

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560373

研究課題名(和文)クレアチン・アナログ投与がラット骨格筋のエネルギー代謝特性に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of creatine-analogue treatment on the energy metabolism in skeletal muscles

研究代表者

大平 充宣(Ohira, Yoshinobu)

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：50185378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の収縮・代謝特性が、高エネルギーリン酸含有レベルにどのような影響を受けるのか、ラットを使って追求した。その結果、特に長指伸筋で顕著であったが、ヒラメ筋にもbeta-GPA投与に伴う更なる遅筋化が見られた。また、beta-GPA投与により、炭水化物代謝の抑制と脂質代謝の亢進が示唆された。日常の筋収縮活動レベルは減少しているにも関わらず、長期間のクレアチン枯渇による筋の有酸素能が改善されることを示すもので、基礎科学分野のみならず、運動トレーニング分野においても有意義な示唆を与えてくれるものと思われる。しかし、一時注目されていたクレアチン投与に対しては、顕著な効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Effects of creatine levels on the contractile and metabolic properties in skeletal muscles were studied in rats. As the results, shift toward slow-twitch type was induced by beta-GPA feeding even in soleus, although such trend was prominent in extensor digitorum longus. Further, inhibition of carbohydrate metabolism and simulation of lipid utilization were induced. It was indicated that oxydative capacity of skeletal muscles was increased following chronic depetion of creatine, although daily muscle activities were less, on the contrary. These observations gave important suggestions not only for basic science, but also for the exercise training areas. However, beneficial effects by treatment using creatine were not observed.

研究分野：神経・筋生理学

キーワード：ラット骨格筋 クレアチン枯渇 炭水化物代謝 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

持久性またはスプリント性の筋の特性を改善するための運動トレーニングは国内外で処方されているが、顕著な効果は得られておらず、意図する効果を筋に誘発させる機構も必ずしも明らかではない。そこで、筋の収縮活動レベルに応じた機械的刺激とは無関係に、筋中高エネルギーリン酸レベルを変え、代謝的刺激を変えた場合の筋の可塑機構を追求しようとする研究を計画した。

ラットに長期間 β -guanidinopropionic acid (β -GPA) を経口投与した場合、筋中アデノシン・3・リン酸 (ATP) およびクレアチンリン酸含有量の低下 {Am J Physiol 266 (Cell Physiol 35), 1994 & Am J Physiol 228, 1975} した。しかも日常の筋活動量は減少したにも関わらず (Jpn J Physiol 53, 2003)、 β -GPA 食により、ラットヒラメ筋における β_2 -受容体の最大結合能が上昇し、遅筋タイプにシフトした {Am J Physiol 266 (Cell Physiol 35), 1994}。しかし、筋収縮活動がいかなるエネルギー代謝によって演じられているのか不明である。そこで、電気刺激による筋収縮中の炭水化物および脂質代謝と収縮特性を比較するために、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

骨格筋の形態・収縮・代謝特性が、高エネルギーリン酸含有レベルにどのような影響を受けるのか、ラットを使って追求した。筋中高エネルギーリン酸含有量は、クレアチンまたはそのアナログである β -GPA の経口投与によって調節し、それに伴う骨格筋における形態的特性および筋収縮中の炭水化物および脂質代謝を追求した。

まず、麻酔下のラット後肢筋の坐骨神経を介した電気刺激による収縮特性および筋線維タイプや酵素活性を測定した。次いで、一定頻度・強度・時間の等尺性収縮中の遅筋および速筋における炭水化物および脂質代謝

測定の分析を行った。

3. 研究の方法

生後3週齢のオス Wistar ラットを使って実験した。これらのラットを、①正常食、② β -GPA 食、③クレアチン食の3群に任意に分けた(それぞれ n=5)。正常食には日本クレアの CE-2、 β -GPA およびクレアチン食群のエサには、1%濃度で β -GPA およびクレアチンを正常食に混入した (Am J Physiol 228, 1975)。エサの量は、はじめの4週間は12時間くらいで食べつくす程度で漸増したが、その後は1日に2gずつ与え、約8週間飼育した。水は自由に摂取させた。

・ 収縮特性測定

3種混合麻酔薬 {メドトミジン (0.3 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg)} の腹腔内投与による麻酔下で、右ヒラメ筋および左長指伸筋の *in situ* 収縮特性を測定した。神経および血管を正常に保ちながら両筋の末梢部を露出し、左右の大腿部坐骨神経に電気刺激用電極を装着した。また、継続的な血圧記録のために、頸動脈にカニューレを装着した。その後、収縮特性測定テーブルにうつぶせにした姿勢で膝関節をテーブルに固定し、まずヒラメ筋の末梢部腱を切断し、張力測定用トランスデューサーに連結した。刺激電極は電気刺激装置に連結し、1 Hz での max twitch tension が得られるまで、刺激強度および筋長を調整した後、twitch curve、10 Hz および 20 Hz 刺激に対する fusion pattern、max tetanic tension、それに (5 分間の回復後) 1 Hz 刺激に対する発揮張力の変化、および血圧を連続記録した。Twitch curve では、time-to-peak tension、half relaxation time、contraction time 等も求めた。筋は常に 37 °C の Krebs Henseleit buffer で乾燥を防止した。次いで、同様に長指伸筋の収縮特性を測定した。

・全筋横断切片における組織化学的分析

電気刺激しない側の筋は、刺激前にあらかじめサンプリングした。サンプリングに伴う出血防止のため、血管は結紮した。これらの筋は、サンプリング後生体内長にストレッチして、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結した。その後筋腹中央部を optimum cutting temperature (OCT) compound を使ってコルク上に立て、凍結横断切片におけるミオシン重鎖発現パターンによる筋線維タイプ分布、筋線維サイズ（横断面積）、酵素活性等を分析した。

・一定頻度・強度・時間の等尺性収縮中の炭水化物および脂質代謝測定

3 種混合麻酔薬の腹腔内投与による麻酔下で実験を行ったが、電気刺激しない側の筋はコントロールとして、あらかじめサンプリングした。短時間に変化する炭水化物および脂質代謝に関与する代謝産物や ATP 等を分析したので、神経および血管を正常に保ちながらこれらの筋および末梢部腱を露出した後、液体窒素内で冷やしたアルミ板で瞬間凍結（フリーズクランプ）して採取した。サンプリングに伴う出血防止のため、血管は結紮した。

実験側の筋は張力測定用トランスデューサーに連結し、1 Hz での max twitch tension が得られるまで刺激強度および筋長を調整し、約 5 分間の回復を加えた後で、大腿部坐骨神経を介した 5 分間の 1 Hz 刺激を加えた。5 分間の刺激直後には張力測定用トランスデューサーに連結していた末梢部腱を切断し、筋を即座にフリーズクランプし、採取した。これらのサンプルは、分析まで -80°C 下で保存した。収縮中の筋における血流維持は、血圧のモニターによって推定した。

凍結サンプルは、液体窒素入りの乳鉢内で粉末化した。その後、ガラスホモジナイザーを利用し、氷水で冷却したリン酸バッファー

中でホモジナイズした後、遠心分離により上澄みを採取した。これらのサンプルで、筋収縮に伴うエネルギー代謝によって変化する ATP、クレアチンリン酸、乳酸、グリコーゲン、クエン酸塩含有量等を定量的に分析した。遠心分離後の沈殿部ではタンパク質量を測定し、これらの分析値をタンパク質当たり (μg) で算出し、サンプル量の違いによる値を補正した。

4. 研究成果

骨格筋の収縮・代謝特性が、高エネルギーリン酸含有レベルにどのような影響を受けるのか、ラットを使って追求した。その結果、特に長指伸筋で顕著であったが、ヒラメ筋にも β -GPA 投与に伴う更なる遅筋化が見られた。また、 β -GPA 投与により、炭水化物代謝の抑制と脂質代謝の亢進が示唆された。日常の筋収縮活動レベルは減少しているにも関わらず、長期間のクレアチン枯渇による筋の有酸素能が改善されることを示すもので、基礎科学分野のみならず、運動トレーニング分野においても有意義な示唆を与えてくれるものと思われる。しかし、一時注目されていたクレアチン投与に対しては、顕著な効果は認められなかった。

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 16 件）

1. Ohira, L., T. Ohira, K. Kitada, T. Ohira, F. Kawano, T. Wakahara, K. Kamibayashi, Y. Nakamura, and Y. Ohira.
Anti-gravitational growth-associated changes in the mobilization of leg muscles during walking in one girl. Jpn. J. Aerosp. Environ. Med., in press.
2. Yokoyama, S., Y. Ohno, T. Egawa, K.

- Yasuhara, A. Nakai, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, M. Okita, T. Origuchi, and K. Goto. Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading. *Acta Physiologica*, in press.
3. 河野 史倫、大平 充宣。損傷筋の再生メカニズムと膠原病治療への応用の可能性を探る。季刊誌「分子リウマチ治療」、印刷中。
 4. Shibaguchi, T., T. Sugiura, T. Fujitsu, T. Nomura, T. Yoshihara, H. Naito, T. Yoshioka, A. Ogura, and Y. Ohira. Effects of icing or heat stress on the induction of fibrosis and/or regeneration of injured rat soleus muscle. *J. Physiol. Sci.* DOI 10.1007/s12576-015-0433-0, 2016.
 5. Ohira, T., F. Kawano, T. Ohira, K. Goto, and Y. Ohira. Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading. *J. Physiol. Sci.*, 65: 293-310, 2015.
 6. Ohira, T., X.D. Wang, T. Ito, F. Kawano, K. Goto, T. Izawa, H. Ohno, T. Kizaki, and Y. Ohira. Macrophage deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice inhibits activation of satellite cells and prevents muscle hypertrophy in single soleus fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308 (10): C848-C855, 2015.
 7. Ohira, T., H. Okabe, F. Kawano, R. Fujita, T. Ohira, K. Ohira, Y. Oke, N. Nakai, R.R. Roy, V.R. Edgerton, and Y. Ohira. Speed and/or inclination-dependent mobilization of human leg muscles during walking with a unique exception. *Acta Astronautica* 116: 237-246, 2015.
 8. Canciani, B., A. Ruggiu, A. Giuliani, D. Panetta, K. Marozzi, M. Tripodi, P.A. Salvadori, M. Cilli, Y. Ohira, R. Cancedda, and S. Tavella. Effects of long time exposure to simulated micro- and hypergravity on skeletal architecture. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 51: 1-12, 2015.
 9. Ogasawara, J., T. Izawa, T. Sakurai, K. Shirato, Y. Ishibashi, Y. Ohira, H. Ishida, H. Ohno, and T. Kizaki. Habitual exercise training acts as a physiological stimulator for constant activation of lipolytic enzymes in rat primary white adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464: 348-353, 2015.
 10. Kizaki, T., S. Sato, K. Shirato, T. Sakurai, J. Ogasawara, T. Izawa, Y. Ohira, K. Suzuki, and H. Ohno. Effect of circadian rhythm on clinical and pathophysiological conditions and inflammation. *Critical ReviewsTM in Immunology* 35 (4): 261-275, 2015.
 11. Oishi, Y., R.R. Roy, T. Ogata, and Y. Ohira. Heat stress effects on the myosin heavy chain phenotype of rat soleus fibers during the early stages of regeneration. *Muscle & Nerve* 52: 1047-1056, 2015.
 12. 柴原拓哉、大場友裕、石原達朗、田中剛貴、大平充宣。最大酸素摂取量レベルは持久性運動パフォーマンスにどれだけ貢献するのか？同志社スポーツ健康科学 7: 52-66, 2015.
 13. Kawano, F., T. Shibaguchi, N. Nakai, K. Nakata, and Y. Ohira. Phosphorylation of Hsp25 at serine 15 is promoted in immature fibers following in situ muscle contraction. *J. Phys. Fitness Sports Med.* 4 (2): 231-239, 2015.
 14. Ohno, Y., T. Egawa, S. Yokoyama, A. Nakai, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka,

and K. Goto. Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses heat stress-associated increase in slow soleus muscle mass of mice. *Acta Physiologica* 215: 191-203, 2015.

15. Kawano, F., K. Nimura, S. Ishino, N. Nakai, K. Nakata, and Y. Ohira. Differences in histone modifications between slow- and fast-twitch muscle of adult rats and following overload, denervation or valproic acid administration. *J. Appl. Physiol.* 119: 1042-1052, 2015.
16. Egawa, T., A. Goto, Y. Ohno, S. Yokoyama, A. Ikuta, M. Suzuki, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, T. Hayashi, and K. Goto. Involvement of AMPK in regulating skeletal muscle atrophy during hindlimb unloading in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 309: E651-E662, 2015.

[学会発表] (計 13 件)

1. Ohira, Y., F. Kawano, T. Ohira, and Y. Arima. Role(s) of antigravitational activity-related afferent input in the regulation of the properties of skeletal muscles and/or immune system. The 11th World Congress of the International Society for Adaptive Medicine. Symposium VI: Adaptations to Microgravity, Yonago City, Japan, May 27-30, 2015.
2. Goto, K., T. Sugiura, Y. Ohira, and T. Yoshioka. A role of stress response in the regrowth and regeneration of skeletal muscle cells. The 11th World Congress of the International Society for Adaptive Medicine. Symposium VI: Adaptations to Microgravity, Yonago City, Japan,

May 27-30, 2015.

3. Egawa, T., A. Goto, Y. Ohno, S. Yokoyama, M. Suzuki-Takuwa, A. Ikuta, T. Hayashi, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, and K. Goto. Involvement of AMPK on hindlimb unloading-induced adaptation of muscle mass in mice. The 11th World Congress of the International Society for Adaptive Medicine. Yonago City, Japan, May 27-30, 2015.
4. Ohno, Y., Y. Matsuba, N. Hashimoto, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, and K. Goto. Suppression of myostatin facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in mice under unloading condition. The 11th World Congress of the International Society for Adaptive Medicine. Yonago City, Japan, May 27-30, 2015.
5. Goto, K., T. Sugiura, Y. Ohira, and T. Yoshioka. Expression level of importin and exportin of mouse skeletal muscle in response to unloading with or without reloading. 8th FAOPS (Federation of Asia and Oceania Physiological Society) Congress, Bangkok, Thailand, November 22-25, 2015.
6. 河野史倫、小野悠介、藤田諒、中田研、大平充宣、中井直也。再生筋におけるエピゲノム変化が過負荷による肥大応答性に及ぼす影響。第70回日本体力医学会大会 プログラム・予稿集, 和歌山県民文化会館, 9月18-20日, 2015.
7. 芝口翼、杉浦崇夫、吉原利典、内藤久士、後藤勝正、大平充宣、吉岡利忠。筋損傷後の異なる温度刺激の組み合わせが再生課程における筋衛星細胞の動態に及ぼす影響。第70回日本体力医学会大会 プログラム・予稿集, p. 290, 和歌山県民文化会館, 9月18-20日,

- 2015.
8. 杉浦崇夫、芝口翼、吉原利典、内藤久士、後藤勝正、大平充宣、吉岡利忠。筋損傷後のアイシングと温熱刺激の組み合わせが回復過程におけるミオシン重鎖分子種に及ぼす影響。第70回日本体力医学会大会 プログラム・予稿集, p. 290, 和歌山県民文化会館, 9月18-20日, 2015.
 9. 横山真吾、大野善隆、江川達郎、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、後藤勝正。熱ショック転写因子1はmicroRNAを介した遅筋型ミオシン重鎖発現を抑制する。第70回日本体力医学会大会 プログラム・予稿集, p. 295, 和歌山県民文化会館, 9月18-20日, 2015.
 10. 大野善隆、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、後藤勝正。乳酸が培養骨格筋細胞の分化に及ぼす影響。第70回日本体力医学会大会 プログラム・予稿集, p. 297, 和歌山県民文化会館, 9月18-20日, 2015.
 11. 伊藤理香、横山真吾、大野善隆、江川達郎、宅和美穂、生田旭洋、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、後藤勝正。骨格筋細胞の分化におけるアディポネクチン-アディポネクチン受容体1シグナルの関与。第70回日本体力医学会大会 プログラム・予稿集, p. 297, 和歌山県民文化会館, 9月18-20日, 2015. 他2件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：
 [その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 充宣 (OHIRA Yoshinobu)
 同志社大学・スポーツ健康科学部・
 教授

研究者番号：50185378

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：