

## 骨格筋の可塑性と筋核ドメインの多様性

河合 美菜子<sup>1,2</sup>, 宮田 浩文<sup>1</sup>

# Plasticity of skeletal muscle and variability of myonuclear domain

Minako Kawai<sup>1,2</sup> and Hirofumi Miyata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 山口大学大学院医学系研究科生物機能科学, 〒753-8515 山口市吉田1677-1 (*Biological Sciences, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan*)

<sup>2</sup> 日本学術振興会, 〒102-8472 東京都千代田区一番町8番地 (*Japan Society for the Promotion of Science, 8 Ichibancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8472, Japan*)

Received: January 8, 2013 / Accepted: March 18, 2013

**Abstract** Skeletal muscle fiber has a great ability to hypertrophy during growth and in response to exercise stimuli, and atrophy during aging and in response to disuse. Because the muscle fiber is a multinucleated cell, the region of cytoplasm governed by a single myonucleus (myonuclear domain; MND) is a very important factor for understanding muscle plasticity. Although the MND size varies with fiber type, metabolic property and species, it was considered that the size was maintained constantly during muscle adaptation. Recently, however, there have been many studies demonstrating the variability of the MND size. In some of these studies, it is hypothesized that muscle hypertrophy is achieved by increase in protein synthesis rate until the ‘ceiling’ of MND size and subsequent addition of myonuclei by satellite cell activation. On the other hand, during muscle atrophy, the myonuclei seems to be long lasting as ‘muscle memory’ storing information about previous size to prepare for recovery of muscle fiber. Understanding the variability of MND size more deeply would provide fundamental insights into the mechanism of skeletal muscle plasticity.

*Jpn J Phys Fitness Sports Med, 62(3): 189-198 (2013)*

**Keywords** : myonuclear domain, satellite cell, aging

### はじめに

骨格筋は、機能的要求の変化に適応する卓越した能力を持っている。トレーニング刺激に応答して筋肥大が起こる一方で、ギプス固定や宇宙遊泳に由来する筋活動量の低下に応答して短期間で筋萎縮が生じる。骨格筋が優れた可塑性を維持できる背景には、哺乳類がもつほとんどの細胞が単核細胞であるのに対し、筋線維が巨大な細胞質を共有する多核細胞であることが挙げられる。各々の筋線維は数百個もの筋核で取り囲まれており、これらの核は胚成長時に多数の筋芽細胞が一つの大きな筋管へと融合したことに由来する<sup>1)</sup>。

多くの研究者が、各々の筋核は筋線維の筋核あたりの細胞質領域を示す筋核ドメイン (myonuclear domain; MND) をもつとする説を提唱してきた<sup>2-5)</sup>。この概念は、一つの筋核に関して、特定の筋核に由来するタンパク質は筋線維の長軸に沿って観察されたが、mRNA産物はその核を取り囲む直近の領域に制限されていたとする発見に基づいている<sup>3)</sup>。ここで、筋線維内の個々のタンパ

ク質の発現調節と分布が、そのタンパク質の性質に関係して流動性をもつことに注意しておかねばならない。例えば、収縮装置の基本要素であるミオシンやアクチンなどは、筋線維上の全ての筋核が発現調節を担っており、線維全体に分布している。一方で、神経筋接合部の後シナプス膜に局在するタンパク質であるアセチルコリンレセプターは、筋線維全体ではなく運動神経終板付近に密集しており、運動神経終板付近に局在している筋核のみがアセチルコリンレセプターの発現調節を担っていると考えられている<sup>6)</sup>。上記のようなタンパク質の特性に加えてmRNAの半減期を考慮すると、実在する筋線維サイズを維持するためにすべての転写産物が線維内を長距離移動するとは考えにくい<sup>7)</sup>。実際に、mRNAは起源となる核の周辺でその機能を果たしており<sup>8,9)</sup>、各筋核が周囲の細胞質を制御するために、ある空間的制限をもつとするMND説が一般的に支持されている。

### 筋核ドメインサイズと収縮・代謝特性

通常の生理学的条件下では、筋線維あたりの筋核数が

実験動物<sup>10-13)</sup>でもヒト<sup>14,15)</sup>でも線維サイズに正比例することが知られており, このこともMND説が支持される理由の一つである. しかし, 遅筋, 速筋といった収縮特性の違いや動物の種類に応じたMNDサイズの変動性が存在することが知られている.

骨格筋の分類は, 収縮速度によるものや特に有酸素性酵素活性を考慮したものなど数種類の方法によって決定することができるが, 中でもミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MHC) 分子種の同定は骨格筋線維の収縮特性を決定付ける上で最も重要である. BrookeとKaiser<sup>16)</sup>がmyofibrillar ATPase (mATPase) 染色法を確立して以来, 筋線維はそのpH感受性の違いによりType I, IIA, IIBの3種類に分類されてきた. さらに1980年代には, 免疫組織化学染色法や電気泳動法の発達により筋線維中のMHC分子種の分類が可能となり, ラットなどの小動物の骨格筋にはMHC-I, -IIa, -IIx, -IIbの4種類のMHC分子種が発現しており, mATPase染色法で分類される3種類の線維はそれぞれType IがMHC-I, Type IIAがMHC-IIa, Type IIBがMHC-IIxまたは-IIbを発現する線維であることが明らかになった<sup>17,18)</sup>. その後の研究により, イヌなどの中型動物<sup>19)</sup>やヒト, ウマなどの大型動物<sup>20,21)</sup>の筋は, 主にMHC-I, -IIa, -IIxの3種類のタイプで構成され, MHC-IIbはほとんど含まれないことが証明されている.

一般的に平均MNDサイズは, 動物の種類に関わらずType IからIIA, IIXまたはIIBの順に大きくなる<sup>10,13,22)</sup>. この違いの理由の一つとして, Type I線維 (遅筋) とType II線維 (速筋) のタンパク質合成効率の違いが挙げられる. ラットの後肢筋において, 大部分がType I線維で構成されるヒラメ筋は, Type II線維割合の高い足底筋や前脛骨筋と比較して, 筋湿重量あたりの総RNA量やタンパク質合成効率が高いことは古くから知られている<sup>23,24)</sup>. 近年, van Wesselら<sup>25)</sup>は, Type II線維割合の高い長指伸筋と比較してヒラメ筋において, 筋組織1 mgあたりの総RNA量および18S rRNA,  $\alpha$ -アクチンmRNA発現量が約2倍高いことを証明し, Type I線維割合の高い筋のタンパク質合成容量がType II線維割合が高い筋よりも大きい可能性を示唆した. 彼らは, 線維タイプ特異的 $\alpha$ -アクチンレベルは不明だが, 遅筋の総RNA量の高さから実質的にMHC mRNA含有量も高いと推察している. さらに, ヒラメ筋のほうが長指伸筋よりもmuscle atrophy F-box (MAFbx/ atrogin-1) やmuscle ring finger (MuRF) などの筋特異的ユビキチンリガーゼのmRNA発現量が約2倍高いことも証明しており, すなわち遅筋線維においてはタンパク質分解速度も高いことを示唆した<sup>25)</sup>. またSeeneら<sup>26)</sup>は, ラットの足底筋においてMHCタンパク質合成速度がI : IIA : IIX : IIB = 100 : 98 : 82 : 60 (%) となることを報告した.

これらの結果から, 筋線維タイプの違いに基づくタンパク質合成効率の違いがMNDサイズに影響を与えている可能性が示唆されている.

また, MNDサイズは筋線維のミトコンドリア含有量と関連することも示唆されている. ミトコンドリアが独自のDNAをもつことは良く知られているが, ミトコンドリアDNAがコードするタンパク質はわずか13種類であり, 筋核が残りのミトコンドリアタンパク質を制御しているので, ミトコンドリア含有量と筋核数に相関関係があることは十分に予想される. 確かに, げっ歯類の筋を用いた先行研究では, 特にType II線維においてMNDサイズがミトコンドリア含有量に反比例することが証明されている<sup>27)</sup>. 彼らの研究において, 全筋の収縮特性が異なる筋 (遅筋であるヒラメ筋と速筋である足底筋) に存在する同タイプの線維の特徴を比較したとき, ヒラメ筋にわずかに存在するType II線維は足底筋のType II線維よりも高いミトコンドリア含有量と小さな平均MNDサイズをもち, 一方でType I線維はヒラメ筋でも足底筋でも同様のMNDサイズをもっていた<sup>27)</sup>. 最新の研究でも, 腓腹筋の深層部 (酸化系優位) 領域にあるType II線維が表層部 (解糖系優位) 領域にあるType II線維よりも小さなMNDサイズをもつことが報告されている<sup>28)</sup>. これらの結果は, 特にType II線維において, MNDサイズが筋線維内で調節されるタンパク質 (MHC) の量と種類だけでなく, ミトコンドリア量にも関連していることを示唆している.

### 筋核ドメインサイズと動物種

タンパク質のターンオーバー速度と筋核密度の関係は, 主にげっ歯類の筋において報告されてきたが, 近年異なる動物種間において興味深い知見が報告されている. Liuら<sup>13)</sup>は, マウスからサイまで体重が10万倍異なる動物およびヒトの後肢または下肢筋において, 線維タイプ別のMNDサイズを比較した (Fig. 1). その結果, いずれの動物においてもType IまたはIIA線維のMNDサイズが最も小さく, 収縮速度の速い線維ほどMNDサイズが大きくなっていった. げっ歯類のType I, IIA線維におけるMNDサイズの逆転現象は, このような小動物のType IIA線維がしばしばType I線維よりも高いミトコンドリア酵素活性を持つことに起因すると解釈されている<sup>29)</sup>. さらにLiuらの研究は, Type I, IIA線維のMNDサイズが体重と有意な正の相関 (Type I :  $r=0.84$ ,  $P<0.001$ , Type IIA :  $r=0.91$ ,  $P<0.01$ ) を示すことを証明した<sup>13)</sup>. このことは, 体格の大きな動物ほど骨格筋の酸化系酵素活性が低い<sup>30)</sup>, MNDサイズが大動物ほど大きくなっていると解釈される. しかし, 彼らの研究ではヒトや動物の間で異なる種類の筋が使用されていることに留意しなければならない. 上述のとおり, 同じ動物

の異なる筋では筋線維組成や代謝特性の違いに応じてMNDサイズが大きく異なることがたびたび報告されているが、調査された筋の種類は後肢筋や横隔膜<sup>31-33</sup>)などに限られている。そこで我々は、MNDサイズに関する研究報告がほとんどない大型動物(サラブレッド)の全身の骨格筋において、機能特性の異なる筋の筋線維特性と単一筋線維のMNDサイズ(Fig. 2)の関係を調査した<sup>34</sup>。

3頭のサラブレッド(4.0±0.8歳, 478±12kg)の安楽死後に全身から20種類の筋を摘出し、筋線維組成、酸化(コハク酸脱水素酵素succinic dehydrogenase; SDH)・解糖(ホスホフルクトキナーゼ)系酵素活性および単一筋線維のMNDサイズを測定した。先行研究において、サラブレッドの骨格筋が全身的にType IIA線維を多くもち、

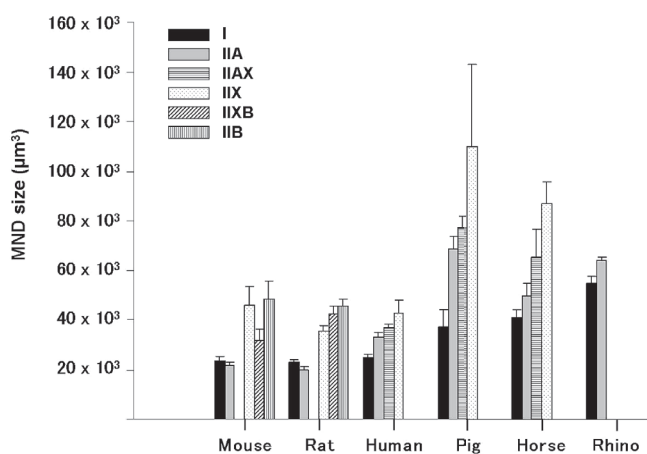


Fig. 1 Myonuclear domain (MND) size (in  $\mu\text{m}^3$ ) in muscle fibers expressing type I, IIA, IIAx, IIX, IIXB and IIB myosin heavy chain (MHC) isoforms from species with a body mass ranging from 25g to 2500kg (partial change)<sup>13</sup>. These samples were taken from the *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) in C57BL/6J mouse (6-month old), the *soleus*, *gastrocnemius* (GN) and EDL in Sprague-Dawley rat (6-month old), the *vastus lateralis* (VL) in human (21-year old), the *soleus* and *gluteus* in Swedish Landrace pig (4-year old), the *gluteus medius* and EDL in Quarter horse (1-year old) and hamstrings muscle group in the white rhinoceros (26-year old). Values are means + standard deviations.

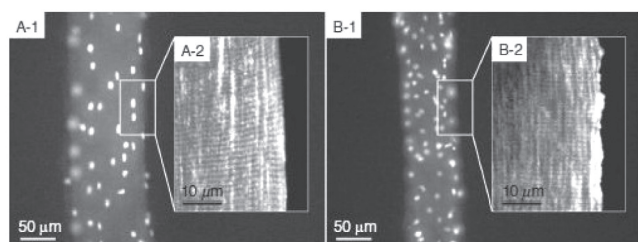


Fig. 2 Typical single fibre isolated from *gluteus medius* (A, contained rich type IIX fibre) and *masseter* (B, mainly consisted of type I fibre) muscles in Thoroughbred horse<sup>34</sup>. A-1 and B-1 are single fibre myonuclei visualised by DAPI, and A-2 and B-2 present a part of a fiber sarcomere stained by the membrane-specific dye.

後肢筋群は最もType II線維が多く解糖系酵素活性が優れ、前肢前腕部や横隔膜ではType I線維が多く酸化系酵素活性に優れていることを報告している<sup>35</sup>。サラブレッド骨格筋の平均MNDサイズは $47.9 \pm 11.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ であり、Liuら<sup>13</sup>)の結果にほぼ一致した。全身の筋線維組成および酵素活性の機能的差異<sup>35</sup>)に関わらず、個々の筋のMNDサイズは身体の部位別による差はなく、加えてMNDサイズとType I線維割合の間には有意な相関が見られたが、ミトコンドリア酵素であるSDH活性との間には見られなかった(Fig. 3)。Tsengら<sup>27</sup>)やLiuら<sup>13</sup>)の研究と異なり、我々の結果は単一筋線維レベルでの線維タイプおよび酵素活性を同定していない。そこで、Kawaiら<sup>34,35</sup>)と全く同じ実験手法によりラットの全身の骨格筋を調査した。その結果、ラットではヒラメ筋と横隔膜以外の全ての筋でType IIX/b線維が60%以上を占め、代謝特性も解糖系に大きく偏っていた<sup>36</sup>)。ラットの平均MNDサイズは $21.0 \pm 3.6 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ であり、Type I線維割合( $r = -0.46, P < 0.05$ )とSDH活性( $r = -0.62, P < 0.05$ )の両方で有意な相関が認められ、Tsengら<sup>27</sup>)と同様の結果が得られた。サラブレッドにおけるMNDサイズとSDH活性との相関関係が認められない理由は不

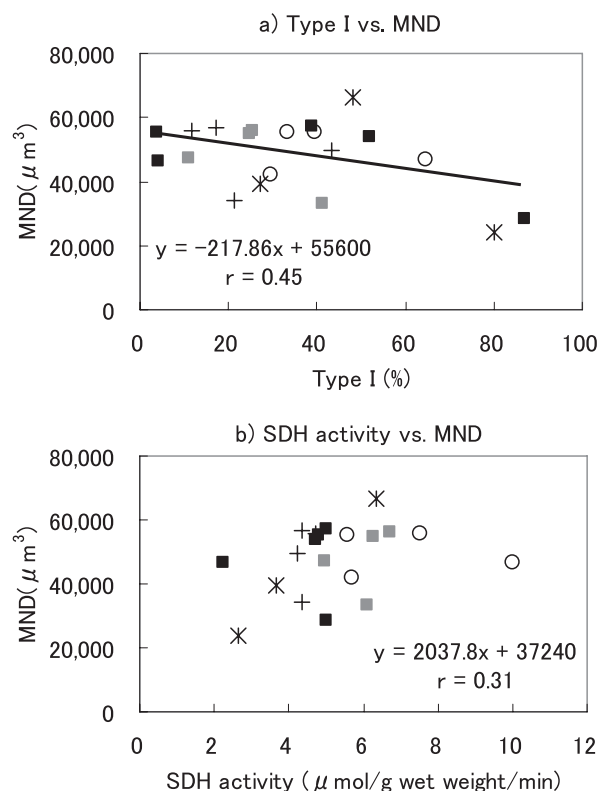


Fig. 3 Relationship between single fibre myonuclear domain (MND) sizes and muscle properties (partial change)<sup>34</sup>. The MND sizes plotted for the percentage of type I (a) and succinic dehydrogenase (SDH) activity (b). The symbols present each site of the body as follows; ■: hindlimb, ■: thoracic and trunk, +: forelimb, ×: head and neck, ○: respiratory-related.

明であるが、競走用動物として日々トレーニングを積んでいることによる筋線維タイプ特異的な酸化酵素活性の変動<sup>37,38)</sup>に起因しているのかもしれない。これらの結果は、MHC分子種などの筋線維内タンパク質がMNDサイズに大きな影響を与える一方で、ミトコンドリア酵素のような環境依存的に変動するタンパク質にも大きく影響を受けるとする概念をさらに支持するものである。

我々の研究室で分析したラットとサラブレッドで共通する20種類の骨格筋において、両方の動物は共にヒラメ筋が最も高いType I線維割合(80%以上)と平均値に対して有意に小さいMNDサイズを示した。しかし、ラットのヒラメ筋が他の20筋と比較して最も多い筋核数(線維長1 mmあたり $163 \pm 10$ 個)と平均的な線維横断面積( $2108 \pm 99 \mu\text{m}^2$ )を示したのに対し、サラブレッドのヒラメ筋は他の20筋と比較して最も少ない筋核数(線維長1 mmあたり $36 \pm 8$ 個)と最も小さい線維横断面積( $921 \pm 340 \mu\text{m}^2$ )を示した<sup>34,36)</sup>。同じ特徴を示したヒラメ筋におけるこのようなデータの相違は、ラットとサラブレッドにおけるヒラメ筋の機能特性の違いが関与している可能性が考えられる。ヒラメ筋は小型、中型動物<sup>4,17,39,40)</sup>からヒト<sup>41)</sup>を含めた多くの動物で典型的な姿勢維持筋であり、その組成の大部分をType I線維が占めていることは良く知られている<sup>42)</sup>。しかし、サラブレッドのヒラメ筋は筋力を発揮するには筋全体の体積が非常に小さく(馬体重500kgに対して7g程度)、その収縮装置としての機能は疑問視されている<sup>43)</sup>。このような機能的差異が、異なる動物種における同じ筋の筋核数と線維横断面積の違いに影響を与えていると考えられる。骨格筋の生来の機能特性とMNDサイズの関係性を明らかにするために、さらなる研究が期待される。

通常の骨格筋において、MNDは一定に保たれていることが基本的な概念である。しかしMNDサイズはMHC分子種や動物の種類に応じて変動性を示し、個々の筋核は細胞質体積を調節する能力をもっているのが妥当である。それでは、成長期やトレーニングによって生じる筋肥大、あるいは加齢による筋萎縮などの条件下において、MNDサイズの逸脱は起こるのだろうか。

#### サテライトセルの機能と刺激応答

一般的に、成長期における筋の成長や筋損傷からの回復、運動・機能的負荷による刺激を受けたときの筋肥大時には、筋の体積および線維サイズの増加に付随して筋核の増加が起こると考えられている。筋核自身は有糸分裂活性を持たないため、サテライトセルが一定のMNDサイズを維持するために新たな筋核を供給していると推測されている。

サテライトセルは基底膜と細胞膜の間に局在する筋特異的幹細胞であり<sup>44)</sup>、通常の成熟した筋では休止状態に

ある。しかし、運動や損傷などの刺激を受けると活性化され、その後の増殖・分化段階を経て既存の筋線維に新たな筋核として融合する<sup>45)</sup>。この一連の過程において、サテライトセルは休止状態から最終分化まで転写因子であるPaired Box (Pax) ファミリーメンバーのPax7を発現している<sup>46)</sup>。ひとたび活性化されると、筋原性調節因子であるmyogenic differentiation 1 (MyoD)が増加し、細胞は分裂を開始する。増殖段階において、筋原性調節因子の発現はMyoDからサテライトセルの分化に必須であるとされるmyogeninにシフトする。筋線維に融合する際には、サテライトセル核が既存の筋線維に筋核として提供されるが、全ての活性化したサテライトセルが筋核に分化するわけではない。増殖後、いくつかのサテライトセルは分化プロセスから逸脱し、MyoDのダウンレギュレーションを経て休止段階へと戻り、その後の適応のためにサテライトセルプールを維持する<sup>47)</sup>。

運動や損傷に対するサテライトセルの刺激応答には、Pax7や筋原性調節因子のほかにも多くのファクターが関与していることが徐々に明らかとなっている。多機能性サイトカインであり、運動刺激に応答して筋中で産生されるインターロイキン-6<sup>48,49)</sup>は、ラットにおける代償性筋肥大モデル<sup>50)</sup>やヒトの抵抗性運動<sup>51)</sup>においてサテライトセルの増殖を開始させることが示唆されている。また、肝細胞成長因子やインスリン様成長因子-Iなどの成長因子は筋肥大のシグナル因子としてよく知られているが、サテライトセルの活性化と増殖にも密接に関連していることがin vivo, in vitroの両方で証明されている<sup>52-56)</sup>。

#### MNDサイズの最高限度説

骨格筋肥大において、新たな筋核の付加、つまりMNDサイズの維持が要求されるのかという点は議論的となっている。多くの研究において、実験動物<sup>4,10,28,57,58)</sup>でもヒト<sup>59)</sup>でも筋肥大時にMNDサイズが一定に保たれていることが報告されている。筋線維肥大に対する筋核付加の重要性は、サテライトセルを含めた様々な細胞タイプで有糸分裂活性を破壊するガンマ線照射後では過負荷による筋肥大が起こらない<sup>58,60)</sup>とする結果によって支持されている。しかし、ある程度までの肥大ならば、筋核数の変化の有る無しに関わらず可能であるとする証拠も数多く存在する<sup>28,59,61,62)</sup>。例えば成長期のラットの横隔膜において、生後14日から24日の間に全ての筋線維タイプでMNDサイズが有意に増加することが証明されている<sup>32)</sup>。彼らの先行研究において、成体ラット(体重~300g)のMNDサイズは生後24日のラットよりもさらに大きかった<sup>31)</sup>。我々も、ラットの成熟成長におけるMNDサイズの増大を報告している<sup>33)</sup>。

このような筋核数の増加を伴わずに線維サイズの増大が起こる現象は、筋核が常時working flat out(全力稼動)

状態にあるわけではなく、ある程度までの肥大ならば既存の筋核で補うことができるとするMNDサイズの最高限度説として提唱されている<sup>59</sup>。刺激に対して生じる筋肥大において、筋核数の経時的変化を考慮したときにもMNDサイズの最高限度説を支持するいくつかの報告が存在する。van der Meerら<sup>28</sup>)は、ラット足底筋において、過負荷の2週間後に筋核数の増加なしに筋肥大が起こり、結果として筋核ドメインサイズが増加することを証明した。また、彼らの研究において、さらに2週間（合計で4週間）の過負荷をかけたときには、筋肥大に付随して筋核数の増加が起こり、過負荷2週間後までに増大したMNDサイズが維持されたままさらなる筋肥大が引き起こされた。他の研究では、サテライトセルが除去されたマウスにおいて、わずか2週間の過負荷後に筋サイズが2倍に増加したとする報告もある<sup>63</sup>。これらの結果は、ある程度までの肥大ならば筋核供給なしに起こるとするMNDサイズの最高限度説を暗示している。

これらの多くの研究において、特に運動刺激に対するサテライトセルの応答性と筋核数の増加、筋線維サイズの増大の間に時間的な不一致が存在することを留意しなければならない。サテライトセルの動態に重点を置いた研究は、一過性刺激または短期間の研究が多い。in vitro またはin vivo、動物の種類、刺激プロトコル、分析された筋の種類など実験内容が大きく異なるとはいえ、これらの研究においてサテライトセルの活性化および増殖は刺激の1~7日後に起こるが筋核数や線維サイズには言及していない、あるいは変化が起こっていない<sup>33,47,50-52,54,56</sup>。一方で、筋線維の肥大に重点を置いた研究は、成長期の数週間、あるいは慢性刺激やトレーニングなど2週間から十数週間におよぶ長期的な実験において比較されている<sup>4,10,28,57-60</sup>。しかし、新たな筋核の付加によって筋線維の成長が長期間維持される必要がある条件下では、筋核の増加に先んじて線維サイズの増加が起こる、すなわちMNDサイズの増大が起こるとするMNDサイズの最高限度の概念は確かに存在しているようである。

#### 萎縮とMNDサイズ -muscle memory-

MND説が筋萎縮にも適用されるならば、筋線維は萎縮に比例して筋核を失うことになる。他の細胞と同様に、筋核もアポトーシス過程によって消失することが知られている<sup>64</sup>。通常の生理学的条件下では筋核のアポトーシスが起こることは非常に稀であるが<sup>65,66</sup>、様々な萎縮刺激後にはproアポトーシス因子の発現とアポトーシス筋核数の増加が起こることが示唆されている<sup>64,66,67</sup>。しかし、萎縮条件下での筋核アポトーシスは起こっていないとする最近の研究も存在し<sup>68</sup>、筋核数と実際の線維サイズの減少量の間には、前章で述べた筋の成長・肥大とMNDサイズの関係と同様に多くの疑問が存在する。

無重力や脱神経などの筋萎縮を誘発する条件下では、MNDサイズが減少することを証明した研究報告が数多く存在する。例えば、11日間の宇宙飛行の後、5人の宇宙飛行士のうち2人の外側広筋のType II線維において線維長1mmあたり18%の筋核が失われていた一方で、線維サイズの減少は47%にも達していた<sup>69</sup>。他の研究においても、有意な筋核数の減少は起こるが線維サイズの萎縮の方が大きいため、結果的にMNDサイズの減少が生じたとする報告<sup>70</sup>や、萎縮に対して筋核数の変化は起こらなかったとする報告がされている<sup>32,68,71-74</sup>。このような結果に対し、Bruusgaardら<sup>68</sup>)はラット後肢懸垂モデルにおいて、確かに萎縮に伴うアポトーシス核の顕著な増加が引き起こされたが、そのアポトーシスは主に間質細胞で生じており、筋核はアポトーシスから保護されていることを証明した。さらに彼らは、後肢懸垂後の再負荷によって、筋核数の変化なしに線維サイズが筋萎縮誘導前のレベルまで回復することも証明した<sup>68</sup>。マウスの筋においても、2週間の筋肥大刺激によって新たに獲得された筋核は、その後の2週間の脱神経により不活動状態を誘導しても失われることがないことが証明されている<sup>75</sup> (Fig. 4)。さらに彼らの研究では、同様の筋肥大モデルにおいて3ヶ月間の脱神経による筋萎縮を誘導したときでも、筋核数は減少しないことを報告している<sup>75</sup>。このことは、筋萎縮過程を経ても長期間生存している筋

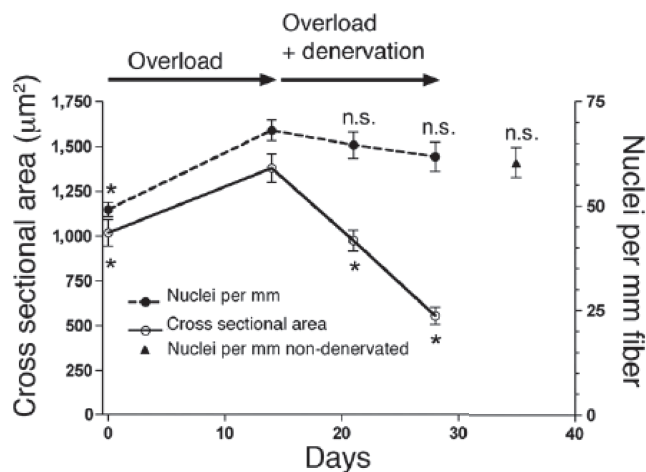


Fig. 4 Effect of denervation on overload muscle studied in vivo<sup>74</sup>. In female mice, approximately two thirds of the distal end of the *tibialis anterior* muscle was excised to overload the *extensor digitorum longus*. After 14 days, denervation was performed by surgically exposing the sciatic nerve in the thigh and then removing a 1-cm-long section of the nerve or by reflecting the nerve and suturing it under skin to prevent reinnervation. Quantification of nuclei per millimeter of fiber length and cross sectional area (CSA) of single fibers after denervation of hypertrophied muscle. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM (n = 23-35 fibers from six to eight animals). Muscles were synergistablated and not denervated for 35 days ( $\blacktriangle$ ). \*Statistical significance difference ( $P < 0.05$ ). n.s., Nonsignificant difference from 14 days of overload.

核が以前のサイズに関する情報である muscle memory を形成しており, 元々もっていた最大サイズ, つまり最高限度以上に線維サイズを成長させるときにのみ筋核の増加が必要となることを示唆している. 筋萎縮の初期段階で観察されるRNAやリボソーム濃度の増加<sup>28)</sup>や高い毛細血管密度<sup>73)</sup>も, タンパク質が急激に分解されていく一方で, 後に想定される筋体積の回復に必要となる機構や構造がいくらかは保持されたとする muscle memory の概念に一致する.

### 加齢筋のMNDサイズ

加齢による筋の弱体化はサルコペニアと呼ばれ<sup>76)</sup>, 筋線維レベルでは, 特にType II線維における筋線維の損失と線維萎縮の両方が引き起こされる<sup>77)</sup>. MND説が加齢筋にも適用されるならば, 筋核数は加齢に伴う萎縮に比例して減少するはずである. しかし, MNDサイズへの加齢効果を研究した報告には矛盾が生じている. 2つの研究<sup>12,78)</sup>は, 高齢マウスにおいて単位線維長あたりの筋核数が減少することを報告しているが, 一方で加齢による筋核数の減少は起こらない<sup>59,79)</sup>, あるいはむしろ増加する<sup>28,73,80,81)</sup>とする報告も存在する. また, 筋核数の変化が起こらないとした研究では線維サイズの変化も起こっていないか, 非常に小さな変化に留まった. van der Meerら<sup>73)</sup>の研究においては, ラットの腓腹筋における加齢による線維本数の損失が, 残りの筋線維の線維サイズの増加と付随した筋核数の増加によって代償されており, このためにMNDサイズは維持されたと解釈されている<sup>73)</sup>.

これらの矛盾した結果の一因として, 実験に用いられたサンプルが筋萎縮を呈するような本当に高齢の被験者または実験動物のものではなかったことが挙げられる. ヒトにおけるサルコペニアの顕著な症状は一般的に70歳を過ぎてから起こるが<sup>76)</sup>, 多くの研究で適用されている高齢被験者の平均年齢は70歳を下回っており<sup>59,79)</sup>, ラットにおける実験でも同様である. 超高齢のラット(32ヶ月齢)の筋では, MNDサイズの減少が報告されている<sup>82)</sup>. 加えて, 加齢による萎縮に従って筋核密度が増加したにも関わらず, 本来MND説に従って互いに均等な距離を保っていると考えられる筋核の分布が不均質性を示すことが証明されている<sup>78)</sup>. Bruusgaardら<sup>78)</sup>は, 高齢個体における筋核分布の不均質性は筋核の形状および周辺の微小管構造の変化が要因であり, 加齢に伴い筋核の質が低下している可能性を指摘している.

### 加齢筋のサテライトセル

加齢による筋核自身の機能低下の可能性に加えて, 加齢筋におけるサテライトセル数の減少, あるいはサテライトセルの能力低下が示唆されている. これまでにラッ

トやマウスにおいて加齢筋でのサテライトセル数の減少が報告されており<sup>12,61,83,84)</sup>, さらにこのサテライトセル数の減少が速筋でより顕著であるとする報告も存在する<sup>85)</sup>. しかし, 加齢筋におけるMNDサイズの矛盾と同様に, サテライトセル数は変化しないとする研究も多く存在する<sup>86)</sup>.

加齢に伴うサテライトセルの変化を観察した研究の多くが, ヒトの下肢または動物の後肢を対象としていることに留意しなければならない. 加齢による社会活動性や体力の低下などに由来する筋の活動量, 活動時間の低下<sup>87-89)</sup>がMNDサイズやサテライトセルに与える影響は無視できず, そのことが多くの研究における矛盾した結果を生み出していると考えられる. そこで我々は, ラットの横隔膜を対象として, 加齢に伴う免疫組織化学的な筋線維特性とサテライトセルの変化, およびサテライトセルの刺激応答の変化を調査した<sup>33)</sup>. ラットの横隔膜は, 全てのMHC分子種が均等に含まれており, 後肢の筋とは異なり呼吸活動のために年齢に関わらず常時活動し続けている. 加えて, この研究で用いた横隔膜の片側脱神経による代償性過負荷モデルは, 片側横隔膜に約50%の筋電図積分値の増大を起こすことが明らかにされている<sup>90)</sup>. 2, 14, 24ヶ月齢の月齢グループにおいて, 筋線維組成は全く変化しておらず, 線維横断面積は2ヶ月齢と比較して14, 24ヶ月齢のラットの方が有意に大きかった. ところが, 筋核数は24ヶ月齢の横隔膜において有意に減少しており, 結果としてMNDサイズは増加していた. 本研究で使用した24ヶ月という月齢は超高齢ではない. しかし, 下肢や後肢の筋と比較して加齢に伴う活動量の低下が少ないと考えられる横隔膜でMNDサイズの拡大が見られたことは, 筋活動量の影響を一定にした場合には加齢に伴う筋核数の減少が筋体積の減少に先んじて起こることを示す. つまり, 筋核数の減少がサルコペニアを進行させる一つの要因であり, その後のさらなる加齢に伴い筋体積の減少が起こることを示唆しているのかもしれない.

サテライトセル数に関しては, 線維タイプあたりの数に年齢グループ間の差は見られなかった (Fig. 5A). 6日間の代償性過負荷後に, 2, 14ヶ月齢のラットではType IIx/b線維のサテライトセル数が有意に増加していたが, 24ヶ月齢ではサテライトセル数にわずかな増加傾向が見られただけであった (Fig. 5A). 加えて, Pax7 mRNA発現量も24ヶ月齢の横隔膜ではコントロールと代償性過負荷側の間に変化は起こらなかった (Fig. 5B). これらの結果をまとめると, 常時活動している筋では加齢に伴うサテライトセル数の減少は起こらないが, 活性化刺激に対するサテライトセルの応答が阻害されていると考えられる. 24ヶ月齢ラットの横隔膜においてMNDサイズの増大が見られたのは, このようなサテライトセ

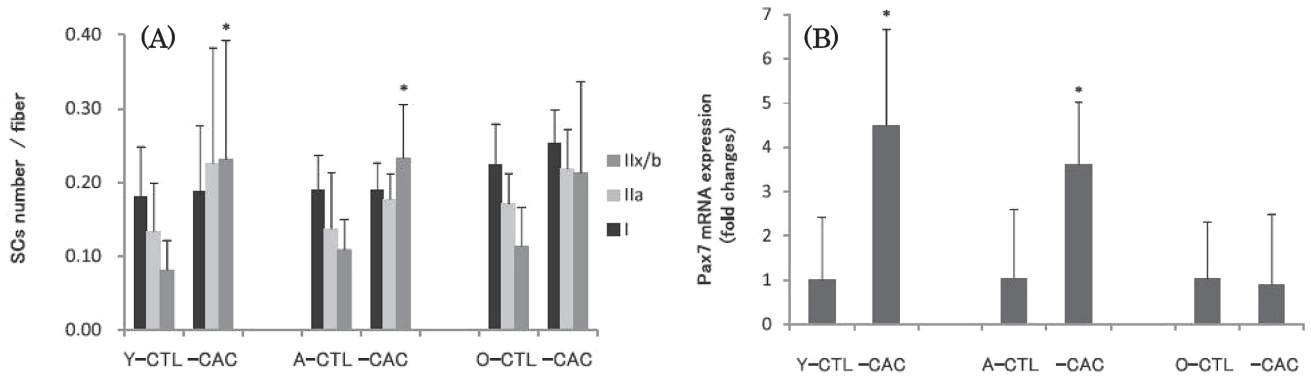


Fig. 5 Number of satellite cells (SCs) in each fiber type (A) and relative values of Pax7 mRNA expression (B) of rat *diaphragm* muscle (partial change)<sup>33)</sup>. The young (Y: 2-month), adult (A: 14-month), and old (O: 24-month) male Wistar rats were randomly divided into the sham-control (CTL) and compensatory activation for 6-day (CAC) groups (n = 7 for each group). In CAC groups, the left phrenic nerve was transected to induce compensatory activation at the right side of *diaphragm*. The relative values of Pax7 mRNA expression are expressed as fold change from the young CTL group. Values are means + standard deviations. \*Significantly different from the age-matched CTL ( $P < 0.05$ ).

ルの加齢に伴う機能障害によって筋核の供給が不完全となり、横隔膜の機能維持のために筋核の最大限度で線維体積が維持されていたと解釈することができる。

## 結 語

多核細胞である筋線維は、非常に大きな細胞質と多くの核をもち、各々の筋核はある一定の細胞質領域を維持し、筋核ドメイン (MND) と呼ばれる。長年、MNDサイズは筋細胞の恒常性を維持するため一定に保たれていると考えられてきた。しかし、MNDサイズは、MHC分子種の種類や代謝酵素の含有量の違い、体格や筋自体の大きさ、動物の種類など多くの要因に対して多様性を示し、成長、肥大、萎縮のような刺激に応答して可変的であることを多くの研究が証明してきた。特に、MNDサイズの最高限度説と筋核の muscle memory は、筋線維の優れた可塑性を説明する上で非常に興味深い。多くの要因が筋の適応変化におけるMNDサイズの意味を複雑化させているが、骨格筋の運動生理学的、病理学的変化を理解する上でより慎重に議論していく必要があるだろう。

## 謝 辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (21300251 および 23・8904) の助成を受けたものです。

## 引用文献

- Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 54: 1177-1191, 2006.
- Cheek DB. The control of cell mass and replication. The DNA unit - a personal 20-year study. *Early Hum Dev* 12: 211-239, 1985.
- Hall ZW, Ralston E. Nuclear domains in muscle cells. *Cell* 59: 771-772, 1989.
- Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 78: 1969-1976, 1995.
- Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22: 1350-1360, 1999.
- Merlie JP, Sanes JR. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature* 317: 66-68, 1985.
- Edgerton VR, Roy RR. Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J Biomech* 24: 123-133, 1991.
- Pavlati GK, Rich K, Webster SG, Blau HM. Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature* 337: 570-573, 1989.
- Ralston E, Hall ZW. Restricted distribution of mRNA produced from a single nucleus in hybrid myotubes. *J Cell Biol* 119: 1063-1068, 1992.
- Roy RR, Monke SR, Allen DL, Edgerton VR. Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J Appl Physiol* 87: 634-642, 1999.
- Bruusgaard JC, Liestol K, Ekmark M, Kollstad K, Gundersen K. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J Physiol* 551: 467-478, 2003.
- Brack AS, Bildsoe H, Hughes SM. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci* 118: 4813-4821, 2005.
- Liu JX, Höglund AS, Karlsson P, Lindblad J, Qaisar R, Aare S, Bengtsson E, Larsson L. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle fibres

- from mammals representing a 100,000-fold difference in body size. *Exp Physiol* 94: 117-129, 2009.
- 14) Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol* 111: 189-195, 1999.
  - 15) Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E154-164, 2002.
  - 16) Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23: 369-379, 1970.
  - 17) Bar A, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235: 153-155, 1988.
  - 18) Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 10: 197-205, 1989.
  - 19) Toniolo L, Maccatrozzo L, Patrino M, Pavan E, Caliaro F, Rossi R, Rinaldi C, Canepari M, Reggiani C, Mascarello F. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1915-1926, 2007.
  - 20) Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle: an immunohistochemical and electrophoretic study. *Anat Rec* 246: 185-194, 1996.
  - 21) Serrano AL, Pérez M, Lucía A, Chicharro JL, Quiroz-Rothe E, Rivero JL. Immunolabelling, histochemistry and in situ hybridisation in human skeletal muscle fibres to detect myosin heavy chain expression at the protein and mRNA level. *J Anat* 199: 329-337, 2001.
  - 22) Davey DF, Wong SY. Morphometric analysis of rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Aust J Exp Biol Med Sci* 58: 213-230, 1980.
  - 23) Goldberg AL. Protein synthesis in tonic and phasic skeletal muscles. *Nature* 216: 1219-1220, 1967.
  - 24) Lewis SE, Kelly FJ, Goldspink DF. Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem J* 217: 517-526, 1984.
  - 25) van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ, Jaspers RT. The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol* 110: 665-694, 2010.
  - 26) Seene T, Kaasik P, Alev K, Pehme A, Riso EM. Composition and turnover of contractile proteins in volume-overtrained skeletal muscle. *Int J Sports Med* 25: 438-445, 2004.
  - 27) Tseng BS, Kasper CE, Edgerton VR. Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers. *Cell Tissue Res* 275: 39-49, 1994.
  - 28) van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, Degens H. The time course of myonuclear accretion during hypertrophy in young adult and older rat plantaris muscle. *Ann Anat* 193: 56-63, 2011.
  - 29) Nemeth P, Pette D. Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. *J Physiol* 320: 73-80, 1981.
  - 30) Emmett B, Hochachka PW. Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respir Physiol* 45: 261-272, 1981.
  - 31) Aravamudan B, Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J Appl Physiol* 100: 1617-1622, 2006.
  - 32) Mantilla CB, Sill RV, Aravamudan B, Zhan WZ, Sieck GC. Developmental effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J Appl Physiol* 104: 787-794, 2008.
  - 33) Kawai M, Saitsu K, Yamashita H, Miyata H. Age-related changes in satellite cell proliferation by compensatory activation in rat diaphragm muscles. *Biomed Res* 33: 167-173, 2012.
  - 34) Kawai M, Kuwano A, Hiraga A, Miyata H. Relationships between myonuclear domain size and fibre properties in the muscles of Thoroughbred horses. *Equine Vet J Suppl* 38: 311-316, 2010.
  - 35) Kawai M, Minami Y, Sayama Y, Kuwano A, Hiraga A, Miyata H. Muscle fiber population and biochemical properties of whole body muscles in Thoroughbred horses. *Anat Rec* 292: 1663-1669, 2009.
  - 36) Miyata H, Kawai M. Comparative study of skeletal muscle fiber composition, Myonuclear domain, Satellite cell-. *Jpn J Physiol Anthropol* 15: 34-35, 2010.
  - 37) Miyata H, Sugiura T, Kai M, Hiraga A, Tokuriki M. Muscle adaptation of Thoroughbred racehorses trained on a flat or sloped track. *Am J Vet Res* 60: 1536-1539, 1999.
  - 38) Yamano S, Eto D, Kasashima Y, Hiraga A, Sugiura T, Miyata H. Evaluation of developmental changes in the coexpression of myosin heavy chains and metabolic properties of equine skeletal muscle fibers. *Am J Vet Res* 66: 401-405, 2005.
  - 39) Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem* 21: 51-55, 1973.
  - 40) Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol* 81: 145-151, 1996.
  - 41) Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Nonaka I, Yoshioka T, Yamashita-Goto K, Shenkman BS, Kozlovskaya IB, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *J Appl Physiol* 87: 1776-1785, 1999.
  - 42) Hodgson JA, Roy RR, Higuchi N, Monti RJ, Zhong H, Grossman E, Edgerton VR. Does daily activity level determine muscle phenotype? *J Exp Biol* 208: 3761-3770, 2005.



- 43) Meyers RA, Hermanson JW. Horse soleus muscle: postural sensor or vestigial structure? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288: 1068–1076, 2006.
- 44) Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493–495, 1961.
- 45) Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 84: 209–238, 2004.
- 46) Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med* 14: 82–91, 2008.
- 47) Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166: 347–357, 2004.
- 48) Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23: 1–21, 2005.
- 49) Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379–1406, 2008.
- 50) Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 7: 33–44, 2008.
- 51) McKay BR, De Lisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G. Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PLoS ONE* 24: e6027, 2009.
- 52) Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 272: 6653–6662, 1997.
- 53) Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* 13: 2909–2918, 2002.
- 54) Ates K., Yang SY, Orrell RW, Sinanan AC, Simons P, Solomon A, Beech S, Goldspink G, Lewis MP. The IGF-I splice variant MGF increases progenitor cells in ALS, dystrophic, and normal muscle. *FEBS Lett* 581: 2727–2732, 2007.
- 55) McKay BR, Toth KG, Tarnopolsky MA, Parise G. Satellite cell number and cell cycle kinetics in response to acute myotrauma in humans: immunohistochemistry versus flow cytometry. *J Physiol* 588: 3307–3320, 2010.
- 56) Kawai M, Aida H, Hiraga A, Miyata H. Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 2013 in press.
- 57) Moss FP. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. *Am J Anat* 122: 555–563, 1968.
- 58) Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F, Baldwin KM. Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1182–1195, 2002.
- 59) Petrella JK, Kim JS, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E937–946, 2006.
- 60) Phelan JN, Gonyea WJ. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247: 179–188, 1997.
- 61) Snow MH. Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *Anat Rec* 227: 437–446, 1990.
- 62) Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558: 1005–1012, 2004.
- 63) McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zant G, Campbell KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* 138: 3657–3666, 2011.
- 64) Marzetti E, Hwang JC, Lees HA, Wohlgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, Bernabei R, Leeuwenburgh C. Mitochondrial death effectors: Relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta* 1800: 235–244, 2010.
- 65) Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, Gurlley CM, Peterson CA. Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. *Am J Physiol* 277: C589–597, 1999.
- 66) Adhihetty PJ, O'Leary MF, Chabi B, Wicks KL, Hood DA. Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 1143–1151, 2007.
- 67) Siu PM, Alway SE. Response and adaptation of skeletal muscle to denervation stress: the role of apoptosis in muscle loss. *Front Biosci* 14: 432–452, 2009.
- 68) Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, Dupre-Aucouturier S, Desplanches D, Gundersen K. No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *J Appl Physiol* 113: 290–296, 2012.
- 69) Day MK, Allen DL, Mohajerani L, Greenisen MC, Roy RR, Edgerton VR. Adaptations of human skeletal muscle fibers to spaceflight. *J Gravit Physiol* 2: P47–50, 1995.
- 70) Zhong H, Roy RR, Siengthai B, Edgerton VR. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 99: 1494–1499, 2005.
- 71) Kasper CE, Xun L. Cytoplasm-to-myonucleus ratios in plantaris and soleus muscle fibres following hindlimb suspension. *J Muscle Res Cell Motil* 17: 603–610, 1996.

- 72) Wada KI, Takahashi H, Katsuta S, Soya H. No decrease in myonuclear number after long-term denervation in mature mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C484-488, 2002.
- 73) van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, Degens H. Timecourse of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 43: 212-222, 2011.
- 74) Degens H, Kosar SN, Hopman MT, de Haan A. The time course of denervation-induced changes is similar in soleus muscles of adult and old rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 33: 299-308, 2008.
- 75) Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA, Gundersen K. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15111-15116, 2010.
- 76) Doherty TJ. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 95: 1717-1727, 2003.
- 77) Lexell J, Taylor CC, Sjostrom M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 84: 275-294, 1988.
- 78) Bruusgaard JC, Liestol K, Gundersen K. Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *J Appl Physiol* 100: 2024-2030, 2006.
- 79) Hikida RS, Walsh S, Barylski N, Campos G, Hagerman FC, Staron RS. Is hypertrophy limited in elderly muscle fibers? A comparison of elderly and young strength strength-trained men. *Basic Applied Myology* 8: 419-427, 1998.
- 80) Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* 29: 120-127, 2004.
- 81) Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, van Loon LJ. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E151-157, 2007.
- 82) Nnodim JO. Satellite cell numbers in senile rat levator ani muscle. *Mech Ageing Dev* 112: 99-111, 2000.
- 83) Schultz E, Lipton BH. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev* 20: 377-383, 1982.
- 84) Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE, Partridge TA. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells* 25: 885-894, 2007.
- 85) Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol* 294: 50-66, 2006.
- 86) Hikida RS. Aging changes in satellite cells and their functions. *Curr Aging Sci* 4: 279-297, 2011.
- 87) Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. Effects of intermittent feeding upon growth, activity, and lifespan in rats allowed voluntary exercise. *Exp Aging Res* 9: 203-209, 1983.
- 88) Ingram DK. Toward the behavioral assessment of biological aging in the laboratory mouse: concepts, terminology, and objectives. *Exp Aging Res* 9: 225-238, 1983.
- 89) Jänicke B, Coper D, Jänicke UA. Motor activity of different-aged Cercopithecidae: silvered-leaf monkey (*Presbytis cristatus* Esch.), lion-tailed monkey (*Macaca silenus* L.), moor macaque (*Macaca maura* Cuv.) as observed in the Zoological Garden, Berlin (West). *Gerontology* 32: 133-140, 1986.
- 90) Miyata H, Wada Y. Electrophysiological properties of compensatory activated phrenic motoneurons in rats. *Adv Exerc Sport Physiol* 10: 49-53, 2004.