

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11519

研究課題名（和文）筋萎縮からの回復における 2-作動薬の適用に関する研究

研究課題名（英文）Study on the application of beta2-agonists in recovery from muscular atrophy

研究代表者

鈴木 英樹（Suzuki, Hideki）

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40235990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では異なる程度の筋萎縮からの回復の違いと、回復期に 2-アドレナリン作動薬であるクレンブテロール（CLE）を投与した際の回復促進作用を調べた。実験動物にラットを使用し、後肢の足関節の固定角度を変えることによって、左右の骨格筋について萎縮の程度の異なるモデルを作成した。後肢背屈筋群は伸長位で固定された際よりも短縮位で固定された際に萎縮が顕著であった。固定解放後、筋萎縮が顕著な場合に回復は遅かった。回復期にCLEを投与した場合、萎縮の程度の大きい速筋と遅筋で回復促進作用が観察された。これらの結果より、筋萎縮が顕著なほどCLEに対する感受性が高まり、回復が促進され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

本研究結果より、異なる筋長での固定による不活動で誘発される骨格筋の萎縮の程度は骨格筋間で異なること、また、萎縮した骨格筋の回復の様相も筋線維レベルである程度説明できることが分かった。さらに、回復期における同化作用を有するクレンブテロールの投与は、特に遅筋において萎縮の程度により回復促進作用が異なることも併せて明らかになった。これらの研究成果は、萎縮した骨格筋の回復のメカニズムを探るうえで基礎的な資料となることから学術的な意義があると考えられる。また、不活動による筋萎縮後の通常生活やスポーツ現場への早期復帰の手がかりとなる資料であることから社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the difference in recovery from muscle atrophy to different degrees and the recovery-promoting effect when the 2-adrenergic agonist clenbuterol (CLE) was administered during the recovery period. In the experiment, rats were used as experimental animals, and models with different degrees of atrophy of the left and right skeletal muscles were used by changing the fixation angle of the ankle joints of the hind limbs. The dorsiflexor muscles of the hind limbs were significantly atrophied in the shortened position than in the extended position. Recovery after fixation release was slow when muscle atrophy was prominent. When CLE was administered during the recovery period, recovery-promoting effects were observed in fast and slow muscles with a large degree of atrophy. These results suggest that the more prominent muscular atrophy, the higher the sensitivity to CLE and the more likely it is that recovery will be promoted.

研究分野：運動生理学

キーワード：クレンブテロール ギプス固定 筋長 筋萎縮 回復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 下肢骨格筋は日常生活における身体の移動・歩行・平衡機能等に重要な機能的役割を担っている。そのため、これらの筋量を維持・増加することはスポーツ活動のみならず、高齢者や身体障害者の運動機能の改善にとっても重要な問題である。一方、様々な要因によって筋の力学的負荷が低下すると、運動能の低下と共に骨格筋の萎縮が明らかに認められ、日常生活の身体活動の質的低下が起こる。したがって、不活動を余儀なくされた場合、下肢骨格筋の萎縮を抑制する作用や萎縮後の回復を促進する作用の機構を明らかにすることは重要な課題であると考えられる。

(2) 先の研究では、ヒトをベッドレスト（不活動）で生活させた際の下腿部・大腿筋の断面積は有意に減少し、筋力も著明に低下することが知られている(Brooks *et al*, 2008)。また、ラットやマウスなどの実験動物の下肢筋の容積についても脚部の固定・尾部懸垂・身体懸垂・微小重力環境下などによって著しく萎縮し、筋機能低下が起こることが報告されている (Ishihara *et al*, 2012; Sato *et al*, 2012)。このような骨格筋の変化は、その筋を構成する個々の筋線維の総和としての応答であり、これらの変化については、骨格筋内の遺伝子や細胞内シグナル伝達の応答との関連についての研究が大きく進展している。一方で、筋萎縮に関しては個々の筋線維の横断面積に関する研究は多いが、筋萎縮に伴う個々の筋線維の収縮タンパク質の動態・筋細胞内の各種代謝関連酵素活性・筋内エネルギー基質の応答についてはそれらの現象を統合した研究が極めて少ない。そのため、不活動に伴う骨格筋の可塑的な変化の実体を系統的に明らかにするためには、筋線維の形態的变化に加え、その質的応答を総合的に測定・解析することが不可欠である。

(3) 私達のグループでは、ラットの後肢関節固定によって惹起された骨格筋の萎縮は同一筋であっても部位毎に異なり、その応答は一様ではないこと(鈴木ら, 2008)、後肢骨格筋の萎縮は速筋と遅筋とで β_2 -アドレナリン受容体 mRNA の発現が明らかに異なること (Sato *et al*, 2011)を見出している、また、骨格筋に対する力学的負荷の増加やドーピング薬物の一つである β_2 作動薬・クレンブテロール（以下、CLE）を投与しても筋が肥大することを報告している(Shirato *et al*, 2007; Sato *et al*, 2008; Sato *et al*, 2013; Shirato *et al*, 2013)。これらの現象は速筋線維の多い骨格筋のタンパク合成が促進されることに由来するものと推定されている(Sato *et al*, 2008)。これらの結果より、骨格筋の萎縮はCLE投与によってタンパク質合成が萎縮の抑制や萎縮からの回復を促進すると考えられた。

以上のような知見に基づき、我々は下脚部をギプスで固定したラットにCLEを経口投与した後の筋萎縮が抑制されるか否かを主に組織化学的な方法を用いて調べた。その結果、その抑制作用は速筋で明らかに認められることを確認した(Suzuki *et al*, 2014)。さらに、CLEの同化作用が萎縮筋の回復にも影響すると予測し、ラットの下脚部を固定して骨格筋を萎縮させた後、固定を解除したラットにCLE投与し回復促進作用があるかを調べた。その結果、その回復促進作用は速筋で明らかであるが、遅筋でもその傾向が観察された。

しかしながら、骨格筋の回復の様相はその筋萎縮の程度とも密接に関係していることが

ら，本研究は骨格筋の回復における筋の萎縮の程度と違いと，さらにその回復の際における CLE 投与の影響を調べた．

2．研究の目的

(1) 当初本研究は，筋萎縮からの回復や CLE 投与による回復促進作用と回復期間中の身体活動量との関連を明らかにすることを目的としていた．しかしながら，実験動物の活動量の制御・調整が非常に困難であったことから，当初の研究計画を変更して，次の研究段階で行う予定であった萎縮の程度が異なる状態からの回復の違いと，その際の CLE の同化作用の影響を検討することとした．

(2) 従来，CLE は遅筋にはあまり作用しないと報告されているが，予備実験から萎縮した遅筋に関してもその同化作用がみられたことから，より萎縮が進んだ遅筋に関しては CLE に対する感受性が亢進している可能性が考えられた．本研究では，ラットの左右の足関節の固定角度を変え，異なる程度の萎縮を誘発させるモデルを用い，固定解除後に同化作用を有する β_2 -作動薬である CLE を投与した際の回復促進作用について組織化学的分析を主に検討した．

3．研究の方法

本研究では系統的な実験データを得るためにすべて 8 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた．本研究は以下の順番で順次実施した．

- (1) 左右の足関節角度を変えてギプス固定することにより，固定時の筋長の違いにより左右の後肢底屈筋群の萎縮の程度が異なることを調べた．
- (2) (1) と同様の方法を用いて固定を行った後，ギプス解放後の回復が異なる萎縮程度の左右後肢底屈筋群で異なるかを調べた．
- (3) (2) における固定解放の後肢骨格筋の回復時に CLE を投与することにより，その回復促進作用について調べた．

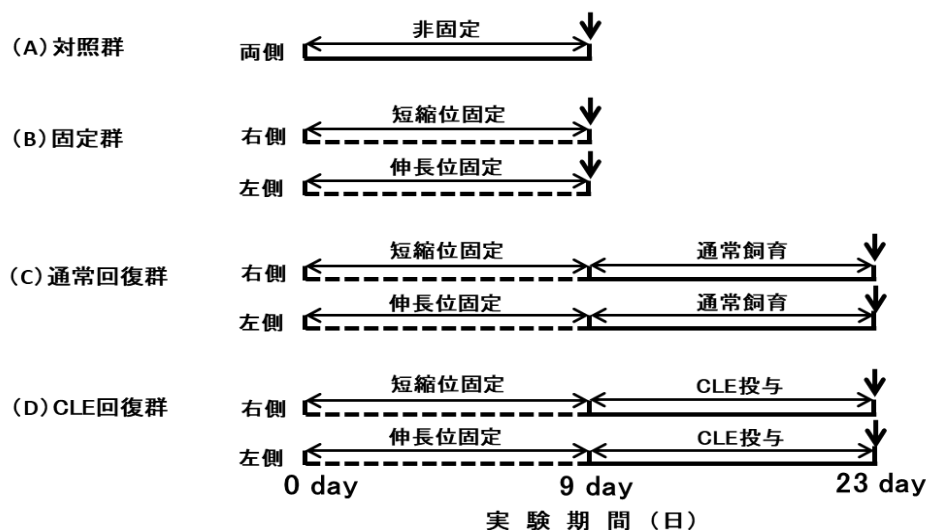


図1 実験群および実験プロトコール
 実験動物：8週齢SD系雄ラット、各群6匹、↓：筋摘出
 * ギプス固定は9日目に解放、開放後14日目に筋摘出

図1には群分けおよび実験プロトコールを示す．8週齢ラットを対照(A)群，ギプス

群 (B), 通常回復群 (C) および通常回復 + CLE 投与 (D) 群に分けた。B, C, D 群の固定は常法にしたがって麻酔下にて, 包帯式ギプス(スコッチキャスト社製)を用いて膝関節と足関節の固定(Resting angle)を 9 日間行った(Suzuki *et al.* 2014)。固定の際, 右側肢は下肢底屈筋群を短縮位で固定するために足関節角度を最大底屈位で固定し, 左側肢は下肢底屈筋群を伸長位で固定するために足関節を底屈 0 度で固定した。D 群には固定解放後の回復期間に CLE (dose=1mg/kg 体重) を頸部後方に皮下投与し, 通常回復群の C 群には D 群と当該量の生理食塩水を同様の方法で投与した。この CLE の投与量により骨格筋の肥大を惹起することは既に再現性を確認し, 方法上の困難な問題はない。

固定期間後と回復期間後に後肢底屈筋であるヒラメ筋, 足底筋, 内側腓腹筋, 外側腓腹筋を両側より摘出した。各筋サンプルは筋腹部位で二分し, 遠位部について全筋タンパク質量および収縮タンパク質を分析し(研究分担者: 北浦孝), さらに分析サンプルの一部は, 電気泳動法を用いたミオシン重鎖の分析を行い, 分子レベルでの筋線維のミオシン重鎖の分析に用いた(研究分担者: 辻本尚弥)。近位部については, 組織化学的分析により各骨格筋の筋線維タイプ別の筋線維横断面積を決定するとともに, 個々の筋線維の代謝酵素活性の測定に用いた。代謝酵素活性は定量的組織化学的手法を用いて, succinate dehydrogenase(SDH)と glycerol phosphate dehydrogenase(GPD)の活性を分析した(研究代表者: 鈴木英樹)。

4. 研究成果

(1) 短縮位でギプス固定した際, 速筋の足底筋と遅筋のヒラメの重量は共に伸長位で固定した場合と比べて低値を示し, 速筋遅筋共に短縮位での固定において筋萎縮が顕著であったと考えられた。また, その萎縮の程度は速筋の足底筋に比べて遅筋のヒラメ筋で大きかった。これらの結果は先行研究(Suzuki *et al.* 2014, 2015, 鈴木ら 2018)と同様の結果であった。

(2) 固定による足底筋とヒラメ筋の筋線維横断面積の変化を筋線維タイプ別に検討した。速筋の足底筋において, 筋線維横断面積は伸長位で固定した場合と比べて短縮位で固定した場合に, いずれの筋線維タイプにおいてもその萎縮は顕著だった。また, 速筋タイプの筋線維に比べて遅筋タイプの筋線維の萎縮が顕著だった。遅筋のヒラメ筋においても, 筋線維横断面積は伸長位で固定した場合と比べて短縮位で固定した場合に, いずれの筋線維タイプにおいても萎縮がみられたが, 足底筋ほど固定方法による違いはなかった。これらの結果は, 短縮位での脚固定は遅筋に比べて速筋でその影響が大きかったことを示していた。

(3) ギプス解放後の足底筋とヒラメ筋の筋線維横断面積の変化を筋線維タイプ別に検討した。速筋の足底筋において, 固定解放後の筋線維横断面積の回復は伸長位後に比べて短縮位後で若干遅かった。また, 遅筋線維の回復は固定時の筋長に関わらず速筋線維に比べて遅かった。遅筋のヒラメ筋においても, 固定解放後の筋線維横断面積の回復は伸長位後に比べて短縮位後で遅かった。また, 遅筋線維の回復は固定時の筋長に関わらず速筋線維に比べて遅かった。これらの結果より, 萎縮した筋線維の横断面積の回復は, 萎縮がより顕著な短縮位での固定後で遅くなること, さらに, 骨格筋の種類や筋線維にタイプに関わらず, 筋線維横断面積の回復は速筋に比べて遅筋で遅いことが示された。

(4) 回復期における CLE 投与が足底筋とヒラメ筋の筋線維横断面積に及ぼす影響を筋線維タイプ別に検討した。速筋の足底筋において、伸長位固定後、短縮位固定後共に CLE 投与による回復促進作用が観察されたが、特に短縮位固定後のタイプ 線維でその回復促進作用が顕著だった。遅筋のヒラメ筋において、伸長位固定後における CLE 投与による筋線維の回復促進作用はいずれのタイプの筋線維においても観察されなかったが、短縮位固定後の回復促進作用はいずれのタイプの筋線維でも観察され、その回復促進作用は特にタイプ 線維で顕著だった。これらの結果より、速筋における回復時の CLE 投与は、筋線維の萎縮の程度に関わらず回復促進作用を示すが、遅筋においては、より萎縮が顕著な場合に CLE 投与による回復促進作用を示すことが明らかになった。従来、CLE の同化作用は速筋に選択的に作用することが報告されているが、本研究ではより萎縮が進行した状態における遅筋において CLE の同化作用による回復の促進作用があることが示された。これは、特に遅筋における CLE に対する感受性は筋萎縮の程度によって変化する可能性を示唆しているものと考えられた。

以上のことから、不活動に伴う筋萎縮からの回復期での CLE 投与は、筋線維レベルにおいて、その回復を促進させることが確認された。また、その回復促進作用は、速筋と遅筋間で異なり、さらに、遅筋においてはその萎縮状態によってもその作用は異なることが示唆された。

現在、上記の研究成果に関する論文の執筆と同時に、筋線維の代謝特性や収縮タンパク質の分析を継続して行っている。これらの一連の研究結果により、筋萎縮からのより速やかな日常生活やスポーツ現場への復帰の基礎的なデータが得られると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Suzuki, Yuki Yoshikawa, Hisaya Tsujimoto, Takashi Kitaura, Isao Muraoka	4. 巻 122:151453
2. 論文標題 Clenbuterol accelerates recovery after immobilization-induced atrophy of rat hindlimb muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2019.151453	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木英樹, 辻本尚弥, 北浦孝, 村岡功
2. 発表標題 クレンブテロールはラット後肢筋の固定による萎縮後の回復を促進する
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	北浦 孝 (Kitaura Takashi) (00143868)	福山大学・経済学部・教授 (35409)	
研究分担者	辻本 尚弥 (Tsujimoto Hisaya) (70299519)	久留米大学・その他部局等・教授 (37104)	

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
---------	---------