

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03042

研究課題名(和文)筋萎縮特有の肥大応答メカニズムの解明とその理学療法の開発

研究課題名(英文)The effective training and the mechanisms for recovery from muscle atrophy

研究代表者

河上 敬介(Kawakami, Keisuke)

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：60195047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：萎縮筋の回復促進に最適な負荷強度や休息の解明を目的とした。その結果、最大収縮強度の40%および60%の強度での等尺性収縮運動は、筋衛星細胞の活性化および筋核の顕著な増加を引き起こすとともに、等尺性収縮力や筋線維断面積の回復に最も効果的であることが判明した。一方、収縮をコントロールできる培養モデルを用いて、収縮活動由来の損傷タンパク質に、筋がどのように対処しているかを、不活動状態とタンパク質分解系に注目して調べた。筋管細胞の肥大を誘発する収縮活動時に蓄積された損傷タンパク質は、収縮活動が止まると直ちにおこるオートファジー活性化により除去が始まり、適度な休息の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine the optimum training intensity for muscle atrophy. Muscle recovery assessed by maximal isometric contraction and myofiber cross sectional areas (CSAs) were facilitated at 40% and 60% maximum contraction strength (MC). Activation of myogenic satellite cells and a marked increase in myonuclei were observed at 40%, 60% MC. On the other hand, we aimed to examine the accumulation or degradation of damaged proteins after contractive activity and the following inactivity in cultured myotube. 2 days of repeated muscle contraction induced myotube hypertrophy. Damaged proteins were accumulated during the hypertrophy. When the contractile activities were stopped, autophagy was immediately activated and the damaged proteins were removed. Muscle inactive state is necessary to remove damaged proteins accumulated by repeated muscle contraction.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：筋萎縮 理学療法 筋衛星細胞 筋肥大

1. 研究開始当初の背景

廃用や、疾病・加齢などによって骨格筋は萎縮する。骨格筋が萎縮すると筋力が低下し、身体活動に制限が生じ、健康寿命が縮小する。よって、筋萎縮に対抗するための効果的な方策を明らかにすることは、リハビリテーション医療に携わる者にとって重要なことである。

一般に正常筋のレジスタンストレーニングには、筋肥大のための適切な負荷量に関するエビデンスが存在し(ACSM, 2006)、アスリートや健常者スポーツのトレーニングに用いられている。一方、リハビリテーションにおける萎縮筋へのトレーニングには、独自のエビデンスはなく、正常筋へのトレーニングと同じエビデンスが用いられている場合が多い。マウスに尾部懸垂を行うと、後肢の筋線維横断面積はわずか 2 週間で正常筋の 1/2 の太さまで萎縮する。この廃用性の萎縮筋は、再荷重により 2-4 週間で正常筋の太さまで回復する。しかし我々は、この筋萎縮動物モデルにオペラント学習による立ち上がり運動を行わせると、わずか 7 日間で正常筋の太さまで回復することを明らかにした(Ito, 2014)。正常筋の肥大に要するトレーニング期間が 8-16 週間であることを考えると、萎縮筋の太さや張力の可塑的变化は異常に早い現象である。

さらに我々は、廃用性筋萎縮動物モデルに立ち上がり運動を行わせると、一旦減少した筋線維核数が、運動開始後わずか 4 日で正常値以上に増加していることを明らかにした。この、筋線維核数の増加は、筋衛星細胞の分化・融合が関与していると考えられた。筋線維核数と筋線維サイズとの間の関連性が強いといわれている。この萎縮筋へのトレーニング時に、筋線維の太さの回復促進前におこる筋衛星細胞の活性化は、単に再荷重を行ったマウスや正常筋へのトレーニングでは認められず、筋萎縮からの回復促進のメカニズムに重要であると考えられた。

一方、筋の太さは筋を構成するタンパク質の合成と分解のバランスによって決定される。例えば筋萎縮時には、合成を促進するシグナル分子が不活性化し、分解を促進する機構が活性化する。しかし近年、筋の太さは、そのような単純なシステムで決定されるものではないことがわかってきた。例えば、合成シグナル分子 TOR の恒常的な活性化は、タンパク質を損傷させ、筋萎縮を引き起こす(Perrine, 2013)。我々の予備的実験でも、本来筋が萎縮する環境下に暴露しても、その数分から数時間以内にはタンパク質合成シグナルが活性化することを示唆する結果を得た。また、オートファジー系の筋萎縮に関連が深いと考えられている酸化ストレスを培養筋管細胞に与えると、その数分後に合成シグナル分子 Akt が活性化することを示唆する結果も得た。さらに、萎縮筋に力学刺激を行うと、刺激開始直後に Akt が活性化する

が、1 時間以内に元の状態に戻り、その後刺激を続けても活性化しないことを報告している(Agata, 2009)。また、少なくとも 12 時間のインターバルの後に再度力学刺激を与えれば、活性化が再度起こることもわかってきた。この様に、萎縮筋が太くなるために必要なメカニズムは、運動開始や運動停止と言った筋細胞の力学刺激環境の変化後早い時期に起こり、かつ持続的な刺激は必要ないようである。

2. 研究の目的

骨格筋は、使用しないと萎縮する(廃用性筋萎縮)が、そのメカニズムは十分にわかっていない。また、廃用性筋萎縮の運動療法は、健常筋へのトレーニングに準じて行われているに過ぎない。しかし我々は、萎縮筋からのトレーニングによる回復促進時におこる筋肥大と、健常筋の筋肥大とで根本的に異なる現象をつかんでいる。よって、萎縮筋は健常筋とは異なる肥大メカニズムがあり、健常筋とは異なる運動療法があるはずである。そこで本研究では、まず萎縮筋特有の運動療法に対する応答のメカニズムを明らかにする。そして、萎縮筋に特化した、最も効果的な量や強度等を持つ運動療法を開発する。

(1)萎縮筋にしか起こらないと考えられる、運動開始後早期の筋衛星細胞の活性化を最も起こす運動量や強度を明らかにする。

(2)廃用性筋萎縮の培養モデルを用いて、いまだ不明な運動停止初期の蛋白質合成・分解の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)筋萎縮動物モデルを用いて、萎縮筋にしか起こらない、運動開始早期の筋衛星細胞の活性化を最も起こす運動量や強度を明らかにする。

廃用性の筋萎縮動物モデルには、2 週間の尾部懸垂により作製した後肢筋萎縮のマウスを用い、対象筋はヒラメ筋とした。下腿後面に対して、マウス用足関節トルク測定装置を用いて足関節の底屈トルクを測定しながら電気刺激を与え、定トルク性の繰り返し等尺性収縮運動を行わせた。運動開始後早期に認められる筋衛星細胞の活性化を最も起こす適切な運動量や強度を明らかにした。

運動開始から 4 日までの筋衛星細胞の活性を以下の免疫組織化学的方法により検証した。

- ・筋線維核数の変化を検証した。凍結横断切片に免疫染色を供し(抗 Dystrophin 抗体、DAPI 染色)筋線維あたりの筋線維核数の変化と新生された筋線維核の有無を検証した。
- ・EdU click-iT 染色を用い新生筋線維核数の変化を検証した。

- ・凍結横断切片に筋の分化・融合の誘導因子(Myf5、MyoD、Myogenin、Myoferlin)の免疫染色を行い、横断切片上の各因子の陽性核数を測定した。

また、等尺性収縮運動 7 日目の筋萎縮からの回復促進効果を、足関節底屈トルクと、筋線維横断面積とで評価した。

(2) 廃用性筋萎縮の培養モデルを用いて、いまだ不明な運動停止初期の蛋白質合成・分解の分子機構を明らかにする。

筋管細胞を電気刺激由来の収縮活動下で 2 日間培養した。その後、電気刺激を止め、収縮活動のない不活動状態でさらに 2 日間培養した。この間の筋管細胞系を測定するとともに、以下の様な指標の変化を調べた。ミトコンドリア量の指標となる ATP5a の割合、mito SOX により検出したミトコンドリア由来の ROS の画像と筋管細胞上の輝度、カルボニル化タンパク質をメンブレン上で検出した画像の輝度、ウエスタンブロット法により得られた p62 と K48 コピキチン鎖の割合、ウエスタンブロット法による p-S6K、p-TOR/total TOR、LC3-II の割合等を調べた。

4. 研究成果

(1) 筋萎縮動物モデルを用いて、萎縮筋にしか起こらない、運動開始早期の筋衛星細胞の活性化を最も起こす運動量や強度を明らかにする。

我々がこれまで明らかにしてきた筋萎縮モデルに対する筋萎縮からの回復促進効果があると考えられる運動強度や回数を参考に、運動開始後早期に起こる筋衛星細胞の活性化を最も起こす適切な運動量や強度を調べた。その結果、最大等尺性収縮強度の 40% から 60% の強度での繰り返し等尺性収縮運動を 1 日 50 回、1 週間行くと、最も効果的な萎縮からの回復促進効果が得られることが判明した。その根拠を以下に述べる。筋力の回復や筋横断面積の回復は、最大等尺性収縮強度の 10% や 90% の等尺性収縮運動に比べて大きかった。特に最大等尺性収縮強度の 40% では、コントロール群と差がないところまで回復した。活性化された筋衛星細胞の数や筋線維当たりの筋核数も同様に、最大等尺性収縮強度の 40% から 60% の強度での繰り返し等尺性収縮運動による効果が大きかった。なお、最大等尺性収縮強度の 60% から 90% の運動では、筋線維の損傷の割合が増加し、筋萎縮からの回復促進効果が制限されることが分かった。

(2) 廃用性筋萎縮の培養モデルを用いて、いまだ不明な運動停止初期の蛋白質合成・分解の分子機構を明らかにする。

2 日間の収縮活動により筋管細胞は肥大し、ミトコンドリア量と ROS の発生が増加した。その後の 2 日間の不活動状態により筋管細胞は萎縮し、ミトコンドリア量と ROS も減少した。収縮活動由来の ROS 増加に伴い、酸化損傷タンパク質やこれから分解されるべきタンパク質が増加した。2 日間の不活動状態によりこれらは減少した。収縮活動により TOR 活性は亢進するが、オートファジー活性の指標となる LC3-II は収縮による差はみられな

かった。収縮活動停止後に注目するとオートファジー活性は収縮停止から 1 時間後に亢進した。オートファジーによる分解を阻害すると、2 日間の不活動状態による LC3-II や p62 の減少が抑えられた。しかし、予想に反してカルボニル化タンパク質はオートファジーを阻害しても不活動状態により同様に減少した。収縮活動継続中でも、TOR を阻害するとオートファジー活性が亢進し、損傷タンパク質は除去された。

以上のことより、骨格筋の不活動状態は、筋機能低下の因子と考えられてきたが、収縮活動により発生する損傷タンパク質の除去に必要である。収縮活動による筋の機能向上には、収縮活動と不活動状態のバランスを考慮する必要がある。

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 5 件)

Mori Tomohiro, Agata Nobuhide, Itoh Yuta, Inoue-Miyazu Masumi, Mizumura Kazue, Sokabe Masahiro, Taguchi Toru, Kawakami Keisuke, Post-injury stretch promotes recovery in a rat model of muscle damage induced by lengthening contractions, The Journal of Physiological Sciences, 査読有、2017, pp.1-10
DOI : 10.1007/s12576-017-0553-9

Itoh Yuta, Murakami Taro, Mori Tomohiro, Agata Nobuhide, Kimura Naoko, Inoue-Miyazu Masumi, Hayakawa Kimihide, Hirano Takayuki, Sokabe Masahiro, Kawakami Keisuke, Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy, Muscle & Nerve, 査読有、Vol.55 no.1, 2017, pp. 243-253
DOI:10.1002/mus.25218

河上 敬介, 宮津 真寿美, メカノバイオリロジーに基づく筋力トレーニング - 筋肥大と抗筋萎縮のメカニズムを探る -, 医学のあゆみ, 査読無、別冊 5 月、2017, pp.113-118

河上 敬介, 宮津 真寿美, メカノバイオリロジーに基づく筋力トレーニング - 筋肥大と抗筋萎縮のメカニズムを探る -, 医学のあゆみ, 査読無、第 257 巻 第 10 号、2016, pp.1079-1084
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=925710&AC=16254>

河上 敬介, 宮津 真寿美, 理学療法のみカノバイオリロジー: 機械刺激と筋治療、化学

同人、2015、pp. 217-224

〔学会発表〕(計 12 件)

川上 健二、菅田 陽怜、松下 光次郎、池田 尊司、河上 敬介、片岡 晶志、津村 弘、疲労後の筋への定量圧刺激が運動機能と筋収縮様式に及ぼす影響、公益社団法人日本理学療法士協会 第 52 回日本理学療法学会大会、2017

竹中 菜々、伊東 佑太、河上 敬介、櫻井 英俊、細胞移植治療後のデュシェンヌ型筋ジストロフィー症モデルマウスに対する等尺性収縮トレーニングは、移植による治療効果を促進する、公益社団法人日本理学療法士協会 第 52 回日本理学療法学会大会、2017

河上 敬介、理学療法の様々な領域に支援工学的視点をどう活かすか - 日本基礎理学療法学会の視点から -、公益社団法人日本理学療法士協会 第 52 回日本理学療法学会大会(招待講演)、2017

河上 敬介、筋の構造から考える理学療法の評価や治療、一般社団法人京都府理学療法士会 生涯学習部第 1 回研修会(招待講演)、2016

伊東 佑太、鈴木 淳也、縣 信秀、木村 菜穂子、平野 孝行、河上 敬介、マウス足関節底屈筋群の遠心性筋収縮による筋損傷モデルの開発、公益社団法人日本理学療法士協会 第 51 回日本理学療法学会大会、2016

縣 信秀、宮津 真須美、河上 敬介、超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖は促進される、公益社団法人日本理学療法士協会 第 51 回日本理学療法学会大会、2016

Nana Takenaka-Ninagawa, Yuta Itoh, Keisuke Kawakami, Hidetoshi Sakurai, Muscle-contraction training can enhance the efficacy cell transplantation treatment for Duchenne Muscular Dystrophy(DMD), 2nd International Symposium on Regenerative Rehabilitation in Kyoto(国際学会)、2016

河上 敬介、理学療法的解剖学、公益社団法人日本基礎理学療法学会 第 2 回日本基礎理学療法学会学術集会日本基礎理学療法学会第 20 回学術大会合同学会(招待講演)、2015

河上 敬介、萎縮筋や損傷筋への力学刺激の与え方(肉眼解剖学、実験動物、培養細胞での腱鞘より)、平成 27 年度第 2 回大分県理学療法士連盟研修会(招待講演)、2015

柴田 篤志、森 友洋、縣 信秀、宮本 靖義、宮津 真寿美、馬路 祥子、河上 敬介、筋損傷からの回復を促進させる超音波刺激は MyoD, myogenin 量を亢進させる、公益社団法人日本理学療法士協会 第 50 回日本理学療法学会大会、2015

Itoh Yuta, Agata Nobuhide, Kimura Naoko, Inoue-Miyazu Masumi, Hirano Takayuki, Hayakawa Kimihide, Murakami Taro, Kawakami Keisuke, The effective intensity of exercise load for facilitating recovery from muscle atrophy in mice, The World Confederation for Physical Therapy Congress 2015: Singapore(国際学会)、2015

Yoshioka Kiyoshi, Adachi Yuka, Inoue-Miyazu Masumi, Agata Nobuhide, Sasai Nobuaki, Hayakawa Kimihide, Murakami Taro, Kawakami Keisuke, Muscle inactive state is necessary to remove damaged proteins accumulated by repeated muscle contraction, The World Confederation for Physical Therapy Congress 2015: Singapore(国際学会)、2015

〔図書〕(計 1 件)

曾我部 正博、河上 敬介 他、化学同人、メカノバイオロジー、2015、217-224

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.kmnu.matrix.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河上 敬介 (KAWAKAMI, Keisuke)
大分大学・福祉健康科学部・教授
研究者番号：60195047

(2) 研究分担者

曽我部 正博 (SOKABE, Masahiro)
名古屋大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号：10093428

(3) 連携研究者

村上 太郎 (MURAKAMI, Taro)
至学館大学・健康科学部・教授

研究者番号：10252305

(4) 研究協力者

()