

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560289

研究課題名(和文)炎症反応と骨格筋の萎縮・肥大を調節する基盤メカニズムの関連解明

研究課題名(英文) Crosstalk between inflammation and the basic mechanisms of skeletal muscle hypertrophy or atrophy

研究代表者

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

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)：本研究の目的は、炎症反応と骨格筋の萎縮・肥大を調節する基盤メカニズムの関連について解明することである。真逆な萎縮・肥大のそれぞれに炎症反応の関連が示唆されているが、詳細は不明である。

そこでマウス骨格筋の萎縮と肥大、さらに細胞培養の実験系を確立して、メカニズムの解明に挑んだ。いずれの実験系も良好に確立できた。一方、マウス実験で炎症反応に関わるマクロファージについて解析を進めるも、実験群間における顕著な違いが検出されなかった。今回、確立できた実験系により、詳細なメカニズム解明を進める体勢を整えることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the association of inflammation with basic mechanisms which induce skeletal muscle hypertrophy or atrophy. Although many suggestions on the association are there, clarifications of actual mechanisms are still incomplete.

In this term, we used mouse muscle hypertrophy and atrophy models, and cell culture models. These models were well established. In mice models, however, no significant difference was showed in the macrophage-detection as the main observation. Further observations on those models must contribute to the elucidations.

研究分野：理学療法学、筋生理学

キーワード：理学療法 骨格筋 萎縮 肥大 炎症反応

### 1. 研究開始当初の背景

廃用性萎縮は、長期臥床やギプス固定などの活動性が低下する場合に頻発する。その筋力低下がADL・QOL低下に繋がるため、萎縮の予防・回復は理学療法の重要な課題である。一般的な処方方は負荷運動だが、高齢、虚弱等により十分な運動が望めない場合については不明な点が多い。申請者は、効果的な処方に発展すべく、げっ歯動物や培養細胞を用いて骨格筋の萎縮・肥大を調節する基盤メカニズムの一端を明らかにした (Agata et al. 2009, Sasai et al. 2010, 科研費 #21700558)。

一方、炎症反応が、萎縮・肥大と真逆なそれぞれを促進すると考えられ始めた (Schiaffino et al. 2013, Saclier M et al. 2013)。炎症性サイトカインや酸化ストレスの関わり、筋損傷を伴う場合に関する報告がある (Muñoz-Cánoves et al. 2013, Ruas et al. 2012, Talbert et al. 2013, Tidball et al. 2010)。また萎縮と肥大のそれぞれで種類の異なる炎症反応が働くことが想定できるが、その様な包括的な理解にはまだ至っていない。理解を深め最適な処方を検討すべきである。上述した運動効果が十分に望めない場合ほど重要となるはずである。

そこで、マウス筋の廃用性萎縮や負荷運動による肥大を用いて、それぞれに働く炎症反応の特徴と、それらと萎縮・肥大を調節する基盤メカニズムの関連を解明しようとするに至った。また筋肥大・萎縮にかかわる炎症管理の必要性を提示し、新たな理学療法処方に萌芽させたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス筋の廃用性萎縮や負荷運動による肥大を用いて、それぞれに働く炎症反応の特徴を明らかにすることを目的とした。とくにタイムコース実験に着眼した。また細胞培養を用いたより詳細なメカニズム解明も目指した。

### 3. 研究の方法

マウス (ICR、雄、12週令) をもいた実験と、細胞培養実験を実施した。マウス実験では生体における現象の捕捉と関連メカニズムの状況証拠取得を狙い、細胞培養では因果関係をも含めたメカニズムの詳細を解明するため実験系である。

マウス実験の基本は、筋の萎縮・肥大を評価するとともに、主にマクロファージに関する解析を試みた。炎症反応の特徴をとらえるために、タイムコースに関するサンプリングも実施した。新モデルの導入・確立などを踏まえて、概ね4匹/実験群で進めた。統計処理は分散分析につづく多重検定で進め、有意水準  $p < 0.05$  で判定した。

実際に使用した実験系について以下に記す。

#### 【マウスの廃用性筋萎縮モデル】

世界的に汎用される2週間の尾部懸垂飼育を実施した。後肢を免荷することで、後肢筋に萎縮が惹起される。

#### 【マウスの代償性筋肥大モデル】

世界的に汎用される後肢共同筋腱切除術を導入した。腓腹筋腱を切除した後の通常飼育により、腓腹筋の協働筋であるヒラメ筋や足底筋が代償的に使用され、これら2筋に肥大が惹起される。顕著な肥大が惹起できる一方、一般的な運動に比べ筋の使用が強烈であるといわれている。



図1. 作製した階段と段を昇るマウス

#### 【マウスの運動性筋肥大モデル】

一般的な運動による肥大を再現モデルとして、負荷運動を実施した。マウスに継続的に行わせる現実的な方法として、自重を負荷とする階段昇りを実施した。専用の階段も模索して作製した (図1)。

#### 【マウスの運動による萎縮回復】

考案した負荷運動の萎縮筋に対する回復効果を検証するため、尾部懸垂飼育した後、通除飼育下で運動を実施した。炎症反応に関する着眼は、萎縮の反応や現象が十分に進み弱った状態で、健常筋の肥大と同様な反応が働くか否かという点である。

#### 【マウスの運動による廃用性萎縮予防】

同様に今回の負荷運動の萎縮予防の効果を検証するために、尾部懸垂飼育下で運動を実施した。炎症反応に関する着眼は、萎縮の反応の進行と同時に、肥大の反応を惹起した場合の反応動態である。

#### 【細胞培養】

トリ骨格筋細胞を初代培養した。電気刺激により筋細胞の収縮を制御することで、生体における収縮活動に応じた肥大・萎縮を再現するモデルの作製を進めた。トリ細胞は低コストかつ初代培養 (生体に近い性質の細胞) といった特徴はあるものの、実験の実際や結果の

解釈などにおける動物種の問題も想定されたので、マウス由来の株細胞 C2C12 とマウス筋の初代培養も導入した。

#### 4. 研究成果

今回、解明を進めるための実験系が導入・確立できた。しかしながらマクロファージに関する群間の違いは検出されなかった。サイトカインや酸化ストレスなども含めより詳細な解析が必要であると考えた。実験系について以下に記す。

##### 【マウスの廃用性筋萎縮モデル】

尾部懸垂による2週間の後肢免荷で後肢筋が萎縮した(図2)。とくにヒラメ筋、長趾伸筋、腓腹筋で顕著であった( $p < 0.05$ )。

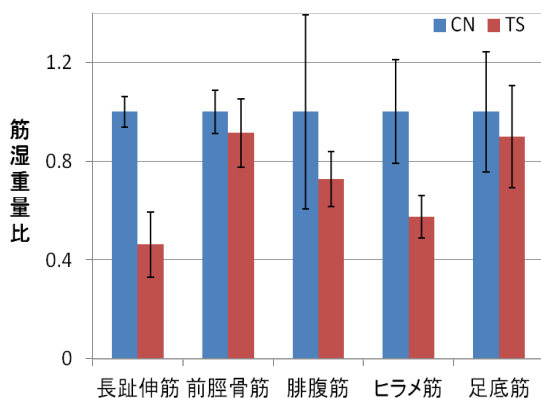


図2. 尾部懸垂マウスの後肢筋萎縮各筋の湿重量について、通常飼育群(CN)を1とする相対値で示す。TSが尾部懸垂。

##### 【マウスの代償性筋肥大モデル】

共同筋腱切除術により、腱が切除された腓腹筋は萎縮して、残された共同筋足底筋が肥大した。一方、今回が初導入でありため、足底筋、ヒラメ筋、長趾伸筋の誤差範囲が大きく、結果の安定性に改善の余地があると判断した。術式そのものは導入できたと考える。

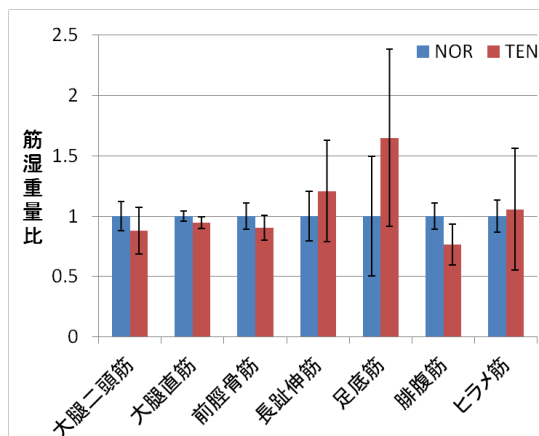


図3. マウス共同筋腱切除による筋肥大各筋の湿重量について、通常飼育群(NOR)を1とする相対値で示す。TENが腱切除。

表1. 階段昇りによる筋湿重量の増加；運動群の通常飼育群に対する比率

実験日数	D1	D2	D3	D7	D14
大腿四頭筋	0.97	1.02	1.12	1.05	1.05
半腱様筋	0.93	1.06	1.39	1.05	1.07
腓腹筋	1.00	1.03	1.14	1.19	1.04
ヒラメ筋	1.05	1.06	1.27	1.11	0.95
足底筋	0.95	0.99	1.09	1.10	0.99

##### 【マウスの運動性筋肥大モデル】

階段を毎日昇らせたマウスでは、同じ期間に通常飼育したマウスより後肢筋の湿重量が大きかった(表1)。多くの筋で運動開始の翌日から増えはじめ、肥大が惹起されたと考えられる。一方、7日目以降の比率縮小は、食餌や体重含めた全身状態に関する個体差を反映するものと考えられる。一般に、その様な個体差は、期間が長ほど拡大する。肥大が惹起されたと考えられた。より顕著な肥大を惹起させるという点では、自重とは別の負荷の追加もよいと考えた。

##### 【マウスの運動による萎縮回復】

概ねの筋は、懸垂飼育による萎縮の後、運動をした方がより回復した(図5)。一方、廃用+通常の筋が、ひたすら通常飼育した筋を上回る可能性が示唆された。懸垂後の再荷重時に一過性に惹起される炎症反応が関連すると想像するがより詳細な解明が必要である。

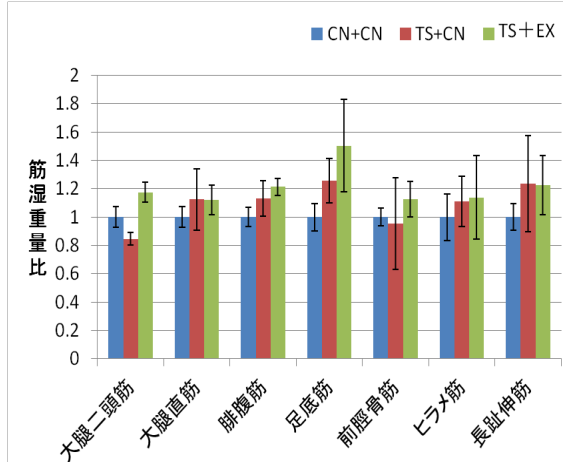


図4. 運動による筋萎縮の回復 各筋の湿重量について、通常飼育群(CN+CN)を1とする相対値で示す。TS+CNは2週間の懸垂飼育後、2週間通常飼育した群、その通常飼育期間に階段昇りをさせた群がTS+EX。

##### 【マウスの運動による廃用性萎縮予防】

懸垂期間中に階段昇りをすることで、大腿直筋や大腿二頭筋は、むしろ肥大した(図5)。ヒラメ筋は、通常飼育個体の水準を維持し萎縮が抑制されたと考えられた。一方、長趾伸筋では、抑制までは至らないが起こるはずの萎縮が凡そ50%程度緩和されたと考えられた。

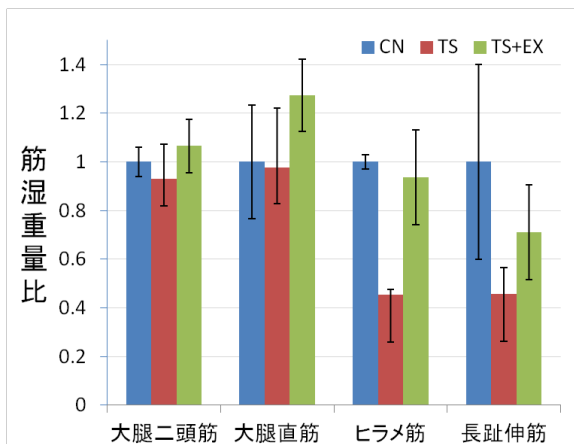


図 5. 運動による筋萎縮予防 各筋の湿重量について、通常飼育群 (CN) を 1 とする相対値で示す。TS は 2 週間の懸垂飼育、懸垂飼育中に運動をさせた群が TS+EX。

#### 【トリ骨格筋細胞の初代培養】

既に保有していたこの培養技術を、より生体の筋に近づけるために、電気刺激により収縮活動を制御する実験系を確立した。今後、筋細胞の収縮あるいは不活動にともなう酸化ストレスやサイトカインなどの炎症反応メディエーターの関連を詳細に解明することに役立つと考える。

#### 【C2C12 及びマウス筋細胞の初代培養】

実験の実際や結果の解釈などにおける動物種の問題が生じることがある。トリ細胞培養に関するこの弱点を補填するために、新たにマウス由来の細胞株 C2C12 とマウス筋細胞の初代培養を習得・導入した。筋線維様の筋管細胞を培養できるに至った。トリ細胞と同様に、今後の詳細な解明に役立つと考える。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

笹井 宣昌, ストレッチによる骨格筋の肥大と萎縮抑制, 体育の科学, 査読有, 65 巻, 2015, 413-418, <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020476809>

##### 〔学会発表〕(計 5 件)

吉岡 潔志, 培養筋管細胞の持続的収縮活動は損傷タンパク質を蓄積させ、その後の不活動はそれらを除去させる, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015.07.02, タワーホール船堀 (東京).

Yoshioka K. Muscle inactive state is necessary to remove damaged proteins accumulated by repeated muscle contraction. the World Confederation for Physical Therapy Congress. 2015.05.04 Suntec City (Singapore).

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 ~, 第 49 回日本理学療法学会大会, 2014.05.31, パシフィコ横浜 (神奈川, 横浜).

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 ~, 第 49 回日本理学療法学会大会, 2014.05.31, パシフィコ横浜 (神奈川, 横浜).

Yoshioka K. Short time of unloading promotes protein synthesis before increasing atrogen-1 expression in unloading-induced muscle atrophy model in culture. International Symposium on Mechanobiology 2014 (ISMB 2014) 2014.05.22, 岡山大学 Junko Fukutake ホール (岡山, 岡山).

〔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

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

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者 ( )