

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650409

研究課題名(和文)骨格筋の可塑性に及ぼす 2 アドレナリン受容体発現レベルの応答とその機能的役割

研究課題名(英文)Functional role of adrenergic receptor in skeletal muscle plasticity

研究代表者

今泉 和彦(Kazuhiko, Imaizumi)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：60145068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ベータ2作動薬投与や運動によって骨格筋内のベータ2アドレナリン受容体を介してシグナル伝達が亢進することによって骨格筋の可塑性が変動することを1年目に見出した。

2年目では、ギプス固定によってラットの下肢骨格筋が萎縮した際にベータ2作動薬のクレンブテロール(CLE)を投与した際に萎縮が軽減されるか否かを組織化学的に検討した。その結果、ラットの関節固定は速筋の長指伸筋の重量とII型線維の横断面積を低下させてその筋重量を萎縮させた。この筋萎縮はCLE投与により主にII型線維の萎縮の抑制により軽減されることを実証した。このような現象は遅筋のヒラメ筋では認められないことから、速筋と遅筋で異なっていた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether daily administration of clenbuterol(CLE;1mg/kg BW per day) prevented casted-immobilization(IMM)-induced atrophy of skeletal muscle fibers. Adult male Sprague-Dawley rats were assigned to control(CON), CLE, IMM, and IMM+CLE groups, and were maintained for 9 days. The extensor digitorum longus(EDL) and soleus(SOL) muscles were isolated and analyzed histochemically after ATPase staining. EDL and SOL muscle weights in the IMM group were lower than those in the CON group. Quantitative analysis of cross-sectional areas revealed that EDL muscle atrophy was limited to type II fibers; SOL muscle atrophy involved type I and type II fibers. In the IMM+CLE group, IMM-induced muscle atrophy was attenuated in the EDL, but not in the SOL muscle. Moreover, the attenuating effect of CLE was observed in type II fibers. These results suggest that CLE attenuated IMM-induced atrophy of type II fibers in the fast-twitch EDL muscle but not in the slow-twitch SOL muscle.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ生理学

キーワード：骨格筋の可塑性 アドレナリン受容体 アドレナリン作動薬 クレンブテロール 骨格筋の組織化学 I型筋線維 I型筋線維 骨格筋萎縮の抑制

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) シグナル伝達系は骨格筋の可塑性や代謝などにおいて重要な機能的役割を担っている。最近の研究によると、 β_2 -作動薬であり、しかもドーピング薬物の clenbuterol (CLE) は骨格筋の肥大を惹起し、筋線維組成の変換および骨格筋内の代謝関連酵素活性の誘導を惹起することが知られている。

一般に、身体運動は骨格筋のタンパク質合成速度を高め、筋線維組成を変化させると共に、ミトコンドリアの代謝回転を高めることはよく知られている。このような身体運動を介した骨格筋の応答には β_2 -AR が少なくとも一部関わっているものと推定されている。しかし、骨格筋における β_2 -AR のシグナル伝達系の応答については明確にされていない点が多い。この骨格筋内の β_2 -AR のシグナル伝達系の応答を明確にすることは、サルコペニア (Sarcopenia), 除神経 (denervation) および各種神経筋疾患のような骨格筋の萎縮やその活動の低下に対する防止のために不可欠である。

一般に、骨格筋内の β_2 -AR シグナル伝達系の経路は、 $G_{\alpha s}$ および $G_{\alpha i}$ のシグナル経路が共役していることが知られている。このうち、 $G_{\alpha s}$ -adenyl cyclase (AC) - cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 経路が β_2 -AR シグナル伝達としてよく知られている。例えば、cAMP の誘導によってリン酸化された protein kinase (PKA) は cAMP 応答性エレメントタンパク質 (CREB) を活性化させる。この CREB は核転写因子でもあり、広く細胞の増殖や分化に関わっている。

一方、 $G_{\alpha i}$ に共役している β_2 -AR は、AC

活性の阻害に加え、 $G_{\alpha s}$ -に依存しない経路、例えば、細胞誘導因子を活性化するリン酸化酵素 (mitogen-activated protein kinase: MAPK) や phosphoinositol 3-kinase (PI3K) -Akt シグナル経路を活性化することが知られている。

また、MAPK ファミリー (extracellular signal-regulated kinase 1/2: ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase: JNK, p38 MAPK) は細胞の成長、分化および適応などに広く関わっていることが知られている。特に、骨格筋内の p38 MAPK は、筋の分化にとって不可欠であり、グルコースの代謝やエネルギー消費に対して重要な機能的役割を担っている。さらに、PI3K-Akt シグナル経路もまたタンパク質合成、遺伝子の転写、細胞増殖および細胞の生存において重要な役割を担っている。

一般に、骨格筋線維はミオシン重鎖のアイソフォームの代謝特性および収縮特性に基づいて収縮速度の遅い I 型 (遅筋) と収縮速度の高い II 型 (速筋) に分類されている。

従来、私達は、CLE をラットに 10 日間投与した場合、あるいは 10 日間ラットの下肢を関節固定した後に解除した際の下肢骨格筋内の β_2 -AR mRNA 発現量が大きく変動し、その変動は筋線維ごとに明らかに異なることを報告してきた。

これらの知見を基にして、本研究では、実験動物としてラットまたはマウスに CLE を投与した場合、あるいは運動を負荷したとき、下肢骨格筋の細胞内のシグナル伝達経路が筋線維ごとに異なる可能性があるのではないかと推定した。

2 . 研究の目的

そこで本研究では、この仮説を検証するため、骨格筋の容積の変化と β_2 -AR を介した骨格筋内のシグナル伝達との関連を明らかにするため、ラットまたはマウスに CLE を投与した場合、トレッドミル上で走行させた場合に、骨格筋内の p38 MAPK や Akt のリン酸化レベルが収縮速度の速い骨格筋【 = 長指伸筋 (Extensor digitorum longus : EDL) 速筋】と遅い骨格筋【 = ヒラメ筋 (Soleus: SOL) 遅筋】) との間でどのように応答するかを比較・検討した。

3 . 研究の方法

1 年目の研究

実験動物 : 約 10 週齢の C57BL/6J 雄性マウス

実験法 : <第一実験> : マウスの腹腔内に CLE を 1mg/kg 体重投与し、1 時間、4 時間、24 時間後に各種骨格筋を摘出・秤量したのち、分析するまで試料を冷凍・保存した。<第二実験> : マウスに回転籠で自発運動を 6 週間実施した。

下肢筋 : EDL (長指伸) 筋および SOL (ヒラメ) 筋

各種遺伝子発現量の測定・解析

各種 mRNA 発現量 : 逆転写ポリマラーゼ連鎖法 (RT-PCR 法); **各種タンパク質発現量** : Western-blot 法

2 年目の研究

実験動物 : 約 8 週齢の Sprague Dawley 系雄

性ラット

実験法 : ラットを対照群、ギプス固定群、CLE 投与 (dose=1mg/kg 体重) 群、ギプス固定と CLE 投与の併用群に分けて 9 日間飼育した。

下肢筋 : EDL (長指伸) 筋および SOL (ヒラメ) 筋

筋線維の分類 : EDL 筋と SOL 筋の筋腹部より連続凍結切片を作成し、ATPase 染色による組織学的分析を実施し、常法にしたがって筋線維型に分類した。

4 . 研究結果

1 年目の主な結果 :

CLE 投与および急性運動後に MAPK や Akt のリン酸化の発現レベルが遅筋・SOL 筋で著明に高まり、速筋・EDL で変化がみられなかった。具体的には、CLE 投与後 1 時間および 4 時間における骨格筋内の p38 MAPK のリン酸化の発現レベルは、SOL 筋では対照群に比べてそれぞれ 6.8 倍および 5.6 倍有意に高かった。それに対し、EDL 筋では SOL 筋で得られた現象は認められず、速筋と遅筋とで異なった応答が認められた。

一方、運動後 1 時間における骨格筋内の p38 MAPK のリン酸化の発現レベルは、SOL 筋では対照群より約 3.0 倍有意に高かった。しかし、この現象は EDL 筋では認められなかった。

つぎに、骨格筋内の Akt のリン酸化の発現レベルに及ぼす CLE 投与と運動後の影響を

しらべた。その結果、SOL 筋の Akt のリン酸化の発現レベルは、CLE 投与後 1 時間と 4 時間でそれぞれ対照群の 4.6 倍と 3.4 倍有意に高かった。それに対し、EDL 筋ではこのような現象がみられなかった。

また、骨格筋内の Akt のリン酸化の発現レベルは、CLE 投与および運動の二条件ともに SOL 筋と EDL 筋ともに変動が認められなかった。

以上の結果より、マウスに CLE 投与や運動を付加した際の骨格筋内の β_2 AR シグナル伝達系の応答特性が明らかに認められた。したがって、骨格筋内の p38 MAPK や Akt 経路の発現レベルは CLE 投与や身体運動に対して明らかに応答する。特にその応答は収縮速度の遅いヒラメ(SOL)筋において顕著であり、収縮速度の高い長指伸(EDL)筋ではその影響がみられないことから、このような条件に対する応答には筋線維の種類に依存することが強く示唆された。

2 年目の主な結果：

2 年目はラットの下肢骨格筋を関節固定法で萎縮させた際に骨格筋の萎縮が CLE 投与で実際に軽減されるか、もし軽減されるとすれば速筋または遅筋の II 型線維または II 型線維の各横断面積が変動するか否かを明確にする為、組織化学的な手法を用いて比較・検討した。

その結果、ラットの関節固定は速筋の EDL 筋の重量と II 型線維の横断面積を低下させて筋萎縮を惹起した。この速筋・EDL 筋の萎縮は CLE 投与により主として II 型筋線維の萎縮の抑制によって明らかに軽減されたが、遅筋・SOL 筋では認められなかった。

これらの結果より、CLE 投与によってラットの速筋・EDL 筋の II 型線維の萎縮を特異的に軽減させるが、遅筋・SOL 筋ではこのような現象がみられないことが強く示唆された。

5 . 主な発表論文

(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 4 件)

- 1) Sato S, Shirato K, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K and Imaizumi K.
Effects of β_2 -agonists and exercise on β_2 -adrenergic receptor signaling in skeletal muscles.
Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 1(1) :139-144 (2012)
- 2) Shirato K, Sato S, Sato M, Hashizume Y, Tachiyashiki K and Imaizumi K.
 β_2 -agonist clenbuterol suppresses bacterial phagocytosis of splenic macrophages expressing high levels of macrophage receptor with collageneous structure.
Biological & Pharmaceutical Bulletin, 36(3) : 474-480 (2013)
- 3) Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Inoue D, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K and Imaizumi K.
Intracellular β_2 -adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response

to single-dose β_2 -agonist clenbuterol treatment and acute exercise.

Journal of Physiological Sciences, 63(3) :

211- 218 (2013)

- 4) Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Mitsuhashi R, Sato S, Tachiyashiki K and Imaizumi K.

Clenbuterol attenuates immobilization-induced atrophy of type II fibers in the fast-twitch extensor digitorum longus but not in the slow-twitch soleus muscle.

Global Journal of Human Anatomy and Physiology Research, 1(1) : 10-17 (2014)

〔専門図書〕(計2件)

- 1) Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Suzuki H, Tachiyashiki K and Imaizumi K.

Functional roles of β_2 -adrenergic receptors in skeletal muscle hypertrophy and atrophy.

In: Sports Sciences for the Promotion of an Active Life. Vol. II. Physical Activity, Exercise. Sedentary Behaviour and Health Promotion (Ed. by Kanosue, et al.), Springer Japan, in press (2014)

- 2) Shirato K, Sato S, Sato M, Hashizume Y, Tachiyashiki K and Imaizumi K.

Effects of β_2 -gonist administration on macrophage bacterial phagocytosis by macrophages in mice.

In: Sports Sciences for the Promotion of an

Active Life. Vol. II. Physical Activity, Exercise. Sedentary Behaviour and Health Promotion (Ed. by Kanosue, et al.), Springer Japan, in press (2014)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今泉和彦 (32689)

早稲田大学人間科学学術院 (738)

教授 (20)

研究者番号 : 60145068

(2)研究分担者

白土 健 (32689)

早稲田大学人間科学学術院 (738)

助手 (23)

研究者番号 : 60559384

(3)連携研究者

立屋敷かおる (13103)

上越教育大学 (研究院)(960)

副学長兼理事

研究者番号 : 20119324