

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5月16日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20500441

研究課題名（和文） 骨格筋衛星細胞活性化と MyoD ファミリー発現を指標とした至適運動負荷量の設定

研究課題名（英文） The setting of proper exercise load used activation in satellite cell and expression of MyoD family in skeletal muscle as index.

研究代表者

山崎 俊明 (YAMAZAKI TOSHIAKI)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00220319

研究成果の概要（和文）：筋衛星細胞の活性化と MyoD ファミリーの発現を指標とした運動負荷量の設定が臨床的に効率的と考えた。正常筋で筋衛星細胞の活性化閾値と MyoD ファミリー発現を分析後、萎縮筋と正常筋の相違を検証した。理学療法学の観点から、萎縮筋における介入至適条件を、荷重と歩行の比較分析から考察した。過大な負荷による筋損傷を避けた、安全な運動負荷量設定には、活性化閾値の利用と病理学的観察の併用が有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We thought that the setting of proper exercise load used activation in satellite cell and expression of MyoD family in skeletal muscle as index was clinically effective. After research on the activation threshold of satellite cells and expression of MyoD family in normal muscle, we analyzed the difference between atrophy and normal muscle. From the viewpoint of physical therapy, we considered optimal intervention condition in atrophy muscle from comparison analysis in weight-bearing and gait. It was thought that combination of the use of the activation threshold and pathological observation was important to the setting of proper exercise load that avoided muscle damage by excessive load.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：理学療法学

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：筋衛星細胞, MyoD ファミリー, 運動負荷量, 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

理学療法の臨床場面で、歩行や日常生活活動の再獲得を目指した筋力強化運動を実施することは常套手段である。しかし効率的な

運動負荷条件を設定する明確な方法・根拠は提示されていない。運動負荷量が多ければ効果も期待できるが、萎縮筋では運動許容範囲が狭いことから、臨床の場面で実際に運動を処方する際には、安全かつ効率的な条件設定

が要求される。近年の研究では筋肥大の際、個々の筋線維を取り巻く筋衛星細胞が重要な役割を担っていることが明らかになった。筋衛星細胞は筋線維の形質膜と基底膜の間に存在する単核細胞として 1961 年に Mauro によって初めて報告された。運動負荷などにより筋に損傷が生じると筋衛星細胞は活性化し、既存の筋線維と融合、新生線維を形成すると考えられている。Darr らは、経時的な筋衛星細胞の活性化を検討し、ヒラメ筋を対象とした結果では運動後 72 時間で最大活性、120 時間後においても対照群より高値を示した。しかし運動負荷強度の違いによる筋衛星細胞活性化閾値に関する報告はない。

一方、骨格筋には筋細胞の発生・分化に重要な役割を担う MyoD ファミリー (MyoD、Myf-5、myogenin、MRF4) と呼ばれる筋特異的転写因子が存在する。MyoD ファミリーは E タンパク質とヘテロダイマーを形成し、筋細胞の調節領域に特異的に存在する E-box に結合したタンパク質の遺伝子転写活性を調節しており、筋細胞のマスター遺伝子と考えられている。

筋萎縮に関しても筋核アポトーシスの可能性が示唆されており、筋衛星細胞の活性化がリハビリテーションにおける運動負荷量設定に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、「骨格筋衛星細胞の活性化閾値を利用し、MyoD ファミリーの発現を指標とすれば、効率的かつ効果的で安全な運動負荷量の設定が可能」と仮説した。つまり、筋衛星細胞の活性化閾値上で、かつ過負荷にならない運動負荷量の設定ができればリハビリテーション、特に理学療法に有用な基礎データを示唆できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床応用の基礎研究として動物の骨格筋を用いて、下記項目を明らかにすることである。①筋衛星細胞を活性化する運動負荷強度に閾値が存在するか、②運動負荷強度の違いが MyoD ファミリーの発現量にどのように影響するかについて、細胞レベルおよび遺伝子レベルで、正常筋および廃用性萎縮筋にて検証する。その結果を基に、萎縮筋に対する至適運動負荷量設定の基礎データを提示することを目標とした。

3. 研究の方法

正常筋に対する運動負荷には小動物用トレッドミルを使用し、持続的なトレッドミル走行を実施した。萎縮筋に対しては、荷重負荷およびトレッドミル歩行を実施した。

廃用性萎縮筋は、代表者らが先行研究で報告した特製ジャケットを用いた後肢懸垂法にて惹起した。両側の後肢筋 (主にヒラメ筋)

を採取し、片側は凍結組織を作製、組織病理学的分析に供した。他側は遺伝子学的分析用とし、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 並びに Real time PCR を利用し、MyoD ファミリーの発現確認および定量化を実施した。

4. 研究成果

(1) 運動負荷強度の違いによる骨格筋衛星細胞活性化および MyoD ファミリー発現への影響を正常筋で調べた。MyoD、Myogenin および増殖細胞核抗原 (PCNA) mRNA 発現量を指標として正常ラットを用いて検討した。16 度下り坂で 30 分間連続走行を実施、走行速度を 5 段階に設定した。運動負荷終了 72 時間後に、後肢よりヒラメ筋 (SOL) および長趾伸筋 (EDL) を採取した。抗ジストロフィン染色と抗 BrdU 染色の免疫二重染色を実施した。筋衛星細胞活性化を分析した結果、20m/min 以上群で有意に増加した。逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法を用いて目的遺伝子の存在を確認し、リアルタイム定量 PCR 法を用いて目的遺伝子 mRNA 量を測定した。その結果、20m/min 以上の運動負荷強度で、Myogenin 発現量が増加傾向を示した。一方、PCNA 発現量は運動負荷により有意に減少した。MyoD と PCNA は類似した傾向を示したが、Myogenin と PCNA では類似した傾向を示さなかった。

(2) 運動負荷後の筋特異的遺伝子発現の経時的变化を正常筋で調べた。低強度単回運動における影響について MyoD、myogenin、MHC-1、MHC-2a mRNA を指標として、運動負荷後 24、48、72 および 96 時間後に分析した。運動を実施しない対照群 (CON) と運動実施 24 (P24)、48 (P48)、72 (P72)、96 (P96) 時間後に両側ヒラメ筋を採取する計 5 群とした。結果、MyoD、MHC-1 発現量は変化なく、myogenin 発現量は P24 で CON に対して約 1.7 倍に、MHC-2a 発現量は P24、P48、P96 で CON に対して約 1.8 倍に増加したが群間に有意差はなかった。

(3) 正常筋における結果を踏まえ、廃用性萎縮筋に対する荷重刺激の影響を分析した。実験群は 7 日間の後肢懸垂を実施後さらに 1 日あるいは 7 日間、①後肢懸垂群 (HS8、HS14)、②毎日 1 時間荷重群 (WB8、WB14)、③通常飼育群 (RL8、RL14) に分類した。目的遺伝子は細胞増殖促進作用のある MGF と筋特異的転写因子の一つである MyoD を用いた。結果、MGF 発現量は 8 日目で RL8 が HS8 や WB8 と比較し有意に大きく、14 日目では HS14 に対して RL14 が大きかったが有意差はなかった。MyoD 発現量は 8 日目で HS8 と WB8 は小さい値を示したが、RL8 は他

群と比較し有意に大きかった。

(4) 荷重刺激より負荷量が多い歩行による影響を萎縮筋で分析した。また廃用性筋萎縮および再荷重に対する反応を、筋長軸部位別に組織形態面から検討した。

ラットを1週間の後肢懸垂後、①1週間通常飼育群 (RL)、②更に1週間後肢懸垂群 (HS)、③1時間荷重群 (WB)、④歩行介入群 (EX)、⑤通常飼育群に分類した。歩行は先行研究データを参考に、小動物用トレッドミルを用い、0~10m/minで5分歩行、2分休止を8セット実施した。荷重・歩行群は介入開始1日後 (day8)、7日後 (day14) 時点で麻酔後、右側ヒラメ筋は瞬間冷凍し-70℃で、左側筋はRNA安定化試薬に浸透し4℃で保存した。凍結した右側筋はHE染色にて病理組織学的に分析した。左側筋はmRNA抽出後PCR法を用い、目的遺伝子としてMGFは機械的刺激量の指標、MyoDは筋衛星細胞活性化の指標として用い、ハウスキーピング遺伝子GAPDHで半定量した (表1)。

表 1: Primers used for qRT-PCR.

Gene	Sequence (5'-3')*
MyoD	ACT ACA GCG GCG ACT CAG AC
	ACT GTA GTA GGC GGC GTC GT
MGF	GCT TGC TCA CCT TTA CCA GC
	AAG TGT ACT TCC TTT CCT TCT C
GAPDH	AAC GGG AAA CCC ATC ACC A
	CGG AGA TGA TGA CCC TTT TG

* Upper = forward primer; lower = reverse primer.

歩行の萎縮抑制程度は小さかったが、単回の介入後は歩行刺激が最も筋横断面積を増大させ筋機能の改善を示唆した (図 2・3)。機械的刺激量は荷重よりも歩行の方が大きい傾向が、MGF の結果から示唆された (図 1)。

今回用いた歩行運動は脆弱した廃用性萎縮筋に対して負荷が大きかった可能性が考えられ、筋横断面積の回復を認めた一方で損傷像も多く確認された (図 2・3)。MyoD の増大を認めず損傷が原因か否かは不明であるが、過負荷による筋損傷を避けた、安全かつ効率的な運動負荷量の設定には、筋衛星細胞の活性化閾値および MyoD ファミリー発現を

指標とし、病理組織学的な評価を加えることが有用と考えられた。

リハビリテーションの場面では、長期臥床期間後に歩行練習を実施する機会が多いことから、廃用性萎縮筋に対する歩行と荷重刺激に対する反応の違いを詳細に分析し、より効果的かつ効率的な理学療法介入方法の導入が必要であり、本研究はその基礎データを提示した。

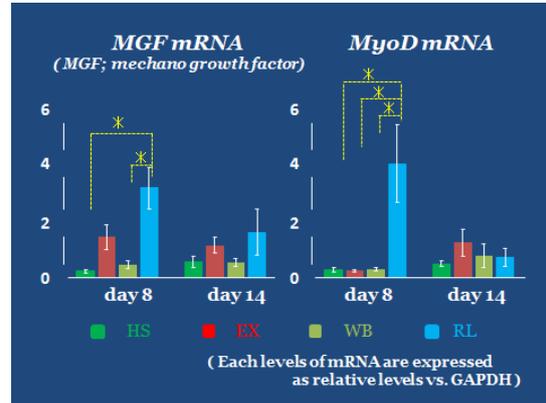


図 1: MGF & MyoD mRNA の変化

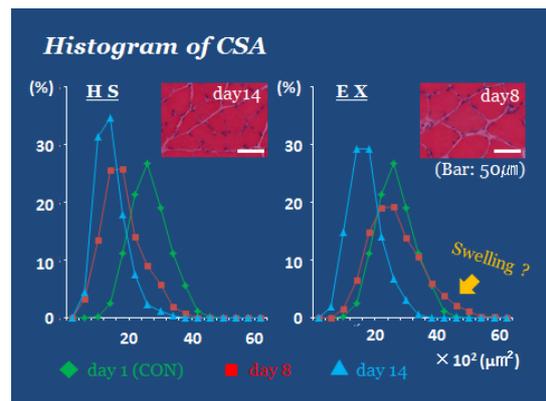


図2: 断面積変化と組織像 (HS&EX)

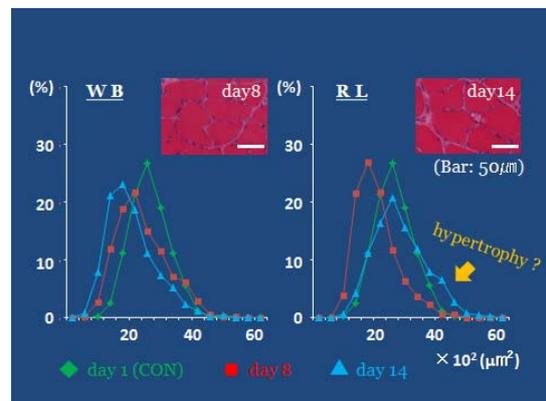


図3: 断面積変化と組織像 (WB&RL)

(5) まとめ: 当初の研究計画・方法に従い、20年度は正常筋を対象に運動負荷強度の違いによる筋衛星細胞活性化、MyoD ファミリー

発現への影響を検討した。20m/min以上の運動負荷強度で Myogenin 発現量が増加傾向を示した結果を踏まえ、21年度は閾値上と考えられる 24m/minの30分間連続走行を採用し、単回運動負荷後の筋特異的遺伝子発現の継続的变化を調べた。22年度は、過去2年間の正常筋における結果を踏まえ、廃用性萎縮筋に対する(運動負荷を加えない)荷重刺激の影響を分析した。23年度は荷重刺激より負荷量が多い歩行による影響を分析した。

また廃用性筋萎縮および再荷重に対する反応を、筋長軸部位別に組織形態面から検討した。その結果、反応は筋全体で一様ではなく長軸部位(近位・筋腹中央部・遠位)により反応が異なることが新たに判明した。部位別対応の可否を検討することが临床上重要と判断し、新規研究テーマとして背景の分析および方法論を構築したので、次年度の新規科学研究費に申請した。

廃用性萎縮筋では荷重や歩行刺激により微細な筋損傷が生じ、効果のある運動許容範囲が狭いことが示唆され、筋衛星細胞の活性化閾値および MyoD ファミリー発現を指標とし、病理学的観察を併用することが有用と考えられた。

臨床では、臥床後に歩行練習を実施する機会が多いが、廃用性萎縮筋に対する歩行と荷重刺激に対する反応の違いが分析できた意義は大きい。今後の展開として、新規テーマである部位別介入効果の検証を加えることができれば、より効果的かつ効率的な理学療法介入方法(例えば、段階的負荷量漸増法など)を検討する基礎データを提示できると考えている。

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)

[雑誌論文] (計12件)

- ① Zushi K, Yamazaki T: The effect of reloading on disuse atrophy: Time course of hypertrophy and regeneration focusing on the myofiber cross-sectional area and myonuclear change. J Jpn Phys Ther Assoc. (2012), in press, 査読有.
- ② Miyata T, Tanaka S, Yamazaki T: Effects of walking and weight-bearing exercise on soleus muscle in hindlimb-suspended rat. J Phys Ther Sci 23: 385-389 (2011), 査読有.
- ③ 西川正志, 山崎俊明, 都志和美: 再荷重がラットヒラメ筋廃用性萎縮の回復に及ぼす影響. 筋の部位による相違. 理学療

法科学 26: 133-137 (2011)、査読有.

- ④ 足立和美, 山崎俊明: 筋核数および筋核ドメインサイズを指標としたラットヒラメ筋の廃用性萎縮過程の分析. 理学療法科学 25: 363-367 (2010)、査読有.
- ⑤ 足立和美, 山崎俊明: 筋核数・筋核ドメインサイズを指標としたラット廃用性筋萎縮に対する再荷重の影響. 石川県理学療法学会誌 10: 17-20 (2010)、査読有.
- ⑥ Miyata T, Tanaka S, Yamazaki T: MyoD, myogenin and myosin heavy chain mRNA expression in rat skeletal muscle after a single session of low-intensity treadmill exercise. J Phys Ther Sci 21: 379-383 (2009), 査読有.
- ⑦ Yamazaki T, Yokogawa M, Tachino K: Effects of combined stretching and clenbuterol on disuse atrophy in rat soleus muscle. J Jpn Phys Ther Assoc 12: 13-19 (2009), 査読有.

[学会発表] (計17件)

- ① Yamazaki T, Nishikawa M, Zushi K, Kimura S, Miyata T: The influence of un- and reloading on disuse atrophy of the rat soleus muscle depends on the longitudinal site. 16th International WCPT Congress, 2011.6.22, RAI convention centre (Amsterdam, Holland)
- ② 宮田卓也, 田中正二, 山崎俊明: 歩行刺激と荷重刺激による廃用性筋萎縮抑制効果の比較. 第46回日本理学療法学会大会, 2011.5.28, シーガイアコンベンションセンター (宮崎県)
- ③ Miyata T, Tanaka S, Yamazaki T: Walking and weight bearing prevent skeletal muscle atrophy in hindlimb suspended rat. 11th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy. 2010.10.12, Sanur Paradise Plaza Hotel (Bali, Indonesia)
- ④ 西川正志, 山崎俊明, 足立和美: 再荷重がラットヒラメ筋廃用性萎縮の回復に及ぼす影響-筋の部位による相違-. 第45回日本理学療法学会大会, 2010.5.27, 長良川国際会議場 (岐阜県)
- ⑤ 宮田卓也, 田中正二, 山崎俊明: ラット骨格筋における単回のトレッドミル運動負荷後の MyoD, myogenin, MHC mRNA 発現量の検討. 第34回日本運動療法学会, 2009.6.21, 早稲田大学国際会議場 (東京都)

[その他]

研究紹介データベース

http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info.php?teacher_id=502

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 俊明 (YAMAZAKI TOSHIAKI)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：00220319

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

横川 正美 (YOKOGAWA MASAMI)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号：80303288

田中 正二 (TANAKA SHOJI)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号：70422657

稲岡 プレイアデス 千春
(INAOKA PLEIADES TIHARU)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号：90507386

(4) 研究協力者

宮田 卓也 (MIYATA TAKUYA)
金沢大学・保健学系・研究協力員