

機関番号：32651
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500470
 研究課題名(和文) 高齢期の長期臥床に伴う筋萎縮とリハビリテーションによる軽減効果の機序解明
 研究課題名(英文) Mechanisms on muscle atrophy by long-term bed rest with or without rehabilitation on in old age
 研究代表者
 山内 秀樹(YAMAUCHI HIDEKI)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60220224

研究成果の概要(和文)：安静臥床など身体不活動による速筋化と筋萎縮を効果的に軽減する運動条件確立のために、若年、壮年、老年期において、臥床期間中に実施した低強度持続的ならびに高強度間欠的荷重負荷の効果を比較した。結果として、速筋、遅筋ともに臥床による筋萎縮は加齢に伴い顕著になるが、速筋化しにくくなることが示された。すべての加齢段階において、遅筋では荷重負荷による筋萎縮軽減効果に荷重条件の影響はみられなかったが、速筋では低強度持続的負荷に比べて高強度間欠的負荷で筋萎縮軽減効果が高かった。

研究成果の概要(英文)：For establishment of effective exercise conditions to reduce muscle atrophy with shifts to the faster characteristics by the physical inactivity, we examined the effects of continuous exercise with low load and intermittent exercise with high load that carried out during bed rest in young, middle, and old age. As a result, in both fast- and slow-twitch muscle, the muscle atrophy by bed rest became remarkable, but shifts to the faster characteristics became less with aging. Inhibitory effects was similar between both exercise regimens in the slow-twitch muscle in all aging stages, but reduction effect on an muscle atrophy was higher with intermittent exercise with high load than continuous exercise with low load in the fast-twitch muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：加齢，安静臥床，筋萎縮，筋変性，リハビリテーション，速筋化

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来で健康長寿を全うすることは、充実した活動的な日常生活の確保にとどまらず、要介護高齢者や寝たきりの軽減、医療費の削減という社会的貢献にもつながる

と考えられる。中・高齢者では病床の安静臥床を余儀なくされるケースが増加することから、臥床期間中に低下した体力を早期に回復させることが健康体力を維持する上で重要なポイントとなる。しかし、臥床期間中に効果

的に体力低下を防ぐ、あるいは回復期に効果的に体力を改善する方法に関する明確な解答は得られていない。この疑問に対する解答こそが健康長寿を達成する一つの手段であり、早期解明が急務であると考えられる。

安静臥床による身体不活動などにより骨格筋は速筋化を伴い萎縮する。この速筋化と萎縮は再荷重により回復するが、高齢期での機能回復は遷延する。臥床期間において『いかに筋萎縮を軽減するか』は再荷重後の筋機能の早期回復を促す予防的な手段となる。先行研究では、臥床による筋萎縮や速筋化に対して、筋に対して抵抗負荷を加えることが短時間で効果的に萎縮を抑制可能であることがヒトのベッドレスト実験や動物の尾部懸垂実験で報告されている。しかしながら、これらは若齢期を対象とした研究であり、高齢期における検討は不足しているのが現状である。

2. 研究の目的

近年の分子細胞生物学的研究の進歩により、骨格筋の多様な機能特性を調節する細胞内情報伝達系が解明されつつある。筋量調節に重要な役割を演じている候補としては、Akt-mTOR経路やユビキチンプロテアソーム経路が有力であり、補助的役割として熱ショックタンパク質 (HSP) があげられる。筋線維タイプの調節因子としては、カルシニューリンを介した活性化T細胞核内因子や筋細胞増殖因子などの核内転写因子やペルオキシソーム増殖活性化受容体 γ 補助因子 (PGC-1) が候補としてあげられている。

抵抗運動では筋に対する抵抗負荷強度を高めることが筋肥大やタイプ変化に重要な要因となるが、高齢期においては血圧上昇に伴う血管系への危険も含んでいるため、廃用性変化を軽減する上で効果的であり、かつ安全に実施できる運動条件の確立が望まれる。しかしながら、骨格筋の廃用性変化に対する運動

の介入効果を前述した細胞内情報伝達系の変化から検討した報告は少なく、さらに高齢期における検討はほとんどみられない。

そこで本研究では、安静臥床など身体不活動による速筋化を伴う筋萎縮を効果的に軽減する運動条件をとくに運動強度に焦点を当てて検討すること、また、筋萎縮と速筋化を調節する細胞内情報伝達系のタンパク質発現の変化を調べ、運動の介入効果の機序の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

これまでのラットを用いた加齢に関する研究ではF334系統が頻用されてきた。しかし、この系統はサルコペニアや収縮・弛緩速度の低下など骨格筋の加齢性変化を呈する以前に死亡するケースが多く、問題視されていた。近年、この問題をクリアしたF344×Brown Norway Hybrid系統が確立され、加齢研究の対象動物として広く使用されるに至っている。

このような経緯を踏まえ、申請時当初、ヒト骨格筋の加齢性変化と同様な表現型を示すF344×Brown Norway Hybrid ratを用いた基礎実験を実施する計画であったが、輸出規制のため研究対象の変更を余儀なくされた。したがって、本研究ではF344系雌ラットを用いた。実験1は「安静臥床による筋萎縮と速筋化に対する低強度持続的荷重負荷の効果：若年、壮年、老年期における比較」、実験2は「安静臥床による筋萎縮と速筋化に対する高強度間欠的荷重負荷の効果：若年、老年期における比較」とした。安静臥床状態は尾部懸垂法により作成し、いずれの実験においても3週間とした。

(2) 実験条件

実験1は4, 10, 20ヶ月齢F344系雌ラットを対象とした。各月齢で対照群、尾部懸垂群、尾部懸垂+荷重負荷群の3群にグルーピング

した。被検筋は姿勢調節や抗重力活動など基本動作の発現に重要な遅筋のヒラメ筋と、ヒラメ筋と同様に足関節底屈運動に関わる速筋の足底筋とした。荷重負荷は1日1回、30分間の運動を週6日の頻度で実施した。荷重負荷時にはラットの尾部に体重の30%相当の錘を付けた(下図参照)。



実験2は4, 24ヶ月齢F344系雌ラットを対象とした。各月齢で対照群, 尾部懸垂群, 尾部懸垂+荷重負荷群の3群にグルーピングした。被検筋は外側腓腹筋とした。外側腓腹筋は全体としては速筋であるが, 深層部にはヒラメ筋と同様のtype I 線維とtype II a線維で構成される領域があり, 表層部はtype II xとtype II b線維で構成される。部位別に検討することにより同一筋内でタイプ別の特徴を検討することが可能であると考えたため, 外側腓腹筋を被検筋とした。荷重負荷は1回10分間の運動を4時間ごとに1日3回, 毎日実施した。荷重負荷時には体重の50~70%相当の錘を尾部に着けた。

(3) 測定項目

実験1では被検筋の湿重量, 最大筋力, ミオシン重鎖 (MHC) 分子種組成, ミトコンドリア内酵素活性 (クエン酸シンターゼ, β -ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ) とHSP, ミオスタチン, PGC1, Akt, S6, カルシニューリン,

DSCR1, SirT1のタンパク質発現量を測定した。

実験2では被検筋の湿重量, 深層部と表層部における筋線維サイズの測定, 筋変性所見の免疫組織学的観察, HSP, ミオスタチン, PGC1 α , Aktのタンパク質発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 実験1: 低強度持続的荷重負荷の効果

① ヒラメ筋の変化

3週間の臥床による筋萎縮は若年期に比べ壮年期, 老年期で顕著であった。低強度荷重負荷はいずれの加齢段階においても筋萎縮を軽減したが, その効果は若年期>壮年期>老年期であり, 荷重負荷による筋萎縮軽減効果が加齢に伴い低下する傾向が認められた。MHC分子種組成に関して, 若年期では臥床によりtype I 比率の減少とtype II xとtype II bの増加を認めた。壮年期ではtype I 比率の低下はみられなかったが, type II xとtype II b比率の増加を認めた。老年期においてもtype I 比率の低下はみられず, type II xの増加を認めたが, type II bは検出されなかった。したがって, 臥床によるMHC重鎖分子種組成からみた速筋化の程度は加齢に伴い減少することが明らかとなった。荷重負荷は若年期においてtype II xとtype II b比率の増加を軽減したが, type I 比率の増加を軽減することはなかった。壮年期と老年期では荷重負荷による軽減効果は認められなかった。

筋量調節に関与するタンパク質の発現量を解析したところ, いずれの加齢段階においても, 臥床によりHSP72と α Bクリスタリンの発現量の低下, 筋肥大抑制因子であるミオスタチンの発現量増加, タンパク質の合成促進と分解抑制に関与するAktの活性 (総Aktに対するリン酸化型Aktの比率) 低下がみられた。臥床期間中の荷重負荷は臥床に伴うHSPの発現低下とミオスタチンの発現増大を抑制したが, Akt活性の低下を抑制することはでき

なかった。興味深いことに、臥床によるミオスタチンの発現増大は若年期に比べて壮年期、老年期で大きかった。また、ミオスタチンの発現増大に対する荷重負荷の抑制効果は若年期に比べて壮年期や老年期では低かった。

以上の結果から、筋肥大抑制因子のミオスタチンが臥床による筋萎縮や荷重効果の加齢差に関与している可能性が示唆された。

②足底筋の変化

臥床による最大張力の低下率は加齢に伴い増加した。臥床はいずれの加齢段階においてもtype IIb比率を増加させたが、その増加の程度は加齢に伴い低下した。また、臥床によるtype I 比率の低下は若年期においてのみ認められた。若年、壮年期では臥床によるクエン酸シンターゼと β -ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼの活性低下がみられたが、老年期では低下がみられなかった。これらの結果から、臥床による速筋化の程度はヒラメ筋と同様、加齢に伴い低下することが明らかになった。

いずれの加齢段階においても、最大張力の低下に対する荷重負荷の軽減効果はほぼ同程度(50-60%)であった。荷重負荷はMHC分子種組成の変化に対して軽減効果を示したが、酵素活性の低下に対する軽減効果は認められなかった。また、荷重負荷のMHC分子種組成の速筋化軽減効果は加齢に伴い低下する傾向がみられた。

いずれの加齢段階においても、カルシニューリンの発現量は臥床により変化はみられなかったが、荷重負荷により増加した。カルシニューリンのフォスファターゼ活性調節タンパク質のDSCR1との比も同様な傾向を示した。定量したストレスタンパク質(HSP90, 72, 25)の中で、いずれの月齢においても臥床による低下と荷重負荷による保持効果が認められた

のはHSP25であった。PGC1 α タンパク質発現は若年、壮年期では臥床による低下がみられたが、老年期では変化がみられなかった。また、荷重負荷は若年、壮年期ではPGC1 α タンパク質発現の保持効果がみられた。SirT1とmyostatinのタンパク質発現量、AktならびにS6のリン酸化の程度に群間差はみられなかった。

以上の結果から、速筋においても臥床に伴う筋萎縮は加齢に伴い顕著になるが、速筋化しにくくなることが明らかとなった。荷重負荷の筋量保持や速筋化軽減効果にはカルシニューリンのタンパク質発現量高値、HSP、PGC1 α タンパク質の発現量保持が部分的に関係していると考えられた。さらに、1日30分間の低強度持続的荷重負荷は完全ではないが、筋萎縮と速筋化に軽減効果を示すことから安静臥床期の積極的なリハの重要性が示唆された。また、老年期では速筋化よりも筋萎縮の対策を重要視する必要性が考えられた。

(2)実験2:高強度間欠的荷重負荷の効果—外側腓腹筋の変化からの検討

臥床による筋重量の低下率は若年に比べて老年期で顕著であった。一方、臥床による筋線維サイズの低下率は表層部では加齢差がみられなかったが、深層部では予想外に老年期に比べて若年期で顕著であった。臥床に伴う筋線維の変性は筋の部位により種類や発生頻度に違いがみられた。深層部の筋線維では筋線維内部構造の乱れや封入体の出現を認めた。また、 α -アクチニン、ネブリンなどのタンパク質発現は強陽性ではあるが、線維内部分陰性反応も観察された。これらの筋線維では小径化が顕著であり、MAFbx-1やMuRF-1などのユビキチンリガーゼの発現増大を認めた。表層部ではtubular aggregates様の空胞を持つ筋線維を認めたものの、深層

部に比べ変性所見はわずかであった。このような筋線維の変性はいずれの部位においても若年期に比べて老年期で顕著であった。

臥床期間の高強度間欠的荷重負荷は臥床による筋重量や筋線維サイズの低下を軽減したが、その効果に加齢差はみられなかった。また、荷重負荷の介入は若年、老年期ともに筋線維の変性をほとんど抑制した。若年期、老年期ともに高強度間欠的荷重負荷は筋重量体重比を対照レベルに保持したことから、体重の低下を抑えることで筋萎縮の進行を効果的に抑制できる可能性が考えられた。Akt 活性（総 Akt に対するリン酸化 Akt の比率）、ミオスタチン、HSP25、PGC1 のタンパク質発現変化を調べたところ、筋線維の萎縮や変性に対する部位差、加齢差、再荷重の介入効果に部分的に関与している所見が認められた。

以上のことから、老年期では臥床による変性が顕著であること、1日30分間の再荷重の介入は筋線維の変性を抑制し、萎縮を軽減することが示唆された。また、実験1の研究結果との比較により、1日の荷重負荷時間が同じ場合、低強度持続的条件に比べて高強度間欠的条件の方がより効果的に筋萎縮を軽減できることが明らかにされた。

(3) 研究成果のまとめと今後の展望

本研究では臥床による筋萎縮の程度が加齢に伴い増加することが示された。この現象は遅筋に比べて速筋において顕著であった。つまり、老年期では臥床による非荷重要因に加えて、加齢性筋萎縮要因とストレス耐性の低下に伴うストレス性筋萎縮要因が筋萎縮に関与するものと推察された。加齢に伴い臥床による速筋化の程度が低下する結果は筋適応能力の低下を示唆している。荷重条件として低強度持続的負荷に比べて、高強度短時間間欠的負荷の有用性が示されたことはベ

ッドサイドドリハを実施する上での基礎的資料となり意義深いと考えられる。

本研究結果から臥床による筋萎縮や速筋化の加齢差と荷重効果の加齢差を裏付ける明確な機序を解明することはできなかったが、ミオスタチンやAkt経路、カルシニューリンやPGC1 α の部分的な関与が示された。

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)

[学会発表] (計5件)

- ① 山内秀樹他. 非荷重による速筋と遅筋の機能低下に及ぼす加齢と間欠的再荷重の影響. 第127回成医会総会. 2010年10月7日. 東京.
- ② 山内秀樹他. 尾部懸垂による筋萎縮と速筋化に及ぼす加齢と間欠的再荷重の影響. 第65回日本体力医学会大会. 2010年9月16日. 市川.
- ③ 山内秀樹他. 非荷重によって萎縮した若齢及び高齢ラット骨格筋のタンパク質発現の特徴と抵抗運動の介入効果. 第87回日本生理学会大会. 2010年5月20日. 盛岡.
- ④ 山内秀樹他. 尾部懸垂によるヒラメ筋の萎縮とmyostatinの発現増大に対する抵抗運動の抑制と加齢の影響. 第64回日本体力医学会大会. 2009年9月19日. 新潟.
- ⑤ 山内秀樹他. 高齢期の非荷重による骨格筋Akt活性の低下と抵抗運動の介入効果. 第46回日本リハビリテーション医学会大会. 2009年6月4日. 静岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 秀樹 (YAMAUCHI HIDEKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60220224