

令和元年6月17日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12938

研究課題名(和文)力学刺激の減少に伴い起こる培養系筋萎縮は臨床の廃用性筋萎縮モデルになりうるか？

研究課題名(英文) Cessation of electrically-induced contractile activity induces atrophy in hypertrophied myotubes.

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：長期臥床やギブス固定などによる廃用性筋萎縮は、筋力低下を引き起こし、ADLやQOLを低下させる。しかし、廃用性筋萎縮のメカニズムやそれに対する効果的な理学療法は、不明な点が多い。これらの不明点を明らかにするためには、培養系の廃用性筋萎縮モデルが必要である。そこで、我々は、臨床を模擬し、運動の脱負荷による培養筋萎縮モデルを作製し、実験動物モデルと同様の現象が認められるかどうかを検証した。これに加えて本モデルが、高負荷トレーニングにおける過負荷時の回復のメカニズムを明らかにするためのモデルとして有効となる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱負荷による筋萎縮モデルが、ヒトや動物の廃用性筋萎縮時に起こる既知の蛋白質分解機構や合成機構の応答を備え持ち、臨床現象を反映した廃用性筋萎縮の培養細胞モデルになりうるかどうかを判明させた。本研究成果は、廃用性筋萎縮のメカニズムの解明に役立つとともに、正常筋とは比べ物にならないほど速い、筋肥大のメカニズムを明らかにさせる糸口となると考える。また、これらが判明したら、効果的な筋萎縮抑制方法や萎縮からの回復促進方法開発へと萌芽する。

研究成果の概要(英文)：To address precise mechanisms of disused-muscle atrophy, we challenged to replicate inactive-induced muscle atrophy in vitro. Myotubes were cultured under repeated muscle contraction evoked by ES for 2 days. After the contraction period, ES was stopped and myotubes were cultured under inactive state for another 2 days. When the ES was removed, the myotube diameter was  $16.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$ . In unload group, the myotube diameter was significantly decreased ( $13.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ). Several hours of unloaded state increased LC3-II protein levels (i.e., autophagic activity). Phosphorylation of Akt was decreased 1 hour after the cessation of ES. After 24 hours, the phosphorylation went back to the basal level. This cultured myotube model which shows atrophic responses induced by inactivity would help to reveal mechanism of inactive-induced muscle atrophy.

研究分野：理学療法

キーワード：理学療法 筋萎縮 培養細胞 機械刺激

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定などによる廃用性筋萎縮は、筋力低下を引き起こし、ADL や QOL を低下させる。よって、いまだ不明な点が多い廃用性筋萎縮のメカニズムを明らかにし、効果的な萎縮抑制や回復促進のための理学療法の方策を検討する必要がある。健常筋への筋肥大効果やそのメカニズムに関する報告は多く、アスリート育成等に臨床応用されている。しかし、廃用性筋萎縮の抑制や回復促進効果と、そのメカニズムに関する報告は少ない。我々は、尾部懸垂マウスに対するトレーニングが、萎縮からの回復を促進させることを明らかにした (Ito 2014)。この現象は、健常筋への肥大を目的としたトレーニングとは異なる大幅な新生筋線維核の増加と、それに伴う相当速い組織学的回復が認められ、正常筋とは異なるメカニズムを持つと考えた。

しかし、メカニズムの検証には、培養細胞による廃用性筋萎縮モデルによる実験が不可欠である。廃用性筋萎縮で、ユビキチン - プロテアソーム系の活性化による筋構成タンパクの分解が起こることはよく知られる。一般に培養細胞を用いた筋萎縮モデルは、このユビキチン - プロテアソーム系の中で下流に位置する MuRF1 の発現を高進させるデキソメタゾンを投薬して作製されるモデルしかない。しかし近年、飢餓状態で活性化することで知られるオートファジー系の蛋白質分解機構が、廃用性筋萎縮時にも活性化することが判明した。また、蛋白質合成機構が抑制されていることもよく知られている。よって、デキソメタゾンを投薬による筋萎縮モデルが、廃用性筋萎縮時における現象をとらえているとは言い難い。

### 2. 研究の目的

そこで臨床を模擬し、運動の脱負荷による培養筋萎縮モデルを確立させる。そして本モデルが、ヒトや動物で起こる廃用性筋萎縮と同様の細胞内応答が起こるかどうか、異なる点はどこかを調べることにより、廃用性筋萎縮モデルになりうるかどうかを以下の順に解明することを目的とする。

(1) 電気刺激と伸長刺激を用いて活動負荷状態で培養した細胞の脱負荷による萎縮の形態学的検証を行う。具体的には、モデルとして適切な刺激時間・強度・頻度、刺激中止時間を明らかにする。

(2) 筋萎縮モデルの検証：ユビキチン - プロテアソーム系とオートファジー系との両蛋白質分解機構や合成機構が、本筋萎縮モデルで活性化しているかどうか、またそれが必須かどうかを明らかにする。

(3) 筋萎縮からの回復現象と分子機構の検証：筋萎縮モデルに再負荷を行い、形態学的回復の検証と、それに関わる蛋白質分解機構の不活性化や、合成機構の活性化の有無を検証する。

### 3. 研究の方法

実験に適切な培養細胞による筋萎縮モデルの確立：筋培養細胞に活動負荷を与えた状態で培養した後、脱負荷状態に切り替えて培養し萎縮の形態学的検証を行う。具体的には、モデルとして適切な活動負荷時間・強度・頻度、脱負荷時間を検討した。

活動負荷の種類：活動負荷を与えるための刺激の種類は、近い将来の研究の波及性を見据えて、電気刺激とした。

#### (1) 電気刺激を用いた筋萎縮モデルの確立

・ディッシュに形成した筋管細胞に対して、電気刺激 (SEN-3401; 日本光電, C-Dish; プライムテック) による周期的な筋収縮を生じさせた状態で 2 日間培養した。その後電気刺激による筋収縮を 2 日間中断させた。

・実験終了後、免疫蛍光染色を施し、筋管細胞の横径を測定した。

・最も適切な刺激時間・強度・頻度、刺激中止時間を検討した。

(2) 筋萎縮モデルの検証：ユビキチン - プロテアソーム系とオートファジー系との両蛋白質分解機構や合成機構が、本筋萎縮モデルで活性化しているかどうかを検証した。

#### ユビキチン - プロテアソーム系の蛋白質分解機構の検証

・培養開始 5 日目から刺激を 2 日間与えた後刺激を止め、経時的に筋管細胞の組織サンプルと筋蛋白質サンプルを採取した。

・ユビキチンリガーゼ E 1 阻害剤 (UBE1-41: BIOGENOVA) を培地に添加して、本モデルの筋管細胞の横径の減少と抑制の有無を検証した。

・プロテアソーム阻害剤を培地に添加して、プロテアソームで認識される K48 ポリユビキチン鎖によって修飾されたタンパク質の増加を検証した。

・廃用性筋萎縮時にユビキチン - プロテアソーム系により分解されるといわれる、IRS-1 などの筋肥大シグナルに関わるタンパク質が、電気刺激を中断した本モデルにおいてもユビキチンによって修飾されているか (すなわち実際の廃用性筋萎縮と同じメカニズムで筋の横径が減少しているか) を、共免疫沈降法により確認した。

#### オートファジー系の蛋白質分解機構の検証

・オートファジー系の活性の確認：培養開始 5 日目から刺激を 2 日間与えた後刺激を止め、経時的に筋管細胞の組織サンプルと筋蛋白質サンプルを採取した。筋管細胞の組織サンプルを電子顕微鏡で撮影し、オートファゴソーム及びオートリソソーム像を確認した。筋蛋白質サンプルではオートファジーに重要な分子である LC3 の活性をウエスタンブロット法により確認

する。オートファジーの活性は、LC3II / LC3I の値で評価した。

・オートファジー系が必須かどうかの確認：培養開始 5 日目から電気刺激を 2 日間与えた後電気刺激を止め、オートファゴソーム形成を阻害する 3-Methyladenine、オートファジープロセスの後期を阻害する Bafilomycin A1、リソソームを阻害する E64d・pepstatin A などの阻害剤を添加した培地で培養する。培養開始から 9 日間培養した細胞に免疫蛍光染色を施し、筋管細胞の横径を測定した。本モデルでの筋管細胞の横径減少に、オートファジー系分解機構が必須であるかどうか確認した。

蛋白質合成機構の活性化の検証

・蛋白質合成機構については、PI3K/ Akt/ mTOR 経路、mTOR/ p70S6K 経路、MAPK/MEK/ERK 経路などに関わる分子の活性をウエスタンブロット法により確認した。

#### 4. 研究成果

我々の作製している筋萎縮モデルが、臨床における廃用性の筋萎縮モデルとして適切かどうかを検証した。筋培養細胞に活動負荷を与えた状態で培養した後、脱負荷状態に切り替えて培養し形態学的検証を行う検証を実施した。その結果、活動状態から脱負荷状態に切り替えた後数日で筋幹細胞横径が減少するモデルがほぼ完成した。この時の生化学的検証において、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系との両蛋白質分解機構の活性化や合成機構の不活性化を示唆する結果も得られた。しかし、我々がコントロールとして用いた負荷運動モデルにおいて、活動負荷を持続的に与えたときの筋横径の増加や維持が起こっている期間に、タンパク質の合成機構に加えてタンパク質の分解に関わる応答が高進することも判明した。また、これに加えて、本負荷運動モデルでは、運動負荷を行わず通常培養の筋管細胞や、動物の正常モデルには見られない構造物が多数観察されることが、電子顕微鏡による観察に置いて判明した。これらの構造は、おそらくオートファゴソーム及びオートリソソーム像ではないかと推察している。

そこで、動物の正常モデルと同じような筋の日常活動を模擬していると考えられるモデルを作製するために、活動負荷時間・強度・頻度、脱負荷時間と萎縮や肥大との関係を検討した。その結果、前述したパラメータの中で、特に活動負荷時間や強度を下げることにより、目的に合った条件がおおむね作れるようになることが示唆された。特に刺激強度に関する条件の調節や運動負荷を行う時間と運動負荷を行わない時間との調整が重要であることが判明した。

一方、電子顕微鏡で動物の正常モデルには見られない構造物が多数観察される強度の筋収縮活動を行わせ、それをやめた直後から数時間の収縮停止期間には、タンパク質の分解と同時に筋構成蛋白質の合成を促進させる機構が活性化することが判明した。このことから、本モデルが、高負荷トレーニングにおける過負荷時の回復のメカニズムを明らかにするためのモデルとして、さらには高強度トレーニング後の効果的休息期間の検証や、その休息が及ぼす役割を新たに明らかにする必要があり、そのモデルとしても有効となる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Mori T., Agata N., Itoh Y., Inoue-Miyazu M., Mizumura K., Sokabe M., Taguchi T., Kawakami K.、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、1 - 10

DOI: 10.1007/s12576-017-0553-9

Itoh Y., Murakami T., Mori T., Agata N., Kimura N., Inoue-Miyazu M., Hayakawa K., Hirano T., Sokabe M., Kawakami K.、Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy、Muscle & Nerve、査読有、55巻、2017、243 - 253

DOI: 10.1002/mus.25218

河上敬介、宮津真寿美、メカノバイオ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、257巻10号、2016、1079 - 1084

〔学会発表〕(計 15 件)

紀瑞成、川島隆史、河上敬介、Comparison of lymphatic indexes in melanoma mouse models、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019

川島隆史、紀瑞成、縣信秀、伊東佑太、笹井宣昌、濱田文彦、河上敬介、廃用性筋萎縮時のマウスヒラメ筋内リンパ管の分布変化について、第 43 回日本リンパ学会総会、2019

清島大資、縣信秀、小林剛、宮津真寿美、河上敬介、培養筋管に対する超音波刺激の肥大効果 - 刺激前の分化培地培養期間の違いによる筋肥大効果の違い、第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会、2018

縣信秀、清島大資、小林剛、宮津真寿美、河上敬介、超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果 超音波刺激条件による効果の違い、第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会、2018

川島隆史、紀瑞成、縣信秀、伊東佑太、笹井宣昌、濱田文彦、河上敬介、廃用性筋萎縮に伴い骨格筋内リンパ管数は減少する、第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会、2018

伊東佑太、田村悠磨、野村篤、河上敬介、廃用性筋萎縮からの回復を促進させる筋力トレーニングの頻度 -1 日 1 回のトレーニングを 2 回に分けて実施すると効果は変わるか?、第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会、2018

河上敬介、筋・筋膜やその周辺の構造を知る - 運動器疾患の評価や治療のために - 、一般社団法人日本超音波骨軟組織学会第 45 回超音波ハンズオンセミナー初級編、2018

河上敬介、The Training about Functional Anatomy, Practicing and Therapy、HOCHIMINH CITY ORTHOPAEDIC REHABILITATION CENTRE、2018

河上敬介、筋膜の構造を知る ~ 筋治療のエビデンス構築の為に ~ 、一般社団法人口コモペイングループ 2 周年記念セミナー、2018

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、第 52 回日本理学療法学会学術大会、2017

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、第 52 回日本理学療法学会学術大会、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 - 、第 52 回日本理学療法学会学術大会、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、2016

縣信秀、宮津真寿美、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、第 51 回日本理学療法学会学術大会、2016

伊東佑太、鈴木惇也、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、第 51 回日本理学療法学会学術大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：笹井 宣昌

ローマ字氏名 : ( SASAI, nobuaki )

所属研究機関名 : 鈴鹿医療科学大学

部局名 : 保健衛生学部

職名 : 准教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 20454762

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 川島 隆史

ローマ字氏名 : ( KAWASHIMA, takafumi )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。