

廃用性筋萎縮の病態と再荷重の過程における 骨格筋再構築と筋内血管の新生

保健医療学専攻・理学療法学分野・基礎理学療法学領域
学籍番号：17S3002 氏名：相原 正博
研究指導教員：丸山 仁司教授 副研究指導教員：堀本 ゆかり教授

キーワード：廃用性筋萎縮, ギプス固定, 再荷重, マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs), 血管新生, 血管内皮増殖因子 (VEGF)

1. 研究の背景と目的

廃用性筋萎縮は、長期臥床や不活動によって生じる。廃用性筋萎縮が進行すると、寝たきりの状態になるため、その病態に則した治療や予防法を見出すことは超高齢社会を迎えているわが国では重要な課題と言える。しかし、廃用性筋萎縮のメカニズムは十分には解明されておらず、その病態に対する介入時期や効果判定する評価方法が少ない事や、理学療法の適応も臨床経験に頼らざるを得ない現状もあり、有効な理学療法が未だ確立されていない。一方で、運動療法のような骨格筋に対する機械的刺激は、骨格筋に微細筋損傷を生じさせることから、筋萎縮を増悪させる可能性もある。そのため、科学的根拠に基づいた病態の理解が必要となる。これまで私は、廃用性筋萎縮と再荷重の過程での骨格筋から分泌され骨格筋に作用するマイオカインや骨格筋の再構築に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteases: MMPs) に注目して研究を行ってきた。MMPs の内、特に MMP-2 や MMP-9 はゼラチナーゼ群に分類され、筋膜や細胞基底膜を構成するコラーゲンの分解を誘導する機能がある。先行研究では、筋ジストロフィーなどの筋疾患の筋再構築に関与することや、腫瘍増殖、腫瘍細胞の血管新生に関与していることが報告されている。しかし、筋萎縮や再荷重における骨格筋内での MMPs の動態とその臨床的意義についてはほとんど知られていない。そこで、今回 MMPs の動態をより詳細に検討するとともに、これに伴って骨格筋内でどのような変化が起きているのか検討することを目的とした。本研究によって運動療法を実施する上で、身体に生じている事象を裏付ける基礎的知見になると考える。

2. 方法

【対象】近交系実験用マウス C57BL/6 のオス（9 週齢）を、通常飼育を行うコントロール群 (Control: Co 群)、ギプス固定を用いた廃用性筋萎縮モデルのギプス固定群 (Cast Immobilization: CI 群)、筋萎縮誘発後に 1 日間再荷重した群 (Reloading for 1 day: RL1 群)、筋萎縮誘発後に 14 日間再荷重した群 (Reloading for 14 day: RL14 群) の 4 群 (各 7 匹) に割り付けした。

【方法】筋萎縮誘発方法は、膝関節伸展、足関節底屈位にてギプス固定を実施し、2 週間の固定期間を設けた。前肢と一側後肢を用いてケージ内を移動し、餌と水は自由に摂取できるようにした。飼育中にギプス固定による浮腫や緩みが生じた際には、その都度巻き直しを行った。2 週間の固定期間後、ギプス包帯を除去し、再荷重を 1 日間、14 日間行った。実験期間終了後に前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋を単離した後、筋湿重量を計測し、凍結横断切片を作成した。H&E 染色、免疫染色にて組織学的解析を実施した。血液中の MMPs は、血清を調製した後にマルチプレックスサスペンションアレイ解析にて定量化した。骨格筋中の MMPs は、マイクロアレイ法にて遺伝子発現量を網羅的に解析した。また、STRING データベース (functional protein association networks) から MMPs に関連する遺伝子群を抽出した。さらに、マイクロアレイで解析した全ての遺伝子の中で、どの機能的グループに属する遺伝子群が大きく変動し

たかをみるため functional annotation 解析及び Heat map 解析を実施した。

筋内血管の評価は、alkaline phosphatase 染色 (AP 染色) 及び免疫蛍光染色 (CD31) を用いて毛細血管及び血管内皮細胞を形態学的に評価した。また、血管新生に関わる因子を遺伝学的解析、マルチプレックスサスペンションアレイ解析にて検討した。MMPs と同様に、VEGF に関連する遺伝子群を STRING データベースから抽出し、遺伝子発現量を解析した。

統計解析は、各群間の各測定結果で一元配置分散分析を行った後、Bonferroni 法の多重比較検定を用いて比較した。検定において有意水準は5%とした。

3. 倫理上の配慮

研究を実施するにあたり、国際医療福祉大学 (第 18021 号) 及び帝京科学大学動物委員会の承認を得て (承認番号 18C039, 18C052) 実験を行った。また動物の扱いに際しては、動物実験のガイドラインに則して研究を実施した。

4. 結果

筋湿重量は、Co 群と比較して CI 群で有意に減少した。RL1 群では筋萎縮の改善は認められなかったが、RL14 群のヒラメ筋では有意に筋湿重量が増加した。腓腹筋の免疫染色では、MMP-2 は RL1 群で、MMP-9 は RL14 群で強い染色がみられた。骨格筋中の MMP-2 は、RL1 群で遺伝子発現量が増加した。一方 MMP-9 は、RL14 群で遺伝子発現量が増加した。血液中の MMP-2 は有意な変動は認められなかったが、MMP-9 は CI 群で有意に上昇し、RL1 群で低値を示した。STRING のデータベースから MMP-2, 9 と関連する遺伝子を検索したところ、両者とも血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) が強く関連していることが明らかとなった。そこで、VEGF の遺伝子発現の変動をみたところ、CI 群と RL14 群で遺伝子発現量が増加したが、RL1 群で発現量が減少していた。エンリッチメント解析 (Heat map 解析、Functional annotation 解析) の結果から、廃用性筋萎縮から再荷重の過程で血管新生の調節や形成、発達に関わる遺伝子が段階的に変動していることが示された。また、血液中の VEGF は Co 群と比較して RL1 群で有意に高値を示し、血管の発達に関わる VEGF R2 は Co 群と比較して RL1 群、RL14 群で有意に高値を示していた。筋内血管の組織解析の結果から、毛細血管及び血管内皮細胞が CI 群で有意に減少し、再荷重によって増加した。STRING のデータベースから VEGF に関連する遺伝子群を抽出し発現量を解析すると、血中の VEGF と VEGF R2 は廃用性筋萎縮と再荷重の過程によって大きく変動した。

5. 考察

廃用性筋萎縮から再荷重の過程において、MMPs は骨格筋と血清において異なる動態で大きな変動を示すことが明らかになった。従来、筋ジストロフィーなどの筋疾患では、壊死再生という病態に関連して MMP-2 や MMP-9 が変動することが知られていた。今回の結果から、MMPs は臨床でよくみられる廃用性筋萎縮においても変動することが明らかとなった。また、MMPs は VEGF と連動して、筋萎縮の誘発及び筋内血管の調節が行われたと考えられた。

6. 結語

今回の検討により、廃用性筋萎縮の病態や再荷重の過程で、骨格筋の再構築に関与する MMP-2, MMP-9 が大きく変動して、筋内血管新生や形成、発達が生じていることが明らかとなった。廃用性筋萎縮の進行中は骨格筋の構築に関わる MMPs が大きく変動するのと同時に、筋内血管の新生が抑制されることが示された。一方で、荷重を再開すると筋内血管の新生や形成、発達に関わる遺伝子群が段階的に変動した。廃用による筋萎縮とその治療的再荷重という日常の臨床でよくみられる状況においても、骨格筋の再構築が生じ、筋内血管の活発な変動が起こることが明らかになった。