

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500443

研究課題名（和文） 神経筋接合部のリモデリングにおける分子機構の解明

研究課題名（英文） Neuromuscular junction remodeling: a study of molecular mechanism

研究代表者

三秋 泰一 (MIKI HIROICHI)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：60251964

研究成果の概要（和文）：医学的リハビリテーションの基盤研究として、脱神経筋における病態変化および修復機構を明らかにするために、ラット脛骨神経切断により脱神経モデルを作成し、関連する因子について分子生物学的、免疫組織学的解析を行った。その結果、神経筋接合部の成熟や筋再生に関連する因子は増加したが、その相互関係の解明には至らず、今後、更なる研究が期待された。

研究成果の概要（英文）：This scientific research in rehabilitation medicine was performed in order to clarify the pathological changes and repair mechanism of neuromuscular junction after tibial nerve denervation. The factors related to the maintenance and repair of neuromuscular junction function were studied by immunohistological observation and molecular biology analysis. Our results indicated that a factor relevant to muscle repair and a factor participant in neuromuscular junction maturity were increased. Further investigation is needed to ascertain the correlation between those factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：理学療法学

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：リハビリテーション、再生

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子（HGF）は、肝再生因子の本体として我国で発見、クローニングされた増殖因子である。HGFは4つのクリングルドメイン構造をもつ α 鎖とセリンプロテアー

ゼ様構造をもつ β 鎖からなるヘテロダイマーであり、主に間葉系細胞で産生される。一方、HGF受容体はプロトオンコジーンのひとつであるc-Metチロシンキナーゼ型受容体で、主に上皮細胞に発現している。C-MetはHGFが結合することによりリン酸化され、細胞内

にシグナルを伝達する。HGF は研究が進むにつれ、肝臓、腎臓、肺、運動神経などの保護・再生や、血管新生、骨格筋衛星細胞の活性化などの生物活性を有することが明らかとなり、多機能因子として注目されている。HGF は運動ニューロンに対して、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性を調整するとともに、末梢神経損傷後の再神経支配にも関与している。さらに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスに HGF 過剰発現させたダブルトランスジェニックマウスにおいて、寿命の延長、運動神経細胞死保護、運動機能の維持が確認されており、その治療薬としての可能性も示唆されている。骨格筋において、HGF が筋衛星細胞の mitogen であり、骨格筋衛星細胞の活性化のトリガーとして重要な役割を担っていることが報告されている。HGF は通常、細胞外マトリックスのプロテオグリカンに結合しているが、筋線維損傷や筋線維への伸張刺激により遊離し、筋衛星細胞の細胞膜表面に存在している c-Met に結合して衛星細胞を活性化する。筋衛星細胞自体からも HGF が産生されることでオートクリン、パラクリンとして機能している。神経筋接合部においても HGF が存在し、筋衛星細胞の活性化とともにアセチルコリンレセプター (AChR) の凝集に関与していることが示唆されている。骨格筋は不動や非荷重によって蛋白分解と合成に変化が生じ、筋湿重量の減少や組織学的形態変化、筋線維の速筋化、毛細血管の減少、運動単位の減少、筋収縮機能の低下といった適応現象を生じる。さらに不動や非荷重は骨格筋細胞だけでなく筋衛星細胞のアポトーシスを惹起し、再生能力の低下を引き起こすと考えられる。また、脱神経筋においても、同様の変化に加え、AChR のリモデリングが報告されている。我々は HGF が正常ラットの筋衛星細胞と考えられる細胞にも発現していること、14 日間の尾部懸垂により廃用性筋萎縮を惹起したマウス下肢筋へ再荷重を行うことで、特に抗重力筋であるヒラメ筋において HGF protein が増加することを報告した。さらに筋衛星細胞と考えられる単核細胞に HGF、c-Met、増殖細胞核抗原 (PCNA) が発現していることを免疫染色法によって示した。

現在、部分脱神経後のリモデリングと HGF 発現、筋衛星細胞の活性化および AChR の凝集の関連性について述べた報告はない。そこでこれらの関連性を明らかにすることを目的に研究を実施し、外傷の圧迫等による神経損傷後の低周波電気刺激や運動療法の有用性を検証するとともに、新しい治療機器や治療薬の開発に発展させる。

2. 研究の目的

ラット部分脱神経筋の神経筋リモデリング機構における増殖因子の作用、筋衛星細胞の活動およびその局在を遺伝子工学、免疫組織化学的手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

対象は Wistar 系 9 週齢雄ラットとした。ラットは無作為に脱神経群と対照群に分類した。本動物実験は金沢大学動物実験委員会において承認を得て実施した。

すべての実験動物はペントバルビタールナトリウム (5mg/100g 体重) を腹腔に投与し、麻酔効果を得た後、右大腿外側を切開し、坐骨神経を露出した。坐骨神経は大腿末梢部付近において、脛骨神経、総腓骨神経、後腓腹皮神経に分岐しているため、脱神経群の右脛骨神経をナイロン糸を用いて結紮し、その中枢部をおよそ 5mm にわたって切除した。その後、ケージに戻し、 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間毎の明暗サイクルで飼育した。その間、水、食餌は自由摂取可能な状態とした。処置後 1、3、7 日後に足底筋および血液を採取し、組織は RNA 発現解析、酵素免疫定量解析、免疫組織学的解析、血液は酵素免疫定量解析を行った。RNA 解析のために、一昼夜 4°C で RNA 安定化試薬に浸漬後、解析時まで -80°C で保存した。免疫組織学的解析のために、組織の横断切片が得られるように O. C. T. compound に包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結し、使用時まで -80°C で保存した。酵素免疫定量解析のために、組織は即座に凍結保存し、血液は EDTA で凝固防止後、遠心により血漿を分離後、使用時まで -80°C で保存した。

RNAはスピナラムを用いて total RNA を抽出した後、逆転写反応を行い、1st strand cDNA を合成した。Real-time PCR システム LightCycler (Roche Diagnostics) を用いて、インターカーレーター法により Real-time PCR を行い、HGF、c-Met、MuSK、Dok7、AChR alpha、AChR gamma、AChR epsilon mRNA の発現量を検出し、GAPDH をリファレンス遺伝子として算出した。

酵素免疫定量解析として、組織はマウス・ラット HGF 臓器抽出液 (特殊免疫研究所) 内で均質化し、4℃で 30 分間遠心して中間層を回収した。組織サンプルおよび血漿はラット HGF EIA (特殊免疫研究所) を用いて ELISA 法を行い、マイクロプレートリーダー (TECAN) を用いて HGF protein 量を検出した。

免疫組織学的解析として、クライオスタットを用いて凍結組織切片を作成し、固定後、HGF、リン酸化 c-Met、MuSK、AChR の検出のため α -bungarotoxin conjugate Alexa Fluor 555、チロシンリン酸化抗体を用いて蛍光抗体法による免疫染色を行った。それらの局在は蛍光顕微鏡 Bio Zero (キーエンス) を用いて検出・撮影した。

4. 研究成果

ラット足底筋湿重量は脱神経 3 日後より対照群と比較して有意に減少した (図 1)。

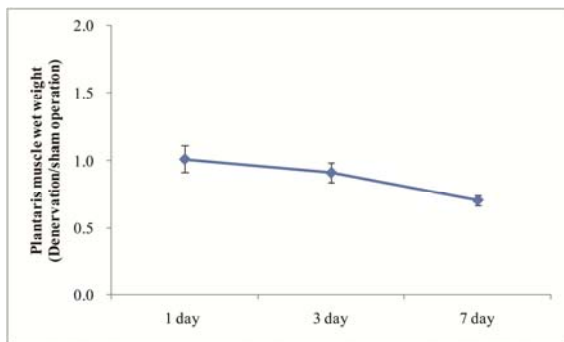


図 1. 足底筋湿重量の変化

足底筋における HGF、c-Met mRNA 発現量はどちらも脱神経 1 日後より脱神経筋において有意に増加した。HGF mRNA 発現量は 7 日まで徐々に増加し、対照群の 3.5 倍となった。また、c-Met mRNA 発現量は脱神経 3 日後の 5 倍をピークに減少し、7 日後では 4.2 倍となっ

た (図 2)。

また、MuSK、Dok7、AChR-alpha、AChR-gamma、AChR-epsilon mRNA 発現量は脱神経 3 日後では有意に増加していた (図 3)。

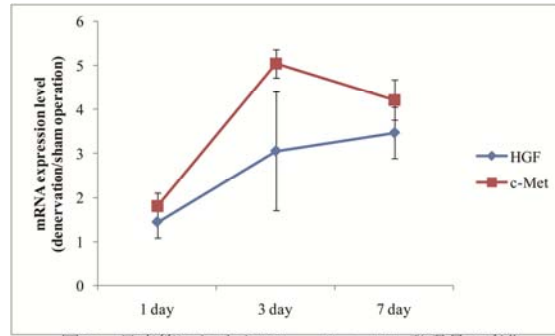


図 2. 足底筋における HGF、c-Met mRNA 発現量の変化

ELISA 法により HGF protein level を調査した結果、足底筋および血漿において、すべての期間で有意な変化は認められなかった (図 4)。

免疫染色により HGF は基底膜および AChR の周辺に、また、チロシンリン酸化および MuSK は AChR と同様の部位に観察された。し

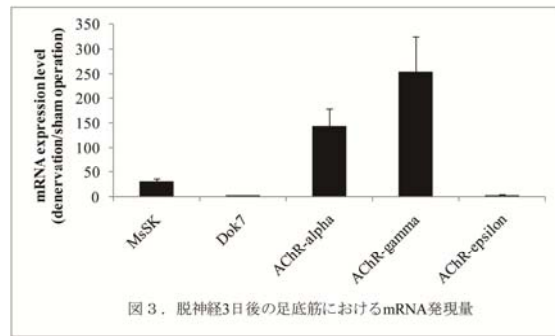


図 3. 脱神経3日後の足底筋におけるmRNA発現量

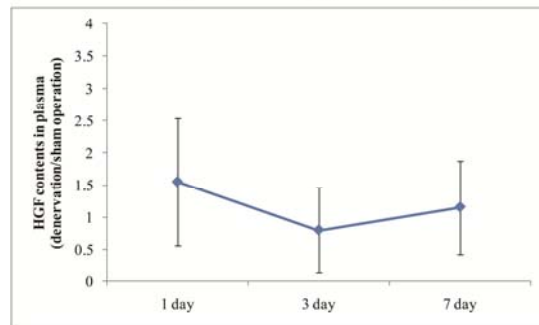
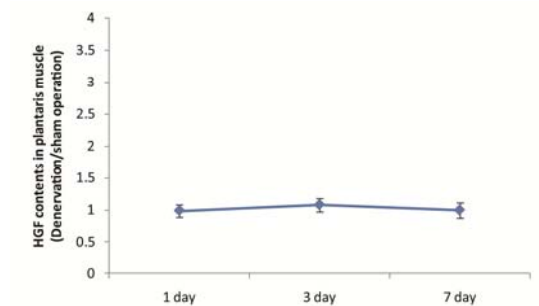


図 4. HGF protein level の変化

かし、リン酸化 c-Met の局在は検出できなかった。

これらの結果は、脱神経後早期において c-Met 発現量に対して HGF の産生もしくは血液を介した供給が不足していることを示していると考えられた。また、神経筋接合部において HGF およびチロシンリン酸化が観察されたが、リン酸化 c-Met が確認できず、現時点では、HGF が神経筋接合部のリモデリングに関与していることを明言できない。

今後、さらに長期的な観察や in vitro の実験系による研究が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tsuji, K., Inaoka, PT., Tanaka, S., Tachio, K. (Molecular biological changes in reloaded skeletal muscles after rat hindlimb suspension, 21(2009), 221-226, 査読有)

[その他]

ホームページ等

http://phys_ther.w3.kanazawa-u.ac.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立野 勝彦 (TACHINO KATSUHIKO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：40092788

(H20：退職)

洲崎 俊男 (SUSAKI TOSHIO)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：40171194

(H20：研究分担者, H21 退職)

三秋 泰一 (MIAKI HIROICHI)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：60251964

(H21:研究分担者)

(2) 研究分担者

田中 正二 (TANAKA SHOJI)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：70422657

稲岡プレイアデス千春

(INAOKA PUREIADESU CHIHARU)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：90507386

(3) 連携研究者

なし