

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500787

研究課題名(和文) 成長ホルモン及びインスリン様成長因子の受容体発現は運動適応に關与するか

研究課題名(英文) Receptor expressions of GH and IGF-1 in exercise-induced skeletal muscle adaptations

研究代表者

花井 淑晃 (Hanai, Yoshiteru)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50360730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋におけるGH受容体とIGF-1受容体の発現レベルがどのように調節されているか調べるために、収縮特性や運動時の動員様式などが異なる種々の骨格筋において、これら受容体の発現レベルを調べた。結果として、これら受容体の発現レベルはそれぞれ筋により異なり、また、発現のパターンも両者で異なることが明らかとなった。筋肥大のモデルでは、筋肥大初期においてGH受容体のみが発現レベルの変化(減少)が認められ、個別の調節機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the expression levels of GH receptor and IGF-1 receptor in rat skeletal muscles, to clarify the regulation mechanisms of these receptor expressions. The expression levels of these receptors differ between muscles, and expression pattern of these two receptors among muscles also not consistent. In the muscle hypertrophy models, at the onset of hypertrophic response (<4days), only GH receptor mRNA was down regulated. An independent regulatory mechanism of these two receptors was suggested.

研究分野：筋生理・生化学

キーワード：GH IGF-1 GH受容体 IGF-1受容体 筋肥大

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の運動適応における成長ホルモン (Growth Hormone:GH)-インスリン様成長因子-1 (Insulin-like Growth Factor -1: IGF-1)軸の貢献については、旧来より、主としてその顕著な蛋白同化作用を介する筋肥大との関係について着目した研究がなされてきた (Gibney et al, 2007)。

一方で、GH は脂肪分解の亢進、IGF-1 は糖利用の促進と蛋白同化と、両ホルモンは代謝調節にも貢献することは明らかであり、事実、運動時に急激に分泌が高まる GH の代謝調節への貢献も多くの研究で示唆されている (i.e. Goto et al, 2009)。しかしながら、これらホルモンに対する筋の反応性に直接的に貢献すると考えられる GH 受容体、および IGF-1 受容体の骨格筋での発現調節や、運動時の代謝反応、ホルモン応答と運動適応に対する貢献については、これまでほとんど検討がなされておらず、特に、筋の代謝応答、代謝適応との関連で検討された研究は見られない (図 1)。

我々は以前、異なる骨格筋間で筋によって GH 受容体の遺伝子発現レベルが事なり、さらに GH 投与時の IGF-1 mRNA 応答も GH 受容体の発現レベルに対応することを報告した (花井ら、日本体力医学会、2001、図 2)。しかしながら、実際に機能するタンパクレベルでの検討は行なっておらず、IGF-1 の受容体に関しては情報が無く、未解決の問題として残されている (図 1)。

GH 受容体と IGF-1 受容体は両者共に膜タンパクであり、異なるいくつかのシグナル経路を利用するが、いくらかのシグナル伝達でのクロストークも示唆されている (Costoya et al, 1999)。両受容体ともに最終的には脂質代謝、タンパク同化、糖利用亢進などを通じて代謝亢進につながることから、運動時の収縮活動によって急激に代謝需要が高まる骨格筋において、これら、両ホルモン受容体の発現レベルが変化し、筋の反応性を変化させることで即座の変化に応答できるように協調した適応が生じている可能性が考えられる。その解明の第一歩として、筋の収縮活動、および運動適応に関連した GH 受容体、および IGF-1 受容体発現の変化を同定することは、筋の運動適応機序の包括的理解に有用な情報を提供するものと考えられる。

図 1

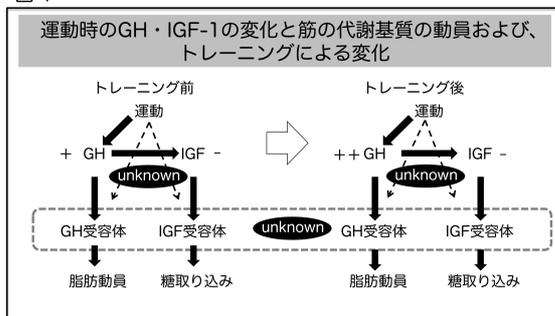
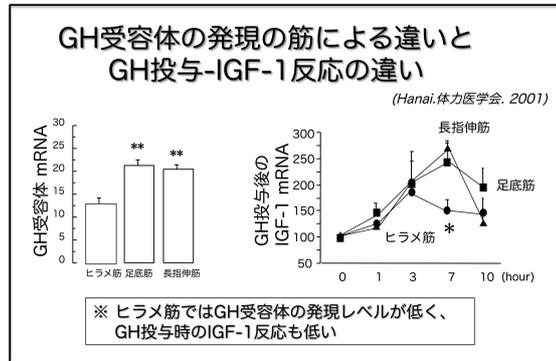


図 2



2. 研究の目的

本研究では、収縮特性や運動時の動員様式、あるいは代謝特性の異なる筋において、GH 受容体、および IGF-1 受容体の発現が異なるか否かを検討し、さらに、種々の運動モデルを用いて、筋の収縮活動の増減や代謝適応の有無によって、これら受容体発現が調節されているか否かを明らかにしようとするものである。

本研究の課題の解明は、GH-IGF-1 系の運動適応に対する貢献についての、筋局所での適応メカニズムについての新知見を提供するとともに、より効果的なトレーニング処方 of 基礎的知見を提供するものとなると期待される。

3. 研究の方法

本研究の計画・実施手順については、名古屋工業大学学内の動物実験安全部会の承認を受けて実施した。

1) 実験動物

実験には成熟した 12 週齢の SD 系雄性ラットを使用した。ラットは常温 (23) で 5 : 00-17:00 を明期とする 12 時間の明暗サイクルで飼育し、水、および餌は自由摂取とした。走行負荷試験は暗期に実施した。

2) 急性走行負荷モデル

急性走行負荷には、小動物用トレッドミルによるランニングモデルを用いた。2 週間、ラットにトレッドミルでの走行学習を行い、徐々に走行スピードおよび走行時間を増加して、運動負荷試験の強度 (20m/min, 60min) の走行が可能となるようにした。ラットは走行負荷の終了後、定められたタイムコース (運動終了後 0h, 3h, 6h, 12, 24h) にしたがって、エーテル麻酔下にて下肢より被検筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、長内転筋、長指伸筋) を摘出した。被検筋は遅筋であるヒラメ筋、長内転筋、および、速筋である足底筋、長指伸筋、腓腹筋とした。腓腹筋については同一筋内で深層と表層で著しく筋線維組成が異なることから、深層部、表層部に分けて分析を行い、同一筋内における筋線維組成の違いによる影響について検討を行った。

3) 筋肥大モデル

筋肥大モデルには、片足の腓腹筋の腱切除による、足底筋およびヒラメ筋の代償性肥大モデルを用いた。ペントバルビタールによる麻酔下で皮膚を切開して腓腹筋の腱を露出させ、腓腹筋外側頭、および内側頭の両方の腱の切除を行った。反対側の脚は対照脚として、皮膚の切開と腱の露出のみの儀手術を処置した。手術後、皮膚を縫合して抗生剤の投与を行い、個別に飼育ケージに入れて安静を保った。手術を行ったラットは、2日後、もしくは4日後にエーテル麻酔下にて被検筋の摘出を行った。

4) 分析方法

摘出した筋は、重量を測定後、RNA、および、タンパク分析用に切り分けて液体窒素中で凍結し、RNA、もしくは、タンパクの抽出までディープフリーザー (-80) にて凍結保存した。

mRNA 発現の分析には定量 RT-PCR 法を用いた。凍結保存してあった筋を RNA 調整試薬 (Isogen、ニッポンジーン) 中でポリトロン製ホモジナイザーでホモジナイズし、遠心した上清より細胞内総 RNA を得た。RNA は濃度を測定して、分析まで -80 で保存した。qRT-PCR は、逆転写キット (prime script、タカラ) による cDNA 合成後に、それぞれ標的とする mRNA 配列に対応したプライマーを用いてインカレーター法 (SYBR Green、タカラ) により定量を行った。

タンパクの分析は Western blot 法を用いた。SDS-PAGE にて分離後、メンブレンにプロットしたタンパクに対して標的タンパク特異的な抗体を用いて検出した。シグナルの定量は ECL キットによる発光を X 線フィルムで検出し、スキャナーで取り込んだ後に画像解析にて標的タンパクのバンドの光学的密度を定量化した。

5) データ分析

得られたデータについては、平均 ± 標準誤差で示し、2 群の比較には対応のない t 検定を、3 群以上の比較には分散分析および student Newman keuls test により各群間の差の有意性について検討を行った。

4. 研究成果

1) 安静ラットにおける、異なる筋間の GH 受容体、IGF-1 受容体の発現の比較

安静時のラットにおいて、下肢骨格筋であるヒラメ筋 (84% slow fiber)、足底筋 (94% fast fiber)、長指伸筋 (96% fast fiber)、長内転筋 (87% slow fiber) および腓腹筋の深層部 (50% slow fiber) と表層部 (100% Fast fiber) を対象として GH 受容体、および IGF-1 受容体の発現レベルを mRNA レベルで検討した。

GH 受容体 mRNA の発現は、我々の先行研究

における結果 (図 2) とほぼ同様な結果が得られ、速筋 (足底筋および長指伸筋) とくらべて遅筋 (ヒラメ筋、および長内転筋) で発現レベルが低い傾向であった。また、腓腹筋内の速筋部 (表層) と遅筋部 (深層) の比較では、深層部で有意に高かった。収縮特性の異なる骨格筋間での比較と、同一筋内での部位による筋線維組成の違いを元にした比較で傾向が異なり、筋間の比較では遅筋で GH 受容体 mRNA 発現が低く、筋内では遅筋部で高かったことから、筋の収縮特性による GH 受容体遺伝子発現への影響は一貫しておらず、筋の収縮特性、あるいは筋線維組成は GH 受容体遺伝子発現の独立した調節因子ではない可能性が示唆された。GH 受容体タンパクの発現レベルについては、Western blot での検出が困難であり、分析から除外した。

IGF-1 受容体 mRNA の発現レベルの分析では GH 受容体とは逆に遅筋で高い傾向が見られたものの、各筋間の発現量の差は有意な差ではなかった。しかしながら、Western blot 分析による IGF-1 受容体タンパクレベルでは、ヒラメ筋で足底筋に対して有意に高い発現が見られ、また、腓腹筋内の比較においても IGF-1 mRNA においては、表層と比較して深層で有意に高い発現が見られた。これらの結果は、IGF-1 受容体の発現が、遅筋型の収縮特性と関連している可能性を示唆するものである。

また、IGF-1 受容体の発現では、mRNA レベルとタンパクレベルで発現パターンが異なる傾向であった。mRNA からタンパクの翻訳過程において、mRNA と相補的配列を持つ小分子 RNA であるマイクロ RNA が、RNA 干渉により翻訳を阻害し、タンパク発現量を調節する機能を持つこと知られている。IGF-1 受容体 mRNA に関しては、miR-1 および miR-133a の 2 つのマイクロ RNA が内因性に発現し、IGF-1 受容体の翻訳を抑制していることが報告されている (Elia et al., 2009, Huang et al., 2011)。ゆえに、本研究では、miR-1 および miR-133a の各筋での発現量についても調べた。miR-1 についてはいずれの筋間でも有意な発現量の差は認められなかったが、miR-133a については、IGF-1 受容体タンパクの発現量が低かった足底筋、および長指伸筋にて有意に高い発現傾向が認められた。これらの筋における高い miR-133a 発現が、IGF-1 mRNA の翻訳を抑制介して、これらの筋における低い IGF-1 受容体タンパク量に貢献している可能性が示唆された。筋でのマイクロ RNA の発現調節については不明な点も多く、実際のメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

安静時のラットにおいて、GH 受容体 mRNA と IGF-1 受容体 mRNA の筋間における発現量プロファイルは、各筋間で一致した傾向にはなく、両者の相関をとったところ、その発現量に有意な相関関係は認められなかった。ゆえに、これら 2 つの受容体発現は同調して調

節はされていない可能性が示唆された。

IGF-1 受容体の発現レベルが、運動時の動員や活動レベルの高い遅筋（遅筋線維）において高い傾向が一部見られたことは、これら筋における安静時、運動時の代謝調節に、遅筋で高い IGF-1 受容体発現が、何らかのかの影響を持つ可能性を示唆するものである。骨格筋における同化ホルモンの受容体発現については、これまでも様々な研究が行われているが、特に、成長・肥大調節や、代謝調節に大きく関与すると考えられる GH と IGF-1 の受容体発現については、安静時、運動時の動員様式や、代謝特性、収縮特性、さらには肥大反応などが異なる様々な骨格筋間で、どのように調節されているのか、これら、生理反応の違いに貢献しているのか否かについて、一定の見解を得ていない。

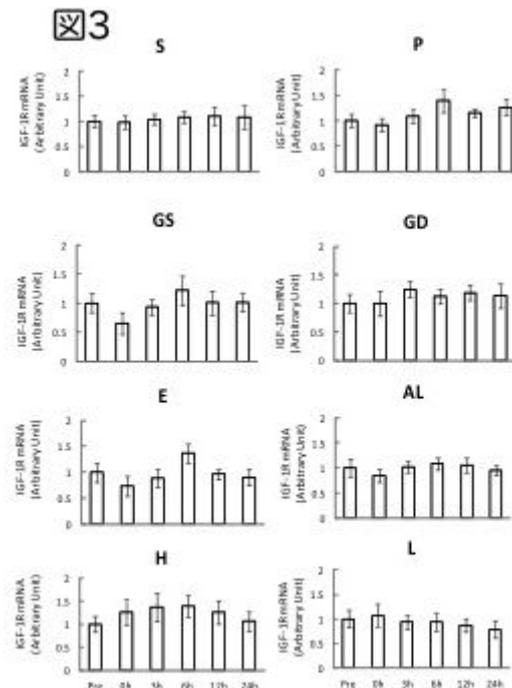
2) 急性走行負荷時の IGF-1、および IGF-1 受容体 mRNA 発現の変化

トレーニングされていないラットにおいては、有酸素運動強度にあたりと予想される運動強度（20m/min, 60min）での一過性のトレッドミル走では、IGF-1 mRNA、IGF-1 受容体 mRNA のいずれにおいても、運動終了後の 24 時間までのタイムコースにおいて、有意な変化は認められなかった。加えて、IGF-1 の蛋白同化作用、および糖輸送に関わる、受容体以降の細胞内シグナル伝達過程における主要な細胞内でのシグナル伝達因子である、Akt タンパクについて、その活性化の指標となる、リン酸化 Akt レベルを、走運動直後のラット下肢骨格筋において、Western blot により分析を行ったが、いずれの筋においても、リン酸化 Akt レベルは運動前のレベルと比較して、有意な変化は認められなかった。これは一過性の有酸素運動では、骨格筋の IGF-1 受容体が活性化されていないことを示唆するものである。

本検討で用いた運動負荷（20m/min, 60min）は、ラットのトレッドミル走行負荷を用いた有酸素運動としては、ほぼ最大負荷レベルの強度であり、また、同レベルの運動負荷での長期にわたるトレーニングでは、筋に有酸素適応が生じることが明らかにされていることから、IGF-1 受容体 mRNA の発現レベルについては、急性の筋収縮活動と、それに伴う代謝的、力学的要因の急性な変化に対しては、調節されることはないであろうと結論付けることが可能であると考えられる。

リガンドである IGF-1 の骨格筋内での発現に関しては、筋肥大時や、伸張性収縮後に遺伝子発現が増加する報告が数多くあり、走運動モデルでは、筋内の IGF-1 タンパク量の増加についても報告されているが、本研究において、急性な持久的運動では、IGF-1 mRNA の発現量に有意な発現量の変化は認められず、また、IGF-1 受容体の活性化を示すリン酸化 Akt レベルも運動前のコントロールと比較して有意な変化が認められなかったことから、

エアロビックな走運動では、IGF-1 の筋内の動員はなされておらず、そのシグナルが運動時の筋の活動や代謝状態に対しては影響を及ぼしていないことが示唆された。



N=5, *: p<0.05 in anova+student Newman keuls test

3) 筋肥大時の GH 受容体、および IGF-1 受容体発現の変化

低強度の有酸素運動刺激では、IGF-1 遺伝子発現が調節されなかったことから、より、収縮活動として高強度なモデルとなる、骨格筋肥大のモデルにて、IGF-1 受容体、および GH 受容体の遺伝子発現が調節されるか否かについて検討を行った。筋肥大モデルには、げっ歯類の運動性筋肥大のモデルとして頻繁に用いられている、腓腹筋切除による足底筋、ヒラメ筋の代償性肥大モデルを用いた。本モデルでは、数多くの研究報告において、2 から 4 週間程度の肥大期間では両骨格筋に数十%以上もの骨格筋肥大が生じることが報告されている。本研究では、筋活動の増加の影響が最も顕著であろうと考えられる、筋肥大ごく初期にあたる、腓切除から 2 日目、4 日目の時点での変化について重点を当てて検討を行った。

片側の腓腹筋切除による代償性筋肥大処置により、処置側のヒラメ筋、足底筋において、対照脚と比較して、筋重量の増加が見られた。今回の検討では処置後、2 から 4 日とごく初期の適応のために、筋内でのタンパク合成の増加や筋核増殖を伴う実質的な筋肥大は生じていないと考えられ、おそらく、急激な負荷の増加による微小な損傷を契機とした炎症反応による免疫担当細胞の浸潤や、細胞内、細胞間への水分の流入等が重量増加の主たる原因であると考えられる。

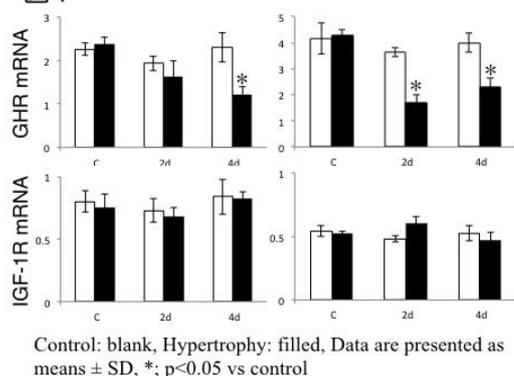
肥大筋における GH 受容体 mRNA 発現は、ヒ

ラメ筋においては4日、足底筋においては2日、4日の時点において、ともに肥大側が対照側に対して有意に発現量の減少がみられた(図4)。一方、IGF-1受容体mRNAにはどちらの筋においても、いずれの時点でも有意な変化は認められなかった。

本研究の結果より、骨格筋のGH受容体のmRNA発現は筋肥大初期(2から4日)には抑制される可能性が示唆された。IGF-1受容体のmRNA発現には変化が認められなかったことから、通常、GH-IGF-1軸として協調して筋機能、形態を調節するとされるこれらホルモンであるが、その受容体の遺伝子発現は、筋肥大時には独立した調節を受けている可能性が示唆された。

減少したGH受容体遺伝子の発現が、どのような形で筋の肥大過程に貢献しているのかについては現時点では不明である。内因性のGH欠損モデルでも骨格筋の運動性筋肥大は生じることから、GHは骨格筋の運動性肥大に必須ではないことは知られている。しかし、本研究で、GHの作用を骨格筋につたえる受容体の遺伝子発現が、筋肥大初期の時点で抑制的に調節されることが明らかとなった。受容体遺伝子の発現抑制による、骨格筋のGHに対する反応性の変化が、生理的条件下での骨格筋肥大反応に対して何らかの貢献をしている可能性は否定できない。また、この急性期(〜4日)に見られたGH受容体遺伝子発現の抑制反応が、その後の実質的な筋肥大反応が現れる時間的経過の中で、どのように調節されていくのかについても現時点では不明である。今後は、これらタイムコースにおけるGH受容体の発現レベルを明らかにしていくとともに、リガンドの投与実験や、GH受容体以降の細胞内のシグナル伝達分子(JAK、Stat5等)の活性化の解析を行い、筋肥大時の急性期に発現が抑制されるGH受容体の生理的な意義について検討を行って行きたいとかがえる。

図4



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 0件)

[学会発表](計 2件)

花井淑晃、小嶋一輝、高木裕士、吉里秀雄、ラット下肢骨格筋におけるインスリン様成長因子受容体の発現調節、第68回日本体力医学会、2013年9月21-23、東京

林敦也、早田陽紀、鍋野辰悟、吉里秀雄、花井淑晃、代償性筋肥大の初期におけるGH受容体及びIGF-1受容体の遺伝子発現の変化、第70回日本体力医学会、2015年、9月18-20、和歌山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花井淑晃 (HANAI YOSHITERU)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 50360730

(2) 連携研究者

吉里秀雄 (YOSHIZATO HIDEO)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

(3) 研究協力者

小嶋一輝、林敦也
名古屋工業大学・大学院工学研究科博士前期課程・未来材料創成工学専攻

高木裕士、早田陽紀、鍋野辰悟
名古屋工業大学・生命物質工学科