

原 著

機能的筋肉移植術におけるMyoDの発現

坂本相哲
(指導：河合伸也教授)

山口大学医学部高次統御系・整形外科学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 筋肉移植, 再神経支配, 筋再生, MyoD, 衛星細胞

I. 緒 言

現在, 腕神経叢引き抜き損傷などの高度な神経損傷や, 外傷, 悪性腫瘍の広範切除例などで筋肉の機能を喪失した場合にはその機能を再建する目的で作動神経を含めた筋肉移植術が用いられており, 良好な成績が得られている。しかし, その筋肉は自家組織であるがゆえ採取できる筋肉量には必然的に限界があり, また諸家の報告によると獲得できる筋力は移植筋が本来有していたレベルにまで回復しないことも指摘されており, 筋肉移植術は完全な再建効果が発揮できていないのも事実である¹⁾。

この課題を解決するために, 様々な研究や工夫が行なわれてきている。再神経支配の促進や同種移植などもその一環であるが, 移植筋肉自体の操作に関する報告は未だ乏しい。移植筋自体の回復を促進することができれば, 前述した筋肉移植における課題を解決する一手段として実際に臨床応用できる可能性がある。

筋肉移植の術後回復過程において, 採取された筋肉は神経の切離を受け他部位に移植されるために, 脱神経された筋線維は急速に萎縮するがその後には生じる神経再支配によって再び肥大してくる。この際に筋肉組織は単に肥大するだけでなく, 筋線維の再生現象も混在していることが推測されている^{2, 3)}。そこでこの過程のメカニズムを分子生物学的に解析することにより, 移植筋の回復さらには再生を促進し移植筋が十分な筋力を獲得することができるので

はないかと着想した。

近年の一連の研究によって骨格筋の発生や生体での損傷筋の修復において, 筋細胞膜と基底膜の間に介在する単核の衛星細胞 (satellite cell) および筋分化制御遺伝子 (myogenic regulatory factor: MRFs) であるMyoD, myogenin, Myf-5, MRF4が重要な役割を果たしていることがわかってきた。生体骨格筋が傷害を受けるとsatellite cellが活性化し, その分化, 増殖が誘導され, 筋再生が行われる⁴⁾。しかし, 正常時ではsatellite cellは休止しており, いずれのMRFsの発現もみられない⁵⁾。このことから, MyoDの発現はsatellite cellが活動していることを意味するとともに, 筋肉に再生が生じていることを間接的に示唆していると考えられる。損傷筋, 脱神経筋におけるMRFsの発現の報告は散見されるが, 機能的筋肉移植術や神経再支配時におけるMRFsに関する報告は著者の渉猟した範囲では見当たらない。

本研究の目的は, 筋肉移植術の術後回復過程におけるMyoDの発現の経過について, ラットを用いた筋肉移植モデルを作成し, MyoD特異的プライマーを用いたReverse Transcription Polymerase Chain Reaction (以下RT-PCR) により分子生物学的に検討することである。

II. 対象と方法

機能的筋肉移植モデルとして, ラット腓腹筋を使用して同所性に移植モデルを作成し, 術後1, 3, 5日, 1-8週までの各週において移植筋を採取し

平成15年10月7日受理

	1日	3日	5日	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週
移植モデル	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
阻血モデル	1	1	1	1	1		1				
脱神経モデル	1	1	1		1	1	1				

表1 実験モデル一覧

た。各時期とも3匹ずつ作成した。

対照群として、阻血モデルは腓腹筋周囲の剥離と阻血のみを行い、術後1, 3, 5日, 2, 4週に腓腹筋を採取した。脱神経モデルは腓腹筋周囲の剥離と阻血を行い神経は切断したままとして、術後1, 3, 5日, 2, 3, 4週に腓腹筋を採取した。正常筋は5検体採取し、各々のモデルと比較した(表1)。

実験モデル術式

実験動物にはWistar系雄ラット、週齢9週、体重約300gを使用した。麻酔はケタミンとサイラジンの混合薬を筋注で投与した。腓腹筋内側頭を全周性に剥離し栄養動静脈のみを残した状態で挙上した。起始部と停止部の切離は腱性部で行った。微小血管静脈用クランプにて栄養血管の血行を遮断し、阻血時間は1時間に設定にした。脛骨神経は阻血前に切離し、阻血中に手術用顕微鏡下で縫合した。腓腹筋は緊張が切離前と同程度となるように注意し、起始部と停止部を縫合した。阻血モデル群は神経を温存したまま、1時間の阻血を行った。腓腹筋は全周性に剥離し移植モデルと同様に腱部で切離後、同所性に縫着した。脱神経モデル群は神経を切断したままとし、他の操作は移植モデルと同様に行った。いずれのモデル群も手術後は外固定を行わず、飼育ゲージのなかで自由に活動させた。

尚、本実験は山口大学医学部動物実験指針に沿って行われ、山口大学医学部動物実験委員会に承認されている。

評 価

1) 筋電図

コントロールとして正常ラット、実験モデルにおいて術後2, 4, 6週の時期に針筋電図を行い、神経再支配の確立時期を検討した。

2) 組織学的検討

移植筋の中央部から標本を採取し、組織学的評価を行った。ヘマトキシリン・エオジン染色(以下HE染色)を行い、筋組織の変化を評価した。

3) RT-PCR解析

術後、各時期において麻酔下で腓腹筋組織の中枢部を採取し、直ちに液体窒素で保存した。この組織から、TRIzol Reagent (ギブコBRL) を使用してtotal RNAを抽出した。5ugのRNAをReady-To-Go T-Primed First-Strand Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) を使用して1st strand cDNAを合成した。これをテンプレートとし、Ready-To-Go PCR Beads Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いてPCRを行った。使用した特異的プライマー、PCR温度設定はKastner等の論文⁶⁾より引用した。PCRの条件はMyoDにおいては熱変性94℃45秒、アニーリング65℃1分、伸展反応72℃2分を1 cycleとし、最終伸展反応を72℃10分で行った。MyoDプライマーのシークエンスは(5'-CAC ACT CCC CAC TAC GGT GC-3' and 5'-CAC TGT AGT AGG CGG CGT CGT AG-3')。PCRproductのサイズは506bp。PCRは33cycleで行った。内部標準遺伝子であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をコントロールとして使用した。GAPDHプライマーのシークエンスは(5'-CCT CTG GAA AGC TGT GGC GT-3' and 5'-TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT-3')。PCRproductのサイズは430bp。PCR設定はMyoDと同じであるが、cycle数は23で行った。増幅されたDNA断片を2%アガロースゲルで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色し、UVライト上での蛍光強度をDNA量として測定、評価した。増幅されたバンドをコンピューターに取り込み、その蛍光強度はフリーソフトウェアNIH-imageを用い、DNA量として定量した。各サンプル間での定量評価は、内部標準遺伝子であるGAPDHをコントロー

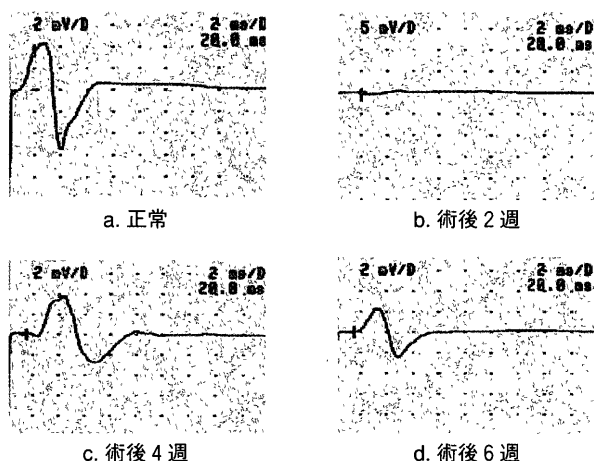


図1 筋電図所見

正常筋および術後2, 4, 6週モデルにおいて筋電図を行い、術後4週にてM波が確認された。

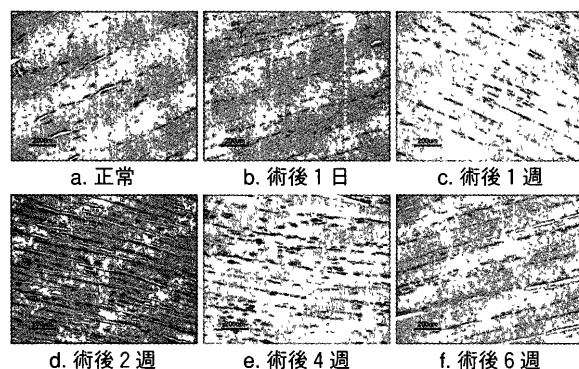


図2 移植モデル群における組織学的評価

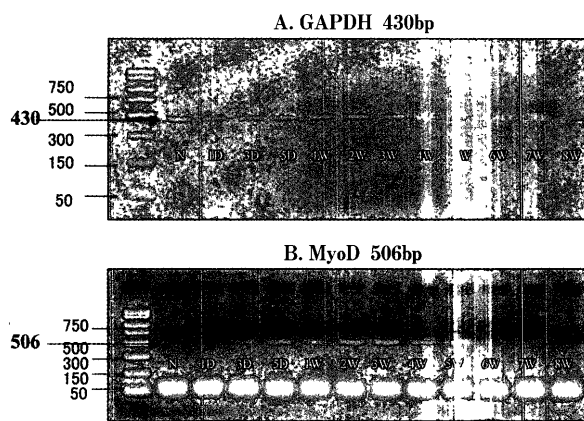
HE染色。術後3日からSatellite cellと思われる円型の核がみられ、4週ではその数が最大となっていた。術後2週で最も筋線維の横径が縮小している。以後明らかな横径の変化はないが6週では劇的にその横径が増大していた。

ルとし、このPCRproductの蛍光量が一定となるよう各サンプルの濃度を調節し、DNA量を統一した。その濃度でMyoDのRT-PCRを行い、各サンプルでMyoDの蛍光量をGAPDHの蛍光量で除し、得られた数値を比較することで、発現量を評価した。

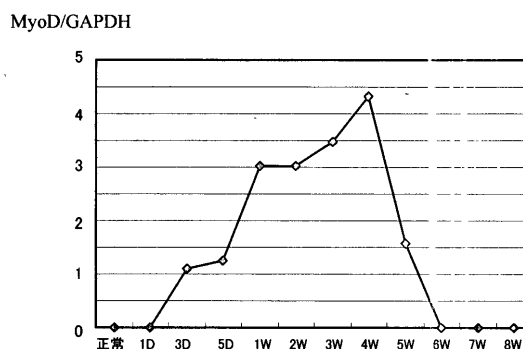
Ⅲ. 結 果

1. 筋電図

正常ラットと、術後2, 4, 6週モデルにおいて針筋電図を行った。2週ではM波は認められず、4週以降に出現していた。つまり、移植後2～4週の間、再神経支配が確立されていると推測された。移植筋の肉眼的観察では術後5～6週以降において萎縮が改善されていた(図1)。



A. 内部標準遺伝子であるGAPDH (A) によりサンプル間の濃度統一を行いMyoD (B) のRT-PCRを行った。GAPDH: 430bp, MyoD: 506bp (N: 正常筋 D: 日 W: 週)



B. NIHimage計測値をMyoD/GAPDHとして処理し発現量を比較した。術後3日目から軽微であるが発現があり、2～4週をピークに増加した後に減少し、6～7週以降では発現がみられなかった。

図3. 移植モデルでのRT-PCRによるMyoD発現の動向

2. 組織学的評価

各時期の筋肉組織の細胞学的評価では、術後2週時で最も筋線維の横径が縮小していた。以後5週まで明らかな横径の変化はみられなかったが、6週では劇的に横径が増大していた。術後3日目からsatellite cellと思われる類円形の核が出現し、以後4週までは徐々にその数が増加していた。再神経支配が確立された4週では、筋肉の萎縮が残存しているものの、類円形の核数は最も多かった。6週においてはその数が激減するとともに筋線維の横径が著しく増大していた(図2)。

3. RT-PCR解析

RT-PCR法にて術後経過におけるMyoDの発現量を比較した。正常筋ではMyoDの発現はみられなかった。筋肉移植群では術後3日目から軽微であるが

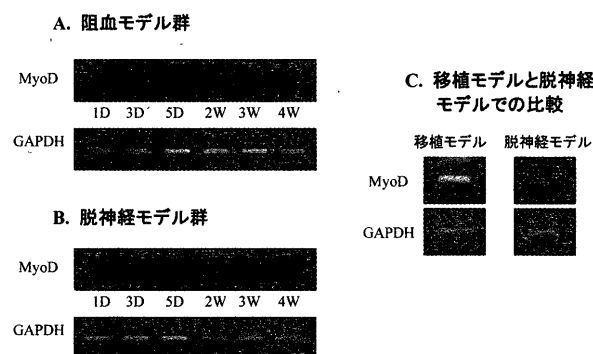


図4 阻血モデル, 脱神経モデルでのMyoDの発現および, 移植モデルと脱神経モデルとの3週時点での発現量の比較

- 阻血モデル群では術後3日～7日までの間にのみ発現がみられた。
- 脱神経モデル群では術後3日～3週まで継続して発現がみられた。
- 術後3週時点での発現量を脱神経群と筋肉移植群とで比較すると移植モデル群で高値を示した。

発現があり, 2～4週をピークに増加した後, それ以後は減少し6～7週以降では発現が消失した(図3A, B)。

一方, 阻血群では術後3～7日までの間にのみ発現がみられた(図4-A)。脱神経群では術後3日～3週まで継続して発現がみられた(図4-B)。

術後3週時点でのMyoD発現量を脱神経群と筋肉移植群とで比較した。発現量は移植モデル群において, 脱神経群に比べ1.5～3.2(平均2.2)倍と多かった(図4-C)。

IV. 考 察

筋肉移植術では, 筋組織は手術時の剥離操作による外傷, 血行再開までの阻血, 脱神経などの多数の侵襲が加わり, 筋萎縮や部分的壊死をきたす。さらに, その後に生じる神経再支配の過程では, 萎縮した筋組織が単に肥大するだけでなく, 移植筋の再生現象も同時に生じていると報告されている^{2, 3)}。

筋ジストロフィーや外傷性の筋損傷の分野では, これまでも骨格筋の再生に関して様々な研究がなされてきている。生体骨格筋に外傷, 壊死や阻血などの障害が生じるとsatellite cellが活性化され, 分裂, 増殖したのちに損傷部を修復し筋組織を再生することがわかってきた。このsatellite cellが分裂, 増殖する際に筋分化制御遺伝子(myogenic

regulatory factors: MRFs)であるMyoDが発現することから, 筋肉の再生過程において重要な役割を果たしていると考えられている⁴⁾。

本実験での移植モデル群, 阻血モデル群, 脱神経モデル群のいずれにおいても術後早期にMyoDの発現が確認でき, 筋損傷からMyoDが発現するという諸家の報告と一致する結果であった。また, Cornelisonら⁴⁾はPCR解析にて, 休止期のsatellite cellではMRFsの発現はみられないと報告しているのと同様, 今回の結果においても正常筋からMyoDは検出されなかった。

本実験では採取した筋組織全体からRNA抽出を行っているため, 結合組織由来の発現も同時に測定していることも危惧される。この点に関しては, Kastnerら⁶⁾はラット前脛骨筋から分離した筋線維と結合組織細胞とで別々に培養, MRFsのRT-PCR解析を行い, 結合組織細胞からはMRFsの発現がないことを確認している。したがって, 本実験で証明したMyoDは筋組織由来と考えられる。

脱神経された筋組織におけるMyoDの発現に関する報告も散見される⁷⁾。Adamsら⁸⁾は7ヵ月の脱神経長期モデルについて検討しMyoDの発現が持続していることを報告している。今回の脱神経モデル群では術後3週までは発現がみられたが, 4週では確認できなかった。この差異を生じた理由に関しては, 遅筋と速筋によるMRFs発現の違いが関与していると考えられる。Waltersら⁷⁾はラットの遅筋(ヒラメ筋)と速筋(足底筋)との脱神経後のMRFsの発現について比較し, 速筋はMyoDの発現量が遅筋に比べ有意に多く, 遅筋では少ないことを報告している。また, 遅筋は脱神経後急速に萎縮をきたし⁹⁾, 速筋は遅筋に比べ萎縮の程度が低いことが報告されている¹⁰⁾。すなわち, 長期モデルを検討したAdamsらの脱神経筋は速筋の多い前脛骨筋を使用していることから, 萎縮の程度も軽度でMyoDが出現しやすいものと考えられる。今回の実験では遅筋である腓腹筋を使用しており, このため4週時にはMyoDの発現がみられなかったと思われる。PCR cycle数をさらに上げた条件下では, 極微量ながら発現が確認できたかもしれない。

移植モデル群では術後3日からMyoDの発現がみられ, 2～4週をピークに増加し6週以降には消失した。3週での脱神経モデル群と移植モデル群との

発現量をNIHimageによって半定量的に比較したところ、移植モデルでは脱神経モデルに比べ約2倍の発現量がみられた。阻血モデル群と脱神経モデル群でのMyoDの発現の結果を踏まえ、この移植モデル群におけるMyoDの発現パターンについて解釈すると、術後早期には阻血などの侵襲や脱神経によってMyoDが発現し、さらに神経の再支配が起こる2～4週にかけてMyoDの発現が増加したものと考えられる。すなわち、図3Bに示すように一見一相性に増加しているように見えるが、阻血、脱神経と再神経支配という二つの要素によるMyoDの発現が二重に加わった結果と思われる。前述したようにMyoDの発現とsatellite cellの分化、増殖には密接な関連がある。再神経支配時期にMyoDの発現量が高レベルであったことは、この時期において筋再生能が高まり、筋再生が生じていることを示唆する結果と推察される。本モデルでは再神経支配の確率を上げるために神経縫合部を神経筋接合部から約10mm近位の部位に設定した。このため早期に再神経支配が生じているが、縫合部をさらに近位とした神経再支配に時間を要するモデルでは、MyoDの発現は二相性を呈したのではないかと思われる。

組織学的には、術後2～4週におけるMyoD発現の増加に少し遅れて術後4～5週に類円形の核の数が最大となっていた。6週にはその数が激減し筋線維の横径が劇的に増大していた。この結果について考察すると、satellite cellの経時的変化は2～4週時におこる再神経支配によりsatellite cellが活性化されMyoDを発現して分化・増殖をきたし、6週には筋線維の形成および成熟が完成したものと思われる。

脱神経筋において、MyoDが発現しているにもかかわらず筋萎縮をきたしていることを考慮すると、MyoDの発現とsatellite cellの分化・増殖、さらには筋再生を単純に結びつけることはできない。しかし既に述べたように脱神経筋におけるMyoDの発現量は、筋肉移植に比較すると明らかに低レベルであった。MyoDは筋再生現象の初期に深く関与しているとされることから、脱神経により衛星細胞が活性化されるものの、神経再生や神経性因子の供給がないため再生過程の初期段階で停止した状態となり、MRFsの発現が維持できず、萎縮、退行変性をきたしていくものと考えられる。

いずれにしても、今後の課題としては免疫染色などの手法を用いてsatellite cellの分化・増殖を直接証明し、また筋肉組織内におけるMyoDの局在を蛋白レベルでも検討する必要がある。そうすることによって筋肉移植の回復過程、とくに神経再支配のメカニズムをさらに詳細に解明でき、将来の臨床応用に結びつくものと考えられる。

神経再支配時にMyoDの発現が増加し、それと並行して組織学的にも回復が進行していたことは、筋再生において神経支配という環境は必要不可欠であるといえる。この神経再支配時期が移植術後の筋再生のポイントとなる時期である。これまでも筋肉再生を促進することを目的としてFGF, IGF, HGF, LIFなどの様々な成長因子の関与についての研究結果が報告されており¹¹⁾、また最近ではsatellite cell以外にも骨髄から中胚葉性幹細胞が損傷筋組織まで遊走し筋再生に関わっている可能性も指摘されている¹²⁾。これらの再生現象を応用した治療が可能になり、筋肉移植を用いた再建術のさらなる成績の改善が得られることを期待するものである。

V. 結 語

筋肉移植術における移植筋の再生について検討する目的で、MRFsであるMyoDの発現に関する実験を行った。Wistar系ラットの腓腹筋を移植筋として使用し、移植モデル、阻血モデル、脱神経モデルの3群を作成した。移植モデルでは脛骨神経を一旦切断後に縫合し、脱神経モデルでは切離したままとした。すべてのモデルにおいて1時間の阻血を行った。これら3群のMyoD mRNAの発現についてRT-PCR法を用いて検討した。その結果、移植モデルでは筋電図上の再神経支配時期である術後4週で劇的に増加していた。また3週時において移植モデルは脱神経モデルの2倍以上の発現量がみられ、移植筋において再神経支配はsatellite cellを活性化し増殖させることが推測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と御校閲を賜りました河合伸也教授に深謝致します。また本研究遂行に際し、直接御指導下さった整形外科学講座 伊原公

一郎助教授, 田中浩博士, 村松慶一博士, ならびに整形外科学講座教室員各位に心より謝意を表します。

引用文献

- 1) Ihara K, Sakamoto S, Kawai S. Computed tomography to evaluate postoperative changes in free functioning muscle. *Eur J Plast Surg* 2003 ; **26** :198-201.
- 2) 光嶋 勲. 神経血管柄付筋肉移植の研究 - 第1報: 移植筋の変性と再生に関する光顕的電顕的検索 -. 日形会誌 1987 ; **7** :478-489.
- 3) 光嶋 勲, 遠藤隆志. 神経血管柄付筋肉移植の研究 - 第2報: 移植筋の変性と再生に関する生化学的検索 -. 日形会誌 1987 ; **7** :1042-1049.
- 4) Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 1997 ; **191** : 270-283.
- 5) Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 1996 ; **10** : 1173-1183.
- 6) Kastner S, Elias MC, Rivera AJ, Yablonka-Reuveni Z. Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J Histochem Cytochem* 2000 ; **48** (8) : 1079-96.
- 7) Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil* 2000 ; **21** (7) : 647-53.
- 8) Adams L, Carlson BM, Henderson L, Goldman D. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *J Cell Biol* 1995 ; **131** (5) : 1341-9.
- 9) Loughna PT, Morgan MJ. Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. *Pflugers Arch* 1999 ; **439** (1-2) : 52-5.
- 10) Windisch A, Gundersen K, Szabolcs MJ, Gruber H, Lomo T. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol* 1998 ; **510** (Pt 2) : 623-32.
- 11) Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SS, Huard J. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop* 2000 ; **370** : 272-85.
- 12) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998 ; **279** : 1528-30.

Expression of m-RNA of MyoD in Free Muscle Graft

Sohtetsu SAKAMOTO
(Director : Prof. Shinya KAWAI)

*Dept of Orthopedics. and. Human Science.
Yamaguchi University of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

We hypothesize that recovery process after free muscle graft activates regeneration of satellite cells in the grafted muscle. The present study was undertaken to prove the hypothesis using MyoD, one of the myogenic regulatory factors (MRFs) , which are known as regulators in the process of muscle regeneration after muscle injuries.

Models for muscle graft were created using gastrocnemius muscles of Wister rats. They were divided into three groups. The first group was the reinnervation model in which the tibial nerve received neurorrhaphy. The second group was the denervation model which received the nerve cut only. The third group was the ischemia model. In all groups, one-hour ischemia was given to the muscles. In these three groups, an expression of mRNA of MyoD was examined by RT-PCR.

Electromyography confirmed the reinnervation at 4 weeks after the operation in the reinnervation group. The m-RNA expression of MyoD markedly increased at the time of the reinnervation. On the other hand, the amount of the expression in the denervation group was less than half of the first group at 3 weeks after the operation.

Marked expression of MyoD mRNA which correlated with the process of reinnervation in the muscle graft strongly suggested that activation of satellite cells were involved in these processes.