

機関番号：30110

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500583

研究課題名 (和文) 筋再生過程の骨格筋における線維芽細胞増殖因子の役割

研究課題名 (英文) Role of fibroblast growth factors on regenerating skeletal muscle

研究代表者

山口明彦 (YAMAGUCHI AKIHIKO)

北海道医療大学 歯学部 准教授

研究者番号：50244869

研究成果の概要 (和文)：筋損傷後の回復過程において、線維芽細胞増殖因子である FGF-1～FGF-8 の発現と筋の増殖や分化過程で発現量を増加させるマーカー遺伝子の発現との関連性を調べた結果、FGF-1, FGF-5, および FGF-7 の各 mRNA が筋の増殖過程において発現量を増加させることが認められた。特に、FGF-7 では細胞外マトリックスとともに未成熟な筋細胞の核に発現が認められ、筋損傷後の回復過程における FGF-7 の関連性が明らかになったが、FGF-7 の発現抑制によって、筋の増殖・分化マーカーの遺伝子発現に影響を及ぼさなかったため、FGF-7 の筋再生過程における役割については明確にできなかった。

研究成果の概要 (英文)：To examine the relations between specific fibroblast growth factors (FGFs) and satellite cell activation during muscle regeneration in vivo, we measured mRNA expression of FGFs and myogenic markers in rat plantaris muscle after bupivacaine administration. FGF-1, FGF-5 and FGF-7 mRNAs after the treatment started to increase at the same time as MyoD and PCNA mRNAs. FGF-7 protein was expressed in immature muscle fiber nuclei and the extracellular matrix. These results indicate that FGF-7 is associated with specific myogenic marker expression during muscle regeneration. However, suppression of FGF-7 mRNA expression following short hairpin RNA administration did not change the expression of myogenic markers. Consequently, the role of FGF-7 during muscle regeneration in vivo remains unclear.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ スポーツ科学

キーワード：スポーツ生理学

1. 研究開始当初の背景

からだが大きく、筋肉が発達していることはより大きな筋力、パワーを発揮できる源であり、筋肉量の大小はスポーツパフォーマンスを決定する重要な要素の一つと考えられ

ている。また、高齢者においては、加齢とともに筋が萎縮するというサルコペニアが問題となっており、自立した生活を送るためには最低限の筋量維持が必要とされている。筋量維持や筋成長に対する重要な調節因子と

してインスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor-1: IGF-I) や線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factors: FGFs) などの成長因子があげられる。筋が成長したり、維持するためには筋線維の周囲にある筋衛星細胞が重要な役割を果たす。筋衛星細胞が活性化されると増殖、融合、筋線維への分化、さらに新しい筋線維の核として役立てられる。IGF-I は、筋衛星細胞に対して増殖過程と分化過程の両方を刺激することで筋成長をもたらすことが知られている。一方、FGFs は、筋において FGF-1~FGF-8 の 8 種類が発現するが、それぞれの機能についてはあまり良くわかっていない。その中で、私は、機能的過負荷による筋肥大、および除神経による萎縮中の各 FGF の発現状態を調べたところ、それぞれの FGF の発現パターンが異なっていることを明らかにした (Yamaguchi ら, Pflugers Arch 2004)。しかしながら、内外の研究をみても、各 FGF が、in vivo において筋成長中に生じる筋衛星細胞の増殖、分化に対してどのような役割を持っているのかについて分かっていないのが現状であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、筋再生過程の骨格筋において、筋衛星細胞の増殖過程、および分化過程と各 FGF の発現状態の対応関係を調べることで、それぞれの FGF の筋成長に対する役割について検討を試みた。

(2) 筋再生過程において、RNA 干渉という手法を用いて選択的に特定の FGF の発現を抑制することによって、筋衛星細胞の増殖過程、分化過程がどのように変化するかを調べることで、FGF の筋成長を調節する機構の重要性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験動物として 8 週齢の Wistar 系雄性ラット用い、足底筋にブピバカイン投与群と、そのコントロールである生理食塩水を投与する群を作成した。

ブピバカイン投与および生理食塩水投与後、12時間、24時間、48時間、72時間に足底筋を摘出し、筋損傷後の回復過程における FGF-1~FGF-8 と、MyoD family, cell cycle marker の mRNA 発現の観察を行った。mRNA 発現は、FGF-1 mRNA FGF-2 mRNA FGF-3 mRNA, FGF-4 mRNA FGF-5 mRNA FGF-6 mRNA FGF-7 mRNA, FGF-8 mRNA, HGF mRNA, MyoD family として MyoD mRNA と myogenin mRNA, cell cycle marker として PCNA mRNA と p21 mRNA, さらに筋衛星細胞との関連を調べるため M-cadherin mRNA と Pax7 mRNA を対象に測定を行った。また、内因性コントロールとして GAPDH mRNA の測定を行った。各 mRNA の発現量は、real-time RT-PCR 法 (ABI7300,

Applied Biosystems社製)を用いて測定した。

ブピバカイン投与は、0.5%のブピバカインを 0.5ml 足底筋に投与することによって実施した。ブピバカインによって筋線維が壊されるので、その後筋線維の再生過程を観察することができる。

生理食塩水投与は、滅菌済みの生理食塩水を 0.5ml 足底筋に投与することによって実施し、ブピバカイン投与群のコントロールとして役立てた。

組織化学染色として、筋損傷後の回復過程をモニターするため、hematoxylin & eosin 染色を施した。また、発現量の変化が大きいことが予想される FGF-5 と FGF-7 について、筋における発現箇所を特定するため、免疫組織化学染色を施し、その発現分布を調べた。免疫組織化学染色における 1 次抗体として goat anti-FGF-5 (M-19) polyclonal 抗体

(Santa Cruz Biotechnology), および goat anti-FGF-7 (C-19) polyclonal 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用い、ABC 法 (vectastain Elite ABC kit, Vector) により可視化した。

(2) 実験動物として 4 週齢の Wistar ラットを用い、前脛骨筋に FGF-7 mRNA の発現を抑制する short hairpin RNA (shRNA) を発現する plasmid と特定の遺伝子発現を修飾しない Random 配列の plasmid を投与 (各 100 μ g DNA/100 μ l saline) した。FGF-7 shRNA plasmid 投与および Random 配列 plasmid 投与後、1日、2日、3日、5日に前脛骨筋を摘出し、FGF-7, MyoD, myogenin, M-cadherin, PCNA, および p-21 の各 mRNA の発現量を real-time RT-PCR 法を用いて測定した。

また、4 週齢の Wistar ラットについて、足底筋の協働筋である腓腹筋とヒラメ筋を切除し、さらに FGF-7 shRNA plasmid 投与、および Random 配列 shRNA plasmid 投与を行い、その後の MyoD, myogenin, M-cadherin, PCNA, および p-21 の各 mRNA の発現量を測定した。

FGF-7 に対する short hairpin RNA (FGF-7 shRNA plasmid) とランダム配列の short hairpin RNA (Random 配列 shRNA plasmid) は、RNA 干渉の実験に使用できる siRNA plasmid (pBasi-hU6 Neo Plasmid, Takara) に組み込み、Competent E coli cells (JM109) に導入し、増幅させた。得られた Plasmid DNA を EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen) を用いて、精製し、100 μ g DNA/100 μ l saline 量になるように濃度調整を行った。

本研究の real-time RT-PCR 測定では、Power SYBR Green Master Mix protocol および Taq-Man Gene Expression Assay を用いて行った。Power SYBR Green Master Mix protocol のプライマーは、FGF-1 forward: 5'-TCCCTATTTTGGTTGACCCTAAA-3', reverse: 5'-GCTCTGTGGGCTGAGGGTTA-3', FGF-2

forward: 5'-TGAACGCTGGAGTCCATAAC-3', reverse: 5'-CGTTTCAGTGCCACATACCAA-3', FGF-5 forward: 5'-CGTCAGCGATTACAGAAGT-3', reverse: 5'-CTCTTTTGCTTCCCTCTCTTG-3', FGF-6 forward: 5'-TTCAGAGAAACCTCCTCCAA-3', reverse: 5'-CAGTGAATGTAGGTCCCTCTGT-3', FGF-7 forward: 5'-CTGCTCTATATGCGAAATGG-3', reverse: 5'-GAGGTGGAAGCACGGTCTGT-3', HGF forward: 5'-AAAACACTACATGGGCAACTTATCCAA-3', reverse: 5'-ATGACGGTGTAAATCCTCCATATTC-3', MyoD forward: 5'-GAGTGTCAATTTAGCTTCATTTTGG-3', reverse: 5'-GCTCTGTGGGCTGAGGGTAA-3', myogenin forward: 5'-TGGTACCCAGTGAATGCAACTC-3', reverse: 5'-GGACCAAATCCAGTGCATTG-3', PCNA forward: 5'-TCCGAAGCTTCGACACATAC-3', reverse: 5'-GGACATGCTGGTGAGGTTC-3', p21 forward: 5'-GGCAGACCAGCCTAACAGATT-3', reverse: 5'-GGCACTTCAGGGCTTCTCTT-3', M-cadherin forward: 5'-ATCCTGACGGGCAGTTCAAG-3', reverse: 5'-CTCATAGTCTCACGGCTCTCA-3', Pax7 forward: 5'-CACGGTGCCTCAGTGAGTT-3', reverse: 5'-TCTGCCATCTTCTTCTTTT-3', GAPDH forward: 5'-AGACTGTGGATGGCCCTCT-3', reverse: 5'-GATGACCTTGCCACAGCCT-3'であった。一方, Taq-Man Gene Expression Assay は Power SYBR Green Master Mix protocol で検出できなかった FGF-3 mRNA FGF4 mRNA FGF-8 mRNA に対して実施し, 以下の ID 番号のプライマーを用いて測定を行った。FGF-3: Rn00590754_m1, FGF-4: Rn00709728_m1, FGF-8: Rn00590996_m1。

4. 研究成果

本研究では, ブピバカイン投与による筋損傷後の回復過程において, FGF-1~FGF-8 の発現と MyoD family および cell cycle marker の発現との関連性を調べることで, 各 FGF の筋成長における増殖過程および分化過程における役割について検討を行った。

MyoD mRNA と PCNA mRNA はブピバカイン投与 24 時間後に増加し始め, 48 時間後にピークに達した。myogenin mRNA, p-21 mRNA, M-cadherin mRNA, Pax7 mRNA はブピバカイン投与 48 時間後に増加し始め, 72 時間後にはさらなる増加が観察された。このことから, ブピバカイン投与 24 時間後から筋の増殖過程が, 48 時間後から分化過程が進行していることが示唆された (図 1)。

FGF-1, FGF-5, および FGF-7 の各 mRNA は, ブピバカイン投与 24 時間後に増加し始めた。FGF-2 mRNA の発現量はブピバカイン投与後減

少する傾向にあった。FGF-6 mRNA は生理食塩水投与後増加する傾向になったが, ブピバカイン投与群と有意な違いは認められなかった。HGF mRNA はブピバカイン投与 24 時間後から増加し始め, 48 時間後, 72 時間後にさらなる発現量の増加が観察された。FGF-3, FGF-4, FGF-8 の各 mRNA については, 検出可能なサンプルが少なく, 発現量の変化を観察できなかった。このように, FGF-1, FGF-5, および FGF-7 の各 mRNA が MyoD や PCNA と同じタイミングで発現量を増加させたのに対して, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-6, および FGF-8 の各 mRNA は, MyoD family や cell cycle marker の各 mRNA 発現と対応していなかった (図 2)。

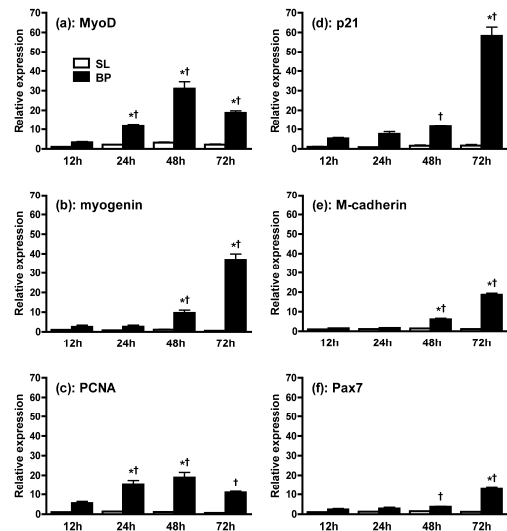


図 1 ブピバカイン投与後の筋分化制御因子および cell cycle marker 遺伝子の mRNA 発現。BP: ブピバカイン投与群, SL: 生理食塩水投与群

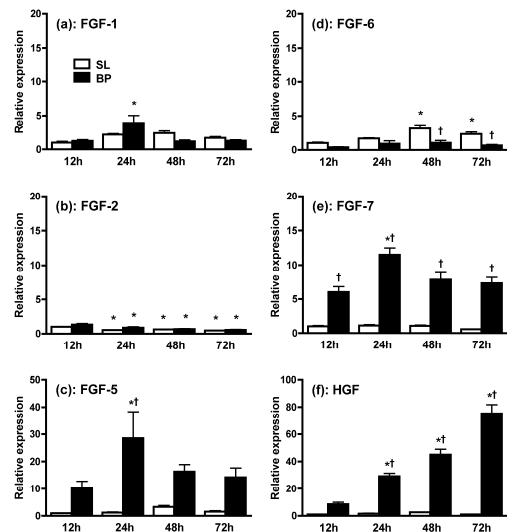


図 2 ブピバカイン投与後の FGF family 遺伝子の mRNA 発現。BP: ブピバカイン投与群, SL: 生理食塩水投与群

ブピバカイン投与によって発現量を顕著に増加させた FGF-5 と FGF-7 に対して免疫組織化学染色を施し、ブピバカイン投与後の FGF-5 および FGF-7 の局在について検討した。FGF-5 抗体に対しては、筋細胞の核でなく、おもに細胞外マトリックスにおいて強く染色された。FGF-7 に対する抗体に対しては、細胞外マトリックスとともに未成熟な筋細胞の核において染色された (図 3)。これらの結果から、筋損傷後の回復過程において、FGF-7 の重要性が明らかになるとともに、FGF-7 が筋の増殖過程を刺激することで、筋再生に貢献している可能性が示唆された。

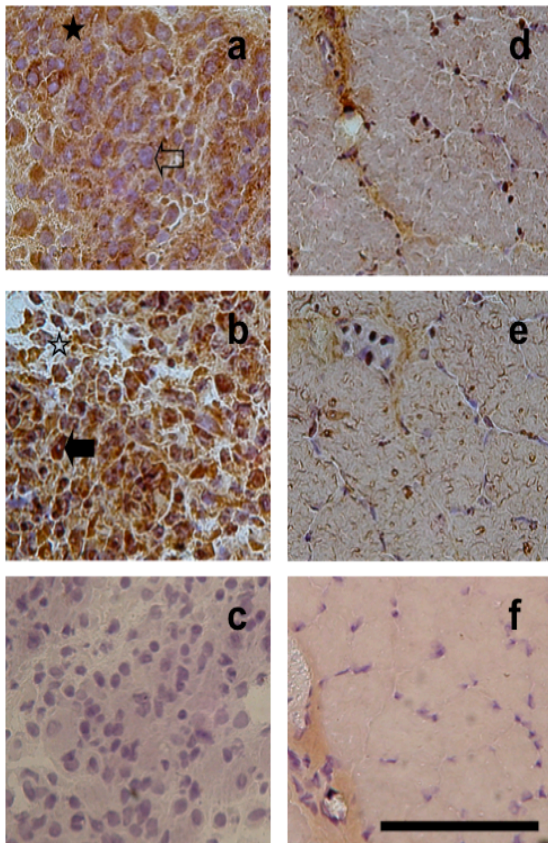


図 3 FGF-5, FGF-7 に対する免疫組織化学染色図。a) FGF-5 (ブピバカイン投与群), b) FGF-7 (ブピバカイン投与群), c) ネガティブコントロール (ブピバカイン投与群), d) FGF-5 (生理食塩水投与群), e) FGF-7 (生理食塩水投与群), f) FGF-7 (生理食塩水投与群)。

FGF-7 の筋成長を調節する機構に対する重要性について検討するために、MyoD family, cell cycle marker の mRNA 発現に及ぼす FGF-7 の発現抑制の影響について調べた。FGF-7 shRNA plasmid 投与群では、投与 1 日後において、Random 配列 shRNA plasmid 投与群と比較して、FGF-7 mRNA の発現量は約 80% に低下し、その後回復する傾向にあった。MyoD mRNA および PCNA mRNA の発現量は、FGF-7 shRNA plasmid 投与群と Random 配列 shRNA

plasmid 投与群との間に有意な違いは観察されなかった。myogenin mRNA の発現量は、投与 1 日後、および 3 日後では FGF-7 shRNA plasmid 投与群と Random 配列 shRNA plasmid 投与群との間に有意な違いは観察されなかったものの、投与 5 日後では FGF-7 shRNA plasmid 投与群の myogenin mRNA の発現量は、Random 配列 shRNA plasmid 投与群と比較して有意な低下が観察された。このように、FGF-7 が生後の骨格筋成長に対して、differentiation 段階で影響を及ぼしている可能性が示唆された。

次に、足底筋の協働筋である腓腹筋とヒラメ筋を切除し、さらに FGF-7 shRNA plasmid 投与、および Random 配列 shRNA plasmid 投与を行い、その後の筋成長過程における MyoD family, cell cycle marker の mRNA 発現状態について観察を行った。MyoD, myogenin, M-cadherin, PCNA, および p-21 の各 mRNA 発現について、いずれの発現量においても有意な違いは観察されず、FGF-7 の筋再生過程における筋成長への貢献は明らかにできなかった。

以上、本研究において、線維芽細胞増殖因子の筋再生過程における役割の可能性については示唆されるものの、FGF-7 の発現抑制による MyoD family および cell cycle marker の遺伝子発現に変化がみられず、in vivo における FGF-7 の役割を明確化することはできなかった。本研究では FGF-7 の発現抑制が低かったことなどの問題点があり、また実験モデルについても改良を加え、今後さらに検討を加えていく必要があるものと考えられる。

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 3 件)

①Tanaka Y., A. Yamaguchi, T. Fujikawa, K. Sakuma, I. Morita, K. Ishii: Expression of mRNA for specific fibroblast growth factors associates with that of the myogenic markers MyoD and proliferating cell nuclear antigen in regenerating and overloaded rat plantaris muscle. *Acta Physiologica* 194: 149-159, 2008. 査読有

②Akiho M., H. Nakashima, M. Sakata, Y. Yamasa, A. Yamaguchi, K. Sakuma: Expression profile of Notch-1 in mechanically overloaded plantaris muscle of mice. *Life Sciences* 86: 59-65, 2010. 査読有

③Sakuma K., A. Yamaguchi: The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal

muscle. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010: 1-8, 2010. 査読有

[学会発表] (計4件)

①佐久間邦弘, 山口明彦, 須藤みず紀, 青井涉, 狩野豊: 齢性筋肉減弱症(サルコペニア)に対する自発性走運動の効果-神経栄養性因子に着目して-, 第65回日本体力医学会大会, 2010年9月16日千葉商科大学(千葉県)

②山口明彦, 佐久間邦弘, 森田勲: 発育期のラットの骨格筋成長に対するFGF-7の発現抑制の影響, 第65回日本体力医学会大会, 2010年9月16日千葉商科大学(千葉県)

③小野寺直也, 須藤みず紀, 山口明彦, 狩野豊: 運動誘発性筋損傷-再生過程におけるVEGF mRNAの発現パターン, 第65回日本体力医学会大会, 2010年9月17日千葉商科大学(千葉県)

④Onodera N., M. Sudo, A. Yamaguchi, Y. Kano: Time course of VEGF-A mRNA expression following eccentric contractions in rat skeletal muscle. ACSM conference on integrative physiology of exercise, 2010年9月22-25日, Eden Roc, Miami Beach, USA

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口明彦 (YAMAGUCHI AKIHIKO)
北海道医療大学 歯学部 准教授
研究者番号: 50244869

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: