

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	荒 川 卓 哉
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Electrical stimulation prevents apoptosis in denervated skeletal muscle (電気刺激を用いた脱神経骨格筋におけるアポトーシスの抑制)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>片田彰博、執行 寛、岸部 幹、安達正明、野中 聡、原淵保明</p> <p>掲載雑誌名</p> <p>NeuroRehabilitation (2010年8月掲載予定)</p> <p>研 究 目 的</p> <p>骨格筋の形態と機能を維持するためには、適切な神経支配が必要である。支配神経が障害され脱神経が生じた骨格筋では、収縮機能が失われ時間経過とともに筋線維の萎縮が進行する。この筋線維の萎縮にはアポトーシスが強く関与することが示されている。脱神経後に生じる筋細胞のアポトーシスには、ユビキチン/プロテアソーム系の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。</p> <p>また、骨格筋は脱神経の状態にあっても適当な電気刺激を加えると筋収縮が誘発されること、さらには長期間の電気刺激が筋線維の萎縮進行を抑制することが確認されている。これらの知見は、脱神経筋への電気刺激が筋細胞のアポトーシスを抑制することでその萎縮を防いでいる可能性を示していると思われるが、現在までその検証はなされていない。</p> <p>本研究では、脱神経後の骨格筋に加えた電気刺激がアポトーシスを抑制することで筋線維の萎縮を防ぐという仮説を検証した。そのために、ラット下腿筋の脱神経モデルを作成し、長期間の電気刺激を加えた場合に、アポトーシス関連遺伝子や蛋白の発現がどのように変化しているのか解析した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 動物モデルの作製

実験には19頭の雌ラット(Sprague-Dawley rat)を用いた。ラットを坐骨神経の非切断群(n=9)と切断群(n=10)の2群に分けた。切断群のラットはハロセン麻酔下に坐骨神経を切除し、ヒラメ筋を含む下腿筋の脱神経の状態を作成した。

2. 電気刺激

切断群のうち5頭(切断+電気刺激群)には、下腿表面に2つの皿電極を接着し刺激時間0.5ms、強度4mA、刺激頻度2Hzの矩形波電気刺激を経皮的におこなった。刺激中は電気刺激によって脱神経状態にある腓腹筋およびヒラメ筋に筋収縮が誘発され、足関節の底屈運動が起ることを確認した。切断の翌日から1日に1時間の電気刺激を隔日でおこない刺激期間は4週間とした。刺激期間終了後に深麻酔下にヒラメ筋を摘出し凍結保存した。非切断群のうちの3頭(非切断+電気刺激群)にも同じ方法で4週間の電気刺激をおこない、比較対照とした。

3. 単鎖DNAの免疫染色

脱神経後の筋細胞のアポトーシスを確認するために、アポトーシスによって細胞核に出現する単鎖DNAの免疫染色をおこなった。摘出したヒラメ筋の凍結切片を作成してスライドガラスに添付後、200倍希釈の抗単鎖DNA抗体(DAKO社)を用いて免疫組織染色をおこなった。光学顕微鏡下に細胞核をカウントし、単鎖DNA陽性細胞核の割合を求めた。

4. cDNAアレイ

電気刺激による遺伝子発現の変化を調べるためにcDNAアレイを用いた。摘出したヒラメ筋からRNAを抽出したのち逆転写をおこないcDNAプローブを作製、Clontech社製BD Atlas Gene List ratに反応させた。非切断群、切断群、切断+電気刺激群の3群でアポトーシス関連遺伝子の発現の変化を比較した。

5. RT-PCR

cDNAアレイにおいて、切断+電気刺激群でもっとも高い増加比を示したvalosin-containing proteinについてRT-PCRをおこなった。

6. Western blot法

ウエスタンブロット法を用いてvalosin-containing protein、およびvalosin-containing proteinが関与する小胞体ストレス関連アポトーシスに特異的な活性型カスパーゼ-12の蛋白量を検討した。摘出材料から蛋白を抽出した後、蛋白濃度を測定し各材料それぞれ100mgの蛋白を電気泳動した。電気泳動後蛋白をPDVF膜に転写したのち抗体反応をおこなった。反応後は化学蛍光法を用いて可視化した。

7. 統計学的解析

非切断群、切断群、切断+電気刺激群、非切断+電気刺激群の4群間の検討にはSteel-Dwassテスト(多群間比較検定)を用いて統計学的解析をおこなった。

成 績

1. 電気刺激によるアポトーシスの抑制

非切断群の正常筋組織内において単鎖DNA陽性細胞核は全体の27%と非常に少なかったのに対し、切断群では52%と著明に増加していた。切断群の単鎖DNA陽性細胞核が平均52%であったのに対して切断+電気刺激群では39%と有意に減少していた($p < 0.05$)。また、非切断+電気刺激群と切断+電気刺激群の2群には単鎖DNA陽性細胞核の割合に有意差を認めなかった。以上の結果から、神経切断により筋細胞にアポトーシスが誘導されたこと、さらに神経切断後の電気刺激によってアポトーシスが抑制されていることが確認された。

2. cDNA アレイによるアポトーシス関連遺伝子発現の変化

cDNAアレイでは、切断群のvalosin-containing proteinの遺伝子発現が、非切断群の0.2倍に減少し、切断+電気刺激群においては切断群の13.6倍と最も高い信号比を示した。すなわち、valosin-containing proteinの遺伝子発現は脱神経によって減少し、脱神経後の電気刺激によって増加することが示唆された。

3. valosin-containing protein の遺伝子発現

RT-PCRの結果、valosin-containing proteinの遺伝子発現は、切断群が4群中もっとも低く、非切断群、切断+電気刺激群では切断群と比較して有意に高いことが確認された($p < 0.05$)。

4. valosin-containing proteinと活性型カスパーゼ-12の蛋白発現量の比較

ウェスタンブロット法で蛋白量を比較した結果、valosin-containing proteinは切断+電気刺激群で最も高く、電気刺激をおこなわなかった他の2群と比較して有意に増加していた($p < 0.05$)。また、電気刺激をおこなわなかった非切断群と切断群の2群間には有意差を認めなかった。活性型カスパーゼ-12の蛋白量は切断群が最も高く、非切断群および切断+電気刺激群と比較して有意に増加していた($p < 0.05$)。しかし切断+電気刺激群は非切断群との間に有意差はみとめなかった。以上の結果から、脱神経後の電気刺激がvalosin-containing proteinを増加させることで活性型カスパーゼ-12を減少させ、筋細胞に誘導される小胞体関連アポトーシスを抑制することが示された。

考 案

最近の研究から、脱神経後の筋萎縮は筋細胞に生じるアポトーシスに起因すると考えられている。本研究においても、単鎖DNAの免疫染色の結果から坐骨神経の切断によってヒラメ筋の筋細胞にアポトーシスが誘導されていることが確認された。さらに、この脱神経後のアポトーシスが筋収縮を誘発するような電気刺激によって抑制されることも確認された。

脱神経により生じる筋細胞のアポトーシスはいわゆる古典的なアポトーシス経路とは異なり、小胞体ストレスをトリガーとしてユビキチン/プロテアソーム系が活性化される経路が主流であると考えられている。小胞体ストレスとvalosin-containing proteinとの間には密接な関連があり、valosin-containing proteinが小胞体内の不良蛋白を細胞質内に引き出すことで小胞体ストレスを軽減するとされている。またカスパーゼ-12は小胞体ストレスに起因するアポトーシス経路に特異的に作用すると言われている。本研究では、脱神経後にvalosin-containing proteinの発現が低下し、活性型カスパーゼ-12の発現が増加すること、さらに脱神経後に電気刺激をおこなうことでvalosin-containing proteinの発現が増加し、活性型カスパーゼ-12の発現が低下することが確認された。以上の結果から脱神経後の電気刺激はvalosin-containing proteinを増加させ小胞体ストレスを軽減し、小胞体ストレス特異的アポトーシスの経路が抑制されることによって、筋萎縮を防ぐ効果を発揮しているものと推察された。

電気刺激は脱神経後の筋であっても筋収縮を誘発できることから、脊髄損傷による四肢麻痺や神経因性膀胱の機能回復、また喉頭麻痺による呼吸障害や音声障害への新しい治療としての臨床応用が期待されている。しかし、脱神経となった筋の機能回復には筋の興奮性の維持のみならず、筋萎縮をいかに防ぐかということも重要な課題である。本研究の結果から、電気刺激は脱神経後の骨格筋に筋収縮を誘発すると同時に、筋萎縮を防ぐことに対しても有効であり、このような電気刺激の応用は運動機能の回復を目指した新しい治療法となりうると考えられた。

結 論

1. 脱神経後の骨格筋に加えた電気刺激がアポトーシスを抑制することによって筋線維の萎縮を防ぐという仮説を検証した。
2. ラット下腿筋の脱神経モデルを作成し、長期間の電気刺激によるアポトーシス関連遺伝子や蛋白の発現の変化について解析した。
3. 神経切断による脱神経によってヒラメ筋の筋細胞にアポトーシスが誘導され、電気刺激がそのアポトーシスを抑制した。
4. 脱神経によりヒラメ筋組織の valosin-containing protein の発現は低下していたが、電気刺激によりその発現が増加した。
5. 脱神経によりヒラメ筋組織の活性型カスパーゼ-12 の発現は増加したが、電気刺激によりその発現が低下した。

6. 脱神経後の電気刺激は valosin-containing protein を増加させることで小胞体ストレス関連アポトーシスを抑制し、脱神経による筋線維の萎縮を防ぐ効果があることが示唆された。
7. 電気刺激は脱神経後の骨格筋に筋収縮を誘発すると同時に、筋萎縮を防ぐことにも有効であり、神経障害による運動機能の回復をめざした新しい治療法になりうると考えられた。




引用文献

- 1) S. C. Bodine, E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass, Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy, *Science* **294** (2001), 1704-8.
- 2) A. B. Borisov and B. M. Carlson, Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis, *Anat Rec* **258** (2000), 305-18.
- 3) T. Kobayashi, K. Tanaka, K. Inoue and A. Kakizuka, Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells, *J Biol Chem* **277** (2002), 47358-65.

参考文献

- 1) Kunibe I, Nonaka S, Katada A, Adachi M, Arakawa T, Harabuchi Y. Fos expression in the brainstem nuclei evoked by nasal air-jet stimulation in rats. *Am J Rhinol.* 2007 Jan-Feb;21(1):128-32.
- 2) Katada A, Nonaka S, Adachi M, Kunibe I, Arakawa T, Imada M, Hayashi T, Zeale DL, Harabuchi Y. Functional electrical stimulation of laryngeal adductor muscle restores mobility of vocal fold and improves voice sounds in cats with unilateral laryngeal paralysis. *Neurosci Res.* 2004 Oct;50(2):153-9.
- 3) 荒川卓哉, 野中 聡, 片田彰博, 執行 寛, 安達正明, 原淵保明. 機能的電気刺激による内喉頭筋の筋萎縮抑制作用の発現機序の検討. *喉頭* 2004 Jun;16(1):8-12

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	荒川 卓哉
<p>審査委員長 坂本尚志 </p> <p>審査委員 相柳 誠 </p> <p>審査委員 西山 祐司 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Electrical stimulation prevents apoptosis in denervated skeletal muscle. (電気刺激を用いた脱神経骨格筋におけるアポトーシスの抑制)</p>			
<p>脱神経後の骨格筋の萎縮は、筋細胞に生じるアポトーシスに起因することが示唆されている。また、脱神経後のアポトーシスは古典的なアポトーシスとは異なり、小胞体ストレスをトリガーとした経路が主流であることが提唱されている。本研究は、脱神経後の骨格筋に加えた電気刺激が、小胞体ストレスに起因するアポトーシスを抑制することで筋線維の萎縮を防いでいることを、分子生物学的手法を用いて検証しようとした研究である。</p> <p>実験には、ラット下腿筋の脱神経モデルを用い、4週間に渡って電気刺激を加え、ヒラメ筋における変化を、cDNA アレイ解析、RT-PCR 法による遺伝子発現解析、ウェスタンブロット法を用いたタンパク量解析により解析している。</p> <p>得られた結果は明快で、cDNA アレイ解析および RT-PCR 法により、萎縮にともなって抑制されていた valosin-containing protein の遺伝子発現が、電気刺激により回復することが明らかとなった。タンパク量解析では、電気刺激により</p>			

valosin-containing proteinが増加すること、小胞体ストレスに起因するアポトーシスに作用する活性型カスパーゼ-12が増加していることが明らかとなった。これらのことは、電気刺激による筋萎縮の抑制が、小胞体ストレスに起因するアポトーシスを抑制することにより生じていることを示唆している。

本研究は、脱神経後の骨格筋の筋萎縮に対する電気刺激の効果が、アポトーシスを抑制することにより生じていることを、分子生物学的手法を用いて初めて示すものである。今後脊髄損傷による四肢麻痺や、末梢神経障害による喉頭麻痺に伴う呼吸障害や音声障害の治療法の開発など臨床研究への応用に資するところが大きいと思われる。本論文は2010年のNeuroRehabilitation誌に掲載予定である。

なお、論文提出者に対する本論文の内容、関連領域に関する試問に対し、適切な回答が得られ、学力も十分と考えられた。以上より、本論文は博士（医学）の学位論文に値すると判定された。