MyHC 陽性筋線維の割合が 13% から 26% に増加した。また、Fast 型と Slow 型の双方の MyHC を有する中間型筋線維も 14% から 25% に増加した (図 1)。

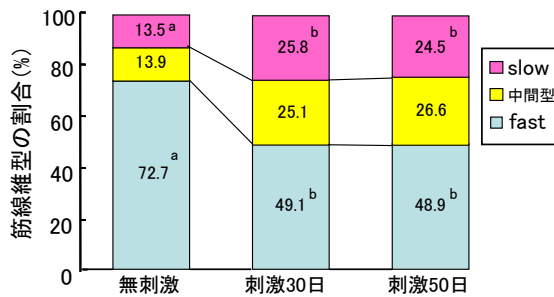


図1 ウシ腰最長筋へのCLFSによる筋線維型構成の変化

この時、筋収縮調節蛋白質であるトロポニン (Tn) T-slow 型と TnI-slow 型の陽性反応は、slow 型と中間型筋線維で検出されたが、Fast 型 MyHC 陽性反応が優勢な筋線維では TnT-slow、TnI-slow の陽性反応はほとんど認められなかった。筋線維型移行過程における Tn アイソフォームの変化は、MyHC アイソフォームの Fast-to-Slow 変化に追従して起こることが明らかとなった (図 2)。

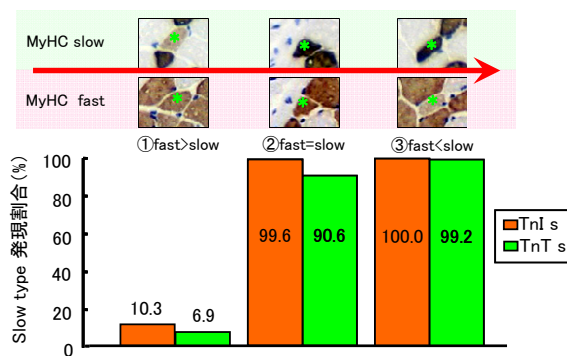


図2 中間型筋線維におけるSlow型トロポニンTおよびトロポニンIの発現変化

(2) 筋線維型変移過程における筋分化関連因子の発現解析

筋線維型変移部をマイクロダイセクションにより切り出し、ミオスタチン mRNA 発現

を半定量的 RT-PCR 法により解析したところ、CLFS による持続的な筋運動の結果、ミオスタチン mRNA 発現量が減少することが判明した。この時、筋線維型変移部位ではミオスタチン発現は減少するが、レセプターおよびインヒビターの発現には変動は見られなかった (図 3)。CLFS はミオスタチンの発現にのみ影響を及ぼすことが明らかとなった。筋分化や筋肥大への抑制作用を持つミオスタチンの発現減弱によって、筋線維型変移の環境が誘導され、変移の進行を促進するものと考えられる。このことは免疫組織化学的に筋線維のミオスタチン陽性反応が減弱することからも確かめられた。

ミオスタチン以外の筋分化関連因子発現動態については、Fast-to-Slow 変移を反映する明らかな遺伝子変動は不明確であった。これは筋線維が長大な細胞であるため活性化した筋衛星細胞が不規則に散在し、RT-PCR サンプルへ筋分化関連因子 mRNA 発現量の差異が反映しにくいことが考えられる。本研究におけるウシ骨格筋への CLFS による筋線維型移行は緩慢なものであったことも遺伝子発現に顕著な変動が見出せなかった要因として考えられる。

ウシ腰最長筋への CLFS による筋線維型移行において、筋分化抑制因子であるミオスタチン発現が下方制御を受けることによって、筋細線維のターンオーバーに関与する筋原細胞の活動が促進されることが示唆される



図3 CLFSによる筋線維型移行部位でのmyostatin mRNAの発現変化 (RT-PCR)

(3) 筋線維型移行における筋細線維ターンオーバーに関与する筋原細胞の動態解析

CLFS によって筋線維型変移が起きた部位では、筋線維間に多数の細胞核が観察され、視野当たり 1.6 倍の核が観察された。筋衛星細胞マーカーである Pax7 陽性細胞は CLFS によって増加していたが、血管周皮細胞由来のアルカリフォスファターゼ陽性細胞数も 5.3 倍に増加していた。このことから筋衛星細胞の活性化の他に、外来の細胞が筋原細胞となって筋線維に融合し、筋線維型変移に介入することが示唆された (図 4)。

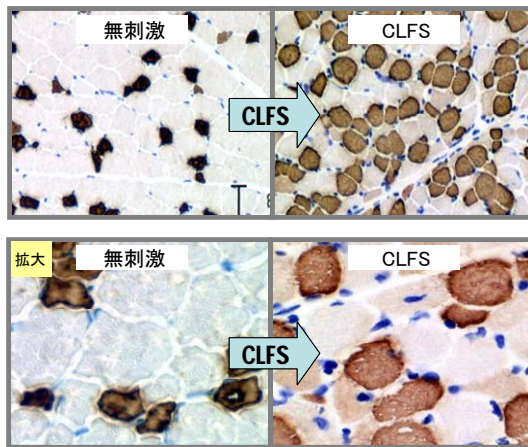


図4. CLFSによる筋線維型移行に伴うI型筋線維の肥大と筋組織における核数の増大(免疫染色・MyHC Slow)

単離筋線維における筋衛星細胞の解析においては、外来の筋原細胞の介入を判別する必要が生じたが、これらの細胞種を同定することが極めて困難である。筋線維単離法によって筋衛星細胞の動態を解析するためには、種々の外来筋原細胞の識別法を考案する必要がある。また、当初目標としていた三次元解析は、筋線維型変移の進行が遅く、腰最長筋という大きな筋での変移部位を特定することが困難であったため、立体可視化するには至らなかったが、巨大筋での変移を3次元的に見出すためには、さらに手法の開発が必要である。

(4) 筋線維分化過程におけるケモカインの発現解析

筋形成過程において、筋細胞からケモカイン CXCL1, CXCL2, CXCL6 および CCL2 が産生されることが判明した。また、ミオスタチンを自然欠損した日本短角種牛では、通常牛よりもケモカイン発現誘導が弱く、ミオスタチンはケモカイン発現を亢進させる方向に作用することが明らかとなった(図5)。一方、CLFSによってミオスタチン発現が減少することから、筋線維型移行過程ではケモカイン発現は抑制されると考えられ、炎症性反応を

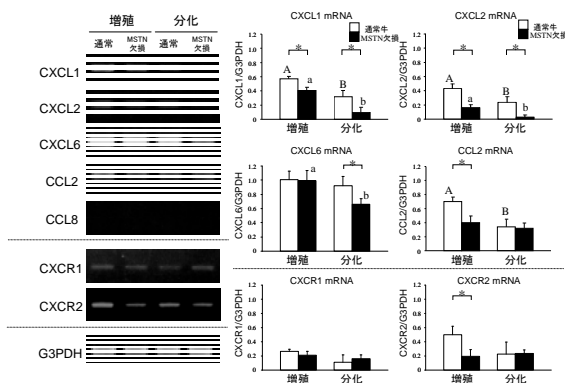


図5 筋芽細胞からのケモカインmRNA発現

抑制した状態で、筋線維の筋細線維ターンオーバーに動員される筋原細胞が増殖あるいは分化を進行し得ることが示唆された。このことは、筋再生部位に遊走集積する貪食細胞がCLFSによる筋線維型移行部位にほとんど見られないことから支持される。

(5) 総括

本研究におけるCLFSによる筋線維型変移は、Slow型MyHCを有するI型筋線維を神経支配するS型運動ニューロンのインパルスと同程度の低周波電気刺激を、運動神経を介さずすべての筋線維に強制的に伝達させることによって誘導される。本研究においては、筋線維型の移行は半数以上の筋線維がSlow型MyHCを発現させたが、50日間の刺激でもSlow型筋線維優位の状況には至らなかった。ウシの骨格筋線維型の移行は緩慢なものであることが示唆された。筋細線維ターンオーバーの面から見ると、筋細線維の主要な収縮蛋白質であるMyHCの亜型変移に引き続き、トロポニンの亜型変移が起きていることが明らかとなった。筋細線維がターンオーバーを受ける際には、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントによる筋節構造が先行して再構成され、引き続きアクチンフィラメント上に調節蛋白質として局在するトロポニン複合体が構築されることが推定される。

CLFSによる筋線維型変移誘導において、筋衛星細胞以外の外来筋原細胞が筋線維に融合することによって筋細線維ターンオーバーに介入している可能性が示された。一般に骨格筋線維の筋線維核は分裂能を持たない。通常、筋線維に機能的変化あるいは損傷が生じた場合、筋衛星細胞が分裂、増殖して筋線維に融合し、筋線維核を増大させることで筋線維の筋蛋白質合成能を増強させることが知られている。しかし、CLFSでの筋線維型移行における筋細線維のターンオーバーでは、筋蛋白質を大規模に置き換えて行くために、外来の筋線維核を補充する必要があるものと考えられる(図6)。

本研究のCLFS条件では電気刺激の伝導が運動神経を経由するものではないため、刺激の効果がランダムに生じた。本研究より、CLFSによって筋組織内の細胞核数が1.6倍に増大し、外来の筋原細胞が筋線維型変移に動員されている可能性が示された。しかし、ウシにおける筋線維間の筋原細胞の由来を同定する方法は見出されておらず、筋分化マーカーを発現した筋衛星細胞が外来筋原細胞由来であるか否かを判別する手段を新たに見出す必要がある。

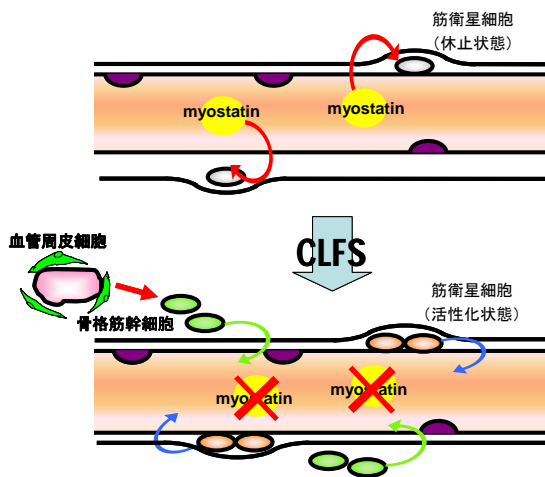


図6. CLFSによるウシ筋線維型移行モデル

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 3 件)

- ① Muroya S., Watanabe K., Hayashi S., Miyake M., Konashi S., Sato Y., Takahashi M., Kawahata S., Yoshikawa Y., Aso H., Chikuni K., Yamaguchi T. Muscle type-specific effect of myostatin deficiency on myogenic regulatory factor expression in adult double-musled Japanese Shorthorn cattle. *Animal Science Journal* 80, *in press*. 2009. 査読有
- ② Hayashi S., Miyake M., Watanabe K., Aso H., Hayashi S., Ohwada S., Yamaguchi T. Myostatin preferentially down-regulates the expression of fast 2x myosin heavy chain in cattle. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 84: 354-362. 2008. 査読有
- ③ Miyake M., Hayashi S., Sato T., Taketa Y., Watanabe K., Hayashi S., Tanaka S., Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. Myostatin and MyoD family expression in skeletal muscle of IGF-1 knockout mice. *Cell Biology International* 31, 1274-127. 2007. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 今井由佳・三宅雅人・渡邊康一・大和田修一・麻生 久・山口高弘. ウシ骨格筋での筋線維型移行過程の解析. 第 110 回日本畜産学会大会. 2009. 3. 27. 日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市)
- ② 小笠原英毅・畔柳 正・渡邊康一・三宅雅人・大和田修一・麻生 久・山口高弘・萬

田富治. 放牧など自給粗飼料 100%で生産した肥育牛骨格筋組織の組織化学的解析. 2009. 3. 27. 第 110 回日本畜産学会大会, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市)

- ③ Miyake M., Iwasaki S., Imai Y., Abe H., Watanabe K., Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. Effect of myostatin on IL-6 expression in skeletal muscle. The 13th AAAP Animal Science Congress. 2008. 9. 24. Hanoi, Vietnam.
- ④ Iwasaki S., Miyake M., Watanabe K., Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. Influence of myostatin on chemokine expressions in bovine skeletal muscle. The 13th AAAP Animal Science Congress. 2008. 9. 24. Hanoi, Vietnam.
- ⑤ 岩崎俊輔・三宅雅人・渡邊康一・大和田修一・麻生 久・山口高弘 (2008) 骨格筋細胞でのケモカインおよびケモカインレセプター発現に対するマイオスタチンの影響, 第 109 回日本畜産学会大会, 2008. 3. 29. 常磐大学 (茨城県水戸市)
- ⑥ 松崎正敏・渡邊康一・山口高弘・神谷 充・折戸秀樹・常石英作・鈴木裕之 (2008) 代用乳の増量給与が哺乳子牛の筋線維特性に及ぼす影響, 第 109 回日本畜産学会大会. 2008. 3. 29. 常磐大学 (茨城県水戸市)
- ⑦ 渡邊康一 (2008) やわらかい赤肉生産の取り組み, 第 2 回日本産肉研究会大会. 2008. 3. 28. 常磐大学 (茨城県水戸市)
- ⑧ 今井由佳・三宅雅人・渡邊康一・大和田修一・麻生 久・山口高弘. ウシ骨格筋への持続的低周波電気刺激 (CLFS) における myostatin 発現動態, 第 108 回日本畜産学会大会. 2007. 9. 26. 岡山大学 (岡山県岡山市)
- ⑨ 山口高弘・渡邊康一. 筋線維の機能的分化と筋線維型移行. 平成 19 年度第 38 回繊維学会夏季セミナー. 2007. 9. 6. 宮崎県宮崎市
- ⑩ 岩崎俊輔・三宅雅人・林 晋一郎・渡邊康一・大和田修一・麻生 久・山口高弘. 骨格筋形成過程におけるマイオスタチンのケモカイン発現に対する影響. 第 144 回日本獣医学会学術集会 (日本獣医解剖学会). 2007. 9. 4. 酪農学園大学 (北海道江別市)
- ⑪ 三宅雅人・林 晋一郎・渡邊康一・今井由佳・岩崎俊輔・大和田修一・麻生 久・山口高弘. ウシ骨格筋での MSTN による IL-6 の発現制御, 第 57 回東北畜産学会大会. 2007. 8. 24. 山形大学農学部 (山形県鶴岡市)
- ⑫ Miyake M., Hayashi S., Imai Y., Watanabe K., Ohwada S., Aso H., and Yamaguchi T. MSTN regulates IGF-2 but not IGF-1

expression during myogenesis of cattle.
2007 ADSA- PSA-AMPA-ASAS Joint Annual
Meeting, 2007.7.10. San Antonio, USA.

[図書] (計 2 件)

- ① 渡邊康一・山口高弘, 学窓社, 獣医組織学 第4版(日本獣医解剖学会編), 69-79, 2008
- ② 山口高弘・渡邊康一, チクサン出版, カラーアトラス獣医解剖学 (カラーアトラス獣医解剖学編集委員会編), 151-160, 2008

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 康一 (WATANABE KOUICHI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：80261494

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし