

■理学療法基礎系 32

817 培養骨格筋細胞に周期的伸張刺激をくわえると Akt がリン酸化される

笹井宣昌¹⁾, 宮津真寿美¹⁾, 河上敬介¹⁾, 早川公英²⁾, 小林邦彦¹⁾

1) 名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻, 2) 科学技術振興機構・ICORP・細胞力覚プロジェクト

key words 培養骨格筋細胞・周期的伸張刺激・Akt

【目的】骨格筋を肥大させる刺激のひとつに伸張刺激がある。しかし伸張刺激が、どのようにして筋肥大を引き起こすか、その分子メカニズムは明らかにされていない。一方、成長因子のひとつである IGF-1 (insulin like growth factor 1) による筋肥大については、IGF-1 により筋細胞の脂質キナーゼである PI3K (phosphatidylinositol 3,4,5 kinase) を介して細胞内のタンパク質キナーゼである Akt がリン酸化されることが重要であることが示された。そこで伸張刺激による筋肥大と PI3K / Akt の関連について探るため、伸張刺激による培養骨格筋細胞の Akt がリン酸化と、その Akt のリン酸化への PI3K の関与について確かめた。

【方法】ニワトリ胚の胸筋から採取した筋芽細胞を、collagen type I をコーティングした薄いシリコン膜上に初代培養した。シリコン膜の表面に一定方向の溝をつけ、筋管細胞が一定方向に並ぶように工夫をした。培養開始後 6 日目の筋管細胞に、シリコン膜を伸張して、筋管細胞の長軸方向に伸張刺激を与えた。刺激条件は、Adachi ら (2003) が培養骨格筋細胞の肥大を観察した条件 (頻度 1 / 6 Hz、伸張率 10% で 72 時間の周期的伸張刺激) を参考に、同様の頻度で伸張率が 10% もしくは 30% である周期的伸張刺激とした。刺激時間は、0, 5, 15, 30, 45, 60 分の 6 種類を実施した。刺激直後の細胞の全抽出物を電気泳動した後、ウェスタンブロットで全 Akt とリン酸化 Akt を検出し、全 Akt の検出値に対するリン酸化 Akt

の検出値の割合を算出した。さらに、刺激前に wortmaninn 100 nM (PI3K のインヒビター) を培養液に投与して、伸張率 30% で同様の実験を実施した。

【結果】Akt のリン酸化は、周期的伸張刺激開始後 5 - 15 分で刺激前の約 3 倍に充進した。その後やや減少し、45 分以上の刺激で再び緩やかに充進した。一方、wortmaninn を投与した後の周期的伸張刺激による Akt のリン酸化は、観察した 60 分の間、刺激前とほぼ同レベルに抑制された。なお、伸張率の違いによる Akt のリン酸化に顕著な違いはなかった。

【考察】今回、伸張刺激により培養骨格筋細胞の Akt がリン酸化されることが分かった。また PI3K のインヒビターをもちいた実験結果から、周期的伸張刺激により PI3K が関与して Akt がリン酸化されると解釈できた。今後、PI3K / Akt 経路の不活化が周期的伸張刺激による筋肥大を抑制するか確かめたい。また Akt の活性化は筋肥大とともに筋萎縮の抑制にも効果があるといわれており、周期的伸張刺激が PI3K / Akt を介して筋肥大をひき起こすとなれば、同様の経路による筋萎縮の抑制効果も期待できる。以上のような筋肥大や筋の萎縮抑制にかかわる分子メカニズムが明らかにされれば、筋力低下の予防や筋力増強のための科学的根拠にもとづく効果的で効率的な理学療法の開発につながると考える。

■理学療法基礎系 32

818 伸張刺激の時間や種類とラット除神経筋萎縮抑制の関係

縣 信秀¹⁾, 亀井健太²⁾, 柴田賢一²⁾, 宮津真寿美¹⁾, 河上敬介¹⁾, 早川公英³⁾, 小林邦彦¹⁾

1) 名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学, 2) 名古屋大学医学部保健学科学療法学専攻, 3) 科学技術振興機構・ICORP・細胞力覚プロジェクト

key words ラット・筋萎縮・伸張刺激

【はじめに】筋に伸張刺激を加えると筋萎縮は抑制される。前回、萎縮抑制に周期的伸張刺激と持続的伸張刺激に効果があることを報告した。そこで今回、それぞれの伸張刺激で刺激時間の違いによる萎縮抑制効果について検討した。

【対象と方法】8週齢の Wistar 系雄性ラットを対照群 (C群) 7匹、除神経群 (D群) 7匹、除神経+周期的伸張刺激 (CS群) 22匹、除神経+持続的伸張刺激 (SS群) 22匹に分けた。さらに CS群、SS群は 5分刺激群 (CS5群、SS5群) 各 8匹、15分刺激群 (CS15群、SS15群) 各 7匹、30分刺激群 (CS30群、SS30群) 各 7匹に振り分けた。D群、CS群、SS群は麻酔下にて左坐骨神経を約 2 cm 程度切除し、C群は皮膚と筋を切開し坐骨神経を露出させ、そのまま縫合を行った。周期的伸張刺激は麻酔下にて左足関節の他動的背屈運動 (足関節最大背屈位で 5 秒間保持 - 足関節中間位 5 秒間保持) を繰り返した。持続的伸張刺激は麻酔下にて左足関節背屈位固定を行なった。これらを 1日 1回、週 5日、2週間施した。術後 2週間で、麻酔下にて左のヒラメ筋を剖出し筋湿重量を測定した後、筋を長軸方向に二分し、一方は組織学的分析に、他方は生化学的分析に用いた。組織学的分析は筋の横断凍結切片を作製し、筋線維断面積を測定した。生化学的分析は筋タンパク抽出後、ピロリン酸電気泳動を行い、各ミオシン重

鎖 (MHC) アイソフォームの割合の違いを調べた。

【結果】筋湿重量は、C群 (0.38 ± 0.04mg/kg) に比べ他の群は有意に減少していたが、CS30群 (0.25 ± 0.04mg/kg) は D群 (0.20 ± 0.02mg/kg) に比べ有意に大きかった (P < 0.05)。筋線維断面積も、C群 (2471 ± 352 μm²) に比べ他の群は有意に減少していたが、CS15群 (1313 ± 120 μm²)、CS30群 (1491 ± 188 μm²)、SS15群 (1168 ± 202 μm²) は D群 (924 ± 164 μm²) に比べ有意に大きかった (P < 0.05)。MHC アイソフォームのタンパク量比は、D群、CS5群、CS15群では C群に比べ type 2a の割合が増加し MHC の速筋化が見られた。しかし CS30群、SS5群、SS15群、SS30群ではその減少が抑えられていた。

【まとめ】一般にヒラメ筋のような遅筋では、除神経を行うと相対重量、筋線維断面積は減少し、MHC の速筋化が起こる。周期的伸張刺激を 30分行うと筋湿重量、筋線維断面積の減少と MHC の速筋化が抑えられ、15分行ったものでは筋線維断面積において萎縮抑制効果が得られた。一方、持続的伸張刺激を 15分行うと筋線維断面積、MHC アイソフォームにおいて萎縮抑制効果が得られ、5、30分行ったものでは MHC の速筋化は抑制されていた。以上のように、刺激時間や種類によって萎縮抑制の程度や筋線維の type 変化が異なることがわかった。