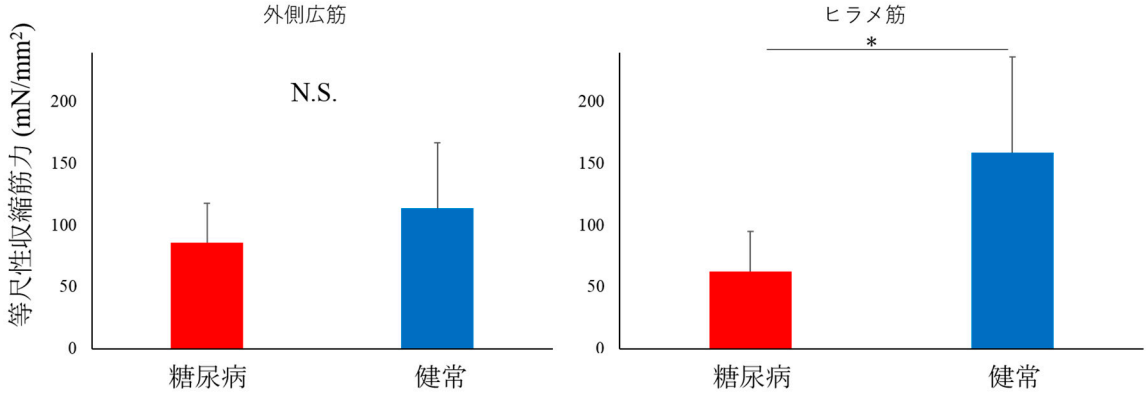
121　単一筋細胞を用いた、糖尿病が筋収縮特性に与える影響	福谷　充輝

【目的】糖尿病が代謝に与える影響は広く検証されているが、筋の収縮機能に与える影響はあまり検証されていない。筋の収縮機能が低下すると、運動不足によりさらなる糖尿病の悪化に繋がる可能性がある。そこで本研究では、糖尿病によって筋の収縮機能がどのように変化するかを、単一の筋細胞を摘出して検証した。

【方法】本研究では、糖尿病モデルとしてZDFラットを対象とした。ZDF（糖尿病条件）、およびコントロール（健常条件）から、速筋で構成される外側広筋、および遅筋で構成されるヒラメ筋を摘出した。これらの筋サンプルから、化学的、物理的処理によって単一の筋細胞を抽出し、筋細胞を浸した水溶液内にカルシウムイオンを加えることで筋収縮を誘発した。主要な測定項目は、筋細胞の断面積と最大等尺性収縮筋力から算出した単位断面積あたりの力、およびカルシウムイオン濃度を徐々に増大させていった時の等尺性筋力から求められるカルシウムイオン感受性とした。

【結果】本研究の結果、速筋である外側広筋においては、糖尿病条件、健常条件間において単位断面積あたりの力に差は認められなかったが、遅筋であるヒラメ筋においては、糖尿病条件は健常条件よりも単位断面積あたりの筋力が小さかった。一方でカルシウムイオン感受性は、いずれの筋においても条件間で差はみられなかった。上記の結果は、糖尿病によって筋細胞内に蓄積した脂肪によるクロスブリッジサイクルの阻害が原因として考えられ、この影響は筋線維タイプによって異なることが示唆された。

外側広筋（速筋）およびヒラメ筋（遅筋）における、糖尿病ラットと健常ラットの単位断面積あたりの筋力



121. 単一筋細胞を用いた、糖尿病が筋収縮特性に与える影響

福谷　充輝

*立命館大学 総合科学技術研究機構

Key words：クロスブリッジ，単位断面積あたりの力，カルシウムイオン感受性，筋線維タイプ

緒　言

生活習慣病の一つである糖尿病は、代謝に関する様々な問題を引き起こすことが知られており、腎臓の損傷による人工透析や失明のような、非常に重篤な健康問題も生じうる。そのため、骨格筋の糖代謝といった、糖尿病が代謝に与える影響については非常に多くの研究が行われている。一方で、糖尿病が引き起こす骨格筋の力発揮能力低下といったバイオメカニクス的な観点での研究はあまり行われていない。骨格筋の力発揮能力低下は、高齢者の転倒や寝たきりを引き起こす重要な因子であるため、糖尿病が骨格筋の力発揮能力に与える影響を明らかにすることは、検証する価値のあるトピックだと考えられる。

近年、糖尿病による骨格筋の力発揮能力低下が複数の研究で確認されている［1，2］。この糖尿病による力発揮能力低下の理由として、骨格筋の萎縮（骨格筋の量的な低下）が挙げられている。言い換えれば、骨格筋の質的な低下（収縮機構の阻害）は生じていないと結論づけている［3］。しかしながら、糖尿病に伴い脂肪蓄積が生じることが提唱されており［4］、この脂肪は筋細胞内にも蓄積され、筋細胞内に脂肪が侵入すると、骨格筋の力発揮能力が低下しうることを踏まえると、糖尿病によって骨格筋の収縮機構が阻害され、質的な低下も生じている可能性も考えられる。

また、先行研究の問題として、先行研究の多くはヒト生体を対象としているため、筋細胞が発揮した力をダイレクトに評価することは困難であり、多くの推定の上に成り立っていることが挙げられる。したがって、より直接的な評価法を用いて正確に再検証すべきである。加えて、先行研究間では、測定対象とされた筋が統一されていない。筋が異なれば筋線維組成も異なること、加えて、筋線維組成によって、脂肪蓄積の程度は異なることを踏まえると［5］、糖尿病が骨格筋の力発揮能力に及ぼす影響は速筋と遅筋では異なる可能性があるため、各筋線維組成それぞれで個別に検証すべきでる。

これらのことを踏まえ、本研究では、糖尿病モデルおよび通常モデルのラットを用いて、単一の筋細胞を抽出し、力発揮能力を網羅的に解析した。単一の筋細胞であれば、筋力と筋断面積を正確に計測することが出来るため、筋の質（ここでは、単位断面積あたりの力を筋の質と定義）をより正確に評価することが出来る。また、単一の筋細胞においては筋収縮をカルシウムイオン濃度で制御することが出来るため、生体を対象とした実験では避けることが出来ない神経系の影響を完全に排除した、純粋な筋細胞の力発揮能力を評価することが可能である。これらの利点を活かし、糖尿病モデルと健常モデルのラット間で筋の力発揮能力を詳細に比較し、さらに、この比較を速筋および遅筋を対象に実施することで、糖尿病の影響が筋線維組成に依存するのかどうかも合わせて検証した。

方　法

1.　筋サンプル

実験開始に先立ち、所属機関の動物実験委員会の承認（BKC2017-03）を得た。本究では、糖尿病モデル（ZDF $^{fa/fa}$）、および健常モデル（ZDF$^{fa/+}$、もしくはZDF$^{+/+}$）のラットを対象とした。使用部位は、速筋が豊富な外側広筋（糖尿病モデルN＝6、健常モデルN＝6）、および遅筋が豊富なヒラメ筋（糖尿病モデルN＝6、健常モデルN＝6）の2つとした（合計N＝24）。イソフラレンを用いた麻酔下で、ペントバルビタールナトリウムの過剰摂取により安楽死させた後、ラットの対象筋を摘出した。

*現在の所属：立命館大学 スポーツ健康科学部

2. セットアップおよび実験試行

摘出した筋サンプルをグリセリンに浸して 2〜4 週間、−20℃で保存することで結合組織および筋の細胞膜を化学的に除去した。実験当日に、顕微鏡下で単一の筋細胞を物理的に抽出し、力学計測装置に固定した。各条件における筋力比較を可能とするため、レーザー回折法を用いて筋の長さ（サルコメア長）を計測し、すべての条件においてサルコメア長が 2.4 μm（筋の力-長さ関係における指摘長）になるように統一した。その後、実体顕微鏡にて筋細胞の直径を計測し、筋細胞の断面を円と仮定して筋細胞の断面積を算出した。筋収縮は、筋細胞を浸した水溶液にカルシウムイオンを加えることで誘発した。計測項目は、最大等尺性収縮時の力を筋細胞の断面積で除した単位断面積あたりの力、カルシウムイオン濃度を増大させていった時の筋力の変化を計測することによるカルシウムイオン感受性とした。また、各サンプルの筋線維タイプを実測により判別するため、カルシウムイオンのかわりにストロンチウムイオンを用いて筋収縮を誘発した時の筋力を計測した。これは、遅筋は速筋とは異なり、カルシウムイオンだけでなくストロンチウムイオンによっても強い筋収縮が誘発されるという特性を利用したものである［6］。その結果、外側広筋から得られたサンプルはすべて速筋（ストロンチウムイオンによる筋収縮時の筋力が、最大筋力に対して 21.3±15.1%）であり、ヒラメ筋から得られたサンプルはすべて遅筋（ストロンチウムイオンによる筋収縮時の筋力が、最大筋力に対して 97.4±4.5%）であった。

3. 統計

単位断面積あたりの力に関しては、対応のない t 検定を用いて、外側広筋、ヒラメ筋それぞれ、糖尿病条件と健常条件とで比較した。カルシウムイオン感受性に関しては、対応のない二元配置の分散分析を用いて、交互作用および主効果の有無を検証した。有意水準は α = 0.05 とした。統計は、IBM SPSS 25 を用いて実施した。

結　果

1. 単位断面積あたりの力

対応のない t 検定の結果、外側広筋においては糖尿病条件と健常条件とで有意差はみられなかった（$p = 0.29$）。一方、ヒラメ筋においては、糖尿病条件と健常条件とで有意差がみられた（$p = 0.02$）（図 1）。

2. カルシウム感受性

対応のない二元配置の分散分析の結果、外側広筋、ヒラメ筋、いずれにおいても交互作用はみられなかった（外側広筋：$F = 1.209$, $p = 0.348$、ヒラメ筋：$F = 2.637$, $p = 0.094$）。また、糖尿病条件、健常条件間の主効果もみられなかった（外側広筋：$p = 0.596$、ヒラメ筋：$p = 0.180$）（図 2）。

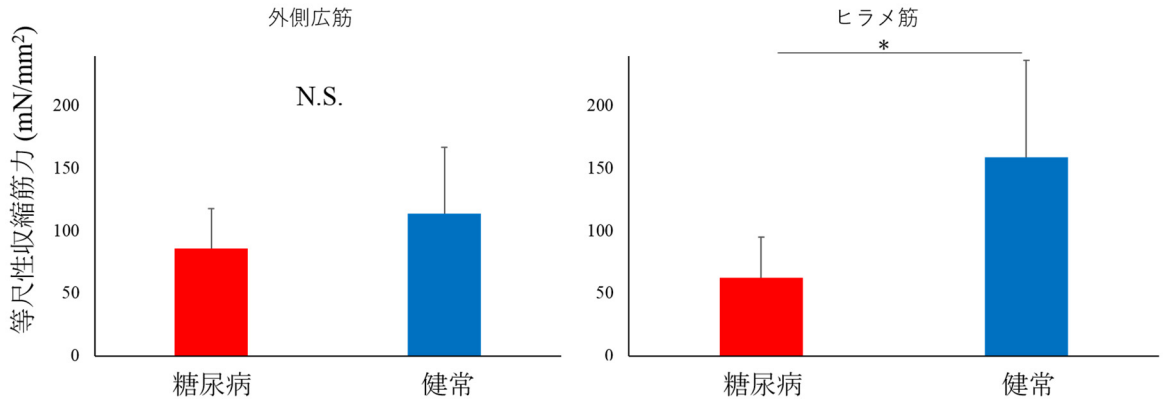


図 1. 単位断面積あたりの力

左側の図は、外側広筋における糖尿病条件（赤）と健常条件（青）の単位断面積あたりの力を示す。
右側の図は、ヒラメ筋における糖尿病条件（赤）と健常条件（青）の単位断面積あたりの力を示す。
*は糖尿病条件と健常条件間の有意差を示す。

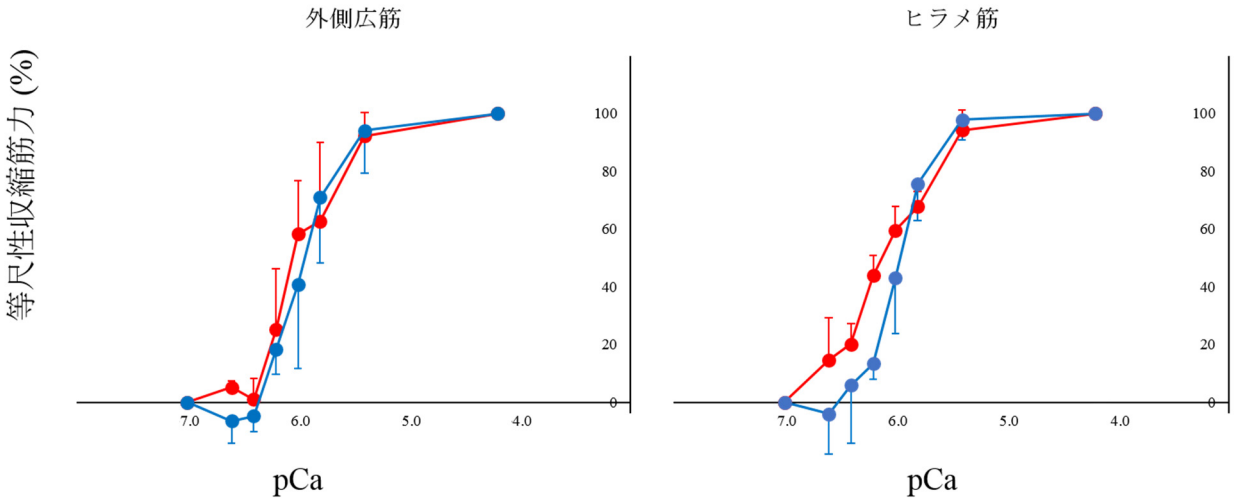


図 2. カルシウムイオン感受性

左側の図は、外側広筋における糖尿病条件（赤）と健常条件（青）のカルシウムイオン感受性を示す。
右側の図は、ヒラメ筋における糖尿病条件（赤）と健常条件（青）のカルシウムイオン感受性を示す。
縦軸は、pCa4.2 の時の筋力を 100%とした時の相対値、横軸はカルシウムイオン濃度を示す。
どちらの条件においても、糖尿病条件、健常条件において有意差はみられない。

考　察

本研究では、糖尿病条件は健常条件よりも単位断面積あたりの力が低下すると仮説を立てて実験を行った。その結果、速筋である外側広筋では単位断面積あたりの力は、条件間において差は認められなかったが、遅筋であるヒラメ筋においては、糖尿病条件は健常条件よりも単位断面積あたりの力が有意に小さかった。一方で、カルシウムイオン感受性に関しては、いずれの筋においても条件間で差はみられなかった。

これまでの研究では、糖尿病によって筋の量が低下し、結果的に筋力が低下すると考えられていた［3］。しかしながら、本研究によって筋の量だけでなく、筋の質も低下することが示された。現時点では、糖尿病によって筋の質（単位断面積あたりの力）が低下するメカニズムを特定するのは困難であるが、本研究では単一の筋細胞という実験系を利用していることを踏まえると、単位断面積あたりの力の低下は、カルシウムイオンとトロポニン C が結合してからクロスブリッジの回転が行われるまでのいずれかの段階で生じているといえる。糖尿病によって筋の細胞内に脂肪が蓄積すること［4］を踏まえると、この筋細胞内の脂肪が物理的に上述の筋収縮機構を阻害している可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、意図的に筋細胞や筋原線維の中に脂肪を送り込み、クロスブリッジキネティクスが dose-dependent に減弱していくのかどうかを調べる必要がある。

遅筋であるヒラメ筋においてのみ単位断面積あたりの力が低下するという結果は、糖尿病が筋の収縮機能に与える影響は筋線維組成によって異なる、すなわち、糖尿病の影響を受けやすい筋と受けにくい筋が存在することを示唆している。さらには、筋線維組成は個人差が大きいことを踏まえると、糖尿病の影響を受けやすい人と受けにくい人が存在する可能性がある。したがって、糖尿病を予防するための運動や罹患後のリハビリテーションは、部位差や個人差を踏まえたオーダーメイドのプログラムを作成することが望ましいと考えられる。

文 献

1) Leenders M, Verdijk LB, van der Hoeven L, Adam JJ, van Kranenburg J, Nilwik R, van Loon LJ. Patients with type 2 diabetes show a greater decline in muscle mass, muscle strength, and functional capacity with aging. J Am Med Dir Assoc. 2013 Aug;14(8):585-92. doi: 10.1016/j.jamda.2013.02.006. Epub 2013 Mar 26. PMID: 23537893.

2) Hatef B, Bahrpeyma F, Mohajeri Tehrani MR. The comparison of muscle strength and short-term endurance in the different periods of type 2 diabetes. J Diabetes Metab Disord. 2014 Jan 29;13(1):22. doi: 10.1186/2251-6581-13-22. PMID: 24476108.

3) RodríGuez-Reyes N, RodríGuez-Zayas AE, Javadov S, Frontera WR. Single muscle fiber contractile properties in diabetic RAT muscle. Muscle Nerve. 2016 Jun;53(6):958-64. doi: 10.1002/mus.24988. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26598963.

4) Monaco CMF, Perry CGR, Hawke TJ. Diabetic Myopathy: current molecular understanding of this novel neuromuscular disorder. Curr Opin Neurol. 2017 Oct;30(5):545-552. doi: 10.1097/WCO.0000000000000479. PMID: 28665810.

5) Komiya Y, Sawano S, Mashima D, Ichitsubo R, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Mizunoya W. Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. J Muscle Res Cell Motil. 2017 Apr;38(2):163-173. doi: 10.1007/s10974-017-9468-6. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28281032.

6) Takagi A, Yonemoto K, Sugita H. Single-skinned human muscle fibers: activation by calcium and strontium. Neurology. 1978 May;28(5):497-9. PMID: 565489.