

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01734

研究課題名(和文) 骨格筋アミノ酸代謝亢進シグナル伝播による中枢性疲労発症の解明

研究課題名(英文) Involvement of amino acid metabolite in skeletal muscle on the onset of exercise-induced central fatigue

研究代表者

宮崎 照雄 (Miyazaki, Teruo)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60532687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：持久性運動時は、エネルギー代謝の亢進に伴い骨格筋(筋)では分岐鎖アミノ酸バリンの中間代謝物である3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)が、筋より放出される。筋由来の3HIBが脳へ移行して中枢性疲労を惹起する可能性について、持久性運動による脳内3HIB濃度の変化と運動パフォーマンスとの関連性を検討した。ラットにおいて、トレッドミル走運動量に依存して筋3HIB濃度が増加し、それに相関して血清と脳組織中3HIB濃度が有意に増加した。さらに、3HIB腹腔内投与により脳内3HIB濃度を人為的に増加させると走行運動量が有意に減少したため、3HIBが運動誘発性の中枢性疲労の原因と1つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動誘発性の中枢性疲労の原因には、多くの説が唱えられているが、未だ明確に解明されていない。本研究では、骨格筋エネルギー代謝の変化に伴い骨格筋より放出されるアミノ酸中間代謝物が、脳内に取り込まれて蓄積し、運動パフォーマンスの低下をもたらした。そのため、本研究で得られた結果から、骨格筋のエネルギー代謝中間代謝物が、中枢性疲労の原因の1つである新たな可能性が示唆され、運動誘発性の中枢性疲労発症機序の解明に寄与する成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In endurance exercise, 3-hydroxyisobutyrate (3HIB) that is a valine intermediate in muscular energy metabolism is excreted from the skeletal muscles. This study investigated the hypothesis that the 3HIB accumulated in brain might be one of the reasons to cause the central fatigue in exercise. In the results, 3HIB concentration in rat brain was significantly increased by treadmill exercise in a running time dependent manner, and there were significant correlation relationships in 3HIB concentration among skeletal muscles, serum and brains. In the rats with the significantly increased 3HIB in brain by its ip injection, the exercise performance was significantly decreased. This study suggested that the 3HIB accumulation in brain by endurance exercise might be one of the reasons for the exercise-induced central fatigue.

研究分野：栄養エネルギー代謝

キーワード：中枢性疲労 持久性運動 エネルギー代謝 分岐鎖アミノ酸 骨格筋 脳

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

持久性運動時、エネルギー産生の需要が高まり、糖質・脂質をエネルギー源とするエネルギー代謝が亢進する。運動時間や強度の増加に伴い、第三のエネルギー源として、アミノ酸の燃焼が高まる。特に、骨格筋では、分岐鎖アミノ酸をエネルギー源とするエネルギー産生が亢進するが、骨格筋でのアミノ酸燃焼は、筋蛋白質の分解を伴う危険性があり、生体にとっては不利益な状況である。そのため、骨格筋のアミノ酸がエネルギー源として燃焼する様な末梢組織における栄養エネルギー代謝の変化を、中枢で把握して、身体活動の制御を必要がある。我々は、骨格筋において分岐鎖アミノ酸のバリンがエネルギー源として異化される際に生じる 3-ヒドロキシイノ酪酸(3HIB)に着目し、骨格筋から血中に放出される 3HIB の一部が、脳に移行して、末梢組織(骨格筋)での栄養エネルギー代謝状態(アミノ酸異化状態)を脳に伝えるシグナルとしての役割を担っているのではないかという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ラットを用いて、持久性運動時に骨格筋で増加する 3HIB の体内動態(脳組織への蓄積)と運動パフォーマンスとの関連性を明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

**検討1(持久性運動による体内 3HIB 動態):** Wistar 系雄性ラット(8週齢)を1週間の予備飼育後、トレッドミルにて6日間の予備走行学習を施した。その後、体重が均等になる様に、非走行運動群(0 分群/ $N=7$ )、30 分間走行運動群(30 分群/ $N=7$ )、60 分間走行運動群(60 分群/ $N=7$ )、120 分間走行運動群(120 分群/ $N=7$ )の四群に分けた。ラットを 24 時間絶食させ、トレッドミル上に 5 分間の安置させた後、30 分群、60 分群、120 分群に、20 m/min(傾斜 0°)にて、それぞれ 30 分、60 分、120 分間の一過性の走行運動を施した。0 分群には、トレッドミル上に 5 分間、安置した。運動負荷終了後、安楽死処理を行い、血液、下腿骨格筋(ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋)、肝臓、脳組織(大脳皮質、小脳、海馬)を採取し、分析まで、-80°Cにて保存した。各組織ならびに血清中の 3HIB 濃度を、我々が開発した HPLC-MS/MS 装置を用いた測定方法(Miyazaki *et al.* Springerplus. 2015)にて、定量した。

**検討2(3HIB 腹腔投与による脳内 3HIB 濃度の増加):** ラットを Saline 群、3HIB 投与 15 分群、3HIB 投与 60 分群の三群( $N=7$ /群)にわけ、3HIB 投与 15 分群と 3HIB 投与 60 分群には、60 mg/kg BW の 3HIB を腹腔内投与し、それぞれ 15 分後と 60 分後に、血液と上記各組織を採取した。Saline 群は、生理食塩水を同様に投与した。検討1と同様に、各組織中の 3HIB 濃度を定量した。

**検討3(脳内 3HIB 濃度の増加による運動パフォーマンスへの影響):** ラットを Saline-Ex 群と 3HIB-Ex 群の2群に( $N=7$ /群)にわけ、検討2と同様に、生理食塩水と 3HIB を投与した後に、疲労困憊までトレッドミル走行運動を施した。各群1匹を同時に走行させ、同一走行実験条件における疲労困憊に至るまでの時間を比較した。

### 4. 研究成果

### 検討1(持久性運動による体内 3HIB 動態):ラット

に、トレッドミルにて 0~120 分間の一過性走行運動を施した際の血液、下腿筋(腓腹筋, ヒラメ筋, 足底筋), 肝臓, 脳組織(大脳皮質, 小脳, 海馬)の 3HIB 濃度の変化を観察した。その結果, 運動時間の増加に伴い腓腹筋の 3HIB 濃度が有意に増加した(図1)。ヒラメ筋と足底筋における 3HIB 濃度も, 腓腹筋同様に, 運動時間依存的に有意

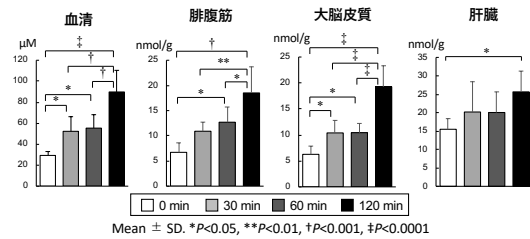


図1. ラット走行運動による血清・組織中3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)濃度の変化。ラットに、0, 30, 60, 120分間のトレッドミル走行運動(20m/min)を施した後、LC-MS/MS装置により、3HIB濃度を定量した。

に増加した。骨格筋 3HIB 濃度の増加に伴い, 血清中の 3HIB 濃度も運動時間依存的に増加した(図1)。さらに, 大脳皮質の 3HIB 濃度でも, 運動時間の増加に伴った有意な増加が確認された(図1)。小脳と海馬においても, 大脳皮質と同様に, 運動時間依存的に 3HIB 濃度が有意に増加した。一方, 肝臓の 3HIB 濃度は, 運動時間に依存した増加はなく, 120 分後のみに有意な増加が見られた(図1)。3HIB 濃度について, 血清と腓腹筋との間に正の有意な相関関係があった( $r^2=0.58$ ;  $P<0.0001$ )。同様に, 血清とヒラメ筋との間, 血清と足底筋との間にも, 正の有意な相関関係があった。さらに, 3HIB 濃度は, 血清と大脳皮質との間に正の有意な相関関係があった( $r^2=0.77$ ;  $P<0.0001$ )。同様に, 血清と小脳との間, 血清と海馬との間にも, 正の有意な相関関係があった。

### 検討2(3HIB 腹腔投与による脳内 3HIB 濃度の増加):

ラットに, 3HIB を腹腔内投与した際の脳組織中の 3HIB 濃度の変化を検討した結果, 3HIB 投与 15 分後に, 血清中の 3HIB 濃度は有意に増加し, 60 分後には, 正常レベルに回復した(図2)。同様に, 大脳皮質における 3HIB 濃度も, 腹腔内投与 15 分後に有意に増加し, 60 分後には, 正常レベルに戻った(図2)。小脳と海馬の 3HIB 濃度も, 大脳皮質と同様に, 3HIB 投与 15 分後に有意に増加し, 60分後には減少した。

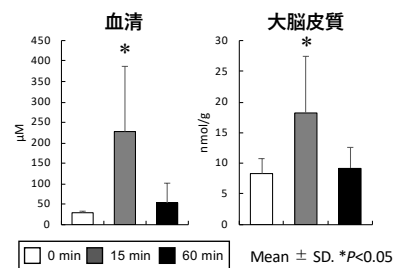


図2. 3HIB 腹腔内投与後の脳内3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)濃度の時間的変化。ラットに3HIBを腹腔内投与(60mg/kg BW)し, 15分後と60分後の血清と脳組織内の3HIB濃度を定量した。

### 検討3(脳内 3HIB 濃度の増加による運動パフォーマンスへの影響):

検討2により 3HIB を腹腔内投与する事で, 人為的に脳内 3HIB 濃度を増加させる事ができたことから, 脳内3HIB 濃度の増加が運動パフォーマンスに及ぼす影響を評価するため, 3HIB 腹腔内投与後のトレッドミル走行運動能を評価した。Saline-Ex 群と比較して, 7回の走行試験中6回の施行において, 3HIB-Ex 群のラットが先に疲労困憊に至り, 走行平均時間も, 有意に低値であった( $135.0 \pm 10.5$  分 vs  $126.3 \pm 15.0$  分;  $P<0.05$ )。

以上の結果をまとめると, 1) 持久性運動において, 骨格筋内で産生される 3HIB 濃度増加に伴い, 血液を介した脳組織内 3HIB の有意な増加が確認された。2) 3HIB を腹腔内投与する事で, 人為的に脳内の 3HIB 濃度を一時的に増加させる事ができた。3) 脳内 3HIB 濃度を増加させると運動パフォーマンスが有意に減少する事が明らかとなった。以上の結果から, 持久性運動時のエネルギー需要の増加に伴う骨格筋のアミノ酸燃焼の亢進により, 骨格筋から放出されるバリン中間代謝物 3HIB が, 脳内に取り込まれ, 身体活動を抑制させる可能性が示唆された。この新しい骨格筋アミノ酸代謝物を介した運動誘発性中枢性疲労発症機序の仮説は, 中枢性疲労の原因解明と予防や解消の手段の開発への寄与が期待される。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 4 件)

1. Miyazaki T, Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Yorifuji T, Matsuzaki Y, Honda A. Serum amino acid profiling in citrin-deficient children exhibiting normal liver function during the apparently healthy period. *JIMD Rep.* 43:53-61, 2019. <査読あり>
2. Ra SG, Miyazaki T, Kojima R, Komine S, Ishikura K, Kawanaka K, Honda A, Matsuzaki Y, Ohmori H. Effect of BCAA supplement timing on exercise-induced muscle soreness and damage: A pilot placebo-controlled double-blind study. *J Sports Med Phys Fitness.* 58(11):1582-91, 2018. <査読あり>
3. Miyazaki T. The regulation of BCAA catabolism for preference of energy expenditure in the skeletal muscle. *Adv Exer Sport Physiol.* 23(2): 19-24, 2017. <査読なし>
4. Miyazaki T, Nakamura Y, Ebina K, Mizushima T, Ra RG, Ishikura K, Matsuzaki Y, Ohmori H, Honda A. Increased *N*-acetyltaurine in the skeletal muscle after endurance exercise in rat. *Adv Exp Med Bio.* 975: 403-11, 2017. <査読あり>

### [学会発表] (計 16 件)

1. 妙圓園香苗, 吉川徹, 朴ジヨン, 辻本健彦, 宮崎照雄, 本多彰, 下條信威, 前田清司. 肥満男性における定期的な有酸素性運動が血中 3-HIB 濃度に及ぼす影響. 第 73 回日本体力医学会大会(福井市). 2018 年 9 月 7-9 日.
2. 中村健吾, 佐藤峻太, 征矢茉莉子, 宮崎照雄, 征矢英昭. 高感度測定法による走運動時の脳ケトン体動態:異なる運動様式での検討. 第 73 回日本体力医学会大会(福井市). 2018 年 9 月 7-9 日.
3. Nakamura K, Sato R, Miyazaki T, Jesmin S, Soya H. Ketone body dynamics with exercise at different conditions: Usefulness of LC-MS/MS system. 第 2 回 NIPS-ARIHHP 共同ワークショップ「ヒューマン・ハイ・パフォーマンスの実現を目指した次世代健康スポーツ科学と神経科学の融合・統合」.(岡崎市). 2018 年 8 月 9-10 日.
4. 宮崎照雄, 松村正隆, 大森肇, 本多彰. 持久性運動によるバリン中間代謝物 3-ヒドロキシイソ酪酸の骨格筋濃度の変化. 第26回日本運動生理学会大会(熊取町). 2018 年 7 月 28-29 日.
5. Myoenzono K, Yoshikawa T, Kumagai H, Miyazaki T, Honda A, Maeda S. 3-hydroxyisobutyrate related to physical activity in adult men. International Conference for Adaptations and Nutrition in Sports (ICANS) 2018 (Chonburi, Thailand). 2018 年 7 月 18-20 日.
6. Miyazaki T. Valine intermediate 3-hydroxyisobutyrate is a possible biomarker of muscular BCAA utilization for energy production in exercise. 23rd Annual Congress of the European College of Sport Science (Dublin, Ireland). 2018 年 7 月 4-7 日.
7. Myoenzono K, Yoshikawa T, Park J, Miyazaki T, Honda A, Shimojo N, Maeda S. Aerobic exercise training reduces plasma 3-hydroxyisobutyrate level in overweight and obese men. 23rd Annual Congress of the European College of Sport Science (Dublin, Ireland). 2018 年 7 月 4-7 日.
8. Myoenzono K, Yoshikawa T, Park J, Miyazaki T, Honda A, Shimojo N, Maeda S. The effect of aerobic exercise training of plasma 3-hydroxyisobutyrate concentration in overweight and obese men. ARIHHP Science Week (つくば市). 2018 年 2 月 28 日-3 月 6 日.

9. Nakamura K, Sato R, Miyazaki T, Jesmin S, Soya H. Ketone body dynamics across the blood-brain barrier in response to exercise at different intensities: Usefulness of LC-MS/MS system. 第二回 WINGs(若手研究者の会)ミーティング(文京区), 2018年2月14日.
10. 宮崎照雄, 池上正, 松崎靖司, 本多彰. TGR5を介した細胞内甲状腺ホルモン活性化による骨格筋分岐鎖アミノ酸異化の制御. 第72回日本体力医学会大会(松山市). 2017年9月16-18日.
11. 宮崎照雄. 唾液マーカーを用いた非侵襲的な肝硬変患者の肝筋栄養代謝評価の試み. 第10回 IBARAKI LIVER FORUM 2017(つくば市). 2017年7月20日.
12. Miyazaki T, Ra SG, Ishikura K, Ohmori H, Ikegami T, Matsuzaki Y, Honda A. Comparison of the influence of pre-exercise BCAA supplementation on serum HMB level between endurance and resistance exercises. Experimental Biology 2017 (Chicago, USA). April 22-26, 2017.
13. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 運動による分岐鎖アミノ酸(BCAA)の代謝. 第9回三大学交流セミナー(阿見町). 2017年2月1日.
14. 宮崎照雄, 羅成圭, 石倉恵介, 宮川俊平, 松崎靖司, 本多彰, 大森肇. 分岐鎖アミノ酸(BCAA)摂取後の運動による血中  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (3HMB)濃度の上昇. 第71回日本体力医学会大会(盛岡市). 2016年9月23-25日.
15. 宮崎照雄. 持久性運動時の脂質, アミノ酸代謝の筋肝連関. 日本体育学会第67回大会(熊取町). 2016年8月24-26日.
16. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. TGR5 activation inhibits muscular BCAA catabolism via thyroid hormone activation. XXIV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease (Düsseldorf, Germany). June 17-18, 2016.

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:本多 彰

ローマ字氏名: HONDA Akira

所属研究機関名:東京医科大学

部局名:医学部

職名:教授

研究者番号:10468639

研究分担者氏名:大森 肇

ローマ字氏名: OHMORI Hajime

所属研究機関名: 筑波大学

部局名: 体育系

職名: 教授

研究者番号: 20223969

研究分担者氏名: 池上 正

ローマ字氏名: IKEGAMI Tadashi

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号: 40439740

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。