

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300189

研究課題名（和文）プレコンディショニング運動に栄養サポートを併用した廃用性筋萎縮の予防法の開発

研究課題名（英文）Development of medical countermeasures for disuse muscle atrophy and the protective effects of exercise preconditioning with nutritional supports

研究代表者

藤野 英己（FUJINO HIDEMI）

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20278998

研究成果の概要（和文）：廃用性萎縮筋では筋細胞への栄養や酸素供給などに関与する毛細血管ネットワークも減衰する。一方、運動は廃用性萎縮筋に対して、予防効果があるが活性酸素等の酸化ストレスも増加させる。活性酸素は筋タンパク質のユビキチン化を促進させ、タンパク質分解を進行させる。この作用は運動による効果を制限しているのではないかと考えられ、活性酸素の発生やユビキチン化の抑制をすることが廃用性筋萎縮の予防に重要であると考えられる。そこで、抗酸化力の高い栄養素やユビキチン化の抑制作用を持つ栄養素を摂取することで、運動の効果を最大限に得られる方法について検証した。本研究では、抗酸化作用、細胞活性化作用等があると考えられる栄養素（アスタキサンチン、フラボノイド、ヌクレオプロテイン等）を運動や安静時に摂取することで廃用性萎縮筋（血管退行等を含む）を予防できるかどうかについて検証した。この結果、運動やタンパク質摂取は筋萎縮の量的な変化を効果的に予防し、抗酸化サプリメントは筋萎縮時の毛細血管後退、ミトコンドリア障害、筋の速筋化を抑制した。これらの結果はリハビリテーションを行う際に栄養サポートを行うことで、効果的な廃用性筋萎縮の予防を行うことが可能になることを示唆した。また、栄養素により作用が異なるために適切な摂取を要し、今後、より効果的な栄養サポートを行うための栄養素（サプリメント等）を探索して、筋萎縮予防のための包括的リハビリテーション確立を進めるためのエビデンスの構築が必要である。

研究成果の概要（英文）：The reduction of skeletal muscle loss in pathological states, such as muscle disuse, has considerable effects in terms of rehabilitation and quality of life. Skeletal muscle and its microvasculature can exhibit remarkable plasticity in response to decreased functional demand, i.e., muscle disuse. In addition, disturbed redox signaling, due to increased production of reactive oxygen species (ROS), is an important regulator of cell signaling pathways that control both proteolysis and protein synthesis, and capillarity in skeletal muscle. Therefore, the purpose of this report is to investigate the effects of exercise with nutrition supports, e.g., anti-oxidant action, on atrophy and capillary regression in skeletal muscle. Exercise attenuated the atrophy in skeletal muscle. However, Exercise and loading could not attenuate the capillary regression in skeletal muscle. Anti-oxidant supplementation, i.e., astaxanthin, attenuated the capillary regression by decreasing the oxidative-stress. In addition, exercise combined with licorice flavonoid oil effectively reduced visceral adipose tissue, because exercise and licorice flavonoid oil enhanced the muscular and hepatic lipid metabolism, respectively. These results suggested that exercise combined with licorice flavonoid oil supplementation might be effective to decrease the risk from obesity. These results indicate that exercise combined with nutrition supports, i.e., nutrition supplementation, might be effective to prevent atrophy, capillary regression and metabolism disturbance in skeletal muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：複合領域

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、運動、栄養、抗酸化

1. 研究開始当初の背景

「生活習慣病予防対策の推進」と「介護予防の推進」を柱とする平成17年度からの10カ年戦略(健康フロンティア戦略)が策定された。平成18年6月に成立した医療制度改革関連法においては、予防を重視した介護や生活習慣病対策をその一つの柱としている。また、予防対策の中心は、「運動」と「栄養指導」である。しかし、「予防」に焦点をあて、科学的な裏付けをした研究は散見される程度である。また、両者の研究は単独では行われているが、運動と栄養の相互作用・相乗効果については、今後の学術的裏付けが期待されている。

2. 研究の目的

運動障害の原因の一つとして、廃用性筋萎縮がある。予防的に運動負荷を行うことで、骨格筋の収縮張力、筋横断面積、筋原線維タンパク質量、ミオシン重鎖(MHC)アイソフォームの速筋型への移行が予防できることを明らかとしてきた。その成果はすでに国際誌(Fujino, J Appl Physiol 2005; Yasuhara, Neurosci 2007; Fujino, Acta Physiol-Oxf, 2009; Takeda, J Muscle Res Cell Motil, 2009)に発表してきた。一方、廃用性萎縮筋では、骨格筋細胞への栄養や酸素供給などに関与する毛細血管ネットワークも減衰することを明らかとした(Fujino, J Appl Physiol 2005)。筋細胞の毛細血管ネットワークの変化には、特に筋細胞を取り囲む吻合毛細血管の減少が関与し、吻合毛細血管部における血管内皮細胞のアポトーシスを観察した(Fujino, Int Proc Microcirc 2004)。これらの結果から骨格筋細胞と毛細血管(特に吻合毛細血管)はクロストークを行っており、骨格筋の萎縮に毛細血管を含めた解析が必要であると考えられる。

廃用性萎縮筋では毛細血管ネットワークが減衰し、速筋型毛細血管へ移行するが、プレコンディショニング治療により毛細血管構造変化が減衰されることを検証した。これらの検証から運動は廃用性萎縮筋に対して、一定の予防効果がある。しかし、プレコンディショニング運動を行った際には、酸化ストレスが増加する知見も得られている(プレコンディショニング運動に限らず、運動により酸化ストレスは増加する)。この結果、運動による効果を一部制限しているのではないかと考えられる。活性酸素は体内で脂質、蛋白質、糖、核酸などを酸化変性させ、細胞機能を障害し、廃用性筋萎縮やサルコペニアを進行させることやユビキチン化を促進させ、タンパク質分解を進行させることが知られている(Powers, Am J Physiol, Review, 2005)。このため活性酸素の発生やユビキチン化の抑制をすることが重要な課題であり、運動による廃用性筋萎縮を抑制する効果的な方法

であるという結論を得た。そこで、抗酸化力の高い栄養素やユビキチン化の抑制作用を持つ栄養素を摂取することで、運動の効果を最大限に出す方法を検討した。

3. 研究の方法

本研究では、栄養サポート併用によるプレコンディショニング運動の筋萎縮に対する予防効果と作用機序を解明するために、骨格筋の代謝活性、タンパク質分解プロテアソーム系、骨格筋 PGC-1 α 、毛細血管ネットワークの三次元構造(共焦点レーザー解析)、血管新生因子(VEGF, Flt-1, KDR, angiopoietin-1, -2, Tie-2)・血管新生抑制因子(TSP-1)、低酸素誘導物質(HIF-1 α)等を検証した。また、血管新生因子は骨格筋細胞から産生されることや骨格筋細胞の代謝状況によりHIF-1 α が誘導され、VEGFの分泌を促すことから、毛細血管と骨格筋細胞のクロストークについても検証した。さらに栄養サポートは抗酸化力をもつ栄養素であるアスタキサンチン、炎症性サイトカインの抑制作用を持つ可能性がある栄養素(ヌクレオプロテイン)、フラボノイドの一種であるグラボノイドを用いて効果を検証した。

4. 研究成果

1) 抗酸化物質の摂取による筋萎縮の効果

多くの抗酸化物質はプロオキシダントになる要素を持っている。そこで本研究における栄養サポートとしてプロオキシダントとしての作用が低く、抗酸化作用をもつアスタキサンチンを使用した。

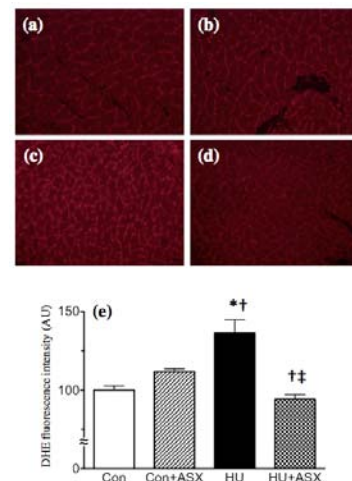


図1. (a) Con, (b) Con+ASX, (c) HU, (d) HU+ASX

成熟したWistar系雄ラット(12週齢)をコントロール群(Con)、栄養サポートのみを実施した群(Con+ASX)、後肢非荷重群(HU)、後肢非荷重+栄養サポート群(HU+ASX)の4群に分けた。HU群とHU+ASX群は尾部懸垂に

て後肢非荷重とし、Con+ASX 群と HU+ASX 群はゾンデを用いて経口的にアスタキサンチン (50 mg/kg, 富士化学工業より提供) を 1 日 2 回投与した。その結果、ROS は HU で有意に高くなり、ASX は ROS の発現を抑制した (図 1)。SOD 発現は HU 群が最も高く、ASX は SOD を抑制させた (図 2)。

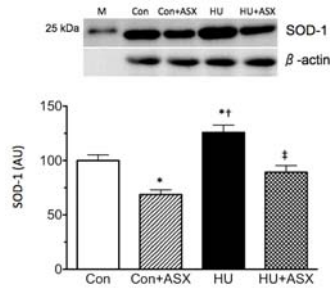


図 2. SOD-1 発現

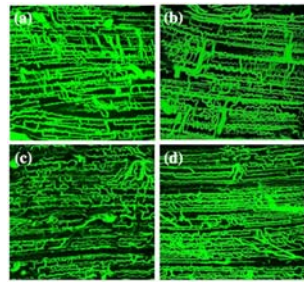


図 3. (a) Con, (b) Con+ASX, (c) HU, (d) HU+ASX; bar = 100µm

筋湿重量は、HU 群と HU+ASX 群で有意に低下した。C/F ratio、筋線維あたりの毛細血管数、毛細血管容積、毛細血管直径は、Con 群と比較して HU 群が有意に低値を示し、Con+ASX 群は有意に高値を示した。一方、HU 群に栄養サポートを行った HU+ASX 群では、C/F ratio 及び筋線維あたりの毛細血管数は Con 群と差が認められな

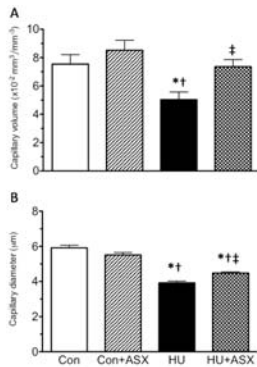


図 4. 毛細血管容積と内径

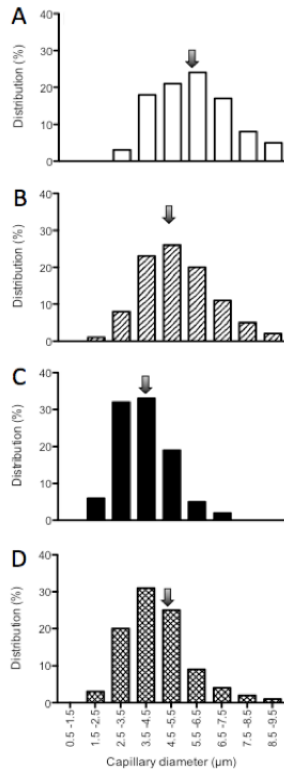


図 5. (A) Con, (B) Con+ASX, (C) HU, (D) HU+ASX

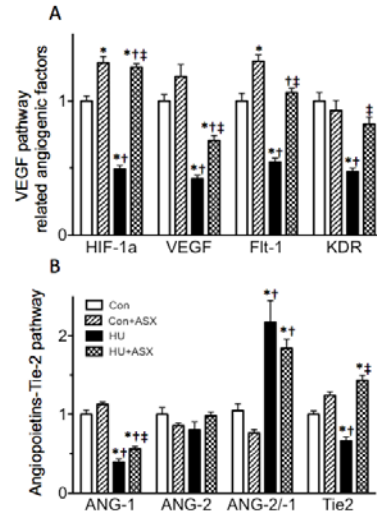


図 6. 血管新生因子

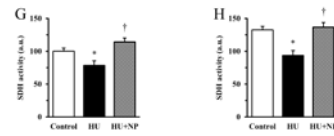
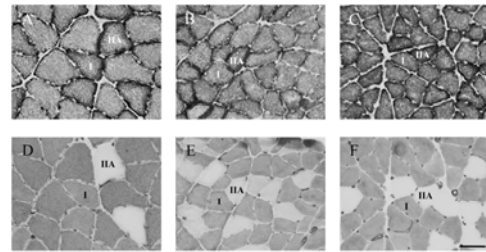


図 7. コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性

く、毛細血管退行を抑制したものと考えられる (図 3)。

毛細血管容積は、HU 群に比較して有意に高値を示し、Con 群と差が認められなかった (図 4)。また、毛細血管直径は Con 群に比較して低下を示したが、HU 群に比較して有意に高値を示した (図 5)。一方、血管新生に参与する VEGF は筋萎縮で減少したが ASX で発現低下を減衰させた。さらに他の血管新生因子についても同様に萎縮筋では抑制され、ASX は発現の抑制を減衰させた (図 6)。さらに血管新生因子と血管抑制因子の比では、萎縮筋では抑制され、ASX で増加した。

これらの結果から栄養サポートは骨格筋の廃用性萎縮に伴う毛細血管退行を防止することが確認された。

さらにヌクレオプロテイン摂取による萎縮予防効果についても検証した。SD ラットをコントロール群 (Control)、2 週間の後肢非荷重群 (HU)、及びヌクレオプロテインを摂取しながら HU を行った群 (HU+NP) に区分した。2 週間の後肢非荷重でヒラメ筋湿重量は Control 群に比較して、HU 群では 52% の減少、

NP を投与した HU+NP 群も 49% の有意な減少を示し、NP 投与による萎縮予防効果は観察されなかった。一方、酸化系的リン酸化系のコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性は HU 群で有意に低下したが、HU + NP 群は Control 群と比較して有意差はみられなかった

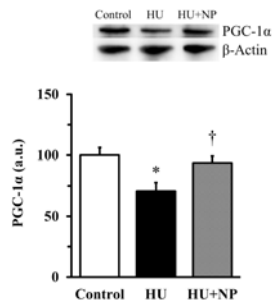


図 8. PGC-1α 発現

(図 7)。また、毛細血管・筋線維比は HU 群で有意に低下したが、HU+NP 群は HU 群と比較し有意に高値を示し、Control 群との間には有意差が認められなかった。これら結果から NP 投与により筋萎縮による骨格筋代謝活性の低下を減衰し、毛細血管退行を予防したものと考えられる。また、ミトコンドリア新生に関与する PGC-1α の発現を観察すると、HU 群では減少するが、HU+NP 群では HU 群と比較し有意に高値を示し、Control 群との間には有意差が認められなかった (図 8)。

本実験で得られた結果から NP は筋萎縮を予防する効果は認められないが筋代謝活性を保つ作用があり、筋萎縮に伴う微小血管障害を予防する働きがあることが認められた。

2) 運動に加え、栄養サポートを併用した検証を行った。本検証では、甘草抽出フラボノイドを摂取し、運動を行った場合の脂質代謝について、検討を行った。8 週齢の雄性 SD ラットを対照群 (Con 群, n=7)、運動群 (Ex 群, n=7)、グラボノイド群 (Gn 群, n=7)、運動+グラボノイド群 (ExGn 群, n=7) の 4 群に分けた。Ex 群及び ExGn 群には、トレッドミルを用いた中等度強度の持久運動を週に 5 日実施した。Gn 群と ExGn 群に対しては 1 日あたり 1500mg/kg の量のグラボノイドを、他の 2 群に対しては

同量のオリーブオイルを朝と夜の 2 回に分けて経口投与した。その結果、精巢上体脂肪の湿重量は、Ex 群、Gn 群、ExGn 群では Con 群に対して有意に

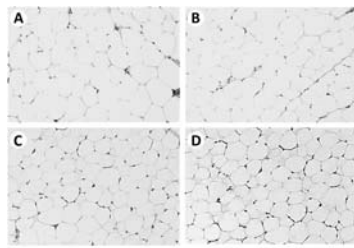


図 9: 脂肪組織の HE 染色所見
A: Con 群, B: Ex 群, C: GN 群, D: ExGN 群. スケールバーは 100µm である。

低値を示した。また、ExGn 群は Ex 群に対して有意に低値を示した。白色脂肪細胞の直径は、Gn 群と ExGn 群では Con 群に対して有意に低値を示した。また、ExGn 群は Ex 群に対して有意に低値を示した。一方、Con 群と Ex 群および Ex 群と Gn 群の間に有意差はなかった。肝臓の CPT 活性は、Gn 群と ExGn 群では Con 群及び Ex 群に対して有意に高値を示した。足底筋の HAD 活性及び CS は、Ex 群と ExGn 群では Con 群及び Gn 群に対して有意に高値を示した。これらの結果から運動に甘草抽出フラボノイド摂取を併用することにより効率的な脂質代謝の改善が明らかとなった。次にヌクレオプロテイン摂取した運動の効果についても検証した。その結果、運動と NP 投与を併用した NE 群では遅筋線維面積の有意な増加が観察された。また、運動を行った EX 群及び NE 群では遅筋線維比率の増加が観察された。本実験で得られた結果から運動のみでは筋肥大や筋代謝は有意差がみられるほど増加を示さなかったが、NP を投与することで有意な増加が得られることが明らかとなった。

3) 抗酸化物質の摂取を併用した運動による筋萎縮の効果の検証

10 週齢の雄性 SD ラット 35 匹を対照群、後肢非荷重群 (HU)、後肢非荷重期間中に Ax を投与した群 (HU+AX)、後肢非荷重期間中に毎

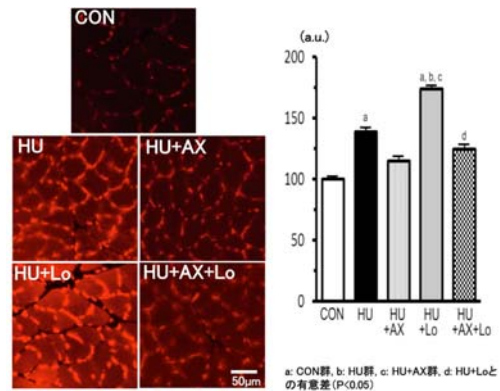


図 10. 酸化ストレス (ROS)

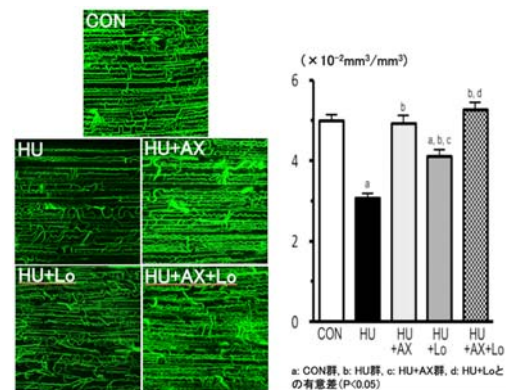


図 11. 毛細血管密度

日 1 時間の荷重を実施した群 (HU+Lo)、後肢非荷重期間中に Ax 投与と荷重を併用した群 (HU+AX+Lo) の 5 群に区分した。Ax (50 mg/kg、富士化学工業) は 1 日 2 回に分けて経口投与した。

HU 群と HU+AX 群の筋線維横断面積は対照群と比べて有意に低値を示したが、HU+Lo 群と HU+AX+Lo 群は HU 群と比べて有意に高値を示した。ROS と SOD-1 は、HU 群と HU+Lo 群では対照群と比べて有意に高値を示し、HU+Lo 群では HU 群と比べて有意に高値を示した (図 10)。

一方、HU+AX 群と HU+AX+Lo 群は対照群との間に有意差を認めなかった。ヒラメ筋における毛細血管容積は、HU 群と HU+Lo 群では対照群と比べて有意に低値を示したが、HU+AX 群と HU+AX+Lo 群は対照群との間に有意差を認めなかった。タイプ I 筋線維比率においても毛細血管容積の結果と同様の傾向を示した (図 11)。PGC-1 α の発現量は、HU 群と HU+Lo 群では対照群と比べて有意に低値を示したが、HU+AX 群と HU+AX+Lo 群は HU 群および HU+Lo 群と比べて有意に高値を示した。PGC-1 α の上流因子である e-NOS の発現量は、HU 群は対照群、HU+AX 群、HU+Lo 群と比べて有意に低値を示したが、HU+AX+Lo 群は他の 4 群と比較して有意に高値を示した。筋線維の SDH 活性に関して、HU 群は対照群と比べて有意に低値であったが、HU+AX 群と HU+Lo 群は HU 群に比べて有意に高値であった。また、HU+AX 群と HU+Lo 群は対照群と比べて有意に低値であったが、HU+AX+Lo 群と対照群の間には有意差を認めなかった。

以上の結果より運動やタンパク質摂取は筋萎縮の量的な変化を効果的に予防し、抗酸化サプリメントは筋萎縮時の毛細血管後退、ミトコンドリア障害、筋の速筋化を抑制した。これらの結果はリハビリテーションを行う際に栄養サポートを行うことによって、効果的な廃用性筋萎縮の予防を行うことが可能になることを示唆した。また、栄養素により機能が異なるために適切な摂取が必要であり、今後、より効果的な栄養サポートを行うための栄養素 (サプリメント等) を探索して、筋萎縮予防のための包括的リハビリテーション確立を進めるためのエビデンスを構築が必要である。

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 31 件)

1. Protective Effects of Astaxanthin on Capillary Regression in Atrophied Soleus Muscle of Rats. Kanazashi M, Okumura Y,

Al-Nassan S, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. *Acta Physiol* **207**, 405-415. 2013. 査読; 有

2. Differential Effects of Astaxanthin on Oxidative Key Enzyme and Capillarization in the Deep and Superficial Layers of Unloading-induced Atrophied Muscle. Okumura Y, Kanazashi M, Kanazawa Y, Fujita N, Kondo H, Fujino H. *J Phys Ther Sci* **25**, 349-353, 2013. 査読; 有

3. Comparison of premodulated interferential and pulsed current electrical stimulation in prevention of deep muscle atrophy in rats. Tanaka M, Hirayama Y, Fujita N, Fujino H. *J Mol Histol* **44**, 203-211, 2013. 査読; 有

4. Influence of magnetic stimulation on muscle atrophy in the rat unloading hindlimb muscles. Fujiwara Y, Arakawa T, Fujita N, Fujino H, Miki A. *Bulletin Health Sciences Kobe* **27**, 19-26, 2012. 査読; 有

5. Differences in capillary architecture, hemodynamics, and angiogenic factors in rat slow and fast plantarflexor muscle. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. *Muscle Nerve* **45**, 242-249, 2012. 査読; 有

6. Oxidative stress levels in rats depending on oxygen concentrations. Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ishihara A. *Oxid Med Cell Long*, 2012:381763, 5 pages, 2012. 査読; 有

7. Chronic exercise training down-regulates TNF- α and atrogen-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading. Saad Al-Nassan, Fujita N, Kondo H, Murakami S, Fujino H. *Acta Histochem Cytochem* **45**, 343-349, 2012. 査読; 有

8. Regressed three-dimensional capillary network and inhibited angiogenic factors in the soleus muscle of non-obese rats with type 2 diabetes. Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Roy RR, Ishihara A. *Nutrition & Metabolism* **8**, 77, 2011. 査読; 有

9. The combined effect of electrical stimulation and high-load isometric contraction on protein degradation pathways in muscle atrophy induced by hindlimb unloading. Fujita N, Murakami S, Fujino H. *J Biomed Biotechnol* doi:10.1155/2011/401493, 2011. 査読; 有

10. PGC-1 α and FOXO1 mRNA levels and fiber characteristics of the soleus and plantaris muscles in rats after hindlimb

unloading. Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Suzuki H, Kouzaki M, Takeda I, Ishihara A. *Histol Histopathol* **26**(12):1545-1553, 2011. 査読 ; 有

11. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. *Bosn J Basic Med Sci* **11**(2): 1-6, 2011. 査読 ; 有

12. Comparison of capillary architecture between slow and fast muscles in rats using a cofocal laser scanning microscope. Murakami S, Fujino H, Takeda I, Momota R, Kumagishi K, Ohtsuka A. *Acta Medica Okayama* **64** (1): 11-18. 2010. 査読 ; 有

13. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, Tayra JT, Morimoto T, Jing M, Kikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata F, Takeda I, Furuta T, Date I. *Brain Res* **1310**:200-207. 2010. 査読 ; 有

[学会発表] (計 96 件)

1. Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Ameliorative effects of antioxidant astaxanthin on capillary regression in hindlimb unloading-induced atrophied muscle. Integrative Biology of Exercise VI, Westminster, USA. 2012.10. 10.

2. Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Antioxidant Supplementation To Prevent The Progression Of Microangiopathy In Hindlimb Unloading-induced Atrophied Soleus Muscle In Rats. 59th American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 43(5): S187, San Francisco, USA. 2012. 5. 29.

3. Tanaka M, Fujita N, Fujino H. Preventive effects of premodulated interferential and pulsed currents on muscle atrophy in deep layer of rat hindlimb muscle. *FASEB J* March 29, 2012 26:1074.3. *Experimental Biology 2012*, San Diego, USA. 2012.04. 24.

4. Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Three-dimensional visualization of capillary and prevention of capillary regression by antioxidant supplementation in disused skeletal muscle. The 51th annual meeting of American society for cell biology, Denver, USA. 2011.12.03.

5. Fujita N, Fujino H. Protective effects of isometric contraction using electrical stimulation on muscle atrophy. 16th The World Confederation for Physical Therapy, Amsterdam, Netherlands, 2011. 06. 20.

6. Kanazashi M, Okumura Y, Fujita, Murakami S, Fujino H. Beneficial effect of nutritional support against regression of capillary network in atrophied slow muscle. 16th The World Confederation for Physical Therapy, Amsterdam, Netherlands, 2011. 06. 20.

7. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A, Roy RR: Capillary hemodynamics and expression of angiogenic regulators in metabolically different rat muscles. The 57th Annual meeting of American college of sports medicine, Baltimore, USA. 2010. 06. 01.

8. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A, Roy RR: Fiber capillary regression and endothelial cell apoptosis in the soleus muscle of hindlimb unloaded rats: role of angiogenic regulators. *Experimental biology 2010*, Anaheim, USA. 2010.04. 24.

[図書] (計 1 件)

運動生理学のニューエビデンス (宮村実晴編), 真興交易医書出版部 (東京), 藤野英己・他 54 名, p250-p258, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-fujino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 英己 (FUJINO HIDEMI)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号 : 20278998

(2) 研究分担者

石原 昭彦 (ISHIHARA AKIHIKO)
京都大学・大学院人間環境学研究科・教授
研究者番号 : 90184548
村上 慎一郎 (MURAKAMI SHINICHIRO)
姫路獨協大学・医療保健学部・准教授
研究者番号 : 30454763
近藤 浩代 (KONDO HIROYO)
名古屋女子大学・家政学部・講師
研究者番号 : 50333183