

萎縮骨格筋における筋力低下ならびに
易疲労性の分子メカニズム
—新しいリハビリテーション法の開発を目指して—

東京慈恵会医科大学 福田 紀 男
(共同研究者) 同 宇 高 潤
同 栗 原 敏

**Research on Molecular Mechanisms of Active Force Reduction and
Easy Fatigability in Atrophied Skeletal Muscle
with the Aim of Developing New Rehabilitation Exercises**

by

Norio Fukuda, Jun Udaka, Satoshi Kurihara
*Department of Physiology (II),
The Jikei University School of Medicine*

ABSTRACT

We investigated how hindlimb immobilization (HI) affected contractile functions of single skinned soleus fibers from the rat. HI (6 weeks) resulted in reduced wet weight of soleus muscle (~40%). The area of single skinned fibers was ~30% less in immobilized muscle than in control muscle. We found that in immobilized fibers, maximal Ca^{2+} -activated force was reduced by ~30%. We then induced Ca^{2+} -independent active force under the relaxing condition by lowering the MgATP concentration to investigate whether the decrease in Ca^{2+} -activated force results from reduced likelihood of cross-bridge formation. We found that in immobilized fibers, the Ca-independent active force was reduced by ~40%. These results suggest that cross-bridge recruitment is suppressed in immobilized muscle via, probably, structural changes of the sarcomere, resulting in reduced active force production.

要 旨

不動化にともなう骨格筋の機能がどのように変化するかを、ラットひらめ筋のシングルスキンドファイバーを用いて検討した。6週間の不動化によって、湿重量は約40%低下し、スキンドファイバーの断面積は約30%縮小した。単位断面積当たりの最大Ca活性化張力は、約30%低下した。さらに、弛緩条件下でATP濃度を低下させることによりCa非依存性の活性張力を発生させ、Ca活性化張力の低下がクロスブリッジ形成確率の低下に由来しているかどうかを検討した。その結果、Ca非依存性の活性張力が約40%低下することが示された。以上の結果は、不動化筋における活性張力の低下は、サルコメアの構造変化に由来するクロスブリッジ形成の抑制に基づくことを示唆している。

緒 言

近年、整形外科領域における骨折の治療において、ガラス繊維ニットによるギプス固定が汎用されている。しかしながら、ギプス固定は骨格筋の萎縮を誘発し、さまざまな機能的変化をともなうことが知られている。この病態は、さまざまな角度から研究されているが、収縮力低下の分子メカニズムはいまだに解明されていない。例えば、ミオシン重鎖の速筋化、トロポニンの速筋化などの収縮タンパク質の異性化はよく知られているが、それによる収縮機能への影響については、はっきりとした見解がない。そこでわれわれは、ガラス繊維ニットによりラットの片側後肢関節を固定して臨床に近い萎縮モデルを作製し、ひらめ筋のシングルスキンドファイバーを用いて収縮力低下のメカニズムを探ることを試みた。

1. 研究方法

1. 1 実験動物

オスのWistar rat (体重: 約300g) 10匹の片側下肢を、ガラス繊維ニット (3M, Scotchcast™, Plus-J, Tokyo, Japan) にてギプス固定を施した。本研究で用いたガラス繊維ニットは、整形外科の臨床で一般に使われているものである。6週間のギプス固定した側の下肢を不動化筋、反対側下肢からはコントロール筋を摘出した。動物は、ペントバルビタール麻酔 (50 mg/kg i.p.) によって安楽死させた。

1. 2 スキンドファイバーの作製

摘出後、ただちに筋標本をCaを含まないタイロード氏液 (135 mM Na⁺, 5 mM K⁺, 1 mM Mg²⁺, 98 mM Cl⁻, 20 mM HCO₃⁻, 1 mM HPO₄²⁻, 1 mM SO₄²⁻, 20 mM acetate, 10 mM glucose, 5 U/l insulin, pH 7.35 when equilibrated with 5% CO₂-95% O₂) に浸し、湿重量を測定した。タイロード氏液中において直径1-2 mm, 長さ約1 cmの細い筋標本を切り出し、それらの標本を界面活性剤である1% (w/v) のTriton X-100を含む弛緩溶液 [5 mM MgATP, 40 mM BES, 1 mM Mg²⁺, 10 mM EGTA, 1 mM DTT, 15 mM phosphocreatine, 15 U/ml creatine phosphokinase, イオン強度180 mM (K-propionateにて調節)] に24時間浸すことにより除膜処理 (スキニング処理) を行った¹⁾。

1. 3 張力測定

スキンドファイバーの活性張力の測定は、筆者らが報告している方法に基づいて行った²⁾。すなわち、ファイバー (長さ: 約3 mm) を二つのフックにエナメルで固定した³⁾。フックの一つは張力トランスデューサーに接続しており、これによって活性張力を測定する。もう一つはマイクロマニピュレータに接続しており、これによって筋長を

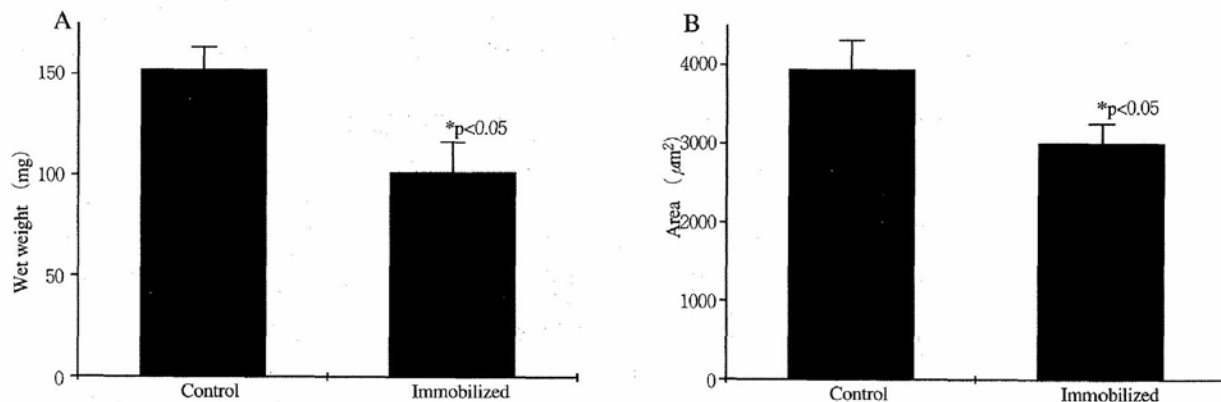


図1 不動化にともなうひらめ筋の形態的变化。
 A: 湿重量, B: 単一筋線維 (スキンドファイバー) の断面積. *p<0.05.
 いずれも N=10. データは, 平均値±SEMで表示してある.

変化させる。サルコメア長はレーザー回折法によって測定し²⁾, 2.2 µm にセットした。コントロール標本と萎縮標本について, Ca 依存性の張力と Ca 非依存性の張力を測定した。Ca 依存性の張力の測定については, 筆者らが報告している方法に基づいて行った⁴⁾。すなわち, ファイバーを浸している弛緩溶液を pCa 4.5 の Ca を含む収縮溶液に瞬時に置換し, 収縮張力を測定した (なお, pCa = -log [Ca])。溶液交換から最大張力の 50% の張力が得られるまでの時間を $t_{1/2}$ とし, 収縮速度の指標として測定した⁴⁾。Ca 非依存性活性張力の測定は, 三尾らによって確立された方法に基づいて行った⁵⁾。すなわち, 弛緩溶液の ATP 濃度を 0.1 µM に低下させ, ATP を結合していないクロスブリッジ (硬直クロスブリッジ) による活性化張力を発生させた。張力測定の実験はすべて 15°C で行った。

1. 4 電気泳動

ミオシン重鎖の SDS-PAGE は, アクリルアミド濃度を 6% として行った^{1, 6)}。電圧は 90V で, 泳動時間は 24 時間である。染色は, 銀染色法を用いて行った (Silver Stain Kit Wako II)。

1. 5 統計処理

t 検定により統計処理を行い, p 値が 0.05 未満のものを有意差ありと判断した。

2. 結果

2. 1 形態的变化

図1は, コントロール筋と不動化筋の湿重量 (A) とスキンドファイバーの断面積 (B) を比較したものである。不動化にともなって湿重量が約 40% 低下しており, ファイバーの断面積が約 30% 縮小していた。

次に, シングルスキンドファイバーを溶解し, SDS-PAGE によってミオシン重鎖の分離を試みた。遅筋にはタイプ I のミオシン重鎖が発現しているが, 萎縮するとアイソフォームが変化し, 速筋において発現しているタイプ II が増えることが知られている⁷⁻⁹⁾。本モデルにおいても, 不動化にともなってミオシンのタイプが遅筋タイプの I から速筋タイプの II へと変化していた。

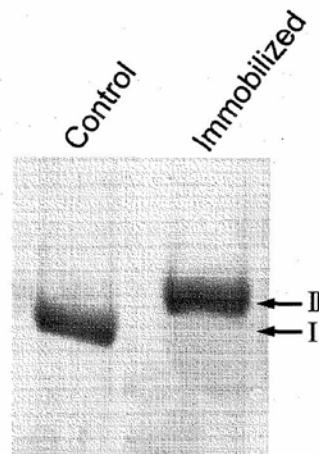


図2 ミオシン重鎖の SDS-PAGE. 左: コントロールひらめ筋 (不動化なし), 右: 不動化ひらめ筋. 6 週間の不動化によって, ミオシンタイプが I から II へと変化した。

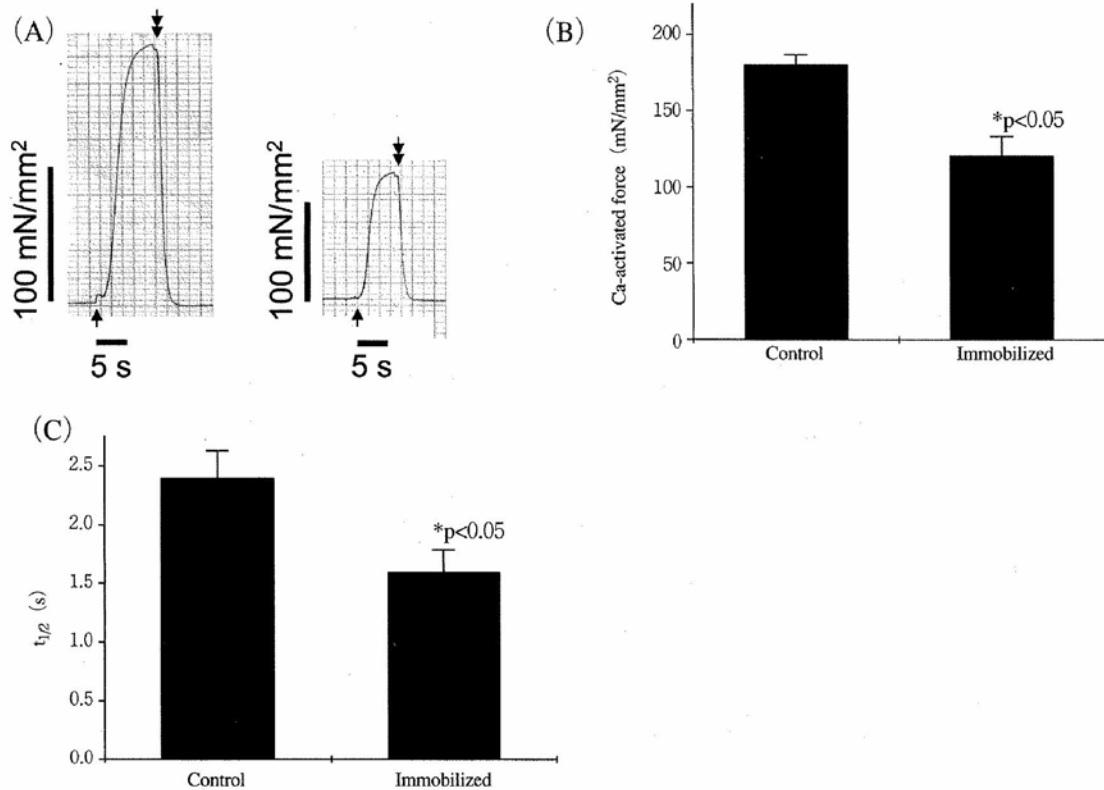


図3 不動化にともなう機能的変化. A: スキンドファイバーのチャートレコード. 不動化筋では単位断面あたり活性張力が低下している. 矢印のところで弛緩溶液を収縮溶液 (pCa 4.5) に置換し, 二重矢印のところで収縮溶液を弛緩溶液に置換した. B: 最大Ca活性化張力の平均値のグラフ. データは平均値±SEMで表示してある. N=8. C: $t_{1/2}$ の平均値のグラフ. データは平均値±SEMで表示してある. N=8.

2. 2 機能的変化

不動化にともなう機能的変化を調べる目的で, スキンドファイバーを用いてCa活性化張力を測定した. 図3Aは, スキンドファイバーを高濃度のCa (pCa 4.5) で活性化させた際のチャートレコードを示す (左: コントロール筋, 右: 不動化筋). 不動化筋では, 最大Ca活性化張力が著明に低下していることが分かる. 図3Bには, 平均値のデータを示す. 8例の動物について検討を行ったところ, 不動化筋において, 単位断面あたりの張力が約30%低下するというデータが得られた. また, 不動化筋では $t_{1/2}$ が低下しており, 収縮速度が上昇していることが示唆された (図3C).

次に, Ca非依存性の活性張力について検討した. 結果を図4に示す. コントロール筋, 不動化筋, いずれの標本においても, 張力レベルはCa活性化張力よりも低く, 約50%程度であった.

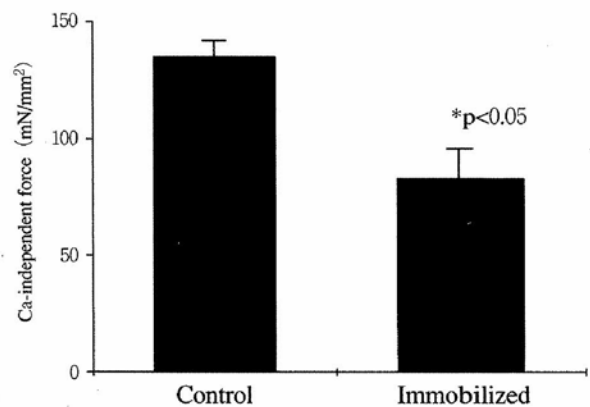


図4 コントロール筋と不動化筋における硬直クロスブリッジによる収縮の比較. Caは存在しない. データは平均値±SEMで表示してある. N=5.

図4に示したように, 不動化筋において, Ca非依存性張力が約40%低下していた.

3. 考 察

本研究では, 長期の不動化にともなう筋力低下のメカニズムを探った. ギプス固定したラットのひらめ筋を用いて機能, 構造解析を行い, 6週間のギプス固定によってひらめ筋が顕著に萎縮する

こと、スキンドファイバーレベル、すなわち収縮タンパク系レベルで機能的変化が生じることを見出した。

骨格筋は不動化にともなう形態的变化のみならず機能的変化を示すことは古くから知られている。本研究で用いたモデルでは、ひらめ筋の筋重量が約40%低下しており、シングルファイバーの断面積が約30%縮小していた(図1)。これらの変化は、筋肉全体が発生する絶対張力の低下に関与していると考えられる。

萎縮筋の機能面については、これまで、最大Ca活性化張力の低下^{9, 10)}、Ca感受性の低下^{9, 11)}、短縮速度の上昇^{9, 10, 12)}が報告されている。本研究において、われわれは、6週間の不動化によって単位断面積当たりの最大Ca活性化張力が約30%低下することを明らかにした(図3B)。

骨格筋における活性張力は、太いフィラメントと細いフィラメントのオーバーラップ、すなわち重なり程度の依存して変化することはよく知られている¹³⁾。等尺性張力は、ファイバー内部のサルコメアの短縮(internal shortening)の程度に依存するが、われわれの実験では弛緩時に設定したサルコメア長が2.2 μm と短く、その程度はコントロール筋と不動化筋でほとんど差がなかった(いずれも5%程度)。したがって、不動化筋においてinternal shorteningがより顕著に生じており、その結果として発生張力が低下するということが考えにくい。

骨格筋遅筋が萎縮すると、ミオシンの異性化が生じ、遅筋タイプのミオシン(タイプI)が速筋タイプ(タイプII)に変化することはよく知られている⁹⁾。本研究においても、タイプIがタイプIIへと変化した(図2)。ミオシンは、ATPを加水分解し、その化学エネルギーを力学エネルギーに変換する分子モーターである。ATP加水分解速度はタイプにより異なり、そのレベルは、タイプIIの方がタイプIよりも高いことはよく知られてい

る。萎縮筋において、筋の収縮速度が上昇していることは既に報告されているが^{9, 10, 12)}、これは収縮速度がATP加水分解速度と比例するからであると考えられている。本研究においても、萎縮筋において、収縮速度が有意に上昇していたが(図3C)、これは、上述したミオシンの異性化に基づくと考えられる。

細いフィラメントには、onとoffの2つの状態が存在し、on状態になるとクロスブリッジがアクチンに結合し、ATPが加水分解され、力を発生する。筆者らは、細いフィラメントのon/off状態が、Caとクロスブリッジによって等価に制御されていることを明らかにしている¹⁴⁾。この性質を利用して、不動化筋において硬直クロスブリッジによって惹起されるCa非依存性の活性張力が低下しているかどうかを調べた。すなわち、弛緩溶液のATP濃度を μM 以下に低下させると、硬直クロスブリッジの割合が増大するが、これらのクロスブリッジは細いフィラメントに強く結合し、細いフィラメントの状態をonにするため、Ca非存在下でも活性張力を得ることができる。本研究では、Ca非依存性の活性張力が不動化にともなう約40%低下するという結果が得られた(図4)。したがって、図3で観察された不動化筋におけるCa依存性の活性張力の低下は、Caがトロポニンに結合する過程以降のステップ、すなわち、クロスブリッジレベルで生じていることが示唆される。

骨格筋が疲労すると、細胞内の無機リン酸(Pi)濃度が増大し、pHが低下する¹⁵⁾。PiやH⁺は、クロスブリッジに直接作用する性質を持っているため^{14, 15, 16)}、最大Ca活性化張力を低下させる。本研究の結果は、不動化にともなうクロスブリッジの形成が抑制されること、すなわち、クロスブリッジの数が減少することを示唆している。したがって不動化において、PiやH⁺による張力低下の作用が見かけ上増強し、易疲労性が増大することが予想される。

本研究で使用した骨格筋の萎縮モデルは、比較的容易に作製できるものであり、再現性のある形態的、機能的変化をひらめ筋に誘起することができる。萎縮骨格筋に対するリハビリテーションの効果、形態ならびに機能面から評価することを可能にする優れた実験系であると考えられる。

結 語

ギプス固定によって不動化したひらめ筋を用いて、萎縮骨格筋の筋力低下のメカニズムを探った。その結果、単位断面積あたりの最大Ca活性化張力が低下していること、ミオシンのタイプがIからIIへと変化していること、さらに、Ca非依存性の活性張力が低下していることを見出した。したがって、不動化にともなう筋力の低下は単一の筋線維において生じており、Ca-トロポニン結合以降のステップ、すなわちクロスブリッジレベルで生じていると考えられた。今後、本研究により見出されたクロスブリッジの形成不全が、サルコメアのいかなる構造変化に基づいているかを詳細に検討する予定である。さらに、ギプス固定終了後、ラットに様々な運動負荷を与え、不動化にともなう機能、構造変化を改善する有効なリハビリテーション法を開発したいと考えている。

文 献

- 1) N. Fukuda, Y. Wu, G. Farman, T. C. Irving, H. L. Granzier. Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle. *Journal of Physiology (London)*, 553, 147-154 (2003)
- 2) N. Fukuda, H. Kajiwara, S. Ishiwata, S. Kurihara. Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *Circulation Research*, 86, e1-e6 (2000)
- 3) N. Fukuda, H. Fujita, T. Fujita, S. Ishiwata. Spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 433, 1-8 (1996)
- 4) N. Fukuda, D. Sasaki, S. Ishiwata, S. Kurihara. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*, 104, 1639-1645 (2001)
- 5) Y. Mio, N. Fukuda, Y. Kusakari, Y. Tanifuji, S. Kurihara. Bupivacaine attenuates contractility by decreasing sensitivity of myofilaments to Ca_2^+ in rat ventricular muscle. *Anesthesiology*, 97, 1168-1177 (2002)
- 6) L.G. Prado, I. Makarenko, C. Andresen, M. Kruger, C.A. Opiz, W.A. Linke. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *Journal of General Physiology*, 126, 461-480 (2005)
- 7) R.H. Fitts, J.M. Metzger, D.A. Riley, B.R. Unsworth. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *Journal of Applied Physiology*, 60, 1946-1953 (1986)
- 8) M. Campione, S. Ausoni, C.Y. Guezennec, S. Schiaffino. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology*, 74, 1156-1160 (1993)
- 9) J.J. Widrick, S.T. Knuth, K.M. Norenberg, J.G. Romatowski, J.L.W. Bain, D.A. Riley, M. Karhanek, S.W. Trappe, T.A. Trappe, D.L. Costill, R.H. Fitts. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibers. *Journal of Physiology (London)*, 516, 915-930 (1999)
- 10) D.A. Riley, J.L.W. Bain, J.L. Thompson, R.H. Fitts, J.J. Widrick, S.W. Trappe, T.A. Trappe, D.L. Costill. Decreased thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *Journal of Applied Physiology*, 88, 567-572 (2000)
- 11) K.S. McDonald, R.H. Fitts. Effect of hindlimb unloading on rat soleus fiber force, stiffness, and calcium sensitivity. *Journal of Applied Physiology*, 79, 1796-1802 (1995)
- 12) Effect of 17 days bed rest on peak isometric force and unloaded shortening velocity of human soleus fibers. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 273, C1690-1699 (1997)
- 13) A.M. Gordon, A.F. Huxley, A.F. Julian. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *Journal of Physiology*

- (London), 184, 170-192 (1966)
- 14) N. Fukuda, H. Fujita, T. Fujita, S. Ishiwata. Regulatory roles of MgADP and calcium in tension development of skinned cardiac muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 19, 909-921 (1998)
- 15) R.E. Godt, T.M. Nosek, T. M. Changes in the intracellular milieu with fatigue or hypoxia depress contraction of skinned rabbit skeletal and cardiac muscle. *Journal of Physiology (London)*, 412, 155-180 (1989)
- 16) N. Fukuda, S. Ishiwata. Effects of pH on spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. *Pflüers Archiv European Journal of Physiology*, 438, 125-132 (1999)