

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350899

研究課題名(和文) 血流制限による骨格筋萎縮の抑制効果とそれに関連する遺伝子の解明

研究課題名(英文) Inhibiting effect of blood flow restriction on skeletal muscle atrophy and investigation of related genes

研究代表者

桜庭 景植 (SAKURABA, KEISHOKU)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：50175460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：局所的な血流制限の繰り返しによる筋萎縮、筋力低下予防効果に対するメカニズム解明のため、ヒトを対象に筋萎縮、筋力低下モデルである下肢ギプス固定を用いて骨格筋タンパク質合成・分解に関わる遺伝子発現量を検討した結果、このメカニズムには、MuRF1, FoxO3, p70S6Kなどの遺伝子発現量の調節が関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Expression levels of genes influencing skeletal muscle protein synthesis and breakdown were analyzed after immobilizing the human lower extremity in a cast as a model of muscle atrophy and weakness to clarify the mechanisms of the preventing effect of repeated local blood flow restriction on muscle atrophy and weakness. It was suggested that the regulation of gene expression level such as MuRF1, FoxO3, p70S6K may be involved in the mechanisms.

研究分野：スポーツ医学(運動器系)

キーワード：血流制限 筋萎縮 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

入院等によりベッド上での生活時間が増加し、積極的な運動の実施が困難になると、短時間であっても筋萎縮や筋力低下が生じることが知られている。そして、その後の生活に多大な影響を与え、寝たきりの生活へとつながることも十分に考えられるため、早期介入が可能でより安全に行える画期的な予防法の開発が強く望まれる。

その中で我々は、筋萎縮や筋力低下予防の方法の一つとして「局所的な血流制限」に注目している。血流制限とは四肢の基部に圧を加えることで局所の血流を制限し、その後、圧を開放することで一時的に局所の血流量を増大させる方法である。これまでの我々の調査によって血流制限だけで、2週間の足関節固定および松葉杖歩行によって生じる筋力低下をほぼ完全に抑制することを証明した。また、実際の早期リハビリテーションを想定した低強度の等尺性トレーニングと比べてもその効果は明らかに高かった。さらに、大腿部筋横断面積の低下も抑制し、筋萎縮に対しても効果があることが明らかとなっている。この血流制限単独による筋萎縮や筋力低下の予防はトレーニング等の運動や投薬を一切使わずに骨格筋の変化を予防した世界で初めての方法である。しかし、なぜ血流制限を繰り返すだけで骨格筋萎縮や筋力低下が抑制できるのかは現在まで全く不明である。

そこで血流制限の繰り返しによる骨格筋萎縮の抑制を筋繊維レベルで調査することと、遺伝子発現を網羅的解析から関連遺伝子から候補を抽出することで、これまでに全く明らかなでなかった新規の骨格筋萎縮メカニズムの発見につながる可能性が高く画期的な成果が得られると考えた。

2. 研究の目的

(1) MRI 画像を用いて筋横断面積の骨格筋バイオプシーサンプルを用いて筋繊維組成やタイプ別の断面積の変化を調査することで、骨格筋萎縮に対する詳細な血流制限効果を明らかにすることを目的とした。

(2) 骨格筋筋生検サンプルを用いて、遺伝子発現を解析し、血流制限による骨格筋萎縮の抑制に関連する遺伝子を抽出し、メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心臓・血管系疾患および下肢の傷害を有さない健常成人男性 10 名を対象に大腿部からつま先にかけてギプスを巻くことで膝関節と足関節を固定した。また、実験期間中は移動時の松葉杖の使用を義務付け、下肢への荷重を制限した。この方法を用いて対象者の下肢を 14 日間の関節固定及び非荷重状態にすることで筋萎縮を生じさせた。対象者を無作為に下肢固定のみ行うコントロール群・下肢固定と血流制限を行う血流制限群の 2 群に分類した。血流制限群には、すでに筋萎縮や筋力低下の抑制効果が示されている方法を参考に、駆血帯を用いて、対象者のギプス固定側の大腿基部に 200mmHg の圧を加えることで、下肢の血流を制限した。血流制限は 5 分間とし、3 分間の安静をばさんで 5 セット行い、午前と午後の 1 日 2 回毎日実施した。実験期間は 14 日間とした。実験前・開始 3・7・10・14 日後に大腿部前面および下腿後面の MRI 撮影を行い、筋横断面積の変化をみた。

筋横断面積の測定は、MRI を用いて大腿部の筋横断画像を撮像した。画像解析ソフトを用いて膝蓋骨上端から 10cm、15cm 中枢側の筋横断面積を計測した。筋繊維の面積・組成・面積組成は、局所麻酔で外側広筋より筋生検を行った。その後、筋繊維タイプ別に面積・組成および面積組成の変化を調査した。

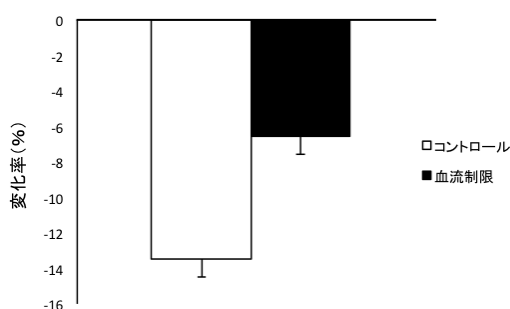
(2) 対象は、心臓・血管系疾患および下肢の傷害を有さない健常成人男性 10 名とした。

(1)と同様の方法を用いたコントロール群(5名)、血流制限群(5名)に対して、実験前と開始から 1・3・7・14 日後に外側広筋より筋生検を行った。得られたサンプルより、フェノール・グアニジンイソチオシアネート法 (TRIzol, Invitrogen, USA) と精製カラム (RNeasy Lipid tissue mini kit, QIAGEN, Germany) を用いて Total RNA を抽出した。その後、Experion Automated Electrophoresis System で RNA の品質を確認した後、Total RNA 400ng を RT² First Strand Kit (QIAGEN, Germany) を使用して cDNA を合成し、RT² ProfilerTM PCR Array Human Skeletal Muscle: Myogenesis & Myopathy (QIAGEN, Germany) による骨格筋に関連する遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1) 局所の血流制限により、膝関節屈曲筋群の筋萎縮が抑制された(コントロール群では、実験前: $46.7 \pm 6.4 \text{ cm}^2$ 、実験後: $44.6 \pm 5.9 \text{ cm}^2$ 、

変化率: $-4.4 \pm 1.7\%$ 、血流制限群では、実験前: $42.1 \pm 2.1\text{cm}^2$ 、実験後: $42.5 \pm 2.3\text{cm}^2$ 、変化率: $1.1 \pm 1.1\%$)が、膝関節伸展筋群(コントロール群では、実験前: $65.4 \pm 6.0\text{cm}^2$ 、実験後: $58.4 \pm 4.9\text{cm}^2$ 、変化率: $-9.6 \pm 3.4\%$ 、血流制限群では、実験前: $62.2 \pm 5.6\text{cm}^2$ 、実験後: $57.4 \pm 5.4\text{cm}^2$ 、変化率: $-7.7 \pm 1.8\%$)や足関節底筋群(コントロール群では、実験前: $46.2 \pm 7.5\text{cm}^2$ 、実験後: $43.7 \pm 6.9\text{cm}^2$ 、変化率: $-5.4 \pm 3.9\%$ 、血流制限群では、実験前: $42.9 \pm 3.9\text{cm}^2$ 、実験後: $40.7 \pm 3.8\text{cm}^2$ 、変化率: $-4.7 \pm 2.6\%$)については筋萎縮の抑制はみられなかった。しかし、膝関節伸展筋群の中の外側広筋のみに着目すると、コントロール群: $-13.5 \pm 3.6\%$ に対し、血流制限群: $-6.6 \pm 2.3\%$ であった(図1)。

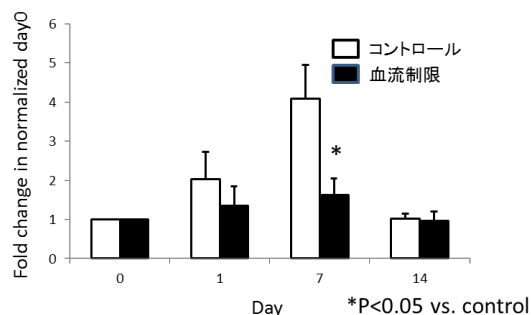


(図1) 外側広筋横断面面積の変化率の比較

このように骨格筋サンプルを摂取した外側広筋だけみると、血流制限による筋萎縮の抑制効果が見られた。

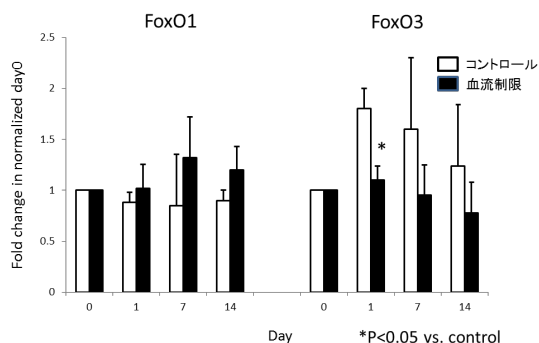
(2) 血流制限による骨格筋萎縮抑制メカニズムの探索

骨格筋タンパク分解に関わる骨格筋特異的ユビキチンリガーゼ MuRF1 (Muscle RING-Finger Protein-1) の発現量はコントロール群で固定前と比べて1, 7日目において増加していたが、血流制限群ではコントロール群に比べて7日目において有意に増加量が抑制されていた。(図2)



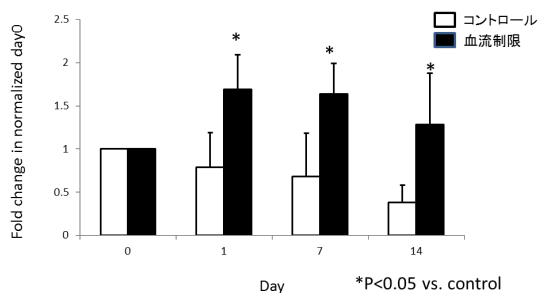
(図2) Murf1 mRNA 発現量

また、MuRF1 の転写に関わる転写因子 FoxO1、FoxO3 (forkhead box O-1, forkhead box O-3) の発現量は、FoxO1 については固定で有意な発現量の変化は認められず、血流阻害によってもコントロールと比べて差は認められなかったが、FoxO3 ではコントロールで下肢固定後1日で発現量の増加が認められたのに対して、血流制限群ではその発現量の増加が抑制されていた。(図3)



(図3) 転写因子 FoxO1, FoxO3 mRNA 発現量

さらに、骨格筋タンパク合成に関わる p70S6K (Ribosomal Protein S6 Kinase, 70kDa, Polypeptide 1) の発現量が血流制限群では下肢固定後増加傾向にあり、1, 7, 14日の時点でコントロールと比べて有意に増加していた。



(図4) p70S6K mRNA 発現量

これらの結果より、繰り返しの血流制限が筋萎縮や筋力低下の抑制を行うメカニズムには、繰り返しの血流制限による MuRF1, FoxO3, p70S6K などの骨格筋タンパク合成、分解に関わる遺伝子発現量の調節を介している可能性が示された。しかしながら、今回の検討では mRNA レベルでの検討しか行っておらず、今後更なる検討が必要である。また、非荷重やギプス固定による骨格筋の萎縮には活性酸素種の産生が関与していることがわかっており、酸化ストレスは、骨格筋において筋萎縮関連遺伝子の発現を刺激する重要な因子であることが明らかとなっている。阻血再

灌流には組織における酸化ストレスの惹起が懸念されるが、最近、動物を使用した検討において、短時間の血流制限が骨格筋組織中の低酸素状態を招くが、mTOR シグナルを活性化し筋萎縮を予防する可能性があることが明らかとなってきている。(Nakajima et al. Heart Vessels. 2016)

今後、これらのメカニズムの更なる解明のため、in vitro の系などを使用し明らかにしておく必要があると思われる。

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)

1. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Increased intramyocellular lipid/impaird insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016 Jan 1;310(1):E32-40. 査読あり
2. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Increased intramyocellular lipid/impaird insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016 Jan 1;310(1):E32-40. 査読あり

[学会発表](計8件)

1. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H. 62nd Annual Meeting of American College of Sports Medicine. 26-30 May 2015, San Diego USA. Mechanisms of insulin resistance after 24hours physical inactivity in murine soleus muscle
2. Takehi S, Tamura Y, Kawamori R, Watada H. Cell Symposia: Exercise Metabolism. 12-14 July 2015, Amsterdam, Netherlands. Physical inactivity and high fat diet synergistically enhance the accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle
3. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. 2nd Congress, International Academy of Sportology. 12 Sep 2015,

Tokyo, Japan. Intramyocellular lipid accumulation after high-fat diet is associated with the gene expression involved in lipid metabolism in skeletal muscle of non-obese men

4. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H. 70th Annual Meeting of Japanese Society of Sports Medicine. 18-20 Sep 2015, Wakayama. 24 hours foot cast immobilization increases intramyocellular diacylglycerol and induces insulin resistance in murine soleus muscle
5. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H. 27th Annual Meeting of Japanese Society of Sports Medicine. 5 Dec 2015, Tokyo. High fat diet and physical inactivity synergistically enhance the accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle
6. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H. 50th EASD Annual Meeting. 15-19 Sep 2014, Vienna. Physical inactivity and high fat diet synergistically enhance the accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle
7. Takehi S. Japanese Orthopedic Society. 25 May 2015, Hiroshima. Knee joint exercise therapy and muscle training up to date - blood flow restriction - prevention of muscle atrophy and improvement of muscle training effect
8. Takehi S. Japanese Orthopedic Society. 23 Nov 2015, Hiroshima. Knee joint exercise therapy and muscle training up to date - blood flow restriction - prevention of muscle atrophy and improvement of muscle training effect

6. 研究組織

(1)研究代表者

Takehi S (SAKURABA, Keishoku)
順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授
研究者番号：50175460

(2)研究分担者

Takehi S (KAKEI, Saori)
順天堂大学大学院・医学(系)研究科(研究院)・特任助教
研究者番号：00450560