

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32672

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04041

研究課題名（和文）骨格筋萎縮の作用機序に基づいた電気刺激介入 - 原因療法の開発を目指して -

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of electrical stimulation for prevention of muscle atrophy

研究代表者

中里 浩一（Nakazato, Koichi）

日本体育大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00307993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,360,000円

研究成果の概要（和文）：サルコペニアをはじめ骨格筋萎縮の予防は喫緊の課題である。特に運動実施が困難な方に対して骨格筋電気刺激（EMS）は骨格筋萎縮予防法として有効となりうる。ただしその分子メカニズムは必ずしも明らかではない。本研究により（1）低周波EMSによる単収縮を中心とした骨格筋収縮を誘発することで脱神経による筋萎縮が抑制され、その作用機序としてミトコンドリア生合成および量の増加が示唆された。（2）高周波EMSによる強収縮を中心とした骨格筋収縮を誘発することで低周波と同様脱神経による筋萎縮が抑制された。ただしその分子基盤はミトコンドリアではなくリボソーム量の増加によるものであると結論された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や病気によって筋肉が失われることは力の低下につながり歩行などの日常動作を困難にします。加齢や病気によって筋肉が失われるような人はそもそも筋肉量を維持するための運動も困難である場合が多く、運動の代わりになる骨格筋電気刺激は有望視されています。ただしその処方基礎研究が乏しいのが現状です。電気刺激は電気の周波数（ヘルツ）によって異なり、低周波ではびくっとした収縮、高周波では力強い収縮が導かれます。今回の研究では低周波、高周波ともに筋萎縮効果があることがわかりましたが、そのメカニズムが異なることも明らかになりました。本研究の成果は根拠に基づいた電気刺激の処方につながると言えます。

研究成果の概要（英文）：The prevention of skeletal muscle atrophy, including sarcopenia, is an urgent issue. Skeletal muscle electrical stimulation (EMS) may effectively prevent skeletal muscle atrophy, especially for those who have difficulty exercising. However, the molecular mechanism is not necessarily clear. In this study, we found that (1) low-frequency EMS induces skeletal muscle contraction, mainly consisting of twitch contractions, and suppresses muscle atrophy caused by denervation, suggesting an increase in mitochondrial biosynthesis and quantity as the molecular mechanism. (2) High-frequency EMS-induced skeletal muscle contractions, mainly tetanic contractions, which suppressed muscle atrophy due to denervation as in the low-frequency study. However, it was concluded that the molecular basis for this was an increase in ribosome quantity, not mitochondria.

研究分野：筋生理学

キーワード：骨格筋萎縮 電気刺激 ミトコンドリア リボソーム

1. 研究開始当初の背景

骨格筋量維持は加齢性筋萎縮のみならず、がん、悪液質、集中治療室入院患者の急速な筋量減少 (ICU-AW)、心臓リハビリテーションなど骨格筋萎縮を伴う様々な臨床現場において喫緊の課題である。この背景には、骨格筋が単に運動器としてのみならず、全身の糖代謝を調節することや内分泌臓器としてマイオカインを分泌することなどへの理解がある。

骨格筋萎縮は不活動と全身炎症が主な原因であり、運動は有効な対策法と位置づけられている。ただし、疾病によって不活動を余儀なくされている患者において継続的な運動の実施は現実的ではない。自重運動すら困難な方に対して運動刺激を加える方法として、骨格筋電気刺激 (EMS) が提唱されている。ただし EMS の基礎研究は乏しく、介入条件の差が骨格筋へ与える影響およびその分子メカニズムの検討は不十分である。したがって、骨格筋萎縮予防に対する骨格筋電気刺激の適用法の確立に向けた基礎的エビデンスの蓄積が急務である。

骨格筋量は骨格筋タンパク質の合成と分解のバランスに依存する。骨格筋電気刺激による強縮は筋タンパク質合成を亢進するため、骨格筋萎縮への有効な予防策とされる。我々はマウス尾部懸垂モデルにて、高周波 EMS (60 - 100Hz) による強縮の骨格筋萎縮予防効果を検討し、その結果、高周波 EMS は骨格筋萎縮に一定の効果を示すが萎縮を完全には抑制しなかった。すなわち、不活動や全身炎症による骨格筋萎縮に対して高周波 EMS による筋タンパク質合成亢進の誘発のみが骨格筋萎縮予防に対するカウンターメジャーではないことを示している。

特に不活動による筋萎縮モデルにおいて細胞内酸化ストレス物質が増大すること、ミトコンドリアが酸化ストレス産生の主な細胞小器官であることが想定されている。ただし、ミトコンドリア機能低下が酸化ストレス物質産生を誘発し筋萎縮の開始因子となる直接的な証拠はなかった。単収縮を誘発する低周波 EMS (~10Hz) はミトコンドリア増生を促すとの報告も散見されるが筋萎縮に対する明確な根拠は示されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は下記の二点とする。

- (1) ミトコンドリアの生合成を促すとされる低周波 EMS にて単収縮により骨格筋収縮を誘発し、萎縮刺激に対する筋萎縮抑制効果を検討するとともにミトコンドリア量および機能改善の有無を検討する。
- (2) 高周波電気刺激との比較により低周波および高周波電気刺激が筋萎縮抑制効果を示す際のそれぞれの作用機序の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

対象は 10 週齢雄 SD 系ラットとした。坐骨神経切除による除神経を用いて下腿筋群に筋萎縮を誘発した。電極には両足首に装着するベルト型電極を用いた。低周波電気刺激条件は周波数が 7 - 8 Hz、電流が 1.2mA とシソフルラン麻酔下にて 30 分間刺激した。高周波では周波数を 60Hz とし 5 分間刺激とした。電気刺激は 1 日 1 回として一週間の間毎日電気刺激を行った。除神経および電気刺激終了後、下腿骨格筋を摘出し重量を測定した。摘出筋は液体窒素にて急速凍結を行った。

4. 研究成果

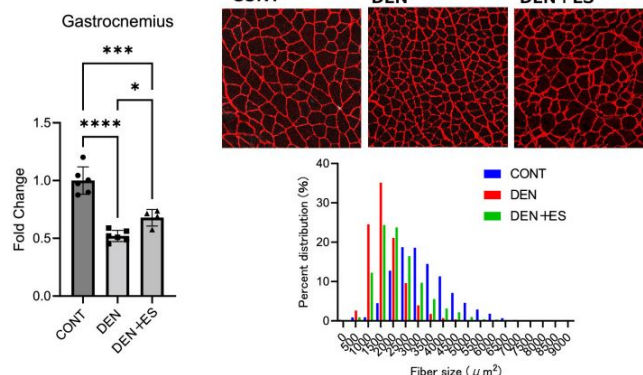
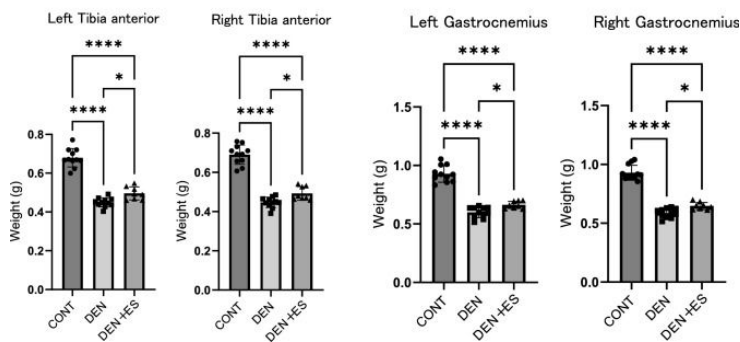
(1-1) 低周波 EMS が脱神経による骨格筋萎縮に与える効果

骨格筋量に関して未処置コントロール (CON) と比較して除神経のみの群 (DEN) および除神経と電気刺激併用群 (DEN+ES) は有意に低値を示した。ところが DEN+ES 群は DEN 群と比較して有意に高値を示し、低周波電気刺激が除神経による骨格筋萎縮に対して抑制効果を示すことが分かった。

さらに摘出した骨格筋を急速凍結し細胞外マトリックスタンパク質であるラミニンを染色することで筋線維断面積を描出、その面積を群間で比較した。結果的に筋重量と同様の傾向を示し、CON 群に対して DEN 群と DEN + ES 群は有意に低値であったものの、DEN 群と DEN + ES 群では DEN + ES 群のほうが有意に高い値を示す結果となった。

以上から低周波 EMS は除神経による骨格筋萎縮を抑制する効果があること

Muscle weight



が分かった。

(1-2) 低周波 EMS が脱神経による骨格筋ミトコンドリアの変化に与える影響

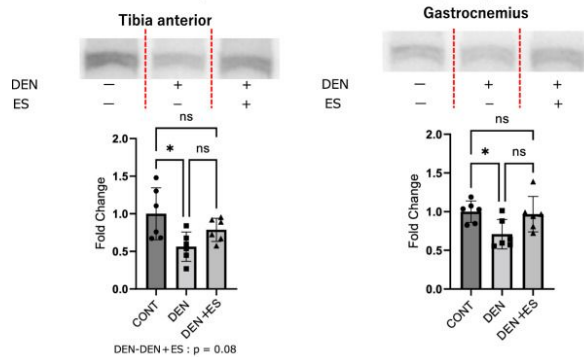
骨格筋内ミトコンドリアの生合成を強力に促進する因子として Peroxisome Proliferator activated receptor coactivator-1 (PGC-1) の存在が知られている。そこでまず脱神経による PGC-1 量の変化をウエスタンブロット法にて検討した。その結果 PGC-1 量は DEN 群において有意に減少することが分かった。低周波電気刺激によって PGC-1 量の平均値は DEN 群と比較して増加するものの有意な変化に至ることはなかった。ただしコントロール群との差は有意ではなかった。

ミトコンドリア電子伝達系に存在し、ミトコンドリア量のマーカーとして広く用いられるシトクロム c 量を検討した。DEN 群は未処理 CONT 群と比較して有意な低値を示した。低周波電気刺激を課した DEN+ES 群は DEN 群と比較して有意な高値を示し、CONT 群との差は有意ではなかった。

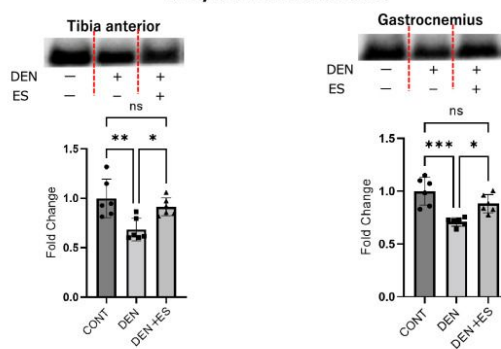
さらにミトコンドリア内における反応であるクエン酸回路の酵素であるクエン酸合成酵素の活性を測定した。クエン酸合成酵素活性はやはりミトコンドリアの量の指標として用いられる。脱神経を課した DEN 群は未処理 CONT 群と比較して有意な低値を示した。DEN+ES 群は DEN 群と比較して有意に高い値を示した。未処置 CONT 群とは有意な差は検出されなかった。

以上から総合的に判断して低周波電気刺激によってミトコンドリア生合成およびミトコンドリア量、ミトコンドリア内酵素活性が増加したと結論した。

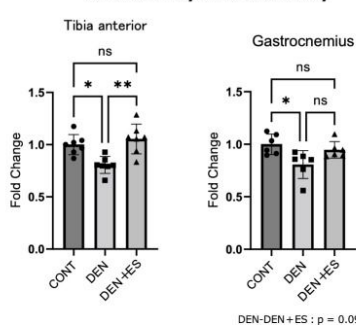
a: Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α



b: Cytochrome c oxidase



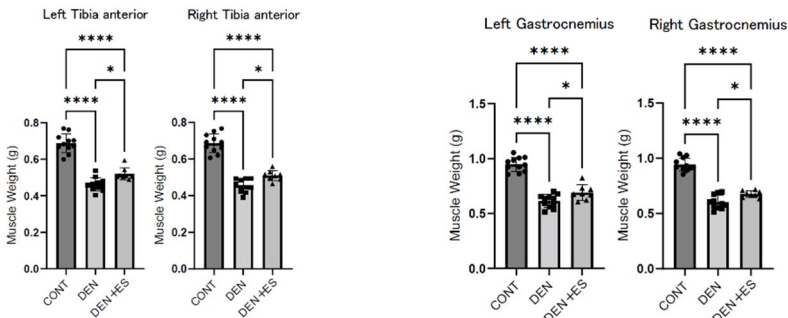
c: Citrate synthase activity



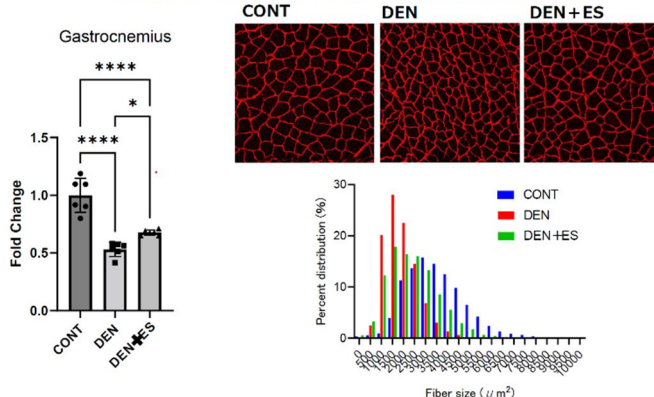
(2-1) 高周波 EMS が脱神経による骨格筋萎縮に与える影響

低周波 EMS は脱神経による骨格筋萎縮に対して抑制効果があることがわかった。次に高周波 EMS に関して同様の効果があるかを改めて検討した。その結果、低周波 EMS と同様、未処置 CONT 群と比較して脱神経 DEN 群および脱神経と電気刺激併用の DEN+ES 群は有意に低値を示した。さらに低周波と同様 DEN+ES 群は DEN 群と比較して有意に高値を示した。以上から高周波 EMS も低周波と同様脱神経による骨格筋萎縮に対して抑制効果を示すことが分かった。

低周波と同様筋線維断面積の評価を実施した。その結果、低周波と同様、DEN 群および DEN+ES 群は CONT 群に対して有意に低値を示したが、DEN 群と DEN+ES 群の比較では DEN+ES 群のほうが有意に大きく、高周波 EMS は筋萎縮に対して抑制効果があることが分かった。



C: Gastrocnemius cross-sectional area

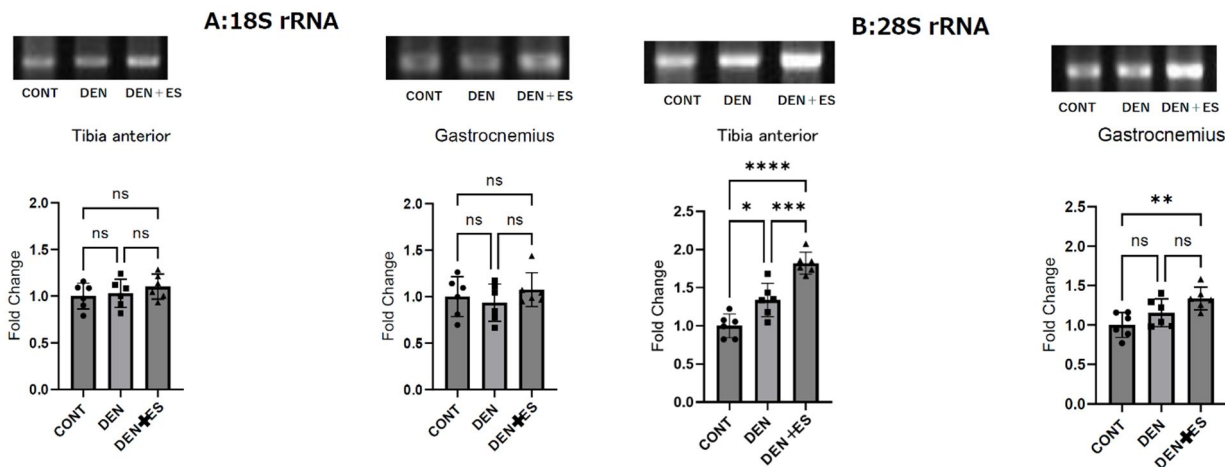
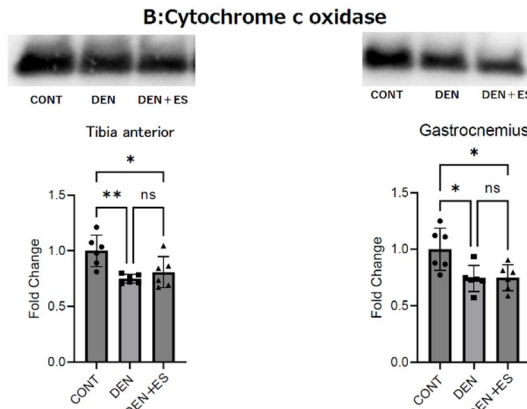


(2-1)高周波 EMS の脱神経による骨格筋萎縮抑制における分子メカニズム

低周波 EMS においてはミトコンドリア合成およびその量の増加が骨格筋萎縮抑制において重要な結論を得た。高周波 EMS において同様の効果があるかを検証するためミトコンドリアの量のマーカーであるシトクロム C 量を測定した。ところが高周波 EMS によるシトクロム C 量の増加は観察されず、低周波 EMS と異なりミトコンドリア量の増加は萎縮抑制メカニズムには関与しない可能性が示唆された。

萎縮抑制に関わる新たなシグナルを探索

する目的で RNA シークエンスによる網羅解析を実施したところ、リボソーム生合成経路の増加を示唆する結果が得られた。リボソームはタンパク質翻訳の場であり、骨格筋におけるタンパク質翻訳容量をあらわす。そこでリボソーム量を反映する 18S、28S リボソーム RNA 量を分析した。その結果、特に 28S リボソーム RNA 量において電気刺激群において高値を示す結果が得られた。以上から高周波 EMS の骨格筋萎縮抑制効果においてはリボソーム量増加による翻訳容量増加が寄与しており、低周波 EMS とはその分子メカニズムが異なることが分かった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamura Yuki, Jee Eunbin, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of endurance training on the expression of host proteins involved in SARS CoV 2 cell entry in C57BL/6J mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Takahiro, Ato Satoru, Knudsen Jonas R., Henriquez-Olguin Carlos, Li Zhencheng, Wakabayashi Koki, Suginozaki Takeshi, Higashida Kazuhiko, Tamura Yuki, Nakazato Koichi, Jensen Thomas E., Ogasawara Riki	4. 巻 321
2. 論文標題 c-Myc overexpression increases ribosome biogenesis and protein synthesis independent of mTORC1 activation in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E551 ~ E559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00164.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ochi Eisuke, Ueda Hisashi, Tsuchiya Yosuke, Nakazato Koichi	4. 巻 121
2. 論文標題 Eccentric exercise causes delayed sensory nerve conduction velocity but no repeated bout effect in the flexor pollicis brevis muscles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 3069 ~ 3081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00421-021-04773-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kotani Takaya, Takegaki Junya, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Nakazato Koichi, Ishii Naokata	4. 巻 9
2. 論文標題 The effect of repeated bouts of electrical stimulation induced muscle contractions on proteolytic signaling in rat skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 1950-1960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Takashi、Hakkaku Takayoshi、Iwai Kazunori、Nakazato Koichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Weight Category-dependent Trunk Muscle Strength and its Relation with LBP in Elite Judokas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sports Medicine International Open	6. 最初と最後の頁 E14 ~ E21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1303-2741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takegaki Junya、Ogasawara Riki、Kouzaki Karina、Fujita Satoshi、Nakazato Koichi、Ishii Naokata	4. 巻 70
2. 論文標題 The distribution of eukaryotic initiation factor 4E after bouts of resistance exercise is altered by shortening of recovery periods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00781-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honma Hiroki、Kobatake Naoyuki、Sekimoto Yusuke、Saito Mika、Mochizuki Yukina、Okamoto Takanobu、Nakazato Koichi、Nishiyama Tetsunari、Kikuchi Naoki	4. 巻 34
2. 論文標題 Ciliary Neurotrophic Factor Receptor rs41274853 Polymorphism Is Associated With Weightlifting Performance in Japanese Weightlifters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Strength and Conditioning Research	6. 最初と最後の頁 3037 ~ 3041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1519/JSC.00000000000003750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumi Koichiro、Munakata Kinuyo、Konno Saori、Ashida Kinya、Nakazato Koichi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Inorganic Iron Supplementation Rescues Hematological Insufficiency Even Under Intense Exercise Training in a Mouse Model of Iron Deficiency with Anemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Trace Element Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12011-020-02402-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 319
2. 論文標題 Electrically stimulated contractile activity-induced transcriptomic responses and metabolic remodeling in C2C12 myotubes: twitch vs. tetanic contractions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1029 ~ C1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00494.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Takanobu, Hashimoto Yuto, Kobayashi Ryota, Nakazato Koichi, Willems Mark Elisabeth Theodorus	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of blackcurrant extract on arterial functions in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Hypertension	6. 最初と最後の頁 640 ~ 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10641963.2020.1764015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumi Koichiro, Ashida Kinya, Nakazato Koichi	4. 巻 105
2. 論文標題 Repeated stretch?shortening contraction of the triceps surae attenuates muscle atrophy and liver dysfunction in a rat model of inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Physiology	6. 最初と最後の頁 1111 ~ 1123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/EP088622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uno Hiroyuki, Kamiya Shohei, Akimoto Ryuji, Hosoki Katsu, Tadano Shunta, Kouzaki Karina, Tamura Yuki, Kotani Takaya, Isemura Mako, Nakazato Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Low-frequency electrical stimulation of bilateral hind legs by belt electrodes is effective for preventing denervation-induced atrophies in multiple skeletal muscle groups in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-25359-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 De Almeida Kathleen Yasmin, Saito Mika, Homma Hiroki, Mochizuki Yukina, Saito Aoto, Deguchi Minoru, Kozuma Ayumu, Okamoto Takanobu, Nakazato Koichi, Kikuchi Naoki	4. 巻 41
2. 論文標題 ALDH2 gene polymorphism is associated with fitness in the elderly Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Anthropology	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) 10.1186/s40101-022-00312-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mano Yosuke, Tsukamoto Manabu, Wang Ke-Yong, Nabeshima Takayuki, Kosugi Kenji, Tajima Takafumi, Yamanaka Yoshiaki, Suzuki Hitoshi, Kawasaki Makoto, Nakamura Eiichiro, Zhou Qian, Azuma Kagaku, Nakashima Tamiji, Tamura Yuki, Kozaki Karina, Nakazato Koichi, Li Yun-shan, Kawai Kazuaki, Yatera Kazuhiro, Sakai Akinori	4. 巻 40
2. 論文標題 Oxidative stress causes muscle structural alterations via p38 MAPK signaling in COPD mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 927 ~ 939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-022-01371-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotani Takaya, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kato Hikaru, Isemura Mako, Nakazato Koichi	4. 巻 133
2. 論文標題 Percutaneous electrical stimulation-induced muscle contraction prevents the decrease in ribosome RNA and ribosome protein during pelvic hindlimb suspension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 822 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00204.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jee Eunbin, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 47
2. 論文標題 Effect of different types of muscle activity on the gene and protein expression of ALDH family members in C57BL/6J mouse skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism	6. 最初と最後の頁 775 ~ 786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/apnm-2022-0005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Akane, Jee Eunbin, Tamura Yuki, Kouzaki Karina, Kotani Takaya, Nakazato Koichi	4. 巻 322
2. 論文標題 Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency promotes skeletal muscle atrophy in aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R511 ~ R525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00304.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Naoki, Tajima Takafumi, Tamura Yuki, Yamanaka Yoshiaki, Menuki Kunitaka, Okamoto Takanobu, Sakamaki-Sunaga Mikako, Sakai Akinori, Hiranuma Kenji, Nakazato Koichi	4. 巻 39
2. 論文標題 The ALDH2 rs671 polymorphism is associated with athletic status and muscle strength in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology of Sport	6. 最初と最後の頁 429 ~ 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5114/biolsport.2022.106151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中里浩一
2. 発表標題 骨格筋形態・代謝適応制御の分子運動生理学 その黎明期から未来へ、遺伝子多型研究が分子運動生理学に果たす役割
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本体育大学体育研究所 https://www.nittai.ac.jp/kenkyujo/index.html
--

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

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