

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：33930
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23700647
研究課題名（和文） 骨格筋サイズの制御における筋膜再構築機構の役割解明と運動器機能の維持向上への応用
研究課題名（英文） The responses of tripartite motif-containing 72 to the changes in skeletal muscle mass of mice
研究代表者 大野 善隆 (OHNO YOSHITAKA) 豊橋創造大学・保健医療学部・講師 研究者番号：80440808

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋量の変化に伴う骨格筋細胞膜再構築タンパク質 tripartite motif-containing 72 (TRIM72) 発現量の変化を検討した。その結果、萎縮筋における TRIM72 の減少ならびに Akt/p70S6 kinase (p70S6K) のリン酸化の減少を認めた。また、萎縮後の再成長において TRIM72 の増加、Akt/p70S6K のリン酸化の増加が認められた。一方、肥大筋では Akt/p70S6K のリン酸化の増加が認められたものの、TRIM72 発現量に変化は認められなかった。萎縮とその再成長と筋肥大では骨格筋サイズの変化に伴う骨格筋細胞膜再構築機構は異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Protein expression levels of tripartite motif-containing 72 (TRIM72) in atrophied, regrown, and hypertrophied mouse soleus muscle were investigated. In unloading-associated atrophied muscle, the mean expression levels of TRIM72, phospho-Akt (p-Akt) and phospho-p70S6K (p-p70S6K) were decreased. On the other hand, the increase in the expressions of TRIM72, p-Akt and p-p70S6K were observed during muscle regrowth of atrophied muscle. Although the expression levels of p-Akt and p-p70S6K were also increased in overloading-associated hypertrophied muscle, TRIM72 expression was stable. These observations strongly suggested that a role of TRIM72 might be different between hypertrophy and regrowth of skeletal muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：細胞・組織、ストレス、筋肥大、筋萎縮、筋細胞膜

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は可塑性に富んだ器官であり、外部環境に適応して構造的かつ機能的に変化する。筋細胞はリン脂質により構成される細胞膜により覆われており、物理的または化学的な要因により損傷が生じる。例えば、筋力トレーニングなどにみられるように骨格筋に対する負荷量の増大は筋線維の肥大をもたらすが、この筋肥大に先立っ

て骨格筋の細胞膜に損傷が生じると考えられている。これに対し負荷量や活動量の低下により骨格筋が萎縮することはよく知られているが、筋細胞膜損傷後の修復不全により細胞死が亢進し筋萎縮が生じることも報告されている。したがって、外部環境に適応した骨格筋サイズの変化には筋細胞膜の重要性が示唆される。筋特異的タンパク質である tripartite motif

-containing 72 (TRIM72) は、骨格筋細胞膜に発現することが知られており、筋細胞膜の再構築に重要な役割を持つことが示唆されている。骨格筋の形成において、筋芽細胞が融合・分化して多核の筋管細胞が形成されるが、その際に膜構造が再構築される。TRIM72 は筋芽細胞では発現せず、筋管細胞への分化に伴い増加することが報告されている。しかしながら、骨格筋サイズの変化に伴う TRIM72 の挙動とその役割は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、外部環境に適応した骨格筋量の変化における、(1)筋細胞膜再構築に作用する骨格筋特異的タンパク質 TRIM72 の発現変化、(2)TRIM72 発現に関与する因子である Akt ならびに p70 S6 kinase (p70S6K) の応答を明らかにし、骨格筋サイズの変化における TRIM72 の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、豊橋創造大学・実験動物飼育管理研究施設動物実験実施指針に従い、豊橋創造大学動物実験委員会による審査・承認を経て実施された。

(1) 実験動物

実験には、生後 11 週齢の雄性マウス (C57BL/6J) 72 匹を用い、ヒラメ筋を対象筋とした。マウスを筋萎縮モデル (n=30)、筋再成長モデル (n=24)、筋肥大モデル (n=18) に分類した。全ての動物を、気温 23°C、明暗サイクル 12 時間の環境下で飼育した。なお、自由に餌および水を摂取できるように配慮した。

①筋萎縮モデル作成、サンプル採取

マウスに対して 2 週間の後肢懸垂により、ヒラメ筋の筋活動を減少させた。後肢懸垂前と後肢懸垂開始後 1、3、7 および 14 日目に、両後肢のヒラメ筋を摘出した。後肢懸垂前を対照群と設定した。

②筋再成長モデル作成、サンプル採取

マウスに対して 2 週間の後肢懸垂により、ヒラメ筋の筋活動を減少させて萎縮を惹起させた後、通常飼育に戻し再荷重を負荷した。後肢懸垂終了後 0、1、3 および 7 日目に、両後肢のヒラメ筋を摘出した。後肢懸垂終了直後 (0 日目) を対照群と設定した。

③筋肥大モデル作成、サンプル採取

マウスの右後肢を対照群、左後肢を肥大群として設定した。左後肢は、ヒラメ筋の

共同筋である腓腹筋腱を切除した。共同筋腱切除後 7、14 および 21 日目に、両後肢のヒラメ筋を摘出した。

(2) 筋重量

筋組織の摘出後即座に結合組織を除去した後、筋湿重量を測定した。筋湿重量測定後、液体窒素を用いて急速凍結し -80°C で保存した。

(3) TRIM72、p-Akt、p-p70S6K 発現量

① タンパク発現量

筋重量測定後、筋組織の一部を protease inhibitor 及び phosphatase inhibitor を含むライセートバッファーを用いてホモジネートし、Bradford 法により筋タンパク量を測定した。さらに、ウェスタンブロット法により、Trim72 の発現量、Akt (phosphorylated Akt、total Akt) と p70S6K (phosphorylated p70S6K、total p70S6K) の発現量を測定した。内在性コントロールには glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、この GAPDH のタンパク発現量に対する TRIM72 の相対的発現量を算出し、評価した。Akt と p70S6K については、全タンパク質 (total Akt、total p70S6K) に対するリン酸化タンパク質 (phosphorylated Akt、phosphorylated p70S6K) の割合から相対的リン酸化レベルを算出し、評価した。

② mRNA 発現量

筋組織の一部より全 RNA を抽出・精製し、cDNA に逆転写した。定量 PCR 法により、TRIM72 の発現量を測定した。内在性コントロールには GAPDH を用い、この GAPDH の mRNA 発現量に対する TRIM72 の相対的発現量を算出し、評価した。

(4) 統計処理

すべての測定値は、平均±標準誤差 (SEM) で示した。筋萎縮モデルならびに筋再成長モデル実験における平均値の比較を、一元配置分散分析 (one-factor ANOVA) を用いて行った。one-factor ANOVA にて有意差を認めた場合は、多重比較検定に Tukey-Kramer 法を適用し、有意差を判定した。筋肥大モデル実験における平均値の比較を、二元配置分散分析 (two-factor ANOVA) を用いて行った。two-factor ANOVA にて有意差を認めた場合は、多重比較検定に Tukey-Kramer 法を適用し、有意差を判定した。すべての検定において、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 筋重量

後肢懸垂中、マウスの体重に有意な変化は認められなかった。2週間の後肢懸垂による筋活動量の減少により、ヒラメ筋の筋重量は徐々に減少し、後肢懸垂7日目以降に筋重量の有意な減少が認められた(図1、 $p < 0.05$)。2週間の後肢懸垂後、通常飼育に戻しヒラメ筋の活動量を増加させることで、筋重量が徐々に増加した。再荷重7日目に筋重量の有意な増加が認められた(図2、 $p < 0.05$)。ヒラメ筋の共同筋である腓腹筋腱の切除により、ヒラメ筋の活動量を増加させることで、筋重量の増加が認められた。肥大群の筋重量は、対照群に比べて有意に高値を示した(図3、 $p < 0.05$)。

(2) TRIM72

後肢懸垂による筋活動の抑制はTRIM72のmRNAならびにタンパク質の発現を徐々に減少させた。後肢懸垂14日目、TRIM72のmRNAならびにタンパク質の発現は対照群に比べて有意に低値を示した($p < 0.05$)。一方、後肢懸垂後の再荷重による筋活動の促進はTRIM72のmRNAならびにタンパク質の発現を増加させた。再荷重7日目以降TRIM72 mRNAは有意に増加し、再荷重14日目にTRIM72タンパク質の有意な増加が認められた($p < 0.05$)。さらに、共同筋切除によるヒラメ筋の活動量増大によって肥大群のTRIM72 mRNAの増加が認められたもの($p < 0.05$)、TRIM72タンパク質の発現量に変化は認められなかった。

(3) p-Akt、p-p70S6K

後肢懸垂による萎縮筋においてリン酸化Aktならびにリン酸化p70s6Kの減少を認めた。後肢懸垂14日目にAktのリン酸化レベルの有意な低下が認められ、後肢懸垂1日目以降にp70S6Kのリン酸化レベルの有意な低下が認められた($p < 0.05$)。また、後肢懸垂後の再荷重による筋再成長ではリン酸化Aktならびにリン酸化p70S6Kの増加が認められた。再荷重1日目以降のAktならびにp70S6Kのリン酸化レベルは対照群に対して有意に高値を示した($p < 0.05$)。さらに、共同筋切除による肥大群は、対照群に比べてAktならびにp70S6Kのリン酸化レベルの有意な増加が認められた($p < 0.05$)。

本研究の検討により、萎縮とその再成長と筋肥大では骨格筋サイズの変化に伴う骨格筋細胞膜再構築機構は異なることが示唆された。

骨格筋が形態的に変化するには筋細胞膜の再構築が必要であると考えられ、筋細胞膜再構築機構が明らかになることで効率的な骨格筋増量方法の開発につながり、

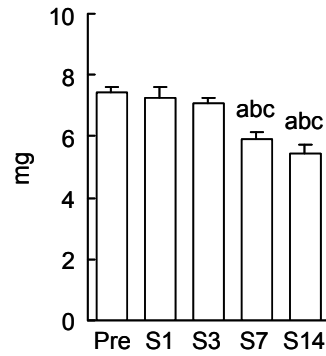


図1. 後肢懸垂によるヒラメ筋の筋重量の変化

Pre: 後肢懸垂前. S1, S3, S7, S14: 後肢懸垂開始後1, 3, 7, 14日目. 平均±標準誤差. a, b, c: $p < 0.05$ vs. Pre, S1, S3.

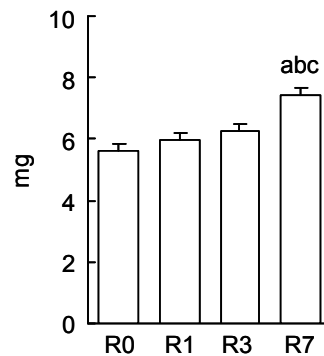


図2. 後肢懸垂後の再荷重によるヒラメ筋の筋重量の変化

R0: 再荷重前. R1, R3, R7: 再荷重開始後1, 3, 7日目. 平均±標準誤差. a, b, c: $p < 0.05$ vs. R0, R1, R3.

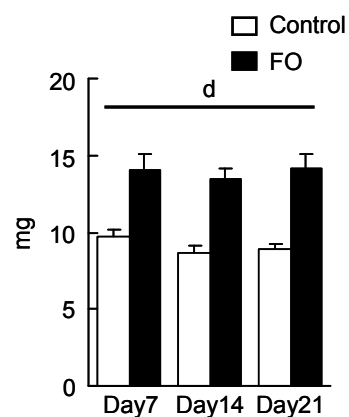


図3. 共同筋腱切除後のヒラメ筋の筋重量の変化

Control: 対照群. FO: 肥大群. Day7, Day14, Day21: 共同筋切除後7, 14, 21日目. 平均±標準誤差. d: $p < 0.05$ Control vs. FO.

高齢者の健康維持はもちろん様々な生活習慣病の予防に大きく貢献できると考えている。また、筋ジストロフィーなど筋細胞膜の損傷および修復不全に由来する様々な臨床症状に対するカウンターメジャーやリハビリテーションなど臨床医学への寄与も大きいと考えている。

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 5 件)

- ① Ohno Y, Yamada S, Goto A, Ikuta A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Effects of heat stress on muscle mass and the expression levels of heat shock proteins and lysosomal cathepsin L in soleus muscle of young and aged mice, *Mol Cell Biochem*, 査読有、369(1-2)、2012、45-53
DOI:10.1007/s11010-012-1367-y
- ② Sandonà D, Desaphy JF, Camerino GM, Bianchini E, Ciciliot S, Danieli-Betto D, Dobrowolny G, Furlan S, Germinario E, Goto K, Gutschmann M, Kawano F, Nakai N, Ohira T, Ohno Y, Picard A, Salanova M, Schiffl G, Blottner D, Musarò A, Ohira Y, Betto R, Conte D, Schiaffino S, Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission, *PLoS ONE*, 査読有、7(3)、2012、e33232
DOI:10.1371/journal.pone.0033232
- ③ K. Goto, Y. Ohno, A. Goto, A. Ikuta, M. Suzuki, T. Ohira, N. Tsuchiya, S. Nishizawa, T. Koya, T. Egawa, T. Sugiura, Y. Ohira and T. Yoshioka, Some aspects of heat stress on the plasticity of skeletal muscle cells, *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 査読有、1(2)、2012、197-204
DOI:10.7600/jpfs.1.197
- ④ Ohno Y, Yamada S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Possible role of NF- κ B signals in heat stress-associated increase in protein content of cultured C2C12 cells, *Cells Tissues Organs*, 査読有、194、2011、363-370
DOI:10.1159/000323324

- ⑤ Yasuhara K, Ohno Y, Kojima A, Uehara K, Beppu M, Sugiura T, Fujimoto M, Nakai A, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Absence of heat shock transcription factor 1 retards the regrowth of atrophied soleus muscle in mice, *Journal of Applied Physiology*, 査読有、111、2011、1142-1149
DOI:10.1152/jappphysiol.00471.2011

[学会発表] (計 8 件)

- ① 大野善隆, 後藤勝正, 杉浦崇夫, 大平充宣, 吉岡利忠, 筋萎縮後の回復に及ぼす微弱電流刺激の影響、第 58 回日本宇宙航空環境医学会大会、2012 年 11 月 15 日、豊橋商工会議所 (愛知県)
- ② 大野善隆, 深見真之介, 犬塚隼輝, 磯村典輝, 藤谷博人, 後藤亜由美, 生田旭洋, 後藤勝正、マイクロカレント刺激が骨格筋細胞に与える影響に関する基礎的研究、第 20 回日本物理療法学会学術大会、2012 年 10 月 27 日、佛教大学二条キャンパス (京都府)
- ③ Y. Ohno, A. Ikuta, A. Goto, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, K. Goto, Effects of unloading and reloading on expressions of skeletal muscle membrane proteins in mice, The 33th Annual International Gravitational Physiology Meeting、2012 年 6 月 19 日、University of Aberdeen (Aberdeen, United Kingdom)
- ④ 大野善隆, 後藤勝正、温熱刺激による骨格筋肥大と HSP25 および HSP72 発現誘導の生理学的意義、第 47 回日本理学療法学会学術大会、2012 年 5 月 25 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- ⑤ 大野善隆, 後藤勝正, 杉浦崇夫, 大平充宣, 吉岡利忠, 筋細胞膜修復タンパクの発現に及ぼす後肢懸垂とその後の再荷重の影響、第 57 回日本宇宙航空環境医学会大会、2011 年 11 月 25 日、宇宙航空研究開発機構筑波宇宙センター (茨城県)
- ⑥ Y. Ohno, K. Goto, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, Up-regulation of heat shock proteins in skeletal muscle of heat shock transcription factor 1-null mice, The 32nd Annual International Gravitational

Physiology Meeting、2011年11月4日、
Saint Claire Hotel (San Jose,
California, USA)

- ⑦ 大野善隆、後藤勝正、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、骨格筋の形態的变化が筋細胞膜修復タンパクの発現に及ぼす影響、第66回日本体力医学会大会、2011年9月18日、海峡メッセ下関(山口県)
- ⑧ 大野善隆、後藤勝正、骨格筋量の変化における細胞膜再構築タンパク TRIM72 発現量の変化について、第46回日本理学療法学会大会、2011年5月28日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県)

[図書] (計1件)

- ① 濱田輝一(監修)、牧田光代(監修)、大野善隆、他、株式会社ヌンク、フィードバック方式実践問題集理学療法自学習ワークブック、2012、pp.4-7, pp.17-19, pp.63-67, pp.90-93

[その他]

ホームページ等

<http://www.sozo.ac.jp/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 善隆 (OHNO YOSHITAKA)
豊橋創造大学・保健医療学部・講師
研究者番号：80440808

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：