

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21300251

研究課題名(和文) 神経筋接合部におけるシナプス核の加齢変化と可塑性

研究課題名(英文) Age-related Change in Endplate morphology and its regulatory factors in rat muscles

研究代表者

宮田 浩文(Miyata, Hirofumi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90190793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円、(間接経費) 3,240,000円

研究成果の概要(和文)：近年、MuSKがアセチルコリンレセプター(AChR)の凝集を誘導していること、Shp2がMuSKに対して拮抗的に働くことが示されている。本研究の結果から以下の4点が推察された。1)発育期においては、MuSK mRNAの高発現に伴いAChRが凝集、エンドプレートの拡大が生じる。2)老齢期においては、Shp2 mRNAの高い発現によりAChRの凝集が抑制され、エンドプレートの断片化が進行する。3)エンドプレートの拡大、断片化にも関わらず、エンドプレート核ドメインは一定に保たれる。4)活動量の多いDIAは、STMに比べMuSKおよびShp2のmRNA発現量が高く、筋活動量と関連する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the number of endplate nuclei, morphological properties of the motor endplate, and the expression level of muscle-specific kinase (MuSK) and tyrosine phosphatase with two SH2 domains (Shp2) in rat muscles with aging. During the developmental period (1 to 25 weeks), the muscle fiber diameter, endplate volume and surface area, and number of endplate nuclei were significantly increased in both DIA and STM muscles. The level of MuSK mRNA expression was decreased by 60% during the developmental period and kept constant values to 130 weeks after birth. While, the level of SHP2 mRNA expression kept constant value during the developmental period and increased to 130 weeks. There were significantly higher levels of MuSK and SHP2 mRNA expression in DIA than those in STM muscles. These results suggested that enlargement of endplate is mainly regulated by MuSK expression during postnatal development, and that fragmentation of endplate is mainly regulated by SHP2 expression with aging.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：応用健康科学

キーワード：エンドプレート シナプス核 Musk 加齢変化

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質アセチルコリンを受容するアセチルコリンレセプター (AChR) は、神経筋接合部の筋線維上に凝集し、運動終板 (エンドプレート) を形成する。その AChR の発現量は、エンドプレート周辺に局在するエンドプレート核によって調節されている。近年、Muscle Specific Kinase (MuSK) が AChR の凝集を誘導していること、tyrosine phosphatase with two SH2 domains (Shp2) が MuSK に対して拮抗的に働くことが示された。加齢に伴うエンドプレートの断片化は、脱神経を起こす可能性を高め、急激な筋萎縮を招く原因と考えられている。エンドプレートの変性のメカニズムを探り、筋萎縮を防ぐ方法について検討することは健康科学分野における重要課題の一つである。

2. 研究の目的

本実験は、エンドプレート核数および3次元形態とレセプター凝集に関わる重要な分子 MuSK および Shp2 の mRNA 発現の発育・加齢変化について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

被験動物には 1・2・3・11・25・90・130 週齢のウィスター系雄ラットを用い、横隔膜筋 (Diaphragm; DIA) と胸鎖乳突筋 (Sternocleidomastoid; STM) を摘出した。摘出筋から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行い MuSK と Shp2 の mRNA 発現量を定量した。各筋断片に対して -bungarotoxin with rhodamine を用い、エンドプレートをラベルした。その後、実体顕微鏡下でエンドプレートを含む単一筋線維を単離し、DAPI 染色により核をラベルした。共焦点顕微鏡下で3次元画像解析ソフトを用いてエンドプレートの立体画像を構築し、エンドプレート体積、エンドプレート核数、エンドプレート核ドメイン (一つの核が支配するエンドプレート領域) を算出した (図1)。

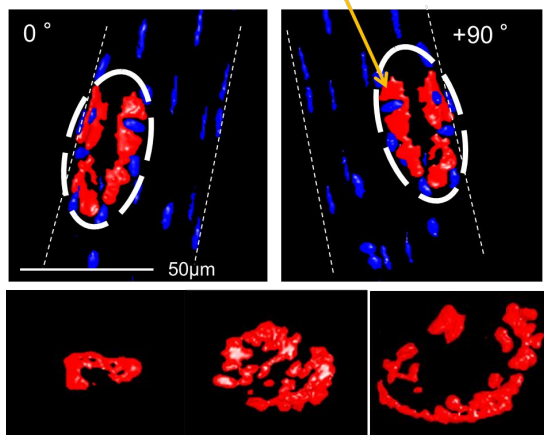


図1 筋線維 (上: 左は 90 度回転) およびエンドプレートの 3 次元構築像 (下) (左は 3 週齢、中は 90 週齢、右は 130 週齢の画像を示す)

4. 研究成果

両筋ともタイプ I, IIa, IIx/b 線維から構成されていた。DIA の筋線維組成には発育加齢に伴う顕著な変化は認められなかったが、STM は加齢に伴う I および IIa 線維の増加が確認された (図2)。

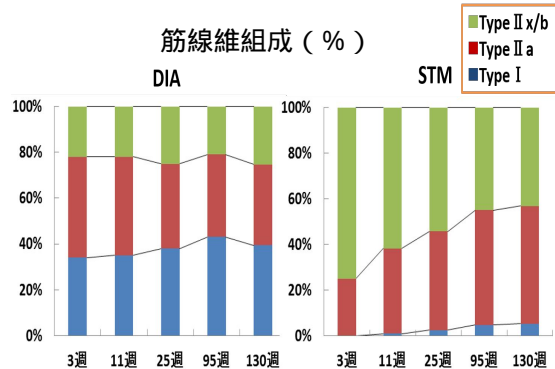


図2 横隔膜 (DIA) と胸鎖乳突筋 (STM) における筋線維組成の発育・加齢変化

筋線維直径、エンドプレート体積・表面積 (図3上)、エンドプレート核数 (図3下) は 25 週齢までの発育段階においては、両筋とも急増し、エンドプレート核ドメインはほぼ一定の値に保たれた。その後 90 週齢 (生存率 70%) まではすべての測定項目が徐々に増大した。130 週齢 (生存率 25%) までの老齢期においては、両筋ともエンドプレートの断片化が顕著になり (図1下)、エンドプレート体積、エンドプレート核数に多少の変動が認められたが、エンドプレート核ドメインは比較的一定の値を保った。

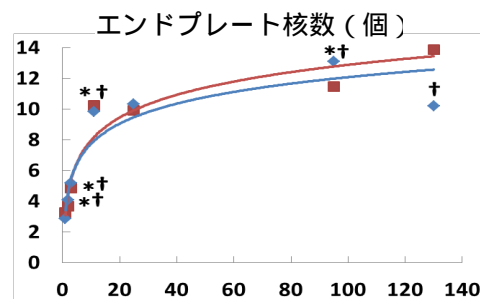
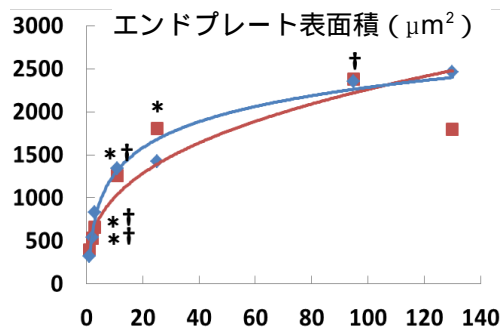


図3 エンドプレート体積とエンドプレート核数の発育・加齢変化 (横軸: 週齢, 赤: DIA, 青: STM, \* \*: 直前週齢との有意差)

MuSK・mRNA の発現量は 25 週齢までの発育段階で急激な減少を示し(図 4 上) その後は 130 週齢まで一定の値を示した。一方、Shp2・mRNA の発現量は 90 週齢まで顕著な変化を示さなかったが、130 週齢にかけて増加が認められた(図 4 下)。両 mRNA とも DIA が STM に比べ有意に高い発現量を示した。

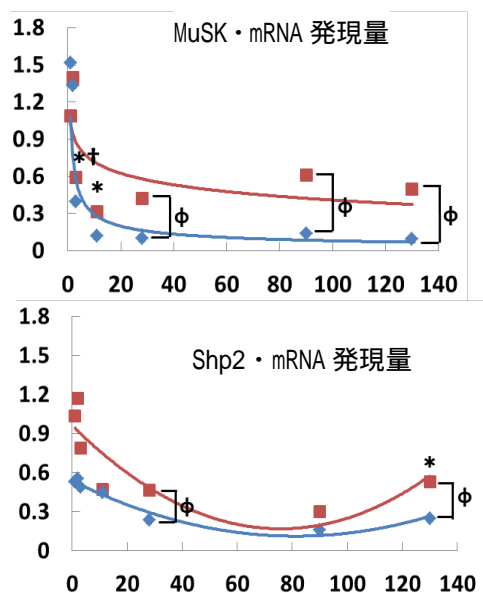


図 4 MuSK および Shp2 の mRNA 発現量の加齢変化(縦軸: Musk 初期値に対する相対値, \*: 直前週齢との有意差, φ: DIA と STM の有意差)

以上の結果から以下の 4 点が推察された。  
 (1) 発育期においては、MuSK・mRNA の高発現に伴い AChR が凝集、エンドプレートの拡大が生じる。  
 (2) 老齢期においては、Shp2・mRNA の高い発現により AChR の凝集が抑制され、エンドプレートの断片化が進行する。  
 (3) エンドプレートの拡大、断片化にも関わらず、エンドプレート核ドメインは一定に保たれる。  
 (4) 活動量の多い DIA は、STM に比べ MuSK および Shp2 の mRNA 発現量が高く、AChR のターンオーバーが速い可能性がある。

#### 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 6 件)

今岡洋子、河合美菜子、向井和隆、大村一、高橋敏之、平賀敦、宮田浩文、競走馬のトレーニングおよび脱トレーニングが骨格筋サテライトセルの反応性に及ぼす影響、体力科学 63(1): 177-187 (2014) 査読有

河合美菜子、宮田浩文、骨格筋の可塑性と筋核ドメインの多様性(総説) 体力科学 62(3): 189-198 (2013) 査読有

Kawai M, Aida H, Hiraga A, Miyata H. Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses. Equine Veterinary Journal.45 (4): 512-517 (2013) 査読有

Miyata H. Age and activity-related changes in the respiratory motor system. Japanese Physical Fitness Sports Medicine, 2(1): 77-83 (2013) 査読有

Kawai M, Saito K, Yamashita H, Miyata H. Age-related changes in satellite cell proliferation by compensatory activation in rat diaphragm muscles, Biomedical research 33(3): 167-173 (2012) 査読有

Kawai M, Kuwano A, Hiraga A, Miyata H. Relationships between myonuclear domain size and fibre properties in the muscles of Thoroughbred horses. Equine Veterinary Journal 42: 311-316(2010) 査読有

[学会発表](計 7 件)

宮田浩文、田中麻衣子、福場良之、ラット骨格筋のエンドプレート核数および発現調節分子の発育・加齢変化 第 68 回日本体力医学会全国大会、日本教育会館(東京)、2013 年 9 月 22 日

宮田浩文、田中麻衣子、福場良之、ラット発育期におけるエンドプレート核数および MuSK 発現の変化、第 67 回日本体力医学会、長良川国際会議場(岐阜市)、2012 年 9 月 16 日

Miyata H, Tanaka M, Yamaguchi A, Developmental Change in Domain Size of Endplate Nucleus in the Rat Diaphragm. 第 59 回アメリカスポーツ医学会、サンフランシスコ(USA)、2012 年 5 月 31 日

宮田浩文、ラットエンドプレートにおけるシナプス核ドメインと MuSK 発現の加齢変化、第 66 回日本体力医学会、海峡メッセ下関(下関市)、2011 年 9 月 17 日

Miyata H, Kawai M, Yamashita H, Tanaka M. Tomi M. Age-Related Changes in Serotonergic Input on Respiratory-Related Motoneurons in Rats. 第 58 回アメリカスポーツ医学会、デンバー(USA)、2011 年 6 月 1 日

宮田浩文、ラット横隔膜のエンドプレートとシナプス核の可塑性、第 65 回日本体力医学会、千葉商科大学(市川市)、2010 年 9 月 16 日

Miyata H, Saito K, Masuda Y, Yamashita H, Kawai M. Age-Related Changes in Satellite Cell Activation in The Rat Diaphragm. 第 57 回アメリカスポーツ医学会、ボルチモア (USA) 2010 年 6 月 5 日

〔図書〕(計 1 件)

宮田浩文：横隔膜の可塑性「身体運動と呼吸・循環機能」 宮村実晴 編、真興貿易医書出版部 pp91-98 (2012)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 浩文 (MIYATA Hirofumi)  
山口大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90190793

### (2) 研究分担者

和田 直己 (WADA Naomi)  
山口大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号：20210982