

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500618

研究課題名（和文）酸化ストレスは筋トレーニング及び筋不活動による骨格筋糖輸送適応を制御する

研究課題名（英文）Oxidative stress-regulated glucose transport in skeletal muscle from training and cast immobilization in mice

研究代表者

檜垣 靖樹 (HIGAKI YASUKI)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：10228702

研究成果の概要（和文）：骨格筋線維特性により異なるが、筋細胞には一酸化窒素合成酵素(NOS)の局在を認めることから、酸化ストレスの一つである NO が、骨格筋の糖輸送の制御を担っているとの仮説を立てた。そこで、我々はトレーニングモデル及び不活動モデルの作成に着手し、上記仮説を検証可能な実験系を立ち上げた。そして、糖輸送の制御に NOS がどのようなメカニズムを持って制御しているか、エピジェネティックな変化を想定して実験を進めた。その結果、NOS プロモータ領域の CpG アイランドのメチル化の定量が可能となり、条件間でメチル化の程度が異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rat skeletal muscle expresses NO synthase and that activity varies among several muscles. We hypothesized that NO as one of reactive oxygen intermediates modulates skeletal muscle glucose transport. First, we tried to make available methods for the model of training and inactivity in mice. Next, to determine if an epigenetic modification of NOS gene involves in mediating glucose transport in skeletal muscle, methylation of cytosines at CpG sites in promoter region of NOS gene was analyzed in these samples. Our results demonstrate that DNA methylation of the NOS promoter may be involved in the regulation of glucose metabolism in skeletal muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 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

科研ひの分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：一酸化窒素合成酵素

1. 研究開始当初の背景

骨格筋運動時に酸化ストレス状態へと導く活性酸素種に一酸化窒素 (NO: Nitric Oxide) と過酸化水素 (H_2O_2 : Hydrogen peroxide) が知られている。我々は、一過性の筋運動後に観察される糖取り込み亢進メ

カニズムに NO と H_2O_2 がそれぞれ独立のシグナル伝達系を介して重要な役割を果たすことを明らかにした (Higaki et al, 2008)。活性酸素種は、組織の障害や炎症を引き起こすことから悪役として考えられてきたが、筋運動で生じる NO と H_2O_2 がむしろ糖代謝の調節

役として機能しているという事実より、1) 長期間のトレーニングによる糖代謝機能の亢進、2) 筋不活動による糖代謝機能の低下について、活性酸素種が糖代謝関連遺伝子発現とタンパク合成を制御する一つの因子である、という作業仮説を着想するに至った。そこで、我々は、持久トレーニングおよび筋ギプス固定による不活動の動物モデル実験を行い、糖代謝制御機構について、その一役を担う一酸化窒素合成酵素の遺伝子修飾の関与を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、長期間のトレーニングによる糖代謝機能の亢進および筋不活動による糖代謝機能の減退について、まず両条件下で惹起される骨格筋適応現象を明らかにした上で、特に一酸化窒素合成酵素の遺伝子修飾の関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究1. 被験動物として、C57BL/6J マウス (10-11 週齢) を用いた。マウスは、対照脚群 (無処置、n=5) と固定脚群 (n=5) に分類した。ギプス固定は、マウスの片側後肢の下肢を最大底屈で1週間固定した。麻酔下にて、各群のヒラメ筋を摘出し、筋湿重量の計測を行った。摘出したヒラメ筋を、近位部 (膝関節より20%)、中央部 (50%)、遠位部 (80%) の各部位に切分け、凍結保存処理を施した。各部位の筋より、クリオスタットにより組織切片 (10 μ m) を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。染色された筋組織は、光学顕微鏡にて観察・撮影を行い、筋線維横断面積の定量を実施した。また、筋細胞の炎症についてもポイントカウンティング法より評価した。

研究2. C57BL/6J 雄性マウスを対象とした。マウスは、4週間の運動トレーニング (TR, n=10) 群とコントロール (C, n=10) 群の2群に分類し、日毎に体重、摂餌量、ホイール回転数を計測した。腹腔内糖負荷試験により耐糖能を評価した。運動期間終了から24時間後にヒラメ筋 (Sol1) 及び腸間膜脂肪を摘出した。不活動モデルマウスは、1週間の片側後肢ギプス固定 (I, n=11) 群、コントロール (C, n=6) 群の2群に分類した。ギプス固定期間終了後、Sol1を摘出し、組織化学染色法により骨格筋の萎縮レベルを評価した。摘出したSol1からDNAを抽出し、Bisulfite処理後、PCRによりDNA断片を増幅し、パイロシーケンス法を用いてDNAメチル化レベルを定量した。

4. 研究成果

研究1.

(1) 筋重量の評価

ギプス固定1週間後の体重あたりのヒラメ筋の筋重量は、固定脚群 (0.28 ± 0.04 mg/body weight) では、対照群 (0.36 ± 0.03 mg/body weight) と比較して有意な低下を示した ($p < 0.01$, Fig. 1)。

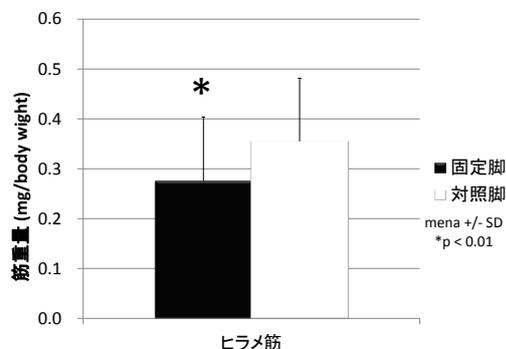


Fig. 1 ヒラメ筋の筋重量

(2) 筋線維法断面積

固定脚群の中央部における筋線維横断面積 (693 ± 182 μ m²) は、近位部 (1127 ± 336 μ m²)、遠位部 (1235 ± 300 μ m²) よりも減少した (Fig. 2)。

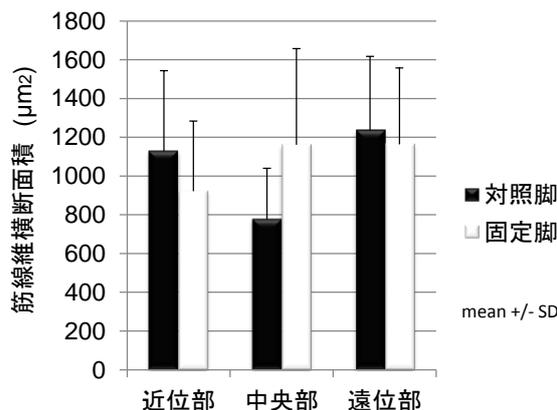


Fig. 2 各部位における筋線維横断面積

(3) 筋細胞の炎症評価

固定脚群において、筋細胞の炎症が観察された。定量した結果、固定脚群では $2.45 \pm 3.12\%$ の炎症応答を示したが、各部位における差異は見られなかった。

本研究の片脚ギプス固定モデルより、ヒラメ筋では、中央部が近位部、遠位部よりも著しい筋萎縮が惹起されることが明らかとなった。先行研究では、ラットの後肢懸垂モデルにおいて、中央部および遠位部の筋萎縮が有意であることが報告されているが、後肢懸垂モデルは、関節固定による負荷ではないため部位的差異の再現性が難しいことも指摘されていた。しかしながら、本研究は関節固定による不活動の誘発モデルであることか

ら、この結果は、筋萎縮が同一筋内において不均一に発生することを示唆する。筋萎縮の部位別な差異が発生する要因の一つとして、ギプス固定による機械的ストレスの減少が、不均一に負荷されるためではないかと考えられる。

研究 2.

TR 群における 4 週間の平均走行距離は、 5.6 ± 2.6 km / day であった。また C 群と TR 群において週齢に伴う体重の増加が認められたが、この変化に違いは認められなかった ($p < 0.05$)。総摂餌量は、C 群 (3.9 ± 0.2 g) と TR 群 (4.8 ± 0.7 g) の間で統計的に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。体重当たりの腸間膜脂肪重量は、C 群 (8.3 ± 1.7 mg / g) と TR 群 (6.3 ± 2.8 mg / g) との間で有意な差が認められた ($p < 0.05$)。腹腔内糖負荷 15 分後の血糖値は C 群 (278 ± 44 mg / dl) と比べ TR 群 (205 ± 65 mg / dl) において有意に減少した ($p < 0.05$) (Fig. 1)。不活動モデルにおける骨長当たりの筋重量は、C 群 (5.2 ± 0.6 mg / g) と比べ I 群 (3.5 ± 0.7 mg / g) は有意に低値を示した ($p < 0.01$)。組織化学的染色画像から得られた筋線維横断面積は、C ($1438 \pm 425 \mu\text{m}^2$) と比べ I 群 ($766 \pm 254 \mu\text{m}^2$) は有意に低値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 2)。nNOS の DNA プロモーター領域における 4 サイトの平均メチル化レベルは、C 群 ($76 \pm 8\%$) に比べ TR 群 ($67 \pm 2\%$) において有意に低値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

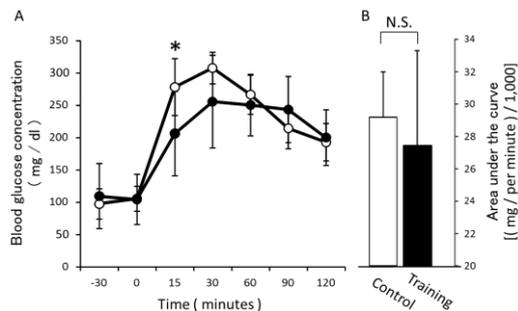


図 3. 腹腔内糖負荷試験の結果

● トレーニング群 ○ 対照群

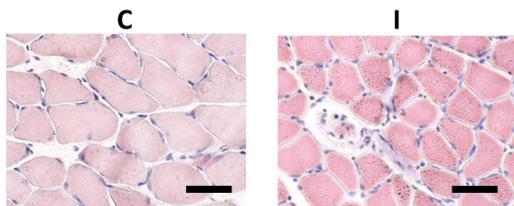


図 4. ギプス固定脚 (I) の筋炎症
C は対照脚を示す

これまでのトレーニング研究及び不活動研究より得られた骨格筋適応現象は、本研究の仮説を検証する上で有用なモデルとなった。次に、一酸化窒素合成酵素遺伝子のプロモーター領域にある CpG アイランドにおけるメチル化の定量実験を行った。実験当初は、パイロシーケンス法によるメチル化の定量性に関する我々の実験技術上の問題があり、かなりの時間を要したが、最近になってようやく定量可能でかつ再現性のあるデータが得られるようになった。予備データの域を出ないが、骨格筋一酸化窒素合成酵素のメチル化状態は、トレーニングにより異なる可能性を示唆する結果を得ている。例えば、低メチル化は転写活性を亢進し、タンパク合成のスイッチをオンにする役割を持つ。得られたデータをもとにタンパク量に変動が見られるとの仮説をたて検証を進めている。現在、精度よく定量できる実験条件が確立しつつあるが、確固たる実験データを提示するために、さらにデータの再現性チェックを行っている。今後、骨格筋の解析に加え、各臓器におけるメチル化レベルの比較も並行して進め、運動トレーニング適応に関する各臓器適応の特性を明らかにしていく実験へと展開する予定である。

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 3 件)

- ① 檜垣靖樹、メタボリック新とローム改善のための運動、心身医学、査読無、53 巻、2013、237-246
- ② 檜垣靖樹、運動処方の構成、日本臨床、査読無、67 巻、2009、363-369
- ③ 檜垣靖樹、高血圧、臨床スポーツ医学、査読無、26 巻、2009、130-137

[学会発表] (計 6 件)

- ① 富賀裕貴、津布子拓弥、江島弘晃、安藤創一、須藤みず紀、田中宏暁、檜垣靖樹、1 週間のマウス片脚ギプス固定誘発性筋萎縮は筋線維タイプにより異なる、第 67 回日本体力医学会大会、2012. 9. 14、岐阜市
- ② Tomiga Y, Tsubuko T, Eshima H, Ando S, Sudo M, Kiyonaga A, Tanaka H, Higaki Y, The skeletal muscle atrophy after unilateral hindlimb cast immobilization depends on fiber type.

1st PUSAN & FU Annual Conference,
2012. 8. 6, Korea

- ③ Sudo M, Tsubuko T, Tomiga Y, Eshima H, Ando S, Tanaka H, Higaki Y, Muscle atrophy occurs heterogeneously after cast immobilization in mouse soleus muscle. 17th Annual congress of ECSS, 2012. 7. 7. Belgium
- ④ 檜垣靖樹、生活習慣病と身体不活動－目覚めよ、運動感受性遺伝子－、平成23年度日本産業衛生学会九州地方会（招待講演）、2011. 7. 2、佐賀市
- ⑤ 富賀裕貴、須藤みず紀、安藤創一、江島弘晃、田中宏暁、檜垣靖樹、マウス片側後肢ギプス固定による筋萎縮モデル作成法、第66回日本体力医学会大会、2011. 9. 16、下関市
- ⑥ 檜垣靖樹、身体不活動(physical inactivity)と生活習慣病、第65回日本体力医学会大会、2010. 9. 18、市川市

[図書] (計3件)

- ① 檜垣靖樹、明和出版、スポーツ・運動生理学概説、2011、89-97
- ② 檜垣靖樹、大修館、ランニングリテラシー、2011、61-63, 66-69
- ③ 檜垣靖樹、朝倉書店、健康づくりトレーニングハンドブック、2010、29-33, 372-383

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜垣 靖樹 (HIGAKI YASUKI)
福岡大学・スポーツ科学部・教授
研究者番号：10228702

(2) 研究分担者

田中 宏暁 (TANAKA HIROAKI)
福岡大学・スポーツ科学部・教授
研究者番号：00078544

清永 明 (KIYONAGA AKIRA)
福岡大学・スポーツ科学部・教授
研究者番号：70177955

飛奈 卓郎 (TOBINA TAKURO)
長崎県立大学・看護栄養学部・講師
研究者番号：60509678

須藤 みず紀 (SUDO MIZUKI)
福岡大学・身体活動研究所・ポストドクター
研究者番号：10585186

安藤 創一 (ANDO SOICHI)
福岡大学・スポーツ科学部・助教
研究者番号：50535630