

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：43949

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500636

研究課題名(和文) 運動と積極的栄養摂取のコンビネーションによる筋萎縮対抗策の開発

研究課題名(英文) Combination of exercise and nutrition to counteract muscle atrophy

研究代表者

宮津 真寿美 (Inoue-Miyazu, Masumi)

愛知医療学院短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：50335056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動と栄養摂取を用いた筋萎縮対抗策の開発を目的とした。萎縮筋に対する一週間の運動は筋萎縮回復促進効果があり、筋線維あたりの筋核数が増えた。増殖核は筋細胞膜の外にあり、外来細胞の増殖が示唆された。また、運動と栄養の筋萎縮抑制メカニズム解明のため、骨格筋培養細胞を用い、電気刺激停止による廃用性筋萎縮モデルを作成した。この筋萎縮モデルで、筋収縮停止早期で、タンパク質合成と分解の両方が高まっており、タンパク質分解によるアミノ酸がタンパク質合成を高めている可能性があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We have developed an exercise- and nutrition-based program to treat muscle atrophy. The week-long exercise program was effective at promoting recovery from muscle atrophy and increasing the number of sarcolemmal nuclei in each muscle fiber. These proliferated nuclei were outside the sarcolemma, suggesting an increase in the number of extrinsic cells. We also used skeletal muscle cultured cells to develop a model of muscle atrophy caused by muscle underutilization. In this model, the electrical stimulation of muscle cells (which causes contraction) is interrupted, simulating muscle underutilization and causing cellular atrophy. The aim of the model is to elucidate a mechanism for inhibiting muscle atrophy through exercise and nutrition. The findings from our model of muscle atrophy showed that both proteosynthesis and proteolysis increase in the early stage of interrupted muscular contraction, suggesting that amino acids released by proteolysis may result in increased proteosynthesis.

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：リハビリテーション 栄養学 運動療法 筋萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

廃用や、疾病・加齢などによって骨格筋は萎縮する。骨格筋が萎縮すると筋力が低下し、身体活動に制限が生じ、健康寿命が縮小する。よって、筋萎縮に対抗するための効果的な方策を知ることは、リハビリテーション医療に携わる者にとって重要なことである。

骨格筋の筋線維の太さは、筋構成タンパク質の合成と分解のバランスで変わる。最近、分岐鎖アミノ酸が筋タンパク質の分解を抑制することや、分岐鎖アミノ酸の一種であるロイシンがタンパク質合成を促進する分子伝達経路を直接活性化することがわかってきた。アミノ酸の摂取が筋線維肥大や萎縮抑制を引き起こす可能性がある。

これらの知見を取り入れ、スポーツ選手などの身体トレーニングは、栄養摂取と合わせて行うと、より効果的であることが知られていて、すでに実践されている。特に、摂食のタイミングや、摂取する蛋白質・アミノ酸などの栄養素の組み合わせがトレーニング効果を高めることが、わかっている。しかし、萎縮筋への対抗策として運動と栄養摂取の組み合わせを検討した研究は、まだ少なく、効果があるのかどうかを含めて不明な点が多い。そこで、本研究は、より効果的な筋萎縮対抗策を開発するために、効果的な運動と栄養の組み合わせを明らかにすることを目的とする。

我々は、尾部懸垂により下肢筋に筋萎縮を起こしたマウスに対して、オペラント学習法を用いた立ち上がり運動を行わせると、普通に飼育するより下肢筋の筋萎縮の回復が早いことを明らかにしている。この運動による筋萎縮回復促進モデルに対して、運動と同時に積極的な栄養摂取を行うと、効果的な筋萎縮の対抗策としての運動と栄養の組み合わせが検討できると考えている。

## 2. 研究の目的

### (1) 運動による筋萎縮回復に効果的な摂食タイミング

運動による筋肥大効果を高める栄養摂取タイミングは、運動数時間後より運動直後が効果的であることが動物やヒトで示されている。前述したように、運動による筋萎縮回復促進モデルは、すでに確立しているので、運動と食事の時間を厳密に規定することで、筋萎縮に効果的な運動と摂食タイミングを明らかにする。

### (2) 運動による筋萎縮回復に効果的な摂取栄養素

運動トレーニング効果を高めるためには、摂取する栄養素をコントロールすると良いと考えられている。しかし、例えば、蛋白質単独より蛋白質と糖質とを組み合わせると効果的であるという報告がある一方、分岐鎖アミノ酸が効果的であるという報告もあり、はっきり結論づけられていない。我々は、こ

れらの報告を参考に、運動による筋萎縮回復促進に効果的な摂取栄養素や栄養素の組み合わせを明らかにする。

### (3) 運動による筋萎縮回復に摂食条件が効果を高める分子メカニズム

摂食のタイミングや摂取栄養素の違いが運動による筋萎縮回復効果を高める分子メカニズムは、不明である。筋蛋白質合成シグナル伝達系として、Akt mTOR S6kinase があるが、この S6kinase は、ロイシン摂取によって直接影響を受けることが知られている。よって、タイミングの良い摂食や効果的な栄養素が、これらの筋蛋白質合成シグナルに作用するのかもしれない。栄養摂取の違いによって、筋蛋白質の合成亢進や萎縮回復を促進する分子メカニズムの解明に展開する予定である。

## 3. 研究の方法

### (1) オペラント学習による立ち上がり運動と、筋萎縮からの回復

本研究では、ICR 雄性マウス(9 週齢)を対象とした。まず、オペラント学習法による立ち上がり運動の学習を行った。スピーカーとのライトからの3秒間の警告信号後、床面の金属製グリッドから電気刺激が発生するが、その電気刺激は側壁のスイッチレバーを押せば、終了するよう設定したオペラント学習用装置を用いた。これを繰り返し行くと、マウスは、警告信号後、電気刺激を受ける前に、スイッチレバー押すため、立ち上がり運動をするようになる。

立ち上がり運動学習後、1週間尾部懸垂によって後肢筋を萎縮させる。その後、すでに学習した立ち上がり運動を、1セット25回を4セット、1日1回、1週間行った。

検出した下肢筋は立ち上がり運動に重要なヒラメ筋とした。ヒラメ筋を取り出し、凍結横断切片を作成し、筋線維断面積、筋線維数、核数を組織学的に検討した。

### (2) 立ち上がり運動による筋萎縮回復における筋核増加

立ち上がり運動による萎縮筋の核増加のメカニズムを検討するため、EdUを用いて増殖核を検出し、その局在を、dystrophin染色にて検討した。

### (3) 培養細胞を用いた廃用性筋萎縮モデルの作成と、タンパク質合成分解シグナル

ニワトリ胚由来の筋管細胞に、電気刺激(筋収縮)を2日間与えたのち、電気刺激を停止する(不活動状態)ことで、廃用性筋萎縮モデルを作製した。このモデルを用いて、蛋白質合成シグナルの指標となるAktの活性と、蛋白質分解シグナルであるユビキチン系とオートファジー系の活性を生化学的に調べた。また、SunSET法を用いて、新生蛋白質

量を計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 運動による筋萎縮からの回復促進

尾部懸垂によって萎縮した下肢筋に、立ち上がり運動を1週間行くと、運動を行わなかった群と比べて、筋線維断面積は大きかったが、筋線維数は変わらなかった。この時、筋線維あたりの筋核数は2倍近く多かった(図1)。一般に、筋線維面積当たりの筋核は一定であるとされている。萎縮筋に運動を行うと、1週間で筋線維断面積が大きくなるとともに、筋核の数も多くなることがわかった。

##### (2) 運動による萎縮筋の筋核増加

萎縮筋に立ち上がり運動を行うと、筋核の増加がみられる。増殖核を示すEdU陽性核は、立ち上がり運動の1、2日後増加する。その増殖核の局在を、dystrophin染色で観察したところ、運動1日目では、筋細胞膜の外に多かったが、運動2日目には、筋細胞膜の内側にある増殖核の割合が急激に増えることがわかった(図2)。これは、萎縮筋において、運動すると、外来細胞の細胞核が増殖し、既存の筋線維に融合して、筋核が増加している可能性がある。萎縮筋に対する運動の効果のメカニズムの一端を示していると考えている。

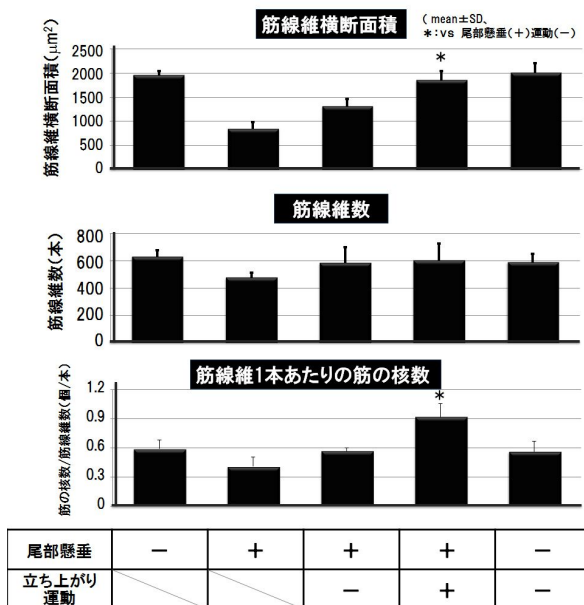


図1. 尾部懸垂による萎縮筋に立ち上がり運動を1週間行った時の筋線維断面積と筋線維数、筋線維あたりの筋核数

下の表は、横軸で示す群の条件を示す。尾部懸垂によって、ヒラメ筋の筋線維断面積は減少するが、立ち上がり運動すると、運動しない群と比べて有意に大きかった。この時、筋線維あたりの筋核も有意に多かった。

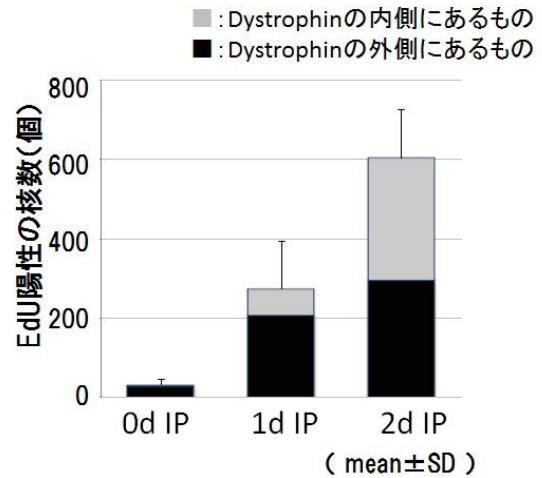


図2. 萎縮筋に対する運動と、増殖核の局在。0d、1d、2dは、それぞれ運動0、1、2日後。

##### (3) 廃用性筋萎縮モデルの作成と、不活動早期のタンパク質合成と分解

電気刺激を与えていた筋管細胞に、電気刺激を停止する(不活動状態)と、48時間後、筋管細胞の横径が減少した。これを廃用性筋萎縮の培養モデルとした(図3)。

このモデルを用いて、タンパク質合成シグナルであるAktの活性を調べたところ低下していた。また、タンパク質分解シグナルであるユビキチン系とオートファジー系を調べたところ、どちらも活性が上昇していた。

ところが、電気刺激停止1時間後では、新生タンパク質の量が増加していた。近年、アミノ酸がタンパク質の合成経路を直接活性化することが明らかになっている。よって、不活動1時間では、タンパク質分解によって増加したアミノ酸が、タンパク質新生を促進させた可能性があり、短時間の不活動は蛋白質の代謝回転・リニューアルに重要かもしれない。

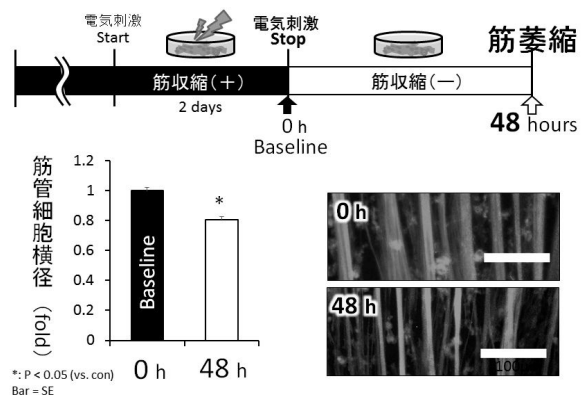


図3. 廃用性筋萎縮培養モデルの作成。電気刺激を2日間行ったあと、電気刺激を停止すると、筋管細胞の横径が有意に減少する。

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)

Murakami, T. and Yoshinaga, Induction of amino acid transporters expression by endurance exercise in rat skeletal muscle., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、439、2013、449-452  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.094.

Taro Murakami, Regulatory mechanisms for blunting protein synthesis in working skeletal muscle, *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 査読有、Vol.1、No.1、2012、pp.163-166  
[http://www.jspfsm.umin.ne.jp/journal/contents\\_and\\_abstracts.pdf](http://www.jspfsm.umin.ne.jp/journal/contents_and_abstracts.pdf)

[学会発表](計12件)

吉岡潔志, 黒木優子, 笹井宣昌, 早川公英, 村上太郎, 宮津真寿美, 河上敬介、短時間の筋収縮停止はタンパク質分解とともに筋収縮構成タンパク質の合成を亢進させる-ニワトリ胚由来の培養系筋萎縮モデルを用いて-、第49回日本理学療法学会、2014年5月30日~6月1日、横浜

吉岡潔志, 黒木優子, 笹井宣昌, 早川公英, 村上太郎, 宮津真寿美, 河上敬介、オートファジーによる蛋白質分解は、筋収縮減少の数時間後に起こる蛋白質合成の促進に関与しない-ニワトリ胚由来の培養系筋萎縮モデルを用いて-、第49回日本理学療法学会、2014年5月30日~6月1日、横浜

伊東佑太, 吉岡潔志, 森友洋, 縣信秀, 木村菜穂子, 宮津真寿美, 河上敬介、筋萎縮からの回復促進効果と筋収縮負荷量との関係、第3回日本基礎理学療法学会学術集会、2013年10月27日、名古屋

Kurogi Y., Yoshioka K., Sasai N., Hayakawa K., Murakami T., Inoue-Miyazu M., Kawakami K., The autophagy system is activated in early stages of unloading-induced muscle atrophy in culture model., *The 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress*, 2013年9月8日、Taiwan

Yoshioka K., Kurogi Y., Sasai N., Hayakawa K., Murakami T., Inoue-Miyazu M., Kawakami K. Unloading-induced muscle atrophy in culture model is mediated by ubiquitin-proteasome system., *The 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress*, 2013年9月8日、Taiwan

村上太郎、ロイシンが運動による筋損傷の

予防や筋損傷からの回復に作用する可能性、第39回日本整形外科学会スポーツ医学学術集会、2013年9月13日~14日、名古屋

Murakami, T., Ishiguro, N., and Yoshinaga, M., Inactivity suppresses the expression of amino acid transporters in rat skeletal muscle., *Experimental Biology*, 2013年04月20日~2013年04月24日、Boston, USA

伊東 佑太, 藤田 佳菜子, 縣 信秀, 宮津 真寿美, 平野 孝行, 河上 敬介、筋力増強運動による萎縮筋の筋線維核数増加の時期や量、第47回日本理学療法学会2012年05月25日~27日、神戸市

Taro Murakami, Kazuya Hasegawa, and Mariko, Exercise downregulates mTORC1 pathway through REDD1 expression in rat skeletal muscle., 8th international congress of Comparative Physiology and Biochemistry, June 1, 2011, Nagoya, Japan

伊東佑太, 岡元信弥, 縣信秀, 宮津真寿美, 平野孝行, 河上敬介、筋力増強運動の期間が萎縮筋の筋線維の太さや数、筋核数に与える影響、第46回日本理学療法学会、2011/5/28、宮崎

Itoh Y., Agata N., Inoue-Miyazu M., Hirano T., Kawakami K. Myonuclei increase through resistance exercises on mouse skeletal muscle that underwent muscle atrophy., 16th World Confederation for Physical Therapy, 平成23年6月23日、Amsterdam

Sasai N., Agata N., Inoue-Miyazu M., Kawakami K., Sokabe M., Hayakawa K. Association between PI3K/Akt/TOR pathway and stretch-induced hypertrophy in primary cultured chick myotubes., 8th international congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 平成23年6月1日~4日、Nagoya

[図書](計2件)

望月久(編) 山田茂(編) 宮津真寿美(著) 他15名、ナップ、筋機能改善の理学療法とそのメカニズム第3版、2014、376(226-246)

下村吉治、松尾達博、北浦靖之、岡村浩嗣、石原健吾、長澤純一、村上太郎、早川享志、中井直也、ナップ、サプリメントのほんとう、2013、168(136-138)

[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

宮津 真寿美 (INOUE-MIYAZU Masumi)  
愛知医療学院短期大学・准教授  
研究者番号：50335056

##### (2) 研究分担者

村上 太郎 (MURAKAMI Taro)  
研究者番号：10252305

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：