

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：34435

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17776

研究課題名（和文）線維芽細胞による基底膜構築に着目した骨格筋の老化に対するリハビリテーションの開発

研究課題名（英文）Development of rehabilitation for skeletal muscle aging focusing on basement membrane construction by fibroblasts

研究代表者

金澤 佑治（Kanazawa, Yuji）

大阪人間科学大学・保健医療学部・講師

研究者番号：60620656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、基底膜の再構築には筋内線維芽細胞が重要な役割を担っていること、老化は筋回復時のみならず定常状態から基底膜関連因子を低下させること、持久運動が老化による基底膜構築能を賦活することが明らかとなった。以上のことから、老化した骨格筋においても運動介入によって線維芽細胞によるコラーゲンの産生を促し、基底膜構築能を改善する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、老化した骨格筋においても運動介入によって線維芽細胞によるコラーゲンの産生を促し、基底膜構築能を改善する可能性が示された。運動介入は、筋の脆弱化を引き起こす病態に対する予防的措置に応用できる可能性があると考えられる。したがって、本研究成果は、老化に伴う身体機能の低下に対する治療開発に寄与するものとする。

研究成果の概要（英文）：In the present study, it was found that (1) intramuscular fibroblasts play an important role in the reconstruction of the basement membrane, (2) aging decreases basement membrane related factors not only during muscle recovery but also from the steady state, and (3) endurance exercise activates basement membrane related factors in aging. These results suggest that exercise intervention may stimulate the production of collagen IV by fibroblasts and improve the basement membrane construction ability in aged skeletal muscle.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：老化 骨格筋 基底膜 線維芽細胞 コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は可塑性に富む組織であり、筋萎縮や筋損傷が生じても再生する能力を有している。残念ながら、老化は骨格筋の再生能を低下させ、筋萎縮や筋損傷からの回復を障害する。そのため高齢者における骨格筋の回復は難渋し、思うようにリハビリテーションが進行しないことが多い。老化による筋の回復障害は、従来の仮説では筋再生に必須な筋サテライト細胞の機能低下 (Hawke TJ et al., 2001, Machida S et al., 2004) や筋タンパク合成能の低下 (Morris RT et al., 2004, Hwee DT and Bodine SC. 2009) が起因していると考えられてきた。しかしながら、近年、筋サテライト細胞数を薬剤で減少させても、萎縮筋の回復は遅延せず (Jackson JR et al., 2012) さらに老化した筋タンパク合成能は若年のものと変わらないレベルであるとの報告もある (Baehr LM et al., 2016)。このように老化による筋の回復障害におけるメカニズムは統一した見解がなく未解明な点が多く存在している。

上述した学術的な背景の中、申請者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老化ラットの筋萎縮モデルを用いて検証した。その結果、筋の回復を困難にしている主な原因は筋細胞そのものの再生能力の低下ではなく、コラーゲンを産み出す線維芽細胞の機能低下が主な原因であることを見出した (Kanazawa Y et al., 2017)。線維芽細胞は全身に存在して、コラーゲンを分泌し、筋の回復過程では筋線維の外枠で筋線維を支える基底板を築く重要な役割を果たす。しかし老化ラットでは、筋線維の再増殖を示す因子が若年ラットと同様の反応を示した一方で、線維芽細胞がコラーゲンを産生する因子の反応が若年ラットと比較して低下していることが明らかとなった。このことは、高齢者は線維芽細胞の機能低下によって、筋線維の回復時に基底板に障害が生じ、筋は脆弱化して回復障害に陥ることを示唆している。筋線維よりも筋線維を取り囲む基底板に老化の原因があるという仮説は、これまでの骨格筋研究においても新しい着眼点である。そして本研究では老化した骨格筋において基底板を再構築する線維芽細胞の働きを如何にして呼び覚ますか？という学術的な問いを解明することで、最終的には老化に伴い脆弱化した筋の回復障害を克服するリハビリテーションを開発したいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、老化により脆弱化した骨格筋の回復障害を解決するリハビリテーション的治療を開発することを最終的な目標とした。そのため、基底板構築における線維芽細胞の関与、老化が基底板構築に与える影響、老化筋の基底板における持久運動の効果、という3つのことを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 基底板構築における線維芽細胞の関与

基底板の修復における線維芽細胞の関与や形態学的な詳細を明らかにするため、若年の Wistar ラットに対して運動に伴う筋損傷を惹起して、その回復過程を経時的に追跡した。基底板の主成分となるコラーゲンと筋内結合組織における線維芽細胞に高発現する Transcriptional factor 4 (TCF4) に着目して、分子生物学的かつ形態学的に回復過程を調査した。

### 老化が基底板構築に与える影響

老化した骨格筋における基底板構築能がどのように障害されているかを明らかにするため、老年の Wistar ラットと若年の Wistar ラットを用いて分子生物学的に比較した。

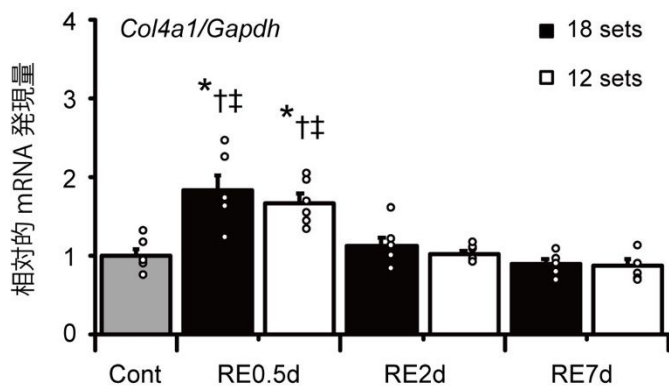
### 基底板構築を促す介入の検討

最後に、老化筋におけるコラーゲン産生を促す介入を模索して明らかとするため、老年の Wistar ラットに対して継続的な持久運動を処方して、その効果を分子生物学的に調査した。

## 4. 研究成果

### 基底板構築における線維芽細胞の関与

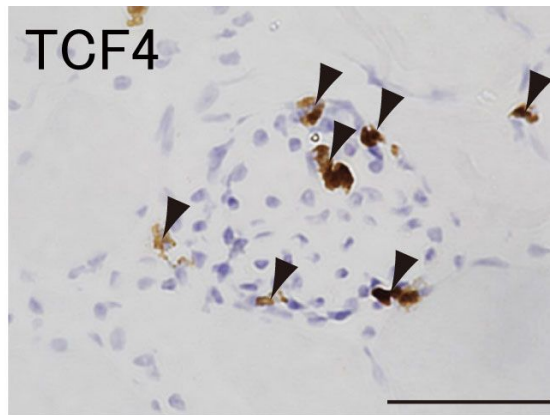
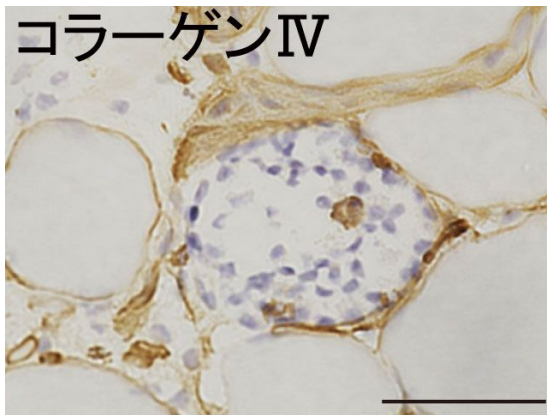
高強度運動負荷によってヒラメ筋の基底板や筋線維が損傷し、損傷後 1 週間には筋構造が回復してくることを確認した。筋損傷後の回復過程においてコラーゲンの mRNA 発現量を測定したところ、損傷後 12 時間後に定常状態よりも有意に増加し、筋構造が回復する損傷後 1 週間にはその発現量も定常レベルに戻った (図 1)。さらに TCF4 陽性細胞は基底板が損傷した筋線維付近に高発現し、筋構造の回復とともに発現数が定常レベルに戻ることを形態学的に確認した (図 2)。これらのことから、TCF4 陽性細胞は基底板再構築に寄与することが示唆された。



**図 1 筋損傷後のヒラメ筋におけるコラーゲンの mRNA 発現の変動**

12 または 18 セットの高強度運動負荷で損傷したヒラメ筋では、いずれも 12 時間後にコラーゲンの遺伝子発現が定常状態よりも高まり、7 日後には定常レベルに戻った。

\*<0.001 vs. Cont; †<0.01 vs. RE2d; ‡<0.0001 vs. RE7d



**図 2 筋回復期間における TCF4 の局在**

高強度運動負荷による筋損傷後 12 時間後のヒラメ筋の横断像である。コラーゲンの免疫染色により、損傷筋の基底膜構造が破綻していることが確認された。さらに、TCF4 陽性細胞 (矢頭) は、基底膜が損傷した筋線維付近に高発現し、筋構造の回復とともに発現数が定常レベルに戻ることを形態学的に確認した。スケールバーは 50  $\mu$ m である。

#### 老化が基底膜構築に与える影響

老化ラットと若年ラットの足底筋における基底膜関連因子の遺伝子発現を測定して比較した。基底膜は、コラーゲンの合成と分解のバランスで保持されていることから、合成系と分解系の両方の遺伝子発現量を測定した。その結果、合成系と分解系の両方において、老化ラットの遺伝子発現量は若年に比べて有意に低下していた。我々の先行研究 (Kanazawa et al., 2017) では、コラーゲンの合成が必要となる筋回復期において、その合成が加齢によって障害されていることを明らかにしているが、今回の研究によって、基底膜関連因子の遺伝子発現は、筋回復期のみならず定常状態から加齢によって低下していることが明らかとなった。

#### 基底膜構築を促す介入の検討

老年ラットに対して 10 週間の継続的な持久運動を処方した。用いた運動負荷が筋損傷を引き起こさない負荷であることを事前に確認した。基底膜関連因子の発現量を分子生物学的に比較した結果、運動習慣のある老年ラットにおける基底膜関連因子の発現量は、運動習慣のない老年ラットに比べて有意に増加した。このことは、老化した筋においても持久運動によって基底膜関連因子の合成を促すことができることを示唆している。

3 つの研究により、基底膜の再構築には筋内線維芽細胞が重要な役割を担っていること、老化は筋回復時のみならず定常状態から基底膜関連因子を低下させること、持久運動が老化による基底膜構築能を賦活することが示唆された。以上のことから、老化した骨格筋においても運動介入によって線維芽細胞によるコラーゲンの産生を促し、基底膜構築能を改善する可能性が示された。本研究の制限として、持久運動によって促された基底膜関連因子の発現が、筋機能や筋の頑健性に与える影響は調べられていないことが挙げられる。また、運動介入以外の効果的な介入方法についても更なる模索が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuji Kanazawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Shinichi Sugiyoshi, Yasufumi Shigeyoshi	4. 巻 Accept
2. 論文標題 Effects of aging on basement membrane-related gene expression of the skeletal muscle in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuji Kanazawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Mitsugu Sujino, Yoichi Minami, Shinichi Sugiyoshi, Isao Takeda, Yasufumi Shigeyoshi	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Basement membrane recovery process in rat soleus muscle after exercise-induced muscle injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03008207.2020.1791839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金澤佑治, 長野護, 鯉沼聡, 筋野貢, 南陽一, 杉生真一, 武田功, 重吉康史
2. 発表標題 筋損傷後の基底板再構築における加齢の影響
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金澤佑治, 杉生真一, 武田功
2. 発表標題 筋損傷後の回復過程における基底板構築反応と線維芽細胞の発現
3. 学会等名 第108回理学療法科学学会 学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金澤 佑治、杉生 真一、武田 功
2. 発表標題 筋損傷が骨格筋内の線維芽細胞による基底板構築反応に与える影響
3. 学会等名 第24回総合理学療法研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 佑治、鯉沼 聡、長野 護、筋野 貢、南 陽一、杉生 真一、武田 功、重吉 康史
2. 発表標題 筋損傷後に生じる骨格筋内の線維芽細胞による基底板構築
3. 学会等名 第5回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Kanazawa, Shinichi Sugiyo, Isao Takeda
2. 発表標題 Basement membrane construction by fibroblasts in skeletal muscle during recovery after muscle injury
3. 学会等名 Asian Confederation of Orthopaedic Manipulative Physical Therapy Congress 2019 (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 佑治、鯉沼 聡、長野 護、筋野 貢、南 陽一、杉生 真一、武田 功、重吉 康史
2. 発表標題 筋損傷後の基底板構築過程における線維芽細胞の発現時期と局在
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会 専門理学療法士(基礎)必須発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤佑治、長野護、鯉沼聡、筋野貢、南陽一、杉生真一、武田功、重吉康史
2. 発表標題 筋損傷後の基底板再構築過程におけるTCF4(+)線維芽細胞の発現時期と局在
3. 学会等名 第125回日解剖学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井 光一、里 尚己、白津 瑠菜、串田 楓理、金澤 佑治、武田 功
2. 発表標題 トレッドミル運動が骨格筋基底板に与える影響
3. 学会等名 第22回総合理学療法研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤 佑治、杉生 真一、武田 功
2. 発表標題 廃用性筋萎縮の回復過程において老化が筋の基底板構築に与える影響
3. 学会等名 第22回総合理学療法研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤佑治、筋野貢、鯉沼聡、長野護、梶博史、重吉康史
2. 発表標題 ラット骨格筋における加齢性の基底板構築障害
3. 学会等名 第4回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤佑治、鯉沼聡、長野護、筋野貢、南陽一、杉生真一、武田功、重吉康史
2. 発表標題 老化が筋損傷後の線維芽細胞による基底板再構築に与える影響
3. 学会等名 第124回日解剖学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 武田 功（監修）、弓岡 光徳、廣瀬 浩昭（編著）、金澤 佑治、弓岡 光也、赤松 泰典、甲斐 義浩、村田 伸、玉田 良樹、山川 友康、弓岡 まみ、奥村 裕、山野 薫、溝田 勝彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出	5. 総ページ数 328
3. 書名 基礎学習を臨床へつなげるPT・OTのための臨床運動学ワークブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------