

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650434

研究課題名(和文) サテライトセルの活性化に対するエキセントリック運動の効果

研究課題名(英文) Effect of Eccentric Contraction on Satellite Cell Activation in Human Vastus Lateralis Muscle

研究代表者

宮田 浩文 (Miyata, Hirofumi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90190793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの骨格筋において、エキセントリック運動後のサテライトセルの動態を、組織学的・分子生物学的に明らかにすることを目的として実験を企画・実施した。今年度は、11名の被験者において上記運動を実施し、運動前、2日後、5日後に両外側広筋からニードルバイオプシーサンプルを採取した。前年度に確立した組織学的分析とリアルタイムRT-PCRによるmRNA発現量の定量を行った。その結果、左外側広筋において2および5日後にサテライトセル活性化因子であるIL-6、IGF-1、HGFおよびMyostatinなどのmRNA発現量増加が認められた。しかし、組織学的にサテライトセルの増殖は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the time-course of SC activation in vastus lateralis (VL) muscle after step exercise. Eleven non-trained young adults participated in a 30-minute step up/down exercise protocol involving mainly concentric contractions with right leg and mainly eccentric contractions with left leg. Biopsy samples were taken from the both side of VL muscles before exercise, and 2 and 5 days after exercise. The numbers of SCs for each fiber type were determined by using immunofluorescence staining. The expressions of several mRNA were analyzed using real-time RT-PCR system. The numbers of SCs in both side VL muscles did not changed in all fiber types after exercise. The expressions of HGF mRNA increased significantly at 2-5 days and the expression of myostatin mRNA also increased at 5 days after exercise in left VL, but not in right VL muscles. The expressions of IL-6, MyoD, and IGF-1 mRNA slightly increased in left VL, but not in right VL muscles after exercise.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：応用健康科学

キーワード：エキセントリック収縮 サテライトセル 活性化サイトカイン 外側広筋

1. 研究開始当初の背景

老齢期に発生・進行するサルコペニア（加齢性筋肉減少症）は、運動機能低下・寝たきり・認知症の悪循環を招き、要介護者の増加につながっていく。特に、脚筋の萎縮は、転倒によるけがの危険性を増加させ、身体活動量の低下のきっかけとなる可能性がある。したがって、脚筋とくに抗重力筋における筋線維の萎縮予防は、超高齢社会に突入しつつある日本にとって社会的要請の強い重要な課題である。

サルコペニアはいくつかの要因によって引き起こされるが、筋細胞に核を供給している筋原性前駆細胞である筋サテライトセルの減少および不活性化も主要因の一つであると考えられている。しかし、筋サテライトセルを活性化させるために必要なトレーニング期間やトレーニング方法に関しては、未だ不明な点が多い。筋サテライトセルを効率的に活性化させるメカニズムおよび具体的な方法を検討する意義は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

筋サテライトセルを活性化する方法の一つとしてエキセントリック収縮が注目されており、手軽にエキセントリック収縮を誘発する踏み台昇降運動は臨床的にも応用範囲が広いと考えられる。そこで、まず踏み台昇降運動における左右の外側広筋に発生するエキセントリックおよびコンセントリック収縮量を定量比較した。次に、踏み台昇降運動を用いてヒト抗重力筋のサテライトセルを効果的に活性化することが可能かについて検討した。

3. 研究の方法

11人の若齢被験者が右脚先行で30分間の踏み台昇降運動を行った。運動中に左右の外側広筋の表面筋電図を記録する同時に、膝関節角度の変化を画像解析により記録し、左右の外側広筋における筋電図積分値をコンセントリック局面とエキセントリック局面に分けて算出した（図1）。

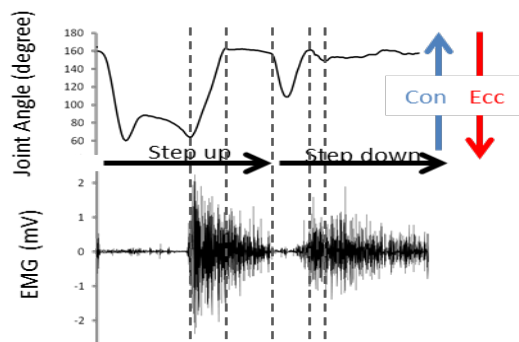


図1 右脚先行の踏み台昇降時の右膝関節角度変化および右外側広筋筋電図記録の一例

運動前、運動2日後、5日後に左右の外側広筋からニードルバイオプシー法により微量筋サンプルを採取した。

採取した凍結筋サンプルから、連続凍結横断切片を作成した。これらの切片に対して、ヘマトキシリン&エオジン染色により筋損傷の程度を評価した。さらに他の連続切片に対して、ミオシン重鎖（MHC）分子種に特異的な抗体を用いて免疫組織化学染色を施し、筋線維組成を決定した。サテライトセルの同定には核、Pax7、基底膜に特異的な抗体を用いた免疫蛍光染色を使用し、各線維タイプごとの Pax7 陽性核数（サテライトセル数）を調べた。

さらに、real-time RT-PCR system により、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を内在性コントロールとし、下記のターゲット遺伝子の相対的発現量を運動前の値と比較し評価した。

- (1) Paired box transcriptional factor 7 (Pax7)
- (2) Myostatin
- (3) Interleukin (IL)-6
- (4) Myogenic differentiation 1 (MyoD)
- (5) Insulin-like growth factor (IGF)-1
- (6) Hepatocyte growth factor (HGF)

表1 real-time RT-PCR で用いた各ターゲット mRNA に対するプライマー

Gene target	Forward sequence Reverse sequence
MyoD	5'-CGGCTCTCTCTGCTCCTTTG-3' 5'-TCGAAACACGGGTCGTCAT-3'
HGF	5'-TCCACGGAAGAGGAGATGAGA-3' 5'-GGCCATATAACCAGCTGGGAAA-3'
Myostatin	5'-GCTCCATCCTCAAGAAGGTGTT-3' 5'-CCAGCAGGCCTCGTTGAT-3'
GAPDH	5'-CAAGGCTGTGGGCAAGGT-3' 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3'

4. 研究成果

筋電図分析の結果、総筋電図積分値は右外側広筋の方が左同筋に比べ約 30% 高値を示した。エキセントリック局面の積分値は右外側広筋において 33.1% であったのに対し、左外側広筋では 73.3% であった（図2）。

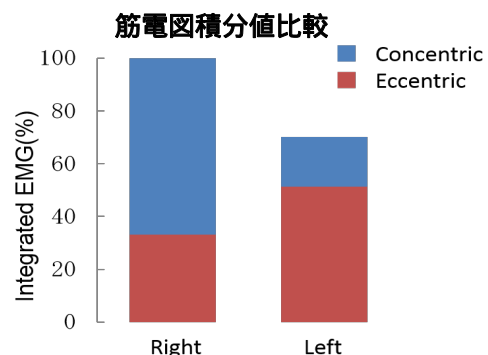


図2 左右外側広筋における筋電図積分値のエキセントリック局面とコンセントリック局面の割合比較

筋痛の主観的評価 (10cm VAS) では、運動直後 (Post) から左右差が見られた。特に運動 2 日後において左脚が右脚に比べ有意に高い筋痛を示した (図 3)。

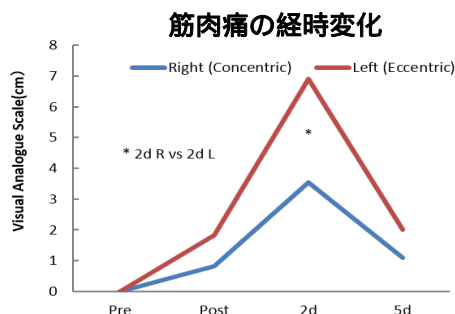
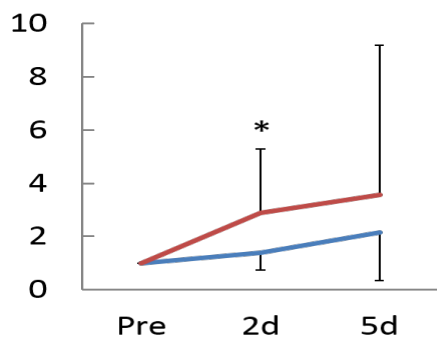


図 3 運動前、および運動後 (直後、2 日後、5 日後) における外側広筋の筋痛評価結果 (青線は右脚、赤線は左脚、* は左右間の有意差を示す)

免疫組織化学的分析の結果、いずれの筋線維タイプにおいても両筋のサテライトセル数に有意な違いは認められなかった。一方、リアルタイム RT-PCR 分析の結果、各種 mRNA には左外側広筋において発現量の増加が確認された。特に、運動後 2-5 日にわたって、HGF および Myostatin mRNA の発現量が有意に増加した (図 4)。また、MyoD および IGF-1 mRNA も左外側広筋のみに増加傾向が認められた。

HGF mRNA (Fold change)



Myostatin mRNA

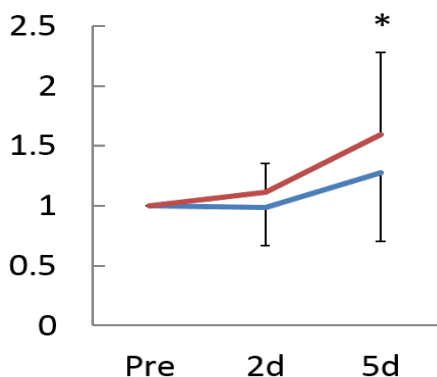


図 4 左右外側広筋における HGF (上) および Myostatin (下) mRNA 発現量の経時変化 (青線は右外側広筋、赤線は左外側広筋、* は各筋の Pre との有意差を示す)

以上の結果から、以下の 4 点が考察された。
(1) 動作解析および筋電図積分値分析により、踏み台昇降おける先行脚 (本研究では右) の外側広筋では主にコンセントリック収縮が生じ、支持脚 (同左) の同筋には主にエキセントリック収縮が生じることが明らかになった。

(2) VAS を用いた筋痛の主観的評価により、主にエキセントリック収縮が主に生じた左脚では、主にコンセントリック収縮が生じた右脚に比べ、運動後 2 日後に有意に高い筋痛が発生することが明らかになった。

(3) サテライトセルの有力な活性化因子である HGF および IGF-1 mRNA 等の発現量変動から、運動 2-5 日後にサテライトセルの活性化が促進されたことが示唆された。

(4) Myostatin mRNA の発現量が 5 日後にすでに増加していることから、サテライトセルの増殖は 5 日後にはすでにダウンレギュレートされている可能性も示唆された。

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 2 件)

今岡洋子, 河合美菜子, 向井和隆, 大村一, 高橋敏之, 平賀敦, 宮田浩文, 競走馬のトレーニングおよび脱トレーニングが骨格筋サテライトセルの反応性に及ぼす影響, 体力科学 63 (1): 177-187 (2014) 査読有

丸山昭男, 久津見学, 宮田浩文, 筋力トレーニングとしてのロングストライド歩行の可能性, 臨床スポーツ医学 28(4): 469-475 (2011) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

Miyata H, Imaoka Y, Kawai M, Mori F. Effect of Eccentric Contraction on Satellite Cell Activation in Human Vastus Lateralis Muscle, 第 61 回アメリカスポーツ医学会、オーランド (USA)、2014 年 5 月 30 日

今岡洋子, 福田智亮, 河合美菜子, 森大志, 宮田浩文 踏み台昇降エキセントリック収縮による骨格筋サテライトセルの活性化 第 72 回日本体力医学会中国四国地方会、ふれあいの里 (米子市)、2013 年 11 月 10 日

宮田浩文 ヒトの骨格筋線維特性は他の哺乳類と異なるか, 第 21 回日本運動生理学会、東京国際大学 (川越市)、2013 年 7 月 28 日

宮田浩文, 河合美菜子, 森大志, ヒト外側広筋微量サンプルの mRNA 発現相対量を用いた筋線維組成の推定, 第 70 回日本体力医学会中国四国地方会、吉備国際大 (高梁市)、2012 年 11 月 25 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮田 浩文 (MIYATA Hirofumi)
山口大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90190793