

機関番号：43933

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500639

研究課題名 (和文) 一過性除神経期の運動がラット骨格筋および神経筋接合部形態に及ぼす影響

研究課題名 (英文) The effect of activity on skeletal muscle and neuromuscular junctions form in rat following temporary denervation .

研究代表者

西沢 富江 (NISHIZAWA TOMIE)

至学館大学短期大学部・准教授

研究者番号：30283980

研究成果の概要 (和文)：筋損傷は一過性除神経を引きこす。運神経終末と筋の再接合期に、筋線維は多重神経支配を受ける。その後、余剰神経が排除されて単一神経支配の状態に戻る。筋損傷から再生過程に起こる余剰神経排除の選択はその後の筋線維タイプの決定を左右するだろう。一方、余剰神経の選択的排除には運動が大きく関与し、筋線維から運動神経終末へ何らかの情報が発信されている可能性が考えられる。筋の情報としてミオシン重鎖 mRNA の発現量があげられる。そこで本研究では、一過性除神経期の神経筋接合部形態と運動がミオシン重鎖 mRNA 発現量に及ぼす影響から仮説を検討した。結果、運動に伴うミオシン重鎖 mRNA 発現量の増加、筋線維タイプ移行が示された。一過性除神経期の運動は、筋から神経への情報伝達に関与し、余剰神経の排除に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Our studies so far have reported that the muscle damage causes the temporary denervation. In the regeneration processes of the muscle fiber, the innervation form becomes multiple innervations. Then, it removes the surplus nerve terminals from muscle fiber, and it becomes the single innervation. It is considered that the selection and the elimination of the surplus nerve terminals affect the muscle fiber type. It may be presumed that the activity of the muscle plays pivotal roles in the affects the selection and elimination of the surplus nerve terminals. And it is further estimated that the muscle fiber also has interactive functions and sends signal to the nerve terminal in the process of regeneration. The purpose of this study was to investigate the effect of activity on neuromuscular junction form and Myosin Heavy Chain (MyHC) mRNA expression quantity following temporary denervation in rat skeletal muscle. The values from the group endurance-downhill-endurance training showed the increase from percentage of Type II a fiber and MyHC Type I and MyHC Type II A of mRNA. And activity following temporary denervation may have a role in the nerve conversion of the neuromuscular junction injury process.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2009年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2010年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：体育学・スポーツ科学

キーワード：①筋細胞・組織 ②運動 ③神経筋接合部形態 ④ミオシン重鎖mRNA

1. 研究開始当初の背景

(1)筋は不活動により大きな影響を受けるが、これらの変化は可逆的であり、再び筋を活動させることで機能的に回復する。また、同時に筋活動は骨格筋を支配する運動神経細胞の機能も回復する。このことは筋収縮情報の神経から筋への入力と、筋紡錘や腱器官からの神経への求心性の信号により、神経筋機能は回復したととらえられる。つまり、筋の収縮活動は、神経からの外部への出力だけではなく、神経筋機能を維持するために必要不可欠なものであるということが示唆される。その神経筋の情報伝達であり、神経筋の機能を維持する場は、神経筋接合部である。神経筋接合部でなされる神経筋相互作用に関わる機能と構造は密接な関係がある。神経筋機能の低下時に神経筋接合部では運動終板の崩壊、脱神経が観察される (Nishizawa et al, 2003)。神経筋接合部崩壊による脱神経は、神経からの筋への情報を遮断し、神経筋機能の低下すなわち、筋発揮張力の低下を引き起こす (Takekura et al, 2003)。筋の収縮活動は機能同様、崩壊した神経筋接合部構造に何らかの影響を与えることは考えられる。

(2)神経筋接合部は、伸張性収縮や塩酸ブピバカイン (BPVC) 投与などによって引き起こされる骨格筋筋線維の崩壊に伴い、構造破壊が進行し形態的特長が大きく変化する。神経筋接合部構造崩壊は、一過性の脱神経を引き起こし、機能特性にも影響を及ぼすが、筋線維の再生に伴い神経筋接合部も再形成されることが報告されている (Nishizawa et al, 2003)。一方、運動神経終末の損傷が神経筋接合部の形態変化に及ぼす影響については、神経凍結に伴う一過性の除神経状態、その後の再神経支配過程における神経筋接合部構造の再形成が報告されている

(Sakakima et al, 2000)。また、一過性除神経期の神経筋接合部で観察される脱神経は、神経軸索終末の退行によって引き起こされるものであり、筋線維構造には大きな変化がみられない。一過性の除神経の影響は、緊張性に働く遅筋に大きく影響し、神経筋接合部の可逆的形態変化の過程が筋線維タイプ別に異なることも報告されている (Nishizawa et al, 2006)。しかし、一過性除神経後に運動神経終末の再生し、神経筋接合部が再形成されることは明らかになっているが、除神経期の筋の収縮活動が、崩壊した神経筋接合部構造におよぼす影響に関しては明らかにされていない。

2. 研究の目的

運動神経終末や骨格筋は特異的にその形態を変化させ、シナプス部である神経筋接合部の形態も特異的に変化する。神経筋相互作用に関して、神経系の調節性、骨格筋筋線維の調節性の多くが明らかにされているが、筋活動が如何にしてシナプス形成を調節するのか、除神経筋に対する神経再接合を何が調節するのか、は明らかにされていない。そこで、本研究では、一過性除神経から神経筋再接合の再形成機序について、筋活動により筋から何らかの情報 (mRNA) を発信するといった筋原性調節が起こるか否かを仮説として①筋活動量の増減に伴うミオシン重鎖 (MyHC) の mRNA 発現量、②筋損傷が起因する一過性除神経に伴う神経筋接合部の変化、③一過性除神経期の筋活動と運動神経再接合、神経筋接合部形態の変化の現象を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)筋損傷が起因する一過性除神経に伴う神経筋接合部のおよび骨格筋の形態変化に関する

る検討。筋損傷後に一過性除神経が起こるか否かの確認を行う。骨格筋細胞及び神経筋接合部 (NMJ) 形態変化を光学顕微鏡により観察する。

(2) 筋活動量の増減変化に伴う MyHCmRNA の発現と筋線維タイプ別構成比のとの関係についての実験

トレーニング条件や期間の違いによる筋活動の増減が MyHCType I mRNA、MyHCType II A mRNA、MyHCType II B mRNA、の発現と量的変化に及ぼす影響を検討する。

実験動物は、生後 10 週齢の Fischer344 系雄ラットを 30 匹用いる。実験動物には持久走トレーニングを行わせる。ラットに 4 週間の走トレーニングを行わせる群 (E)、4 週間のトレーニング終了時点で下り走を行わせ筋損傷を起こす群 (ED)、さらに 2 週間のトレーニングを行う群 (EDE) とコントロール群 (C) を設けた。

トレーニング終了後、ラットから被験筋である足底筋 (PLA) を摘出し、MyHCmRNA 発現量の測定および Myosin ATPase 染色を行い筋線維タイプ別本数比を求める。遺伝子発現量は、骨格筋より RNA を抽出し、Real-Time RT-PCR 法にて定量した。

(3) 一過性除神経期の筋活動と運動神経再接合、神経筋接合部形態の変化

一過性除神経期+トレーニング実験: 実験動物は、生後 10 週齢の Fischer344 系雄ラットを 30 匹用いる。被験筋は EDL、SOL とする。下り走後、持続的走トレーニングを 2 週間行う。トレーニング終了後、ラットを安楽死させ物理的刺激を可能な限り与えないよう注意して筋を摘出する。筋摘出後は神経筋接合部の形態変化と MyHCmRNA の発現量的変化に着目する。

(4) 実験動物の扱いおよびトレーニング条件

①実験における飼育は、昼夜逆転した 12 時間の明暗サイクルで、室温 23°C に保った動物飼育施設にて飼育を行なった。摂餌、飲水は自由摂取とし、餌はマウス・ラット・ハムスター用固形飼料 (日本クレア株式会社 CE-2) を使用した。②持久走トレーニング (E 群) は、小動物用ト

レッドミルで、一日一回、分速 35m のスピードで 1 時間のトレーニングを週 6 日、4 週間行なった。筋損傷を引き起こすための下り走はレッドミルに -16% の傾斜をつけて、一日一回、分速 45m のスピードで 1 時間のトレーニングを 2 日間行なった。

トレーニング、屠殺時の動物の扱いは「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」「至学館大学・至学館大学短期大学部 (旧名称: 中京女子大学) 動物実験規則に従って行った。

(5) 測定方法

①神経筋接合部の形態観察

光学顕微鏡下にて神経筋接合部 (NMJ) の形態観察を行う。筋摘出後、液体窒素により冷却したイソペンタン中にて筋を凍結し、クリリオスタット内で 50 μ m の筋縦断切片を作成する。切片にコリンエステラーゼ染色、銀染色を行う。光学顕微鏡を用いて神経終末、運動終板を観察し、筋損傷、脱神経、多重神経支配、単一神経支配を確認する。NMJ の形態は Tuffery の分類を参考にして定量化を行う。

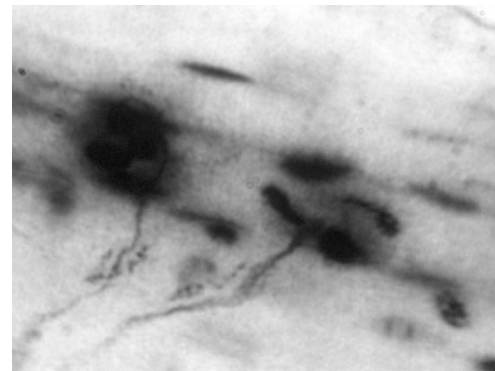


Fig 1. 骨格筋神経筋接合部組織像 (コリンエステラーゼ染色と鍍銀染色)

②筋の組織化学的特性

筋摘出後、液体窒素により冷却したイソペンタン中にて筋を凍結し、クリオスタット内で 10 μ m の筋横断切片を作成する。筋横断面の Myosin ATPase 染色による筋線維タイプ分類を Brook の方法により行う。プレインキュベーションは pH4. 3, pH4. 6, pH10. 3 の三つの条件を設定し、筋線維タイプ別本数比を求める。

③ MyHCmRNA 発現量の定量

MyHCmRNA の定量は、筋摘出後 -80°C で保存した骨格筋 (PLA) より mRNA を抽出し、Real-Time RT-PCR 法にて遺伝子発現量を定量した。

Real-Time RT-PCR 法は Thermal Cycler Dice Real-Time System リアルタイム PCR (タカラバイオ) にて検出を行う。MyHCType I, Type II A, Type II B の mRNA 発現量測定を行う。各アイソフォームごとのセンス・アンチセンスのプライマーの塩基配列は、MyHCType I が 5' - GTAGATCTTG

TGCTACCCAAC - 3' / 5' - TGTTTCTGCCTAAGGTGCTG - 3'、MyHCType II A が 5' - GTAAGGCAGCTCTGATGCTG - 3' / 5' - GAATCACATCCAAGCAGGA - 3'、MyHCType II B が 5' - ATAGCTCAATTCCTTCTGTTG - 3' / 5' - CTTGATATATACAGGACAGTGA - 3' とした。加えて Total MyHC、5' - AGAAGGAGCAGGACACCAGCG - 3' / 5' - GCTTGTTGACCTGGGACTCG - 3'、GAPDH、5' - CATTGACCTCAACTACATGG - 3' / 5' - GTCATGGATGACTGACCTTGGCCA - 3' とした。

(6) 統計処理

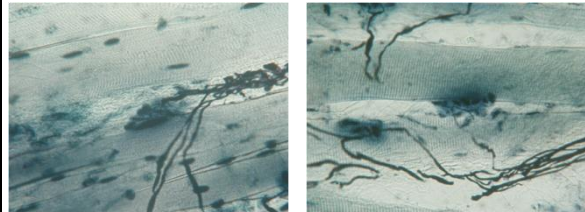
各測定値は群ごとに平均値、標準偏差および標準誤差を求め統計学的な検討を行なった。分散分析では主効果が有意となった場合の多重比較に scheffe 法を用いた。全ての検定において有意水準は 5% ($p < 0.05$) とした。

4. 研究成果

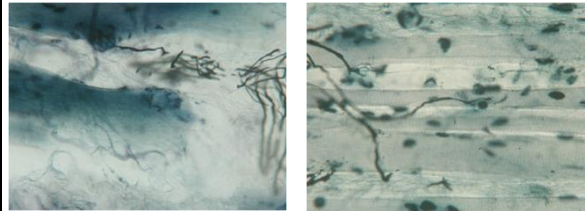
(1) 筋損傷が起因する一過性除神経に伴う神経筋接合部のおよび骨格筋の形態変化

神経筋接合部の形態は、C 群、E 群 (Fig. 2) には変化が観察されなかった。ED 群 (Fig. 2) では、一部の筋線維に過収縮、膨潤化などの筋損傷の指標像が観察された。損傷筋線維上 (Fig. 2 E

群) の神経筋接合部には、運動終板に終末分枝、神経終末の接合が観察されず、脱神経の像が観察された。EDE 群では、核の行列化や極細線維



が観察され、筋の再生が確認できた。再生筋線



維上には、2カ所にコリンエステラーゼ活性が観察され、多重神経支配像が観察された。また、極細線維上の運動終板上では、終末分枝が観察されず、未発達な神経筋接合像が観察された。筋損傷を引き起こす下り走を行うことで、一過性除神経が起こることが確認された。

C 群

E 群

ED 群

EDE 群 (50 μm)

Fig. 2 コリンエステラーゼ染色と都銀染色による神経筋接合部画像

(2) 筋活動量の増減変化に伴う MHCmRNA の発現と筋線維タイプ別構成比

① 神経筋接合部の形態変化時のミオシン重鎖 mRNA 発現量をコントロールに対する相対値で示した。EDE 群において持久性能力の高い MyHCType I mRNA (Fig. 2)、MyHCType II AmRNA が有為な高値を示し、E 群、ED 群間に有為な差が認められた。MyHCType II BmRNA は、運動群で低値を示したが、各群間に差は認められなかった。

Fig.2 MyHCmRNA 発現量相対値 Type I

筋損傷、一過性除神経期に運動を行なうと、運動に適したミオシン重鎖 mRNA が増加することが示唆された。

②筋線維タイプ別本数比では、トレーニングと一過性除神経に伴う Type I と Type II 間の変化は認められなかった。一方、Type II のサブタイプであり、有酸素能力の高い Type II A において C 群約 22% に対し、E 群約 28%、EDE 群約 34% で優位に高値を示した。EDE 群は、E 群に対しても有意な値を示した。トレーニング、一過性除神経の影響が筋線維タイプ別構成比に影響を与えたことが示唆された。

③筋横断組織像は、表層に Type II A の増加が観察された。

MyHCmRNA の発現と筋線維タイプ別構成比の結果から、一過性除神経期の神経筋接合部形態変化時に行った活動に適応した筋線維タイプへ移行したことが示唆された。しかし、MyHC Type I mRNA 発現量の増加は筋線維タイプ Type I 本数比の増加に影響を与えていない。筋線維タイプの決定には、mRNA から収縮タンパクが構築される過程で抑制要因が影響を与えていることが推測され、この要因の解明は今後の検討課題である。

(結論)筋損傷後に起こる多重神経支配期の筋活動は、筋から神経への情報として関与し、余剰神経の排除に影響を及ぼす可能性が示唆された。

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 1 件)

① Kounosuke Tomori · Yukiko Ohta · Tomie Nishizawa · Hiroyuki Tamaki · Hiroaki Takekura. Low-intensity electrical stimulation ameliorates disruption of transverse tubules and neuromuscular junctional architecture in denervated rat

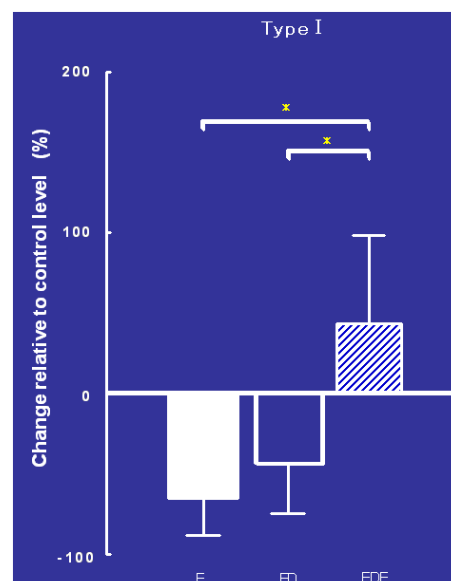
skeletal muscle fibers. J Muscle Res Cell Motil 29, 2010 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① NISHIZAWA Tomie, KASUGA Norikatu, YUKI Atumu, TAMAKI Hiroyuki, TAKEKURA Hiroaki. The Effect on Neuromuscular Junction Form and Contractile Properties in the Rat Skeletal Muscle Following the Eccentric Contraction Exercise. 14th Annual Congress of the European College of Sport Science, Oslo (Norway), 2009. 6,

②西沢富江、春日規克、竹倉宏明、伸張性収縮後の骨格筋筋線維および神経筋接合部の形態変化 第 64 回日本体力医学会大会、新潟、2009. 9

③ NISHIZAWA Tomie, TOMORI Konosuke, YUKI Atumu, TAMAKI Hiroyuki, TAKEKURA Hiroaki. Effect of activity on muscle fiber type composition and Myosin Heavy Chain mRNA expression after muscle injury induced by eccentric contraction in rat skeletal muscle. 13th Annual Congress of the European College of Sport Science, Estril (Portugal), 2008. 7



6. 研究組織

(1)研究代表者

西沢 富江 (NISHIZAWA TOMIE)

至学館大学短期大学部・准教授

研究者番号： 30283980

(2)研究分担者

春日 規克 (KASUGA NORIKATU)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号： 60152659