

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：35413

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650343

研究課題名(和文) 廃用性萎縮筋の筋線維構造と筋細胞外環境の統合的解析

研究課題名(英文) Integrative Analysis of Structure and Extracellular Environment in Disuse Atrophic Skeletal Muscle

研究代表者

清水 壽一郎 (Shimizu, Juichiro)

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80294403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：現在我が国は超高齢化社会と言う問題に直面している。すべての高齢者が、健康で自立した生活を送ることが理想であるが、脳血管障害に伴う麻痺、外傷や疾病に伴う長期臥床など一次障害を契機とした廃用症候群、加齢に伴う老化現象により自立生活が制限された方も非常に多く、その予防と機能回復を進めることは喫緊の課題である。そこで、筋細胞の受動的特性やクロスブリッジ形成量について組織レベル、細胞レベルでの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Currently our country is facing a serious problem that the super-aging society. It is quite ideal that all elder people spend their life without being suffering from any physical and social discomfort. However, number of elder people have poor activity of daily life due to disuse syndrome, due to aging, paralysis with cerebral vascular diseases, chronic obstructive pulmonary disease, sarcopenia with fracture, congestive heart failure, and so on. Muscle atrophy is a condition that occurs not only in elder people, but also young healthy people in case of astronauts who is exposed to the microgravity environment, and cast immobilization due to fracture. Thus, it is important to reveal the mechanism of muscle atrophy and mechanical properties of atrophied muscle. In this study, we performed experiments of passive transvers stiffness of muscle cells with an atomic force microscope and x-ray diffraction of muscle tissue in synchrotron radiation facility.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

科研費の分科・細目：リハビリテーション医学

キーワード：廃用性 筋萎縮 原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

現在我が国は超高齢化社会と言う問題に直面している。すべての高齢者が、健康で自立した生活を送ることが理想であるが、脳血管障害に伴う麻痺、外傷や疾病に伴う長期臥床など一次障害を契機とした廃用症候群、加齢に伴う老化現象や呼吸不全に伴う呼吸筋の疲弊などによるサルコペニアにより、自立生活が制限された方も非常に多く、その予防と機能回復を進めることは喫緊の課題である。

このような廃用症候群やサルコペニアの症状として筋萎縮が問題になることが多い。病態的には筋への力学的負荷あるいは力学的抵抗の消失・減弱により筋線維のタイプ移行が起こる。これは遅筋有意の筋組織で多く観察され、易疲労性で収縮速度が速い筋線維へと変化し、段階的に Type a Type x Type b へ変化する。これは筋量の変化とは別に起こる可能性も示唆されている。さらに、分子レベルではミオシンアイソザイムの変化の他、ミオシン線維を連結しているタイティンの減少とサブタイプ変化も筋の収縮特性、受動的力学特性に影響を与えることが知られている。

筋萎縮は高齢者に限らず、骨折などによるギプス固定や宇宙飛行士など微小重力環境への曝露など、健康者であっても惹起されうる病態である。筋萎縮は分解される筋量が合成される筋量を上回るために起こる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、筋萎縮時および予防法、治療法の効果を筋線維の構造と受動的力学的特性対象に、生体医工学的な手法により統合的に解析し、筋萎縮の病態、予防、治療に効果的な判定指標を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット短指屈筋細胞の単離

雄 Wistar ラット (9~10 週齢) をペントバルビタール (200mg/kg, i.p.) により深麻酔し、サクリファイスした。70%エタノールにより脚部~足部を消毒し、両足関節にて切離する。切離した足をクリーンベンチ内の解剖用シャーレに移し皮膚を切開した。両足から短指屈筋を傷つけないように摘出し、滅菌リンゲル液に浸漬後、シリコンシートに固定した。実体顕微鏡下で短指屈筋の附属組織を鑷子および剪刀で除去した。

0.3% コラゲナーゼ溶液をフィルターに

より滅菌し、短指屈筋を入れた 35mm ディッシュに注ぎ、3 時間インキュベーションした。

滅菌リンゲル液でコラゲナーゼをウォッシュアウトし、短指屈筋組織を DMEM 培養液をいれた 50ml コニカルチューブに移す。ピペティング操作により骨格筋線維を分散し、残余の組織片は除去した。

静置による沈渣を DMEM で攪拌し、培養ディッシュに移し、12 時間インキュベートする。この時、線維芽細胞はディッシュに接着するため、浮遊している筋線維を実験に用いた。

### (2) 廃用性萎縮モデルの作成

雄 Wistar ラット (9~10 週齢) をペントバルビタール (50mg/kg, i.p.) により麻酔し、片側の坐骨神経を 2mm 切離し 3~4 週間経過を見て実験に用いた。

### (3) 原子間力顕微鏡による観察。

原子間力顕微鏡のカンチレバーを単離骨格筋線維に接触させ、さらにカンチレバーを押し込んだときのカンチレバーの撓み量を計測し、ヘルツモデルに基づき以下の式から Elastic module を求めた。

$$F = 2 \cdot \frac{1}{2} \cdot E / (1 - 2) \cdot \tan$$

ここで、F は押し込んだときの力、E は Elastic module、 $\theta$  はポアソン比であり細胞を非弾性圧縮体と見なすと値は 0.5、 $\alpha$  はカンチレバーの開角、 $L$  は押し込んだ長さである。対照群、廃用性筋萎縮群の各動物からの筋線維を解析に供する予定であったが、廃用性筋萎縮群の単離骨格筋細胞は様々な検討を行ったが単離後の生存期間が各種解析に供するには不十分であった。

そこで、解析手技の確立を目的に、単離心筋細胞を用いて実施し、平行して単離骨格筋細胞の生存率向上を図った。

### (4) モデル動物作成

雄 Wistar ラット (9~10 週齢) をペントバルビタール (50mg/kg, i.p.) にて麻酔後、項部に 1cm ほどの切開を加え背部に向けて全長 3cm ほどの皮下ポケットを作成、浸透圧ポンプ (Alzet, model 2001; 1.0 $\mu$ L/h) を埋め込み縫合した。浸透圧ポンプによりイソプロテレノール (2.4mg/kg/日、7 日間) を持続投与し、左室肥大モデルを作成した (イソプロテレノール群)。また、対照群も同様に浸透圧ポンプを埋め込

んだが、塩酸にて pH7.4 に調整した生理食塩液のみが流出することとした。

#### (5) 超音波検査

浸透圧ポンプを埋め込み後 7 日目に心臓超音波検査を行った。ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔後、左側臥位とし傍胸骨アプローチにて左室短軸像を描出し、左心室短縮率を計測した。また心尖部からの四室像から、僧帽弁の血流速度 (E 波、A 波) を記録した。

#### (6) 組織標本

一部のモデルから組織標本を作製した。ペントバルビタール (200mg/kg, i.p.) にて犠死後、心臓を摘出し大動脈から PBS を逆行性に灌流し血液を除去した。次いで 4% パラホルムアルデヒドにて固定、パラフィン包埋後、5 $\mu$ m 厚でスライスした。スライドガラスに接着後、Masson's trichrome にて染色し、観察した。

#### (7) 単離心筋細胞の作成

ラットをペントバルビタール (200mg/kg, i.p.) にて犠死後、大動脈からコラゲナーゼ (0.8mg/ml, 新田ゼラチン) 加タイロート溶液を灌流した。左室壁が軽度の機械的操作でほぐれるまで柔らかくなったことを確認し、培養液に心筋細胞を分散、Poly L-Lysine でコートしたカバーガラスボトム (35mm 培養皿) に移し、12~18 時間インキュベートし接着させた。

#### (8) Passives stiffness 解析

単離心筋細胞の Passives stiffness を計測するため、原子間力顕微鏡を利用した。原子間力顕微鏡のカンチレバーを心筋細胞に接触させ、さらにカンチレバーを押し込んだときのカンチレバーの撓み量を計測し、ヘルツモデルに基づき以下の式から Elastic module を求めた。

$$F = 2 \cdot l \cdot E / (1 - 2) \cdot \tan$$

ここで、F は押し込んだときの力、E は Elastic module、 $l$  はポアソン比であり細胞を非弾性圧縮体と見なすと値は 0.5、 $\theta$  はカンチレバーの開角、 $L$  は押し込んだ長さである。対照群、イソプロテレノール群の各動物から 10 心筋細胞をそれぞれ計測に供した。どちらの群も通常のタイロート溶液中で静止時に計測し、その後 2,3-butanedione monoxime および blebbistatin 存在下に残存しているクロ

スブリッジを解除し、新たなクロスブリッジの形成を抑制した状態で計測し、解析した。

#### (9) X 線回折実験

本解析では大型放射光施設 (SPring-8) にて実験を行った (BL-40B2)。X 線ビームのサイズは水平方向が 0.25 mm、垂直方向が 0.10 mm というサイズである。撮像はベリリウムイメージインテンシファイア (V5445P, Hamamatsu Photonics) をもった高速 CCD カメラ (C4880-80-24A, Hamamatsu Photonics) を用いて記録した。

標本は対照群および肥大群ラットの右心室乳頭筋を、特別に作成した張力トランスデューサーおよび筋長コントロール装置にセットし、乳頭筋中央部に X 線ビームが通過するように調整した。X 線回折像は、筋線維の走行方向と垂直な方向に赤道反射として観察される。筋線維からの X 線回折像は基本的に X 線ビームを中心として点対称の関係を持つため、対向する二つの赤道反射は結晶学的には等価である。また、骨格筋ではアクチン線維、ミオシン線維による六角格子構造からの赤道反射のほか、アクチンやミオシンの繊維の長軸方向の繰り返し構造からの子午反射、アクチンのらせん構造からの層線が観察されるが、心筋では赤道反射のうち (1,0)、(1,1) 反射のみが観察される。各赤道反射 (1,0)、(1,1) 反射の輝度分布曲線を得た後、背景放射を表す四次関数と (1,0)、(1,1) 反射の分布を表す二つのガウス関数からなる曲線でカーブフィッティングし、それぞれのガウス関数の係数から (1,0)、(1,1) 反射強度を求めた。この反射強度からそれらの比  $I(1,0)/I(1,1)$  からクロスブリッジ形成量を推定することができる。

また、(1,0)、(1,1) 反射の位置が筋線維六角格子の格子間隔を反映することが知られており、六角格子上の (1,0) 平面間の間隔 ((1,0) 格子間隔、 $d_{1,0}$ ) は (1,0) 反射の位置から求められる。格子間隔を求める上でのキャリブレーションにはカエル骨格筋からの 14.3 nm の子午反射を利用した。

#### 4. 研究成果

肥大モデルでの超音波検査の結果を表 1 に示す。

	対照群	肥大群
中隔	1.6 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1*

(mm)		
拡張期内径 (mm)	6.7±0.2	6.8±0.2
収縮期内径 (mm)	3.1±0.1	3.1±0.1
後壁 (mm)	1.8±0.1	2.1±0.1
短縮率 (%)	54±1	55±2
E/A	1.6±0.1	1.7±0.1

表1 超音波解析結果

中隔厚のみ有意差を認めた (\*; p<0.05 vs. 対照群)

組織標本での特徴として、対照群に対して肥大群では前周性の壁肥厚に加え、細胞周囲の結合組織の増加が著明であった。

Passive stiffness 解析の結果、弛緩状態のElastic moduleは対照群に比べ肥大群で有意に高い、即ちカンチレバーの押し込みに対して有意に硬い細胞であることが判明した。一方、肥大群の心筋細胞に対し、2,3 butanedione monoxim (2,3-BDM) および blebbistatin にて、筋線維アクチン、ミオシン相互作用を完全にブロックすると、肥大群のElastic moduleも対照群と同程度に有意に低下し、対照群との差異も認められないことを明らかにした。

X線回折実験では、弛緩期の(1,0)/(1,1)反射輝度比に注目した。対照群では通常のタイロッド溶液での灌流時と2,3-BDMでの灌流時で(1,0)/(1,1)反射輝度比に有意な差は認めなかった。一方、肥大群では通常のタイロッド溶液で灌流した際には、対照群のそれと比較し(1,0)/(1,1)反射輝度比の有意な低下を認めた。これは、弛緩期にあっても対照群と比較して残存しているアクチン-ミオシン相互作用すなわちクロスブリッジ数が多いことを示している。さらに、肥大群に2,3-BDMを作用させると、(1,0)/(1,1)反射輝度比は対照群と同程度に増加し、その有意差も認められないことを明らかにした。

これらの結果からイソプロテレノールにより誘導された肥大心筋細胞では弛緩期に於いて、正常な心筋細胞と比較して有意に多いクロスブリッジの残存を認め、これはPassive stiffness 解析における弛緩状態でのElastic moduleの増大としても観察さ

れており、拡張期心不全として扱われる左室弛緩機能異常についてその原因の一つである可能性を明らかにした。

## 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)

[雑誌論文](計3件)

Increased passive stiffness of cardiomyocytes in the transverse direction and residual actin and myosin cross-bridge formation in hypertrophied rat hearts induced by chronic -adrenergic stimulation.

Sumita Yoshikawa W, Nakamura K, Miura D, Shimizu J, Hashimoto K, Kataoka N, Toyota H, Okuyama H, Miyoshi T, Morita H, Fukushima Kusano K, Matsuo T, Takaki M, Kajiya F, Yagi N, Ohe T, Ito H. Circ J. 2013;77(3):741-8. Epub 2012 Dec 6.

査読あり

Effects of propofol on left ventricular mechanoenergetics in the excised cross-circulated canine heart.

Fujinaka W, Shimizu J, Iribe G, Imaoka T, Oshima Y, Kiyooka T, Morita K, Mohri S. Acta Med Okayama. 2012;66(6):435-42.

査読あり

Energy for myocardial Ca<sup>2+</sup> handling per beat increases with heart rate in excised cross-circulated canine heart.

Kiyooka T, Oshima Y, Fujinaka W, Iribe G, Mohri S, Shimizu J.

Tokai J Exp Clin Med. 2014 Mar 20;39(1):51-8.

査読あり。

[学会発表](計5件)

ラット新生児の心筋六角格子発達過程についての基礎解析

竹内祐貴、中村一文、三浦大志、清水壽一郎 2011/10/22 第34回日本生体医工学会中国四国支部大会、徳島、日本

Increased Heart Rate Reduced Crossbridge Formation in Beating Rat Whole Heart

Yamato Tamura, Takehiro Miyasaka, Juichiro Shimizu 2012/1/5-7 IEEE-EMBS

International Conference on Biomedical and Health Informatics (BHI2012), Shenzhen, China

Cellular basis analyses of afterload dependent increasing in crossbridge formation in ejecting rat

Yamato Tamura1), Takehiro Miyasaka2), Juichiro Shimizu 2012/10/26-27 The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, Fukuoka, Japan

Afterload dependent increasing in crossbridge formation in ejecting rat Yamato Tamura, Kengo Horiuchi, Takehiro Miyasaka3), Juichiro Shimizu 2013/6/30-7/4 International Society for Heart Research, Sandiego, USA

Cellular basis analyses of afterload dependent increasing in crossbridge formation in ejecting rat heart Yamato Tamura, Kengo Horiuchi, Takehiro Miyasaka, Juichiro Shimizu 2013/7/21-26 International Union of Physiological Science 2013, Birmingham, UK

〔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

清水壽一郎 (SHIMIZU JUICHIRO)  
広島国際大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：80294403

### (2) 研究分担者

中島正光 (NAKAJIMA MASAMITSU)  
広島国際大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：20198097

小澤淳也 (OZAWA JUNYA)  
広島国際大学・総合リハビリテーション学部・准教授  
研究者番号：00435059

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：