

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25560254

研究課題名(和文) 培養細胞で“真”の廃用性筋萎縮モデルは作れるか？-理学療法研究への応用に向けて-

研究課題名(英文) Muscle atrophy model in vitro for physical therapy research

研究代表者

河上 敬介 (Kawakami, Keisuke)

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：60195047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の骨格筋は、毎日の活動からの負荷の存在下でタンパク質合成と分解のバランスを保つことによって、そのサイズを保持する。一方、筋収縮活性の持続的な低下は、不活性誘導性筋萎縮をもたらす。我々は、筋萎縮の詳細なメカニズムに対処するために、インビトロで不活性誘導筋萎縮モデルを作製した。本研究では、電気刺激で筋幹細胞の収縮活性を増強し、増強の停止が筋管細胞における萎縮を誘導するかどうかを調べた。その結果、2日間の電気刺激による収縮活動は、筋管細胞の直径を有意に増加させた。そして、その後2日間の活動停止は筋管細胞直径が減少を引き起こした。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle in vivo retains its size by keeping a net balance of protein synthesis and degradation in the presence of loading from daily activity. Meanwhile, a prolonged decrease of muscle contractile activity results in inactive-induced muscle atrophy. To address the precise mechanisms of muscle atrophy, we challenged to create inactive-induced muscle atrophy model in vitro. In the present study, we enhanced myotube contractile activity by electrical stimulation (ES) and examined whether the cessation of the enhancement would induce atrophy in the myotubes. Two days of contractile activity evoked by the ES significantly increased myotube diameters compared to that of pre group or control group on day 2. And, the myotube diameters were decreased in inactive group on day 4.

研究分野：理学療法学

キーワード：廃用性筋萎縮 培養細胞 筋萎縮モデル マウス 理学療法

## 1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定などによる廃用性筋萎縮は、筋力低下を引き起こし、ADL や QOL を低下させる。よって、いまだ不明な点が多い廃用性筋萎縮のメカニズムを明らかにし、効果的な萎縮抑制や回復促進のための理学療法の方策を検討する必要がある。健常筋への筋肥大効果やそのメカニズムに関する報告は多く、アスリート育成等に臨床応用されている。しかし、廃用性筋萎縮の抑制や回復促進効果と、そのメカニズムに関する報告は少ない。我々は、尾部懸垂マウスに対するトレーニングが、萎縮からの回復を促進させることを明らかにした(論文執筆中)。この現象は健常筋への肥大を目的としたトレーニングに比べて相当速い組織学的変化を伴い、正常筋とは異なるメカニズムを持つ可能性も示唆された。

しかし、メカニズムの検証には、培養細胞による廃用性筋萎縮モデルによる実験が不可欠である。廃用性筋萎縮で、ユビキチン-プロテアソーム系の活性化による筋構成タンパクの分解が起こることはよく知られる(Gomes 2001, Lecker 2004, Combaret 2005)。一般に培養細胞を用いた筋萎縮モデルは、このユビキチン-プロテアソーム系の中で下流に位置する MuRF1 の発現を高進させるデキソメタゾン投薬して作製されるモデルしかない(Baehr 2011)。しかし近年、飢餓状態で活性化することで知られるオートファジー系の蛋白質分解機構が、廃用性筋萎縮時にも活性化することが判明した(Maki in press 2012)。また、蛋白質合成機構が抑制されていることもよく知られている。よって、デキソメタゾン投薬による筋萎縮モデルが、廃用性筋萎縮時における現象をとらえているとは言い難い。そこで我々はまず予備実験として、トリ胸筋の初代培養細胞に活動負荷を与えた状態(周期的電気刺激を与えた状態)で培養後、電気刺激を中止し脱負荷状態で培養すると、薬品を加えなくても筋萎縮モデルができることを確認した。

## 2. 研究の目的

廃用性筋萎縮に効果的な理学療法を解明するには、培養細胞を用いた廃用性筋萎縮モデルが不可欠である。薬物投与による培養筋萎縮モデルの報告はあるが、シグナルの一部を止めただけのモデルである。複数の蛋白質分解・合成機構が絡む廃用性筋萎縮のモデルとして十分だとはいいがたい。そこで本研究の目的は臨床を模擬し、運動の脱負荷による培養筋萎縮モデルを作製することである。そして、本モデルが、ヒトや動物で起こる“真”の廃用性筋萎縮モデルとして適格かどうかを検証することである。これらのことにより、いまだ不明な点の多い廃用性筋萎縮のメカニズムに迫るとともに、新しい理学療法の方

策へと萌芽させることができると考えている。

## 3. 研究の方法

まず、電気刺激下と伸長刺激下で培養した細胞の脱負荷による筋萎縮モデルの形態学的検証により、実験に適切な筋萎縮モデルを確立する。次に、ヒトや動物の廃用性筋萎縮で活性化されることが分かっている蛋白質の分解機構が、本筋萎縮モデルで活性化するか、それが必須かどうかを明らかにする。そして、理学療法刺激による筋萎縮の抑制や筋萎縮からの回復の検証を行う。研究代表者河上は研究の統括・電気刺激モデルの作製・組織学的解析を行い、研究分担者笹井は主に電気刺激モデルの作製を行う。研究協力者として、名古屋大学大学院医学系研究科大学院生が生化学的解析を行う。

## 4. 研究成果

電気刺激下で2日間培養した筋管細胞を、電気刺激停止により脱負荷状態に切り替えて2日間培養し、筋管細胞横径の変化を検証した。対象は、トリ胸筋から作製した初代筋管細胞(トリ筋管細胞)およびマウスの筋サテライト細胞から作成した初代筋管細胞(マウス筋管細胞)を用いた。その結果、電気刺激を与えないで培養するよりも電気刺激を与えた状態で培養した方の筋管細胞横径が太いこと、電気刺激停止2日後には有意な筋管細胞横径の減少が起こることを両細胞において確認できた。

ただ、我々の行った電気刺激による筋管横径の増加は、蛋白質の合成に加え蛋白質の分解に関わる応答が非常に高くなることと、正常な筋幹細胞には認められない構造が多数観察されることが判明した。一方、収縮活動を停止して数時間後における合成や分解の現象を確認したところ、タンパク質の合成が活性化して、分解が抑制される時期があることが分かった。即ち、通常運動を行っている状況と考えて我々が作製していたモデルは、実は刺激は過負荷状態を模擬している可能性が出てきた。また、収縮活動の停止は、廃用性のモデルというよりも、過負荷状態からの休憩を模擬していると考えられた。よって、今回の作製されたモデルは、筋力向上のための運動に必要なと考えられている休息のメカニズムを明らかにするためモデルとして重要な地位を占める可能性が高くなった。今後は、さらに収縮運動休止直後の分子動態の解析が必要であると考えられる。一方で、理学療法において、廃用性筋萎縮モデルの作製も重要である。今後は収縮強度や頻度をもっとマイルドなものに変えながら、本来の運動状態を模擬するモデルを作製し、真の萎縮モデル作製へ向けた取り組みが必要であると考え

## 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)

Itoh Y., Murakami T., Mori T., Agata N., Kimura N., Inoue-Miyazu M., Hayakawa K., Hirano T., Sokabe M., Kawakami K., Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy, *Muscle & Nerve*, 査読有, Vol.55, 2017, 243 - 253  
DOI:10.1002/mus.25218

河上 敬介, 宮津 真寿美, メカノバイオロジーに基づく筋力トレーニング - 筋肥大と抗筋萎縮のメカニズムを探る -, 医学のあゆみ, 査読無, Vol.257No.10, 2016, 1079 - 1084

Itoh Y., Hayakawa K., Mori T., Agata N., Inoue-Miyazu M., Murakami T., Sokabe M., Kawakami K., Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell proliferation in mice, *Physiological Reports*, 査読有, Vol.2 No.e12185, 2014, 1 - 10,  
DOI:10.14814/phy2.12185

[学会発表](計21件)

河上 敬介, 筋の構造から考える理学療法の評価や治療, 公益社団法人大分県理学療法士協会研修会, 平成 28 年 6 月 19 日, 京都大学(京都府京都市)

伊東 佑太, マウス足関節底屈筋群の遠心性筋収縮による筋損傷モデルの開発, 公益社団法人日本理学療法士協会第 51 回日本理学療法学会大会, 平成 28 年 5 月 29 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

縣 信秀, 超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖は促進される, 公益社団法人日本理学療法士協会第 51 回日本理学療法学会大会, 平成 28 年 5 月 28 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Nana Takenaka-Ninagawa, Muscle-contraction training can enhance the efficacy cell transplantation treatment for Duchenne Muscular Dystrophy(DMD), 2nd International Symposium on Regenerative Rehabilitation in Kyoto, 平成 28 年 3 月 25 日, 京都大学(京都府京都市)

河上 敬介, 萎縮筋や損傷筋への力学刺激の与え方(肉眼解剖学、実験動物、培養細胞での腱鞘より), 平成 27 年度第 2 回大分県理学療法士連盟研修会, 平成 27 年 8 月 27 日, ホルトホール大分(大分県大分市)

柴田 篤志, 筋損傷からの回復を促進させる超音波刺激は MyoD, myogenin 量を亢進させる, 公益社団法人日本理学療法士協会第 50 回日本理学療法学会大会, 平成 27 年 6 月 6 日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

Yuta Itoh, The effective intensity of exercise load for facilitating recovery from muscle atrophy in mice, The World Confederation for Physical Therapy Congress 2015, 平成 27 年 5 月 2 日, Singapore (Singapore)

Kiyoshi Yoshioka, Muscle inactive state is necessary to remove damaged proteins accumulated by repeated muscle contraction, The World Confederation for Physical Therapy Congress 2015, 平成 27 年 5 月 1 日, Singapore (Singapore)

河上 敬介, 基礎理学療法学 - 理学療法と科学のインテグレーション -, 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会合同学会, 平成 26 年 11 月 15 日, 名古屋学院大学(愛知県名古屋市)

黒木 優子, オートファジーによる蛋白質分解は, 筋収縮減少の数時間後に起こる蛋白質合成の促進に関与しない ニワトリ胚由来の培養系筋萎縮モデルを用いて, 公益社団法人日本理学療法士協会第 49 回日本理学療法学会大会, 平成 26 年 5 月 31 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

吉岡 潔志, 短時間の筋収縮停止はタンパク質分解とともに筋収縮構成タンパク質の合成を亢進させる ニワトリ胚由来の培養系筋萎縮モデルを用いて, 公益社団法人日本理学療法士協会第 49 回日本理学療法学会大会, 平成 26 年 5 月 31 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

河上 敬介, 骨格筋に対する効果的な伸張刺激の与え方, 公益社団法人鹿児島県理学療法士協会第 27 回学会, 平成 26 年 2 月 16 日, 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)

Kiyoshi Yoshioka, Short time of unloading promotes protein synthesis in cultured unloading induced muscle atrophy model, Growth and Wasting in Heart and Skeletal Muscle, 平成 26 年 1 月 29 日、Santa Fe (USA)

河上 敬介、理学療法の基礎研究の現状と近未来への提言、第 32 回関東甲信越ブロック理学療法士学会、平成 25 年 11 月 2 日、幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

高田 拓明、マウス初代培養筋細胞に対する電気刺激による筋肥大効果、第 12 回コ・メディカル形態機能学会学術集会、平成 25 年 9 月 14 日、広島国際大学呉キャンパス(広島県呉市)

吉岡 潔志、培養系筋萎縮モデルで早期におこる筋萎縮シグナルの活性化、第 12 回コ・メディカル形態機能学会学術集会、平成 25 年 9 月 14 日、広島国際大学呉キャンパス(広島県呉市)

Yuko Kurogi, The autophagy system is activated in early stages of unloading-induced muscle atrophy in culture model, The 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013, 平成 25 年 9 月 8 日、Taichung (Taiwan)

Kiyoshi Yoshioka, Unloading-induced muscle atrophy in culture model is mediated by ubiquitin-proteasome system, The 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013, 平成 25 年 9 月 8 日、Taichung (Taiwan)

村田 奈緒子、筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進過程におけるマウス骨格筋の形態的变化と機能的変化、公益社団法人日本理学療法士協会第 48 回日本理学療法学会学術大会、平成 25 年 5 月 25 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

吉岡 潔志、薬物・遺伝子操作を用いない培養系筋萎縮モデルでもユビキチン-プロテアソーム系による筋萎縮が起こる、公益社団法人日本理学療法士協会第 48 回日本理学療法学会学術大会、平成 25 年 5 月 25 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

- 21 黒木 優子、培養筋管細胞による廃用性筋萎縮モデルの作製収縮活動をコントロールして、公益社団法人日本理学療法士協会第 48 回日本理学療法学会学術大会、平成 25 年 5 月 25 日、名古屋国際会議場

(愛知県名古屋市)  
〔図書〕(計 2 件)

河上 敬介 他、科学同人、メカノバイオロジー、2015、22

河上 敬介 他、ナップ、筋機能改善の理学療法とそのメカニズム(第 3 版)、2014、20

〔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

河上 & 宮津研究室  
<http://www.kmnu.matrix.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河上 敬介 (KAWAKAMI, Keisuke)  
大分大学・福祉健康科学部・教授  
研究者番号：60195047

### (2) 研究分担者

笹井 宣昌 (SASAI, Nobuaki)  
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授  
研究者番号：20454762

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

黒木 優子 (KUROGI, Yuko)

吉岡 潔志 (YOSHIOKA, Kiyoshi)