

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34521

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650340

研究課題名（和文） 加齢による血管退行とサルコペニアに対する運動療法の効果

研究課題名（英文） Effect of exercise to capillary degradation and sarcopenia by aging

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：サルコペニアに対して長期の運動の効果を検証した。運動を処方されたラットは、II 型線維の I 型への移行の抑制が認められた。筋毛細血管は、運動を処方されたラットでは、処方されなかったラットと比し緻密な構築であった。SDH 染色像濃度は、運動を処方されたラットが濃染されており、ミトコンドリアの代謝活性に関する PGC-1 α の増加が認められた。そして、血管増殖因子等は、運動を処方されたラットが有意に多く発現していた。これらの結果より、長期間の有酸素運動は、サルコペニアや、筋中の毛細血管退行を抑制する十分な効果が得られることが検証できた。

研究成果の概要（英文）：The aerobic exercise training has been utilized as one of therapy in the aging muscle. The effects of a long term therapeutic exercise on the myocyte and the microcirculation of skeletal muscle in elderly rats were investigated. Compared with elderly rat EDL muscles, treated elderly rats had higher percentage type I MyHC fibers. The succinate dehydrogenase activity in training elderly rat was significantly higher than that in elderly rat. The capillary volume in elderly rat muscle was significantly less. In the aerobic exercised elderly rat muscles, PGC-1 α , VEGF and FLK-1 were increased. In summary, the results of the present study provide evidence for the effectiveness of long term exercise training in reducing some of the muscle circulatory complications associated with capillary degradation and sarcopenia by aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：リハビリテーション科学

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：筋毛細血管、サルコペニア、血管増殖因子

1. 研究開始当初の背景

高齢者の要介護状態や医療費のかかる主たる原因が筋力の低下による転倒や骨折によるものと考えられ、高齢者の筋力向上が予防策となる。加齢性変化は運動によって防げると考えられるが、特に本研究が主眼に置く毛細血管ネットワークの検証は少ない。筋力や筋細胞は、60 歳から急激に減少する。(Lexell, J Neurol sci 1992) そして、高齢者に筋力

訓練を行った結果、筋横断面積、が共に増加した (Frontera, J Physiol 1988)。高齢者に筋力トレーニングを行った結果、大腿部筋横断面積、最大膝屈曲筋力および膝伸展筋力が共に増加した (Frontera, J Physiol 1988)。本邦に於いても、高齢者に対して運動の効果が示唆されている。(Takeshima, Eur J Appl Physiol 2004) 一方、高齢期の毛細血管についての論文は散見される程度である。廃用性

萎縮筋は筋線維に対しては、垂直方向に走行する血管数が減少すると報告している (Fujino, J Appl Physiol 2005). しかし、筋細胞と筋毛細血管のクロストークの検証はない。研究代表者は、高齢者の運動に対する身体活動、筋機能、血行動態などの効果 (Murakami, Int J Mol Med 2009), 筋毛細血管構築 (Murakami, Acta Med Okayama 2010) や廃用性に対する運動の効果 (Fujino, Acta Physiol 2009) について報告した。

一般に、運動療法は、筋中の PGC-1 α を増し、ミトコンドリア活性が上昇し、さらに、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体、FLK-1 が増加し、毛細血管ネットワークの密な構築に繋がると考えられている。

2. 研究の目的

我々は、加齢による毛細血管構築の退行変性に、毛細血管構築の退行性変化をきたす血管増殖系因子の低下が密接に関連し、血管と血管結合の副側循環路の形成不全にかかわり、若年期からの長期運動療法は、これを妨げるとする仮説を検証するためにこの研究を企画した。本研究では、1 点目とし、ミオシン重鎖 (MyHC) の型の同定に免疫染色および ATPase 染色と、ミトコンドリアによる酸化酵素活性の同定のためコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性を行い筋線維の組織化学的变化の検証とする。2 点目として筋線維の萎縮と血管増殖因子の低下を密接に関連づける新規の因子を想定し、その存在を証明する、または、血管増殖系との関連をウェスタンブロット法を用いて測定し検討する。3 点目は共焦点レーザー法により三次元毛細血管構築を観察し、毛細血管の可視化を行い、側副循環路の形成・退行を明らかにする。

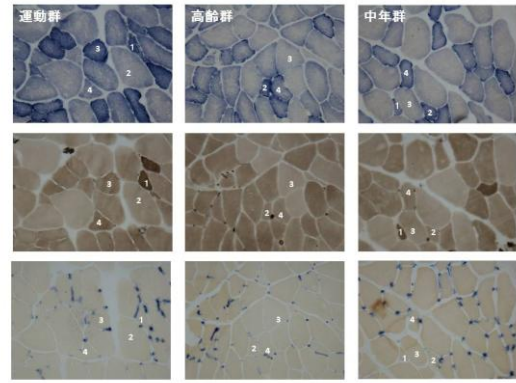
3. 研究の方法

本研究では、モデル動物を用いて検証を行った。本研究で使用したモデル動物は、SD ラット (Sprague-Dawley rat) を用いた。SD ラットは、一般毒性、神経科学、生殖、加齢研究、催奇形性研究、発癌性、栄養学、食餌誘発性肥満、その他の基礎研究など、昔から広く使用されているラットである。ここでは、若年期から高齢期の長期運動療法を処方されたモデル (運動群) に対しての報告する。Ex 群に対する運動の種類は、有酸素的持久的運動とし、高齢期に成熟しても可能な運動を考慮した。また、運動中にオールアウトはさせなかった。(速度 10m/min, 角度 0 $^{\circ}$, 最高 30 分間まで、6 回/wk) をトレッドミル上で行った。血中乳酸値は、運動前は、1.9mmol/L あり、運動を行った直後、Ex 群は 2.0mmol/L であった。運動前と直後で有意な差はなかった。運動期間は 10 週齢から 98 週齢までの 88 週間行った。比較として、加齢群 (9 8 週齢

自由飼育した群) と、中年群 (5 3 週齢の自由飼育群) を用いた。

(1) 筋組織観察

- ①各群より 1 2 μ m 厚の連続切片を作成し、コハク酸脱水素酵素染色 (SDH 染色), ATPase 染色 (pH4. 3) および、アルカリフォスファターゼ染色 (AP 染色) を行った。
- ②その画像よりミオシン重鎖の種類、筋線維の太さ、および、筋毛細血管密度を比較した。



1, type I fiber, 2, type IIa fiber, 3, type IIb fiber, 4, type II/dx fiber.
Scale bar: 100 μ m.

図 1 筋の連続切片像

(2) 毛細血管構築の観察

- ①腹大動脈より蛍光物質を 1 0 % 含む造影剤を下腿筋に還流させて検体を作成した。
- ②共焦点レーザー顕微鏡を使用して骨格筋内の毛細血管三次元構造を解析した。1 μ m 枚に筋標本をスキャンして 1 0 0 μ m をスタックして三次元構造を構築した。

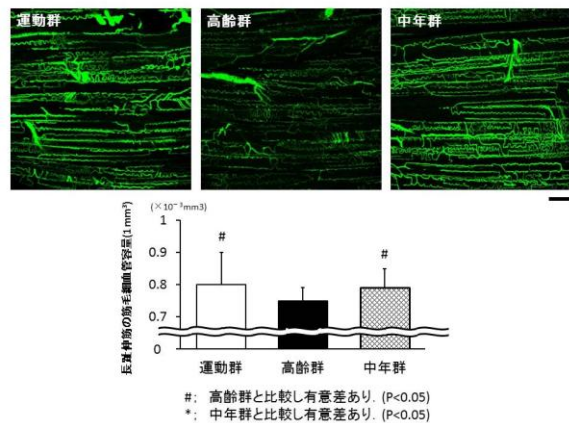


図 2 骨格筋の毛細血管構造

(3) 生化学的組織解析

- ①筋腹をより抽出しウェスタンブロット法により解析した。
- ②ミトコンドリアの活性に係のある

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC-1 α), 毛細血管の変化を惹起する因子として, 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) および, その受容体である血管内皮細胞増殖因子受容体 (FLK-1) の発現量を観察した.

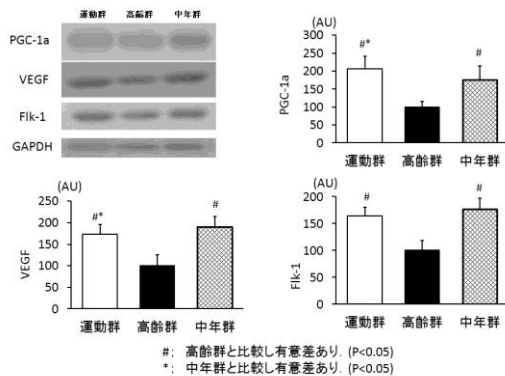


図3 各種因子の発現量

4. 研究成果

高齢群では, ミオシン重I型線維が消失していた (図1 高齢群). 運動群では, 筋横断面積の縮小の抑制が認められた (図4).

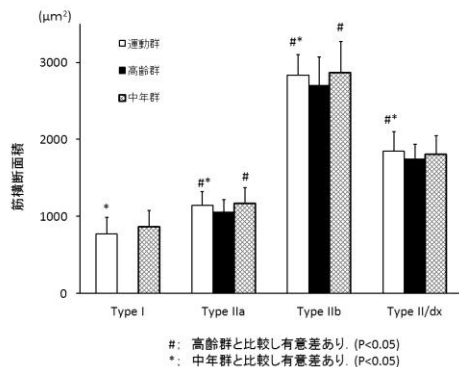


図4 筋線維タイプ別の筋横断面積

SDH 活性 (図2 上段) は, 運動群, 中年群, 高齢群の順に高くなっており, 加齢によるミトコンドリアの活性低下と運動による活性の上昇が認められた. 筋毛細血管は, 加齢による退行が認められた. そして, 長期間の運動により, 毛細血管直径と毛細血管流域容量減少の抑制が確認された (図2).

一般に運動で増加するといわれている血管新生に関与する因子である PGC-1 α , 毛細 VEGF, および, FLK-1 は, 運動群は高齢群より有意に発現していた. 特に, ミトコンドリア新生および活性に関与する PGC-1 α は, 中年群より多く発現した. しかし, FLK-1 は中年群と同程度, VEGF は中年群より発現量が少なかった. これらの結果により, 長期間の運動は加齢によるサルコペニアと筋毛細血管退行予防に効果があることが検証できた.

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9件)

(1) Shinichiro Murakami, Naoto Fujita, Hiroyo Kondo, Isao Takeda, Ryusuke Momota, Aiji Ohtsuka, and Hidemi Fujino, Abnormalities in the Fiber Composition and Capillary Architecture in the Soleus Muscle of Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats, The Scientific World JOURNAL, 査読有, 2013, 680189.

DOI: 10.1100/2012/680189.

(2) Kanazashi M, Okumura Y, Saad AL-NASSAN, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Acta Physiol (Oxf), 査読有, Feb;207(2), 2013, 405-415 DOI: 10.1111/apha.12018.

(3) Saad AL-NASSAN, Fujita N, Kondo H, Murakami S, Fujino H. Chronic exercise training down-regulates TNF- α and atrogen-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading, Acta Histochem Cytochem, 査読有, 45(6), 343-349,

DOI: 10.1267/ahc.12023.

(4) Morifuji T, Murakami S, Fujita N, Kondo H, Fujino H. Exercise Training Prevents Decrease in Luminal Capillary Diameter of Skeletal Muscles in Rats with Type 2 Diabetes. The Scientific World JOURNAL, 査読有, 2013, 645891

DOI: 10.1100/2012/645891.

(5) Fujita N, Nagatomo F, Murakami S, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Effects of hyperbaric oxygen on metabolic capacity of the skeletal muscle in type 2 diabetic rats with obesity. The Scientific World JOURNAL, 査読有, 2012, 637978.

DOI: 10.1100/2012/637978.

(6) 森藤武, 村上慎一郎, 椎名祥子, 藤田直人, 近藤浩代, 藤野英己, 自然発症2型糖尿病ラットの血糖及び骨格筋内微小血管障害に対する継続的な持久運動の予防効果, 日本基礎理学療法学会誌, 査読有, Vol. 15, No. 2, 2012, 22-27.

(7) 藤田直人, 村上慎一郎, 藤野英己. 廃用性筋萎縮の予防に対する治療的電気刺激を用いた等尺性収縮の効果, 日本物理療法学会

会誌, 査読有, Vol.19 2012, 53-58

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

(9) Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. Differences in Capillary Architecture, Hemodynamics, and Angiogenic Factors in Rat Slow and Fast Plantarflexor Muscle. *Muscle Nerve*, 査読有, 45(2), 242-249. DOI: 10.1002/mus.22267.

[学会発表] (計 28 件)

(1) Shinichiro Murakami, Naoto Fujita, Takeshi Morifuji, Miho Kanasaki, Masahiro Sakita, Hiroyo Kondo, Ryusuke Momota, Aiji Ohtsuka, and Hidemi Fujino. Different effects of aerobic and anaerobic exercise on the capillary in the extensor digitorum longus: PGC-1 α , VEGF, Flk-1 and Capillary Architecture. *Experimental biology 2013*, Boston, 2013 4.

(2) Hidemi Fujino, Hiroyo Kondo, Shinichiro Murakami, Masayuki Tanaka, Fumiko Nagatomo, Naoto Fujita, and Akihiko Ishihara. Treadmill running improves diabetes-induced capillary regression in skeletal muscle through activation of VEGF and angiopoietin pathways without inhibition of thrombospondin-1. *Experimental biology 2013*, Boston, 2013 4.

(3) Miho Kanazashi, Minoru Tanaka, Masayuki Tanaka, Hiroyo Kondo, Shinichiro Murakami, Naoto Fujita, and Hidemi Fujino. Protective effects of loading combined with astaxanthin on capillary regression of disused muscle. *Experimental biology 2013*, Boston, 2013 4.

(4) Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Minoru Tanaka, Hiroyo Kondo, Shinichiro Murakami, Naoto Fujita, and Hidemi Fujino. Beneficial effect of exercise combined with licorice flavonoid oil supplementation on visceral adipose tissue. *Experimental biology 2013*, Boston, 2013 4.

(5) Minoru Tanaka, Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Hiroyo Kondo, Shinichiro Murakami, Naoto Fujita, and Hidemi Fujino. Comparison of rectangular and sine waveforms on electrical stimulation to atrophy of rat soleus muscle. *Experimental*

biology 2013, Boston, 2013 4.

(6) 森藤武, 村上慎一郎, 椎名祥子, 藤田直人, 金指美帆, 近藤浩代, 藤野英己. 低強度運動が2型糖尿病に伴う骨格筋内微小血管障害のメカニズムに及ぼす影響. 第67回日本体力医学会, 岐阜, 2012.9

(7) 田中雅侑, 村上慎一郎, 藤田直人, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦, 藤野英己. 異なる運動強度が遅筋・速筋の毛細血管新生及び代謝活性に与える影響. 第20回日本運動生理学会大会, 筑波, 2012.7.

(8) 平山佑介, 田中稔, 藤田直人, 村上慎一郎, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦, 藤野英己. 中周波および低周波電気刺激が後肢非荷重ラットの深層骨格筋における毛細血管退行に及ぼす影響. 第20回日本運動生理学会大会, 筑波, 2012.7.

(9) 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, 2012.6.

(10) Murakami S, Fujita N, Morifuji T, Kondo H, Fujino H. Effect of Aerobic Training on Three-dimensional Capillary Architecture in Soleus Muscle. 59th American college of sports medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 43(5): S274, San Francisco, 2012.6.

(11) Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Reduction in Muscle Capillary is Inversely Associated with VEGF Expression in Non-obese Type 2 Diabetic Rats. 59th American college of sports medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 43(5): S657, San Francisco, 2012.6.

(12) 森藤武, 村上慎一郎, 椎名祥子, 藤田直人, 近藤浩代, 藤野英己. 有酸素運動が2型糖尿病に起因する骨格筋内毛細血管数の減少を予防するメカニズムの検討. 第2回日本基礎理学療法学会学術集会(神戸), 2012.5.

(13) 森藤武, 村上慎一郎, 椎名祥子, 藤田直人, 近藤浩代, 藤野英己. 2型糖尿病に対する継続的な持久運動が骨格筋内微小血管障害と VEGF 発現に及ぼす影響. 第47回日本理学療法学会学術大会(神戸), 2012.5.

(14) Al-Nassan Saad, 藤田直人, 近藤浩代, 村上慎一郎, 藤野英己. 長期間の持久運動はマウス腓腹筋の廃用性筋萎縮に伴う TNF- α と atrogen-1/MAFbx の発現を抑制する. 第47回日本理学療法学会学術大会(神戸), 2012.5.

(15) Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Morifuji T, Fujita N, Tanaka M, Ishihara A. Effects of exercise training on adipokines and glucose tolerance in non-obese spontaneously type 2 diabetic torii rats. FASEB J March 29, 2012 26:869.2. Experimental Biology 2012, San Diego. 2012.04.

(16) Murakami S, Fujita N, Kondo H, Tanaka M, Sakita M, Fujino H. Effect of aerobic exercise on capillary and vascular endothelial growth factor in rat soleus muscle. FASEB J March 29, 2012 26:683.7. Experimental Biology 2012, San Diego. 2012.04.

(17) Fujino H, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Angiopoietins regulate capillary network in non-obese type 2 diabetic muscle, but VEGF is not necessary for the angiogenic response to exercise. FASEB J March 29, 2012 26:1086.21. Experimental Biology 2012, San Diego. 2012.04.

(18) Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Exercise training prevents the microangiopathy of skeletal muscle in non-obese goto-kakizaki rats. The 7th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. Taipei, 2011. 09.

(19) Kondo H, Fujino H, Murakami S, Fujita N, Morifuji T, Shiina S, Nagatomo F, Ishihara A. Low-intensity exercise prevents hyperglycemia and hyperlipidemia in spontaneously type 2 diabetic torii rat. The 7th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. Taipei, 2011. 09.

(20) 金指美帆, 村上慎一郎, 藤田直人, 藤野英己, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦. 廃用性筋萎縮に対する荷重及びアスタキサンチン投与の予防効果. 第19回日本運動生理学大会. 徳島. 2011. 8.

(21) 近藤浩代, 藤野英己, 村上慎一郎, 藤田直人, 永友文子, 石原昭彦. 2型糖尿病モデルSDTラットの高血糖症に対する低強度運動の予防効果. 徳島. 2011. 8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

藤田 直人 (FUJITA NAOTO)

神戸大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：90584178

(3) 連携研究者

大塚 愛二 (OHTSUKA AIJI)

岡山大学・大学院医歯薬総合研究科・教授

研究者番号：50168986

百田 龍輔 (MOMOTA TYUSUKE)

岡山大学・大学院医歯薬総合研究科・助教

研究者番号：80263557