

## 再現性を重視した筋シナジー解析アルゴリズムの提案

○松井 佑介<sup>1)</sup>, 野鳥 一平<sup>2)</sup>

1) 名古屋大学 大学院医学系研究科

2) 信州大学 医学部保健学科

### 【目的】

運動モジュールの同定において筋シナジー解析は広く用いられている。しかし、日常的な臨床現場における応用は十分に進んでいない。その要因として、再現性と可用性の二つのボトルネックが存在する。筋シナジー解析は多チャンネル表面筋電位 (surface electromyography; sEMG) から低次元構造を推定する問題であるが、再現性を阻む要因として筋電位測定におけるノイズ複雑性と、筋シナジーモデルとして広く用いられる非負値行列分解 (Non-negative matrix factorization; NMF) の解の不定性が挙げられる。特に複数の対象者を比較するような場合には、再現性の問題はより深刻となる。また、可用性を阻む要因としては、解析過程において異常試行に対して手動による除外ステップがあることや、アドホックなパラメータ調整が存在することが主な要因としてあげられる。これらの臨床応用上の問題を、包括的に解決するためには、筋活動データにおいてばらつきを生む原因を特定し、関心のあるシグナルのみを自動的に推定・分離するための統計的なフレームワークが必要である。

### 【方法】

sEMGの多様な誤差構造を生み出す主な要因として、試行間のばらつきを生み出す個体内変動と個体間のばらつきを生じさせる個体間変動を仮定したKarhunen-Loève展開に基づく統計モデルを立てた。推定には主成分分析法を用いた。真の筋活動を推定したのちにNMFによる筋シナジー推定を行った。提案アルゴリズムの評価には、実際の筋活動データを元に異常な振幅成分と、異なる筋活動成分をランダムに加えて生成したシミュレーションデータおよび歩行時筋活動に関する実データを用いて検証した。シミュレーションでは、真の筋活動が再現できるかを評価した。

### 【結果】

シミュレーション実験では、異常振幅がランダムに含まれた場合であっても感度99.8%で自動的に異常試行を除外でき、複数のアーチファクト成分に対しても真の筋活動を安定的に分離可能であった。最終的に推定した筋活動と真の筋活動との相関は0.99であった。また実データを用いた筋シナジー解析についても、異なる測定条件である既報の研究結果と同様な構造を再現できた。

### 【考察】

筋シナジー解析の再現性を実現するためには、sEMGデータのノイズ構造を的確に捉えた統計モデルによって真の筋活動成分を高い精度で推定することが重要である。

### 【結語】

提案した筋シナジー解析アルゴリズムでは結果のばらつきを生み出す多様なノイズの多くを分離でき、解析を自動化することも可能である。日常的な臨床評価としての応用が期待できる。

### 【倫理的配慮、説明と同意】

本研究は本学の倫理審査委員会の承認を受けて実施された。また、本研究はヘルシンキ宣言に則っており、実験開始前に対象者に本研究内容を口頭と書面にて十分に説明し、同意を得た上で行われた。

## 超音波パルス刺激は脱神経筋におけるアセチルコリン受容体の形態変性を抑制する

○伊藤 明良, 河合 秀紀, 中原 峻, 徐 仕軒, 趙 梓汐, 戴 嘉, 黒木 裕士

京都大学大学院 医学研究科理学療法学講座

### 【目的】

末梢神経損傷後の運動機能回復には、損傷神経、効果器である骨格筋、そして両者を接合する神経筋接合部 (NMJ) への包括的なアプローチが必要である。脱神経筋および損傷神経に対する理学療法効果検証は試みられているものの、NMJへの介入研究はほとんどない。NMJは、運動神経終末と骨格筋の接合部であり、運動神経終末、アセチルコリン受容体 (AChR)、非ミエリンシュワン細胞 (tSC) からなる。本研究ではtSCがNMJの形成・維持機能を有すること、および超音波刺激がシュワン細胞の増殖と生存を促進することが報告されていることから、超音波刺激がtSCを維持・増殖させ、損傷後のNMJの変性や減少を抑制すると仮説を立てた。本研究の目的は、末梢神経損傷後のNMJの変性や減少に対する超音波刺激の影響を、実験動物を用いて検証することである。

### 【方法】

実験動物として12週齢のWistar系雄性ラットを用いた。左腓骨神経を切除して超音波を照射するUS群 (n=8)、切除して疑似照射するSham群 (n=8)、そして左腓骨神経を切断しないIntact群 (n=2) に無作為に振り分けた。超音波照射は、周波数1 MHz、強度 140 mW/cm<sup>2</sup> (空間平均時間平均)、照射時間率 20% の条件で、左前脛骨筋に対して切断翌日から麻酔下で1日5分間の介入を4週間毎日実施した。4週後、左前脛骨筋のNMJの数と形態を評価するためにAChRの数と形態を解析した。形態解析では、AChRを成熟したpretzel型、未成熟なplaque型、それらの中間であるintermediate型の3つに分類した。さらに、NMJの数や形態に対するtSCの影響を評価するために、ひとつのAChRあたりのtSC数 (tSC数) およびtSCを持つAChRの割合 (tSC保持率) を算出した。統計手法として、US群とSham群の2群間をStudent's t検定にて解析した。

### 【結果】

切断後4週経過時点においてAChRが変性し、US群、Sham群ともにIntact群と比較してpretzel型が減少し、plaque型が増加することを確認した。さらに、US群ではSham群と比較してpretzel型の減少とplaque型の増加が有意に抑制された (p < 0.05)。一方で、AChRの数はUS群とSham群の間に有意な差は認められず、Intact群と比較しても減少する傾向は認められなかった。tSC数および保持率は、US群とSham群で有意な差は認められなかった。

### 【考察】

末梢神経損傷によってNMJを構成するAChRの変性 (pretzel型の減少、plaque型の増加) が確認されたが、超音波刺激はこの変性を抑制する効果を有することが明らかとなった。しかしながら、超音波刺激の有無でtSC数や保持率に対する影響は認められず、仮説を支持する結果とはならなかった。超音波刺激によるNMJの変性抑制作用機序には、tSC数および保持率以外の要因が関与することが示唆された。

### 【結語】

超音波刺激は脱神経筋のAChRの変性を抑制することが示唆された。

### 【倫理的配慮、説明と同意】

本研究は所属施設の倫理委員会の承認を得て実施した (Med Kyo20027)。



## 筋力トレーニングによる筋萎縮回復促進効果への筋衛星細胞取り込みの関与

○伊東 佑太<sup>1)</sup>, 吉岡 潔志<sup>2)</sup>, 田村 悠磨<sup>3)</sup>, 縣 信秀<sup>4)</sup>, 清島 大資<sup>5)</sup>, 河上 敬介<sup>3, 6)</sup>

- 1) 名古屋学院大学 リハビリテーション学部
- 2) プロダクティブ・エイジング研究機構 -
- 3) 大分大学大学院 医学系研究科
- 4) 常葉大学 保健医療学部
- 5) 東海大学 医学部
- 6) 大分大学大学院 福祉健康科学研究科

【目的】これまで尾部懸垂 (TS) を施したマウスの筋萎縮回復が筋力トレーニング (Ex) によって促進することを明らかにしてきた。このとき筋線維核数が大幅に増加しており、筋衛星細胞の関与が示唆された。しかし健康な筋の肥大時に、筋衛星細胞取り込みによる筋線維核数の増加が起こるか否かは意見が分かれる。病的に萎縮した筋であればなおその証拠は見当たらない。そこで本研究は、廃用性筋萎縮からの回復促進時に筋衛星細胞の取り込みが生じる証拠を、後天的に筋衛星細胞を蛍光標識できる組換えマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】12週齢のB6.129X1-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(EYFP)Cos/J</sup>;Pax7<sup>tm2.1(cre/ERT2)Fan/J</sup> マウス (雄性) に対し5日間Tamoxifenを投与し、Pax7陽性細胞にYellow Fluorescent Protein (YFP) を発現させた。なおこのPax7陽性細胞は、以降分化が進み筋線維となってもYFPを発現する。このマウスに2週間TSを行い、後肢筋を萎縮させた。その後マウス用等尺性筋収縮運動装置 (BRC) を用いて1週間Exを行った (Tra群)。Exには以前明らかにした筋萎縮からの回復を促進させる強度 (最大筋力の40%) を用いた。Ex後、採取したヒラメ筋から10 μm厚の凍結横断切片を作成し、抗YFP抗体および抗Dystrophin抗体を用いて免疫組織化学染色を施した。得られた染色像から筋線維や核のサイズや数、位置関係の組織学的観察とともにYFP陽性の筋線維の割合を測定し、TS後にExを行わず普通飼育したマウス (nTra群)、Tamoxifen投与後、TSもExも行わないマウス (con群) の筋と比較した (各n=6)。

【結果】 nTra群の平均筋線維横断面積は1361±535 μm<sup>2</sup>であり、con群の面積1867±203 μm<sup>2</sup>と比べ有意に低値であったのに対し、Tra群の面積は1637±656 μm<sup>2</sup>であり、以前の報告と同様にcon群との間に有意な差はなかった。筋線維1本あたりの筋線維核数も以前の報告と同様にTra群で有意に高値を示した (nTra群 0.55±0.22, Tra群 0.82±0.42, con群 0.46±0.18)。YFP陽性の筋線維の割合はTra群で高く (nTra群 0.67±0.86%, Tra群 3.42±2.71%, con群 0.01±0.00%)、これらの筋線維の核は細胞膜に近接して存在した。

【考察】 損傷後のマウス筋再生において、筋衛星細胞同士が融合した新生筋線維の核は、新生後1年近くにわたって、筋線維の中心部に数珠状をなして存在する (中心核線維)。本研究で観察されたYFP陽性筋線維はこのような中心核線維ではないため、衛星細胞同士の融合ではなく、既存の筋線維に筋衛星細胞が取り込まれた証拠であると考えられる。

【結語】 廃用性筋萎縮を起こした筋に筋力トレーニングを行い、その回復が促進される時には、既存の筋線維に筋衛星細胞が取り込まれ、筋線維核を増加させる。

【倫理的配慮, 説明と同意】 本研究は、発表者が所属する組織の動物実験委員会 (2014-001) および遺伝子組換え実験安全委員会 (D2017-001) の承認を得て実施した。

## 筋芽細胞分化過程における性差がメカニカルストレス感受性に及ぼす変化

○村田 健児<sup>1)</sup>, 高須 千晴<sup>2,3)</sup>, 寺田 秀伸<sup>2,3)</sup>, 小島 拓真<sup>2,4)</sup>, 川端 空<sup>2,4)</sup>, 峯岸 雄基<sup>2,5)</sup>, 加納 拓馬<sup>2,3,4)</sup>, 岡 優一郎<sup>2)</sup>, 小曾根 海知<sup>2)</sup>, 金村 尚彦<sup>1)</sup>

- 1) 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科
- 2) 埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科
- 3) 医療法人やつか整形外科内科
- 4) 医療法人東西医会 草加整形外科内科
- 5) 日本学術振興会 特別研究員DC

【目的】生物分野における異なる個体形質は性的二型といわれ、繁殖や生体組織に影響を与えている。男女の筋力差も性的二型の一つであるが、性別の差に関わらずヒトは地球における重力がメカニカルストレスとして結合組織に感知される。しかし、性差を考慮した細胞に対するメカニカルストレスの影響については検証されていない。本研究では、筋芽細胞を利用して筋管分化過程における細胞増殖能力と細胞応答性について筋管分化に関連するMyod1ならびにMyogから性差を検証し、伸張ストレスに対する反応性を調査した。

【方法】4週齢Wistar雄性ならびに雌性ラットから雄性筋芽細胞 (m-Myo) と雌性筋芽細胞 (f-my) を単離した。各細胞は96well (1x10<sup>4</sup>C NMR/ml) または12Wellプレート (1x10<sup>5</sup>C NMR/ml) に播種し、24時間の前培養後、分化誘導培地に変更し、細胞増殖能力 (24・48・72h) およびリアルタイムqPCR法 (12・24・48・72h) によるmRNA挙動を評価した。また、伸張ストレスに対する反応性は、2x2cm<sup>2</sup>C NMRの伸縮シリコンチャンバーに1x10<sup>5</sup>C NMR/mlの濃度で前培養された筋芽細胞を分化誘導後、正常比125%で持続伸張ストレス (EX) を1hと24h曝露し、通常の筋芽細胞 (CTR) とqPCR法で比較した。標的遺伝子はMyod1およびMyogをβ-actinとGAPDHを基準として比較した。統計解析は、時間と性差における二元配置分散分析、伸張ストレスに対する反応性には2群間比較を行った。

【結果】細胞増殖能力は、誘導培地変更後24hでは有意にm-Myoの分化が高かった (p<0.001)。平均RNA収量は49.1ng/μl、A260/A280=1.99、A260/A230=1.09であった。遺伝子発現量は、MyoDでm-Myo-12hの発現量を1とした場合、24h:1.03倍、48h:1.66倍、72h:1.15倍、f-Myoは24h:1.57倍、48h:1.59倍、72h:1.88倍であった。Myogについてm-Myoは24h:13.01倍、48h:21.91倍、72h:14.14倍、f-Myoは24h:171.05倍、48h:79.78倍、72h:18.4倍となった。β-actinとGAPDHにおける時間や性差における変化し得る差は認めなかった。また、EXの反応性は、CTRと比較してMyod1はEX-m-Myo-1h 2.3倍、EX-f-Myo-1h 1.2倍で、MyogはEX-m-Myo-1h 6.3倍、EX-f-Myo-1h 2.0倍であった。

【考察】筋芽細胞の増殖率は雌雄で類似しているものの筋衛星細胞から筋芽細胞の分化率は雌よりも雄が高いこと、雄は雌と比較して筋転写因子の発現量が高いことが報告されている。本研究は、筋芽細胞から筋管分化過程における検証でも同様に性差を認めた。また、増殖能力について雌よりも雄が高いことは同様であったが、分化誘導によるmRNA発現量は雌性由来細胞でより高い反応性を示し、EXでも同様であった。

【結語】1)筋芽細胞分化過程において細胞レベルでの性差を認めた。2)分化誘導による反応性は雌性細胞でより大きかった。3)伸張ストレス反応性は雄性細胞でより効果的であった。

【倫理的配慮, 説明と同意】 実験動物倫理委員会の承認を得た (2021-2)。



## 遅発性筋痛モデルラットの筋および末梢神経における Tmem120A, Bの発現定量

○太田 大樹<sup>1,2)</sup>, 大井 理史<sup>1)</sup>, 片野坂 公明<sup>3)</sup>, 田口 徹<sup>1,2)</sup>

- 1) 新潟医療福祉大学 リハビリテーション学部理学療法学科
- 2) 新潟医療福祉大学 運動機能医科学研究所

【目的】近年、機械痛覚を担う新たなイオンチャネルとして Tmem120Aが発見され (Beaulieu-Laroche et al., Cell, 2020)、皮膚の炎症性機械痛覚過敏への関与が報告された (Bonet et al., 2021)。一方、遅発性筋痛は運動後の筋組織に知覚される機械痛覚過敏であり、理学療法やスポーツ医学で関心が高いものの、その分子基盤は十分に解明されていない。そこで、本研究では遅発性筋痛のモデルラットを用い、筋や末梢神経における Tmem120Aとそのホモログである Tmem120Bの発現変化を調べ、機械痛覚過敏への関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】先行研究にない、雄性SDラット (8~12週齢、244~397 g、49匹)の下腿伸筋群に伸張性収縮 (LC)を負荷し、遅発性筋痛モデルを作製した (Hayashi et al., 2017)。筋機械痛覚過敏が最も強くなるLC24時間後に、①前脛骨筋表層、②深層、③前脛骨筋の表面を覆う下腿筋膜、④運動筋を支配する感覚神経の細胞体があるL3~L5後根神経節 (DRG)を採取した。①については、より詳細な時間経過を調べるため、0、6、48、120時間後のサンプルも採取した。①~④の組織サンプルからRNAを精製後、リアルタイムRT-PCR法により Tmem120Aおよび Tmem120B mRNAの発現レベルを定量した。有意水準は5%未満とした。

【結果】Tmem120Aの発現は、LC6および24時間後の筋表層において、無処置対照群に比べ有意に増大し、24時間後にピークとなった。Tmem120Bの発現はどの時点でも変化しなかった。また、筋深層、下腿筋膜およびDRGではTmem120Aの発現に変化はなかった。

【考察】今回観察された運動筋表層における Tmem120Aの発現量増加の時間経過は、先行研究で報告されている遅発性筋痛モデルにおける機械痛覚過敏行動の時間経過 (Hayashi et al., 2017)と類似していた。このことから、運動後の遅発性筋痛の発症における Tmem120Aの関与が示唆される。その分子機構として、骨格筋細胞を介した痛覚感作物質の産生増大や侵害受容体の機械感作を介した末梢神経機構の関与が考えられるが、未だ不明な点が多く、今後、さらなる研究が必要である。

【結語】Tmem120Aは筋機械痛覚過敏に関与し、遅発性筋痛の発症に関わる可能性が示唆された。

【倫理的配慮、説明と同意】本研究は、発表者が所属する組織の動物実験倫理委員会 (承認番号: 29020)の承認を得て実施した。

## 筋性拘縮の発生メカニズムの探索—ミトコンドリア融合・分裂因子の動態に関する検討

○本田 祐一郎<sup>1,2)</sup>, 高橋 あゆみ<sup>1)</sup>, 前田 俊輔<sup>1)</sup>, 三宅 純平<sup>1)</sup>, 坂本 淳哉<sup>1,2)</sup>, 沖田 実<sup>1,2)</sup>

- 1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 理学療法学分野
- 2) 長崎大学生命医科学域 (保健学系)

【目的】

これまでわれわれは、骨格筋が不動状態に曝されると筋性拘縮の主病態である線維化が惹起され、これには活性型 caspase-3を介した筋核のアポトーシスとこれを契機としたマクロファージの集積ならびに interleukin (IL)-1 $\beta$  / transforming growth factor (TGF) $\beta$  1シグナリングの賦活化が関与することを報告してきた。しかし、この分子機構の上流のメカニズムは明らかにできておらず、検討課題となっていた。一方、先行研究によれば、活性型 caspase-3の発現亢進にはミトコンドリアの機能不全が影響し、これにはミトコンドリアの融合因子である mitofusin (mfn)-1の発現低下と分裂因子である dynamin-related protein (drp)-1の発現亢進に起因したミトコンドリアDNA (mt DNA)の減少が関与するとされている。つまり、不動化した骨格筋でも同様の変化が誘因となって筋核のアポトーシスが生じるのではないかと仮説できるが、この点を検証した報告はこれまでにない。そこで、本研究では不動化したラットヒラメ筋を検索材料として用い、上記の仮説を検証した。

【方法】

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット20匹を用い、両側足関節を最大底屈位でギプスにて1、2週間不動化する不動群 (計10匹)と同期間、通常飼育する対照群 (計10匹)に振り分けた。各実験期間終了後は両側ヒラメ筋を採取し、右側試料には NADH-TR染色ならびにSDH染色を施し、単位面積当たりの optical densityを計測することでミトコンドリアの恒常性を評価した。また、左側試料は分子生物学的検索に供し、mfn-1ならびに drp-1 mRNA発現量、mt DNA発現量を定量した。

【結果】

不動群のNADH-TR染色像およびSDH染色像における optical densityや mfn-1 mRNA発現量、mt DNA発現量はいずれの不動期間とも対照群と比較して有意に低値を示した。また、不動群の drp-1 mRNA発現量はいずれの不動期間とも対照群と比較して有意に高値を示した。

【考察】

今回の結果から、不動化した骨格筋ではmfn-1の発現低下と drp-1の発現亢進が生じ、ミトコンドリアの恒常性が破綻していることが明らかとなった。つまり、このようなミトコンドリアの機能不全によって活性型 caspase-3を介した筋核のアポトーシスが誘導され、マクロファージの集積を発端としたIL-1 $\beta$  / TGF $\beta$  1シグナリングの賦活化が生じ、線維化、ひいては筋性拘縮に発展すると推察される。

【結語】

本研究は、不動状態に曝された骨格筋における線維化の分子機構の探索を目的に実施した基礎研究である。そして、この成果は理学療法の治療対象である筋性拘縮の発生メカニズムの解明に寄与するものであり、理学療法学研究としても意義深いと考える。

【倫理的配慮、説明と同意】

本研究は所属組織の動物実験倫理委員会承認 (承認番号: 1903281524)を受けた後、同委員会が定める動物実験指針に準じて実施した。

