

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10814

研究課題名(和文) 筋肥大時に骨格筋の成長ホルモンに対する反応性は低下するのか

研究課題名(英文) Responsiveness to growth hormone administration in hypertrophied skeletal muscle

研究代表者

花井 淑晃 (Hanai, Yoshiteru)

名古屋工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50360730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨格筋肥大時の成長ホルモンの作用について、筋のGH受容体発現調節の面から研究を行ってきた。

本研究では、筋肥大初期(4日まで)に観察されるGH受容体遺伝子発現の低下が骨格筋のGHに対する反応性に影響するのか否かを検討するために、片脚に4日間の代償性肥大を処置した下垂体摘除ラットにGH投与を行い、GHにより発現が誘導されるIGF-1発現の変化を対照脚と比較した。結果、肥大筋ではGH受容体発現の低下が見られたにもかかわらず、IGF-1反応には対照脚と比較して低下は観察されなかった。筋肥大初期に肥大筋で生じるGH受容体の発現の低下には、GH誘導性のIGF-1反応には影響しないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋力トレーニングを実施するにあたって、その効率の問題は重要である。筋肥大初期には同化ホルモンである成長ホルモンの受容体の遺伝子発現が肥大筋で低下することが明らかとなっている。本研究では、この成長ホルモンの受容体遺伝子の発現の低下が、実際のGH投与に対する反応性に影響するのか否かについてIGF-1発現の誘導の面から検討を行い、影響は少ないことを明らかにした。この知見は適切なトレーニング処方を考えるための基礎的成果として有用なものであると考える。

研究成果の概要(英文)：We have studied the growth hormone receptor expression in hypertrophied skeletal muscle. In the present study, to examine whether the reduction of GH receptor gene expression in the early phase of muscle hypertrophy (up to 4 days) affects the responsiveness of skeletal muscle, we externally administered rhGH to hypophisectomized rat with unilateral compensatory hypertrophy for 4 days. In the hypertrophied muscle, GH receptor mRNA expression was significantly reduced in hypertrophied muscle compared to the control leg, the IGF-1 mRNA induction was comparable. The reduction of GH receptor expression observed in hypertrophied muscle during the early phase of muscle hypertrophy seems not affect the GH-induced IGF-1 response.

研究分野：運動生化学

キーワード：成長ホルモン 成長ホルモン受容体 筋肥大

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の運動性肥大の分子メカニズムの詳細については未だ未解明の部分も多い。成長ホルモン (Growth Hormone: GH) は下垂体前葉から分泌され、哺乳動物の除脂肪組織の生後成長を調節する重要なホルモンである。骨格筋肥大との関係については、直接的に筋を大きくする作用は GH 自体は持っていないと考えられるが、GH 依存的に骨格筋で産生されるインスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor 1: IGF-1) による細胞増殖やタンパク合成の増進などの同化作用は強力なものであることから、GH はこの局所での IGF-1 産生を介して骨格筋の成長調節に関与すると考えられている。

GH が骨格筋に作用して直接の同化因子である IGF-1 発現を惹起する上で、骨格筋細胞表面に発現し、GH の受けてとなる GH 受容体の役割は大きい。我々は GH による骨格筋の成長調節において、骨格筋における GH 受容体の発現調節の面から検討を行ってきた。我々が運動性筋肥大の実験モデルとして用いているラットの代償性肥大モデルでは、肥大処置の初期(4日未満)において、GH 受容体の mRNA 発現が減少し、その後(14日まで)安静レベルまで回復するという経過をたどることが明らかとなった。

しかしながら、このデータは mRNA レベルでの分析であり、それが実際の受容体タンパクレベルの変化を反映し、生理機能としての骨格筋の GH に対する反応性に貢献するのかがについては不明であった。またこの、肥大初期に減少する GH 受容体 mRNA レベルに対して、どのようなシグナル経路が働いているのかについての発現調節のメカニズムについても不明であった。

骨格筋の細胞表面に発現する GH 受容体は発現レベルがかなり低く、また糖化されている影響からも通常のウエスタンブロットでは検出が難しい。そこで本研究では、筋肥大初期に観察される GH 受容体の発現レベルの低下が実際の筋の GH に対する反応性に貢献しているのかが確認するために、GH 受容体の遺伝子発現の低下が見られる肥大処置 4 日の時点で、下垂体摘除ラットに対して外因性に GH 投与を処置し、その後骨格筋で見られる IGF-1 の遺伝子発現の誘導レベルの変化を GH に対する反応性の指標として検討をおこなうものである。

また、代償性肥大において GH 受容体 mRNA の発現レベルを調節する因子として、最も根本的な筋の生理条件の変数である、筋の収縮活動に着目し、筋の活動の増加による GH 受容体 mRNA 発現への影響を単離して検討するために、麻酔下の電気刺激による高強度の筋の収縮活動後の GH 受容体発現の変化を検討した。

2. 研究の目的

(1) 筋肥大処置に生じる GH 受容体 mRNA 発現の低下が、実際の筋の GH に対する反応性に貢献する可能性の有無を明らかにすること。

(2) 筋肥大初期に生じる GH 受容体 mRNA 発現の低下に対する収縮活動の貢献の有無について確認すること。

以上の2つを研究目的としてそれぞれ実験と分析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と代償性肥大、およびサンプリング

実験には下垂体摘除された 11 週齢の SD 系雄性ラット 13 匹を用いた。GH 投与の 4 日前にイソフルラン麻酔下で片脚の腓腹筋遠位部の腱の切除を行った。この処置により、同側のヒラメ筋、および足底筋に代償性の過負荷が生じ、代償性肥大が惹起される。GH 投与は麻酔下で外頸静脈より 200 μ L の生理食塩水に懸濁した 50 μ g のリコンビナントヒト GH を投与した。コントロール群には生理食塩水のみを投与した。投与後、6 時間の時点で麻酔下で下肢よりヒラメ筋および足底筋を摘出し液体窒素中で凍結し分析まで -80 の冷凍庫で保存した。

急性の筋収縮実験は小笠原らによりサンプルの提供を受けた。筋収縮処置は、11 週齢の SD 系雄性ラットの右脚腓腹筋に経皮電極により足関節を固定した状態で 30V・100Hz の電気刺激を 3 秒刺激-7 秒休憩の間隔で 10 回行い、高強度なアイソメトリックな収縮を惹起した。これを 3 分のセット間休憩をあけて 5 セット繰り返した。このプロトコルを用いた長期の筋トレーニングでは有意な筋肥大が生じることが報告されている(Ogasawara et.al.2012)。収縮刺激直後、および終了 6 時間後に腓腹筋を摘出し、分析まで冷凍保存した。

(2) RNA の抽出と mRNA 発現の分析 (q-RT-PCR) および統計

組織より総 RNA を抽出し、各 mRNA に特異的なプライマーを用いて qRT-PCR 法により mRNA の発現量を評価した。内部標準として GAPDH mRNA を用いた。統計には ANOVA および Tukey の HSD 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

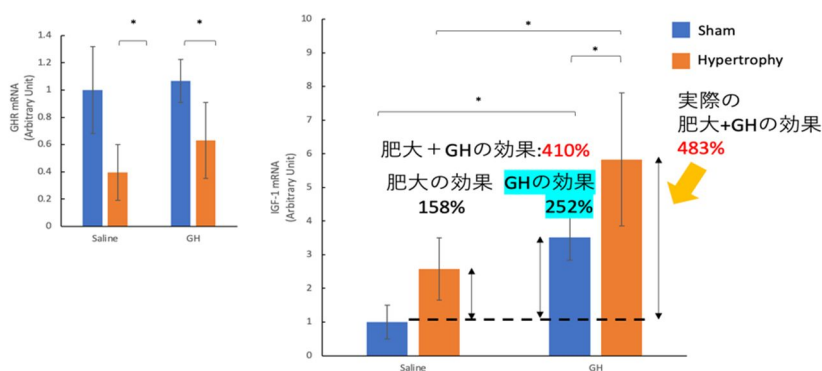
4. 研究成果

(1)代償性肥大処置 4 日後の GH 投与に対する IGF-1 反応について

4 日間の代償性肥大処置により、処置側のヒラメ筋、足底筋では対照側と比較して 20%程度の筋重量の有意な増加が認められた。この重量増加は主として急性の筋活動の増加による筋組織の損傷を契機とした炎症反応によるものと考えられ、衛星細胞の増殖や筋線維横断面積の増加などの実質的な筋肥大は未だ生じていないものと推察される。我々の研究室において、正常ラットの代償性肥大において以前に観察されたのと同様に、下垂体摘除ラットにおいても肥大筋において対照側と比較して有意な GH 受容体 mRNA の発現レベルの低下が観察された。IGF-1 mRNA は、足底筋においてのみ生理食塩水投与群、GH 投与群の両方において対照脚に対して肥大脚が有意に増加した。また、生理食塩水投与群の対照脚と比較して GH 投与群の対照脚においても有意に高い発現であった。

骨格筋における IGF-1 mRNA の発現は、GH、および、筋肥大を誘発する筋活動によってそれぞれ独立した調節を受ける。本研究の足底筋の分析結果では、筋肥大単独の効果はプラス 158%（生理食塩水投与群の対照脚と肥大脚の比較）であり、GH 単独の効果はプラス 252%（生理食塩水投与群の対照脚と GH 投与群の対照脚の比較）程度と見積もられた。これに対し、筋肥大と GH の同時効果（生理食塩水投与群の対照脚と GH 投与群の肥大脚の比較）は 483%と、およそ相加的な値であった。GH 投与群の肥大脚では、GH 受容体 mRNA の発現レベルは有意に低下していることから、この GH 受容体 mRNA の発現レベルの低下が GH に対する反応性に寄与するのならば、それぞれ単独の効果を合わせたレベル（410%）よりも低下するものと予想されるが、実際はどれと同等（483%）、あるいはむしろ高い値となった。これらの結果は、筋肥大初期に観察される肥大筋での GH 受容体発現レベルの低下は、GH 投与時の IGF-1 反応の観点からの GH に対する反応性にたいする貢献は少ないものと考えられる。

GH 受容体 mRNA の発現が有意に低下しているにも関わらず、GH に対する反応性には低下が認められなかった理由については不明である。観察された変化は mRNA レベルでの変化であり、実際の GH 受容体タンパクレベルでの変化につながっていない可能性も考えられるが、代償性肥大時の肥大筋における GH 受容体 mRNA の低下は、我々の以前の研究では処置後 2 日～4 日にかけて長期にわたって低下が継続しており、時間的にはタンパクレベルに反映されうる変化である。骨格筋での GH 受容体タンパクの発現レベルは著しく低く、通常の western blot 等の研究方法では検出が難しい。我々も今回、数種の抗体を用いて検出を試みたが特異的なシグナルを検出することができなかった。免疫沈降などの濃縮法によって特異的シグナルを検出できれば定量的な解析が可能となるかもしれない。しかしながら、本研究における IGF-1 反応による検討では、実際にタンパクレベルでの変化があったとしても GH に対する反応性には貢献しない程度の変化である可能性が高く、これ以上の検討の必要性は低いと考える。



肥大筋において GHR mRNA 発現量は減少したが、GH 単独の IGF-1 mRNA 発現量の増加に対する効果には影響がなかった

(2)急性の高強度筋収縮後の GH 受容体 mRNA 発現の変化について

骨格筋の GH 受容体 mRNA の発現レベルを調節する因子についてはこれまで報告されていないことから、筋肥大初期の GH 受容体 mRNA の低下に関してはどのような因子によるものか不明である。我々は肥大筋における高強度の筋活動自体が影響する可能性に着目し、電気刺激による急性の筋活動直後の変化を調べることによりその貢献の有無の検討をおこなった。結果、電気刺激による急性の高強度筋活動直後、刺激後 6 時間後の両方において、対照脚と有意な変化は認められなかった。高強度の筋活動自体は肥大筋で観察される GH 受容体 mRNA 発現の低下には関与しない可能性が考えられる。GH 受容体 mRNA 発現を調節するその他の因子については今後検討の余地がある。

【引用文献】

Riki Ogasawara, et. al "The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle"
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014 May 15;306(10):E1155-1162. doi: 10.1152/ajpendo.00647.2013. Epub 2014 Apr 1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小笠原 理紀 (Ogasawara Riki)	国立研究開発法人 産業技術総合研究所・研究員 (82626)	
研究協力者	寺田 隆之 (Terada Takayuki)	名古屋工業大学・大学院工学研究科・学生 (13903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関