

機関番号：32620

研究種目：若手B

研究期間：2009～2010

課題番号：21700548

研究課題名（和文）一過性の血流制限筋萎縮防止の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of molecular mechanism in prevention of muscular atrophy by transient blood flow restriction.

研究代表者

笥 佐織 (KAKEHI SAORI)

順天堂大学・医学部・研究員

研究者番号：00450560

研究成果の概要（和文）：

本研究は一過性の筋肉への血流制限の筋萎縮防止効果の明確な分子メカニズムを解明するため実験を行った。マウス筋芽細胞に対する過酸化水素・低酸素の共刺激により骨格筋特異的ユビキチンリガーゼの発現は著明に抑制された。また、同様の系にて筋管細胞の直径の減少も抑制され、一過性の低酸素刺激は何らかのシグナル伝達を経て骨格筋萎縮に予防的に働くことが予想された。一方、筋萎縮と関連がある不活動時の骨格筋のインスリン抵抗性について検討した結果、ギプス固定後の骨格筋において、インスリン刺激時の糖取り込み量が有意に減少したという結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Transient blood flow restriction prevents muscular atrophy and weakness induced by chronic unloading. However, it was unclear which molecular mechanism. In cultured C2C12 myotube, the mRNA level of ubiquitin ligase atrogin-1・MuRF1 and the decreasing of diameter were inhibited by hypoxic stimulation at hydrogen peroxide -induced muscle atrophy model. On the other hand, the amount of insulin stimulated glucose uptake was decreased by 24 hours hind limb fixation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、今後高齢少子化社会の到来が

予想される。従って、豊かな老後と医療費削減を目指すための対策は、最優先されるべき

課題である。実際に、政府の健康フロンティア戦略は「介護予防」を柱の一つとしており、その目的のために取り組まれるべき極めて重要な課題の一つに寝たきりの予防がある。現在の日本における寝たきりの原因の約25%が衰弱や骨折、転倒であり、約40%が脳血管疾患によることが明らかになっている。これらのことから、寝たきりが出現する機序として、疾患が発症した時の長期臥床により廃用性筋萎縮が引き起こされ、物理的に自立する筋力が保てないことが原因として考えられる。実際に、安静臥床により1週間で10~15%、3~5週で約20%もの筋力低下が報告されており、安静時の筋萎縮は予想以上に急速に進むことがわかっている(Mittler E. Arch Phys Med Rehab, 1970, Dudley GA, et al. Physiologist, 1989)。そのため、早期リハビリテーションの必要性が繰り返し強調されているが、現状の寝たきり患者、要介護者の増加を鑑みると、今後の我が国において、さらなる画期的な取り組みが必要であると考えられる。

廃用性筋萎縮の効果的な予防手段として、筋力トレーニングがある。高齢期におけるトレーナビリティはさまざまな先行研究によって証明されており、Frontera らによると、60-72歳の高齢者を対象に週3回、12週間の筋力トレーニングを行った結果、大腿四頭筋横断面積が11.4%増加すること、この時の最大屈曲、伸展筋力がそれぞれ170%、227%増加することが示されている。これらは若齢者に対してのものと同様の効果を示しており、高齢者の筋力トレーニングに対する適応能力は若齢者と同等であることを示している(Frontera WR, J Appl Physiol. 1988)。また、Grimbyらは平均81歳の9名の男性に、約2ヶ月間に渡り求心性と遠心性トレーニングを行わせた結果、両者共に有意なトレーニ

ング効果が認められたとしている(Grimby G, J Appl Physiol. 1992)。

しかしながら、現時点においては高齢期におこる加齢に伴う筋量の低下や、筋力トレーニングに対するトレーナビリティについて、明確な基礎的メカニズムとその起序が証明されていないのが現状である。また、高齢者や安静を必要とする患者においては筋力トレーニングが骨格系のみならず、循環器系にも負担が大きく、怪我や疾病を新たに引き起こす可能性があることから、もっと安全で効果的な廃用性筋萎縮防止法の開発が望まれている。骨格筋と同様、重要な運動器である骨について考えると、骨折の予防として栄養や運動療法のあり方の面から長く研究され、一定の効果が得られてきた。しかしながら、骨折やその重要なリスクである骨粗鬆症を予防・改善するために、骨代謝のメカニズムが分子レベルで解明されつつあり、これらに加えて薬物療法を行うことが治療のゴールドスタンダードになりつつある。その一方で、骨格筋の廃用性萎縮についての分子メカニズムは未だ不明な点が多く、効果的に筋萎縮を予防する薬剤も未だ開発されていない。よって、今後の廃用性筋萎縮の予防法のメカニズムに関する基礎的な研究は将来の超高齢化社会において極めてneedsの高い研究となると考えられる。

近年、ヒトにおけるギプス固定と松葉杖による廃用性筋萎縮モデルにおいて、血流制限単独で等尺性収縮トレーニングと同等の骨格筋萎縮予防が可能であることが明らかとなった(Kubota A. et al. Med Sci Sports Exerc, 2007)。これは、世界で初めてヒトにおいて骨格筋を収縮させる以外の方法で廃用性萎縮を予防した画期的な報告であり、その分子メカニズムは全く不明で、今後はin vitro, in vivoの実験系でより詳細な機序の解明が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、一過性の筋肉への血流制限の筋萎縮防止効果の明確な基礎メカニズムを解明することである。具体的には、血流制限によってもたらされると考えられる一過性の低酸素刺激が筋萎縮に対してもたらす影響を調べるために、低酸素チャンバーを用いた実験を行い、骨格筋萎縮の鍵分子である遺伝子群の発現や培養筋管細胞の径について検討を加える。

また、筋萎縮をもたらす身体活動量の減少（不活動）は骨格筋におけるインスリン抵抗性を惹起することが明らかとなっているが、不活動によりもたらされる筋活動制限時のインスリン抵抗性発症の分子機序については未だ明らかになっていない。そこでギプス固定による骨格筋の活動を制限した場合の骨格筋におけるインスリン抵抗性の変化について検討し、筋萎縮防止のための一過性の筋肉への血流制限が与える影響についても明らかにすることを目的とし、実験を行った。

## 3. 研究の方法

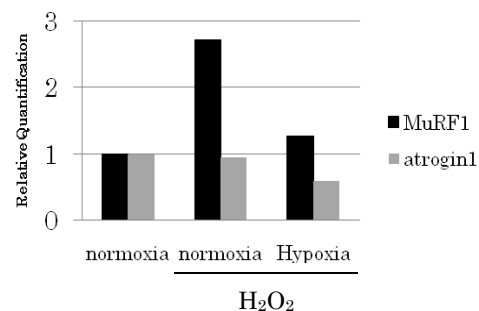
C2C12細胞を用いて、酸化ストレス負荷（過酸化水素負荷）による *in vitro* の廃用性萎縮モデルにおいて実験を行った。C2C12 マウス筋芽細胞を分化誘導させた筋管細胞に過酸化水素を添加し、同時に低酸素刺激を加えた。30分後に mRNA を抽出し、骨格筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1、atrogin1 の発現を real-time PCR にて調べた。また、低酸素刺激のタンパク分解系に与える影響を証明するために、刺激開始 24 時間後の、筋管細胞の直径の測定を測定した。

8-9 週齢 C57BL6J 雄性マウスに対してギプス固定（24 時間）後に腓腹筋・足底筋を摘出し、インスリン刺激時の deoxyglucose の取り込み量を測定した。また、インスリン刺激

を行った 5 分後に腓腹筋・足底筋を摘出しインスリンシグナル伝達について検討を行った。

## 4. 研究成果

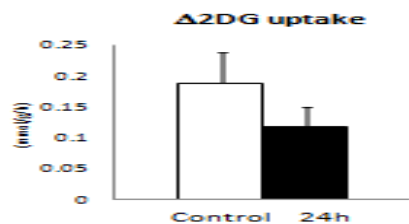
C2C12 細胞を用いて、酸化ストレス負荷による *in vitro* の廃用性萎縮モデルにおいて、酸化ストレスによる骨格筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1・atrogin1 の発現が増加したが、30 分の低酸素の刺激によりそれらの発現が著明に抑制されたことを見出した（図 1）。しかしながら、同じ系を用いて 3 時間後の MuRF1・atrogin1 の発現量を調べたところ、低酸素による抑制効果は見られなかった。



（図 1） C2C12 筋萎縮モデルにおける、低酸素刺激（0.5h）による MuRF1, atrogin1 mRNA 発現

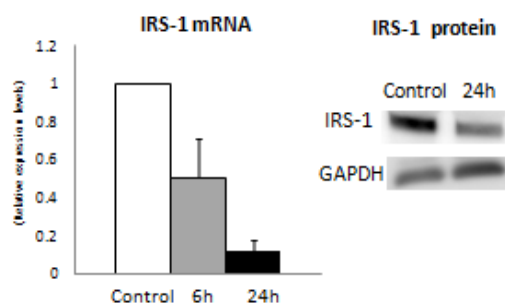
これらの事象より、一過性の低酸素刺激によるタンパク分解系への影響が示唆されたため、30 分間の低酸素刺激を行い 24 時間後の筋管細胞の直径の測定を行った。その結果、コントロールと比して、酸化ストレスのみでは直径の減少が見られたが、低酸素刺激を 30 分間加えることにより直径の減少が抑制された。これらの結果より、一過性の低酸素刺激は何らかのシグナル伝達を経て MuRF1 や atrogin1 の発現を減少させ骨格筋萎縮に予防的に働くことが予想されたが、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

一方、不活動モデルである下肢の 24 時間ギプス固定においてインスリン依存的筋糖取り込み量が減少した。(図 2)



(図 2) 24 時間のギプス固定による、骨格筋のインスリン感受性

さらに、ギプス固定によるインスリン抵抗性は骨格筋の可塑性に密接に関連する AKT のリン酸化と関連することが認められ、インスリンシグナル伝達で重要なタンパクである IRS-1 の mRNA 発現量が下肢のギプス固定後 6 時間から半減し、24 時間では著明に抑制はされ、蛋白レベルの減少も認められた。(図 3)



(図 3) 不活動によるインスリン受容体基質 - 1 (IRS-1) 発現の低下

これらのことより身体活動量の減少がインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆されるとともに、24 時間というごく短時間の不活動によっても筋肥大にも重要な役割を果たすインスリン受容体基質 - 1 (IRS-1) の発現量が低下することが明らかとなった。最近マウスでの 10 日間後肢懸垂モデルで、ユビキチンリガーゼ cb1-b の発現量増大にとまな

てインスリン受容体基質 - 1 (IRS-1) がユビキチン化分解され、筋萎縮を招くことが明らかとなった (Nakao R, Nikawa T et al. Mol Cell Biol. 2009)。しかしながら、今回観察された IRS-1 mRNA 発現量が抑制されるメカニズムについては未だ解明されておらず、今後更なる検討をしていく予定である。また、一過性の低酸素刺激が IRS-1 発現量や骨格筋の可塑性に密接に関連する AKT シグナルに与える影響についても検討していく。

本研究からもたらされる結果は、新規の骨格筋萎縮メカニズムの発見に繋がる可能性も期待され、将来の超高齢化社会において極めて重要な知見をもたらすものと期待される。

#### 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 1 件)

1. Sakurai Y, Tamura Y, Takeno K, Kumashiro N, Sato F, Kakehi S, Ikeda S, Katamoto S, Ogura Y, Saga N, Naito H, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H: Determinants of intramyocellular lipid accumulation after dietary fat loading in non-obese men. *J Diabetes Invest.* in press

[学会発表] (計 10 件)

1. Tamura Y, Sakurai Y, Takeno K, Kumashiro N, Ikeda S, Kakehi S, Watada H, Kawamori R: Effects of high fat diet on intramyocellular lipid and insulin resistance. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2009
2. Sakurai Y, Tamura Y, Takeno K, Kumashiro N, Ikeda S, Kakehi S, Watada

- H, Kawamori R: Effects of high fat diet on intramyocellular lipid and insulin resistance. The First Asia-Pacific Conference on Health Promotion and Education, Chiba, Japan, 2009
3. Tamura Y, Sakurai Y, Takeno K, Kakehi S, Ikeda S, Sato F, Hirose T, Watada H, Kawamori R.: Diabetes and Exercise: Intramyocellular Lipid Accumulation and Insulin Sensitivity. In *The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus* Jeju (Korea), 2009, p. 84-85
  4. 池田 真一、田村 好史、笥 佐織、綿田 裕孝、河盛 隆造：筋サイズ並びに筋糖代謝に対する PKC  $\delta$  の関与の検討, 第 65 回日本体力医学会, 2010
  5. 笥 佐織、田村 好史、池田 真一、綿田 裕孝、河盛 隆造：脂肪負荷感受性の規定因子の解明, 第 65 回日本体力医学会, 2010
  6. 池田 真一、田村 好史、笥 佐織、綿田 裕孝、河盛 隆造：廃用性筋萎縮に対する PKC  $\delta$  の関与の検討, 第 64 回日本体力医学会, 2009
  7. 笥 佐織、田村 好史、池田 真一、綿田 裕孝、河盛 隆造：筋インスリン抵抗性に対する高脂肪食と身体活動量の作用, 第 64 回日本体力医学会, 2009
  8. 田村 好史、櫻井 裕子、笥 佐織、池田 真一、佐賀 典生、小倉 裕司、内藤 久士、綿田 裕孝、河盛 隆造：ヒトにおける高脂肪食負荷が、骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン抵抗性発症に与える影響とその規定因子, 第 64 回日本体力医学会, 2009
  9. 櫻井裕子, 田村好史, 竹野景海, 熊代尚記, 池田真一, 笥 佐織, 綿田裕孝, 河盛隆造：ヒトにおける高脂肪食負荷が、骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン抵抗性発症に与える影響とその規定因子, 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009
  10. 田村好史, 櫻井裕子, 竹野景海, 熊代尚記, 池田真一, 笥 佐織, 綿田裕孝, 河盛隆造：ヒトにおける高脂肪食負荷が、骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン抵抗性発症に与える影響とその規定因子. 第 59 回日本体質医学会総会 東京都千代田区(日本), 日本体質医学会, 2009
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 笥 佐織 (KAKEHI SAORI)
- 順天堂大学・医学部・研究員
- 研究者番号：00450560