

32. 筋衛星細胞核の形状と核内 DNA 局在の変容とサルコペニア

後藤 勝正

Key words : 加齢促進モデルマウス, 老化, 筋萎縮,
速筋細胞, MBNL1

豊橋創造大学 大学院健康科学研究科
生体機能学分野 生理学教室

緒 言

加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)とそれを主要因の1つとするロコモティブシンドロームなど加齢に伴う運動機能低下は、超高齢社会に突入した我が国において早急に対策が求められている問題である。サルコペニアは、老年性変化の1つであり、その結果として身体活動量の減少はもちろん様々な身体機能が大きく低下する。身体活動量の減少は骨吸収の増加をもたらす。骨吸収の増加はさらなる活動量の低下と骨格筋の減弱化という悪循環を招く。骨吸収の増加は筋力低下と相まって、転倒時の骨折リスクを増大させることはよく知られている。さらに、骨格筋量の低下は毛細血管床の低下すなわち循環血液量の減少という心循環器系のディコンディショニングを招来する。したがって、サルコペニアは人々の Quality of Life (QOL) を大きく左右する社会的問題である。こうした状況下で、人々は健康を求めて日々運動を実践しており、ランニング人口の急激な増加は周知の事実である。その他、数多くのトレーニング機器や機能性食品(サプリメント)など、健康の維持増進に関わる物が氾濫している。習慣的な運動は体脂肪量減少やインスリン感受性などメタボリックシンドロームの諸症状を改善させると考えられているが、サルコペニアに対する有効な対策(カウンターメジャー)は未だ確立していないのが現状である。

廃用性の筋萎縮は遅筋細胞に顕著であるのに対して、サルコペニアの影響は速筋細胞に強いことが知られている。しかしながら、その要因は不明である。一方、サルコペニアの治療としては、①運動療法、②栄養療法、③薬物療法、が挙げられ、特にレジスタンストレーニングなど運動療法に関しては効果的とするエビデンスが多い。レジスタンストレーニングは、筋細胞に大きな変形をもたらす。その結果として筋衛星細胞が活性化あるいは筋核における遺伝子発現が変容して、サルコペニア改善に至る可能性が示唆される。

そこで本研究では、サルコペニア発症要因として、筋衛星細胞核ならびに筋核の形状に着目した。加齢や骨格筋に対する機械的刺激の変化による筋衛星細胞核ならびに筋核の形状への影響を、筋線維タイプの違いから検討した。

方 法

生後 2.5 ヶ月齢の C57BL/6J 雄性マウスならびに加齢促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse Prone 8: SAMP8) とその対照マウス (SAMR1) を用い、それぞれのマウス毎に無作為に対照群および懸垂群に分類した。全てのマウスは、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル 12 時間の環境下で飼育した。なお、餌および水は自由摂取とした。懸垂群のマウスには尾部を吊るすことで後肢懸垂する「後肢懸垂」を 2 週間持続的に負荷した。この後肢懸垂により、ヒラメ筋、足底筋および腓腹筋内側部は萎縮した。さらに、2 週間の後肢懸垂終了後に一部のマウスは通常飼育に戻し、2 週間継続飼育することで、萎縮した筋の再成長を促した。後肢懸垂前 (Pre)、後肢懸垂 2 週間直後 (R0) および後肢懸垂後 2 週間の回復期間終了後 (R2) の 3 つの時点で、マウスの両後肢より速筋細胞を多く含む底筋および遅筋細胞に富むヒラメ筋ならびに腓腹筋内側部を摘出した。また、生後 12 ヶ月齢の C57BL/6J マウスから摘出したヒラメ筋および足底筋も実験に用いた。摘出した筋は即座に結合組織を除去した後、筋湿重量を測定した。ヒラメ筋および足底筋の一部より単一筋線維を単離した。また、残りの筋サンプルは、液体窒素を用いて急速凍結し、分析まで -80°C にて凍結保存した。

1. 免疫組織染色

単離した単一筋線維に対して免疫組織化学染色を施した。単一筋線維を抗 Pax 7 抗体, 抗 MBNL1 抗体および 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Dapi) により染色した。染色した標本は, 蛍光顕微鏡 (BZ-X700, キーエンス, 東京) により観察し, 筋衛星細胞核ならびに筋核の形状を, 0.1 μm のスライス厚にて得られた再構成三次元画像を用いて, XY 面, YZ 面, XZ 面の形状より三次元的に評価した (図 1)。

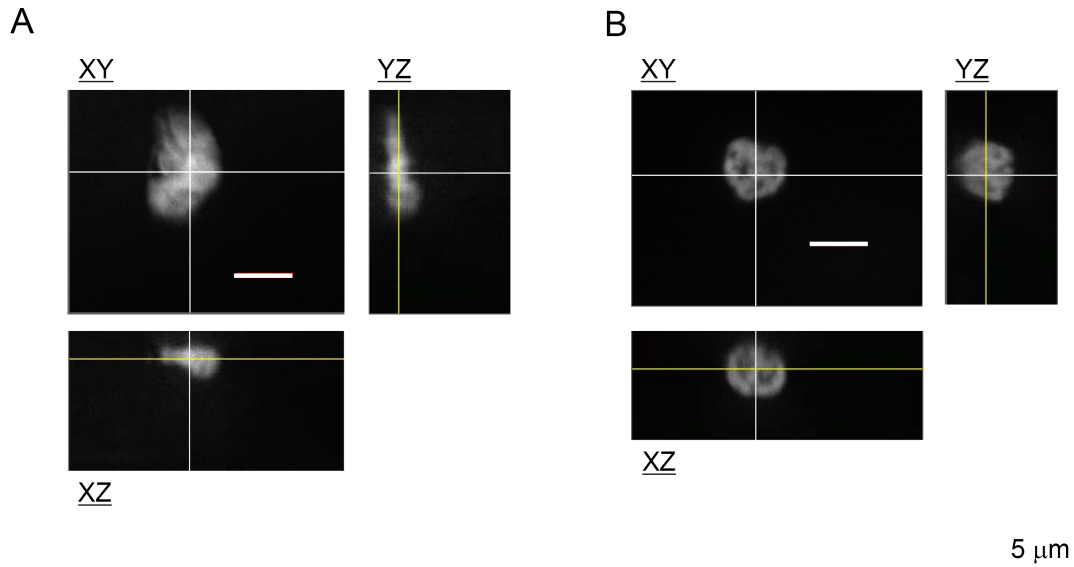


図 1. 筋衛星細胞の形状とその評価.

XY 面で, 厚さ 0.1 μm で画像を取得し, 再構成した筋衛星細胞像. 筋衛星細胞の形状は一様ではなく, 様々なものがある. 筋線維タイプや加齢の影響は特に認めない. XY : XY 面, YZ : YZ 面, XZ : XZ 面.

2. ウェスタンブロッティング

腓腹筋内側ならびに足底筋の一部を 250 mM sucrose, 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , Protease/phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) にてホモジネートし, 可溶性タンパク質を核分画と細胞質分画に分画した. タンパク測定後, SDS サンプルバッファーを用いて, 各サンプルのタンパク濃度が一定になるように調整し, 95°C で 5 分間処理し, SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプルを得た. SDS-PAGE は, アクリルアミド濃度が 7.5% あるいは 10% のゲルを用いて行い, SDS-PAGE 終了後にゲルのタンパクを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写して, MBNL1 発現量を定量解析した.

なお本研究は, 豊橋創造大学が定める動物実験規定に基づき, 豊橋創造大学実験動物委員会の審査・承認を経て実施された.

結 果

2.5 ヶ月齢と 12 か月齢, さらに SAMP8 マウス間の比較により, 加齢と老化の影響を, またヒラメ筋と足底筋の比較により遅筋と速筋の差を検討した. ヒラメ筋における筋衛星細胞は, 球形からディスク状を呈するものまで多様であった. 一方, 足底筋では球形に近い形状 (直径約 5 μm) を示すものが多かった. ヒラメ筋および足底筋共に, 加齢ならびに老化により多様な形態を呈する筋衛星細胞が出現した. 特に, 足底筋では, 小型 ($\leq 1 \mu\text{m}$) の筋衛星細胞が認められた. 一方, 成熟マウスの筋核は, 遅筋であるヒラメ筋でも速筋である足底筋でもディスク状を呈していた. また, 筋核の分布では, 足底筋に比べてヒラメ筋では筋核数が多く, その分布は不均一であった. 加齢と老化により, ヒラメ筋の筋核数は増加し, その分布の不均一性も増大した (図 2).

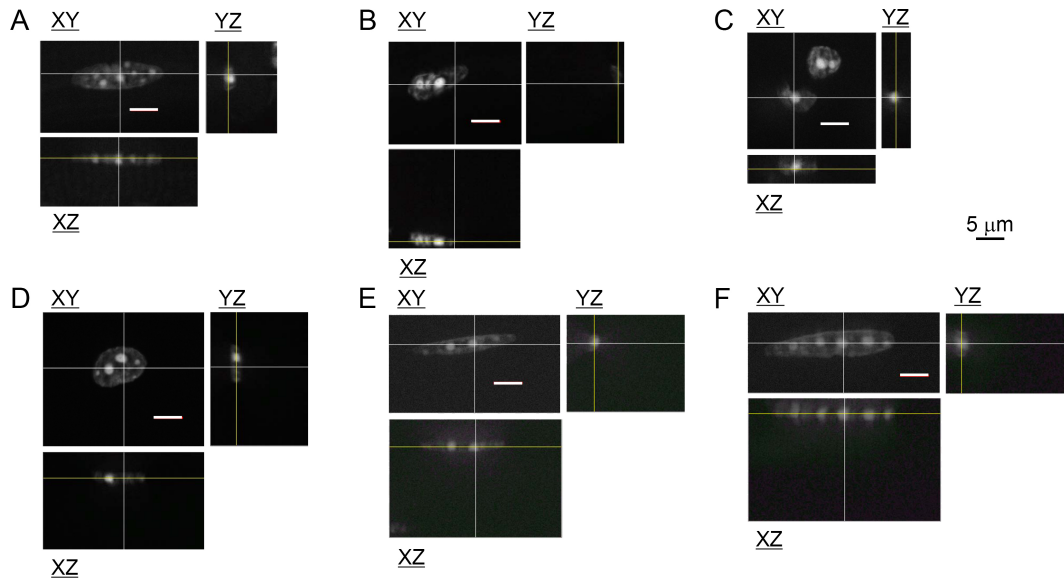


図2. 筋核の形状と多様性.

成熟マウスの筋核は、筋タイプに関わらずディスク状である。足底筋においてのみ、加齢や老化に伴い細長い巨大紡錘形の筋核が出現する。A：成熟マウスヒラメ筋，B：加齢マウスヒラメ筋，C：加齢促進 (SAMP8) マウスヒラメ筋，D：成熟マウス足底筋，E：加齢マウス足底筋，F：SAMP8 マウス足底筋。

さらに、部分的に筋核の凝集が散見された。一方、足底筋では、加齢と老化により細長い紡錘形の筋核が多数認められた。筋核数は減少する傾向を示し、不均一な分布が一部認められた。SAMP8 マウス足底筋では、細長い紡錘形の巨大な（長さ： $\geq 15 \mu\text{m}$ ，断面：直径 $2 \mu\text{m}$ 程度の円形）筋核が出現した（図3）。

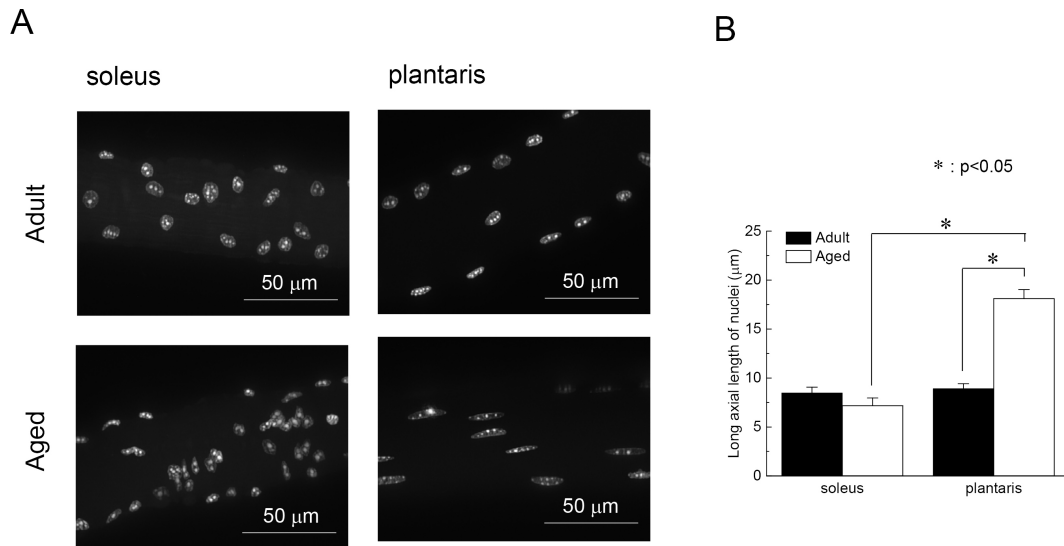


図3. 加齢マウスのヒラメ筋および足底筋における筋核の形状と分布.

A) 成熟マウス (Adult) と比較して加齢マウス (Aged) では、ヒラメ筋 (soleus) の筋核数は増加し、その分布の不均一性が増大している。さらに、部分的に筋核の凝集が散見される。足底筋 (plantaris) では、加齢により細長い紡錘形の筋核が多数認められる。B) 筋核長軸長の加齢による変化。足底筋では、加齢により筋核長軸が約2倍に延伸している。しかし、ヒラメ筋では、そうした傾向は認めない。

次に、後肢懸垂負荷により萎縮と再成長の影響を検討した。ヒラメ筋および足底筋共に後肢懸垂により萎縮し、その後再荷重に伴い再成長した。萎縮率ならびに再成長率共にヒラメ筋に比べ足底筋で低かった。後肢懸垂による筋萎縮に伴いヒラメ筋の筋核密度は増加し、筋核の凝集部が認められた。また、SAMP8 マウスのヒラメ筋では、萎縮に伴う筋核密度の増加がより顕著であり、筋核凝集部位では一定の方向に配列し連なる核群が観察された。一方、足底筋では、筋核の形状が不整形になる傾向が認められたものの、その形状や筋核密度、そしてその分布に大きな変化は認められなかった。また、再成長により筋核数やその分布は後肢懸垂前に戻る傾向を示した。しかし、部分的に筋核が凝集し、一定方向に配列した部分が認められた。特に、SAMP8 マウスヒラメ筋では、筋核数のさらなる増加が認められた。一方、SAMP8 マウス足底筋では、中心核と考えられる筋核が一定方向に配列した部分が多数認められた。筋衛星細胞核の形状に、萎縮と再成長の影響は認めなかった。スプライシング調節因子である MBNL1¹²⁾ は、筋萎縮により核分画含有量は減少し、その傾向は速筋である足底筋に比べ遅筋である腓腹筋内側部で顕著であった。再成長に伴う核分画 MBNL1 は増加したが、その増加は遅筋に比べ速筋で著明に認められた。

考 察

骨格筋に含まれる核に関する報告³⁾は、単位筋細胞当たりの筋核数の制御に関するものに限られ、筋衛星細胞ならびに筋核の形状に関する報告⁴⁵⁾はほとんどなく、その詳細は明らかになっていない。本研究では、加齢に伴い筋衛星細胞の小型化ならびに形状の不定形化が認められた。これは、筋衛星細胞の増殖能力あるいは筋細胞への筋核供給能力を低下させ、サルコペニア発症要因になりうるものと考えられた。また、サルコペニアの影響が強く出現する速筋細胞のみ、加齢に伴い筋核が細長い紡錘形を呈して、一部巨大核が認められた。さらに、廃用性筋萎縮時には、遅筋において筋核の縮小と不均等な分布も確認された。したがって、筋核形状の変化ならびに巨大筋核の出現もまた、サルコペニア発症要因の1つと考えられた。これまで、廃用性筋萎縮は遅筋細胞⁶⁾に、サルコペニアは速筋細胞に強く出現することは長らく謎であったが、筋核形状の応答から両筋細胞間における応答の差異を説明できることが初めて示された。また、廃用性筋萎縮からの再成長時にも中心核⁴⁷⁾が出現し、その中心核の形状は紡錘形を呈していることも確認された。以上より、加齢および廃用に伴い筋核形状が変化することが示唆された。こうした筋核形状の変化は、遺伝子発現を変化させて骨格筋の質的かつ量的な変容を引き起こすことが示唆される。萎縮と再成長の検討から、筋核形状の変化に伴い、MBNL1 の核内蓄積量の変化が関与していることもあわせて示唆された。MBNL1 はスプライシング調節因子であり、核内蓄積量の減少は mRNA プロセッシングを変調させることが示唆されている。今後、筋核形状と筋核蓄積分子の関係から、サルコペニア発症機構の全容解明に迫っていきたいと考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、豊橋創造大学保健医療学部の大野善隆、横山真吾、および日本学術振興会特別研究員の江川達郎である。また、本研究の実施に当たり、豊橋創造大学大学院健康科学研究科生体機能学分野生理学教室の教室員の協力を得た。本稿を終えるにあたり、本研究に御支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Masuda, A., Andersen, S., Doktor, K. K., Okamoto, T., Ito, M., Anderesen, B. S. & Ohno, K. : CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3'UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.*, **2** : 209, 2012.
- 2) Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M. P., Nishino, I., Takeda, S. & Ishiura, S. : Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci. Rep.*, **3** : 2142, 2013.
- 3) Bruusgaard, J. C., Egner, I. M., Larsen, T. K., Dupre-Aucouturier, S., Desplanches, D. & Gundersen, K. : No change in myonuclear domain during muscle unloading and reloading. *J. Appl. Physiol.*, **113** : 290-296, 2012.
- 4) Gnocchi, V. F., Scharner, J., Huang, Z., Brady, K., Lee, J. S., White, R. B., Morgan, J. E., Sun, Y. B., Ellis, J. A. & Zammit, P. S. : Uncoordinated transcription and compromised muscle function in the lmna-null mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *PLoS One*, **6** : e16651, 2011.
- 5) Qaisar, R. & Larsson, L. : What determines nuclear domain size? *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **58** : 1-12, 2014.
- 6) Ohno, Y., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T. & Goto, K. : Loading-associated expression of TRIM72 and caveolin-3 in antigravitational soleus muscle in mice. *Physiol. Rep.*, **2** : e12259, 2014.
- 7) Fujiya, H., Ogura, Y., Ohno, Y., Goto, A., Nakamura, A., Ohashi, K., Uematsu, D., Aoki, H., Musha, H. & Goto, K. : Microcurrent electrical stimulation facilitates regeneration of injured skeletal muscle in mice. *J. Sports Sci. Med.*, **14** : 297-303, 2015.