

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：33912

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700555

研究課題名（和文） 細胞生物学的な根拠に基づいた、筋萎縮に効果的な筋力増強運動の方法の開発

研究課題名（英文） Effective resistance exercise method for muscle atrophy based on a cell biology

研究代表者

伊東 佑太（ITO H YUTA）

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・助手

研究者番号：30454383

研究成果の概要（和文）：筋力増強運動に萎縮筋の回復を促進させる効果があるかどうかを調べた。また、新生した筋線維核が出現するかどうかを調べ、萎縮筋に対する筋力増強運動の効果に筋衛星細胞などの未分化な細胞が関与するかどうかを探った。その結果、萎縮筋に対して筋力増強運動を行うと、筋線維横断面積の回復が促進されることがわかった。また、この効果には、筋衛星細胞などから新生した細胞の筋線維への融合が関与していることを突き止めた。そして、この現象は運動開始2日後から約2日間という短期間に生じていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recovery from skeletal muscle atrophy by resistance exercise was examined in mice. After tail suspension, the animals were subjected to resistance exercise (RE). The myofiber thickness of soleus muscle of the mice with RE was significantly greater than that of non RE group, and was not significantly different from normal mice. Intriguingly, the number of myonuclei of the mice with RE was 1.5 times greater than that of non RE mice. We found that the newly-acquired myonuclei were increased within a few days after the onset of RE, suggesting that satellite cells proliferated rapidly after the onset of RE and fused to the myofibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮・筋力増強運動・細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

不活動や微重力は廃用性筋萎縮を起こす。リハビリテーションの分野では、筋萎縮からの回復を促進させるために筋力増強運動を用いる。しかし、萎縮筋に対する筋力増強運

動の効果の定量的解析や、萎縮筋回復の分子機構の解析はほとんど行われていない。

健常筋に対する筋力増強運動の効果は、スポーツ科学の分野で多く報告されているが、萎縮筋に対する筋力増強運動の回復促進効

果に関する報告は少ない。廃用性筋萎縮モデル動物に、ホイール走や水泳といった運動を行わせると、ヒラメ筋の筋湿重量や筋線維横断面積が2週間で回復し、回復促進効果があると報告されている。一方、廃用性筋萎縮モデルを筋力増強運動を行わないで普通に飼育するだけでも、筋線維横断面積は2週間で正常な大きさまで回復するという報告もある。ホイール走や水泳運動は、持久性向上に用いる強度の運動であり、筋質量の増加を引き起こす高強度の筋力増強運動とは筋サイズの回復促進効果やその分子機序が異なる可能性がある。

筋力増強運動により起こる個々の筋線維の肥大のメカニズムは一部が明らかになってきている。筋線維内の1つの核が転写、翻訳をする領域は限られているため、1本の筋線維の大きさとそこに含まれる筋線維核数とは正の相関があるといわれている。一般に哺乳類では、最終分化した筋線維核は分裂しないといわれており、筋線維あたりの筋線維核数が増加するためには、筋芽細胞が新たに融合する必要がある。実際に、筋線維の肥大が起こるときには、増殖した筋衛星細胞から分化した筋芽細胞が、既存の筋線維に融合するという報告がある。また、筋力増強運動により筋質量が増加する際には、筋衛星細胞から分化した筋芽細胞同士が融合して筋線維を新生することで、筋線維数が増加するという報告がある。これらのことから、筋萎縮からの回復促進過程で、筋質量が回復する際には、筋芽細胞の萎縮筋筋線維への融合と、筋線維の新生とが起こると考えられる。しかし、統合的に評価した報告はなく、その過程は詳細に解析されていない。

2. 研究の目的

本研究は、廃用性筋萎縮モデルマウスに、オペラント学習法による筋力増強運動を行わせる実験により、筋萎縮からの回復に対する筋力増強運動の効果を統合的に明らかにすることを目的とした。加えて、筋萎縮からの回復過程において、筋力増強運動が筋衛星細胞の増殖/分化、および筋線維への融合に及ぼす影響を細胞生理学的に検証した。さらに、この検証結果を元に、筋衛星細胞の増殖、分化、融合時期を視標として筋力増強運動の方法を検討し、最も効率的に筋萎縮から回復させることができる筋力増強運動の負荷方法、実施期間を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

10週齢のICR雄性マウスを用いた。マウスは、実験期間中、25°Cに設定した室内で、12時間毎の明暗サイクルで飼育した。また、マウスには餌や水を自由に与えた。

これらのマウスの後肢筋を萎縮させるために、Morey法を用いて2週間の尾部懸垂法を施した。尾部懸垂のための処置はisoflurane

(1.0%)吸入麻酔下で行った。尾部懸垂は舌根沈下による窒息死を避けるため、麻酔からの覚醒を確認した後に開始した。なお、尾部懸垂期間中でもマウスの前肢は接地しており、ケージ内の移動、餌や水の摂取は自由に行えた。この尾部懸垂法による筋萎縮効果を調べるため、尾部懸垂後すぐに筋を採取した群(TS群、n=6)、それと同週齢の尾部懸垂をしなかった群(nonTS群、n=6)を作製した。そして、萎縮筋に対する筋力増強運動の効果を調べるために、尾部懸垂後に筋力増強運動を行わせた群(RE群、n=6)、筋力増強運動を行わせないで普通飼育した群(nonRE群、n=6)、尾部懸垂も筋力増強運動も行わせない群(CON群、n=6)を作製した。また、筋力増強運動を行った萎縮筋への新生細胞の関与を調べるために、尾部懸垂後筋力増強運動を行い、運動開始直後(n=6)、1日後(n=6)、2日後(n=6)に5-ethynyl-2'-deoxyuridine(EdU)を投与し、各々48時間後に筋を採取する3群を作製した。更に、新生した筋線維核の出現後筋力増強運動を行わなくても筋萎縮からの回復を促せるかどうかを確かめるため、4日間の筋力増強運動後3日間運動を行わず飼育する群を作製した。

(2) オペラント学習による筋力増強運動

筋力増強運動には、自発的な立ち上がり運動を行わせた。この立ち上がり運動を行わせるために、尾部懸垂を施す前の7日間に、オペラント学習法を施した。この学習には、オペラントケージとショッカー付プログラマーを用いた。本装置は、オペラントケージの壁にあるスピーカーと電灯から音・光刺激が3秒間起こった後、床から電流刺激が発生するようプログラムされている。この電流刺激は、オペラントケージの壁に設置されたスイッチレバーを押すと止まる。オペラントケージにマウスを入れ、本プログラムを1日100回、7日間繰り返し行った。その結果、マウスは80%以上の確率で音・光刺激中に立ち上がり、電流刺激に曝される前にスイッチレバーを押すことを学習した。

尾部懸垂から解放後、予め学習した立ち上がり運動を1セット25回、セット間を4時間以上空けて1日2セット、7日間毎日行った。立ち上がり運動時のスイッチレバーの高さは、マウスの足関節底屈筋に負荷がかかる

ように、マウスがスイッチレバーに触れたときに踵部がグリッドから離れる（大腿骨と下腿骨がなす角度が約 80° 、下腿骨と第5中足骨がなす角度が約 100° の肢位）高さに調節した。

(3) 組織学的評価

① 筋線維の太さや数、筋線維核数の評価

すべての群のマウスから pentobarbital sodium (0.05 mg /BWg) 腹腔内投与麻酔下でヒラメ筋を採取した。採取したヒラメ筋は、液体窒素で冷やした isopentane 内で凍結させた。その後、厚さ 8 μm の凍結横断切片を作製した。切片は、筋腹が最も太い領域（ヒラメ筋の遠位の端から 3 mm から 5 mm の間）から作製した。作製した凍結横断切片は、haematoxylin-eosin (H-E) 染色を施し、顕微鏡下で観察、画像解析ソフト (Image J) に取り込んだ。取り込んだ画像から、ヒラメ筋の筋腹の横断面積、1 つの切片に含まれるすべての筋線維の横断面積と数を測定した。

筋線維核数を測定するために凍結横断切片は、筋線維細胞膜に局在する dystrophin と核の二重染色を施した。切片は、4% paraformaldehyde にて 10 分間固定し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、3% bovine serum albumin (BSA) で一晩ブロッキング処理を行った。PBS で洗浄後、1 次抗体である rabbit anti-dystrophin polyclonal antibody (1:400, Santa Cruz) をのせ、 37°C で 60 分間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体である Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG antibody (1:400, Molecular Probers) と 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:10000, SIGMA) をのせ、遮光した上、 37°C で 45 分間インキュベートした。これを蛍光顕微鏡で観察、画像解析ソフト (Image J) に取り込んだ。取り込んだ画像から、筋線維細胞膜の位置に観察される dystrophin 染色像の内側に存在する DAPI 陽性核（筋線維核）の数を測定した。

② 活性化した筋衛星細胞の既存筋線維への融合の評価

EdU を投与したマウスから採取したヒラメ筋の横断切片は、新生した核の染色を行うとともに、dystrophin と核との多重染色を行った。薄切した切片を、4% PFA にて 10 分間固定し、1% BSA で洗浄後、0.5% Triton[®] X-100 で 20 分間処理した。1% BSA で洗浄後、3% BSA で一晩ブロッキング処理した。その後、10 mM Alexa Fluor[®] 568 azide (Invitrogen) 1 μl に対し、1 mM copper (II) sulfate, 100 mM ascorbic acid, 1% BSA を、各々 500 μl 、200 μl 、300 μl の割合で混合した液をのせ、遮光して、 37°C で 60 分間インキュベートした。洗浄後、前述と同じ方法で dystrophin およ

び核の染色を行った。この染色像から、EdU 陽性である核数を測定した。

4. 研究成果

(1) 筋力増強運動による萎縮筋の筋質量および横断面積の増加

まず、14 日間の尾部懸垂による筋萎縮の程度を調べた。尾部懸垂を 14 日間施した TS 群の筋腹横断面積は $0.46 \pm 0.16 \text{ mm}^2$ であり、尾部懸垂を行わなかった nonTS 群の面積 ($1.29 \pm 0.25 \text{ mm}^2$) と比べて有意に小さかった。この時の筋線維横断面積は $843 \pm 140 \mu\text{m}^2$ であり、尾部懸垂を行わなかった nonTS 群の面積 ($1953 \pm 78 \mu\text{m}^2$) と比べて小さかった。また、筋あたりの筋線維数 (474 ± 37 本) も、nonTS 群の数 (625 ± 50 本) と比べて有意に小さかった。筋線維あたりの筋線維核数も TS 群で 0.41 ± 0.10 であり、nonTS 群 (0.59 ± 0.09) と比べて有意に少なかった。

この筋萎縮モデルマウスに対して筋力増強運動を 7 日間行い、筋萎縮からの回復促進効果を調べた。筋萎縮後の 7 日間に筋力増強運動を行った RE 群の筋腹横断面積は $1.16 \pm 0.13 \text{ mm}^2$ であり、尾部懸垂後 7 日間普通飼育した nonRE 群の面積 ($0.89 \pm 0.10 \text{ mm}^2$) よりも有意に大きかった。しかし、RE 群の筋腹横断面積は、尾部懸垂を行わなかった CON 群の面積 ($1.26 \pm 0.26 \text{ mm}^2$) に比べて小さく、完全な回復には至らなかった。RE 群の筋線維横断面積は $1843 \pm 194 \mu\text{m}^2$ であり、nonRE 群の面積 ($1315 \pm 153 \mu\text{m}^2$) よりも有意に大きかった。この RE 群の筋線維横断面積は、CON 群の面積 $2005 \pm 196 \mu\text{m}^2$ に比べて小さいが有意差はなかった (図 1A)。RE 群の筋線維数は 601 ± 124 本であり、nonRE 群 (584 ± 116 本)、CON 群 (589 ± 601 本) との間には有意な差がなかった (図 1B)。以上の結果は、筋力増強運動が筋萎縮により減少した筋線維横断面積の回復を促進した事を示している。

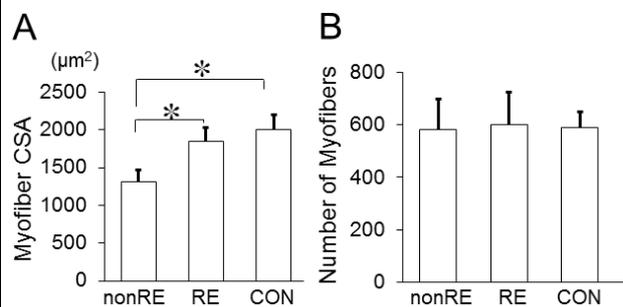


図 1 筋線維の横断面積および数に対する 7 日間の筋力増強運動の効果
尾部懸垂開放 7 日後の筋線維横断面積および筋線維数を示す (Mean \pm SD)。*: $p < 0.05$

(2) 筋力増強運動による筋線維核数増加

筋線維の大きさと筋線維あたりの筋線維核数には正の相関があるといわれる。そこで、筋萎縮後7日間の筋力増強運動によって起こった筋線維横断面積の回復に伴う筋線維核数の変化を調べた。その結果、RE群の筋線維1本あたりの筋線維核数は 0.92 ± 0.14 であり、筋力増強運動を行わずに飼育した nonRE群の数 (0.57 ± 0.03) よりも有意に多かった (図2)。驚くことにこの値は、尾部懸垂を行っていない CON群の数 (0.56 ± 0.11) の1.6倍であり、7日間で急激な筋線維核数の増加が起こったことが分かった。

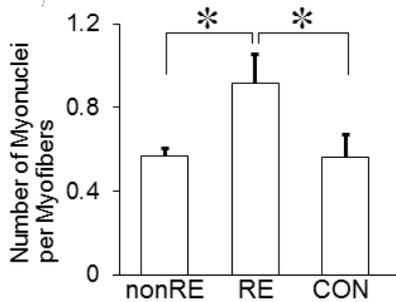


図2 筋線維1本あたりの筋線維核数に対する筋力増強運動の効果

尾部懸垂開放7日後の筋線維1本あたりの筋線維核数を示す (Mean ± SD)。*: $p < 0.05$

さらにこの筋線維核数の急激な増加に、新たに増殖した細胞が関与しているかどうかを調べた。筋力増強運動を開始した直後、1日後、2日後に核酸の誘導体である EdU を投与し、DNA 合成期にある細胞を標識した。運動開始直後、1日後、2日後に筋組織を採取し筋線維内の EdU 陽性核数を計測した。筋萎縮後に筋力増強運動を行ったすべてのマウスには、筋線維内の EdU 陽性の核が観察された (図3A)。EDU 陽性の筋線維核数は、運動開始直後の投与で 0.0116 ± 0.0159 /本、1日目の投与で 0.0138 ± 0.0066 /本と少なかった。しかし、運動開始2日目の投与では 0.1125 ± 0.0172 /本と非常に多かった (図3B)。EdU の血中半減期は約48時間であることから、運動開始2日目以降に筋芽細胞が急激に増殖し、既存の筋線維へ融合することが示唆された。筋線維あたりの筋線維核の総数は、運動開始後4日目の時点で既に 1.01 ± 0.23 であり、尾部懸垂後7日間筋力増強運動を行った RE群と同じ数まで増加していた。このことから、筋芽細胞の増殖と融合は筋力増強運動開始から4日以内にほぼ完了することが示唆された。

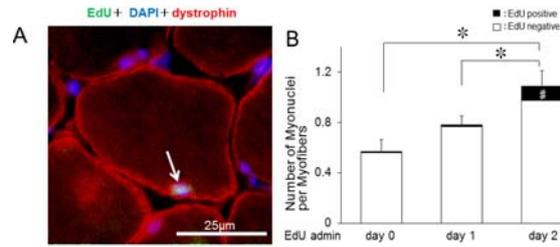


図3 EdU 陽性の筋線維核像および

EdU 陽性筋線維核の筋線維あたりの数

EdU、Dystrophin、核の染色像の一例および筋線維1本あたりの筋線維核数の内、EdU 陽性核の数を示す (Mean ± SD) *: 筋線維核数に $p < 0.05$, #: EdU 陽性核数に day0、1 と比べ $p < 0.05$

(3) 筋線維核新生後の筋力増強運動の有無と筋萎縮回復促進の効果との関係

筋力増強運動を4日間行って筋線維核数を増加させると、それ以降の筋力増強運動を行わなくても7日後に筋萎縮からの回復促進効果が得られるかもしれない。筋力増強運動を行う期間が短くなれば、対象者の負担軽減やリハビリテーション期間の短縮に繋がる。そこで、尾部懸垂後に筋力増強運動を4日間行い、それ以降7日目まで運動せず飼育したときの筋萎縮からの回復促進効果を調べた。その結果、筋線維横断面積 ($1221 \pm 400 \mu m^2$) は、7日間筋力増強運動を行った RE群よりも有意に小さく (図4A)、7日間継続して筋力増強運動を行わなければ回復促進効果が得られないことがわかった。また、一旦増加したはずの筋線維核数 (0.56 ± 0.14) は、RE群よりも有意に少なく (図4B)、アポトーシスにより減少する可能性が示唆された。

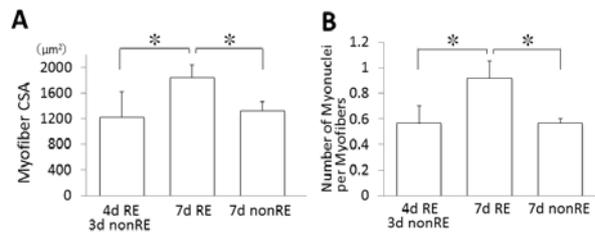


図4 筋線維横断面積および筋線維核数に対する筋力増強運動の中断効果

尾部懸垂開放後、4日間筋力増強運動を行った後、運動を中断した時の筋線維横断面積および筋線維核数を示す (Mean ± SD)。*: $p < 0.05$

以上のことより、筋力増強運動を7日間継続して行うことが、筋萎縮からの回復促進に重要であることが判明した。また、この回復促進効果には、筋衛星細胞などから新生され

た細胞の関与が示唆された。本研究成果は、臨床における筋萎縮からの回復促進方法の開発や、萎縮筋に対する筋力増強運動効果のメカニズム解明の発展に繋がると考える。

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)

[学会発表] (計 4 件)

① Yuta Itoh ・ Nobuhide Agata ・ Masumi Miyazu ・ Takayuki Hirano ・ Keisuke Kawakami . Myonuclei Increase through Resistance Exercises on Mouse Skeletal Muscle that Underwent Muscle Atrophy. World Physical Therapy 2011 (World Confederation for Physical Therapy), 20-23 June. 2011. Amsterdam.

② Yuta Itoh ・ Nobuhide Agata ・ Masumi Miyazu ・ Masahiro Sokabe ・ Keisuke Kawakami. Effect of resistance exercise on the recovery of atrophied muscles in mice. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (IACPB, JSCP and SCJ), 1-5 June. 2011. Nagoya.

③ 伊東佑太・縣信秀・宮津真寿美・平野孝行・河上敬介. 筋力増強運動の期間が萎縮筋の筋線維の太さや数、筋核数に与える影響, 第 46 回日本理学療法学会 (社団法人 日本理学療法士協会), 2011. 5. 28. 宮崎.

④ 伊東佑太・岡元信弥・縣信秀・宮津真寿美・平野孝行・河上敬介. 萎縮筋に対する負荷運動は、筋核を増加させる. 第 45 回日本理学療法学会 (社団法人 日本理学療法士協会), 2010. 5. 27. 岐阜.

[その他]

ホームページ:

<http://www.maruron-ac.net/ngu-u/public/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 佑太 (ITO H YUTA)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・助手

研究者番号: 30454383