

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	湊 圭太郎
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 1096 号
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Measurement of lateral transmission of force in the extensor digitorum longus muscle of young and old mice (若齢および老齢マウスの長趾伸筋における側方力伝達の計測)
論文審査委員	主査 教授 小野寺 理 副査 教授 芝田 晋介 副査 講師 近藤 直樹

博士論文の要旨

背景：

加齢と共に筋力低下をきたすサルコペニアは移動能力、嚥下機能の低下をきたし健康寿命に大きく関わる喫緊の課題である。サルコペニアの病態には不明な点が多く、有効な薬物治療はまだない。近年、筋線維自体は老化しても収縮力が保たれること、筋量が維持されていても筋力の低下がみられることから筋線維以外の要素の関与が示唆されている。それを説明しうる研究として筋線維同士をつなぐ筋間質の老化に関する研究が注目されている。

骨格筋の主な機能は、力を発生させることである。筋線維の収縮によって発生した力は腱に伝達される。筋線維から腱への力の伝達経路は、筋腱接合部を介した張力に依存する縦方向の伝達と、筋線維表面と周囲の結合組織が接する面を介した剪断力に依存する横方向の伝達（側方力伝達：以下 LFT）の 2 つがある。動物筋を用いた実験や数理モデルから、筋力伝達は LFT が主であることが示され、ラット筋を用いた研究により、加齢に伴い LFT の効率が低下することが示された。加齢による筋肉の結合組織の肥厚が剪断力を低下させるものと考えられ、老化による筋力低下の背景に筋間質の肥厚があると考えられている。

この筋間質の機能を定量的に評価する方法はマウスにおいてはまだない。マウスでは多様な遺伝子改変体を利用可能なため、マウスを用いた LFT 測定による筋間質の機能評価法は、今後の筋研究に有用になると考えられる。申請者らは、若齢および老齢マウスの長趾伸筋を用いて LFT を測定した。

方法：

In vitro での収縮力の計測

13 週齢と 28 か月齢の C57BL/6 マウス (n=8) の長趾伸筋 (以下 EDL) を採取した。5-0 シルク糸で近位と遠位の腱を結び、リング液を満たした筋張力計 (DMT, Hinnerup, Denmark, model 840MD) を使い、パルス刺激時 (300ms, 150Hz) の筋収縮力 F_0 を計測した。

次に EDL を筋張力計のチャンバーからリング液を満たしたディッシュに移し替えた。4 本ある EDL (第二趾～第五趾) のうち第二、三趾の腱を実体顕微鏡下に切除し、EDL を筋張力計にセットし直して張力 $F'_{2,3}$

を計測した。その後またディッシュに EDL を移し替え、第二、三趾の筋切除を行った後、同様に張力 F2_3 を計測した。この低下分が腱を介さない力伝達である LFT であり、若齢マウスと高齢マウスで計測を行った。第四趾でも同様の手順を行い、第四趾の腱を切除したときの張力 F' 4、筋切除したときの張力 F4 を計測した。

免疫組織染色

別のマウス (C57BL/6, 3 か月齢と 24 か月齢) から採取した筋を、液体窒素で冷やしたイソペンタンのなかで凍結した。クライオスタットを使い、7 μ m 厚で切片を作成した。-20°C のアセトンで 5 分間の固定を行った後ブロッキングを行い、一次抗体を 4°C で一晩反応させ、二次抗体での染色を行った。一次抗体は anti-dystrophin, anti-collagen III を使用した。蛍光顕微鏡で観察したのち、Hybrid Cell Count (Keyence) で定量した。

結果：

各手順で測定された張力は F0 で標準化した。若齢マウスでは F' 2_3/F0 と F2_3/F0、および F' 4/F0 と F4/F0 でのみ有意差が認められた。これは腱切除のみでは有意に筋力が低下しなかったことで、力の大部分が腱に頼らない力伝達である LFT によるものであることを示唆している。高齢マウスでは筋切除したときに加え F0/F0 と F' 2_3/F0、および F2_3/F0 と F' 4/F0 でも有意差を認めた。つまり腱切除しただけで有意に筋力が低下しており、これは高齢マウスでは縦方向の伝達への依存度が高くなっていることを示唆している。高齢筋では結合組織量の増加が顕著であったが、筋線維の細胞骨格と細胞外マトリックスをつなぐ重要な分子であるジストロフィンの発現には大きな変化が見られなかった。

考察：

LFT は筋張力を腱へ伝えるために非常に重要な役割を担う。本研究では若齢マウスでは張力の 80% を LFT が担っていたが、これは過去の報告と同様であり、この方法の妥当性を支持する結果である。加齢による筋張力の低下のメカニズムは明らかにされていないが、筋線維以外の組成が影響しているとされている。筋線維以外の組織の一つである結合組織は LFT の重要な担い手である。本研究では加齢に伴う結合組織の肥厚を示した。この結合組織の加齢による変化が LFT の低下をきたし、ひいては筋力の低下を引き起こしている可能性がある。

本研究では、ジストロフィンは加齢によって変化しなかった。報告によって、加齢によりジストロフィンの発現が減少するというものもあれば、増加するとしているものあり、この結果の乖離の理由は明らかではない。ジストロフィンの減少と筋力の減少は関係のないことを示しているのかも知れない。本研究ではすでに知られているように加齢に伴って結合組織の量が増加した。結合組織の硬さなど他の要因の関与は検討できないが、少なくとも結合組織の厚みの増加が横方向の力伝達における加齢性変化の原因の 1 つである可能性が示された。筋の力伝達特性が制御される分子メカニズムを解明することが今後の課題であり、様々な遺伝子改変マウスでの研究がこの課題に取り組むための有用なツールとなり得る。したがってこの研究手法は筋間質の分子メカニズム解明の一つの基礎となる可能性がある。

審査結果の要旨

加齢による筋力低下は、健康寿命に大きく関わる。しかし、その病態は不明で、有効な治療はない。筋力は骨格筋の筋線維の収縮が腱へ伝達して生ずる。この経路には、筋腱接合部を介した縦方向の伝達と、筋線維表面と周囲の結合組織との接触面を介した横方向の伝達 (側方力伝達) がある。ラットでは、側方力伝達の測定法が確立しており、加齢による低下が示されている。この際、筋間質の繊維化が推察されている。一方、マウスでは、側方力伝達の測定法は確立されていない。申請者らは、マウスの長趾伸筋にて、ラットの既報を応用し、側方力伝達の測定法を確立した。具体的には、まず 4 本ある長趾伸筋の一部の腱を切除し張

力を計測、その後、それらの筋を切除し張力を計測し、この差を側方力伝達とした。その結果、若齢マウスでは、既報と同様に、張力の80%を側方力伝達が担っていると算出しえた。このことより、本法が有用であることを示した。一方、高齢マウスでは、腱切断のみで、張力は低下した。この事実は、側方力伝達が低下していることを示した。さらに高齢マウスの筋組織では筋間質にコラーゲン3の増加を認めた。様々な遺伝子改変が可能であるマウスで、側方力の測定系を確立したことは、本症の病態解明に寄与する。この点に、本論文の学位論文としての価値がある。