

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500641

研究課題名（和文） 加圧トレーニングによる筋細胞増大メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanisms of muscle hypertrophy in Kaatsu training

研究代表者

内貴 猛 (NAIKI TAKERU)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：40241385

研究成果の概要（和文）： 加圧トレーニングにおける筋肥大のメカニズムを筋芽細胞を用いて細胞レベルで調べた結果、四肢の根元の圧迫による低酸素・低栄養状態が筋芽細胞にダメージを与え、その後に筋芽細胞の増殖能が増加することがわかった。さらに低酸素・低栄養状態の時に筋芽細胞に10%程度の繰り返し引張りひずみを与えると、ダメージを緩和する、あるいは回復を早める効果があることがわかった。

研究成果の概要（英文）： Strength training with low load in combination with vascular occlusion, named Kaatsu training, increases muscular size and strength similarly to conventional, heavy resistance training. The aim of the present study is to know the effects of ischemia and cyclic stretch on the proliferation of cultured myoblasts. The obtained results suggest that activated satellite cells are damaged by hypoxia and reperfusion, and that the proliferation rate increased as a result of recovery from the damage. Furthermore, the moderate training with 10% cyclic strain enhances cell proliferation during the recovery process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：バイオメカニクス

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：虚血・うっ血・筋芽細胞・成長ホルモン・増殖因子・繰り返し引張りひずみ

## 1. 研究開始当初の背景

加圧トレーニングとは、四肢の根元を適度に圧迫して、筋内の血流を制限した状態で軽度のトレーニングを行うことにより、激しいトレーニングを行ったときと同程度の筋肥大を引き起こすトレーニング方法である。当初はボディビルディングのトレーニング

方法として開発されたが、手軽さから現在ではリハビリテーションや中高齢者のアンチエイジング、ダイエット等の医療・健康やスポーツ分野、さらには航空宇宙医学分野においても注目されている。その効果については既に多くの研究により確実なものとして認められている。しかし、そのメカニズムにつ

いては不明な点が多く、完全には明らかになっていない。ヒトや実験動物を用いた研究から、加圧トレーニングにより乳酸が普通のトレーニングより多く筋肉中に蓄積し、成長ホルモンの分泌が増加することがわかっている。この現象が筋肥大を引き起こす直接の原因ではないかと考えられているが、生体を用いた研究ではその因果関係を実証することはできない。体内では、乳酸や成長ホルモンによる影響と同時に、IGF（インシュリン様増殖因子）、FGF（線維芽細胞増殖因子）、PDGF（血小板由来増殖因子）等の増殖因子濃度の上昇、血流制限の影響や神経活動の影響、筋肉の収縮伸展活動の影響、細胞内小胞体ストレスの影響、細胞内エネルギー代謝変化の影響が進行し、どれか一つの要因が支配的であるのか、あるいはこれらの要因がカスケード的に発生して筋肥大を引き起こしているのか等を明らかにすることができない。各要因と筋肥大との因果関係を明らかにするには、他の要因の影響が全くない状態で、その要因の大きさの程度を段階的に変えてやり、筋肥大におよぼす効果を検討する必要がある。一般的にこのような検討には、実験動物より摘出した組織を用いる方法と、培養細胞を用いる方法が有効である。骨格筋細胞は増殖しないため、培養細胞には活性化した筋衛星細胞のモデルである筋芽細胞株が多く使用される。そのため、骨格筋細胞そのものへの作用を調べるわけではないが、各要因を完全に独立に検討できることから、本研究の場合には培養細胞を用いる方法が適当であると考えられる。そこで、本研究では筋芽細胞を用いた実験により、加圧トレーニングにおいて発生する各種要因の筋肥大におよぼす効果を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、活性化した筋衛星細胞のモデルとして一般的に使用されている筋芽細胞株（H9c2）を使用し、その増殖速度におよぼす各要因の効果、あるいはそれらの相乗効果を検討する。加圧トレーニングにおいては、低酸素・低栄養、細胞の収縮伸展、乳酸の増加、成長ホルモンの増加、細胞内エネルギー代謝の変化、細胞内小胞体ストレスの変化、運動神経と交感神経の活動、が起こると考えられる。それらの要因の影響を順次検討したいと考えたが、本研究では、血流の減少、細胞の収縮伸展、乳酸の増加、成長ホルモン、幾つかの細胞増殖因子の増加が筋芽細胞の増殖能におよぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 低酸素・低栄養、乳酸、成長ホルモン、増殖因子の影響

筋芽細胞を株分けして、通常状態（37℃、

O<sub>2</sub>:18%, CO<sub>2</sub>:5%）で24時間培養を行った。培養液には、高濃度グルコース含有 D-MEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）を用いた。その後、低酸素低栄養状態で1時間または2時間培養した。この時のインキュベータの設定は37℃、CO<sub>2</sub>:5%、O<sub>2</sub>:2%とし、培養液には glucose と L-glutamine を含まない D-MEM を用いた。低酸素刺激終了後は、培養液を高濃度グルコース含有 D-MEM に交換し、通常状態で培養を続けた。比較対象（control）として、同時に株分けをした筋芽細胞を通常状態で培養した。

また、成長ホルモン、IGF、PDGF、TGF $\beta$ 、ノルアドレナリンの影響を検討するために、株分けをして24時間培養した筋芽細胞を、成長ホルモン [40 ng/mL]、あるいは IGF [2 ng/mL]、PDGF [2 ng/mL]、TGF $\beta$  [1 ng/nL]、ノルアドレナリン [1  $\mu$ M] を添加した培養液で培養をした。同様に比較対象として同時に株分けをした筋芽細胞を通常状態で培養した。成長ホルモンの濃度は加圧トレーニングにおける測定値としたが、その他の増殖因子の濃度は ED<sub>50</sub>（50%効果量）の2倍の濃度とした。

刺激開始時を0とし、0、24、48、72時間における細胞数を Alamar Blue 法（改良 MTT 法）で測定し、それら間における細胞増殖率を評価した。

## (2) 細胞の収縮伸展の影響

筋芽細胞は骨格筋細胞とは異なり収縮せず、トレーニング中には周りの骨格筋細胞の収縮伸展により圧迫と伸展を繰り返していると考えられる。そこで本研究では細胞自動伸展装置（ストレックス、STB-140）により細胞を周期的に伸展し、その影響を検討した。本装置では細胞を柔軟なシリコン製伸展チャンバ（ストレックス、STB-CH-10.0、細胞播種部の厚さ 200  $\mu$ m）に播種し、そのチャンバを周期的に引っ張ることにより細胞に伸展刺激を与えている。筋芽細胞（H9c2）をコラーゲンコートした伸展チャンバに播種して、通常状態（37℃、O<sub>2</sub>:18%、CO<sub>2</sub>:5%）で24時間培養した。培養液には、高濃度グルコース含有 D-MEM を用いた。その後、培養液を glucose と L-glutamine を含まない D-MEM に入れ替えて、伸展チャンバを細胞自動伸展装置に取り付け、インキュベータ内の酸素濃度を2%に変更し、低酸素・低栄養状態で1時間培養した。同時に細胞に10%または18%の伸展ひずみを0.5 Hzで繰り返し与えた。1時間後に培養液を高濃度グルコース含有 D-MEM に交換し、伸展せずに24時間通常状態で培養した。伸展チャンバに播種して伸展ひずみと低酸素刺激を与えなかった細胞を比較対象（control）とした。刺激開始直前（0時間）、刺激開始から24時間後の細胞数を

Alamar Blue 法を用いて測定し、細胞増殖率を求め、control と比較した。統計的検定には ANOVA を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 低酸素・低栄養、乳酸、成長ホルモン、増殖因子の影響

細胞を 60 分間低酸素・低栄養状態で培養し、その後成長ホルモン、IGF、FGF、PDGF を添加して（加圧トレーニングを模した状態）培養した結果、24 時間毎の細胞増殖率は、刺激を加えた場合と control との間に有意差は見られなかった。しかし、加圧トレーニングを模した状態の刺激を与えた場合、0~24 時間と 24~48 時間の間で細胞増殖率が増加する傾向があった。これは、細胞が低酸素・低栄養刺激でダメージを受けた後、その影響により増殖率が増加することを示している。この効果により、加圧トレーニングでは筋肥大が起こるものと考えられる。そのため、低酸素低栄養刺激から 24 時間でどれだけ細胞増殖率が低下する（ダメージを受ける）のかが重要と考えられる。

低酸素低栄養状態で培養する時間の影響を調べた結果、60 分以上の低酸素・低栄養刺激を加えると細胞増殖率が有意に低下し、360 分のような長時間低酸素・低栄養刺激を加えた場合には、細胞増殖率は control の 30% 程度まで低下した。しかし、幾つかの培養ディッシュでは 60 分および 120 分の低酸素低栄養刺激を加えた場合、0~24 時間における、細胞増殖率が control よりも有意に高くなるがあった。この場合は、低酸素・低栄養刺激を受けた細胞は、24 時間以内に低酸素・低栄養刺激のダメージから回復し、細胞増殖率が増加したと考えられる。ただし、今回の研究では、どのような条件がダメージの回復時期をコントロールしているのかを特定することはできなかった。また、360 分のような長時間にわたって低酸素・低栄養状態にさらされた細胞は、増殖能を回復する前に死滅したと考えられる。おそらく低酸素・低栄養刺激を与える時間に関しては、120 分と 360 分の間に細胞増殖率を回復させることができる限界があるのではないかと推測される。

乳酸あるいは成長ホルモン、ノルアドレナリン、PDGF、IGF-I、TGF- $\beta$ 、FGF が単独で筋芽細胞の増殖速度におよぼす影響を検討した結果、乳酸や成長ホルモン、増殖因子の影響はほとんどないことがわかった。これらの結果から、低酸素・低栄養刺激が細胞増殖能におよぼす影響が最も大きいことがわかった。

##### (2) 細胞の収縮伸展の影響

低酸素・低栄養状態で培養すると同時に筋芽細胞に繰り返し伸展ひずみを与えた結

果、10%の繰り返し伸展ひずみを与えた細胞の細胞増殖率は control 細胞（伸展ひずみ 0%、低酸素低栄養刺激なし）の増殖率と同程度（1.02 倍）であったが、18%の繰り返し伸展ひずみを加えた細胞の増殖率は、control 細胞の増殖率より有意に低くなることがわかった。

一方、上記の低酸素・低栄養刺激のみの影響を検討した結果では、60 分の低酸素・低栄養刺激を与えた細胞の 24 時間における増殖率は、低酸素・低栄養刺激を与えなかった control 細胞の 0.79 倍になった。すなわち、低酸素・低栄養刺激を加えると細胞がダメージを受け、細胞増殖率はいったん低下し、その後回復するが、24 時間後でも刺激を与えなかった細胞と同程度までは回復しないという結果であった。しかし、低酸素・低栄養刺激中に細胞に 10%の繰り返し伸展ひずみ刺激を与えることにより、細胞増殖率は control と同程度まで回復することが本研究により明らかになった。いったん細胞増殖率が低下していた可能性があるにもかかわらず、24 時間後の細胞増殖率が control と同程度になったということは、24 時間後における瞬間的な増殖率は control よりも高くなっていると考えられる。

これらの結果から、通常の運動時の生体内での筋の長さの変化は概ね 10%であることから、加圧トレーニングにおいて筋肉を周期的に収縮させることは、低酸素・低栄養刺激のダメージを緩和する、あるいは低酸素・低栄養刺激のダメージからの回復を早める効果があると考えられる。しかし、繰り返し伸展刺激のひずみ量が多ければよいわけではなく、18%の繰り返し伸展ひずみを与えた場合には、細胞増殖率の回復を早めるどころか、さらに細胞増殖率を低下させることがわかった。

以上のことから、加圧トレーニングにおいては、血流を制限した状態で適度な運動により衛星細胞を伸展させることが、筋肥大を促進するために重要であることが示唆された。

以上、本研究により低酸素・低栄養刺激を与えると、細胞増殖率は一旦低下するが、その後は回復して、刺激を与えない細胞よりも多く増殖する傾向があることが分かった。さらに、細胞に適度な伸展ひずみ（10%程度）の力学的負荷を加えると、細胞増殖率の回復が早くなることが分かった。

これらのことから、加圧トレーニングにおいては、血流制限が衛星細胞にダメージを与えるが、力学的刺激（10%程度の筋長の変化を伴う運動）を与えることによって、回復が早くなり、筋肥大を引起すというメカニズムが存在することが示唆された。

## 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4件)

- ① T. Naiki, S. Fujii, K. Hayashi, Effects of ischemia and cyclic stretch on the proliferation of myoblasts, Abstracts of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2012, 査読無、2012、CD-ROM.
- ② 内貴 猛, 藤井智子, 林紘三郎、低酸素環境における筋芽細胞の増殖におよぼす繰り返し伸展刺激の影響、第24回バイオエンジニアリング講演会講演論文集、査読無、11-47、2012、CD-ROM。
- ③ 藤井智子, 内貴 猛, 林紘三郎、培養筋芽細胞の増殖におよぼす低酸素刺激の影響、第20回バイオフィロンティア講演会講演論文集、査読無、9-10、2009、35-36。
- ④ T. Naiki, S. Fujii, K. Hayashi, Effects of ischemic and reperfusion on proliferation of myoblasts, Abstracts of the 3rd Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009, 査読無、2009、62.

[学会発表] (計4件)

- ① T. Naiki, S. Fujii, K. Hayashi, Effects of ischemia and cyclic stretch on the proliferation of myoblasts, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2012, 2012. 5. 27, Beijing, China.
- ② 内貴 猛, 藤井智子, 林紘三郎、低酸素環境における筋芽細胞の増殖におよぼす繰り返し伸展刺激の影響、第24回バイオエンジニアリング講演会、2012年1月8日、大阪大学(大阪府)。
- ③ 藤井智子, 内貴 猛, 林紘三郎、培養筋芽細胞の増殖におよぼす低酸素刺激の影響、第20回バイオフィロンティア講演会、2009年11月7日、和歌山県民文化会館(和歌山市)。
- ④ T. Naiki, S. Fujii, K. Hayashi, Effects of ischemic and reperfusion on proliferation of myoblasts, 3rd Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009, 2009年9月4日, Engels berg, Switzerland.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内貴 猛 (NAIKI TAKERU)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号：40241385

### (2) 研究分担者

林 紘三郎 (HAYASHI KOZABURO)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号：90026196  
八田 貴 (HATTA TAKASHI)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号：00218497