

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300201

研究課題名（和文）：筋力増強・廃用性筋力低下における筋代謝マーカーの分子生物学的検討と臨床応用

研究課題名（英文）：Molecular biological study of Muscle metabolic marker on muscle strengthening and disuse weakness

研究代表者：池田 聡 (Ikeda Satoshi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00343369

研究成果の概要（和文）：

リハビリテーション医療において、廃用性筋力低下、筋力増強は非常に重要であるが、分子生物学的視点から筋力増強をとらえ、解析した研究は近年まで殆んど見られなかった。そこで、筋力増強モデルを用い、筋関連の転写因子、成長因子・筋構成タンパクの遺伝子およびタンパク発現を解析するためリアルタイムRT-PCR法によりmRNA発現定量をおこなった。また、denervation model を用いてmyostatinの定量をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

Muscle strengthening and disuse weakness are very important on rehabilitation medicine. However, there are little study about muscle strengthening from the view point of molecular biology. Then, we examined the gene expression of muscular transcription factors, muscular growth factor, muscle constriction protein by real time RT-PCR method. Besides, quantitative analysis of myostatin on denervation model were done.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：リハビリテーション医学

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：(1) リハビリテーション医学 (2) 廃用性筋力低下 (3) 筋力増強
 (4) 分子生物学 (5) Myogenin (6) MyoD (7) 動物モデル
 (8) myostatin

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会の到来を迎え、医療費の高騰、要介護老人の増加など様々な問題が沸き起こっている。このような現在、高齢者の筋力低下は大きな問題となっている。疾病をきっかけにした廃用性筋力低下により寝たきりとなり全介助状態となり合併症の治療が必要となるようなケースがいまだに見受けられる。また、栄養の問題、活動度の低下、慢性疾患の影響とも関連したサルコペニアも問題となってきている。この高齢者筋力低下の対策として、臨床的には高齢者の筋力強化プログラムなどが行われるようになってきたが、その詳細についての分子生物学的な基礎研究はほとんど行われていない。また、骨粗鬆症では骨代謝マーカーについての研究が盛んに行われ臨床応用が進み、診断、評価、治療に貢献しているが筋代謝マーカーについてはほとんど研究が行われておらず臨床応用も行われていない。

本研究は筋力増強・廃用性筋力低下モデル動物を用いて筋力増強の分子生物学的メカニズムと筋代謝の評価マーカーを検討し廃用性筋力低下患者の筋力増強に関する知見を集めることでより有効な筋力増強プログラムを構築し、高齢化社会のQOL改善、医療介護資源の節約を図るものである。これまで我々は、分子生物学を基盤とした筋肥大および筋力増強の解析を行い、筋の他動的ストレッチが筋成長因子のmRNA発現を促進し、筋力維持に有効であることを報告して評価を得ている。

リアルタイム RT-PCR 法は微量の mRNA を増幅し定量できるためより詳細な遺伝子発現調節の解析を行うことができると考えられる。この基盤の上に筋組織の筋成長因子、筋関連転写因子、筋構成タンパクなどの検討と血中での筋関連タンパクを測定することにより筋萎縮・筋力増強に関する分子生物学的メカニズムを解明し筋萎縮・筋力増強のモニタリングを可能にすることにより筋力低下の予防改善に関する知見を得ることができ、脳血管障害、神経筋疾患、廃用症候群、寝たきり予防、高齢者リハビリテーション、しいては高齢者介護、医療費抑制にも有用である。

2. 研究の目的

リハビリテーション医療において、廃用性筋力低下、筋力増強は非常に重要であるが、分子生物学的視点から筋力増強をとらえ、解析した研究は近年まで殆んど見られなかった。筋力低下、筋力増強を評価できる因子を検討することにより筋力低下の評価、診断、治療に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

筋力増強モデルとしてラット骨格筋ストレッチモデルを用い伸張刺激をおこなったのち腓腹筋、ヒラメ筋を摘出、RNA を抽出し筋特異的転写因子 myogenin, MyoD, myosin heavy chain 成長因子として、IGF splice variant である MGF の mRNA

発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量を行った。

また蛋白同化ステロイドのメテノロンを投与し伸張刺激を加え MGF 発現を検討した。

また、廃用性筋力低下モデルとしてラットの両側坐骨神経切断を作成し血中 myostatin 量を ELISA 法を用いて定量した。

4. 研究成果

私たちの研究室では筋の遺伝子発現の研究、脳梗塞モデル・脊損モデルにおける脳の神経栄養因子、伝達物質などの発現、膀胱機能・排尿障害などの研究を行ってきた。生命活動は、遺伝情報である DNA から RNA が転写され、その遺伝情報に即したタンパクが合成されることを基本とし、遺伝子転写の調節をおこなう転写因子や、様々な機能を持ったタンパクにより営まれている。これは、セントラルドグマとよばれ、生命現象の基本骨格をなすものである。分子生物学的手法は、遺伝子発現、転写調節、タンパク合成などを調べることにより生命活動の解析を行うものである。

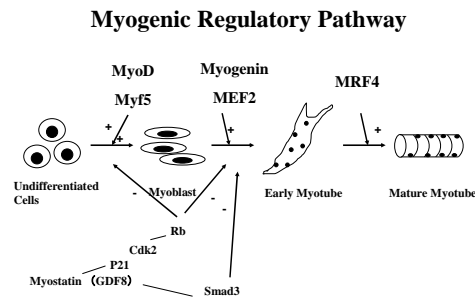
筋力増強がリハビリテーション医療において重要な分野の一つであることに異論はないと思われるが、その遺伝子発現、タンパク合成などの観点からの研究は少なかった。筋力増強のメカニズムは、筋自体の変化によるものとして筋の肥大・容積の増大すなわち個々の筋線維の肥大、筋線維数の増加筋細胞の増大・肥大と神経制御の変化によるものとして、発射する運動単位数の増加、発射頻度の増加、同期化が考えられている。このうち筋肥大は、筋力増強訓練により遺伝子転写が促進され、筋タンパク合成が増加し、筋細胞の肥大が生じたものである。

筋肥大を引き起こす因子としてのメカニズムには、テストステロン、成長ホルモン、インシュリン、Insulin-like growth factor: IGF、Fibroblast growth factor: FGF、Hepatocyte growth factor: HGF などの内分泌系因子、アセチルコリンなどの神経系因子、pH、代謝物質などの化学的因子、力学的刺激などの機械的因子などが考えられている。

このなかで、私たちは局所の筋肥大に密接な関係があると考えられる機械的因子に注目した。Vandenburg らは、骨格筋培養細胞を用い、伸縮性のあるシリコントレーに細胞をトレーごと伸張させ静的ストレッチ刺激を加えたところ細胞肥大が起こったと報告している¹⁾。また Sparrow らによると、鶏の翼の筋に伸張刺激を加えたところ筋肥大が得られたという。これらは、筋力増強に機械的刺激が関与していることを示唆している²⁾。

私たちは、筋の他動的反復ストレッチ刺激が筋の遺伝子発現に関与するかどうか摘出骨格筋を用いた実験を行った。ラットの前脛骨筋、ひらめ筋を摘出し、反復伸張刺激を加えたところ、2時間の反復伸張で初期遺伝子の c-fos mRNA の発現増加が、4時間のストレッチで筋の分化・増殖を調節する働きを持つ筋特異的転写因子の一つである Myogenin mRNA の発現増加が認められた³⁾。筋の遺伝子発現は図 1 に示すような筋特異的転写因子により制御されており分化、肥大、萎縮などが調節されており、Myogenin は筋組織に存在する Myoblast の分化を誘導し筋組織に動員することにより筋肥大を生じさせる転写因子と考えられている。

図 1



一方、2時間、4時間のような長時間のアプローチでは臨床応用は困難であると考えられたため、短時間の反復伸張の効果を検討した。麻酔をかけたラットの足関節反復背屈を15分、30分、60分で行い、24時間後のMyogenin mRNAを調べたところ60分伸張群において発現増加が認められた⁴⁾。このことは、意識障害など自動運動ができない患者でも他動的筋ストレッチで筋の維持ができる可能性を示唆している⁵⁾。また、筋ストレッチにより、局所での筋自己分泌型IGFであるMechano growth factor: MGFのmRNA増加、筋構成タンパクの増加なども認められた。これらより、骨格筋では運動、重錘負荷などで筋の遺伝子発現が促進し筋構成タンパクの合成を促し筋の増大となるが他動的なストレッチのみでも筋関連遺伝子の発現が認められることが解った。また、ストレッチと蛋白同化ホルモンの併用による遺伝子発現の促進効果も認められた。一方、廃用モデルにおける血中のmyostatinは有意な上昇が認められず臨床応用は難しいと考えられた。

今後、臨床応用できるリハビリ技術の開発、リハビリテーションアプローチの効率化、効果判定などまだまだ課題が山積しており、この分野の推進が重要であると思われる。

また、近年は遺伝子を外部から生体に注

入し発現させる遺伝子導入や、遺伝子発現を外部から調節する方法も開発されてきている⁶⁾。RNA interferenceという技術はFireとMelloによって確立され2006年に両氏がノーベル賞を受賞した技術で、これまではmRNA発現後に外部からタンパク合成を調節することが困難であると思われていたが、この技術を用いることによりmRNAからタンパク合成の過程で制御できる可能性が出てきた。これらの方法を取り入れることにより、リハビリテーション効果を促進できる可能性もあると思われる。

参考文献

- 1) Vandenburg H, Kaufman S. In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science* 1979; 203: 265-8.
- 2) Sparrow MP. Regression of skeletal muscle of chicken wing after stretch-induced hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*.1982; 242: C333-C338
- 3) Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003;84:419-23.
- 4) Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Horinouchi K, Tanaka N. Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive repetitive stretching. *Arch Phys Med Rehabil*. 2004;85:166-7.

- 5) Ikeda S, Kamikawa Y, Harada K, Oowatashi A, Yoshida A, Horinouchi, K, Kawahira K. New Messenger RNA Research Communications. Ch8 Passive repetitive stretches activate the skeletal muscle and induce the expression of mRNA of transcription factors. Frank Columbus Ed. Nova Science Publishers, Inc. NY. 2007
- 6) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;391:806-11.

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)

1) 池田 聡
筋力増強の分子生物学的解析
リハビリテーション医学 vol48
242-245, 2011 (査読無)

2) 池田 聡
脳可塑性研究の動向
Medical Rehabilitation vol14
18-22, 2010 (査読無)

3) 池田 聡
脳血栓片麻痺モデル:機能回復と神経栄養因子
Japanese journal of Rehabilitation Medicine
vol46 411-414, 2009 (査読無)

4) 池田 聡
学生がリハビリテーション科医に興味を持つには
Japanese journal of Rehabilitation Medicine
vol46 681-685, 2009 (査読無)

[学会発表] (計 7 件)

①池田 聡
がんのリハビリテーションと筋力増強
第 5 回統合医療国際シンポジウム 2012.1.27 鹿児島市

②池田 聡
サルコペニア、転倒の克服に向けての筋力増強 分子生物学的視点から
Center for Development of Advanced Medicine for Dementia seminar
2012.1.18 愛知県大府市

③池田 聡
シンポジウム リハビリテーション医学領域の基礎研究と臨床応用筋力増強の分子生物学的解析
第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会
2010.5.23 鹿児島市

④池田 聡
分子生物学的視点から見た筋力増強訓練
第 92 回 藤田リハビリテーション医学・運動学研究会 2010.4.2 愛知県豊明市

6. 研究組織

(1) 研究代表者
池田 聡 (Ikeda Satoshi)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 00343369

(2) 研究分担者
吉田 輝 (Yoshida akira)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 40347109

上川百合恵 (Kamikawa Yurie)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号: 70418804

大渡昭彦 (Oowatashi Akihiko)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：30295282

川平和美 (Kawahira Kazumi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20117493