

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23700784

研究課題名(和文)肉離れ損傷修復時の分子機構の解明

研究課題名(英文)The molecular response of skeletal muscle injury after repeated bouts of eccentric contractions

研究代表者

越智 英輔(OCHI, EISUKE)

岡山大学・教育学研究科(研究院)・講師

研究者番号：90468778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一過性の高速度の伸張性収縮が筋タンパク質分解系のシグナルを活性化することが報告されている。本研究では、高速度のエキセントリック収縮を繰り返すことで筋萎縮及び筋機能低下を引き起こすモデルを作成し、その生理・病理組織学的特性を他の条件と比較検討すること、およびタンパク質・遺伝子発現を明らかにすることを目的とした。その結果、高速群で筋力・筋量・筋線維横断面積の有意な減少を観察した一方、筋細胞に中心核や浮腫・炎症・損傷は確認されなかった。さらに、タンパク質分解シグナルの活性化、瘢痕化タンパク質、アポトーシスの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：One bout of exercise consisting of fast velocity eccentric contractions has been shown to increase muscle protein degradation in rats. The present study tested the hypothesis that repeated bouts of fast velocity eccentric contractions would activate molecules inducing muscle atrophy. Gastrocnemius wet mass were smaller, cross-sectional area of medial gastrocnemius was smaller, and isometric tetanic torque of triceps surae muscles was 36% smaller for 180EC than control at 1 day after the fourth session, but no such differences were evident between 30EC and control. However, no muscle fibers infiltrated by inflammatory cells or with centrally-located nuclei were observed for any rats. The expressions of atrophy-related molecules such as FoxO1, FoxO3 and myostatin were unregulated only for 180EC, but an increase in phosphorylated p70s6k was found only for 30EC at 1 day after the fourth session. The level of Bax, a pro-apoptotic protein, was greater for 180EC than control.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：筋損傷 肉ばなれ 伸張性収縮 萎縮 タンパク質 アポトーシス 瘢痕化 線維化

1. 研究開始当初の背景

スポーツ現場で発生する筋萎縮・線維化を伴う重度肉離れ損傷では、競技復帰が困難になるうえに再受傷のリスクも高い点が問題となっている。特に臨床的な報告から重症度の高い肉離れでは、触診的に結合組織癒痕化が観察されることが明らかになっているが、筋タンパク質分解・筋萎縮・結合組織の癒痕化に関連した因子がどのように活性化されるかという検討は極めて少ない。

実験動物を用いた肉離れ損傷モデルでは摘出筋による *in vitro* の系が多く、*in vivo* の筋を対象とした系はこれまで検討が乏しく、かつ肉離れ損傷発生頻度の高い腓腹筋をターゲットとした研究は皆無であった。そこで我々のグループではラット腓腹筋を対象とした *in vivo* 筋損傷モデルを使用し、その病態、力学的変化、栄養摂取効果、タンパク質応答等を報告してきた (Song et al., Am J Sports Med. 2004, Ochi et al., J Sport Sci and Med. 2008, Nakazato Ochi et al., Mol Nutr Food Res. 2010, Ochi et al., J Appl Physiol. 2010)。しかしこのモデルでは、肉離れモデルで最も重要な評価系とされている筋張力低下の期間が4日間と比較的短く、かつ有意な筋萎縮は認められなかった。そのため、長期間の治癒を余儀なくされるスポーツ選手における肉離れとの直接的な比較ができていなかった。

2. 研究の目的

我々は、低速度・高速度のエキセントリック筋収縮が、それぞれラット骨格筋のタンパク合成・タンパク質分解に関わるシグナル伝達系を活性化させることを報告した (Ochi et al., J Appl Physiol. 2010)。加えて、高速度のエキセントリック収縮を繰り返すことで、筋萎縮及び筋機能低下を引き起こすことも見出した。そこで本研究では、上記繰り返しの筋損傷・萎縮モデルの 1) 生理・病理組織学的特性を他の条件と比較検討すること、および 2) 損傷修復時のタンパク質・遺伝子発現の応答変化から分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験には Wistar 系ラットを用いた。対象筋は下腿三頭筋 (腓腹筋を含む) とした。伸張性収縮は、30deg/sec (30EC・筋肥大条件)、180deg/sec (180EC・筋萎縮条件) の条件で5回4セットを負荷した。2日1回を1週間ほど実施し、その後分析用のサンプルを採取した。あわせてコントロール群を設定し上記2群と比較した。

4. 研究成果

繰り返しの筋損傷・萎縮モデルの生理・病理組織学的特性

繰り返しの筋損傷・萎縮(180EC)損傷に伴い、力学的指標となる等尺性最大トルクは、30EC群およびコントロール群との比較において、最初の伸張性収縮負荷2日後から有意に低下し、その後全てのセッションで低下していた (図1)。

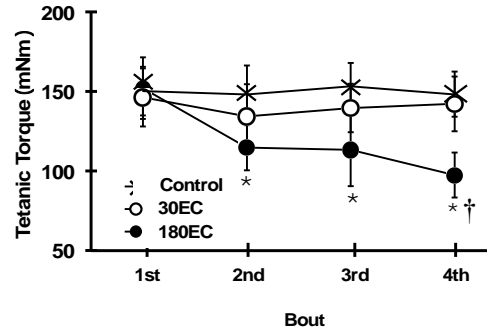


図1 等尺性最大トルクの変化

そして、伸張性収縮中の最大トルクは全てのセッションにおいて重度群が高い値を示した一方、各セッションのトルク低下率は群間で変化が認められなかった。全てのセッション後に計測した体重は群間で差が認められなかった。腓腹筋内側、外側については180ECで有意に減少 (4-6%; $p < 0.05$) した一方、ヒラメ筋、足底筋の筋量は有意差がなかった。筋線維横断面積は、180ECでtype IおよびIIともに有意に減少していた ($p < 0.001$)。

さらに、本モデルにおいて筋線維自体に損傷が発生しているかを検証するために、最初のセッション後にサンプルを採取し Evans blue dye (EBD) 法を用いて筋線維を観察した。その結果、全群において損傷筋線維が観察されず、筋細胞に中心核や浮腫・炎症も確認されなかった。以上の結果から、本モデルにおける継続的な筋力の低下や筋重量、筋線維横断面積の減少は、筋線維自体の損傷なく引き起こされる解釈できる。加えて、Periodic acid-Schiff (PAS) 法により、筋線維の動員の程度を検討した。その結果、コントロール群との比較で180ECおよび30ECの色調が全体的かつ2群間で同程度減少していた。このことから、筋線維の動員パターンは180ECと30ECで同程度かつすべての筋線維が動員されていると解釈できる。

繰り返しの筋損傷・萎縮モデルの損傷時のタンパク質・遺伝子発現

筋萎縮・肥大関わるタンパク質の産生量を Western blot 法を用いて検討した。その結果、180ECにおいて、タンパク質分解シグナル系である FoxO1, FoxO3, 筋萎縮や線維化に関わるミオスタチンの有意な増加を確認した (78-229%, 図2)。一方、30ECにおいて、タンパク質合成シグナル系である p-p70s6k の有意な増加を確認した。そしてアポトーシスに関わるタンパク質群では、Bax が180ECで有

意に増加したが、Bcl-2 は群間に差はなかった。さらに、線維化・癒痕化に関わるタンパク質群では、Tenomodulin 及び TGF- β が 180EC で有意に増加したが、Scleraxis 及び p75 については群間に差はなかった。

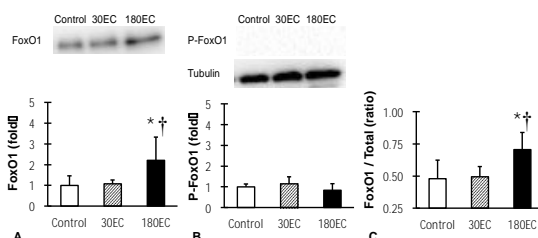


図 2 FoxO1 の変化

このことから、繰り返しの重度肉離れ伸張性収縮は筋力低下と骨格筋の萎縮を導くことが明らかになった。加えて、その応答にはタンパク質分解シグナルの活性化、癒痕化タンパク質、アポトーシスの関与が示唆された。

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 9 件)

Ochi E, Nakazato K, Ishii N.

Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle.

Journal of Strength and Conditioning Research. 査読有 25. 2011, 2283-2292

Song HS, Ochi E, Lee KH, Hiranuma K, Nakazato K.

Characteristics of myogenic response and ankle torque recovery after lengthening contraction-induced rat gastrocnemius injury. BMC Musculoskeletal Disorders. 査読有 13. 2012, 211-221

Kobayashi K, Ogasawara R, Tsutaki A, Lee KH, Ochi E, Nakazato K.

Genetic strain-dependent protein metabolism and muscle hypertrophy under chronic isometric training in rat gastrocnemius muscle.

Physiological Research. 査読有 61. 2012, 527-535

Tsuchiya Y, Ochi E, Sakuraba K, Kikuchi N, Hwang IK.

Isokinetic strength and anaerobic/intermittent capacity of Japanese lacrosse players

Isokinetics and Exercise Science. 査読有 21. 2013, 77-82

Nakazato K, Lee KH, Kouzaki K, Hiranuma

K, Min SK, Ochi E, Song HS.

Clinical and basic studies of muscle strain injury (invited review) International Journal of Applied Sports Science. 査読無 25. 2013, 1-10

白土男女幸, 土屋陽祐, 佐藤照友旭, 丸山伸也, 濱野早紀, 具志堅武, 木村直人, 越智英輔.

β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) とホエイプロテインの同時摂取が筋損傷の回復過程に及ぼす影響.

運動とスポーツの科学. 査読有 19. 2013, 99-106

Tsuchiya Y, Sakuraba K, Ochi E.

High force eccentric exercise enhances serum tartrate-resistant acid phosphatase-5b and osteocalcin.

Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions. 査読有 14. 2014, 50-57

Lee KH, Kouzaki L, Ochi E, Kobayashi K, Tsutaki A, Hiranuma K, Kami K, Nakazato K.

Eccentric contractions of gastrocnemius muscle induce nerve damage in rats.

Muscle and Nerve. 査読有 50. 2014, 87-94

Tsuchiya Y, Sakuraba K, Ochi E.

Effect of eccentric contractions of elbow flexor on bone formation and resorption markers.

The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness. 査読有 54. 2014, 651-657

[学会発表](計 10 件)

Ochi E, Hiranuma K, Tsutaki A, Nakazato K. Repeated bouts of lengthening contractions cause muscle atrophy and dysfunction in rat medial gastrocnemius muscle.

40th European Muscle Conference 2011 年 9 月 14-18 日 Berlin (Germany)

小林幸次, 越智英輔, 小笠原理紀, 蔦木新, 李基赫, 中里浩二.

レジスタンストレーニングによる筋肥大にはタンパク質分解抑制が重要である.

第 66 回日本体力医学会大会 2011 年 9 月 16-18 日 海峽メッセ下関 (山口県・下関市)

李基赫, 小林幸次, 越智英輔, 中里浩二.

筋損傷に伴う神経再生治癒過程の解析. 第 66 回日本体力医学会大会 2011 年 9 月 16-18 日 海峽メッセ下関 (山口県・下関市)

越智英輔, 蔦木新, 平沼憲治, 石井直方, 中里浩二.

角速度の速い伸張性収縮の繰り返しは骨格筋の萎縮を引き起こす.

第 66 回日本体力医学会大会 2011 年 9 月
16-18 日 海峡メッセ下関 (山口県・下関
市)

Ochi E, Nakazato K.

Differential expressions of tendon-related
markers after fast/slow velocity lengthening
contractions in rat gastrocnemius muscle.

American College of Sports Medicine 59th
Annual Meeting 2012 年 5 月 29 日-6 月 2
日 San Francisco (USA)

Lee K, Kobayashi K, Ogasawara R, Tsutaki
A, Ochi E, Nakazato K.

Eccentric contractions of Gastrocnemius
induce sciatic nerve injury in Wistar rats.

American College of Sports Medicine 59th
Annual Meeting 2012 年 5 月 29 日-6 月 2
日 San Francisco (USA)

Kobayashi K, Ogasawara R, Lee K, Tsutaki
A, Ochi E, Nakazato K.

Strain-dependent protein metabolism and
muscle hypertrophy under chronic isometric
training of rat gastrocnemius muscle.

American College of Sports Medicine 59th
Annual Meeting 2012 年 5 月 29 日-6 月 2
日 San Francisco (USA)

Lee KH, Ochi E, and Nakazato K.

The relationships between AMP-activated
protein kinase (AMPK) activation and
FoxOs and myostatin expression in rat
gastrocnemius after eccentric contractions.

American College of Sports Medicine 60th
Annual Meeting 2013 年 5 月 28 日-6 月 1
日 Indianapolis (USA)

Ochi E, Nosaka K, Nakazato K.

Repeated bouts of fast but not slow velocity
eccentric contractions induce atrophy of
gastrocnemius muscle.

19th Annual Congress of the European
College of Sport Science 2014 年 7 月 2-5 日
Amsterdam (Netherlands)

白土男女幸, 土屋陽祐, 越智英輔, 佐藤
照友旭, 丸山伸也, 濱野早紀, 具志堅武,
木村直人.

β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) とホ
エイプロテインの同時摂取が筋損傷の回
復過程に及ぼす効果.

第 69 回日本体力医学会大会 2014 年 9 月
19-21 日 長崎大学 (長崎県・長崎市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=7265fe0f7725930c74506e4da22f6611>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 英輔 (OCHI EISUKE)

岡山大学・大学院教育学研究科・講師

研究者番号：90468778

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中里 浩一 (NAKAZATO KOICHI)

日本体育大学・大学院体育科学研究科・教授

研究者番号：00307993

石井直方 (ISHII NAOKATA)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20151326