

博士論文の内容の要旨

論文題目 Effects of mechanical unloading on collagen metabolism in skeletal muscle (力学的除負荷が筋のコラーゲン代謝に与える影響)

氏名 廣瀬立朗

ベッドレストや宇宙飛行により筋は萎縮する。この筋萎縮モデルとしてマウスやラットを用いた尾部懸垂がある。尾部懸垂後のヒラメ筋での筋萎縮、遅筋線維減少などが報告されている。このような力学的環境の変化にたいして、骨格筋細胞の応答の報告は数多くなされている。一方、骨格筋細胞を取り囲む細胞外マトリクスも同様に骨格筋組織において重要な役割(力伝達・支持等)を果たすと考えられる。細胞外マトリクスの主要構成成分であるI型コラーゲンの生合成に関して、尾部懸垂による力学的変化が及ぼす効果についての報告は少ない。そこで本研究では、尾部懸垂が骨格筋のI型コラーゲン代謝に及ぼす影響を明らかにするため、いくつかの実験を行った。以下に、主要な実験の結果を述べる。

実験1 尾部懸垂がマウス筋内におけるI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖転写活性に与える影響

背景：筋内結合組織の主要構成成分はI型コラーゲンである。I型コラーゲン分子は $\alpha 1$ 鎖2本と $\alpha 2$ 鎖1本でできた3本鎖らせんヘテロトリマーである。 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖は2:1で協調して合成されている。Crombrughe(1996)らのグループにより、 $\alpha 2$ 鎖のプロモーター、エンハンサーの下流にルシフェラーゼと β ガラクトシダーゼをレポーター遺伝子として組み込んだマウスが作成された。レポーター遺伝子による転写活性の測定は簡便かつ高感度での検出が可能である。特に結合組織のmRNA発現が少ない骨格筋などにおいては、レポーター遺伝子をもったトランスジェニックマウスを用いて解析することでより詳細な検討を加えることが可能になる。本実験は尾懸垂後のヒラメ筋および腓腹筋におけるI

型コラーゲン遺伝子の転写活性について検討することを目的とした。

方法：I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖（COL1A2）のレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ・ β ガラクトシダーゼ）を導入したトランスジェニックマウス（pGB-17）を被検動物とした。性別は♀、週齢は11～14週齢とした。尾懸垂3、7、14日後、後肢筋でのCOL1A2遺伝子転写活性を調べるためにルシフェラーゼ活性を測定した。組織内でのI型コラーゲン転写活性亢進部位を調べるためにx-gal染色を行った。また、ゼラチンザイモグラフィを行い、コラーゲン分解の活性を観察した。

結果：尾懸垂3、7、14日後、ヒラメ筋におけるCOL1A2遺伝子転写活性はコントロールと比べてそれぞれ約360、410、350%上昇した。腓腹筋でも同様のパターンでI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の遺伝子転写活性が高まった。これらの結果から尾懸垂によって後肢筋のI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の遺伝子転写活性はすみやかに上昇し、かつその活性は2週間の尾懸垂の間維持されることが示された。

x-gal染色では筋紡錘内、神経繊維などに染色が観察された。ゼラチンザイモグラフィでは尾部懸垂によりMMP-2の活性が顕著に高まっていた。

考察：力学的環境変化に対して特に早期では自己受容器などが応答した結果、I型コラーゲンmRNA転写活性に影響を与えた可能性がある。コラーゲン分解が活性化された可能性が考えられ、結合組織の再構築が行われていることが示唆された。またギプス固定や筋ジストロフィーによる筋萎縮でも、I型コラーゲンが主成分である筋紡錘のアウターカプセルの肥厚が報告されており（Esaki, 1966. Ovalle, 1986）、尾懸垂においても筋紡錘アウターカプセルの肥厚による自己受容器の変化およびその応答能の変化が起きる可能性がある。

実験2 尾部懸垂がラット筋内におけるコラーゲン mRNA とその制御因子の発現に与える影響

背景：実験1において用いたレポーター遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域はコラーゲン合成の転写活性を最大限に測定するために作られている可能性があり、コラーゲン合成を抑制するシグナルを感知しない可能性が示唆される。コ

ラーゲン合成を制御する代表的なタンパクとして TGF- β と TNF- α が知られている。TGF- β はレセプターを介し Smad3 をリン酸化してコラーゲンの合成を亢進する。一方 TNF- α はコラーゲンの合成を抑制する。しかし、筋萎縮におけるコラーゲン発現を制御するタンパクの発現は不明なところが多い。

目的：そこで本実験では尾部懸垂が I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 mRNA (COL1A2) TGF- $\beta 1, 2, 3$ とその受容体である TGF RECEPTOR I (TGFRI) の発現、また TNF- α の発現に与える影響を試料の大きいラットを用い検討した。

方法：5 週齢の Wister 系雄ラットに 1, 3, 7, 14 日間の尾部懸垂（各群：n=6）を行った。実験終了後麻酔下による脱血死させ、ヒラメ筋を摘出し、ノーザンブロッティングにより COL1A2 の発現量と in-situ hybridization により発現場所を検討した。ウエスタンブロッティング法により TGF- $\beta 1, 2, 3$ と TGFRI、Smad3 と TNF- α の発現量を検討した。また、免疫組織化学法により TGF- $\beta 1$ と TNF- α の発現部位を検討した。

結果：尾部懸垂によりラットヒラメ筋内での COL1A2 の発現量は 3 日目に減少した。また COL1A2 の主要な発現部位は筋紡錘、神経組織であった。TGF- $\beta 1$ と TNF- α の発現量はそれぞれ 7 日目に一過性に増加、3 日目以降継続的に増加した。TGF- $\beta 2$ と TGF- $\beta 3$ の発現量は 7 日間の尾部懸垂群にて増加し、尾部懸垂 14 日間の群ではコントロールレベルに戻った。これは TGF- $\beta 1$ の発現パターンと同様であった。TGFRI の発現量は尾部懸垂中に変化が見られなかった。TGF- $\beta 1$ と TNF- α の発現部位はともに主に筋紡錘、神経組織に観察され、尾部懸垂中にもこれらの発現部位は同じであった。

考察：尾部懸垂により TGF- β は 7 日目に一過性に発現量が増加した。TNF- α はコラーゲン合成を抑制するが、これは発現量が増加した TNF- α に対するカウンターメジャーと考えられた。尾部懸垂により TGF- β s と TNF- α は発現量に影響を受け筋内コラーゲンの合成を調節している可能性が示唆された。TGF- $\beta 1$ と TNF- α の発現部位は神経組織や筋紡錘周辺に観察され、これらの部位ではコラーゲン代謝が盛んであることが示唆された。

実験 3 尾部懸垂がラットヒラメ筋内における NT-3 と TrkC 発現に与える影響

背景：実験 2 より尾部懸垂により筋紡錘や神経組織周辺においてコラーゲン代謝にかかわるタンパク質の発現の変化が認められた。尾部懸垂により筋紡錘からの求心性の放電量が一過性に減少することが知られている。また神経栄養因子の 1 つである neurotrophin-3 (NT-3) が筋紡錘の機能を制御するという報告がある。そこで本実験では尾部懸垂が NT-3 とその受容体の TrkC の発現に及ぼす影響を検討した。

方法：5 週齢の Wister 系雄ラットに 7、14 日間の尾部懸垂を施した。実験終了後麻酔下による脱血死させ、ヒラメ筋を摘出し、ウエスタンブロッティング法により NT-3 と TrkC の発現量を検討した。また、免疫組織化学法により両タンパクの発現部位を検討した。

結果：尾部懸垂によりヒラメ筋内の TrkC の発現量は 7 日目において減少し 14 日目には回復していた。NT-3 の発現量も同様のパターンを示した。両タンパクとも錘内線維にシグナルが観察され、尾部懸垂により変化は見られなかった。

考察：TrkC タンパク量は尾部懸垂により速やかに減少し、14 日後には回復していた。これは尾部懸垂中の求心性シグナルの変化パターンを検討した先行研究と一致していた。尾部懸垂により NT-3 と TrkC タンパク発現量が増加し、筋紡錘の機能に影響を与えた可能性が示唆された。

まとめ：尾部懸垂によってラットヒラメ筋の I 型コラーゲン合成が転写レベルで減少し、この変化には TGF- β と TNF- α が関与していることが判明した。また、こうした変化が顕著に現れる部位は、筋紡錘と神経組織であり除負荷に伴う求心性神経活動の低下が、より上位の環境要因として関与することが示唆された。