

脊髄損傷ラットにおける 骨格筋Myosin heavy chainアイソフォームの経時的变化

堤 恵理子 山田 崇史 中野 治郎 永野 克人 梶原 博毅

キーワード (Key words) : 1. 脊髄損傷 (spinal cord injury) 2. SDS-PAGE (SDS-PAGE)
3. 骨格筋線維 (skeletal muscle fiber)

要 旨

脊髄損傷初期における麻痺骨格筋線維の形態学的、生化学的变化を検討する目的で脊髄損傷動物を作成した。ラットヒラメ筋のATP-ase染色では、術後1, 3, 5週とタイプ の線維が著しく減少し、タイプ が増加した。電気泳動解析では、Myosin Heavy Chain (以下、MHCとする) アイソフォームが有意に減少し、同時にMHC II d, MHC II b アイソフォームが出現した。脊髄損傷による廃用性筋萎縮により、ヒラメ筋では筋線維レベルにおいても筋原線維タンパクレベルにおいても、slow typeからfast typeへ変換することが示された。

緒 言

脊髄損傷は永久的な骨格筋麻痺、感覚脱失、自律神経機能損失等を伴い、重度の障害を残す。これまで骨格筋の可塑性を示す観点から、たとえば下肢不動化と慢性的電気刺激が骨格筋に及ぼす影響¹⁾、電気刺激のみの影響²⁾、神経交差による再神経支配の影響³⁾、中枢神経系傷害の影響⁴⁾等を考慮し、様々なモデルが作成されてきた。脊髄損傷において、適切な治療を行うためにはその病態発生を十分に把握する必要がある。特に痙性麻痺における筋肉の変化は末梢神経麻痺の場合⁵⁾とはかなり異なることが知られてはいるものの、麻痺筋肉の経時的变化に関する知見は極めて乏しい。

今回ラットを用いて実験的に脊髄損傷を作成し、実験動物の麻痺筋の経時的变化を組織形態学的、組織化学的、及びSDS-PAGEにより生化学的に検討した。

方法と対象

実験動物は、6週齢のWistar系雄ラット(体重179 ± 11 g) 34匹を用い、実験群(以下、SCIとする)を22匹、対照群(以下、CONとする)を12匹とした。

SCIの22匹は、胸髄をTh6-12間で切断し、術後1週

(n=8), 3週(n=7), 5(n=7)週で、CONは各週で各40匹用い、層殺後、神経根を数え、どのレベルで脊髄が切断されているかを確認した。その後、右の腓腹筋とヒラメ筋を切離し、1)パラフィン包埋後、HE染色、2)残片を電気泳動(SDS-PAGE)に用いた。電気泳動は、和田ら⁶⁾の変法を用い、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)により実施した。筋を40倍の抽出液(5 M尿素, 2 Mチオ尿素, 10 mMピロリン酸ナトリウム, 0.1% (V/V)メルカプトエタノール)中でホモジナイズ後、得られた抽出液をサンプル・バッファ(62.5 mMトリス塩酸: pH6.8, 2% (W/V) SDS, 10% (V/V) グリセロール, 5% (V/V)メルカプトエタノール, 0.02% (W/V) ブロモフェノールブルー)で75倍に希釈し、電気泳動を行うまでフリーザー内(-70)で保存した。電気泳動時には、電気泳動槽(ラビダス・二連スラブ電気泳動槽; アトー社製)を用い、160Vで44時間(4 下)行った。

左の腓腹筋とヒラメ筋も同様に切離し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。凍結切片は、-25 のクリオスタット(MICROM, HM500-OM; カールツァイス社製)中で10 μ m厚にスライスし、Gollnickら⁷⁾の変法で、ATP-ase染色(アルカリ前処理; pH10.4, 酸性前処理; pH4.6)を行った。

筋線維の萎縮の程度を知るため、筋組織のHE染色標本において横断面を選択し、その写真撮影を行ってスキャンし(Sharp scanner V3.01 JX-330), 各筋より平均100個の筋線維横断面を選択した後、その短径を画像解析ソフトNIH Imageにより処理した。MHCアイソフォーム分析においては、泳動終了後銀染色を行い、スキャン後NIH Imageを用いて各バンドの比を算出した。統計学的手法として、1)体重と筋線維短径比較はSCIの効果を検証するために二元配置分散分析、2)MHCアイソフォームバンドの比較は一元配置分散分析によって検証し、その後いずれも多重比較検定Bonferroni/Dunn法を用いた。尚、全ての統計学的検索において、有意水準を

• Sequential Changes in Myosin Heavy Chain Isoforms of Skeletal Muscle Fibers in Rats with Spinal Cord Injury

• 所属: 広島大学医学部保健学科病態解析学教室

• 広島大学保健学ジャーナル Vol. 1(1): 60~64, 2001

5%とした。

実験動物飼育は、広島大学医学部附属実験施設において、12時間の明暗サイクル、温度 23.0 ± 2.0 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ の一定条件下で、プラスチックケージ1個にラット1~2匹を割り当て、餌、水は自由に与えた。尚、この研究は広島大学医学部附属動物実験施設倫理委員会の承認のもとに行った。

結 果

体重は手術後SCIで有意に減少した(図1; $p < 0.001$)。CONが緩やかに体重増加を示す一方で、SCIは術後1週目まで体重増加はほとんど見られなかったが、その後増加に転じた。

1) 筋線維の形態学的変化: 筋線維短径(腓腹筋内側頭)の統計学的解析では、交互作用が認められたので一元配置分散分析をし、ポストホックテストを行った。図2にその結果を示す。全ての週に於いて、SCIとCONの間に有意差を認めた。

2) 筋線維の組織化学的变化: ヒラメ筋のATP-ase染色

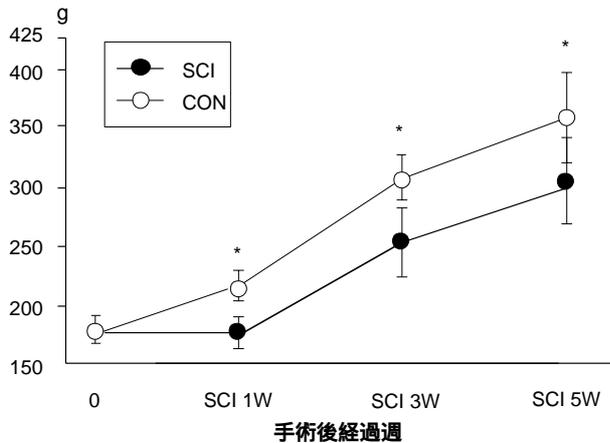


図1 手術後の体重変化 * $p < 0.001$

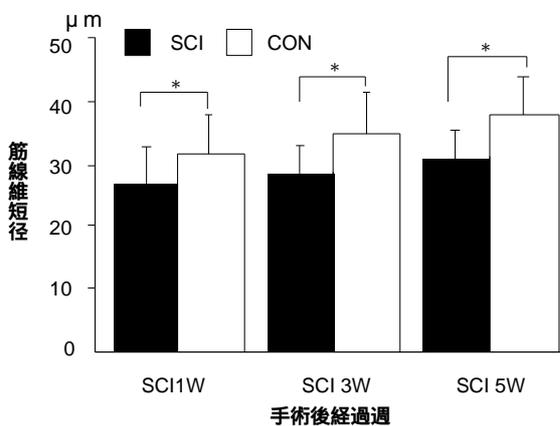


図2 筋線維短径 * $p < 0.001$

では、CONにおいて淡染するtype I線維が大部分を占め、濃染するtype II線維は少数散在性に見られ、その中間に染色する線維も観察された(図3)。術後1週目ではほとんど変化がなく、3、5週目では次第にタイプII線維が増加した(図4)。

3) MHCアイソフォームの変化: CONでは、MHC Iが約78%、MHC IIaが22%で他のアイソフォームは、

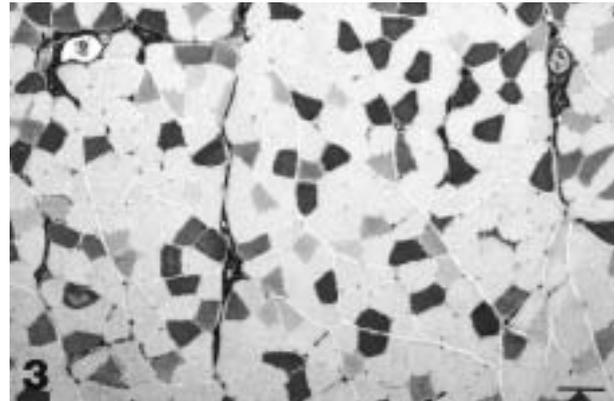


図3 CON 3W ATP-ase 染色 ヒラメ筋 (pH 10.6)

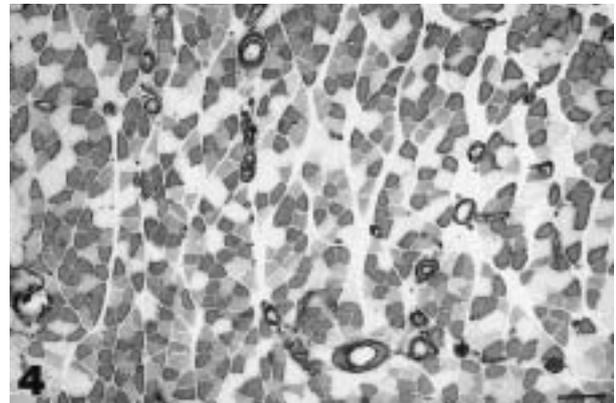


図4 SCI 3W ATP-ase 染色 ヒラメ筋 (pH 10.6)

は、100 μm

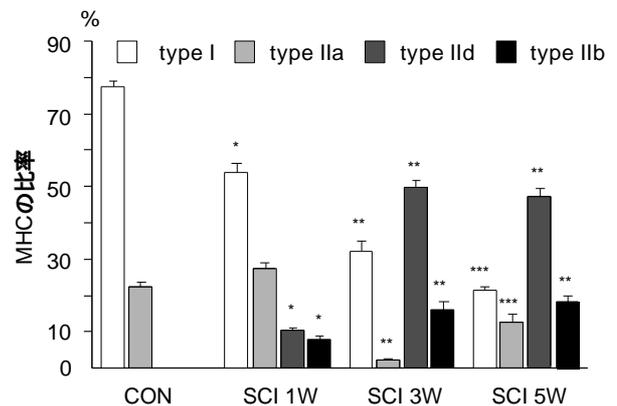


図5 ヒラメ筋におけるCONとSCI1、3、5WのMHCアイソフォーム変化

* CONとの有意差を認めたもの $p < 0.05$

** SCI 1Wとの有意差を認めたもの $p < 0.05$

*** SCI 3Wとの有意差を認めたもの $p < 0.05$

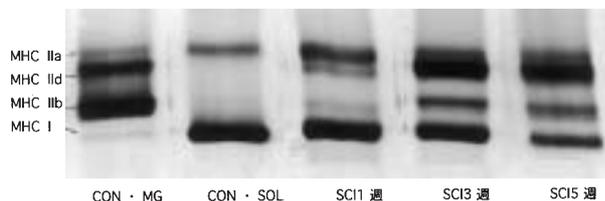


図6 ヒラメ筋のMHC アイソフォーム

MGはMedial Gastrocnemius、

バンドは、上部からMHC IIa、MHC IIb、MHC IIc、MHC Iの順番である。

認められなかった。MHC Iは、術後、1、3、5週と徐々に減少し、術後5週では、約22%となった。一方、術後1週目で出現したMHC IIbとMHC IIcは、術後3週目で1週目の2～5倍に増加し、術後5週ではCONとの間で有意差が認められたものの、術後3週目との変化はなかった(図5、6)。

考 察

脊髄に損傷を受けた場合に、受傷直後しばらくの間は脊髄ショックと呼ばれる時期があり、骨格筋が弛緩性麻痺状態となることは良く知られている。また、一般に動物が高等であればあるほど、脊髄ショック期間は長い。脊髄損傷ラットを実験的に作成した研究で、Behrmannら⁸⁾はラットは術後すぐに弛緩性麻痺となり、伸展した下肢を引きずって歩くと報告している。しかし、次第に刺激に対する反射性収縮が見られるようになり、反射過敏となって痙攣性麻痺と呼ばれる状態に移行する。この時点で、股関節が前後に動き、歩行様パターンが見られるが、足、膝、股関節はほぼ伸展状態で、足部を背屈して体重支持する様子は全く観察できなかった⁹⁾。また脊髄横断後、ラットは尿閉状態となるが、反射性膀胱が獲得されるまで毎日1～2回手動的に排尿を促した。

すでに述べたように、SCI後すべての週で萎縮が観察され、術後1週目の筋線維短径は対照と比較して87%、3週目は80%、5週目では、83%であった。行動観察では、1週目頃から刺激に対する反射が次第に回復してくる。したがって、反射がすでに回復し、筋収縮はおきてはいるものの、3週目頃までは萎縮が進行する。これは脊髄ショックに引き続く廃用性の萎縮と考えられる。その後5週目からの萎縮率の減少は、反射過敏の状態が3～5週目に最大となるためと思われる。

ヒラメ筋のATP-ase染色では、術後1週目ではほとんど染色性は変化がなく、術後3週、5週と濃染するtype IIが増加した。脊髄損傷後、筋線維のtype IIへの変換は

ヒトや動物でよく知られている^{10, 11)}。一方、fastからslowへのtype変化も生じる。ラットのヒラメ筋においては、加齢^{12, 13)}によってもfast to slowのtype変化が生じると言われる。ATP-ase染色の変化は、萎縮の程度と同じ術後3週目に現れており、たとえば、同様な廃用性筋萎縮を惹起する後肢懸垂モデル^{14, 15)}とは異なって、萎縮進行の程度が比較的ゆっくり生じ、その後やや回復する結果となった。これは前述したように、SCIが脊髄反射により常に筋収縮が生じていたことに起因すると考えられる。一方の後肢懸垂モデルでは、ヒラメ筋はSCIと同様な短縮位ではあるが、筋が常に弛緩状態であったことなどが要因として考えられる。また本文では示していないが、pH4.6の酸性前処理のATP-ase染色でも全く同じ結果を示した。

MHCアイソフォーム分析では、ATP-ase染色と同様な結果が得られた。術後1、3、5週に向かってMHC Iの減少が著しく、その一方でMHC IIbやMHC IIcが出現し、増加した。一般に、高周波刺激や廃用性萎縮では、MHC I MHC IIa MHC IIbへとシフトが生じる¹⁶⁾。低周波では、この逆のシフトが起こる。Jakubiec-Puka¹⁷⁾らは、坐骨神経損傷後のヒラメ筋のMHCアイソフォーム分析を行っており、脱神経後MHC IIbの出現がなく、MHC IIcが著明に増加したことを報告している。今回の我々の実験では、MHC I、MHC IIaの激減、MHC IIbとMHC IIcの増加が見られることから、前述のシフトシエマより、MHC I MHC IIa MHC IIb MHC IIcというシフトが考えられる。最近では、Talmadgeら¹¹⁾が病的筋線維において、同一筋内にミオシン重鎖アイソフォームの hybrid fiberが出現することを報告している。この報告を考慮すると、たとえば、MHC I + MHC IIa + MHC IIbなどのような3種類の hybrid fiberと3種類の“pure fiber”，全部で6種類の存在が考えられる¹⁸⁾。またAllenら¹⁹⁾は、脊髄切断術後のネコのヒラメ筋において、速筋線維の筋核数の減少とともに筋横断面積が減少する事を報告している。nuclear domainの観点からすれば、筋線維ボリュームの変化と筋線維核と変化との間には密接な関与が考えられ²⁰⁾、今回の筋原線維タンパクの変化はその報告を支持できるひとつとなりうる。

最近では、MHCタンパクと同時にMHC mRNAについての報告が多いため、MHC mRNAは、タンパク動態との間にタイムラグが指摘されているものの、MHCタンパクとほぼ同様なシフトをすることが示されている¹⁶⁾。また、興味あることに、同一筋線維内に異なるtypeのmRNAとタンパクが存在することが報告されている²¹⁾。Hybrid fiberの存在は、MHCアイソフォームシフトが短期間に連続的に行われていることを意味し²²⁾、上述の報告は不思議ではない。以上のことから、刺激に対す

る筋線維の適応能力は、予想以上に優れていると考えられる。これはtypeシフト能力が可逆的であり、適切な刺激を加えれば、元の状態に極めて近いところまでtype変換を促進できうることを示唆するものである。

しかし、Dupont-Versteegden²³⁾らは脊髄損傷後実施したexerciseはヒラメ筋の横断面積を増加させたが、MHC typeに影響を与えず、また、hybrid fiber数もexerciseを実施しなかったgroupと有意差がなかったと報告している。MHCアイソフォームと筋の収縮速度は、MHC I < MHC IIa < MHC IIc < MHC IIbという関係があり、hybrid fiberではその組成によって速度が変化する²⁴⁾ことを考慮すると、hybrid fiber出現²⁵⁾は様々な課題を含んでいると言えよう。

我々は以前、NADH活性が筋線維萎縮の進行とともに低下したことを報告したが²⁶⁾、筋線維の代謝も非常に重要な要素である。筋に対する過剰負荷を実施した研究では、過剰負荷後、GPDH (FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 活性が筋線維肥大とともに一過性に減少、一方SDH (succinate dehydrogenase) 活性は一過性に上昇し、その代謝変化はMHCアイソフォームシフトよりも先行すると報告されている²⁷⁾。筋線維のエネルギー代謝の変化に応じて、MHCアイソフォームが変化するの是非常に合目的的である。

MHCアイソフォームの変化が筋線維代謝の変化を表すということは、元々の筋線維自体の代謝回復を念頭に置く必要があることを意味する。これまで、脊髄損傷患者に対するFES (functional electrical stimulation)²⁸⁾、脊髄損傷ネコに対するstepping とstanding training²⁹⁾、萎縮筋へのstretch^{30,31)}等により、MHCアイソフォーム発現が変化したとの報告があるが、刺激の介入には適切な時期が必要だという指摘もあり^{24,32)}、これから先の研究が待たれる。脊髄損傷による二次的な筋萎縮に伴う神経筋接合部への影響や³³⁾、筋紡錘の錘内筋の変化の関与も指摘されるが、報告は少ない³⁴⁾。またMHCアイソフォームの変化は筋の種類に依存し²⁶⁾、対象となる筋によって考慮が必要である。さらに、異なる種では異なるMHCアイソフォームが存在し、ヒトの場合、MHC I、MHC IIa、MHC IIxの3種類であり³⁵⁾、MHC IIxはラットのMHC IIcに相当するものとされている³⁶⁾。

今回観察されたMHC アイソフォームの経時的なtype変換は、形態学的観察、酵素組織学的観察とほぼ一致した。本研究が示した骨格筋線維の初期の変化は、ヒトにおける脊髄損傷においても同様に認められると考えられ、以上のような研究結果に基づいて、脊髄損傷患者の運動麻痺に対する初期の理学療法的対応を確立する必要がある。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、有益なご指導とご助言を賜りました広島大学総合科学部 和田正

信助教授に深く御礼申し上げます。また組織標本作成に助力いただきました日高幸子技官に深謝致します。

文 献

- 1) Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T and Gerlach GF :Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol*, 262:356-363, 1992
- 2) Kirschbaum BJ, Schneider S, Izumo S, Mahdavi V, Nadal-Ginard B and Pette D :Rapid and reversible changes in myosin heavy chain expression in response to increased neuromuscular activity of rat fast-twitch muscle. *FEBS Lett*, 268:75-78, 1990
- 3) Roy RR, Eldridge L, Baldwin KM and Edgerton VR: Neural influence on slow muscle properties :inactivity with and without cross-reinnervation. *Muscle Nerve* , 19:707-714, 1996
- 4) Ansved T, Ohlsson AL, Jakobsson F and Johansson BB: Enzyme-histochemical and morphological characteristics of fast- and slow-twitch skeletal muscle after brain infarction in the rat. *J Neuro Sci*,144:14-20, 1996
- 5) Eisenburg HA and Hood DA: Blood flow, mitochondria, and performance in skeletal muscle after denervation and reinnervation. *J Appl Physiol*, 76:859-866, 1994.
- 6) 和田正信, 土路恭子, 新畑茂充, 菊池邦雄 :ミオシン重鎖分離のための電気泳動条件. 広島大学総合科学部紀要 理系編, 19:71-78, 1993
- 7) Gollnick PD, Parsons D and Oakley CR :Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. *Histochemistry*,77:543-555, 1983
- 8) Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS and Shah BR :Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats :behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*, 9:197-217, 1992
- 9) Slawinska U, Majczynski H and Djavadian R :Recovery of hindlimb motor functions after spinal cord transection in enhanced by grafts of the embryonic raphe nuclei. *Exp Brain Res*, 132:27-38, 2000
- 10) Burnham R, Martin T, Stein R, Bell G, MacLean I and Steadward R :Skeletal muscle fiber type transformation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 35:86-91, 1997
- 11) Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR :Prominence of myosin heavy chain hybrid fibers in soleus muscle of spinal cord-transected rats. *J Appl Physiol*, 78:1256-1265, 1995.
- 12) Pette D and Staron RS :Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol*, 170:143-223,1997
- 13) Danieli-Betto D, Betto R, Megighian A, Midrio M, Salviati G

- and Larsson L :Effects of age on sarcoplasmic reticulum and histochemical composition of fast- and slow-twitch rat muscles. *Acta Physiol Scand*, 154:59-64,1995
- 14) Laurence S, Firinga C, Gohlsch B, Bastida B, Mounier Y and Pette D :Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chain in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279:C1558-C1563, 2000
- 15) Mozdziak PE, Greaser ML and Schults E :Myogenin, Myo D and Myosin heavy chain isoforms express following hindlimb suspension. *Aviat Space Environ Med*, 70:511-516, 1999
- 16) Laurence S, Sultan KR, Perker H, Gohlsch B, Mounier Y and Pette D :Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol Cell Physiol*, 277: C1044-C1049, 2000
- 17) Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Morga J and Matusiak A :Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp Biochem Physiol*, 122:355-362,1999
- 18) Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR and Edgerton VR : Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol*, 81:145-151, 1996
- 19) Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR :Plasticity of myoclear number in hypertrophied and atrophied mammlian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*, 78:1969-1976, 1995
- 20) Habets PEMH, Franco D, Ruijter JM, Sargeant AJ, Sant'ana Pereira JAA and Moorman AFM :RNA content differs in slow and fast muscle fibers :implications for interpretation of changes in muscle gene expression. *J Histochem Cytochem*, 47:995-1004, 1999
- 21) Andersen JL and Schiaffino S :Mismatch between myosin heavy chain mRNA and protein distribution in human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 41:C1881-C1889, 1997
- 22) Peuker H, Conjard A and Pette D : -Cardiac-like myosin heavy chain as an intermediate between MHC IIa and MHC I in transforming rabbit muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 43:C595-C602, 1998
- 23) Dupont-Versteegden E, Houle JD, Gurley CM and Peterson CA :Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol Cell Physiol*, 44:C1124-C1133, 1998
- 24) Hori A, Ishihara A, Kobayashi S and Ibata Y : Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. *Acta Histochem Cytochem*, 31:375-384, 1998
- 25) Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M, McCue S and Baldwin KM :MHC polymorphism in rodent plantaris muscle :effects of mechanical over load and hypothyroidism, *Am J Physiol Cell Physiol*, 278:C709-C717, 2000
- 26) 堤 惠理子, 日野真一郎, 江口幸孝, 藤井 澄, 梶原博毅: 実験的脊髄損傷における麻痺骨格筋の経時的, 形態学的変化. *理学療法学の医学的基礎研究会雑誌*, 3:20-26, 1999
- 27) Dunn SE and Michel RN :Coordinated expression of myosin heavy chain isoforms and metabolic enzymes within overloaded rat muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 42:C371-C383, 1997
- 28) Andersen JL, Mohr T, Biering-Sorensen F, Galbo H and Kjaer M :Myosin heavy chain isoform transformation in single fibers from m.vastus lateralis in spinal cord injured individuals :effects of long-term functional electrical stimulation (FES) . *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, 431:513-518, 1996
- 29) Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, Zhong H, Baldwin KM and Edgerton VR :Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T12-T13) as adults. *Muscle Nerve*, 21:63-71, 1998
- 30) Laughna PT, Izumo S, Goldspink G and Nadal-Ginard B :Disuse and passive stretch cause rapid altertations in expression of developmental and adult contractile protein genes in skeletal muscle. *Development*, 109:217-223, 1990
- 31) Laughna PT and Morgan MJ :Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. *Pflugers Arch*, 439:25-55, 1999
- 32) Dupont-Versteegden E, Murphy RJ, Houle JD, Gurley CM and Peterson CA :Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279: C1677-C1684, 2000
- 33) Somasekhar T, Nordlander RH and Reiser PJ :Alterations in neuromuscular junction morphology during fast-to-slow transformation of rabbit skeletal muscle. *J Neurocytol*, 25:315-331, 1996
- 34) Wang J, Mcwhorter DL and Wairo JM :Stability of myosin heavy chain isoforms in selectively denervated adult rat muscle spindles. *Anat Rec*, 249:32-43, 1997
- 35) Bammam MM, Clarke MSF, Talmadge RJ and Feeback DL :Enhanced protein electrophoresis technique for separating human skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. *Electrophoresis*, 20:466-468, 1999
- 36) Smerdu V, Karsch-Misrachi I, Campione M, Leinwand L and Schiaffino S :Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 267: C1723-1728, 1994