



Title	筋萎縮性側索硬化症(ALS)における摂食機能と四肢運動機能の比較及び筋体積減少の特徴
Author(s)	川田, 創
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/95980
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における
摂食機能と四肢運動機能の比較および
筋体積減少の特徴

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻 顎顔面口腔外科学講座
川田 創

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) は随意筋を支配する上位及び下位運動ニューロンが選択的に障害される、進行性の神経変性疾患である。その発症率は、欧米において 10 万人あたり 2.16 人で、約 3 年で半数の患者が死亡する¹。四肢の筋力低下が初発となることが多く、支配神経の変性による骨格筋の萎縮と麻痺を認める。ALS 患者では、急激な体重減少を認め、その原因として、筋萎縮に伴う筋量の減少に加え、代謝の亢進が挙げられる²。末期には横隔膜の筋力低下が起これ、しばしば死因に関与する。また上位下位運動ニューロン症状のほかに、嚥下障害や構音障害といった球麻痺症状が認められ、舌の筋萎縮や咽頭反射の低下や消失などが知られており^{3,4}、ALS 患者の重症度スケールとして用いられる改訂 ALS Functional Rating Scale (ALSFRS-R)にも嚥下の評価が立項されている⁵。

ALS の病因について、運動神経が選択的に障害される原因をはじめ、そのメカニズムは大部分が明らかにされていない。ALS の治療薬として現在認可されているものに、リゾールとエダラボンがあるが、いずれも余命をわずかに延長させるにとどまり、根本的な治療薬の開発が待たれている⁶⁻⁸。近年では、運動神経に加え、これまで注目されてこなかった感覚神経についても ALS の病態への関与が指摘されている⁹⁻¹²。

ALS はそのほとんどが家系内に単発する孤発性 ALS (sporadic ALS : sALS) であるが、5.1%が遺伝性を有する家族性 ALS (familial ALS : fALS) である⁷。1993 年に fALS

の原因遺伝子として、Cu / Zn superoxide dismutase (SOD1) が初めて同定された¹³。翌年には変異 SOD1 トランスジェニックマウス(SOD1G93A マウス)が作成され、運動麻痺を認めたことから ALS モデル動物として広く認知された¹⁴。SOD1G93A マウスは中枢神経に対する研究に加え、経時的な体重変化や運動機能の測定、MRI での筋体積の測定など、末梢の筋組織における検討もなされ、本日まで ALS の病態解明や治療薬開発にむけた研究に広く使用されている¹⁵⁻¹⁸。

ALS 患者では嚥下障害について報告されているが、咀嚼機能についてはその大部分が未知のままである。これまで SOD1G93A マウスにおいて、咀嚼機能の神経中枢である三叉神経運動ニューロン(MoV)や三叉神経中脳路核ニューロン(MesV)において発火異常が起こることが報告されているが^{9,19,20}、末梢の咀嚼筋での経時的な変化については報告がなく、その詳細は不明である。ALS 患者では骨格筋の多くが萎縮と麻痺を認めるが、外眼筋や外括約筋は顕著な萎縮を認めず、末期まで眼球運動障害、膀胱直腸障害は認めないなど例外的に機能が温存される。そのため ALS 患者は眼球運動が温存されることを利用して、視線追跡デバイスを用いたコンピューターによるコミュニケーションを行っている²¹。

近年 ALS の骨格筋は病態に深く関与することが示され、ALS の治療標的として注目されている。骨格筋は損傷に対して再生機能を有しており、筋組織の再生、肥大にはタンパク質合成及び筋線維核の増加が必要であると報告されている²²。また骨格筋の組織

幹細胞である筋衛星細胞は筋線維核の増加に必須であり、筋組織の再生、肥大に関与していると考えられている²³⁻²⁵。筋衛星細胞は通常、休止期の状態で存在しており、筋損傷により活性化する。この段階では Pax7 という転写因子が発現しており、筋衛星細胞のマーカーとして報告されている^{26,27}。活性化した筋衛星細胞は増殖し、その大半は筋芽細胞へと分化する。その後、筋芽細胞から分化した筋線維は損傷前から存在した筋線維や新たに分化した筋線維同士で融合し、成熟することで筋組織の再生、肥大がなされる。使用されなかった筋衛星細胞は、次の損傷時に備えて再び静止状態に戻り、筋線維に貯蔵される²⁸。

骨格筋は筋線維に含まれるミオシン重鎖(Myosin Heavy Chain : MyHC)により遅筋と速筋に大別される。遅筋は、MyHC- I 線維からなり、耐疲労性があり持続的な運動に関与する。これに対して速筋は MyHC- II 線維からなり、易疲労性であるが瞬間的に大きな収縮力を発揮する。骨格筋の質的な可塑性として、遅筋、速筋の割合を変化させることで筋組織としての性質を変化させる²⁹。疾患により、萎縮しやすい筋線維も異なり、廃用性萎縮では遅筋が、デュシェンヌ型筋ジストロフィーやがん悪液質では速筋が障害される³⁰。ALS 患者やモデルマウスにおいても、速筋線維から萎縮が始まることが知られており、疾患の進行に伴い速筋線維割合が低下し、中間線維や遅筋線維割合が増加するといった筋線維タイプ割合の変化が報告されている³¹。

今回われわれは、現在その詳細が不明である ALS における咀嚼機能の変化および咀

嚼筋体積変化について、SOD1G93A マウスを用いて出生時から末期まで行動生理学的検討を行った。また発症前後の咀嚼筋組織を蛍光免疫染色にて四肢骨格筋組織と比較することで、SOD1G93A マウスにおける咀嚼筋体積変化、咀嚼機能の変化および、筋線維の組織学的変化を検討した。

研究材料と方法

倫理に関する声明

すべての動物プロトコルは、日本学術会議が定める「動物実験の適正な実施のための指針 2006」(指針)に準拠して実施し、大阪大学遺伝子組み換え実験安全委員会(遺伝子組み換え実験安全委員会承認番号:04538)及び大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会(動物実験委員会承認番号:動歯 R-03-010-0)の承認を受けた。

実験動物

本研究では雄の ALS モデルマウス (JAX strain : C57B6SjL-Tg (SOD1G93A)1Gur/J) (mSOD1 マウス) (The Jackson Laboratory : Bar Harbor, MA, USA) と雌の野生型マウス (C57BL/6JmsSlc)(WT マウス) から繁殖させたマウスを使用した^{9,19}。本実験では、骨格筋体積の測定を含む行動生理学検討に生後 4~16 週齢マウス (雄、mSOD1 : n=11、WT : n=10) を使用し、蛍光免疫染色での組織学的検討に生後 8 週齢、16 週齢マウス (雄、8 週齢 mSOD1 : n =5、8 週齢 WT : n =5 16 週齢 mSOD1 : n =5、16 週齢 WT : n =5) を使用した (Table.1)。各マウスは温度 23°C、湿度 60%、12 時間毎の明期、暗期に管理された環境で個別のケージ内に飼育し、固形飼料 (MF : Oriental Yeast, 東京, 日本) を自由摂取させた³²。本研究で用いた ALS モデルマウスは、生後約 13 週齢で四肢に痙攣や振戦を認め、約 20 週齢でエンドポイン

トを迎えることが報告されている³³。本研究では、行動生理学的検討では、4週齢より2週齢ごとに16週齢まで、体重、筋体積、摂食機能、運動機能を測定した。16週齢以降はマウスを横に寝かせ、30秒以内に自力で立ち上がれないことを確認した後、速やかに安楽死させた³⁴。

遺伝子型の判定

遺伝子型の判定のため、マウスの尾を5mm採取した。DNA抽出・精製キット(*Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit* : ZYMO RESEARCH, Murphy Ave, Irvine, USA)を用いて尾のサンプルよりDNAを抽出、精製した。入手元であるThe Jackson Laboratoryのプロトコル(The Jackson Laboratory : Protocol 29082 : Standard PCR Assay – Tg(SOD))に則り、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction : PCR)によって決定した³⁵ (Table. 2)。

摂食機能測定及び体重計測

摂食機能の測定項目として、先行研究より報告されている方法に準じ、「体重」、「30分当たりの摂食時間」、「30分当たりの摂食量」の3項目を設定した^{32,36}。摂食行動観察の際は、前日より12時間絶食を実施した。飼育用ケージの側面に固形飼料を固定し、2台のVideo Camera (HANDYCAM, model HDR-XR520V : Sony Corporation, 東京,

日本 : Everio, model GZ-HM890 : 日本ビクター株式会社, 神奈川, 日本)を用いて側方 2 方向 (固形飼料よりそれぞれ 115mm と 165mm の位置) から複数回のマウスの摂食行動を観察するため 30 分間ビデオ撮影を行った⁹。「30 分当たりの摂食時間」は、撮影した 30 分間の行動観察のうち、飼料の摂食動作を行っている時間の合計とした。「30 分当たりの摂食量」は観察開始時における飼料の質量から 30 分間の観察終了時点での飼料の質量を差し引いた変化量とした⁹。体重は、後述する筋体積測定時に測定した。

四肢運動機能測定

四肢の運動機能として、走行機能及び握力を測定した。走行機能は実験動物用多連トレッドミル (TMS-8N システム : MELQUEST, 富山, 日本) を用い、Reynolds らの報告による方法を用いた³⁷。計測日の 3 日前より、13m/min で 20 分間のトレーニング走行を毎日実施しトレッドミルへ順応させた。計測は 4 段階に速度を変化させ、最大 60 分間実施した。第 1 段階は、13m/min で 5 分間走行させた。第 2 段階は 5 分かけて速度を 18m/min に上昇させた。第 3 段階は 18m/min の一定速度で 30 分間走行させた。第 4 段階は 23m/min に速度を上げ最後に 20 分間走行させた。60 分完走した際の走行距離は 1142.5m であった。トレッドミル後方には微弱な電気を帯びたグリッドが備え付けられ、走行をやめグリッドと接触したマウスは不快な電気刺激により再び走行を促されたが、物理的に危害を加えたり動物を負傷させるものではなかった。何らかの要因

で電気刺激を回避したマウスが後方のグリッドに上った際は、筆にてマウスを刺激し再度トレッドミル走行を促した。筆にて走行を促した後も走行を拒否し 30 秒間グリッド上にとどまった際は、疲労に達したと判断し、そのマウスはトレッドミルのレーンから飼育ケージに戻し、その時点での走行距離を記録とした。握力は小動物握力測定装置 (GPM-101BV: MELQUEST, 富山, 日本) を用いて四肢の握力を測定した^{38,39}。計測は、トレッドミル走行の測定日及び摂食機能測定のための絶食日を除き、最低 1 分間の休憩を設けて 1 日に 6 回連続測定した。翌日も同様の方法で測定を実施し、その平均値を計測値とした⁴⁰。

咬筋及び四肢筋群の筋体積測定

マウスを三種混合麻酔 (塩酸メドミジン (0.02 mg/kg)、ミダゾラム (0.3 mg/kg)、酒石酸ブトルファンール (0.2 mg/kg)) の腹腔内注射にて麻酔し体重計測を行った。再現性のある姿勢で撮影できるよう作成した撮影台に乗せた。動物実験用マイクロ CT (R_mCT2: 株式会社リガク, 東京, 日本) にて頭部と前腕、後肢に分けて撮影した。管電圧は 90 kV、管電流は 160 μ A、ボクセルサイズは 148 μ m³ で造影剤は使用しなかった。撮影された画像を画像解析ソフト (TRI/3D-BONE, RATOC, 東京, 日本) にて咬筋及び四肢筋群を抽出し、筋体積を測定した。咬筋は、解析前に矢状断でマウスの口蓋骨を地面と水平に、冠状断で鼻中隔を地面と垂直の位置に頭蓋の位置を修正した。次に

前頭断にて下顎骨との境界を咬筋内面とし、上端下端は起始停止を目視にて判断した。咬筋を含みマスクした領域から下顎骨の領域、空気の領域を除き、咬筋断面とした。CT画像におけるマウスの咬筋形態については、Jefferyらの報告を参照した⁴¹。咬筋下顎枝前縁から下顎枝後縁の範囲で咬筋断面を抽出し咬筋体積とした。四肢筋群は、前肢筋群と後肢筋群を分けて抽出した。前肢筋群は上腕三頭筋を主として、冠状断にて腕橈関節から尺骨頭の範囲で筋群を抽出した。後肢筋群は、腓腹筋を主として、前頭断にて膝関節から足根下腿関節の範囲で筋群を抽出した^{42,43}。それぞれの体積を合計し、四肢筋群の体積とした。筋体積の計測は、方法を熟知した同一人物により実施された。

咬筋、腓腹筋の筋湿重量測定および凍結標本作成

8週齢、16週齢のSOD1G93Aマウス及び野生型マウス(雄、各群:n=5)を用いて、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後、直ちに咬筋、腓腹筋を過不足なく摘出し、筋組織及び含有する水分を含めた筋湿重量を測定した。摘出した筋組織は液体窒素で冷却した2-メチルブタンにて凍結した。凍結した組織はドライアイス上で1時間、2-メチルブタンを蒸発させた後、密閉容器に入れ-80°Cで保管した⁴⁴。安楽死から凍結まで、筋組織が乾燥しないようリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate-buffered saline : PBS)で保湿した。

蛍光免疫組織学染色及び顕微鏡撮影

凍結組織標本をクライオスタットにて $6\mu\text{m}$ の厚さで薄切し、スライドガラス上に配置した。15°C~25°Cで30分間乾燥させた後、凍結切片の周囲をPAPペンでなぞり、溶液が漏れないようマーキングした。次いで、4%Paraformaldehyde (PFA)にて10分間固定した。0.1%Triton X-100/PBS (PBST)にて5分間洗浄を2回実施した後、PBSにて5分間洗浄した。スライドガラスを湿箱に移したのち5% skim milk/PBSにて37°Cで1時間ブロッキングを実施した。Pax7を染色するサンプルはPFA固定後に0.5% PBSTにて20分間透過処理を行った後、PBSTにて5分間洗浄を2回、PBSにて5分間洗浄した。1次抗体を5% skim milk / PBSにて希釈し、4度で一晩反応させた。翌日、PBSTにて5分間洗浄を2回、PBSにて5分間洗浄を1回実施し、2次抗体希釈液を室温で1時間反応させた。PBSTにて5分間洗浄を2回、PBSにて5分間洗浄を1回実施し、DAPI入り封入剤にて封入した^{26,44}。画像は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE, 大阪, 日本)にて撮影した。筋組織の摘出から標本作成まで手技を熟知した同一人物により、全ての標本は同様の手法にて実施された。蛍光免疫染色に用いた各種抗体は別に示した (Table.3)。

咬筋及び腓腹筋における筋線維の定量解析

画像認識及び定量化は蛍光顕微鏡に対応する画像解析ソフト (BZ-800 Analyzer,

KEYENCE, 大阪, 日本) のハイブリッドセルカウント機能を用いて実施した。まず、閾値を調整し Laminin 陽性基底板の蛍光シグナルを認識した。つぎに分離機能を用いて個々の筋線維を効率的に分離した。ヒストグラム関数の下限値を調整することで、小さな誤認識領域を除外した後に、筋組織ごとに筋線維数、筋線維断面積を自動算出した⁴⁵⁻⁴⁷。全ての週齢、群間を含む 20 標本で、咬筋では 1370.9 ± 144.12 線維、腓腹筋で 2252.35 ± 210.51 線維が計測された。筋線維タイプは、連続切片にて、MyHC- I、MyHC- II a、MyHC- II b の筋線維数を計測した⁴⁸。計測は前述の方法で全筋線維を認識した後、各筋線維タイプの蛍光シグナルを認識し、算出する筋線維タイプの筋線維を特定した。筋線維核数は Laminin/DAPI 陽性のシグナルを計測した。全ての週齢、群間を含む 20 標本で 1 筋線維当たり、咬筋では 3.94 ± 0.28 個、腓腹筋で 2.64 ± 0.31 個が計測された。筋衛星細胞は Pax7/DAPI 陽性のシグナルをそれぞれ計測した²⁶。筋線維核と同じ 20 標本で 100 筋線維当たり、咬筋では 9.24 ± 1.20 個であった。腓腹筋で 4.31 ± 0.67 個が計測された。

定量化及び統計解析

統計解析は IBM SPSS Statistics (IBM, Chicago , IL , USA) を用いて行った。正規性については Kolmogorov-Sminov 検定または Shapiro-Wilk 検定、分散の等質性については Levene の検定を用いた。独立したサブセットは student-*t* 検定で分析した。すべてのデ

ータは平均値 ± 標準誤差で表した。体重、筋体積、摂食時間、摂食量、走行距離、握力において、WT 群、mSOD1 群間の比較は二元配置反復測定 ANOVA で評価した。両群間に交互作用が検出された場合は、Tukey-Kramer 検定にて、post-hoc 比較を行った。有意水準は 5%とした。

結果

摂食機能及び四肢運動機能

SOD1G93A マウス及び野生型マウスを用いて、4 週齢から 16 週齢まで行動観察を実施し、咀嚼機能及び四肢運動機能を測定した。mSOD1 群、WT 群ともに、摂食時間では 14 週齢から、摂食量では 12 週齢から減少傾向を認めたが、全週齢において有意差を認めなかった (Figure 1a, b)。運動機能において、トレッドミル走行距離は、mSOD1 群では 10 週齢以降減少し、14 週齢以降は顕著に減少した。WT 群は全週齢において増加傾向にあり、完走に近い走行距離を示した。群間比較では、16 週齢から mSOD1 群で有意な走行距離の減少を認めた ($F(1, 117)=9.37, p<0.001$, 12week : mSOD1, $936 \pm 87.01\text{m}$, WT, $1060.92 \pm 45.98\text{m}$, $p=0.20$, 14week : mSOD1, $734.46 \pm 150.98\text{m}$, WT, $964.46 \pm 71.49\text{m}$, $p=0.16$, 16week : mSOD1, $290 \pm 119.59\text{m}$, WT, $1061.15 \pm 37.73\text{m}$, $p=0.003$, repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, Figure 1c)。握力において、mSOD1 群では、トレッドミル走行と同様に 10 週齢以降減少した。WT 群では 8 週齢から増加傾向を認めた。群間比較では、14 週齢から mSOD1 群で有意な握力低下を認めた。($F(1, 133)=10.02, p<0.001$, 12week : mSOD1, $165.39 \pm 15.51\text{g}$, WT, $185.83 \pm 10.88\text{g}$, $p=0.30$, 14week : mSOD1, $152.12 \pm 15.96\text{g}$, WT, $192.93 \pm 8.66\text{g}$, $p=0.042$, 16week : mSOD1, $132.47 \pm 25.15\text{g}$, WT, $211.98 \pm 17.44\text{g}$, $p=0.017$, repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post

hoc comparison, Figure 1d)。体重は、mSOD1 群では 10 週齢まで増加傾向を示したが、12 週齢より減少した。WT 群では観察期間中に一貫した体重増加を認めた。両群間に有意差は認めなかった (Figure 1 e)。

咬筋及び四肢骨格筋の経時的筋体積変化

摂食機能、四肢運動機能に対応する骨格筋の変化を検討するため、経時的な筋体積の測定を実施した(Figure 2a)。筋体積において、咬筋では 14 週齢まで増加傾向を認めた。WT 群では、全週齢で増加傾向を認め、体重増加と同様の結果を示した。群間比較では、全週齢で有意差を認めなかった ($F(1, 145)=3.35, p=0.069$, 12week : mSOD1, $35.93 \pm 2.43 \text{ mm}^3$, WT, $31.47 \pm 2.61 \text{ mm}^3, p=0.23$, 14week : mSOD1, $37.66 \pm 1.79 \text{ mm}^3$, WT, $35.77 \pm 2.29 \text{ mm}^3, p=0.52$, 16week : mSOD1, $34.99 \pm 3.29 \text{ mm}^3$, WT, $37.42 \pm 2.45 \text{ mm}^3, p=0.56$, repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, Figure 2 b)。前肢筋群では、mSOD1 群は 10 週齢以降で減少傾向を認めた。WT 群は観察期間で増加傾向を認めた。前肢筋群において群間比較では有意差は認めなかった ($F(1, 144)=0.60, p=0.44$, 12week : mSOD1, $76.27 \pm 4.96 \text{ mm}^3$, WT, $71.14 \pm 5.73 \text{ mm}^3, p=0.50$, 14week : mSOD1, $72.95 \pm 4.14 \text{ mm}^3$, WT, $76.76 \pm 4.63 \text{ mm}^3, p=0.55$, 16week : mSOD1, $70.71 \pm 4.51 \text{ mm}^3$, WT, $84.56 \pm 7.65 \text{ mm}^3, p=0.15$, repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, Figure 2 c)。後肢筋群では、mSOD1 群は 8 週齢以降体積減少を認めた。WT

群は、全週齢で体積増加を認めた。群間比較では、16 週齢で mSOD1 群の有意な体積減少を認めた (F (1, 143)=5.13, $p < 0.001$, 12week : mSOD1, $178.87 \pm 9.43\text{mm}^3$, WT, $203.7 \pm 20.18\text{mm}^3$, $p=0.25$, 14week : mSOD1, $175.95 \pm 10.31\text{mm}^3$, WT, $222.15 \pm 20.93\text{mm}^3$, $p=0.056$, 16week : mSOD1, $151.01 \pm 15.44\text{mm}^3$, WT, $259.24 \pm 18.51\text{mm}^3$, $p < 0.001$, repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, Figure 2 d)。

咬筋及び腓腹筋の筋湿重量

骨格筋の評価指標として 8 週齢と 16 週齢で SOD1G93A マウスと野生型マウスの筋湿重量を測定した。咬筋、腓腹筋において、8 週齢では mSOD1 群、WT 群との比較で有意差を認めなかった。(Masseter : 8week : mSOD1, $0.1000 \pm 0.0033\text{g}$, WT, $0.0892 \pm 0.0040\text{g}$, $p=0.050$, Gastrocnemius : 8week : mSOD1, $0.1016 \pm 0.0122\text{g}$, WT, $0.1271 \pm 0.0046\text{g}$, $p=0.067$, student-*t* test, Figure 3 a) 腓腹筋において、16 週齢で mSOD1 群は有意に低い値を示したが、咬筋において筋湿重量は有意差を認めなかった (Masseter : 16week : mSOD1, $0.077 \pm 0.0042\text{g}$, WT, $0.082 \pm 0.0043\text{g}$, $p=0.35$, Gastrocnemius : 16week : mSOD1, $0.068 \pm 0.0064\text{g}$, WT, $0.131 \pm 0.0098\text{g}$, $p < 0.001$, student-*t* test, Figure 3 b)。

咬筋及び腓腹筋の筋線維数及び筋線維断面積

8 週齢と 16 週齢の SOD1G93A マウス、野生型マウスにて発症前後の骨格筋の変化を組織学的に検討した(Figure 4a)。筋組織全体の線維数は、咬筋、腓腹筋ともに、mSOD1 群と WT 群との比較で有意差を認めなかった(Masseter : 8week : mSOD1, fiber(n)=1433.8±267.51, WT, fiber(n)=1157.20±230.30, $p=0.46$, 16week : mSOD1, fiber(n)=1497.4±396.53, WT, fiber(n)=1395.2±310.22, $p=0.84$, Gastrocnemius : 8week : mSOD1, fiber(n)=2122.8±489.08, WT, fiber(n)=2597.2±593.91, $p=0.54$, 16week : mSOD1, fiber(n)=1796.8±374.41, WT, fiber(n)=2492.6±210.56, $p=0.14$, student-*t* test, Figure 4b, c)。筋組織の断面積において、咬筋では、8 週齢、16 週齢ともに、mSOD1 群、WT 群との比較で有意差は認めなかった(8week : mSOD1, 1214.8±105.74 μm^2 , WT, 1455.4±175.69 μm^2 , $p=0.27$, 16week : mSOD1, 1700.6±189.47 μm^2 , WT, 1528.2±85.87 μm^2 , $p=0.43$, student-*t* test, Figure 4d)。腓腹筋では、8 週齢、16 週齢ともに、mSOD1 群と WT 群の比較において、mSOD1 群は有意に低い値を示した(8week : mSOD1, 1361.6±26.08 μm^2 , WT, 1567.6±56.12 μm^2 , $p=0.010$, 16week : mSOD1, 1200.8±80.18 μm^2 , WT, 1671.2±56.12 μm^2 , $p=0.023$, student-*t* test, Figure 4e)。

咬筋及び腓腹筋の筋線維タイプ割合

骨格筋線維は、発現する MyHC により、MyHC- I , MyHC- II a, MyHC- II b, MyHC-

IIx の 4 種に大別される。遅筋線維は MyHC- I として、速筋線維は MyHC- II の 3 種に分類される³⁴。本研究では、MyHC- I, MyHC- II a, MyHC- II b 線維について検討した (Figure 5a)。咬筋、腓腹筋ともに各筋線維タイプ別の割合は MyHC- II b>MyHC- II a>MyHC- I であった。咬筋、腓腹筋ともに速筋有意で筋線維タイプごとの占有率は同様であった。咬筋では、各線維タイプにおいて、8 週齢、16 週齢ともに、mSOD1 群と WT 群の比較において、有意差を認めなかった (Figure 5b)。腓腹筋において、MyHC- I、MyHC- II a では、8 週齢、16 週齢ともに、mSOD1 群と WT 群との比較で、有意差を認めなかった。MyHC- II b では、8 週齢では mSOD1 群と WT 群の比較において、有意差を認めなかったが、16 週齢では mSOD1 群は WT 群と比較し、有意に低い値を示した (16week : mSOD1, 0.522 ± 0.018 , WT, 0.694 ± 0.037 , $p < 0.001$, student-*t* test Figure 5c)。

咬筋及び腓腹筋の筋線維核及び筋衛星細胞

咬筋及び腓腹筋を Pax7、Laminin、DAPI にて蛍光免疫染色し、筋線維核数及び筋衛星細胞数を測定した (Figure 6a)。筋線維核において咬筋では、mSOD1 群、WT 群ともに 8 週齢と 16 週齢で有意差を認めなかった (Figure 6b)。腓腹筋では、WT 群では 8 週齢と 16 週齢で有意差を認めなかったが、mSOD1 群では 8 週齢と比較し 16 週齢で筋線維核数は有意に減少した (mSOD1 : 8w, myonucleus= 2.772 ± 0.161 , 16week,

myonucleus= 1.719 ± 0.608 , $p=0.010$, student- t test Figure 6c)。筋衛星細胞において、咬筋は腓腹筋と比較し、約 2 倍の筋衛星細胞数を示した。咬筋では、WT 群は 8 週齢と比較し 16 週齢で増加傾向を認めたが有意差は認めなかったが、mSOD1 群の筋衛星細胞数は 8 週齢と比較し 16 週齢で有意な増加を認めた。(mSOD1 : 8week, satellite cells= 7.13 ± 3.86 , 16week, satellite cells= 14.69 ± 5.92 , $p=0.044$, student- t test Figure 6d)。

腓腹筋では、mSOD1 群、WT 群ともに 8 週齢と比較し 16 週齢で筋衛星細胞数の増加傾向を認めたが、有意差は認めなかった (mSOD1 : 8week, satellite cells= 3.26 ± 0.16 , 16week, satellite cells= 6.59 ± 1.851 , $p=0.11$, WT : 8week, satellite cells= 3.45 ± 1.04 , 16week, satellite cells= 3.86 ± 1.52 , $p=0.83$, student- t test Figure 6e)。

考察

本研究において、SOD1G93A マウスの咀嚼筋である咬筋の筋体積は発症後末期まで減少せず、咀嚼機能も温存された。発症前後で免疫組織学的検討を行ったところ、咬筋における筋線維断面積が維持され、筋衛星細胞数の増加と筋線維核数の維持を認めた。本研究より、SOD1G93A マウスにおいて咬筋は筋萎縮に耐性があり、発症後も咀嚼機能が維持される可能性が示唆された。

SOD1G93A マウスにおける行動生理学的検討

ALS 患者では、しばしば短期間に急激な体重減少を伴い、その原因は骨格筋量の減少、嚥下障害のほかに代謝機能亢進が指摘されている²。SOD1G93A マウスにおいては疾患の進行とともに体重が減少することが確認されているが、体重減少の時期については報告により異なる。本研究において、SOD1G93A マウスは発症後、緩やかな体重減少傾向を認めたが、末期においても顕著な体重減少は認めなかった。過去に同モデルマウスを用いた研究において、体重は発症後も増加し、末期に減少する報告があり、本研究結果はこの報告と類似するものと考え^{35,49-51}。一方、発症後から体重減少を認める報告もあり、同モデルマウスの体重減少は疾患の進行の正確な指標となるものではない可能性が示唆された^{17,35,52}。

摂食機能において、SOD1G93A マウスは発症後も摂食時間、摂食量ともに低下を認め

ず、北岡らの報告と一致した⁹。しかしながら咀嚼運動パターン形成に関わる三叉神経運動ニューロン (MoV) や三叉神経中脳路核ニューロン (MesV) などの咀嚼中枢において、新生児期から成熟期にかけて発火異常が報告されており、他の運動中枢と同様に咀嚼中枢が障害されることが示唆されている^{9,19,20}。ALS 患者において陰性症状を示すことで知られる眼球運動は、その運動を司る外眼筋の支配神経においても障害されないことが報告されており²⁰、その点で咀嚼筋とは異なる。このことから咀嚼筋に、ALS の筋萎縮に抵抗する因子がある可能性が示唆された。

四肢運動機能において SOD1G93A マウスは、握力低下はトレッドミル走行より早期に有意な低下が認められ、後肢は前肢と比較し早期に機能低下を認めた。この傾向は筋体積の変化と一致しており、運動機能の低下は先行研究でも複数報告されている^{51,53}。Oliván, S. らの報告では、同モデルマウスのトレッドミル走行にて 104 日齢から運動機能の異常を認めており本研究結果と一致するものであった¹⁸。

マイクロ CT 画像を用いた筋体積測定において、SOD1G93A マウスの咬筋体積は発症後も減少せず保存される可能性が示唆された。これまで、ALS では嚥下における口腔期で咀嚼筋力が低下すると考えられてきたが、具体的に咀嚼筋の評価はなされていない⁵⁴。本研究の結果は ALS が咀嚼筋に与える影響について、新たな可能性を示すものであると考える。

四肢骨格筋体積において、同じモデルマウスを用いた先行研究では、下肢の筋肉量は発症 4 週齢前である 8 週齢から減少を認めている⁴²。本研究においても 8 週齢以降、後肢筋群の体

積は減少に転じており同様の傾向を認めた。同モデルマウスでは、疾患の進行に伴い前肢握力が低下することが報告されており、前肢筋群も後肢筋群と同様に骨格筋体積の減少が予想された⁵³。本研究においても、有意差は認めなかったが、mSOD1 群の前肢筋群の体積は10 週齢以降で減少しており、前肢筋群も症状進行とともに障害されたと考える。トレッドミル走行と比較し、握力測定でより早期に筋機能低下が認められた理由に、本研究で実施した握力測定方法はより速筋有意な運動であることが考えられる。ALS では速筋有意に筋萎縮が起こることが報告されており³¹、本研究の結果は速筋線維が早期に障害されたことを機能面から示すものと考ええる。

本研究では、姿勢による筋体積計測誤差を可能な限り少なくするため、幼児期の4 週齢から成熟期の20 週齢まで同一の姿勢で撮影できるよう撮影台を作成し、筋体積が接地による影響を受けないよう設計した。SOD1G93A マウスに限らず、本研究のようにモデル動物の筋体積を経時的に測定する際、一般的にはMRI が用いられることが多い^{16,42,43,55}。Pasetto らは造影剤を用いない後肢マイクロ CT 画像でも SOD1G93A マウスにて MRI と同時期から筋肉量の減少を観測できることを報告しており¹⁵、本研究においても同様に造影剤を用いず咬筋体積の測定が可能であることが分かった。同一の個体を経時的に計測する手法は、計測する週齢ごとに動物を用意する方法と比較し実験に必要な動物数を減らすだけでなく、標準化することでマウスの個体差を除き、投薬による変化を観察できるなど利点が多い¹⁵。また、本研究における計測方法は、筋疾患モデルマウスだけでなく、咀嚼運動における咬筋

の影響を研究する際にも応用できると考える。

SOD1G93A マウスの咬筋及び腓腹筋における免疫組織学的検討

SOD1G93A マウスの腓腹筋において、末期で筋湿重量の顕著な減少を認めたが、咬筋では末期においても筋湿重量の顕著な減少を認めず、マイクロ CT 画像を用いた筋体積測定の結果と一致していた。咬筋、腓腹筋ともに末期においても、筋線維数の減少は認めなかったが、腓腹筋では末期に筋線維断面積の減少を認めるのに対して、咬筋では末期においても筋線維断面積の減少を認めなかった。過去の報告においても 8 週齢より後肢筋断面における筋線維径は減少を認めており、本研究の研究と同様の結果を示した⁴²。このことより腓腹筋の筋体積の減少は、筋線維数の減少によるものではなく個々の筋線維の萎縮によるものであり、咬筋の筋線維は ALS 進行に伴った萎縮に耐性があることが示唆された。

筋線維タイプにおいて、遅筋線維は MyHC- I が大部分である。速筋線維は MyHC- II が大部分を占め、複数のアイソタイプを持つ。アイソタイプのうち、MyHC- II b はもっとも速筋としての性質が強く、MyHC- II a は速筋線維ではあるが MyHC- II b 線維と比較しやや遅筋よりの中間線維と位置付けられる。本研究では、咬筋、腓腹筋ともに MyHC- II a、MyHC- II b 線維に富んだ速筋有意の骨格筋であり、これまでの報告と筋線維タイプ割合はおおむね一致していた^{48,56}。SOD1G93A マウスにおいて、腓腹筋では末期で MyHC- II b 線維割合の減少を認めたが、咬筋では症状進行に伴った筋線維タイプ割合の変化を認めなかった。同マ

ウスを用いた過去の研究において、発症初期における筋力低下は遅筋より速筋で起こり、疾患の進行に伴い筋線維タイプ割合が速筋から遅筋に変化することが報告されている⁵⁷。本研究において、咬筋で筋線維タイプ割合の変化が認められなかったことは、咬筋が ALS による筋萎縮の影響を受けにくい可能性を補強するものであった。

生体マウスの咬筋は、本研究で染色したもの以外にも、成体に見られる MyHC-slow、MyHC- α 、MyHC-cardiac、MyHC-IIx に加え、発達段階で見られる MyHC-embryonic、MyHC-neonatal など複数のアイソタイプが存在することが報告されている^{56,58-60}。ALS による筋萎縮を受けにくい外眼筋は、上記に加え MyHC-exoc など、多様な MyHC を発現させるだけでなく、2 つ以上のアイソタイプを単一線維内に含むハイブリッドな筋線維からなる点で四肢骨格筋とは異なる筋組織である⁶¹。ヒトの閉口筋においても同様に、複数のアイソタイプが存在しており^{62,63}、ハイブリッドな線維が多いなど外眼筋と共通点があることが報告されている^{62,64,65}。この特徴は、咬筋が外眼筋同様に ALS における筋萎縮に耐性を示す一因である可能性がある。また、ヒトの閉口筋における速筋線維は四肢骨格筋と比較し直径が小さく、もともと四肢骨格筋における廃用性萎縮に似た組織像を示すという報告もある⁶²。このため速筋線維が障害されやすい ALS において、咬筋体積の変化は四肢骨格筋と比較し現れにくい可能性がある。

筋線維当たりの筋線維核数について、SOD1G93A マウスの腓腹筋では発症後に減少したが、咬筋では筋線維核数が維持されていた。過去の報告では、筋組織の肥大はタンパク質合

成の亢進と筋線維核数の増加が必要であることが報告されている⁶⁶。本研究において咬筋では筋線維核数が減少せず腓腹筋で減少したことは、筋体積の増減と一致しており、筋ごとの筋萎縮への抵抗性の差の一因である可能性がある。また、筋衛星細胞はこの筋線維核の増加に必須であることが知られており、筋肥大そのものに筋衛星細胞が必須かどうかは議論が分かれるが、重要な役割を果たしているという見方が強い^{23,67}。SOD1G93A マウスにおいて、咬筋は症状の進行とともに筋衛星細胞数の増加を認めた。ALS において特異的に筋萎縮の影響を受けない外眼筋は、筋衛星細胞数が多いことが報告されている^{30,68}。マウスの咬筋においても腓腹筋やヒラメ筋、横隔膜と比較し筋衛星細胞数が多く他の筋より再生能力が高い可能性が指摘されている⁶⁹。筋線維核含有量と筋体積には関連が指摘されており^{70,71}、SOD1G93A マウスの咬筋では、筋衛星細胞の増加により筋線維核数が維持され、筋体積が維持された可能性がある。

筋ジストロフィーなど筋損傷を伴う疾患において、筋衛星細胞の重要性が報告されているが、筋損傷を伴わない ALS における筋衛星細胞の働きは未だ不明な点が多い。筋衛星細胞の大部分は変性損傷の程度に関係なく過負荷がかかった筋線維内で活性化し増殖することが報告されている⁷²。本研究において、SOD1G93A マウスの咬筋では疾患の進行とともに筋衛星細胞の増加を認めたが、同モデルマウスにおける ALS 様症状の進行が骨格筋に負荷をかけた可能性も考えられる。これまで ALS 患者から分離培養した筋衛星細胞において、筋管形成能の異常や老化に似た機能異常が報告されており、SOD1G93A マウスでも同様の

報告がなされている^{69,70,18}。さらに ALS 以外の研究において、咬筋機能と筋衛星細胞数の関連が報告されている⁷³。今後の研究において咬筋より筋衛星細胞を分離し、ALS における咀嚼筋、摂食機能の維持に対する筋衛星細胞の関与について、その機能の詳細を確認する必要があると考える。

本研究にて、ALS の咬筋は筋体積が減少せず、咀嚼機能は温存される傾向にある可能性が示唆された。ALS 患者において顎運動は眼球運動と比較し、介助者が目視でも確認が容易であり、現在の視線追跡デバイスのような高価な設備がなくとも、呼びかけへの応答など簡単な意思表示手段として応用が期待できる。また骨格筋ごとに筋萎縮の違いを認めるメカニズムの解明は、骨格筋など末梢組織を標的とした ALS の新たな治療法につながる可能性がある。

結語

本研究では、SOD1G93A モデルマウスにおける摂食機能および咀嚼筋体積の経時的な検討及び、咀嚼筋、四肢骨格筋の組織学的検討を実施した。SOD1G93A マウスにおいて発症後末期まで摂食機能は維持され、四肢運動機能は減衰した。咬筋では、筋体積、筋湿重量、筋線維断面積に減少を認めず、筋線維タイプの変化も認めなかったことから ALS により障害されにくい可能性を認めた。咬筋で萎縮を認めなかった要因として、咬筋に存在する筋衛星細胞数が腓腹筋と比較し多いことや、そのために筋線維核が減少せず、筋組織として再生能を保ちやすいことが示唆された。今後さらなる筋萎縮メカニズムの違いを解明することで ALS の病態解明及び治療薬開発の一助としたい。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて戴き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座教授 田中晋先生に深甚なる謝意を表します。副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いきました同研究科顎口腔機能治療学講座教授 阪井丘芳先生、同研究科系統・神経解剖学講座教授 古田貴寛先生、同研究科口腔生理学講座准教授 豊田博紀先生に深甚なる謝意を表します。本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました、大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座助教 関壮樹先生に深甚なる謝意を表します。実験に際し、ご助言賜りました大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野教授 深田宗一朗先生、岩森歌奈子氏に深甚なる謝意を表します。実験遂行に際し機器の使用をはじめご助力頂きました大阪大学大学院医学系研究科附属共同研究実習センターの皆様には厚く御礼申し上げます。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮を頂きました、大阪大学歯学研究科顎顔面口腔外科学講座の教室員諸兄姉に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* *377*, 942-955. 10.1016/s0140-6736(10)61156-7.
2. Shimizu, T., Nakayama, Y., Matsuda, C., Haraguchi, M., Bokuda, K., Ishikawa-Takata, K., Kawata, A., and Isozaki, E. (2019). Prognostic significance of body weight variation after diagnosis in ALS: a single-centre prospective cohort study. *Journal of Neurology* *266*, 1412-1420. 10.1007/s00415-019-09276-2.
3. Brent, J.R., Franz, C.K., Coleman, J.M., 3rd, and Ajroud-Driss, S. (2020). ALS: Management Problems. *Neurol Clin* *38*, 565-575. 10.1016/j.ncl.2020.03.013.
4. Perry, B.J., Nelson, J., Wong, J.B., and Kent, D.M. (2022). Predicting dysphagia onset in patients with ALS: the ALS dysphagia risk score. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *23*, 271-278. 10.1080/21678421.2021.1961805.
5. Robison, R., DiBiase, L., Ashley, A., McElheny, K., Anderson, A., Wymer, J.P., and Plowman, E.K. (2022). Swallowing Safety and Efficiency Impairment Profiles in Individuals with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Dysphagia* *37*, 644-654. 10.1007/s00455-021-10315-2.
6. Sawada, H. (2017). Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* *18*, 735-738. 10.1080/14656566.2017.1319937.
7. Byrne, S., Walsh, C., Lynch, C., Bede, P., Elamin, M., Kenna, K., McLaughlin, R., and Hardiman, O. (2011). Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *82*, 623-627. 10.1136/jnnp.2010.224501.
8. Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front Aging Neurosci* *9*, 68. 10.3389/fnagi.2017.00068.
9. Kitaoka, Y., Seki, S., Kawata, S., Nishiura, A., Kawamura, K., Hiraoka, S.I., Kogo, M., and Tanaka, S. (2023). Analysis of Feeding Behavior Characteristics in the Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 (SOD1) SOD1G93A Mice Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Nutrients* *15*. 10.3390/nu15071651.
10. Seki, S., Tanaka, S., Yamada, S., Tsuji, T., Enomoto, A., Ono, Y., Chandler, S.H., and Kogo, M. (2020). Neuropeptide Y modulates membrane excitability in neonatal rat mesencephalic V neurons. *J Neurosci Res* *98*, 921-935. 10.1002/jnr.24583.
11. Tanaka, S., Seki, S., Ono, Y., Enomoto, A., and Kogo, M. (2021). Persistent sodium conductance contributes to orexin-A-mediated modulation of membrane excitability in

- neonatal rat mesencephalic V neurons. *Neurosci Lett* *753*, 135846. 10.1016/j.neulet.2021.135846.
12. Seki, S., Kitaoka, Y., Kawata, S., Nishiura, A., Uchihashi, T., Hiraoka, S.I., Yokota, Y., Isomura, E.T., Kogo, M., and Tanaka, S. (2023). Characteristics of Sensory Neuron Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): Potential for ALS Therapy. *Biomedicines* *11*. 10.3390/biomedicines11112967.
 13. Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., and et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* *362*, 59-62. 10.1038/362059a0.
 14. Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., and et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* *264*, 1772-1775. 10.1126/science.8209258.
 15. Pasetto, L., Olivari, D., Nardo, G., Trolese, M.C., Bendotti, C., Piccirillo, R., and Bonetto, V. (2018). Micro-computed tomography for non-invasive evaluation of muscle atrophy in mouse models of disease. *PLoS One* *13*, e0198089. 10.1371/journal.pone.0198089.
 16. Brooks, K.J., Hill, M.D., Hockings, P.D., and Reid, D.G. (2004). MRI detects early hindlimb muscle atrophy in Gly93Ala superoxide dismutase-1 (G93A SOD1) transgenic mice, an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *NMR Biomed* *17*, 28-32. 10.1002/nbm.861.
 17. Weydt, P., Hong, S.Y., Klot, M., and Möller, T. (2003). Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* *14*, 1051-1054. 10.1097/01.wnr.0000073685.00308.89.
 18. Manzano, R., Toivonen, J.M., Calvo, A.C., Oliván, S., Zaragoza, P., Rodellar, C., Montarras, D., and Osta, R. (2013). Altered in vitro proliferation of mouse SOD1-G93A skeletal muscle satellite cells. *Neurodegener Dis* *11*, 153-164. 10.1159/000338061.
 19. Seki, S., Yamamoto, T., Quinn, K., Spigelman, I., Pantazis, A., Olcese, R., Wiedau-Pazos, M., Chandler, S.H., and Venugopal, S. (2019). Circuit-Specific Early Impairment of Proprioceptive Sensory Neurons in the SOD1(G93A) Mouse Model for ALS. *J Neurosci* *39*, 8798-8815. 10.1523/jneurosci.1214-19.2019.
 20. Venugopal, S., Hsiao, C.F., Sonoda, T., Wiedau-Pazos, M., and Chandler, S.H. (2015). Homeostatic dysregulation in membrane properties of masticatory motoneurons compared with oculomotor neurons in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* *35*, 707-720. 10.1523/jneurosci.1682-14.2015.
 21. Hwang, C.S., Weng, H.H., Wang, L.F., Tsai, C.H., and Chang, H.T. (2014). An eye-

- tracking assistive device improves the quality of life for ALS patients and reduces the caregivers' burden. *J Mot Behav* *46*, 233-238. 10.1080/00222895.2014.891970.
22. Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., and Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *Febs j* *280*, 4294-4314. 10.1111/febs.12253.
 23. Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., and Gundersen, K. (2016). Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development* *143*, 2898-2906. 10.1242/dev.134411.
 24. Fukada, S., Ma, Y., Ohtani, T., Watanabe, Y., Murakami, S., and Yamaguchi, M. (2013). Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Front Physiol* *4*, 317. 10.3389/fphys.2013.00317.
 25. Fry, C.S., Lee, J.D., Jackson, J.R., Kirby, T.J., Stasko, S.A., Liu, H., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2014). Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. *Faseb j* *28*, 1654-1665. 10.1096/fj.13-239426.
 26. Feng, X., Naz, F., Juan, A.H., Dell'Orso, S., and Sartorelli, V. (2018). Identification of Skeletal Muscle Satellite Cells by Immunofluorescence with Pax7 and Laminin Antibodies. *J Vis Exp*. 10.3791/57212.
 27. Fukuda, S., Kaneshige, A., Kaji, T., Noguchi, Y.T., Takemoto, Y., Zhang, L., Tsujikawa, K., Kokubo, H., Uezumi, A., Maehara, K., et al. (2019). Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. *Elife* *8*. 10.7554/eLife.48284.
 28. Rahmati, M., McCarthy, J.J., and Malakoutinia, F. (2022). Myonuclear permanence in skeletal muscle memory: a systematic review and meta-analysis of human and animal studies. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* *13*, 2276-2297. 10.1002/jcsm.13043.
 29. Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E., Andersen, P., and Jansson, E. (1977). Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann N Y Acad Sci* *301*, 3-29. 10.1111/j.1749-6632.1977.tb38182.x.
 30. Ciciliot, S., Rossi, A.C., Dyar, K.A., Blaauw, B., and Schiaffino, S. (2013). Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* *45*, 2191-2199. 10.1016/j.biocel.2013.05.016.
 31. Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig - Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.L., Zoll, J., Echaniz - Laguna, A., Loeffler, J.P., and René, F. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine* *7*, 526-546. 10.15252/emmm.201404433.
 32. Kida, K., Tsuji, T., Tanaka, S., and Kogo, M. (2015). Zinc deficiency with reduced

- mastication impairs spatial memory in young adult mice. *Physiol Behav* *152*, 231-237. 10.1016/j.physbeh.2015.10.005.
33. De Giorgio, F., Maduro, C., Fisher, E.M.C., and Acevedo-Arozena, A. (2019). Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech* *12*. 10.1242/dmm.037424.
 34. Azzouz, M., Leclerc, N., Gurney, M., Warter, J.M., Poindron, P., and Borg, J. (1997). Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* *20*, 45-51. 10.1002/(sici)1097-4598(199701)20:1<45::aid-mus6>3.0.co;2-h.
 35. Oliván, S., Calvo, A.C., Rando, A., Muñoz, M.J., Zaragoza, P., and Osta, R. (2015). Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Anim* *64*, 147-153. 10.1538/expanim.14-0077.
 36. Ushimura, A., Tsuji, T., Tanaka, S., Kogo, M., and Yamamoto, T. (2015). Neuropeptide-Y modulates eating patterns and masticatory muscle activity in rats. *Behavioural Brain Research* *278*, 520-526. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.031>.
 37. Reynolds, J.C., and Lee, C. (2020). Mouse Fitness as Determined Through Treadmill Running and Walking. *Methods Mol Biol* *2144*, 57-65. 10.1007/978-1-0716-0592-9_5.
 38. Muramatsu, H., Kuramochi, T., Katada, H., Ueyama, A., Ruike, Y., Ohmine, K., Shida-Kawazoe, M., Miyano-Nishizawa, R., Shimizu, Y., Okuda, M., et al. (2021). Novel myostatin-specific antibody enhances muscle strength in muscle disease models. *Scientific Reports* *11*, 2160. 10.1038/s41598-021-81669-8.
 39. Onoki, T., Izumi, Y., Takahashi, M., Murakami, S., Matsumaru, D., Ohta, N., Wati, S.M., Hatanaka, N., Katsuoka, F., Okutsu, M., et al. (2021). Skeletal muscle-specific Keap1 disruption modulates fatty acid utilization and enhances exercise capacity in female mice. *Redox Biol* *43*, 101966. 10.1016/j.redox.2021.101966.
 40. Takeshita, H., Yamamoto, K., Nozato, S., Inagaki, T., Tsuchimochi, H., Shirai, M., Yamamoto, R., Imaizumi, Y., Hongyo, K., Yokoyama, S., et al. (2017). Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci Rep* *7*, 42323. 10.1038/srep42323.
 41. Jeffery, N., and Mendias, C. (2014). Endocranial and masticatory muscle volumes in myostatin-deficient mice. *R Soc Open Sci* *1*, 140187. 10.1098/rsos.140187.
 42. Marcuzzo, S., Zucca, I., Mastropietro, A., de Rosbo, N.K., Cavalcante, P., Tartari, S., Bonanno, S., Preite, L., Mantegazza, R., and Bernasconi, P. (2011). Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: A longitudinal MRI study. *Experimental Neurology* *231*, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.05.007>.

43. Heier, C.R., Gueron, A.D., Korotcov, A., Lin, S., Gordish-Dressman, H., Fricke, S., Sze, R.W., Hoffman, E.P., Wang, P., and Nagaraju, K. (2014). Non-Invasive MRI and Spectroscopy of mdx Mice Reveal Temporal Changes in Dystrophic Muscle Imaging and in Energy Deficits. *PLOS ONE* *9*, e112477. 10.1371/journal.pone.0112477.
44. Kaneshige, A., Kaji, T., Saito, H., Higashimoto, T., Nakamura, A., Kurosawa, T., Ikemoto-Uezumi, M., Uezumi, A., and Fukada, S.I. (2022). Detection of muscle stem cell-derived myonuclei in murine overloaded muscles. *STAR Protoc* *3*, 101307. 10.1016/j.xpro.2022.101307.
45. Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M., Zhou, H., Kurosawa, T., Yoshimoto, Y., Nakatani, M., Hitachi, K., Yamaguchi, H., Wakatsuki, S., Araki, T., et al. (2021). Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *The Journal of Clinical Investigation* *131*. 10.1172/JCI139617.
46. Hung, Y.L., Sato, A., Takino, Y., Ishigami, A., and Machida, S. (2022). Influence of oestrogen on satellite cells and myonuclear domain size in skeletal muscles following resistance exercise. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* *13*, 2525-2536. 10.1002/jcsm.13031.
47. Ozawa, T., Miyazono, K., and Morikawa, M. (2021). Preparation of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein and evaluation of its effects on muscle mass in mice. *STAR Protoc* *2*, 100839. 10.1016/j.xpro.2021.100839.
48. Villalón, E., Lee, N.N., Marquez, J., and Lorson, C.L. (2019). Muscle fiber-type selective propensity to pathology in the nmd mouse model of SMARD1. *Biochem Biophys Res Commun* *516*, 313-319. 10.1016/j.bbrc.2019.06.117.
49. Azari, M.F., Profyris, C., Le Grande, M.R., Lopes, E.C., Hirst, J., Petratos, S., and Cheema, S.S. (2005). Effects of intraperitoneal injection of Rofecoxib in a mouse model of ALS. *Eur J Neurol* *12*, 357-364. 10.1111/j.1468-1331.2004.00987.x.
50. Hayworth, C.R., and Gonzalez-Lima, F. (2009). Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6.SOD1(G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* *164*, 975-985. 10.1016/j.neuroscience.2009.08.031.
51. Smittkamp, S.E., Brown, J.W., and Stanford, J.A. (2008). Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice. *Neuroscience* *151*, 613-621. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.017>.
52. Tankersley, C.G., Haenggeli, C., and Rothstein, J.D. (2007). Respiratory impairment in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Appl Physiol* (1985) *102*, 926-932. 10.1152/jappphysiol.00193.2006.
53. Hwee, D.T., Kennedy, A., Ryans, J., Russell, A.J., Jia, Z., Hinken, A.C., Morgans, D.J., Malik, F.I., and Jasper, J.R. (2014). Fast skeletal muscle troponin activator tirasemtiv increases muscle function and performance in the B6SJL-SOD1G93A ALS mouse model.

- PLoS One 9, e96921. 10.1371/journal.pone.0096921.
54. Ruoppolo, G., Schettino, I., Frasca, V., Giacomelli, E., Prosperini, L., Cambieri, C., Roma, R., Greco, A., Mancini, P., De Vincentiis, M., et al. (2013). Dysphagia in amyotrophic lateral sclerosis: prevalence and clinical findings. *Acta Neurol Scand* 128, 397-401. 10.1111/ane.12136.
 55. Zhang, J., Zhang, G., Morrison, B., Mori, S., and Sheikh, K.A. (2008). Magnetic resonance imaging of mouse skeletal muscle to measure denervation atrophy. *Exp Neurol* 212, 448-457. 10.1016/j.expneurol.2008.04.033.
 56. Widmer, C.G., Morris-Wiman, J.A., and Nekula, C. (2002). Spatial distribution of myosin heavy-chain isoforms in mouse masseter. *J Dent Res* 81, 33-38. 10.1177/002203450208100108.
 57. Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1^{G93A} transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology* 586, 3337-3351. 10.1113/jphysiol.2007.149286.
 58. Bottinelli, R., and Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73, 195-262. 10.1016/s0079-6107(00)00006-7.
 59. Eason, J.M., Schwartz, G.A., Pavlath, G.K., and English, A.W. (2000). Sexually dimorphic expression of myosin heavy chains in the adult mouse masseter. *J Appl Physiol* (1985) 89, 251-258. 10.1152/jappl.2000.89.1.251.
 60. d'Albis, A., Janmot, C., and Bechet, J.J. (1986). Comparison of myosins from the masseter muscle of adult rat, mouse and guinea-pig. Persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur J Biochem* 156, 291-296. 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09580.x.
 61. Ahmadi, M., Liu, J.-X., Brännström, T., Andersen, P.M., Stål, P., and Pedrosa-Domellöf, F. (2010). Human Extraocular Muscles in ALS. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51, 3494-3501. 10.1167/iovs.09-5030.
 62. Sciote, J.J., Rowleron, A.M., Hopper, C., and Hunt, N.P. (1994). Fibre type classification and myosin isoforms in the human masseter muscle. *J Neurol Sci* 126, 15-24. 10.1016/0022-510x(94)90089-2.
 63. Butler-Browne, G.S., Eriksson, P.O., Laurent, C., and Thornell, L.E. (1988). Adult human masseter muscle fibers express myosin isozymes characteristic of development. *Muscle Nerve* 11, 610-620. 10.1002/mus.880110614.
 64. Monemi, M., Eriksson, P.O., Dubail, I., Butler-Browne, G.S., and Thornell, L.E. (1996). Fetal myosin heavy chain increases in human masseter muscle during aging. *FEBS Lett* 386, 87-90. 10.1016/0014-5793(96)00402-4.
 65. Monemi, M., Kadi, F., Liu, J.X., Thornell, L.E., and Eriksson, P.O. (1999). Adverse

- changes in fibre type and myosin heavy chain compositions of human jaw muscle vs. limb muscle during ageing. *Acta Physiol Scand* *167*, 339-345. 10.1046/j.1365-201x.1999.00624.x.
66. Bamman, M.M., Roberts, B.M., and Adams, G.R. (2018). Molecular Regulation of Exercise-Induced Muscle Fiber Hypertrophy. *Cold Spring Harb Perspect Med* *8*. 10.1101/cshperspect.a029751.
 67. McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* *138*, 3657-3666. 10.1242/dev.068858.
 68. Kallestad, K.M., Hebert, S.L., McDonald, A.A., Daniel, M.L., Cu, S.R., and McLoon, L.K. (2011). Sparing of extraocular muscle in aging and muscular dystrophies: a myogenic precursor cell hypothesis. *Exp Cell Res* *317*, 873-885. 10.1016/j.yexcr.2011.01.018.
 69. Yamane, A., Akutsu, S., Diekwisch, T.G., and Matsuda, R. (2005). Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damage in mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol* *289*, C42-48. 10.1152/ajpcell.00577.2004.
 70. Hansson, K.A., Eftestøl, E., Bruusgaard, J.C., Juvkam, I., Cramer, A.W., Malthe-Sørensen, A., Millay, D.P., and Gundersen, K. (2020). Myonuclear content regulates cell size with similar scaling properties in mice and humans. *Nat Commun* *11*, 6288. 10.1038/s41467-020-20057-8.
 71. Cramer, A.A.W., Prasad, V., Eftestøl, E., Song, T., Hansson, K.A., Dugdale, H.F., Sadayappan, S., Ochala, J., Gundersen, K., and Millay, D.P. (2020). Nuclear numbers in syncytial muscle fibers promote size but limit the development of larger myonuclear domains. *Nat Commun* *11*, 6287. 10.1038/s41467-020-20058-7.
 72. Fukada, S.-i., Akimoto, T., and Sotiropoulos, A. (2020). Role of damage and management in muscle hypertrophy: Different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1867*, 118742. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118742>.
 73. MA, K., S, G., EM, B., CE, C., S, K., and JW, V.d.H. (2014). Reduced masticatory function is related to lower satellite cell numbers in masseter muscle. *European journal of orthodontics* *36*. 10.1093/ejo/cjs044.

Figure 1

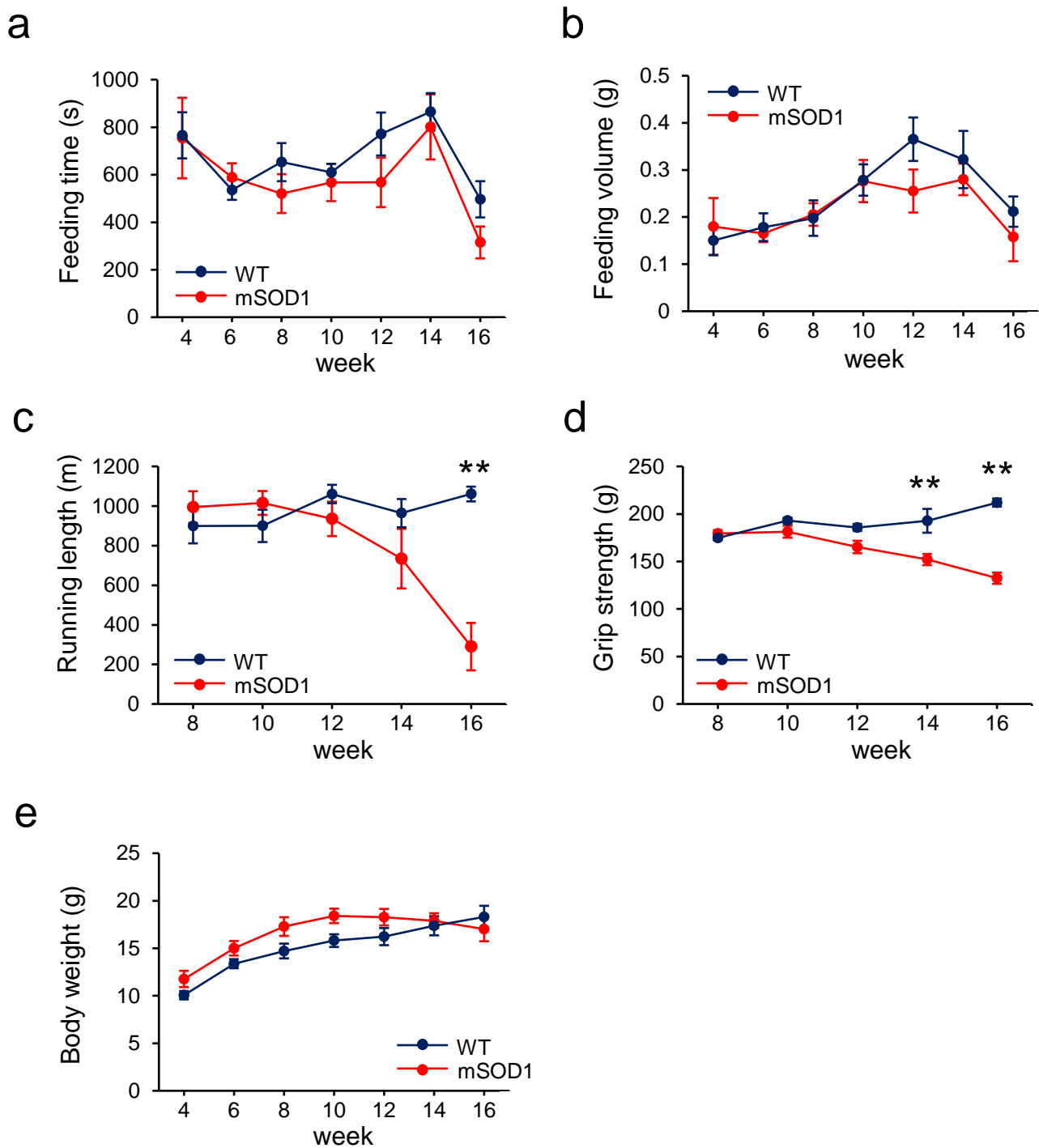
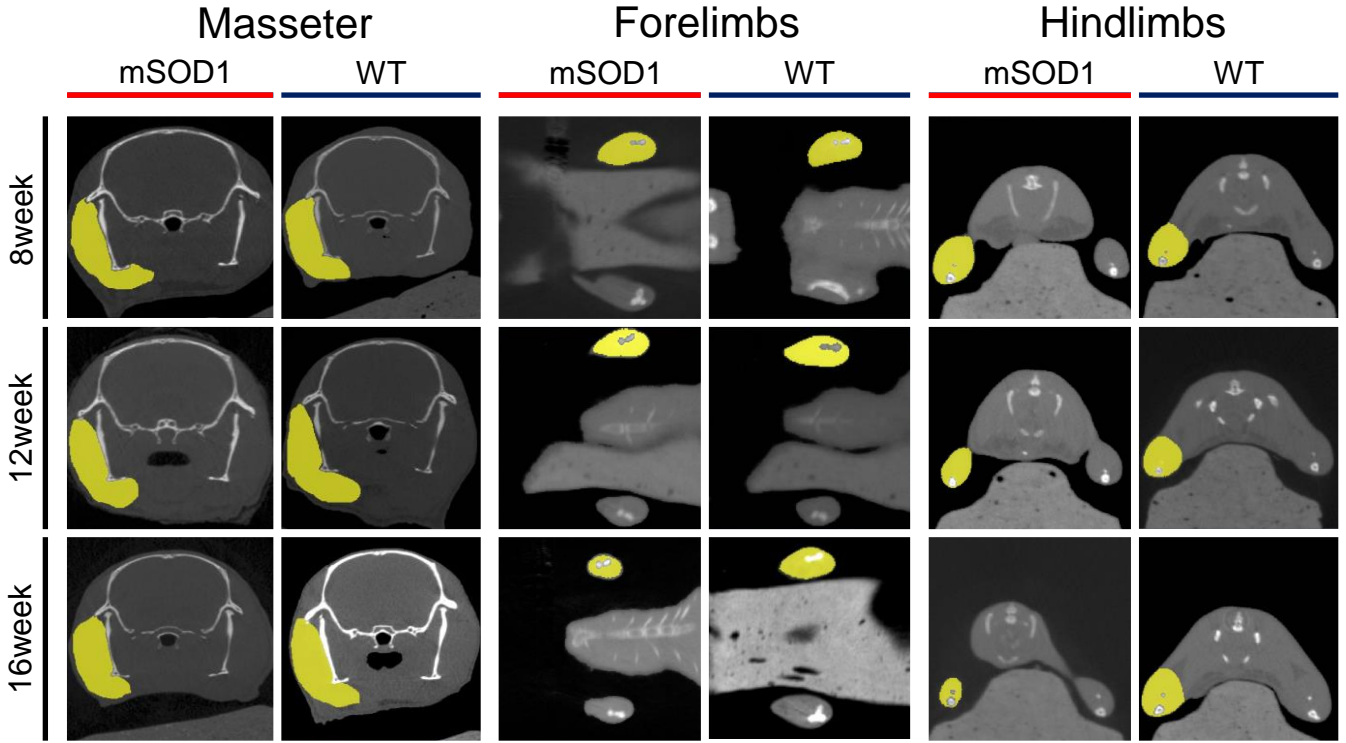


Figure 1 : 摂食機能、運動機能および体重の経時的変化

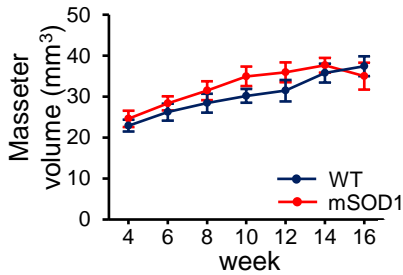
(a) (b) 4週齢から16週齢までの摂食時間及び総摂食量。摂食機能において、摂食時間、摂食量は両群間で有意差を認めなかった。(c) 4週齢から16週齢までのトレッドミル走行距離。トレッドミル走行は16週齢からmSOD1群で有意な走行距離の減少を認めた (mSOD1 (n=11), WT (n=10), repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, $p=0.003$, $**p<0.01$)。(d) 4週齢から16週齢までの四肢握力。握力は14週齢からSOD1群で有意な低下を認めた (mSOD1 (n=11), WT (n=10), repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, $p=0.002$, $**p<0.01$)。(e) 4週齢から16週齢までの体重。体重は、mSOD1群で10週齢から減少傾向を認めたが、有意差は認めなかった。

Figure 2

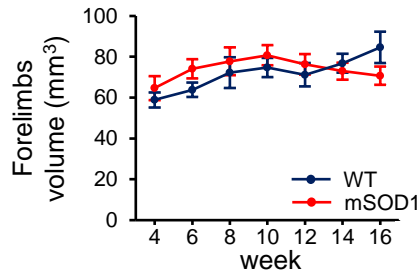
a



b



c



d

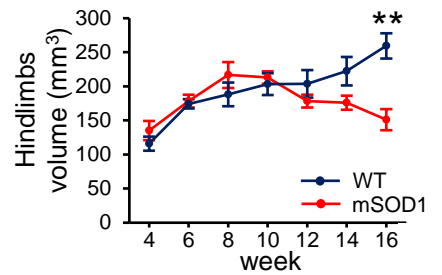
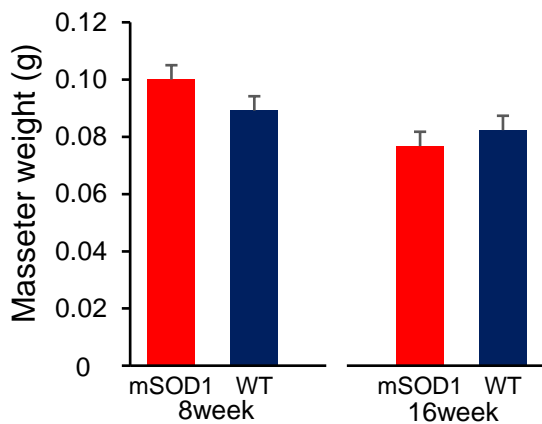


Figure 2: 咬筋及び四肢骨格筋の筋体積の経時的変化

(a) 8週齢、12週齢、16週齢における mSOD1群、WT群の咬筋、前肢筋群、後肢筋群のマイクロCT画像 (黄)。(b) 4週齢から16週齢までの咬筋体積変化。咬筋では両群間で有意差を認めなかった。(c) 4週齢から16週齢までの前肢筋群体積変化。前肢筋群では、SOD1群は10週齢以降で減少する傾向を認めたが、有意差は認めなかった。(d) 4週齢から16週齢までの後肢筋群体積変化。後肢筋群では、SOD1群は8週齢以降で減少傾向を認め、16週齢で有意な減少を認めた (mSOD1 (n=11), WT (n=10), repeated-measures ANOVA followed by Turkey-Kramer post hoc comparison, * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$)。

Figure 3

a



b

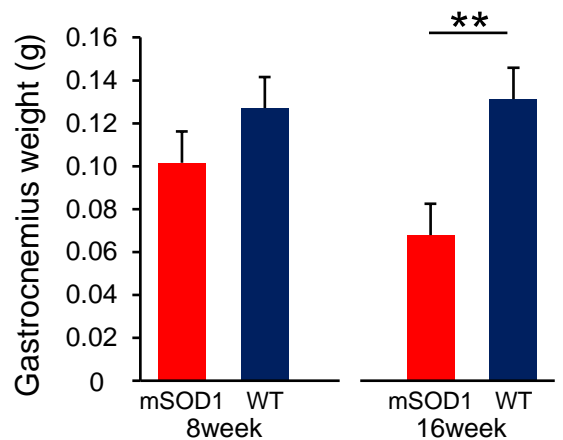
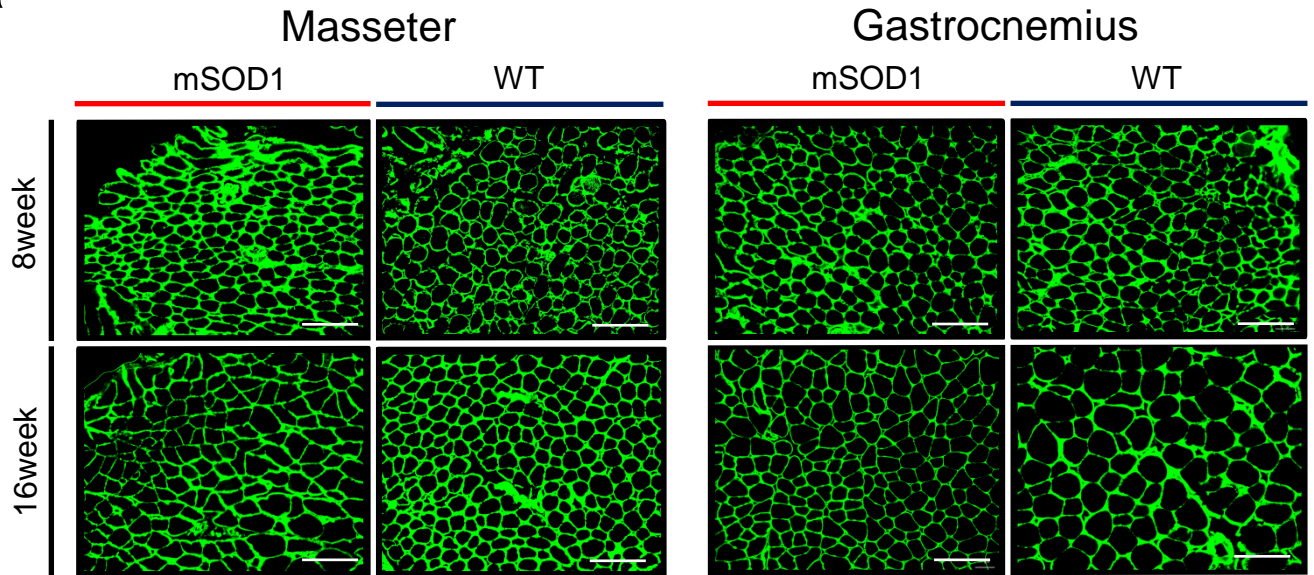


Figure 3 : 筋湿重量

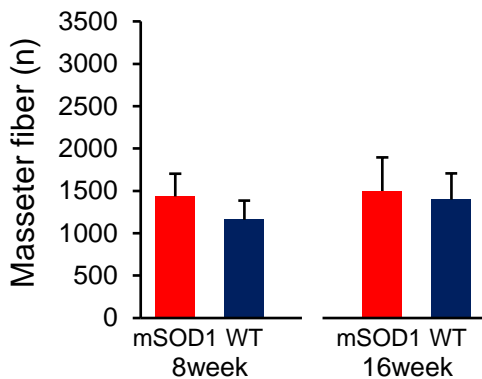
(a) 8週齢、16週齢におけるmSOD1群及びWT群の咬筋筋湿重量。両群間で有意差は認めなかった。(b) 8週齢、16週齢におけるmSOD1群及びWT群の腓腹筋筋湿重量。16週齢において、mSOD1群は、WT群と比較し有意に低い値を示した (8week (mSOD1: n=5, WT: n=5), 16week (mSOD1: n=5, WT: n=5), student-*t* test, $p < 0.01$, ** $p < 0.01$)。

Figure 4

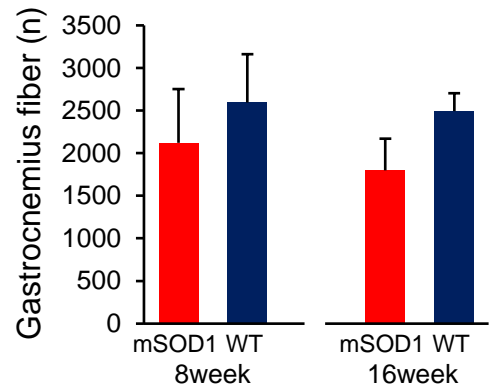
a



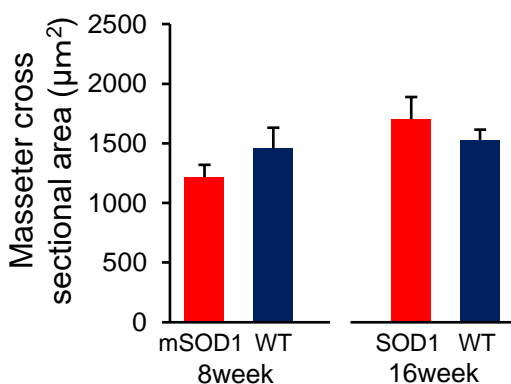
b



c



d



e

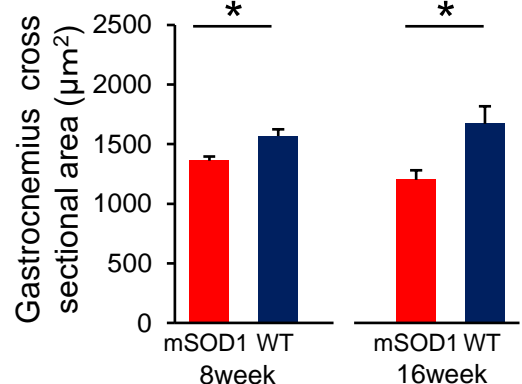
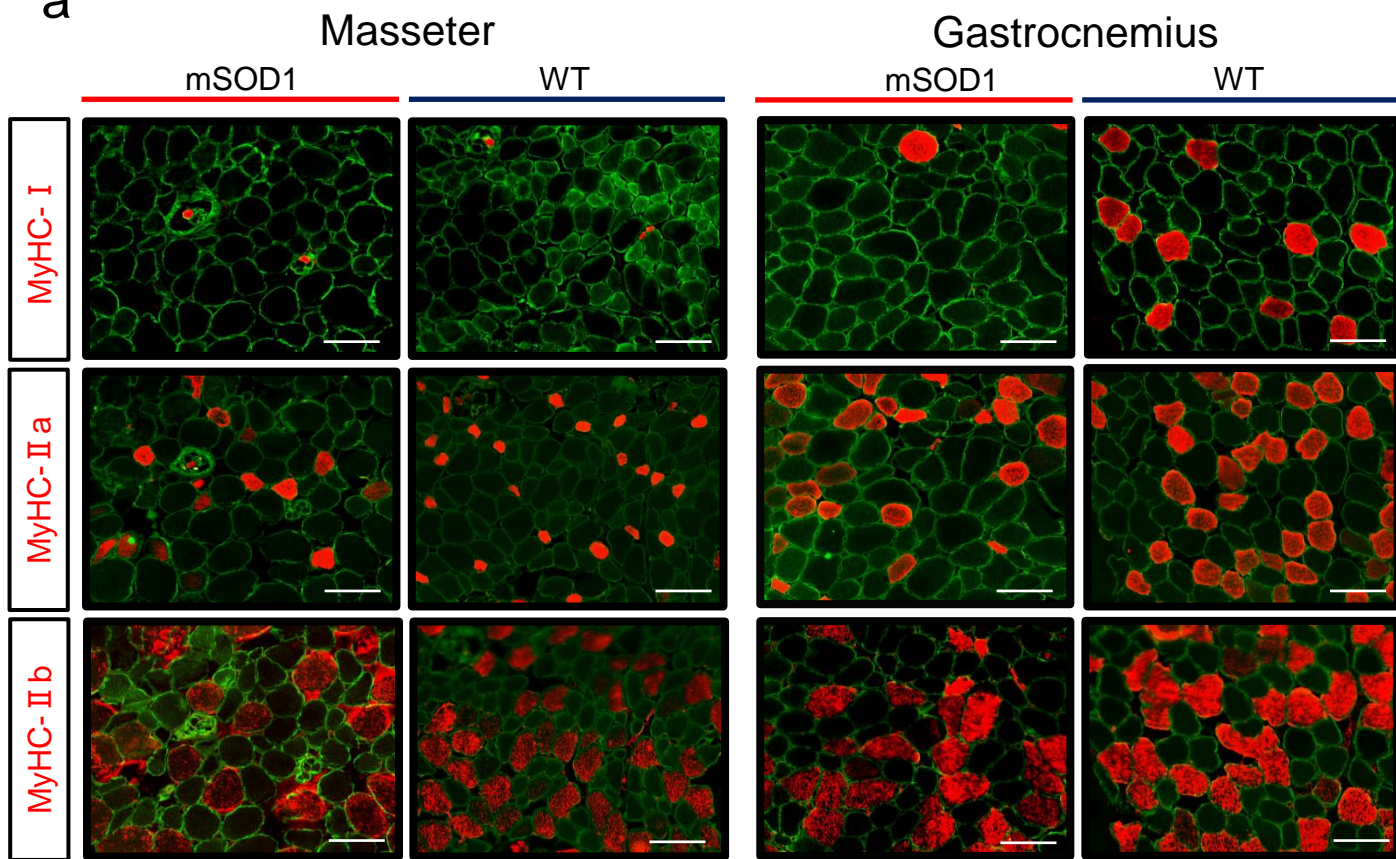


Figure 4 : 筋線維数と筋線維断面積

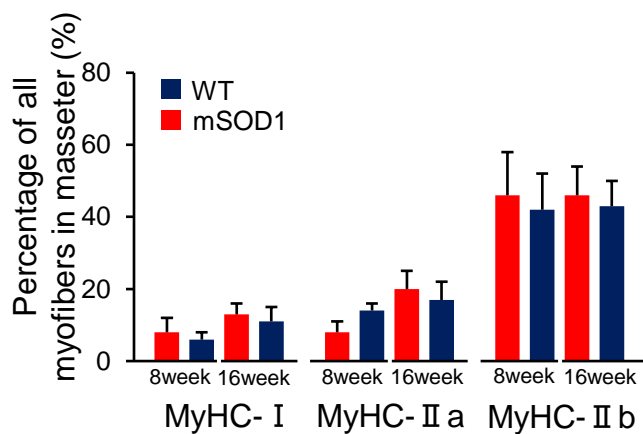
(a) 8週齢、16週齢の mSOD1群及び WT群の咬筋、腓腹筋における Laminin (緑) の蛍光免疫染色画像 (スケールバーは20μm)。(b) 8週齢、16週齢の mSOD1群および WT群の咬筋の筋線維数。咬筋の筋線維数は、群間で有意差を認めなかった。(c) 8週齢、16週齢の mSOD1群および WT群の腓腹筋の筋線維数。腓腹筋の筋線維数は、群間で有意差を認めなかった。(d) 8週齢、16週齢の mSOD1群および WT群の咬筋の筋線維断面積。咬筋の筋線維断面積は、群間で有意差を認めなかった。(e) 8週齢、16週齢の mSOD1群およびWT群の腓腹筋の筋線維断面積。腓腹筋の筋線維断面積は、8週齢、16週齢のそれぞれにおいて、mSOD1群が有意に低い値を示した (8week (mSOD1: n=5, WT: n=5), 16week (mSOD1: n=5, WT: n=5), student-*t* test, 8week : $p=0.010$, 16week : $p=0.022$, $*p<0.05$)。

Figure 5

a



b



c

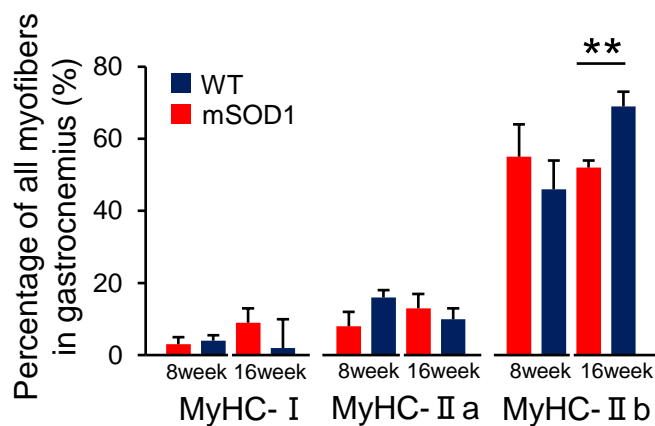


Figure 5: 筋線維タイプ割合

(a) 16週齢の mSOD1群及びWT群の咬筋、腓腹筋における Laminin (緑) および各 MyHC (赤) の蛍光免疫染色画像 (スケールバーは20 μ m)。 (b) 咬筋における筋線維タイプごとの割合。各筋線維タイプにおいて8週齢、16週齢ともに、mSOD1群、WT群間で有意差は認めなかった。 (c) 腓腹筋における筋線維タイプごとの割合。MyHC-IIb線維において、16週齢では mSOD1群がWT群と比較し有意に低い値を示した (MyHC-IIb, 16week (mSOD1: n=5, WT: n=5), student-*t* test, $p=0.003$, ** $p<0.01$)。

Figure 6

a

Masseter

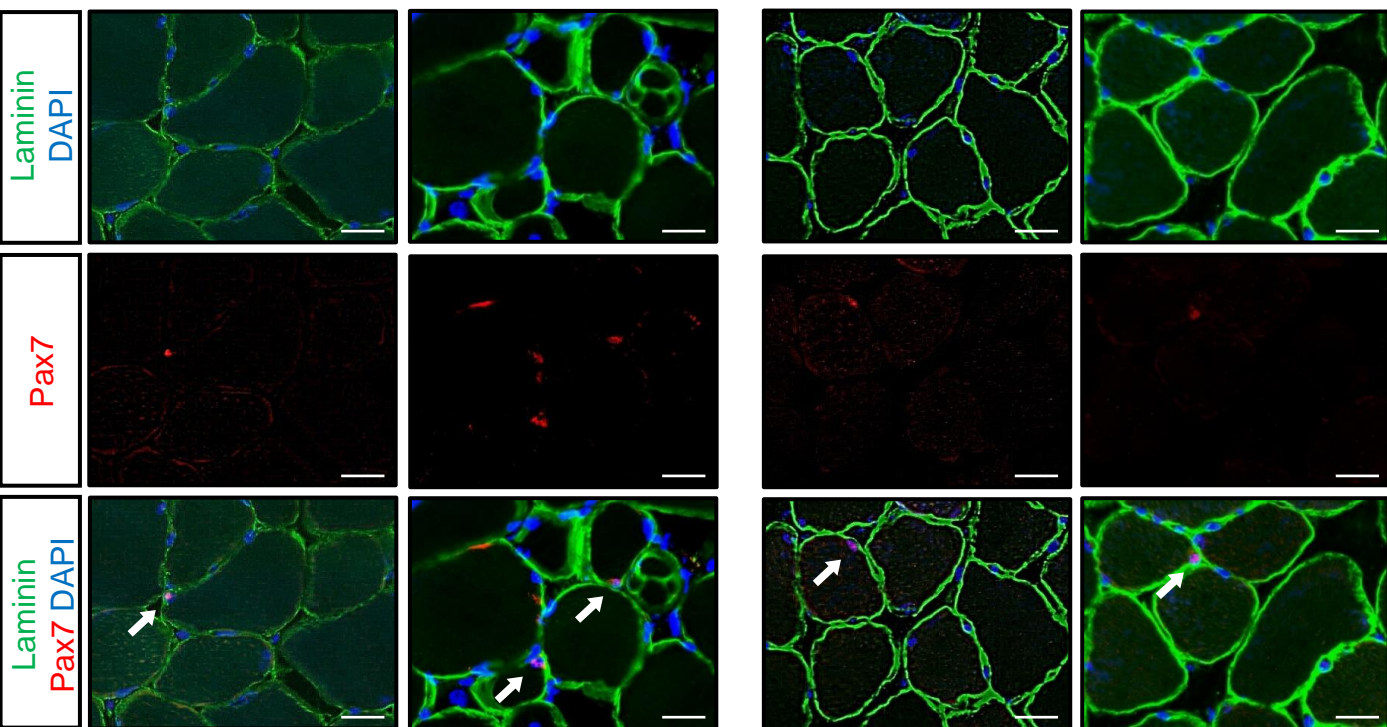
Gastrocnemius

8week

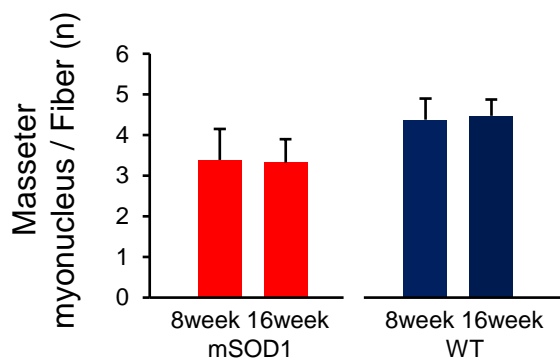
16week

8week

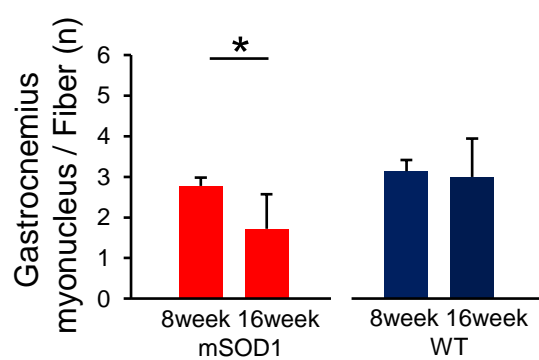
16week



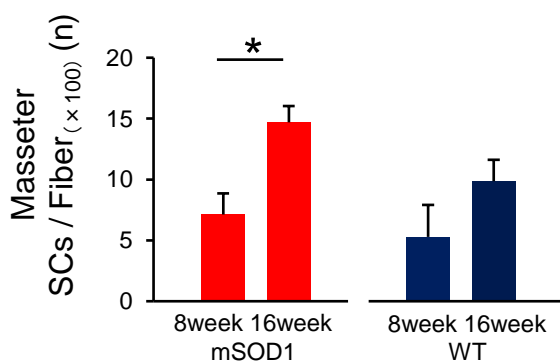
b



c



d



e

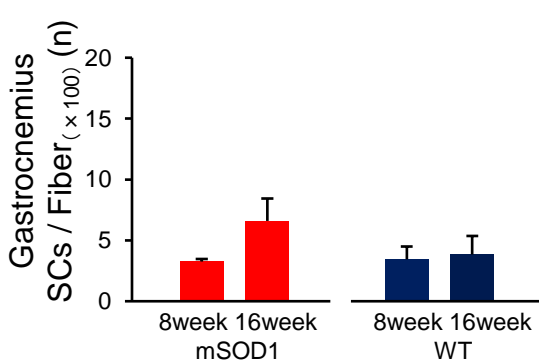


Figure 6 : 筋線維核及び筋衛星細胞

(a) 16週齢の mSOD1群の咬筋、腓腹筋における Laminin (緑)、DAPI (青) および Pax7 (赤) の蛍光免疫染色画像 (スケールバーは20 μ m)。矢印は筋衛星細胞を示す。(b) mSOD1群及び WT群における、咬筋の筋線維当たりの筋線維核数。週齢間で有意差を認めなかった。(c) mSOD1群及び WT群における、腓腹筋の筋線維当たりの筋線維核数。mSOD1群において8週齢と比較し16週齢で有意な減少を認めた。(mSOD1 (8week : n=5, 16week : n=5), WT (8week : n=5, 16week : n=5), student-*t* test $p=0.010$, $*p<0.05$)。(d) mSOD1群及び WT群における、咬筋の筋線維100本当たりの筋衛星細胞数。mSOD1群において8週齢と比較し16週齢で有意な増加を認めた。(mSOD1 (8week : n=5, 16week : n=5), WT (8week : n=5, 16week : n=5), student-*t* test, $p=0.040$, $*p<0.05$)。(e) mSOD1群及び WT群における、腓腹筋の筋線維100本当たりの筋衛星細胞数。週齢間で有意差を認めなかった。

Table 1. 各実験に使用したマウスの個体数

	WT	mSOD1
mouse	C57BL/6JmsSlc	B6SJL-Tg (SOD1G93A)1Gur/J
Behavioral physiological Experiments	10	11
Immunofluorescence	10	10

Table 2. 遺伝子型の判別に用いたプライマー

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Transgene	CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA	CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA
Internal Positive Control	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C

Table 3. 使用した抗体及び希釈濃度

	Dilution	Supplier	Antibody Registry ID
laminin α 2 (clone 4H8-2)	1:500	Enzo Life Sciences	AB_2051764
PAX7 Antibody (PA1-117)	1:200	Thermo Fisher	AB_2539886
BA-D5 (MyHC-I)	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank	AB_2235587
SC-71 (MyHC-IIa)	1:300	Developmental Studies Hybridoma Bank	AB_2147165
BF-F3 (MyHC-IIb)	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank	AB_2266724
Alexa Flaor 647 chicken anti Rat IgG(H+L)	1:1000	Thermo Fisher	AB_2535875
Alexa Flaor Plus 555 Goat anti Rabbit IgG (H+L)	1:1000	Thermo Fisher	AB_2633281
Alexa Flaor 546 goat anti Mouse IgG2b	1:1000	Thermo Fisher	AB_2535779
Alexa Flaor 546 goat anti Mouse IgM	1:1000	Thermo Fisher	AB_2535714
Alexa Flaor 546 goat anti Mouse IgG1	1:1000	Thermo Fisher	AB_2535765