

骨格筋の肥大・萎縮にかかわるメカノバイオロジー研究

笹井 宣昌

鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 リハビリテーション学科

活動報告

骨格筋の肥大・萎縮にかかわるメカノバイオロジー研究

笹井 宣昌

鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 リハビリテーション学科

キーワード： 骨格筋, 肥大, 萎縮, メカニズム解明, メカノバイオロジー

要 旨

筋はトレーニングにより肥大して、廃用により萎縮する。それらのメカニズムを細胞・分子レベルでの解明を目指す当研究室の取り組みについて紹介する。トレーニングや廃用により筋に加わる機械刺激が変動する。その機械刺激に着眼して、細胞培養やマウス実験を中心に、メカノバイオロジーを展開している。これまでに、細胞培養におけるストレッチや電気刺激による筋肥大、あるいは刺激停止による筋萎縮、マウス個体の負荷運動や廃用による筋肥大・萎縮などの実験モデルを確立した。それらを用いた実験により、シグナル分子である phosphatidylinositol-3 kinase, mechanistic target of rapamycin のほか、オートファジーの関連について一端を明らかにした。最近の取り組みで追加した着眼として、炎症、細胞記憶、栄養、エネルギー代謝との関連などがある。成果の臨床トランスレーションも展望する。

1. はじめに

骨格筋の肥大・萎縮に関する研究にたいする関心は、社会の高齢化とともに世界的に高まっている。健康寿命の延伸のために、加齢にともなうフレイルやサルコペニアへの対抗策の確立が重要であるが、いまだ十分といえるに至っていない。一方、筋萎縮の予防・回復が、単に運動能力の維持・回復にとどまらず、全身の健康にかかわることが分かりはじめた。筋が分泌する myokine が全身の多臓器に効くことが続報されている¹⁾。

当研究室では、筋のトレーニング（トレ）による肥大、あるいは廃用による萎縮に働くメカニズムの細胞・分子レベルでの解明を目指している。トレや廃用により筋に加わる機械刺激が変動する。その機械刺激に着目して、細胞培養やマウス実験を中心に、メカノバイオロジーを展開している。

メカノバイオロジー (mechanobiology) とは、簡単に、機械刺激 (mechanical stress) に対する生体の応答を主題とした生物学 (biology) といえる²⁾。骨格筋は、身体運動におけるモーターと表現される通り、まさに収縮力の発揮に特化した組織である。つまり、その力発揮や負荷 (抵抗力) に対する適応メカニズムが、肥大・萎縮のような筋の可塑性の本質にかかわると考え研究を進めている。成果の臨床トランスレーションも展望している。本稿では、当研究室の取り組みについて紹介する。なお本稿に関わり開示すべき利益相反はなく、すべて本学動物実験倫理委員会の承認、あるいは実施施設の臨床研究倫理委員会の承認を受け実施した内容である。

2. 培養細胞におけるストレッチによる筋肥大³⁾

細胞培養で筋肥大モデルを構築するにあたり、次点を考慮して他動的ストレッチによる実験系を確立した (Fig.1A)。随意的筋収縮は、神経からの興奮伝達による筋線維 (細胞) 膜電位の変化に派生する (興奮収縮連関)。つまり、筋に加わる刺激という点では、その膜電位の変化 (電気刺激) と収縮やその負荷にともなう張力 (機械刺激) の少なくとも2つがある。それと同様なので、細

胞培養でも電気刺激による収縮モデルのみでは、機械刺激の重要性を検討するには不十分といえる。そこで、成体の筋線維を模して、細長い筋細胞 (筋管) の配向を揃え、その長軸方向にストレッチを加える実験系を確立した (Fig.1A, B)。

このストレッチ実験系を用いて、機械刺激による筋肥大が phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR) 経路を介して引き起こされることを示唆するデータを世界で初めて提示した (Fig.1C)。PI3K 阻害剤により Akt リン酸化と筋肥大がともに抑制され、mTOR 阻害剤でも筋肥大が抑制された。

それまで他者による報告は、本経路と機械刺激による筋肥大の関連を間接かつ断片的に示唆するものばかりであった。筋トレにともなう筋の Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 分泌⁴⁾、薬理的な IGF-1 投与による PI3K/Akt/mTOR 経路を介した筋肥大⁵⁾、さまざまな筋肥大・萎縮モデルにおける Akt/ mTOR 経路の関連と活性型 Akt の遺伝子導入による強制発現による筋肥大と萎縮抑制⁶⁾ などである。従って筆者らが、機械刺激による筋肥大と本経路の関連を直接的に示唆したことは重要であったと考える。

一方、近年になり Akt の関連について解釈が変わりつつある。機械刺激に応じた mTOR の働きについて Akt の関与は小さいとの示唆が続報された (Fig.1C; Latest suggestion)。Akt1 の発現を遺伝的に抑制した (ドミナントネガティブ) マウス筋において、機械刺激による mTOR 以下の下流が働き⁷⁾、IGF-1 受容体をブロックしたマウス筋では、機械刺激による筋肥大が惹起された⁸⁾。

既知の情報をまとめて次のように考える。遺伝学的操作がなされていない筋なら、機械刺激にともなう mTOR の制御は、IGF-1/PI3K/Akt 及びそれとは別の経路が想定される。それらの働きのバランスという点では、刺激条件、刺激開始からの時間経過、分泌される IGF-1 量 (濃度) などの要因によりダイナミックに変動するかもしれない。より詳細な解明が必要である。

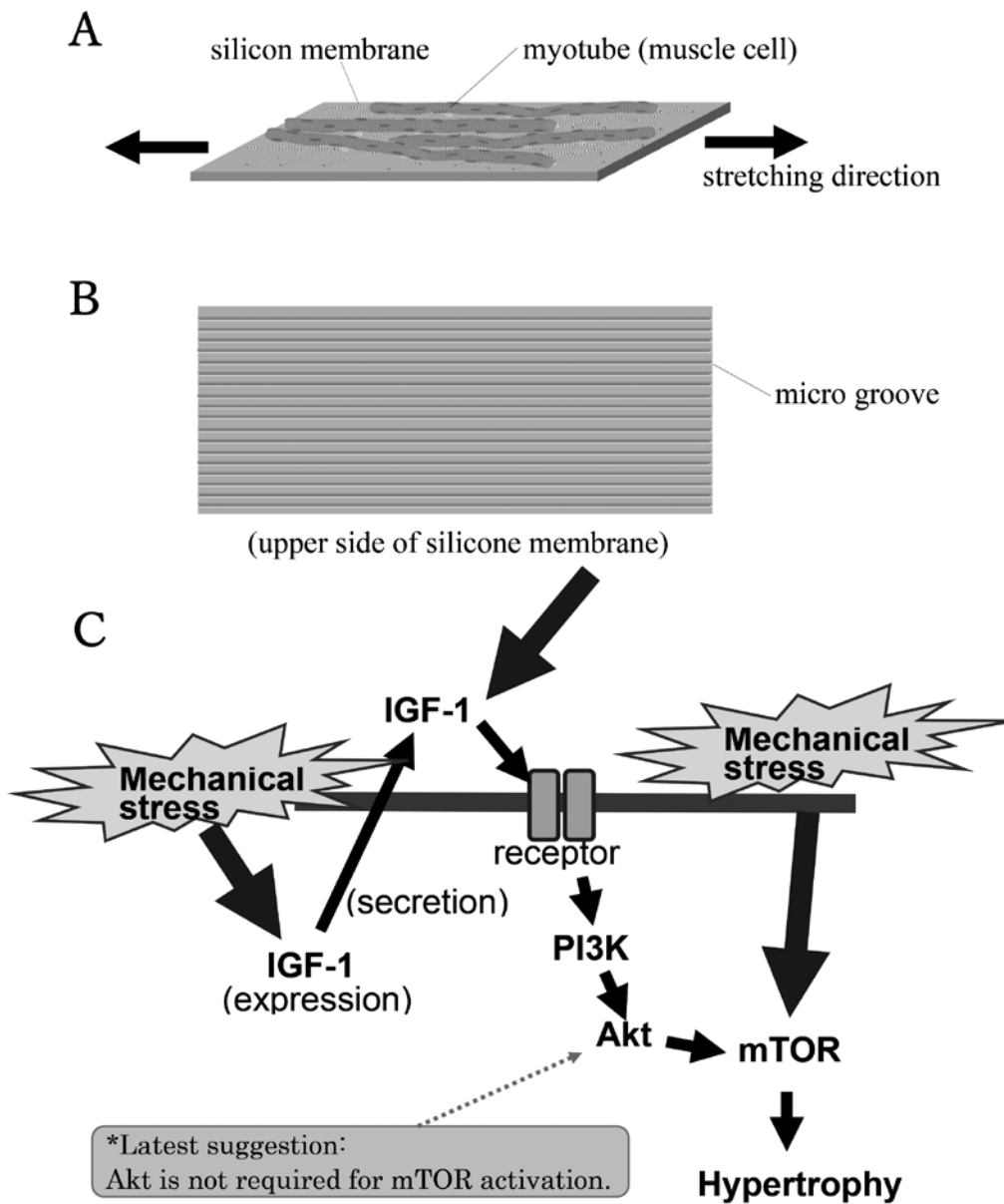


Fig. 1 Hypertrophy induced by stretching in muscle cells

(A) The conceptual schema of stretching myotubes; myotubes are stretched in their longitudinal direction. (B) In parallel with such micro grooves, myotubes align. (C) PI3K/Akt/mTOR pathway was suggested to work on hypertrophy induced by stretching from our results.

3. 培養細胞における電気刺激による筋肥大と、刺激停止による筋萎縮⁹⁾

ストレッチによる筋肥大の次は、電気刺激による筋肥大である (Fig.2A)。ストレッチによる実験系は、機械刺激の意義検証に有利である。それに対してトレの筋肥大を模すという点では、電気刺激の実験系が適している。

筋管の太さ (横径) という点では、この2系の筋肥大は類似であった。詳細な条件の違いより単純な比較はできないものの、トレの筋肥大における機械刺激の意義を想定してよいと考える。この実験系では、電気刺激により筋肥大させた細胞における、刺激停止による筋萎縮も再現した。2日間の刺激による筋肥大は、続く刺激停止2日間で消失した。シグナル解析 (考察スキームを Fig.2B

に掲載)では、この系の筋肥大でも mTOR の働きが示唆された。刺激により mTOR リン酸化 (活性化) が亢進して、その亢進は刺激停止 2 日間のうちに消失した。また、それと同様な動態をたどったのが、タンパク質の酸化 (カルボニル化; 損傷) である。この酸化は、ミトコンドリア由来の活性酸素種 (mtROS) によるものであった。その mtROS は、刺激によるエネルギー代謝の高ま

りに起因すると考えられ、関連としてミトコンドリアの増量が観察された。他者の先行研究では、mtROS が筋肥大にともなうミトコンドリア量の増加に働くことが示唆されている¹⁰⁾。我々の電気刺激実験系では、mtROS 発生の抑制で筋肥大が抑制された。一方、カルボニル化タンパク質が酸化ストレスのマーカーとして知られており¹¹⁾、その除去にオートファジーが働いた。オートファジーの活性は、

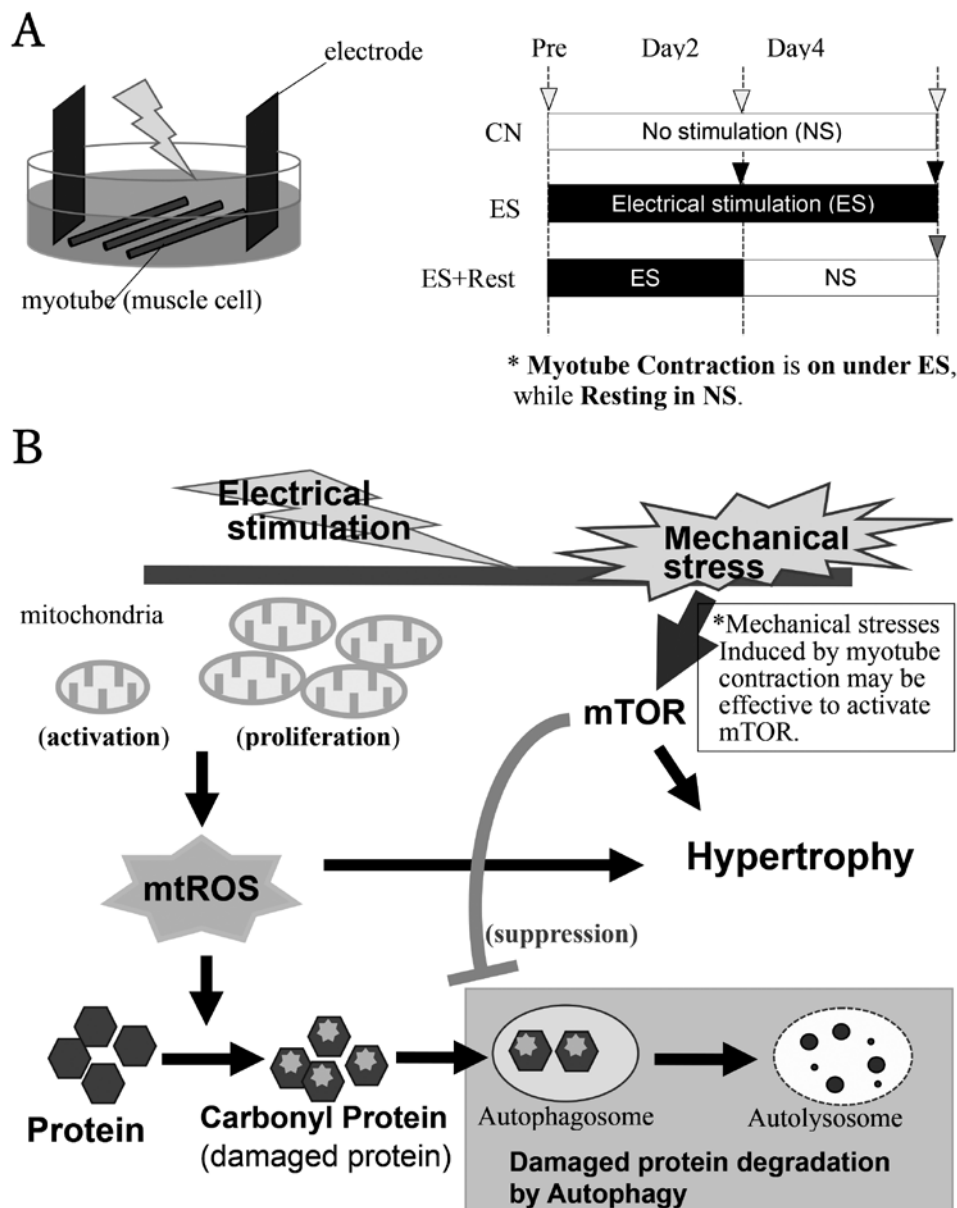


Fig. 2 Hypertrophy induced by electrical stimulation in muscle cells

(A) The conceptual schema of the electrical stimulation to myotubes, and our experimental design. (B) mTOR and mtROS were suggested to work on this hypertrophy. Further, mTOR suppresses the autophagy which clears damaged protein caused by mtROS, which was suggested too.

電気刺激により高まる一方、ともに亢進する mTOR による抑制も受けていた。刺激停止による mTOR の活性低下で、オートファジーがさらに亢進した。また、オートファジーを薬理的に阻害すると損傷タンパク質は滞留した。

まとめると、我々の電気刺激実験系における筋肥大でも mTOR が働き、筋細胞の収縮にともなう mtROS も筋肥大に働いた。一方、mtROS は同時に酸化ストレスとしても働いた。mtROS 発生とともにオートファジーが活性化され、mtROS による酸化タンパク質の除去に働いた。

ただし、そのオートファジーによる除去は、電気刺激により活性化される mTOR により抑制されたため、刺激停止により mTOR の活性が低下することが、オートファジーによる酸化タンパク質の除去を速やかに進めることに役立つとも考えられた。尚、このような mtROS の二面性は他者による示唆に一致する¹¹⁾。従って、筋トレ後の適度な休息が必要であると想像した。

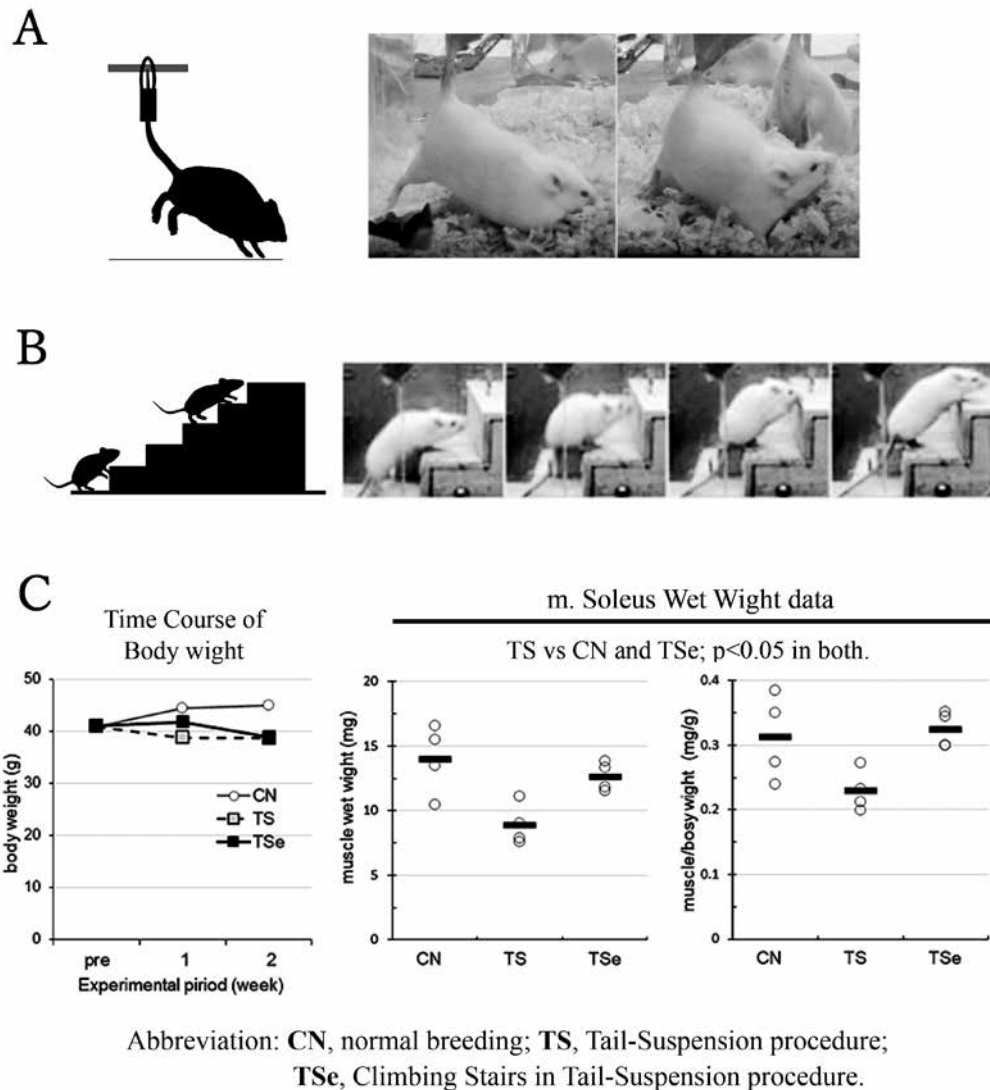


Fig. 3 Atrophy induced by Tail-Suspension procedure and the Suppression of its by Climbing-Stairs Training in mice

(A) The conceptual schema of tail-suspension procedure (TS, left) and photographs of the actual breeding (right). (B) The conceptual schema of climbing-stairs training (left) and photographs of the actual climbing (right). (C) Data of TS-atrophy and the suppression of its. Climbing-training during TS (TSe) kept the wet weight of m. soleus up to the control level. Every group; N = 4.

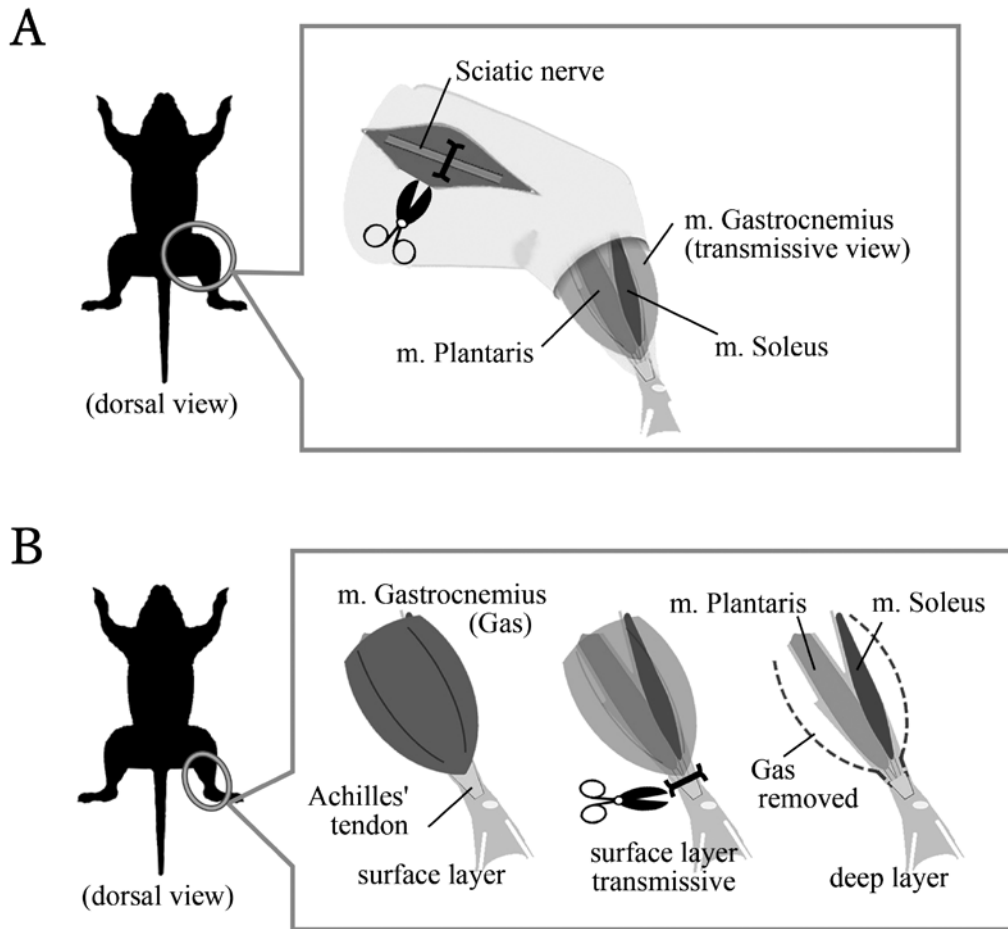


Fig. 4 Denervation and Synergist-Tendon ablation Surgeries in mice

(A) The conceptual schema of the denervation surgery. Muscles dominated by sciatic nerve are atrophied by the procedure. (B) The conceptual schema of the synergist-tendon ablation surgery. At Achilles' tendon, m. gastrocnemius (Gas) tendon is ablated, and m. plantaris and soleus are hypertrophied by overload. Sometimes, m. soleus tendon is ablated too with Gas-tendon.

4. マウスの廃用性および除神経による筋萎縮

個体レベルの探索のためにマウス実験を活用している。筋萎縮モデルとして、廃用性と除神経のモデルを確立した。他モデルにくらべ機械刺激（の減少）の関連が強いと考えられ、また作製が簡便である。

廃用性モデルは、尾部（後肢）懸垂飼育（TS）¹²⁾の簡便改変法（Fig.3A）¹³⁾により、2週間で概ねの後肢筋が萎縮する（Fig.3C, TS）。とくに速筋線維にくらべ遅筋線維の萎縮が顕著であることがよく知られている。後述の除神経モデルと異なり随意収縮が温存されるので、当研究室では運動療法の実験に汎用している（後述6項を

参照）。

除神経（DN）モデル（Fig.4A）は、坐骨神経切除術による後肢下腿筋の萎縮である。以前にラットで確立した手法¹⁴⁾の転用で、最近確立した。この方法では、廃用が萎縮の主要因と考えられる¹⁵⁾。一方、TSモデルとの違いとしては、末梢神経を切除するため、ターゲット筋の随意収縮は損なわれる（前述）。さらに、萎縮がより顕著で、末梢神経からの栄養因子の分泌が抑制されることの影響も想定される¹⁶⁾。したがって当研究室ではDN/TSモデルを区別している。その他として、DNモデルでは、使用する個体数が少なく済む場合が多い。切除術を施した反対側に偽手術を施して、実験対照とするのが

一般的である。適宜に設ける厳密な対照としての通常飼育肢を考慮しても研究全体としてTSモデルより少なく済むことが多い。TSモデルでは、両側とも同じ手順に従うので、対照の別個体が必要となる。DNモデルを用いて、萎縮予防における電気刺激の活用に関する研究が以前より行われていて¹⁵⁾、当研究室でも現在進行中である。

5. マウスの共同筋腱切除による筋肥大

簡便な過負荷による筋肥大モデルとして、後肢下腿の共同筋腱切除モデル (Fig.4B)¹⁷⁾ を確立した。下腿の足関節で協働するヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の停止腱は一体化して共同腱 (いわゆる“アキレス腱”) を成す。一体化する間際で、腓腹筋とヒラメ筋 (もしくは腓腹筋のみ) の腱を切除することで、温存される足底筋 (もしくは足底筋とヒラメ筋) に過負荷をかけ肥大を惹起する。施術後は通常飼育するのみでよい。別にトレをする必要がないという点が簡便である。一方、3筋のサイズのバランスから、足底筋やヒラメ筋が受ける過負荷は、通常トレによる過負荷よりも遥かに大きいと考えられる。実際に1-2週間で劇的に筋肥大が起こる。結果の解釈や応用という点で留意が必要である。目的に適えば強力なツールであり、世界で汎用されている。

6. マウスの昇段トレーニングによる筋萎縮の予防・回復と筋肥大

ヒトの筋トレを模した簡便なモデルとして、階段昇り (昇段トレ) を確立した (Fig.3B)。これまでに学部生の卒業研究で、TS飼育の期間中/後の運動介入として自重のみの負荷による昇段を活用した。それぞれ萎縮予防/回復 (もしくは超回復) がうかがえる結果を得つつある (Fig.3C, TSe)¹⁸⁾。また著者自身の実験では、尾部に錘を負荷して昇らせ筋肥大を惹起させている¹⁹⁾。階段は、実際の昇段を考慮して自作したもので、2-3日の慣らしを行えば、比較的短時間のうちにマウスは昇段してくれる。ここ数年、とくに注力している細胞記憶の研究で、実験プラットフォームとして活用している。

7. 最近の展開

前述した筋細胞の記憶は、以前のトレ履歴がまるで記憶されているかの如く、後のトレ効果に影響を及ぼす現象のことで“筋メモリー”と称される²⁰⁾。現象の補足 (モデル化) ができたのでメカニズム解明に着手するところである。その他に追加した着眼として、栄養²¹⁾、及びエネルギー代謝²²⁾との関連、炎症の関連^{23,24)}、臨床トランスレーションの模索²⁵⁾について展開中である。

さて、それらの臨床トランスレーションについて想像していただけるだろうか。運動療法、物理療法、栄養療法などについて、筋メモリーやその関連を考慮した新たな方策を確立すべきであると考え。筋メモリーを獲得していれば、療法効果が得られ易い。また、筋の萎縮や機能低下が起こりにくいと考えられるからである。例えば、筋は鍛えれば強化され増量するが、筋トレを止めれば簡単に減量する (元に戻る)。不使用・不活動となればさらに減量する (筋萎縮が起こる)。一方、怪我や疾病による活動性低下、あるいはギブス固定による身体の不使用方法などは、いつでも誰にでも起こり得る。加齢による筋萎縮も同じである。つまり、筋メモリーを獲得できているか否かという点が、筋や全身の健康持続性に大きく関わると考える。筋メモリー獲得の方策として、現時点では“十分な筋トレをすること”の他は不明である。関連メカニズムの解明が、筋メモリー獲得・維持に関する具体策の確立に繋がると考える。

8. 終わりに

筋肥大・萎縮のメカノバイオロジーを基軸に展開しながら、さまざまなトピックスを追加し続けている。時間が経つにつれ、それらの異なるトピックス間の関連が浮き彫りになってくる。不思議であり、面白い。好奇心衰えず、ワクワクしながら課題に取り組んでいる。他者の進展にアンテナを張り、自身の筋も鍛えつつ。

「ご興味を感じていただけた方、ともに課題を推進いただける方の参画をお待ちしております。細胞/動物実験のみならずヒト (臨床) 研究もあります。かたちは、共

同・協力，大学院生，卒業研究生，研究生などのさまざまが想定されます。先ずはお声掛けいただければ幸いです。」

謝 辞

当研究室の取り組みのルーツは，恩師である河上啓介教授（大分大学福祉健康科学部）と宮津真寿美 准教授（愛知医療学院短大リハビリテーション学科）が主宰する研究室（当時；名古屋大学大学院医療科学研究科）における研究にある。また，村上太郎 教授（至学館大学健康科学部），両恩師の恩師である曾我部正博 教授（金沢工業大学産学連携室，名古屋大学大学院医学系研究科・名誉教授），各研究室の所属・出身の皆さんの多大なご支援により現在に至る。今もその多くの先生方と共同している。さらに，新たに共同頂いている先生方，これまでに参加いただいた大学院生・学部生の皆さんを含め，ここに深謝する。

尚，これまで著者が受けた助成金等についても深謝するとともに，主要なものを列記する；JSPS 科研費 JP21700558, JP26560289, JP18K10797；斎藤報恩会・学術研究・第 1911202 号。

引用文献

- 1) Severinsen MCK, Pedersen BK. Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocr Rev.* 2020; 41: 594-609.
- 2) 曾我部正博. まえがき：メカノバイオロジーへの誘い. *メカノバイオロジー，細胞が力を感じ応答する仕組み* (曾我部正博 編), 化学同人, 京都, iii-iv, 2015.
- 3) Sasai N, Agata N, Inoue-Miyazu M, Kawakami K, Kobayashi K, et al. Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes. *Muscle Nerve.* 2010; 41: 100-106.
- 4) Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 232-238.
- 5) Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 1009-1013
- 6) Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 1014-1019.
- 7) Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE, Fedele MJ, Fiorotto ML, Chin ER, Esser KA. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J* 2004; 380: 795-804.
- 8) Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SC. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol* 2008; 586: 283-291.
- 9) Yoshioka K, Sasai N, Kurogi Y, Hayakawa K, Itoh Y, et al. Cessation of electrically-induced muscle contraction activates autophagy in cultured myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 533: 410-416.
- 10) Powers SK, Radak Z, Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol.* 2016; 15; 594: 5081-5092.
- 11) Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014; 24: R453-R462.
- 12) Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol.* 2002; 92: 1367-1377.
- 13) Kawashima T, Ji RC, Itoh Y, Agata N, Sasai N, Murakami T, Sokabe M, Hamada F, Kawakami K. Morphological and biochemical changes of lymphatic vessels in the soleus muscle of mice after hindlimb unloading. *Muscle Nerve.* 2021; 64: 620-628.
- 14) Agata N, Sasai N, Inoue-Miyazu M, Kawakami K,

- Hayakawa K, Kobayashi K, et al. Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats. *Muscle Nerve*. 2009; 39: 456-62.
- 15) Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc*. 1996; 28:1463-1469.
- 16) Ozaki Y, Ohashi K, Otaka N, Ogawa H, Kawanishi H, Takikawa T, et al. Neuron-derived neurotrophic factor protects against dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022; 593: 5-12.
- 17) Kirby TJ, McCarthy JJ, Peterson CA, Fry CS. Synergist Ablation as a Rodent Model to Study Satellite Cell Dynamics in Adult Skeletal Muscle. *Methods Mol Biol*. 2016 ; 1460: 43-52.
- 18) 笹井宣昌. 尾部懸垂マウス後肢筋における昇段運動による萎縮の予防. 第25回日本基礎理学療法学会学術大会 (WEB) 発表. 2020; 演題 No. 2G1-04.
- 19) 笹井宣昌. 昇段を用いた再トレーニングによるマウス骨格筋量の加速的増加. 第7回日本スポーツ理学療法学会学術大会 (WEB) 発表. 2020; 演題 No. 84
- 20) Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA, Gundersen K. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15111-15116.
- 21) 笹井宣昌. 第7回日本予防理学療法学会学術大会・第3回産業理学療法部門研究会・第3回栄養・嚙下理学療法部門研究会共同開催 (WEB) 発表. 2020; 演題 No. 栄・嚙セ-4.
- 22) Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugiura T, et al. Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018; 223: Article No. e13042.
- 23) DiPasquale DM, Cheng M, Billich W, Huang SA, van Rooijen N, Hornberger TA, et al. Urokinase-type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol*. 2007; 293: C1278-85.
- 24) McKenzie AI, Reidy PT, Nelson DS, Mulvey JL, Yonemura NM, Petrocelli JJ, et al. Pharmacological inhibition of TLR4 ameliorates muscle and liver ceramide content after disuse in previously physically active mice. *Am J Physiol*. 2020; 318: R503-R511.
- 25) 山野井順矢, 笹井宣昌. 脳卒中の回復期で低栄養を合併する患者における電気刺激による筋萎縮の緩和. 第18回日本神経理学療法学会学術大会 (WEB) 発表. 2020; 演題 No. W-25.

— プロフィール —

笹井 宣昌 鈴鹿医療科学大学大学院医療科学研究科／保健衛生学部リハビリテーション学科・准教授 博士 (リハビリテーション療法学)

〔経歴〕1993年名古屋大学理学部分子生物学科卒業, (株)富士銀行・総合職, 1996年長野県車山高原スキー場・スキー学校指導員兼パトロール隊員, 2003年(株)ジェネラス・訪問リハビリテーション・非常勤職員, 2007年名古屋大学大学院医学系研究科博士課程単位取得後退学 (2010年学位授与), 2007年姫路獨協大学医療保健学部理学療法学科・講師, 2010年より現職。〔専門〕骨格筋のメカノバイオロジー, 生理学, 細胞生物学, 筋力増強・低下予防の理学療法。

Challenges of uncovering mechanisms working on skeletal muscle hypertrophy and atrophy in Mechanobiology

Nobuaki SASAI

Department of Rehabilitation, Faculty of Health Sciences,
Suzuka University of Medical Science

Key words: skeletal muscle, hypertrophy, atrophy, mechanism, mechanobiology

Abstract

Skeletal muscle hypertrophy and atrophy are induced by resistance-trainings and disuse respectively. The mechanisms working on those phenomena is what our lab has been challenging to uncover. Focusing on mechanical stresses which fluctuate on muscles, our studies are in Mechanobiology. Here is, in this article, the introduction of our works. In vitro hypertrophy has ever been established by applications of stretching and electrical stimulus in cell culture, as well as atrophy by the cessation of those stimuli. In vivo hypertrophy and atrophy also has been established by procedures of resistance training and disuse in mice. Involvements of phosphatidylinositol-3 kinase, mechanistic target of rapamycin and autophagy in the mechanisms were uncovered. Recently, some new topics were added as inflammation, cell-memory, nutrition, energy metabolism, and clinical translation.