

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	荒川 卓哉
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">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 style="text-align: center;">共 著 者 名</p> <p style="text-align: center;">片田彰博、執行 寛、岸部 幹、安達正明、野中 聡、原淵保明</p> <p style="text-align: center;">掲載雑誌名</p> <p style="text-align: center;">NeuroRehabilitation (2010 年 8 月掲載予定)</p> <p style="text-align: center;">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須である。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こることを確認した。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でヒラメ筋を摘出し凍結保存した。非切断群の 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グラスに添付後、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検討した。

### 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+電子刺激群の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群中も最も低く、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

ウエスタンブロット法で蛋白量を定量した結果、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をみとめなかった。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. ラット下肢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の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と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, 原渕保明. 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