

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13192

研究課題名(和文) 骨格筋肥大効果を最大限に引き出すサーカディアンリズム

研究課題名(英文) Exercise time and circadian rhythm may impact maximal skeletal muscle hypertrophy

研究代表者

張 碩文(CHANG, SHUOWEN)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・博士研究員

研究者番号：20783913

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)：本研究は、運動を実施するタイミングの違いが骨格筋の適応(筋の肥大)に与える影響について検討した。一過性伸張性運動直後のラットヒラメ筋における筋タンパク質合成に関わるp70S6Kリン酸化率は、活動期と比較して非活動期において高値を示した。さらに、8週間の伸張性運動トレーニングを実施した結果、ヒラメ筋に対する筋肥大効果(筋サイズ・筋重量の増加)は、非活動期において有意に高かった。これらの効果の違いには、グルココルチコイド受容体を介したp70S6Kのリン酸化制御機構が関与している可能性が考えられる。これは、骨格筋には運動刺激を受けて肥大が生じやすい時間帯が存在する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨格筋の肥大に関わる細胞内シグナル伝達の活性化には、筋組織特異的なサーカディアンリズムが関与しており、同一の運動を実施しても、その時間帯によって獲得できる効果が異なることを示唆するものである。これらの成果は、競技力の向上やリハビリテーションの領域において、トレーニング効果を最大限に発揮するための最適な運動プログラムの立案に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine whether exercise at different times of the day influences skeletal muscle hypertrophy in rats. Our data revealed that activation of p70S6K immediately after eccentric-exercise was higher in the inactive phases than in the active phases. Moreover, the training effect (muscle hypertrophy) in response to 8 weeks of eccentric-training was significantly higher in the inactive phase than that found in the active phases. Although the specific mechanism associated with the differential effects of exercising at different times of the day is still unclear, we suggest that it may be mediated by the regulation of p70S6K phosphorylation via the glucocorticoid receptor. Our data demonstrated that eccentric-exercise at different times of day may affect the degree of muscle hypertrophy. This is a novel insight that may point to a potential influence of circadian rhythms in determining exercise effectiveness for gaining muscle mass and size.

研究分野：運動生理学

キーワード：サーカディアンリズム 筋肥大 筋タンパク質 トレーニング ホルモン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古くから、生体の体温調節、血圧制御およびホルモン分泌には概日リズム（サーカディアンリズム）が存在し、各種臓器には一日の中で一番良く活性化する時間帯があることが知られている。例えば、時間薬理学的な研究では、治療薬を服用する時間帯によって治療効果や有害反応が異なる、つまり服薬には治療薬の効果を最大限に発揮するための適したタイミングが存在するということが示されている。また、このようなサーカディアンリズムの調節には、組織特異的な時計遺伝子が関与していることが明らかにされてきており、骨格筋組織においてもこの時計遺伝子が細胞の成長および増殖を制御していることが報告されている。したがって、骨格筋にも運動刺激を受けて肥大や萎縮などの適応が生じやすい時間帯が存在する可能性があると考えられるが、そのことについてはまだ明らかにされていない。

ところで、レジスタンストレーニングによる骨格筋への過負荷は、筋力の増加や筋線維の肥大をもたらすことが知られている。特に、筋損傷が引き起こされるような伸張性運動（伸張性収縮）は筋肥大に有効であることが明らかにされている。また、トレーニング条件の違いは、タンパク質の合成に関わる筋細胞内シグナル伝達経路である mammalian target of rapamycin (mTOR) 系を介して筋肥大に多大な影響を与えることが報告されている。このように、運動の強度、時間または頻度の違いは、骨格筋肥大の程度に影響を与えることが明らかにされてきているが、運動・トレーニングを行う時間帯の違いによってその効果が異なるか否かについては明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、運動を実施するタイミングの違いがラット骨格筋の適応（筋の肥大）に影響を与えるか否かについて、組織および分子レベルで明らかにすることを目的として行った。

研究期間中には、以下の3つの観点から検討を行った。

(1) 一過性の伸張性運動を実施するタイミングの違いにより mTOR シグナル伝達系の活性化に与える影響が異なるか否かについて分子レベルの検討を行った。

(2) 長期間の伸張性運動トレーニングによるラット骨格筋の肥大効果は、運動実施のタイミングにより異なるか否かについて組織レベルでの検討を行った。

(3) 運動を実施するタイミングの違いは、どのような因子を介して mTOR シグナル伝達系に影響を与えるのかについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 研究課題 1 および 2

一過性および長期間の伸張性運動を異なる時間帯に実施し、筋肥大に関わる細胞内シグナル伝達である mTOR シグナル伝達系の応答および骨格筋肥大に与える影響を明らかにすることを目的として以下のような実験を実施した。

①研究課題 1: 異なるタイミングに実施する一過性の伸張性運動が mTOR シグナル伝達の活性化に与える影響の検討

若齢の Wistar 系雄ラットを、筋タンパク質合成に関わる p70S6K のリン酸化率が最高値（非活動期・明期）または最低値（活動期・暗期）を示した2つのタイミングに分け、それぞれ運動前、運動直後および1時間後の3群に分類し、ダウンヒル走行による一過性の伸張性運動を行わせた。一過性の伸張性運動は、動物用トレッドミル（傾斜角度-16°）を用いて、16 m/分で15分間実施した。運動前、運動直後および運動1時間後に速やかにヒラメ筋を摘出し、得られた筋サンプルを用いて生化学的な分析を行った。具体的には、筋サンプルからタンパク質を抽出し、筋肥大に関わる細胞内シグナル伝達物質である mTOR、p70S6K ならびに ERK 等の発現量およびリン酸化率を、ウェスタンブロット法により定量化した。

②研究課題 2: 異なるタイミングに実施する運動が、伸張性運動トレーニング後における筋表現型に与える影響の検討

研究課題 1 の結果、運動を実施するタイミングの違いによって p70S6K リン酸化応答に差異が認められたため、8週間の伸張性トレーニングを実施し、筋重量および筋横断面積などの筋表現型について評価した。具体的には、若齢の Wistar 系雄ラットを、同様に非活動期（明期）および活動期（暗期）に分け、それぞれ安静群およびトレーニング群に分類した。トレーニング群は、研究課題 1 と同様に傾斜角度-16°の動物用トレッドミルを用い、16 m/分で90分間、3日に1回の頻度で8週間（計20回）、ダウンヒル走行を実施させた。最後に実施したトレーニングの2日後、12時間の絶食条件で全てのラットからヒラメ筋を摘出し、筋湿重量測定後、組織学的分析を行うために急速凍結させた。ヘマトキシリン・エオジン染色により得られた画像から、イメージ解析システム (ImageJ) を用いて、200-250本のヒラメ筋線維断面積を測定した。

(2) 研究課題 3

一過性の伸張性運動を実施するタイミングの違いが、どのような因子を介して筋肥大に関わるシグナル伝達の応答に影響を与えるのか明らかにするために、mTOR シグナル伝達系の調節に関わるホルモンの働きについて検討した。

非活動期（明期）の一過性伸張性運動前に活動期（暗期）と同等の濃度になるようにコルチコステロンを投与することで筋肥大に関わる細胞内シグナル伝達の変化について検討を行った。若齢の Wistar 系雄性ラットを用い、対照群（生理食塩水投与）およびコルチコステロン投与群（コルチコステロン 3 mg/kg 投与）に分けた。研究課題 1 と同様に、それぞれ運動前、運動直後、運動 1 時間後 3 つの条件でヒラメ筋を摘出した。得られた筋サンプルを用いて、mTOR シグナル伝達系に関わるシグナル伝達物質のリン酸化率を評価した。また、生理食塩水またはコルチコステロンの投与前および投与 30 分後に尾部から採血し、コルチコステロン EIA キットを用いて、血中コルチコステロン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 研究課題 1 および 2

一過性の伸張性運動直後において、mTOR のリン酸化率には有意な交互作用が認められなかったが、運動および明暗条件に有意な主効果が認められた。また、p70S6K のリン酸化率には、有意な交互作用（明暗条件×運動）が認められ、非活動期における運動直後の p70S6K リン酸化率は、活動期の運動直後と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$, +42.6%)。ERK のリン酸化率には、運動による有意な主効果が認められたが、有意な交互作用は認められなかった。このことから、一過性の伸張性運動を行うタイミングの違いにより、タンパク質合成に関わる p70S6K の活性化の程度が異なる可能性がある。

さらに、8 週間の伸張性トレーニング後のヒラメ筋重量、相対筋重量および筋線維横断面積には、明暗条件×トレーニングの有意な交互作用が認められた。非活動期トレーニング群の筋重量および相対筋重量は、活動期トレーニング群と比較して有意に高く ($p < 0.05$, +12.8%、+9.4%)、筋線維横断面積は、非活動期トレーニング群でのみ有意に増加した ($p < 0.05$, +17.9%、vs 非活動期安静群)。一方、トレーニング後のいずれの群においても mTOR、p70S6K、ERK のリン酸化率には群間で有意な差は認められなかった。

以上のことから、伸張性運動を行うタイミングの違いは、p70S6K の活性化の程度に影響を与え、8 週間のトレーニング後の筋肥大の程度に差が生じた可能性が示唆される。

(2) 研究課題 3

コルチコステロン投与 30 分後の血中コルチコステロン濃度の変化は、対照群（生理食塩水投与）と比較して有意に高値 ($p < 0.05$, +17.5%) を示した。コルチコステロン投与群の運動前のグルココルチコイド受容体 (GR) の発現レベルは、対照群と比較して高い傾向を示した。一過性の伸張性運動直後において、mTOR のリン酸化率には有意な交互作用が認められなかったが、p70S6K のリン酸化率には、有意な交互作用が認められ、コルチコステロン投与により運動直後の p70S6K 活性化は有意に低下した ($p < 0.05$, -20.0%)。ERK のリン酸化率には、交互作用は認められず、両群において運動による有意な増加が認められた。これらのことから、生体内コルチコステロン濃度が高い状態である暗期（活動期）は、運動による p70S6K の活性化が軽減される可能性があり、そこには GR を介した p70S6K の負の制御機構が関与している可能性が考えられる。

(3) 今後の展望

本研究の基礎的な研究結果から、運動を実施する時間帯の違いは、筋肥大に関わる細胞内シグナル伝達応答に影響を与え、その結果、同様のトレーニングを実施しても骨格筋肥大の程度が異なる可能性が示唆される。このことから、限られた時間の中でトレーニングの効果を最大限に得るためには、運動強度や時間、頻度のみならず、運動を実施するタイミング、すなわちサーカディアンリズムを考慮したトレーニングプログラムを立案する必要性が指摘される。しかしながら、筋肥大の程度に差が生じる分子カニズムは未だ不明な点が多いため、筋組織特異的な時計遺伝子の発現調節機構に着目したエビデンスの蓄積を進めるとともに、人を対象とした研究への応用を目指して研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① [Chang, S. W.](#), Yoshihara, T., Machida, S., & Naito, H. (2017). Circadian rhythm of intracellular protein synthesis signaling in rat cardiac and skeletal muscles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 153-158.

[学会発表] (計 17 件)

① [張碩文](#), 吉原利典, 都築孝允, 町田修一, 内藤久士. 伸張性トレーニングを行うタイミングの

違いがラット骨格筋の肥大に及ぼす影響. 第 73 回日本体力医学会大会, アオッサ・ハピリン, 福井, 2018 年 9 月.

②張碩文, 吉原利典, 町田修一, 内藤久士. 一過性の伸張性運動を行うタイミングの違いがラットヒラメ筋の時計遺伝子発現に及ぼす影響. 第 72 回日本体力医学会大会, 松山大学文京キャンパス, 愛媛, 2017 年 9 月.

③張碩文, 吉原利典, 高嶺由梨, 内藤久士. 一過性の伸張性運動を行うタイミングの違いが mTOR シグナル伝達に及ぼす影響. 第 71 回日本体力医学会大会, いわて県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール, 岩手, 2016 年 9 月.

④張碩文, 吉原利典, 高嶺由梨, 町田修一, 内藤久士. 筋萎縮からの回復期における運動実施のタイミングの違いが細胞内シグナル伝達に及ぼす影響. 第 70 回日本体力医学会大会, 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国, 和歌山, 2015 年 9 月.

⑤張碩文, 吉原利典, 高嶺由梨, 町田修一, 内藤久士. 概日リズムによるラット骨格筋における細胞内シグナル伝達の変化. 第 23 回日本運動生理学会大会, 日本体育大学, 東京, 2015 年 7 月.

[図書] (計 1 件)

①張碩文, 陳耀宏: 高中體育(第九章桌球). 台北市: 美新圖書公司, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名: 張 碩文

ローマ字氏名: CHANG, Shuowen

所属研究機関名: 順天堂大学

部局名: スポーツ健康科学部

職名: 博士研究員

研究者番号 (8 桁): 20783913

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 内藤 久士

ローマ字氏名: NATIO, Hisashi

研究協力者氏名: 吉原 利典

ローマ字氏名: YOSHIHARA, Toshinori

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。