

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34435

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21540

研究課題名(和文) 老化による廃用性筋萎縮の回復遅延に対する細胞外因子に着目した治療戦略の構築

研究課題名(英文) Therapeutic strategy focusing on extracellular factors on delayed recovery of disuse muscle atrophy by aging

研究代表者

金澤 佑治 (Kanazawa, Yuji)

大阪人間科学大学・人間科学部・講師

研究者番号：60620656

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)：本研究は、廃用性筋萎縮後の再荷重が老年ラットの筋線維と基底板を損傷させることを明らかにした。再荷重後、老年ラットでは基底板を構成するcollagen IVが異所性局在を示し、さらにネクローシスを呈している筋線維が増加した。これは老化が基底板修復を障害していることを示唆する。さらに再荷重後に若年ラットではcollagen IV関連因子の発現が上昇するが老年ラットではそうではなかった。以上より廃用性筋萎縮が生じた老年ラットの筋は脆弱化しており、基底板構築を担う線維芽細胞の活性が低下していることが示唆された。線維芽細胞の老化を防ぐことが筋の回復において重要な治療戦略になることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that, in the older rats, reloading after disuse atrophy, causes the damage of the muscle fibers and the basement membrane (BM) that structurally support the muscle fibers. After reloading, ectopic immunoreactivity of collagen IV, a major component of the BM, remained mostly associated with the necrotic appearance, suggesting that the older rats were impaired with the ability of repairing the damaged BM. Further, after reloading, the older rats did not show a significant alteration, although the young rats showed clear response of collagen IV related genes. Taken together, our findings suggest that the atrophic muscle fibers of the older rats induced by unloading were vulnerable to the weight loading, and that attenuated reactivity of the BM-synthesizing fibroblast to gravity contributes to the fragility of muscle fibers in the older rats. It is clear that prevention of senescence in fibroblast is an important therapeutic strategy for muscle recovery.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：骨格筋 老化 廃用性筋萎縮 線維芽細胞 後肢非荷重 再荷重 Collagen IV 基底板

1. 研究開始当初の背景

老年期に生じた廃用性筋萎縮の回復は遅延することが知られている (Hwee and Bodine, 2009; White et al., 2015)。これはリハビリテーションにおいて大きな課題となっている。回復遅延のメカニズムとしては加齢に伴う筋サテライト細胞の活性低下やタンパク合成能の低下が挙げられているが (Gallegly et al., 2004; Morris et al., 2004)、統一した見解はなく未解明な点が多く存在している。

骨格筋は筋線維を最小単位としている。そして細胞外マトリクスである基底板は筋線維を覆って保護することで、正常な筋機能を保持している (Sanes, 2003)。すなわち、加齢に伴い筋の回復が遅延するメカニズムの解明には筋線維のみならず細胞外マトリクスを含めた包括的な解析が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、老年期に生じた廃用性筋萎縮の回復が遅延するメカニズムを明らかにすることを目的に、筋線維のみならず細胞外マトリクスにも着目して解析を進めることにした。

3. 研究の方法

雄性 Wistar ラットの 3 か月齢を若年ラット、20 か月齢を老年ラットとした。ラットの尾部を懸垂して後肢を免荷することで抗重力筋のヒラメ筋に廃用性筋萎縮を引き起こし、その後、尾懸垂から解放して後肢に再荷重負荷を加えて萎縮筋の回復を促した。その過程において後肢免荷後 0 日 (Cont)、14 日 (HU14d)、再荷重後 1 日 (RE1d)、7 日 (RE7d) にヒラメ筋を採取し、形態学的観察と定量的 PCR にて遺伝子発現変動の解析を行った。

4. 研究成果

若年ラットでは免荷で減少した筋線維横断面積は再荷重後 7 日で有意に増加した。一方で老年ラットではそのような回復は観察されなかった (図 1)。このことから本研究においても老年期に生じた廃用性筋萎縮の回復は遅延することが再確認できた。さらに老年ラットでは回復期においてネクロシスを呈した筋線維 (図 2 矢印) や中心核細胞 (図 2 矢頭) が増加しており、筋損傷が生じていることがわかった。損傷した筋の微細構造を観察すると、損傷筋を取り囲む基底板が蛇行し、部分的に裂けている像が確認された (図 3)。一方、若年ラットではこれらの所見は観察されなかった。次に、基底板の主成分である collagen IV の局在を確認したところ、老年ラットの回復期には異所性な局在 (図 4 矢頭) を示して、細胞の輪郭が不明瞭な筋線維が増加した。一方、若年ラットではこれらの所見は観察されなかった。Collagen IV の異所性局在を示す筋線維の病理組織所見を確認したところ、高い確率でネクロシスを呈

していることが確認された (図 5)。基底板構築能を評価するために collagen IV の産生と分解に関連する遺伝子の発現を測定すると、若年ラットでは、再荷重によって collagen IV の産生に関連する遺伝子発現レベルが上昇した (図 6)。一方で、老年ラットではその発現が変動しなかった。また筋再生に関連する遺伝子発現レベルは、若年より老年ラットの回復期に上昇する傾向があった (図 7)。

老年ラットでは回復期に基底板が損傷し、さらに基底板構築に関連する遺伝子の発現が変動しないことから、老年期には基底板構築に必要な因子の不足によって、筋損傷が起こり回復の障害をまねくと考えられる。さらに、基底板の主成分は線維芽細胞によって産生されることから、萎縮筋の回復障害の主原因は従来の説である筋細胞の老化ではなく、“線維芽細胞の老化である”ことが示唆された。

本研究では、加齢に伴う基底板構築障害が、老年期に生じた廃用性筋萎縮の回復を遅延することを明らかにした。このことから加齢に伴う筋の回復障害に対する治療戦略には、線維芽細胞による基底板構築能をいかに活性化させるかが重要になることが示唆された。

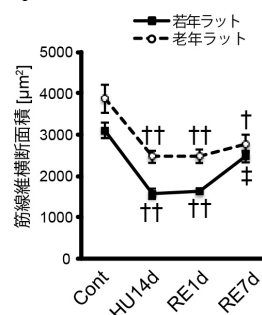


図 1. 筋線維横断面積の変化

†† < 0.001 vs. Cont; † < 0.05 vs. Cont; ‡ < 0.05 vs. HU14d.

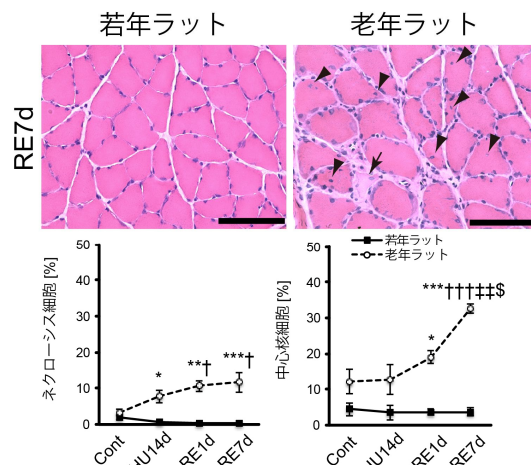


図 2. 病理組織所見

スケールバー; 100 μm. * < 0.05 vs. Young; ** < 0.001 vs. Young; *** < 0.0001 vs. Young; † < 0.05 vs. Cont; ††† < 0.0001 vs. Cont; ‡‡ < 0.0001 vs. HU14d; § < 0.01 vs. RE1d.

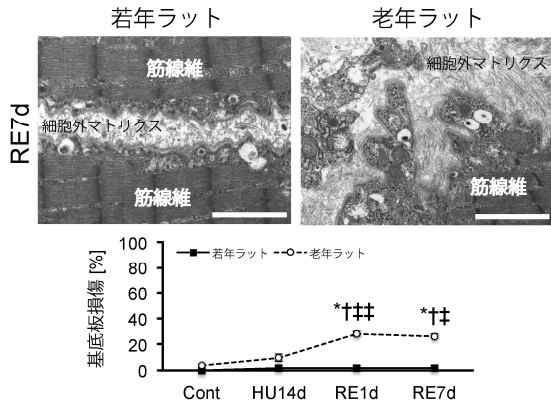


図 3. 透過型電子顕微鏡による分析
スケールバー; 2 μm . * < 0.0001 vs. Young;
† < 0.0001 vs. Cont; ‡ < 0.001 vs. HU14d.
‡ ‡ < 0.0001 vs. HU14d.

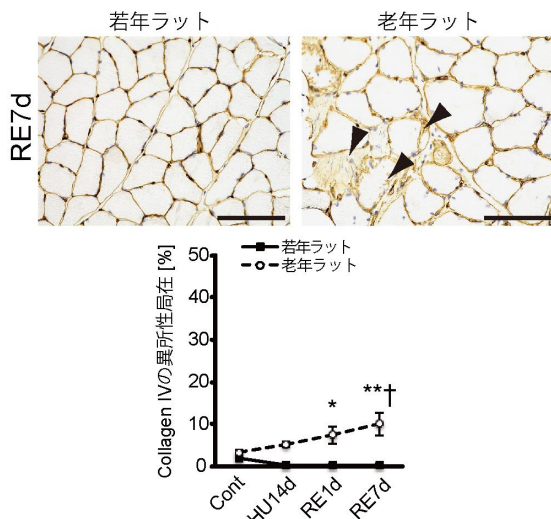


図 4. Collagen IV の局在
スケールバー; 100 μm . * < 0.05 vs. Young;
** < 0.001 vs. Young; † < 0.05 vs. Cont.

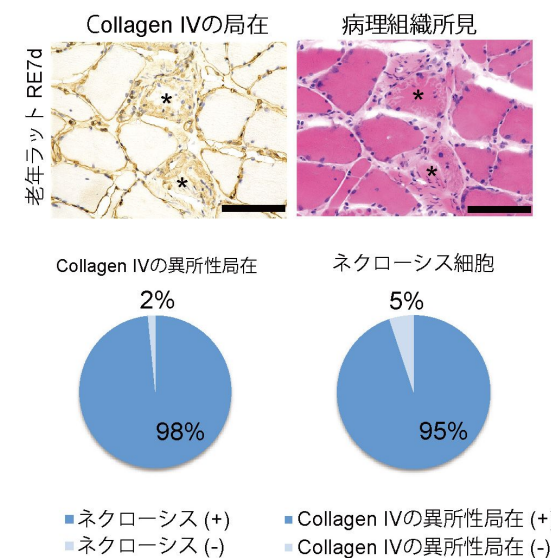


図 5. Collagen IV の異所性局在を示す筋線維における病理組織所見
スケールバー; 100 μm .

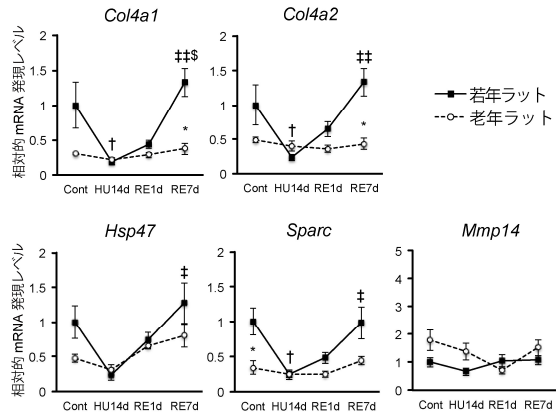


図 6. 基底板構築に関連する遺伝子の発現
* < 0.05 vs. Young; † < 0.05 vs. Cont; ‡ < 0.01 vs. HU14d; ‡ ‡ < 0.001 vs. HU14d;
\$ < 0.01 vs. RE1d.

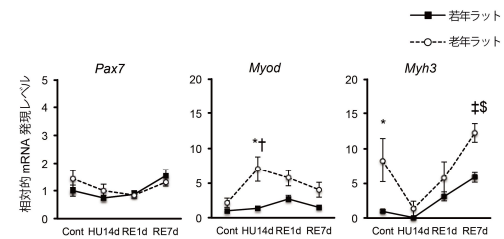


図 7. 筋再生に関連する遺伝子の発現
* < 0.05 vs. Young; † < 0.05 vs. Cont; ‡ < 0.001 vs. HU14d; \$ < 0.05 vs. RE1d.

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)

金澤佑治、杉生真一、武田功 骨格筋の老化指標となるバイオマーカーの探索. 大阪人間科学大学紀要. 2018;17:137-139. 査読有

Yuji Kanazawa, Keisuke Ikegami, Mitsugu Sujino, Satoshi Koinuma, Mamoru Nagano, Yuki Oi, Tomoya Onishi, Shinichi Sugiyo, Isao Takeda, Hiroshi Kaji, Yasufumi Shigeyoshi Effects of aging on basement membrane of the soleus muscle during recovery following disuse atrophy in rats. *Exp Gerontol*.2017;98:153-161. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.014>

金澤佑治、杉生真一、武田功 老化促進マウスの骨格筋に後肢非荷重と再荷重が与える影響. 大阪人間科学大学紀要. 2017;16:163-168. 査読有

金澤佑治、大井優紀、杉生真一、重吉康史、片岡幸雄、武田功 後肢非荷重後の再荷重がラットヒラメ筋毛細血管に与える筋線維タイプ特異的な影響. スポ

ー ツ 整 復 療 法 学 研 究 .
2016;17(3):171-176. 査読有
金澤佑治、大井優紀、杉生真一、武田功
老化促進マウスの運動機能と筋機能に
ついて . 宝塚医療大学紀要 .
2016;3:15-22. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池
上啓介、杉生真一、武田功、梶博史、重
吉康史 老化がラット骨格筋の基底膜
構築に与える影響 第 123 回日本解剖
学会総会・全国学術集会(東京)2018
年 3 月 30 日

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池
上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、
武田功、梶博史、重吉康史 廃用性筋萎
縮後の再荷重負荷が老年ラットのヒラ
メ筋と基底膜構造に与える影響 第 27
回日本病態生理学会大会(東京)2017
年 8 月 19 日

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池
上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、
武田功、梶博史、重吉康史 廃用性筋萎
縮後の再荷重負荷が老年ラットのヒラ
メ筋に与える影響 第 3 回日本筋学会
学術集会～シンポジウム 4:「サルコペ
ニア・ロコモティブ症候群のバイオロジ
ー」～(東京)2017 年 8 月 5 日

金澤佑治、杉生真一、武田功 老化が廃
用性筋萎縮とその後の回復過程に与え
る影響～老化促進マウスを用いた検討
～ 第 20 回総合理学療法研究会(大阪)
2017 年 6 月 24 日

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池
上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、
武田功、梶博史、重吉康史後肢非荷重と
再荷重が老化したヒラメ筋に与える影
響 第 122 回日本解剖学会総会・全国学
術集会(長崎)2017 年 3 月 29 日

金澤佑治 老化と骨格筋 第 14 回大阪

人間科学大学学術研究懇談会(大阪)
2016 年 12 月 1 日

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池
上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、
武田功、梶博史、重吉康史 後肢免荷と
再荷重が老化した骨格筋の細胞外マト
リクスに与える影響 第 92 回日本解剖
学会近畿支部学術集会(大阪)2016 年
11 月 27 日

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、池
上啓介、大井優紀、大西智也、杉生真一、
武田功、梶博史、重吉康史老年期にお
ける後肢免荷と再荷重が骨格筋に与え
る影響 第 2 回日本筋学会学術集会(東
京)2016 年 8 月 5 日

金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、大
井優紀、杉生真一、武田功、重吉康史 非
荷重と再荷重が老年期の骨格筋に与え
る影響 第 121 回日本解剖学会総会・全
国学術集会(福島)2016 年 3 月 30 日

金澤佑治、大井優紀、杉生真一、重吉康
史、片岡幸雄、武田功 ラットヒラメ筋
における後肢非荷重後の毛細血管退行
性変化に対する再荷重の効果 第 17 回
日本スポーツ整復療法学会(兵庫)2015
年 10 月 25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
金澤 佑治(KANAZAWA, Yuji)
大阪人間科学大学 講師
研究者番号: 60620656