

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15348

研究課題名（和文）遅筋速筋型アセチルコリン受容体の生理的機能の解析

研究課題名（英文）Physiological function of slow- and fast-muscle acetylcholine receptors

研究代表者

山下 愛美（Yamashita, Manami）

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：80750637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類では個々の筋肉の中に遅筋と速筋が混在している。そのため遅筋・速筋の機能として想定されているものの多くは推測に基づいており、その分子基盤は不明な点が多い。一方ゼブラフィッシュにおいては遅筋と速筋が解剖学的に判別でき、アセチルコリン受容体のサブユニット構成が異なっていることが報告されている。また発生に伴い、体動に用いる筋肉が変化することも知られている。上記を利用して、ゼブラフィッシュを用いた行動実験およびアセチルコリン受容体再現系の電気生理学的実験により、筋弛緩剤であるPancuroniumが速筋特異的に効くこと、さらにその違いは受容体のサブユニット構成によるものであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋弛緩剤は手術等の全身麻酔の際に体動を抑えるために必須である。筋弛緩剤が速筋・遅筋といったすべての骨格筋を同等に効果があるのかはわかっていなかった。今回速筋優位に抑える筋弛緩剤を同定し、そのメカニズムを明らかにしたことにより、今後速筋・遅筋を選択的に抑制する薬剤の開発につながると考えられる。速筋・遅筋選択的な筋弛緩剤が開発されれば、リハビリテーションへの応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：In mammals, slow and fast muscles are intermingled within individual muscles. Therefore, many of the assumed functions of slow and fast muscles are based on speculation, and their molecular basis remains unclear. In zebrafish, it has been reported that slow and fast muscles are anatomically distinct, and their acetylcholine receptor subunit compositions are different. It is also known that the muscles used for body movements change during development. We showed here that a classical non-depolarizing muscle relaxant pancuronium inhibits fast muscle fibers at lower concentration compared to slow muscle fibers in zebrafish. We further showed that this difference arises from the different composition of acetylcholine receptors between slow and fast muscle fibers in the neuromuscular junction of zebrafish.

研究分野：生理学

キーワード：筋弛緩剤 速筋・遅筋 アセチルコリン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遅筋細胞・速筋細胞は人間を含む脊椎動物骨格筋の機能素子であり、日常生活の体動時などに機能分担することで、スムーズで効率的な運動を可能にしていると考えられている。遅筋と速筋はともに神経筋接合部において筋肉に発現しているアセチルコリン受容体が運動神経からのシナプス入力を受けている。ゼブラフィッシュでは遅筋・速筋が解剖学的に判別でき、アセチルコリン受容体のサブユニット構成が異なっていることを申請者の研究室から報告している(Park et al., J Neurosci, 2014; Zempo et al., Sci Adv, 2020)。しかし哺乳類において、個々の筋肉の中では遅筋と速筋が混在しており、実は個別の機能として想定されているものの多くは推測に基づいており、その分子基盤はいまだ不明な点も多い。そこで、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いた行動実験と、培養細胞による再現系を用いた電気生理学的解析により、今まで調べることが困難であった遅筋と速筋における生理的機能について区別した新たな知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

発生の段階に応じて用いる筋肉が変化するゼブラフィッシュを用いて、遅筋あるいは速筋特異的に効果がある薬剤を同定する。さらに培養細胞を用いたアセチルコリン受容体に対する効果を検証することで、ヒトへの応用を見据える。哺乳類においては、個々の筋肉内で遅筋と速筋が混在しているため、遅筋と速筋をわけて機能を調べることは難しい。しかし、ゼブラフィッシュは受精後 24 時間までは遅筋のみを、生後 48 時間以降は遅筋と速筋を用いて泳ぐ(Naganawa and Hirata, Dev Biol, 2011)。この性質を利用して遅筋・速筋に特異的な薬剤の探索を行う。さらにゼブラフィッシュでは遅筋と速筋に発現しているアセチルコリン受容体の組み合わせが異なっている。具体的にはアセチルコリン受容体は 5 量体で 5 つのサブユニットからなるが、速筋では α1 が 2 個、α2 が 2 個、β1 が 1 個で、もう 1 つが () 型) または サブユニットで構成されるが、遅筋には α1 も α2 も サブユニットも含まれない() 型)。この違いは、魚類に特異的に認められる現象ではなく、哺乳類でも同様の違いがあるという予備実験でのデータを得ている。速筋においてアセチルコリン受容体のサブユニット構成は、幼若期では α1α2β1γδ 型であり、発達に伴って α1α2β1γ から α1α2β1 に置き換わり、α1α2β1 型に変化することがわかっている(Mishina et al., Nature, 1986)。アセチルコリン受容体のサブユニット構成の違いによる薬剤効果に関しては、この α1α2β1γδ 型(幼若期型)か α1α2β1γδ 型(成人型)の違いに着目した研究はあるが(Garland et al., Eur J Pharmacol, 1998; Jonssen et al., Anesthesiology, 2006)、速筋型(α1α2β1γδ 型)と遅筋型(α1α2β1γδ 型)の違いに着目した例はない。また、マウスの骨格筋を用いた実験では、発達段階に伴い、薬剤の効果は変化することがわかっている。しかし、培養細胞を用いた再現系の実験において、幼若期型と成人型アセチルコリン受容体における薬剤効果に差はないことが報告されている(Wang et al., Mol Med Rep, 2015)。このことから、マウス骨格筋における発達段階に伴う薬剤効果の差は、遅筋と速筋における薬剤効果の差に起因することが示唆される。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュを用いた行動実験により、遅筋速筋特異的な薬剤のスクリーニングを行う。ゼブラフィッシュは受精後 24 時間までは遅筋を、48 時間以降は速筋と遅筋を用いて泳ぐ(Naganawa and Hirata, Dev Biol, 2011)。そのため、受精後 24 時間までの個体と 48 時間以降の個体に薬剤を投与し、効果に違いがあるか調べる。すでに受精後 24 時間の個体では効果が弱く、48 時間以降の個体では効果が強い、すなわち、遅筋への効果は弱く、速筋に選択的に効くと考えられる筋弛緩剤も同定している。知覚しやすい行動は、速筋による運動が多いため、筋弛緩剤として用いられている薬剤は速筋特異的に効果が大きい可能性が考えられる。そこで、筋弛緩剤として用いられている薬剤のみではなく、アセチルコリン受容体のサブユニット構成が異なる、自律神経系や中枢神経におけるアセチルコリン受容体の作動薬・拮抗薬にも手を広げ、行動実験にて遅筋あるいは速筋特異的に作用する薬剤の同定を目指す。

ゼブラフィッシュの遅筋および速筋から電気生理学的手法で応答を測定し、薬剤の効果を確認する。ゼブラフィッシュの運動神経にチャンネルロドプシンを発現させ、光刺激により運動神経を刺激する。その際に遅筋および速筋においてホールセル記録を行い、電氣的応答を測定する。遅筋と速筋で薬剤の効果に違いがあるかを確認する。

Xenopus の卵細胞に速筋・遅筋型アセチルコリン受容体を発現させ、薬剤の効果を確認する。アセチルコリン受容体、一つは速筋型()ともう一つは遅筋型()を発現させ、ゼブラフィッシュを用いた行動実験によりスクリーニングされた薬剤の効果に差があるか検証する。発現系を用いることでアセチルコリン受容体サブユニット構成の違いにより速筋と遅筋の神経接合部を区別して再現できる。速筋もしくは遅筋のみを特異的に抑制できた場合、今までとは異なる、速筋と遅筋との機能的区分に関する新しい知見が得られることが期待できる。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュは受精後 24 時間までは遅筋を、48 時間以降は速筋と遅筋を用いて泳ぐ。そのため、受精後 24 時間までの個体と 48 時間以降の個体に薬剤を投与し、効果に違いがあるか調べた。受精後 24 時間の個体では効果が弱く、48 時間以降の個体では効果が強い、すなわち、遅筋への効果は弱く、速筋に選択的に効くと考えられる筋弛緩剤を複数種同定した。そのような薬剤の中でも特に Pancuronium に着目して解析を行った。ゼブラフィッシュの遅筋と速筋からホールセル記録を行い、速筋の方が Pancuronium が効きやすいことを確認した。ゼブラフィッシュにおいては速筋と遅筋でアセチルコリン受容体のサブユニット構成が異なることが知られており、上記効果の違いはアセチルコリン受容体のサブユニット構成の違いによるものではないかと考え、アフリカツメガエルの卵細胞に速筋型アセチルコリン受容体と遅筋型アセチルコリン受容体のサブユニットを発現させ、アセチルコリン投与による Pancuronium の阻害効果を測定したところ、やはり速筋型アセチルコリン受容体において Pancuronium の阻害効果が強いことがわかった。以上より、Pancuronium は遅筋より速筋を効果的に抑制し、それはアセチルコリン受容体の構成が異なることが理由であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamashita Manami, Egashira Yoshihiro, Nakamura Shuntaro, Sakata Souhei, Ono Fumihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Receptor subunit compositions underly distinct potencies of a muscle relaxant in fast and slow muscle fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.1026646	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yamashita Manami, Egashira Yoshihiro, Nakamura Shuntaro, Sakata Souhei, Ono Fumihito
2. 発表標題 Receptor subunit compositions underly distinct potencies of a muscle relaxant in fast and slow muscle fibers
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------