

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500578
 研究課題名（和文） 筋萎縮抑制と萎縮からの回復促進のための方策にかかわる細胞内情報伝達系からの検討
 研究課題名（英文） Signaling examination on strategies for suppression of muscular atrophy and facilitation of restoration from muscular atrophy
 研究代表者
 杉浦 崇夫（SUGIURA TAKAO）
 山口大学・教育学部・教授
 研究者番号：80136150

研究成果の概要（和文）：本研究は、熱刺激や抗酸化物質であるアスタキサンチン（Ax）投与ならびにそれらの組み合わせが、骨格筋萎縮の抑制ならびに萎縮からの回復促進の方策として有効か否かについて、筋タンパク質合成並びに分解に関わる細胞内情報伝達および筋衛星細胞の変化から検討した。その結果、熱ストレスと Ax 摂取は不活動による萎縮抑制あるいは萎縮からの回復促進をもたらすが、それらの組み合わせによる相乗効果は見られなかった。これらの機序として、熱ストレスによって増大した HSP72 の細胞保護・修復機能あるいはサテライト細胞の活性化によることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was investigated to clarify from the point view of an intracellular signaling pathway involving protein synthesis and proteolysis, and satellite cell whether or not the heat stress, antioxidant (astaxanthin; Ax) administration, or their combinations can be an effective strategy for suppression of muscular atrophy and facilitation of restoration from muscular atrophy. The results obtained in this study suggested that heat stress and Ax administration attenuates muscle atrophy and accelerates the recovery from atrophy, due in part, to the promotion of protein synthesis and/or the suppression of protein degradation by HSP, and the activation of satellite cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：運動生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：筋萎縮、萎縮回復、熱ストレス、アスタキサンチン、筋タンパク質合成、筋タンパク質分解、衛星細胞、熱ショックタンパク質

1. 研究開始当初の背景

不慮の事故や疾病によるベッドレストやギプス固定といった廃用、あるいは加齢などにより骨格筋は萎縮する。骨格筋の萎縮は筋力や筋機能の低下を引き起こすため、運動能力や Quality of life (QOL) の著しい低下を招

く。したがって、骨格筋萎縮自体の抑制、あるいは萎縮からの回復を促進させる方策について検討することは、一般人やスポーツ選手における受傷後速やかな社会や競技への復帰、さらには高齢者の健康寿命の延伸・QOLの向上などに役立つと考えられる。

これまで、不活動により誘発される筋萎縮（廃用性筋萎縮）は、骨格筋活動の低下による活性酸素種（Reactive Oxygen Species: ROS）産生の増大とそれに関連したタンパク質分解の亢進によって生じることが報告されている。また、萎縮筋の回復期においても骨格筋中の酸化ストレスが増大することが動物モデルを用いて報告されている。

このような廃用性筋萎縮に対するカウンターメジャーあるいは萎縮からの回復促進の方法として、熱ショックタンパク質（Heat Shock Protein: HSP）や代表的な抗酸化剤であるビタミンEよりも抗酸化能力が高いと言われているアスタキサンチン（Ax）に着目した研究が行われている。

熱ストレスは、タンパク質の合成や損傷したタンパク質の修復を促進するといわれている HSP の発現を増加させるばかりでなく、タンパク質合成に関与する Akt-mTOR 系を亢進させる可能性も報告されている。さらに、熱ストレスは骨格筋の増殖・分化、新たな筋線維の形成などに関与するサテライト細胞を増加・活性化させることが示されている。これまで、不活動によって筋萎縮を誘導する前に熱ストレスを負荷することにより、HSP72 発現量の増加、Akt-mTOR 系の亢進、酸化ストレスの抑制、筋サテライト細胞の活性化などにより萎縮が抑制されたことが報告されている。

また、前述したように不活動により誘発される筋萎縮や、萎縮からの回復過程において酸化ストレスは亢進するが、抗酸化剤を摂取し生体の抗酸化能力を高めることで萎縮抑制や萎縮からの回復促進をもたらすと考えられる。これまで、ビタミンEやAxなどの抗酸化摂取により不活動により誘発される筋萎縮を抑制したという報告や効果が見られないという報告があり一致した見解は得られていない。また、抗酸化剤による萎縮した筋の回復促進効果については、ビタミンEを投与した報告1件があるのみである。

さらに、不活動により誘発される筋萎縮や萎縮からの回復に対し、熱ストレス負荷と抗酸化剤投与の組み合わせに、相乗効果があるか否かについては、これまで検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は、熱ストレス、抗酸化剤投与あるいはそれらの組み合わせが筋萎縮の抑制や萎縮からの回復促進にどのような影響を及ぼすかについて、筋タンパク質合成系と分解系にかかわる細胞内シグナル伝達系ならびに筋衛星細胞の動態から検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験 I（萎縮抑制）：実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄ラット 52 匹を用い、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクルを維持した規制環境下において 1 週間の予備飼育を行った。予備飼育後、ラットを体重が等しくなるように対照群（Cont 群；n=10）、尾部懸垂群（Sus 群；n=11）、尾部懸垂+熱ストレス群（Heat 群；n=10）、尾部懸垂+アスタキサンチン摂取群（Ax 群；n=10）、および尾部懸垂+熱ストレス+アスタキサンチン摂取群（Heat +Ax 群；n=11）に分け、Cont 群、Sus 群および Heat 群には粉末飼料（CE-2、Clea Japan, INC.）にアスタキサンチン非含有パウダー（東洋酵素化学株式会社）を混ぜた飼料を、Ax 群および H+A 群にはアスタキサンチン含有パウダー（東洋酵素化学株式会社）を混ぜた飼料を飼育終了時まで摂取させた。投与開始 2 週間後、Cont 群を除く全ての群には 7 日間の尾部懸垂を行った。また、Heat 群および H+A 群には尾部懸垂開始 1 日前、1 日後、3 日後および 5 日後の定時に、1 時間尾部懸垂を解除し 42°C で 30 分間の熱ストレスを負荷した。熱ストレス負荷後、サーミスタ（日本光電、2762C）で測定した直腸温は、 $41.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ であった。その間、Sus 群および Ax 群も同様に尾部懸垂を解除した。飼育期間中、ラットの摂食量および体重を測定し、飼料や水は自由に摂取させた。

飼育期間終了後、ラットをエーテル麻酔下で屠殺し、SOL および PLA を摘出した。摘出した筋は速やかに筋重量を測定し、分析まで -80°C で凍結保存した。

(2) 実験 II（萎縮からの回復）：実験動物には、8 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。1 週間の予備飼育の後、10 日間の尾部懸垂を行い、その後回復期間を 0 日、3 日、7 日と設定した。

予備飼育後、各群のラットの体重がほぼ等しくなるように、対照群（Cont；n=24）、尾部懸垂群（Sus；n=26）、尾部懸垂+抗酸化食群（Ax；n=18）、尾部懸垂+熱ストレス群（Heat；n=18）、尾部懸垂+抗酸化食+熱ストレス群（Heat+Ax；n=18）に群分けした。その後、Cont 群以外のすべての群に 10 日間の尾部懸垂を行なった。尾部懸垂終了直後、Heat 群および Heat+Ax 群のラットには、インキュベーター（アドバンテック、TVG241AA）内で熱ストレス（ 42°C 、60 分）を負荷した。熱ストレス負荷後、サーミスタを用いてラットの直腸温を測定した（ラット直腸温： $40.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ）。また、回復期間 0 日の Cont 群および Sus 群のラットをエーテル麻酔で屠殺し、体重を測定した後、ヒラメ筋（SOL）を摘出し筋重量を測定した。回復期間 3 日、7 日後も同様に、ラットをエーテル麻酔で屠殺し、体重および SOL の筋重量を測定した。

予備飼育および尾部懸垂期間中はすべての群に粉末飼料を摂取させた。回復期間中には、Ax群およびHeat+Ax群に粉末飼料とアスタキサンチン含有パウダー飼料を混ぜ合わせた抗酸化飼料 (Ax0.04%含有) を、Cont群、Sus群およびHeat群には粉末飼料とアスタキサンチン非含有パウダー飼料を混ぜ合わせた飼料を摂取させた。飼育期間中は食餌と水を自由に摂取させた。摘出した筋は、分析を行なうまで -80°C に設定したディープフリーザー内で凍結保存した。

(3) 分析項目

①筋タンパク合成

凍結保存した筋よりサンプルを調整し、電気泳動によりタンパク質を分離した。分離したタンパク質はウェスタンブロッティング法を用いPolyvinylidene difluoride membrane (PVDF膜) にタンパク質を転写後、以下に示す抗体を用い抗原抗体反応を行い検討した。

Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K, p-p70S6K, S6, p-S6, eIF4G, p-eIF4G, eIF4E, p-eIF4E

②筋タンパク分解・HSP

筋タンパク合成と同様の方法でPVDF膜にタンパク質を転写後、以下に示す抗体を用い抗原抗体反応を行い検討した。

Cathepsin L, Clpains 1, 2, UBC3B, Multi Ubiquitin, Caspase-3, Cu, Zn-SOD, Nitrotyrosine, HSP72

③筋サテライト細胞

凍結保存した筋より厚さ $8\mu\text{m}$ の連続横断凍結切片を作成し、免疫組織化学的手法によりPax7染色、DAPI染色、Laminin染色を行い、筋サテライト細胞を同定した。

4. 研究成果

(1) 実験I (萎縮抑制)

① 筋重量は、両筋において、Cont群と比較し、全ての群で有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。しかしながら、相対筋重量で比較した場合、SOLではUG群と比較し、Heat群、Ax群、およびHeat+Ax群において有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。一方、PLAの相対筋重量は、UG群と比較し、Heat群およびAx群において有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。1) 足底筋の相対筋重量は、Heat群、Ax群、Heat+Ax群の場合、Cont群と比較して低値を示したが有意差は認められなかった。しかし、UG群ならびにSus群では有意に低い値を示した。一方、ヒラメ筋の相対筋重量は、Heat群と比較してHeat群を除く群で有意に低い値を示し、Heat群はUG群よりも有意に高い値を示し

た。

- ② 熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与ならびにそれらの組み合わせは、筋タンパク質合成に関わる細胞内シグナル伝達経路に影響を与えなかった。
- ③ PLAのHSP72発現量は、Cont群、Sus群と比較してHeat群およびHeat+Ax群で有意に高い値を示すと同時に、UG群はHeat群およびHeat+Ax群と比較して有意に低い値、Heat+Ax群はAx群と比較して有意に高い値を示した。一方、SOLのHSP72発現量は、いずれの群間においても有意差は認められなかった。
- ④ Cu, Zn-SOD発現量は、SOLではCont群と比較し、UG群において有意に高い値を示したが ($p < 0.05$)、その他の群で有意差はみられなかった。また、PLAでは熱ストレスとアスタキサンチン投与の影響は認められなかった。
- ⑤ Cathepsin L発現量は、SOLではCont群と比較し、Heat+Ax群において有意に低い値を示したが ($p < 0.05$)、PLAでは熱ストレスとアスタキサンチン投与の影響は認められなかった。
- ⑥ Calpain 1発現量は、PLAの筋原線維分画において、Cont群と比較し、Heat+Ax群で有意に低い値を示したが ($p < 0.05$)、PLAの可溶性分画およびSOLではCalpain 1発現量に熱ストレスとアスタキサンチン投与の影響は認められなかった。また、Calpain 2発現量は、SOLの筋原線維分画において、Sus群と比較し、Heat群およびHeat+Ax群で有意に低い値を示したが ($p < 0.05$)、SOLの可溶性分画およびPLAでは、Calpain 2発現量に熱ストレスとアスタキサンチン投与の影響は認められなかった。
- ⑦ ユビキチン化タンパク質発現量は、SOLの筋原線維分画において、UG群と比較し、Heat+Ax群で有意に低い値を示したが ($p < 0.05$)、PLAでは可溶性分画および筋原線維分画におけるユビキチン化タンパク質発現量に熱ストレスとアスタキサンチン投与の影響は認められなかった。
- ⑧ Nitrotyrosine発現量およびCaspase-3発現量は、両筋のいずれの群間においても熱ストレスとアスタキサンチン投与の影響は認められなかった。
- ⑨ Pax7陽性核数は、SOLおよびPLAの両筋において各群間に有意な差は認められなかった。しかし、SOLでは群間内に有意差を示す傾向が見られ、Cont群と比較してAx群とHeat+Ax群では高い値を示す傾向にあった。
- ⑩ SOLの総筋核数に対するサテライト細胞の割合は、Heat+Ax群においてCont群と比較して有意に高い値を示し、UG群と比較してSus群、Heat群、Ax群、Heat+Ax

群において有意に高い値を示した。PLA では、Cont 群と比較して UG 群において有意に低い値を示し、UG 群と比較して Heat 群および Heat+Ax 群において有意に高い値を示した。

- ⑪ SOL の筋線維 1 本あたりのサテライト細胞数は、Cont 群と比較して UG 群において有意に低い値を示し、UG 群と比較して Heat+Ax 群において有意に高い値を示した。一方、PLA では、各群間に有意差は認められなかった。
- ⑫ 筋線維 1 本あたりの筋核数は、SOL および PLA のいずれにおいても各群間に有意差は認められなかった。

以上のことから、熱ストレスとアスタキサンチン、摂取は、筋タンパク質合成亢進というよりは、酸化ストレスの増大やタンパク質のユビキチン化の抑制、サテライト細胞の活性化あるいは HSP の細胞保護作用によって、筋萎縮を抑制したと考えられる。しかしながら、熱ストレスとアスタキサンチン投与を組み合わせることによる萎縮抑制効果の相乗効果は認められなかった。

(2) 実験Ⅱ (萎縮からの回復)

- ① 10 日間の尾部懸垂後の回復過程において、ヒラメ筋の相対筋重量は、各群の回復 0 日目と比較して、回復 3 日目の Sus 群では有意な増加が見られなかったのに対し、Heat 群、Ax 群、および Heat+Ax 群においては有意な増加が見られた。さらに、回復 3 日目の Sus 群と比較して、回復 7 日目の Heat 群の相対筋重量は有意に高い値を示した。しかしながら、Heat 群あるいは Ax 群と Heat+Ax 群の間に有意な差は認められなかった。
- ② Akt-mTOR 系タンパク質合成シグナルは、Cont 群を除くすべての群で、回復 3 日目に著しい亢進が観察されたが、Cont 群を除く各群の間に有意な差は認められなかった。
- ③ HSP72 発現量は、回復 3 日目および 7 日目に Heat 群および Heat+Ax 群において、Cont 群と比較して有意な増加が見られた。また、回復 7 日目には、Sus 群においても、Cont 群と比較して有意な増加が見られた。
- ④ Cathepsin L 発現量、Calpain 1 発現量、Autolyze Calpain 1 発現量、Multi Ubiquitin 発現量および Caspase 3 発現量は回復 3 日目までにピークを示し、その後 7 日目ではそれよりも低値を示したが、各処置群の間には有意差は認められなかった。
- ⑤ 総筋核数に対するサテライト細胞の割合は、回復 7 日目の Heat+Ax 群の値は回復 3 日目の値よりも有意に高い値を示し

たが、回復 7 日目の各群間に有意な差はみられなかった。

- ⑥ 筋線維 1 本あたりのサテライト細胞数は、回復 3 日目および 7 日目の Heat 群の値は、回復 0 日目の値よりも有意に高い値を示した。さらに、回復 7 日目の Sus 群および Heat+Ax 群も回復 0 日目よりも有意に高かったが、Ax 群には有意な差は認められなかった。
- ⑦ 筋線維 1 本あたりの筋核数は、回復 3 日目の Heat 群の値は回復 0 日目の値よりも有意に高い値を示し、さらに Cont 群、Ax 群および Sus 群と比較して有意に高い値であった。また、回復 3 日目の Heat+Ax 群は、Sus 群と比較して有意に高い値を示したが、回復 7 日目では有意な差は認められなかった。回復 7 日目の Heat+Ax 群を除く各処置群は、回復 0 日目よりも有意に高い値を示した。

以上のことから、萎縮からの回復過程において熱ストレスあるいはアスタキサンチン摂取は、相対筋重量の回復を促進するが、これらの組み合わせによる相乗効果は見られなかった。また、熱ストレスあるいはアスタキサンチン摂取の回復促進効果は、Akt-mTOR 系の筋タンパク質合成シグナル伝達経路、筋タンパク質分解経路やアポトーシス経路に影響されたものではなく、熱ストレスによって増大した HSP72 の細胞保護・修復機能およびサテライト細胞の活性、増殖を早めることで、早期の筋重量の回復をもたらしたものと考えられる。

(3) 総括

本研究で得られた所見から、熱ストレスや抗酸化剤摂取は不活動による筋萎縮抑制に対し、酸化ストレスを軽減することによる筋タンパク質分解の抑制やサテライト細胞の活性化により効果的に作用することが明らかになった。また、萎縮からの回復においては HSP72 の細胞保護・修復機能およびサテライト細胞の活性、増殖をもたらす回復を促進すると考えられる。しかしながら、これらの相乗効果は認められなかった。

筋質量は、筋タンパク質合成ならびに分解の平衡により成り立っている。これまで、筋萎縮抑制や萎縮からの回復についての報告の多くは、筋タンパク質合成系ならびに筋タンパク質分解系のいずれかから検討したものであり、両者の観点から検討した報告は内外を問わず行われていない。そのような観点からも本研究は、意義深いと考えられる。

また、筋タンパク質合成・分解に関わる細胞内シグナルについては、本研究で測定した項

目以外にも多数関与しており、今後そのような項目についても検討する必要があると考える。さらに、本研究で得られた所見がヒトにおいても認められるのか否かについても検討する必要があるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① 芝口 翼、杉浦崇夫、古川達也、吉原利典、山元勇樹、後藤勝正、内藤久士、大森大二郎、吉岡利忠. 間欠的な再負荷と温熱負荷の組み合わせによる骨格筋萎縮の抑制. 山口体育学研究, 査読有, 53巻, 2010, 1-8.
- ② 吉原利典、杉浦崇夫、芝口 翼、山元勇樹、後藤勝正、磯山智美、内藤久士、大森大二郎、吉岡利忠, 熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせが廃用性筋萎縮に与える影響. 体力科学, 査読有, 59巻, 2010, 303-312.
- ③ 杉浦崇夫、芝口 翼、吉原利典、山元勇樹、後藤勝正、内藤久士、吉岡利忠. 萎縮ラットヒラメ筋のデスミン発現に及ぼす熱ストレス効果. 体力科学, 査読有, 59巻, 2010, 167-174.

[学会発表] (計3件)

- ① 杉浦崇夫、吉原利典、芝口翼、山元勇樹、後藤勝正、西郷真奈美、内藤久士、大森大二郎、吉岡忠利. デスミン発現からみた熱ストレスとアスタキサンチン投与の筋萎縮の抑制効果. 体力科学, 59巻, 2010, 6.28 (第65回日本体力医学会大会, 千葉, 千葉商科大学).
- ② 吉原利典、杉浦崇夫、芝口 翼、山元勇樹、後藤勝正、磯山智美、内藤久士、大森大二郎、吉岡忠利. 筋タンパク質分解系からみた熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせによる筋萎縮の抑制効果. 体力科学, 58巻, 2009, 6.20 (第64回日本体力医学会大会, 新潟, 朱鷺メッセ).
- ③ 山元勇樹、杉浦崇夫、吉原利典、芝口 翼、後藤勝正、磯山智美、内藤久士、大森大二郎、白木 仁、吉岡忠利. 筋衛星細胞からみた熱負荷とアスタキサンチン接取の組み合わせが筋萎縮抑制に及ぼす影響. 体力科学, 58巻, 2009, 6.17 (第64回日本体力医学会大会, 新潟, 朱鷺メッセ).

[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) 研究代表者

杉浦 崇夫 (SUGIURA TAKAO)

山口大学・教育学部・教授

研究者番号: 80136150

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし