

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560403

研究課題名（和文）局所筋血流と骨格筋萎縮の関係

研究課題名（英文）Relationship between blood flow and atrophy of muscle

研究代表者

山門 一平（YAMATO, Ippei）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20328157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は骨格筋萎縮モデルとして、ギブス固定による動物実験を用いて、骨格筋萎縮と遺伝子発現の変化を解析してきました。骨格筋を栄養する局所の血流量を測定したところ、Type-1線維を多く含む筋は、固定直後から血流の有意な低下が認められました。経時的な変化を調査する為に、実験日を6時間、1日、4日、10日と設定しました。いずれかの実験日において、有意に大きな動態を示した遺伝子発現が86probesで見つかり、ここから血流相関性遺伝子群をピックアップして、その役割について分析を行いました。その結果、血流相関性遺伝子群は、特に筋の構造維持と調節に関わるものが低下していることを見つけました。

研究成果の概要（英文）：We analyzed relevant gene expression while atrophic change in model by cast immobilization (CI). We revealed that the blood flow rapidly decreased in the CI leg. This trend was found especially in Type-1 rich muscle. we experimented on rat model to simulate muscle atrophy, and analyzed the gene expression pattern. Gene expression was analyzed encyclopedically in DNA micro array at the following time points; 6 hours, 1, 4, 10 days after the procedure. We focused on 86 probes which showed significant difference between control and experimented side at each sampling point. Then we searched the relationship of the found probes to their roles either of blood flow or muscle volume. It was revealed that blood flow probes had metabolism regulation feature and muscle volume, structure building feature. From the analysis it seemed that decrease in blood flow induce suppression of metabolism regulation genes, and then gradually suppress structure related genes to lead morphological change.

研究分野：解剖学

キーワード：骨格筋萎縮 血流 筋重量 遺伝子発現 Type-1

1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮に関する研究は、多角的に研究され多くの報告がなされている。とりわけ、社会的影響が大きい sarcopenia に関わる研究や病因解明のための筋内因性および筋外因性疾患に関わる研究が世界的に展開されている。近年、遺伝子解析等の普及により疾患及び筋萎縮関連遺伝子の抽出から一連の Pathway の検証が行われている。しかしながら、現在においても明確な筋萎縮プロセスは見いだされておらず、網羅的解析法の限界とも言われている。

我々は、多くの研究報告同様に、骨格筋萎縮実験モデルを用いた栄養素・薬剤等摂取による萎縮改善効果や、そのメカニズム解析に取り組んできた。しかしながら、結果から見いだされるのは筋萎縮プロセスの断片を窺い見るだけに過ぎなかった。骨格筋萎縮に関わる、生体における根本的な変化を追っていたところ、A.C.GUYTON & J.E.HALL による血流変動を手がかりに、血流動態と筋萎縮の関係の検討を開始した。

2. 研究の目的

骨格筋量の減少は、病的だけでなく環境要因など多因子によって生じる。筋萎縮は、身体活動の低下だけでなく、ADL および QOL 低下に直結しており、大きな医学的・社会的課題の 1 つとされている。筋萎縮の予防や治療に関する研究は、広範囲かつ多数で行われているにも関わらず、基本手なメカニズムにおいても in vivo, in vitro 共に未解明な面が多く残されている。本研究においては、基礎研究として筋内局所血流測定法を確立した。局所筋血流と筋萎縮の関連性、遺伝子発現動態の特徴を Microarray 解析で試行している。そこで有意な相関関係を認める新たな所見を発見したので、漸進的な研究に発展させ、血流改善による筋萎縮予防効果と、治療効果、その細胞内調節プロセスの経路の証明と解明について検討を行う。

筋血流変化と骨格筋萎縮の相関関係と遺伝子アレイ解析 (経時的変化)

筋線維内におけるプロセスの解明

運動処方、血流増大、薬剤、ノックアウトによる骨格筋萎縮予防効果を検討

3. 研究の方法

実験は東海大学動物実験委員会での承認 (142054/153009) を得て行った。本研究ではオスの Fisher ラット (n=32) を用いた。右脚を CI、左脚は Control とした。CI 後、6 時間、1 日、4 日、10 日で筋組織採取 (各 n=2) 血流測定 (各 n=4) 各重量測定と遺伝子解析試料 (各 n=4) を採取した。採取に用いた対象筋は、Type- fiber 比率の高い SM (Soleus muscle) 参考筋として Type- fiber の多い EDL (Extensor digitorum longus muscle) を用いた。実験

初日、全ての実験動物に CI (Cast Immobilization) を施した。

CI は右脚の膝関節が完全に固定されるように、膝関節から末梢部を完全に被った。

ギプスは X-Line Classic Splint (XSC1510DW) (Photonic Instruments Co., Ltd., Japan) を用いた。足関節は、本実験において対象筋への有意な影響が認められなかった 45 度屈曲位とした。

対象筋への局所血流量の測定には、Kawahira らによる、非放射性マイクロスフェア (NRMS: non-radioactive microsphere) を用いた X 線蛍光分析 (X-ray fluorometry) による方法を用いた。

遺伝子発現の動態の解析には DNA マイクロアレイを用い、リアルタイム PCR により検証を行った。

4. 研究成果

CI 実験モデルで筋重量 (R/L) の経時変化を得た (図 1a)。SM は 10 日で有意 ($63.3\% \pm 5.4$ $p < 0.001$) に筋重量が低下した。筋重量が約 37% 低下した。EDL は、10 日間で筋重量に有意な変化は認められなかった。

筋血流の経時変化 (図 1b) は、SM は CI 脚の血流が、6 時間 (SM: $47.8\% \pm 21.6$ $p < 0.001$) から有意に低下し、10 日 (SM: $34.7\% \pm 17.2$ $p < 0.001$) までこの状態が維持された。CI 後 6 時間で約 52%、10 日で約 63% 血流が低下していた。Type-1/Type-2 の経時変化においては SM で Type-1 の減少傾向が認められた (図 1c/d、図 2a/b)。

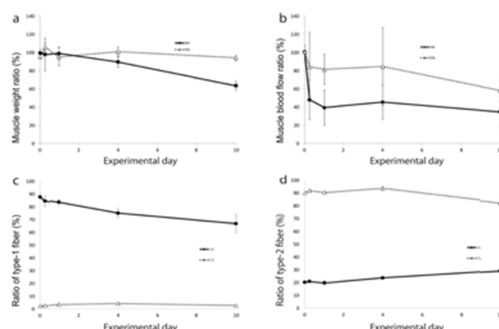


図 1 経時的変化 a) 筋重量 b) 血流 c) Type-1 比率 d) Type-2 比率

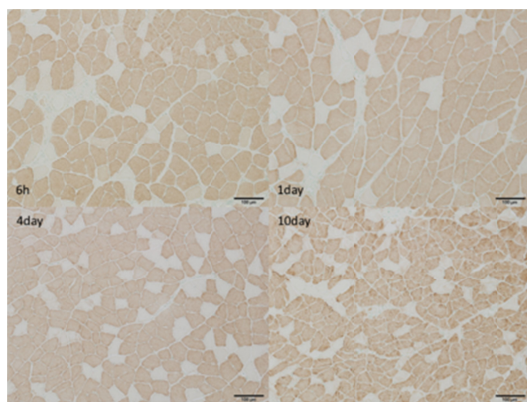


図 2a Type-1 免疫染色 (SM)

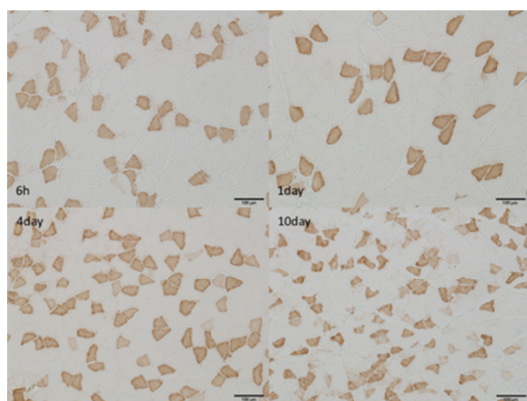


図 2b Type-2 免疫染色 (SM)

実験期間中 (6 時間、1~10 日) の SM において、有意な変化が認められた遺伝子発現を DNA Microarray 解析により網羅的に抽出した。86 遺伝子群が抽出条件 (Fold change ≥ 10.0 、Filtered on Flags Present (32/32)) に一致した (表 1)。

筋重量と血流に関係のある遺伝子を探るために、経時的な発現変動がそれぞれ (筋重量、血流) に相関しているものを任意選択した。その結果、筋重量相関性遺伝子は 17probes、血流相関性遺伝子は 12probe であった。

抽出されたそれぞれの遺伝子群の特徴を検索すると共に、遺伝子群の機能力カテゴリーを探索するために GO analysis から統計的に関連のある GO term を抽出した。筋重量および血流相関性遺伝子群のうち、GO term に含まれる遺伝子群全てについてリアルタイム PCR を用いて DNA マイクロアレイの結果を検証 (validation) した。

我々のピックアップした血流相関性の遺伝子群 (図 3) は、血流低下と共に Hspa1b, Rcan1 の遺伝子発現量が低下した。このことは、Type-1 特異的な影響として、筋構造の維持・調節の状態が低下もしくは少なくとも変化したことが考えられる。特に、今回の実験結果で、血流と強い相関関係を示したことから、血流が Type-1 の変化の因子となることが考えられる。

No.	ProbeName	GeneSymbol	No.	ProbeName	GeneSymbol
1	A_44_P480120	Acto1	44	A_43_P11040	Tppp3
2	A_42_P656495	Actn3	45	A_44_P1017144	Vcan
3	A_44_P284753	Ankrd1	46	A_44_P142837	Xirp1
4	A_44_P262593	Ankrd2	47	A_44_P459362	Xpo4
5	A_43_P11613	Anp32a	48	A_42_P625157	Zfp503
6	A_44_P553098	Axb5	49	A_44_P377681	LOC310926
7	A_43_P11616	Atf3	50	A_44_P321605	LOC501089
8	A_44_P1029403	Bst2	51	A_44_P487714	LOC680319
9	A_44_P1029397	Bst2	52	A_44_P775952	LOC688744
10	A_42_P695401	Ccl2	53	A_44_P431685	MGC116197
11	A_44_P776556	Chac1	54	A_44_P220424	MGC116197
12	A_43_P12996	Crym	55	A_44_P163968	MGC116197
13	A_44_P997843	Csrp3	56	A_44_P243708	MGC116197
14	A_44_P233080	Egr1	57	A_44_P258147	RGD1304931
15	A_44_P390700	Fhl2	58	A_43_P19145	RGD1309676
16	A_44_P495480	Fos	59	A_44_P852862	
17	A_44_P109455	Gstm2	60	A_44_P241458	
18	A_44_P1015203	Gstt3	61	A_44_P117850	
19	A_44_P109342	Hspa1a	62	A_44_P315218	
20	A_44_P1042876	Hspa1b	63	A_44_P685364	
21	A_43_P15812	Hspb7	64	A_44_P513635	
22	A_44_P498937	Hspb7	65	A_44_P789637	
23	A_43_P13297	Mt1a	66	A_44_P505500	
24	A_44_P201295	Mybpc2	67	A_44_P215689	
25	A_44_P385066	Mybpc	68	A_44_P629936	
26	A_44_P1031380	Myh1	69	A_44_P755803	
27	A_42_P708941	Myh4	70	A_44_P900646	
28	A_44_P397163	Myl2	71	A_44_P632287	
29	A_44_P638191	Otcd1	72	A_44_P718743	
30	A_44_P290231	Psap	73	A_44_P333811	
31	A_44_P145605	Pvalb	74	A_44_P274688	
32	A_44_P456492	Rcan1	75	A_44_P985925	
33	A_44_P992854	Rhoa	76	A_44_P121781	
34	A_44_P152395	Rnd1	77	A_44_P809642	
35	A_44_P562894	Rnd1	78	A_44_P932768	
36	A_44_P431049	Rad	79	A_44_P378322	
37	A_44_P210852	Sn3rf2	80	A_44_P942315	
38	A_44_P959143	Shisa4	81	A_44_P213320	
39	A_44_P548257	Shisa4	82	A_44_P128848	
40	A_44_P771052	Sic41a3	83	A_44_P133618	
41	A_44_P625026	Tbc1d10c	84	A_43_P14406	
42	A_44_P1038028	Tnfrsf12a	85	A_44_P238738	
43	A_44_P210173	Tnfrsf12a	86	A_44_P444122	

表 1 有意な変動を示した遺伝子群

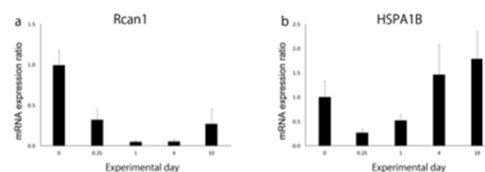


図 3 血流相関性遺伝子群 (rPCR)

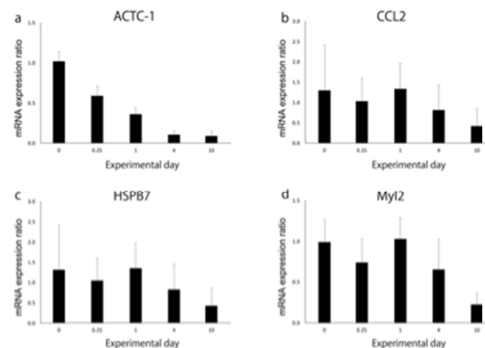


図 4 筋重量相関性遺伝子群 (rPCR)

さらに本研究の発展的展望としては、血流の低下は、ギプス固定初期の極短期間で発生した。筋重量や筋線維径の低下よりも前の時期に遺伝子発現をモニタリングすることで、筋萎縮が誘導される前兆を知る可能性が示唆される。

一方で続発して認められた筋重量相関性遺伝子群(図4)は、従来の筋萎縮過程に認められる筋構造系に関わるものが多く含まれていた。特に GO Analysis の結果としては、Actc1 (actin, alpha, cardiac muscle 1), Ankrd2 (ankyrin repeat domain 2), Csrp3 (cysteine and glycine-rich protein 3)はsarcomere関連遺伝子。さらに前2者はI band関連遺伝子である。Myl2 (myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow)はcontractile fiber, myofibril, myosin complex に所属しており、これらは全てcellular componentに関わり、Protein synthesisのメインパスウェイであるPI3K/Akt/mTORの下流に位置している。ギプス固定後、時間の経過に伴い、徐々にこれら構造遺伝子群の発現が低下し、その結果として構造系タンパク合成のダウンレギュレーションが生じているものと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

山門一平、Characteristics of gene expressions related to muscle blood flow and muscle atrophy in animal model. 2016年3月22-24日、第93回日本生理学会大会、北海道・札幌市・札幌コンベンションセンター

山門一平、Type-1 Fiber 萎縮に関わる血流と遺伝子発現動態の解析と特徴、2015年9月18-20日、第70回日本体力医学会、和歌山県和歌山市・和歌山県民文化会館

山門一平、廃用性筋萎縮モデルにおける遺伝子発現の経時的変化と血流動態との関係、2014年9月19-21日、第69回日本体力医学会、長崎県長崎市・長崎大学文教キャンパス

〔図書〕(計0件)

〔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

山門 一平 (YAMATO, Ippei)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20328157