

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：43949

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350647

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮に対する運動療法の培養細胞モデルの開発

研究課題名(英文) Development of an Exercise Therapy Cultured-Cell Model for Disuse Muscle Atrophy

研究代表者

宮津 真寿美 (Inoue-Miyazu, Masumi)

愛知医療学院短期大学・理学療法学専攻・准教授

研究者番号：50335056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、廃用性萎縮筋に対して運動刺激を行う培養モデルを開発することを目的とした。まず、電気刺激を加えたニワトリ胚由来の培養筋管細胞に、電気刺激停止による廃用性筋萎縮モデルの作製を試みた。その結果、2日の停止で筋管細胞横径は約20%細くなり、萎縮することがわかった。次に、蛋白質合成・分解系の因子の動態を解析した。電気刺激を加えている時期、蛋白質合成が高まると同時に、オートファジー系の因子の増加が観察された。さらに、電気刺激停止早期では、蛋白質合成が活性化し、分解が抑制される時期があった。これらのことから、電気刺激の停止は、過負荷状態からの開放を模擬している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a cultured-cell model for use with exercise stimulation for disuse muscle atrophy. We first attempted to create a disuse muscle atrophy model through cessation of electrical stimulation applied to chicken embryo-derived cultured myotubes. The results indicated that two days after cessation of electrical stimulation the transverse diameter of the myotubes decreased by approximately 20%. Next, we analyzed the dynamics of protein synthesis and degradation factors. We observed that during the electrical stimulation period protein synthesis increased and concurrently autophagy factors also increased. In addition, immediately after the discontinuation of electrical stimulation, there was a period during which protein synthesis became increasingly active and degradation was suppressed. Based on these results, it is possible that the discontinuation of electrical stimulation may be used as a model for releasing muscle cells from a state of muscle overload.

研究分野：理学療法学

キーワード：リハビリテーション 廃用性筋萎縮 運動療法 培養モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 廃用や、疾病・加齢などによって骨格筋は萎縮する。骨格筋が萎縮すると筋力が低下し、身体活動に制限が生じ、健康寿命が縮小する。よって、筋萎縮に対抗するための効果的な方策を明らかにすることは、リハビリテーション医療に携わる者にとって重要なことである。

(2) 筋萎縮は、筋蛋白質の合成速度より分解速度が早いと起こる。この筋蛋白質合成と分解に関する細胞内情報伝達系が明らかになってきたのは、ここ 10 年くらいである。筋蛋白質分解は、Akt 不活性化、FOXO atrogen1(ユビキチンリガーゼ)系により起こると考えられてきた。しかし、つい最近、筋蛋白質分解におけるオートファジー系の重要性が判明した。これらの筋蛋白質分解に関する分子機構は、合成の情報伝達系や未知の情報伝達系を含めて、複雑にクロストークするはずであるが、今のところ独立した機構として報告され、整理されていない。また、筋萎縮時の蛋白質分解による細胞内アミノ酸の増加は、蛋白質の合成を促進することが判明し、分解と合成の分子機構は複雑に入り組んでいる。詳細な分子機構の検討には、培養筋細胞を用いた廃用性筋萎縮モデルの作製が欠かせない。

2. 研究の目的

(1) 電気刺激した培養筋細胞を用いて、電気刺激を停止することによる廃用性筋萎縮モデルを作製する。

(2) 廃用性筋萎縮モデルを用いて、蛋白質合成・分解の分子機構の関係を明らかにする。

(3) 廃用性筋萎縮モデルに対して、再電気刺激を行うことで、筋萎縮に対する運動療法モデルを開発する。

この研究の成果は、廃用性筋萎縮に対する予防や治療法開発の基盤になる。

3. 研究の方法

(1) 電気刺激した培養筋細胞を用いて、電気刺激を停止することによる廃用性筋萎縮モデルを作製する。

- ・ 孵卵開始 11 ~ 13 日目のニワトリ胚の胸筋から取り出した筋芽細胞を、コラーゲンコートしたディッシュ上に播種する。

- ・ 筋管細胞が形成された 5 日後、電気刺激 (SEN-3401; 日本光電、C-Dish; プライムテック) による周期的な筋収縮を生じさせた状態で 2 日間培養する。その後電気刺激による筋収縮を 2 日間中断する (図 1)。

- ・ 萎縮の評価は、免疫蛍光染色を施し、筋管細胞の横径を測定する。

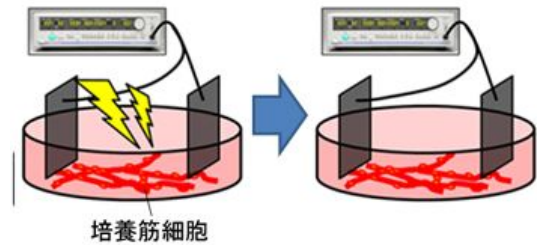


図 1 廃用性筋萎縮モデルの作製。培養筋管細胞に数日電気刺激を与え、活動状態にした後、電気刺激を与えず不活性状態にすると細胞径が小さくなる。これは廃用性筋萎縮の状態だと考える。

(2) 廃用性筋萎縮モデルに対して、再電気刺激を行うことで、筋萎縮に対する運動療法モデルを開発する。

- ・ 電気刺激停止による萎縮筋に対して、再度電気刺激を与え、萎縮筋に対する運動療法モデルを確立する。

(3) 萎縮筋に対する運動療法モデルを用いて、蛋白質合成・分解の分子機構の関係を明らかにする。

経時的に筋細胞の組織サンプルと筋蛋白質サンプルを採取し、以下で述べる - の機構を軸に様々な分子の変化を解析する。シグナルの阻害実験では、横径の変化と、他の機構の指標分子の変化も同時に解析し、複数の情報伝達機構との関係を明らかにする。

- ユビキチン - プロテアソーム系分解機構を軸にした他の機構との関連

- オートファジー系分解機構を軸にした他の機構との関連

- PI3K/ Akt/ mTOR 経路、mTOR/ p70S6K 経路、MAPK/MEK/ERK 経路など蛋白質合成機構の活性化の検証を軸にした他の機構との関連

4. 研究成果

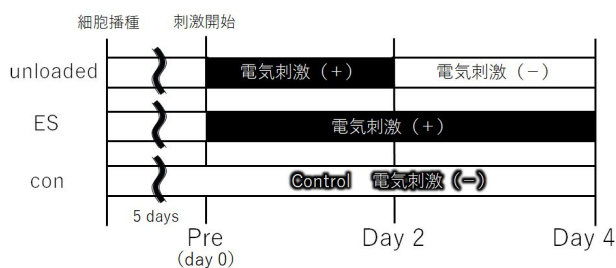
(1) 廃用性筋萎縮モデルの作製

ニワトリ胚由来筋芽細胞を筋管細胞に分化させた後、電気刺激を 2 日間与えたのち、電気刺激を 2 日間停止した (図 2A unloaded)。その結果、筋管細胞の横径 (図 2B) は、電気刺激停止前 (ES day2) に比べて、電気刺激停止後 (unloaded day4)、有意に小さくなった。これは、不活動による筋萎縮であると考えた。

(2) 廃用性筋萎縮モデルにおける蛋白質合成・分解機構の関係

電気刺激を加えている時期、蛋白質合成が高まると同時に、分解系であるオートファジー系の因子の増加が観察された。

A



B

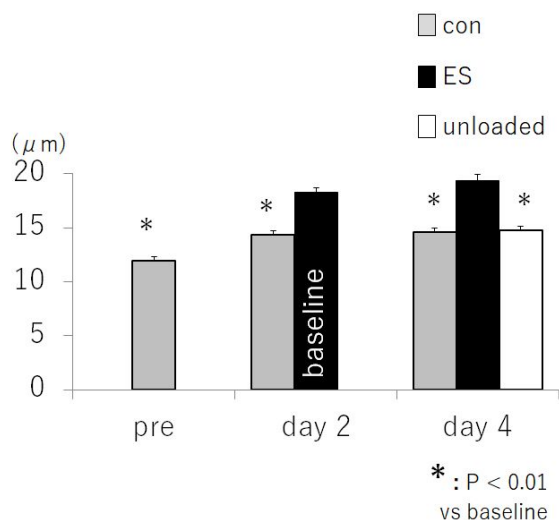


図 2 電気刺激停止による筋管細胞横径の変化。A : 実験プロトコル、B : 各条件による筋管細胞横径。電気刺激をしていない時(con pre)に比べ、2 日間電気刺激をすると、横径は大きくなり (ES day2) 。そこから電気刺激を 2 日間停止すると、小さくなった (unloaded day4) 。

電気刺激停止後 1 時間では、蛋白質合成が活性化し、分解が抑制される時期があった。

これらの知見から、本研究での電気刺激は過負荷状態であり、電気刺激の停止は、過負荷状態からの開放を模擬している可能性があると考えた

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 4 件)

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 . Physiol Report 査読あり 2014 2(11). pii: e12185

Mori T, Agata N, Itoh Y, Miyazu-Inoue M, Sokabe M, Taguchi T, Kawakami K. Stretch speed-dependent myofiber damage and functional deficits in rat skeletal muscle induced by lengthening contraction. Physiol Rep. 査読あり 2014 2(11). pii: e12213.

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 Vol.257 No.10 2016 査読なし

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. 査読あり 2017 Feb;55(2)

[学会発表] (計 6 件)

吉岡潔志、黒木優子、笹井宣昌、早川公英、村上太郎、宮津真寿美、河上敬介 . 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 第 49 回日本理学療法学会大会 : パシフィコ横浜 (横浜) 黒木優子、吉岡潔志、笹井宣昌、早川公英、村上太郎、宮津真寿美、河上敬介 . 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 第 49 回日本理学療法学会大会 : パシフィコ横浜 (横浜)

柴田篤志、森友洋、縣信秀、宮本靖義、宮津真寿美、河上敬介 . 筋損傷後早期の超音波刺激は筋衛星細胞の活性と損傷からの回復を促進させる 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 : 名古屋学院大学 (名古屋キャンパス白鳥学舎) 伊東佑太、縣信秀、木村菜穂子、宮津真寿美、平野孝行、河上敬介 . 筋損傷を引き起こす強度の運動は筋萎縮からの回復促進効果を下げる 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 : 名古屋学院大学 (名古屋キャンパス白鳥学舎) 柴田篤志、森友洋、縣信秀、宮本靖義、宮津真寿美、馬路祥子、河上敬介 . 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 第 50 回日本理学療法学会大会 : 東京国際フォーラム (東京)

縣信秀、宮津真寿美、河上敬介・超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖は促進される 第51回日本理学療法学会(札幌コンベンションセンター)(札幌)

〔図書〕(計2件)

宮津真寿美,ほか、ナツブ、筋機能改善の理学療法とそのメカニズム【第3版】
2014、376

宮津真寿美,ほか、化学同人、メカノバイオロジー 細胞が力を感じ応答する仕組み、2015、332

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮津 真寿美 (INOUE-MIYAZU Masumi)
愛知医療学院短期大学・理学療法専攻・
准教授
研究者番号: 50335056

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

清島大資 (KIYOSHIMA Daisuke)