

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700525

研究課題名 (和文)

骨格筋収縮時の内圧上昇に対する骨格筋細胞応答とその分子機構の解析

研究課題名 (英文)

Cellular and molecular responses to elevated pressure stimulus in skeletal myocytes

研究代表者

森田 憲輝 (Morita Noriteru)

北海道教育大学・教育学部・准教授

研究者番号： 10382540

研究成果の概要 (和文) : 骨格筋細胞の分化は筋収縮に伴う種々の刺激でどのような影響を受けるのかは理解が進んでいない。本研究では筋収縮に伴う刺激の一つ圧力が筋細胞の分化過程に及ぼす影響を検討した。分化初期から中期の骨格筋細胞に対して圧力刺激を加えたところ、初期の分化反応である筋細胞の融合現象が抑制され、さらに細胞内の分化誘導タンパク質 myogenin や収縮に必要なタンパク質 myosin 重鎖も減少していた。これらから筋収縮に伴う圧力上昇は筋細胞の分化を抑制する可能性があることが示された。

研究成果の概要 (英文) : It is not yet clear that how mechanical stimuli during muscle contraction, such as stretch and pressure stresses, affect skeletal myocyte differentiation. The purpose of this study was to examine the effects of pure pressure stimulus on muscle differentiation in differentiating myoblasts. Atmospheric pressure at 160 mmHg, which is equivalent to calf muscle intramuscular pressure during locomotion, was applied to early phase of L6 myoblast differentiation. Compared to controls kept under normal pressure, the number of fused myoblasts reduced after pressurization. Myogenin and myosin heavy chain proteins in the pressurized cells were lowered. These results suggest that elevated intramuscular pressure may suppress myogenic differentiation from myoblasts to myotubes in contracted skeletal muscles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：運動生理生化学, 健康科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ 応用健康科学

キーワード：メカニカルストレス, 筋細胞, myogenesis, 圧力

1. 研究開始当初の背景

物理的刺激的のひとつである圧力刺激が骨

格筋筋芽細胞の好氣的代謝を活性化するという知見を研究代表者らのグループが 2004

年に公表していた (Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004)。この圧力刺激は骨格筋収縮にともなって収縮筋内部で上昇する内圧を想定したものであり、同論文では神経系の刺激および筋細胞の変形という干渉因子を除いた収縮骨格筋の内圧上昇による作用を in vitro 実験系で再現した応答であった。その同時期に他の研究グループ (Ishihara A., et al., Neurosci Res, 2005) も 1 日 6 時間高圧高酸素環境に暴露したラットの骨格筋酸化系酵素活性が亢進したことを報告していた。これらの知見は筋組織への圧力負荷が、骨格筋代謝能を活性化したことを示すものだが、我々の研究グループと Ishihara A., et al. (Neurosci Res, 2005) の研究以外には圧力の影響について検討した研究報告は見当たらず、圧力刺激による代謝活性化が如何なる細胞応答 (細胞周期の変化, 分化など) を惹起するのか、そしてその意義や機序は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでに研究代表者が行ってきた研究に基づく骨格筋細胞への圧力刺激によって惹起されることが推測される以下の骨格筋細胞の反応を、遺伝子および蛋白質発現解析から検証することである：

仮説①筋芽細胞や筋衛星細胞という未成熟な細胞への圧力刺激は筋細胞への成熟 (分化) を促進する。

仮説②筋管細胞に対する圧力刺激は細胞のエネルギー代謝機能を亢進する。

また、副次的な目的としては、圧力刺激による細胞応答に関するメカニズムの解明、とくに圧力という物理的的刺激を知覚し化学的な情報へと変換する細胞機構について探索的に検討することであった。

3. 研究の方法

(1) 細胞および圧力負荷：骨格筋細胞は、培養骨格筋筋芽細胞の樹立株である L6 細胞を用いた。L6 筋芽細胞は増殖用培地である 10% ウシ胎児血清入り DMEM で 1 週間ほど継代培養し、その後 2% ウマ血清入り DMEM に培地交換することで筋管細胞への分化誘導を行った。分化誘導 2 日目から 4 日目まで 1 日につき 3 時間、160 mmHg の定常圧力を細胞に負荷した。圧力負荷装置は独自に開発したもので、空気圧によって圧力が負荷されるため細胞の変形を生じさせない特性を有している。したがって、他の機械的刺激であるシエアストレス (せん断) やストレッチストレス (伸展刺激) は介在していない。

(2) 分析手法：細胞内のタンパク質発現解析には、Immunoblotting 法を用いた。遺伝子発現解析には real-time RT-PCR 法および RT²Profiler (SABioscience 社) による RT-PCR

分析を用いた。細胞分化度の評価には、ギムザ染色および光学顕微鏡による形態評価によって行った。細胞外へ放出したタンパク質の分析には、ELISA 法 (R&D 社) を用いて定量的に分析した。

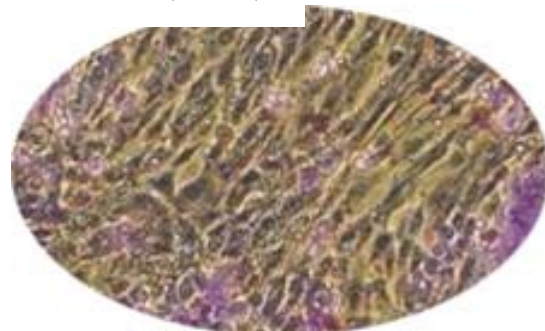
4. 研究成果

(1) 研究の主な成果：

① 仮説①に関する研究結果

細胞形態：分化誘導 3 日目の時点でのギムザ染色による圧力負荷を実施した細胞と処置しなかった細胞の形態評価の典型例について図 1 に示した。圧力負荷を実施しない細胞 (図 1A) では、3 日目にすでに細胞融合が生じて細長い線維状の形態を示していることが見てとれる。一方、圧力負荷を実施した細胞 (図 1B) では、融合が進んでおらず、個々の細胞が独立している状態のままであることが見てとれる。この観察から、圧力刺激が細胞融合を阻害した、つまり分化を抑制したということが考えられた。

A: 圧なし (3 日目)



B: 圧力負荷 (3 日目)

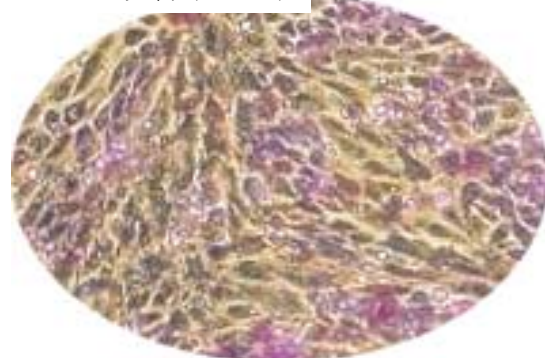


図 1. 分化誘導 3 日目のギムザ染色像. A, 分化誘導のみの細胞; B, 分化誘導および圧力負荷を実施した細胞

細胞内タンパク質および遺伝子発現：骨格筋分化の促進因子の一つである myogenin のタンパク質発現および遺伝子発現を測定した。その結果、圧力刺激 1 日目および 3 日目

で myogenin タンパク質発現が約 40~60%ほど減少していたこと (図 2 参照), また myogenin 遺伝子発現についても 1 日目および 2 日目にそれぞれ 30~40%ほど減少していた。

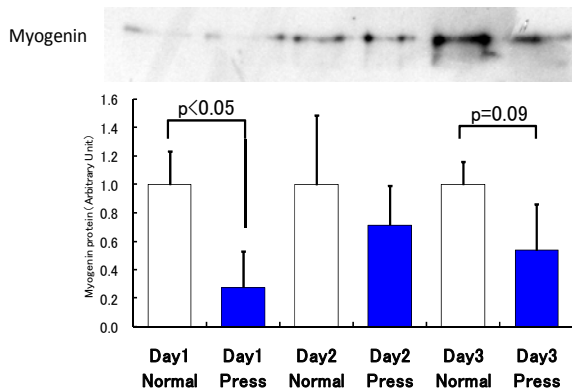


図 2. Myogenin タンパク質の発現量の比較。

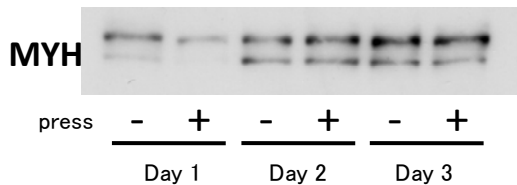


図 3. ミオシン重鎖タンパク質の発現。

他の筋細胞の制御因子である IGF-1 および myostatin 遺伝子についても検討したが、いずれの遺伝子も 1 日目および 2 日目に減少が観察された。

骨格筋分化指標の一つである myosin 重鎖タンパク質発現についても、圧力負荷により減少する傾向が観察された (図 3 参照)。

まとめ：これらの結果から、本研究課題で提示した仮説①については棄却することが妥当であり、仮説①とは逆に圧力刺激が骨格筋細胞分化を抑制する可能性が強いと結論づけるのが適切と考えられる。しかしながら、以前の研究結果である圧力刺激によって細胞の代謝活性が亢進していることを考慮すると、分化進展ではないもうひとつの細胞の成長反応である細胞増殖が促進していることが推測された。この新たに導かれた仮説を裏付けるデータとして、細胞タンパク質の総量が圧力刺激の有無によって変化していないことを観察している。つまり、ある種のタンパク質合成が促進されているものの分化応答が阻害されている状態にあるということまでが現状より想定されている。

②仮説②に関する研究結果

網羅的遺伝子発現解析：RT²Profiler

(SABioscience 社) を用いて定量的かつ網羅的に遺伝子発現解析を実施した。対象とした遺伝子は、代謝や免疫、細胞増殖などに関連する 84 遺伝子についてであり、 β -actin に対する標的遺伝子の量を相対的に検討した。その結果、免疫および炎症応答関連因子である CTLA4, CD28, HMOX1 などに有意な応答がみられた。代謝関連の遺伝子発現には変化は見られなかった。代謝関連タンパク質発現解析についても遺伝子発現解析と同じく顕著な変化は観察されなかった。

まとめ：これらの結果から、仮説②についてもそれを支持する有力な結果を得るには至らなかったことから、細胞の代謝活性化は起こるものの細胞の代謝機能の亢進までは起こっていないものと考えられた。

③圧力刺激による細胞応答のメカニズム解析

細胞内情報伝達タンパク質の応答：細胞内情報伝達経路のひとつである MAPK カスケードについて検討した。MAPK カスケードの ERK, JNK, p38MAPK のうち p38MAPK が分化促進反応と関連しており、一方 ERK が増殖促進というもう一つの細胞成長応答に関与していることが報告されている。分化誘導中の筋芽細胞への圧力刺激により、ERK および JNK のリン酸化の増加、つまりそれらの細胞内情報伝達経路の活性化が観察された。しかしながら、p38MAPK には圧力刺激の影響はみられなかった。これらの結果は上記の myogenin やギムザ染色による分化抑制に合致する結果であった。

Autocrine/paracrine による影響 (細胞外への制御因子放出による影響)：圧力刺激の骨格筋細胞に及ぼす影響についてはほとんど検討されていないものの、ストレッチストレス (伸展刺激) の筋細胞への作用については多くの検討がなされている。それらの検討によると、ストレッチストレスによる筋細胞の応答には、IGF-1 やストレッチ刺激受容チャネル (Stretch-activated channel) の関与があり、そしてその下流に位置する細胞内情報伝達タンパク質の活性化が筋肥大や細胞応答に関与することが提示されている (Tidball JG, J Appl Physiol, 2005)。そこで本研究課題においても、Tidball が提示した autocrine/paracrine 機構のように筋細胞自体が IGF-1 や TNF α , IL-6 を生成し作用させることで圧力刺激による細胞応答が生じているのかどうかについて検討した。その結果、IGF-1, TNF- α , IL-6 タンパク質の細胞外放出量について ELISA 法によって測定したが、圧力刺激の有無によるそれらのタンパク質量に有意な変化は認められなかった。つまり、これらの筋細胞制御因子が圧力刺激による細胞応答に関与している可能性は低いものと考えられた。

まとめ：圧力刺激による骨格筋細胞応答を誘発する作用機構に関する検討において、細胞内の情報伝達経路の探索、そして細胞外への自己および周辺細胞への制御因子放出 (autocrine/paracrine) の影響から解析を進めた。しかしながら、両者をつなぐ経路については明確にはならなかった。このことから、ストレッチストレス (伸展刺激) とは異なった制御機構によって圧力刺激が細胞に受容されている可能性、細胞内情報伝達の中途の経路においては既存のものを經由して細胞応答が発現している可能性があることまでは推定された。しかし、具体的な圧力刺激の受容メカニズムや圧力刺激センサーについては今後の解明すべき研究課題として残された。

(2) 国内外における位置づけとインパクト：

骨格筋細胞に対する機械的刺激の影響については、国内だけでなく国外においても注目されている。その理由としては、筋細胞への刺激として化学的な刺激 (代謝的な刺激) があるが、生理的条件に近づくほど、化学的な刺激だけでは細胞応答メカニズムの説明が困難になっているためである。さらに、高齢者や虚弱者の骨格筋に対する治療法の開発という観点からや宇宙などでの微小重力環境での身体機能の低下予防策としても、薬物療法に頼らない方策の開発という観点から注目されるテーマとなっている。

このような現状で、骨格筋という伸展そして収縮を繰り返す組織特性や実験系の確立の容易さからストレッチストレス (伸展刺激) の作用に関する研究が多く行われており、一方で圧力刺激に関する研究を実施しているのは我々のグループを含め数グループといった現状である。つまり、本研究課題の結果から導かれた圧力刺激の骨格筋細胞への生理学的作用に関しては、機械的刺激の作用に関して高い独自性と新規性を有する知見であり、骨格筋に対する機械的刺激に関する生理学的研究を進展させるインパクトを有しているといえる。これらのことから一連の成果は国際的な学術誌に採択されうると考えられる。今後は、これらの結果を可能な限り早く海外学術誌に公表する予定である。

(3) 今後の展望など：

本研究課題の遂行期間中には解明しきれなかったことおよび新たに得られた課題・可能性は以下の事柄である。

①細胞増殖反応が亢進している可能性：

「研究の主な成果」で記載した通り、細胞増殖に関連しているとされている ERK の活性化が観察され、また研究代表者の先行研究においてタンパク質合成の促進による代謝活性化であることが示されている。この2つの

結果を考慮すると、圧力刺激によって分化は抑制され細胞増殖が亢進していることが推測される。今後は細胞増殖反応が亢進しているかどうかについて検討することが必要と思われる。

②免疫および炎症応答関連因子が機械的刺激による細胞応答に関与している可能性：

網羅的に遺伝子解析を行った結果、圧力刺激によって免疫および炎症応答関連因子の遺伝子発現に変化が生じていた。伸展刺激を用いた研究においても近年では免疫および炎症応答関連因子が骨格筋細胞応答に関与していることが報告されており、圧力刺激によっても同様にそれらの因子が何らかの作用を担っている可能性がある。したがって、上記の細胞増殖反応とともに免疫や炎症応答関連因子の関与についても、本研究課題の解明に結びつく有力な関連課題となるものと考えられる。

まとめ：本研究課題「骨格筋の内圧上昇に対する細胞応答」に関しては、筋収縮に伴う内圧上昇が未熟な筋細胞の成熟とくに分化を抑制している可能性が示唆された。一方で、未熟な筋細胞の細胞増殖という可能性そしてそれを示唆するような知見が得られている。本研究課題は *in vitro* での実験をもとに検討を行ってきたが、今後はこれらの知見についてより *in vivo* に近い実験系での検討を行い、生体内とくに骨格筋という他の組織以上にメカニカルストレスに暴露される頻度の高い組織でのその意義について検討を深める必要があると考えられた。また、化学的刺激では説明の困難な細胞応答に関して、メカニカルストレスと化学的な刺激の両者を包含した実験系により、やはりより生理学的な条件において骨格筋細胞の応答に関しての理解を深める必要があるものと考えられた。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① Noriteru Morita, Kenji Iizuka, Yoshiki Fujisawa, Takuji Machida, Masahiro Horiuchi, Masahiko Hirafuji, Koichi Okita, Exposure to Pressure Stimulus Suppresses Myogenin Expression in Differentiating L6 Myoblasts. 36th International Congress of Physiological Science, July 27, 2009, Kyoto (Japan).
- ② 森田憲輝, 飯塚健治, 藤沢佳輝, 町田拓自, 平藤雅彦, 沖田孝一. 筋芽細胞への圧力刺激はmyogenin発現を抑制する. 第63回日本体力医学会大会, 2008年9月

19日, 大分県別府市.

- ③ Noriteru Morita, Kenji Iizuka, Yosuke Kondo, Yoshiki Fujisawa, Masahiro Horiuchi, Takuji Machida, Masahiko Hirafuji, Koichi Okita, Mechanical pressure activates the glucose metabolism and MAPK signaling in L6 skeletal myocytes. 13th Annual Congress of the European College of Sports Science, July 8, 2008, Estoril (Portugal).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 憲輝 (MORITA Noriteru)
北海道教育大学・教育学部・准教授
研究者番号: 10382540

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: