

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岩崎 肇
<p>学位論文題目</p> <p>廃用性筋萎縮により生じた筋弛緩薬抵抗性の改善に関する研究</p> <p>共著者なし</p> <p>北海道医学雑誌 第90巻第2号 平成27年 11月掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>通常$2\alpha_1\beta\delta\epsilon$の5つのサブユニットで構成される成熟型ニコチン性アセチルコリン受容体(AChRs)は骨格筋の終板に最も数多く存在し、神経筋接合部での刺激伝達に関与している。一方で、発生段階の胎児の筋肉や、不動化や除神経によって廃用性に萎縮した筋肉には、$2\alpha_1\beta\delta\gamma$のサブユニットで構成される胎児型AChRsが、さらに、除神経された筋肉では中枢型AChRsである$\alpha 7$AChRsが発現することが報告された。</p> <p>臨床において、廃用性筋萎縮を有する患者に非脱分極性筋弛緩薬を用いる場合、効果発現に抵抗性を示すことが知られている。しかし、胎児型AChRs、中枢型AChRsである$\alpha 7$AChRsのどちらが神経伝達に影響を与えているかは未だ明らかにはなっていない。</p> <p>今回我々は、一方の下肢のみをギプス固定した廃用性筋萎縮マウスに$\alpha 7$AChRsの特異的阻害薬であるArIBを先行投与し、その後の成熟型AChRsに特異的に結合するwaglerin-1投与によるギプス固定側と健常側の下肢の筋収縮反応を解析することにより、$\alpha 7$AChRsの筋弛緩薬抵抗性への関与を検証した。また、これまでに報告されていない$\alpha 7$KOマウスを用いて同様の検証を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 廃用性筋萎縮モデルの作成</p> <p>本研究に用いた廃用性筋萎縮モデルはKhanらによって示された方法に準拠し、ポリエチレン製のスポイトとスポンジによって作成したギプスをマウスの左下肢に3週間装着し左下肢を不動化することにより作成した。</p>			

2. 神経刺激による誘発筋収縮反応の測定

1) 手術

3週間の下肢のギプス固定の後, ペントバルビタールをマウスに腹腔内投与し麻酔した. マウスに気管切開を施行し, 内頸静脈に投薬用カニューレを挿入した. 坐骨神経を露出し, 刺激電極を装着した. アキレス腱を露出し, 張力トランスデューサーを装着した.

2) 坐骨神経刺激による腓腹筋収縮反応の記録

腓腹筋の収縮反応測定のための坐骨神経刺激には末梢神経刺激装置を用い, 坐骨神経に Train-of-four 刺激 (2Hz, 4回刺激) を与えた. 最大上刺激電流を決定後, 50Hz×3秒のテタヌス刺激を施行し, その後15分間腓腹筋の収縮反応を安定化するのを確認した. その後, まず, ArIBを10ug投薬用カニューレから静脈内投与した. ArIB投与10分後にwaglerin-1を4ug投与し, 腓腹筋の収縮反応を経時的に記録した. 腓腹筋収縮反応の記録終了後速やかに左右の腓腹筋を採取し, 液体窒素で急速冷凍, 保存した.

3. Real-time PCR

筋収縮反応観察後に採取した腓腹筋よりRNAを抽出し, cDNAを作成した. $\alpha 7$, γ , $\alpha 1$ の各アセチルコリン受容体の発現については, TaqMan® Gene Expression Assays (life technologies) の特異的プライマーを用いてreal-time PCRにて検出した. なお, GAPDHの発現量を内部コントロールとして標準化した.

5. 統計処理

データはいずれも平均±標準誤差で示した. 有意差検定にはMann-Whitney U検定, Wilcoxon符号順位検定を用い, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした.

成 績

1. 3週間のギプス固定前後の体重と腓腹筋重量の変化

実験開始前のマウスの体重は, 野生型 ($n=5$) が 30.2 ± 1.5 (g), $\alpha 7$ KOマウス ($n=5$) が 32.7 ± 1.8 (g) であり有意差を認めなかった. 3週間のギプス固定後のマウスの体重は, 野生型が 27.3 ± 1.0 (g), $\alpha 7$ KOマウスが 26.6 ± 1.2 (g) であり有意差を認めなかった. 3週間後のギプス固定後採取した健常側の腓腹筋を対照としたギプス固定側の腓腹筋の筋重量の減少率は, 野生型が 13.6 ± 1.0 (%), $\alpha 7$ KOマウスが 17.5 ± 1.5 (%) であり有意差を認めなかった.

2. ArIB, waglerin-1投与後の腓腹筋収縮の変化

1) 野生型での筋萎縮側と健常側の比較

ArIB先行投与後のwaglerin-1投与により, 筋萎縮側の単収縮高は 26.5 ± 14.3 (%), 健常側の単収縮高は 46.1 ± 15.7 (%) 減少した. 統計学的有意差は認めなかった ($p=0.0625$).

2) $\alpha 7$ KOマウスでの筋萎縮側と健常側の比較

ArIB先行投与後のwaglerin-1投与により,筋萎縮側の単収縮高は 2.14 ± 0.79 (%),健常側の単収縮高は 7.4 ± 2.1 (%)減少した.統計学的有意差は認めなかった($p=0.125$).

3) 野生型, $\alpha 7$ KOマウスそれぞれの筋萎縮側の比較

上記に示した野生型, $\alpha 7$ KOマウスそれぞれの筋萎縮側を比較した場合,ArIB先行投与後のwaglerin-1投与により野生型で有意に単収縮高が減少した($p < 0.05$).

3. Real-time PCR

健常側の腓腹筋をコントロールとし,筋萎縮側の $\alpha 7$, γ それぞれのサブユニットの遺伝子発現量を $\Delta \Delta$ CT法で相対定量した.筋萎縮側の $\alpha 7$ サブユニットの増幅効率は,野生型では 2.44 ± 0.41 であったが, $\alpha 7$ KOマウスではGAPDHの発現は認めたが, $\alpha 7$ 遺伝子の増幅を認めなかった.筋萎縮側の γ サブユニットの発現は,野生型で 7.46 ± 5.31 , $\alpha 7$ KOマウスで 10.35 ± 8.07 と有意差を認めなかった.筋萎縮側の $\alpha 1$ サブユニットの発現は,野生型で 1.47 ± 0.81 , $\alpha 7$ KOマウスで 3.14 ± 1.03 と有意差を認めなかった.

考 案

本研究では,非脱分極性筋弛緩薬に抵抗性を有する廃用性筋萎縮モデルに $\alpha 7$ AChRs特異的阻害薬であるArIBを先行投与することにより,ArIBが無効な $\alpha 7$ KOに比べ野生型において,続く成熟型AChRs特異的阻害薬であるwaglerin-1投与による筋弛緩効果を有意差に得ることができた.Real-time PCRの結果において,筋萎縮側では健常側の約2.4倍の $\alpha 7$ AChRsが発現していることから,この廃用性筋萎縮によって増幅した $\alpha 7$ AChRsがArIBによって阻害されたことにより,続くwaglerin-1の効果を増強されたと考えられる.

野生型の神経刺激による誘発筋収縮反応においても筋萎縮側と健常側の筋弛緩薬抵抗性に統計学的有意差はないが,その差が $p=0.125$ とArIBの $\alpha 7$ AChRs阻害だけで完全に筋弛緩薬抵抗性を改善させたとは言い難い結果となった.この機序の一因として,野生型の筋萎縮側の γ サブユニットの発現は健常側に対し約7.5倍と増加しており,胎児型AChRsの筋弛緩薬抵抗性への関与の可能性を今後検討する必要があることが示唆された.

結 論

廃用性筋萎縮によって増加した $\alpha 7$ AChRsを特異的に阻害するArIBを先行投与することにより,続く成熟型AChRs特異的阻害薬であるwaglerin-1投与による筋弛緩効果を増強することができた.しかし,胎児型AChRsも $\alpha 7$ AChRsと同様に筋弛緩薬抵抗性に寄与している可能性があり,今後その両受容体を阻害することにより完全に筋弛緩薬抵抗性を改善できるかを検討する必要がある.




引 用 文 献

- 1) Tsuneki H, Salas R, Dani JA. Mouse muscle denervation increases expression of an alpha7 nicotinic receptor with unusual pharmacology. *J Physiol* 2003; 547: 169-179.
- 2) Fischer U, Reinhardt S, Albuquerque EX, Maelicke A. Expression of functional alpha7 nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 2856-2864.
- 3) Molles BE, Tsigelny I, Nguyen PD, Gao SX, Sine SM, Taylor P. Residues in the epsilon subunit of the nicotinic acetylcholine receptor interact to confer selectivity of waglerin-1 for the alpha-epsilon subunit interface site. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 41: 7895-7906.
- 4) Whiteaker P, Marks MJ, Christensen S, Dowell C, Collins AC, McIntosh JM. Synthesis and characterization of ¹²⁵I-alpha-conotoxin ArIB[V11L;V16A], a selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325: 910-919.

参 考 论 文

- 1) Khan MA, Sahani N, Neville KA, Nagashima M, Lee S, Sasakawa T, Kaneki M, Martyn JA. Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2014; 92: 1-8.
- 2) Lee S, Yang HS, Sasakawa T, Khan MA, Khatri A, Kaneki M, Martyn JA. Immobilization with atrophy induces de novo expression of neuronal nicotinic alpha7 acetylcholine receptors in muscle contributing to neurotransmission. *Anesthesiology* 2014; 120: 76-85.

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	岩 崎 肇
審査委員長 鎌田 恭輔 			
審査委員 伊藤 浩 			
審査委員 高井 章 			
学 位 論 文 題 目			
廃用性筋萎縮により生じた筋弛緩薬抵抗性の改善に関する研究			
<p>通常 $2\alpha 1\beta \delta \epsilon$ の5つのサブユニットで構成される成熟型ニコチン性アセチルコリン受容体(AChRs)は骨格筋の終板に最も数多く存在し、神経筋接合部での刺激伝達に関与している。一方で発生段階の胎児の筋肉や、不動化や除神経によって廃用性に萎縮した筋肉には、$2\alpha 1\beta \delta \gamma$ のサブユニットで構成される胎児型 AChRs が、さらに、除神経された筋肉では中枢型 AChRs である $\alpha 7$AChRs が発現することが報告されている。</p> <p>臨床ではこの廃用性筋萎縮を有する患者に非脱分極性筋弛緩薬を用いる場合、効果抵抗性を示すことがある。しかしこれが胎児型 AChRs, 中枢型 AChRs の関与しているか明らかでない。</p> <p>本研究では、Wild と $\alpha 7$KO マウスを用いて一側の下肢のみをギプス固定した廃用性筋萎縮マウスに $\alpha 7$AChRs(中枢型AChRsへ)の特異的阻害薬である ArIB を先行投与し、その後成熟型 AChRs に特異的(胎児型ではない)に結合する waglerin-1 投与し、健・患側の違いを解析した。</p>			

方法：筋萎縮マウスモデル(wild: 5, α 7KO: 5)

電気刺激評価

Train-of-four 刺激 (2Hz, 4 回刺激) を繰り返し、15 分間腓腹筋の収縮反応を安定化するのを確認した。①ArIB を 10ug 投薬用カニューレから静脈内投与、②その 10 分後に waglerin-1 を 4ug 投与。刺激反応を経時的に観察した。

Real-time PCR 評価；筋収縮反応観察後に採取した腓腹筋より RNA を抽出。 α 7, γ , α 1 の各アセチルコリン受容体の発現については real-time PCR にて検出した。

結果：

Wild 群；ArIB 先行投与後の waglerin-1 投与により、単収縮高の健側・患側間での有意差を認めなかった。

α 7KO 群：同様に健側・患側間での有意差を認めなかった。

Wild 群 vs α 7KO 群：筋萎縮側を比較した場合、ArIB 先行投与後の waglerin-1 投与により野生型で有意に単収縮高が減少した ($p < 0.05$)

Real-time PCR(筋萎縮側)

Wild 群： α 7 サブユニットの増幅あり

α 7KO 群： α 7 サブユニットの増幅なし

γ サブユニット、 α 1 サブユニットの発現の有意差なし。

結論

非脱分極性筋弛緩薬に抵抗性を有する廃用性筋萎縮モデルに α 7AChRs 特異的阻害薬である ArIB を先行投与することにより、野生型において成熟型 AChRs 特異的阻害薬である waglerin-1 による筋弛緩効果を有意差に得ることができた。

Real-time PCR では、Wild 群で筋萎縮側では α 7AChRs が高く発現し、この廃用性筋萎縮によって増幅した α 7AChRs が ArIB によって阻害されたことにより、続く waglerin-1 の効果を増強されたと考えられる。

今後は筋弛緩薬抵抗性に関与していると考えられる胎児型 AChRs の関与の可能性を検討する必要がある。