

令和元年6月11日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01725

研究課題名(和文) 筋萎縮の回復期におけるクレンブテロール投与の有効性に関する研究

研究課題名(英文) Study on the accelerative effect of clenbuterol on recovery after muscle atrophy

研究代表者

鈴木 英樹 (Suzuki, Hideki)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40235990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2アゴニストのクレンブテロールは骨格筋のタンパク合成を高め、タンパク分解を抑えることにより筋重量を増加させる。本研究は固定により萎縮したラット骨格筋の回復期におけるクレンブテロール投与の影響を調べた。本研究結果は、クレンブテロール投与群の筋線維横断面積はコントロール群に比べて高値を示したことで、ヒラメ筋のその増加は足底筋より大きかったことを示した。さらに、筋線維あたりの筋核数の変化は両筋間で異なっていた。これらの結果は、筋萎縮後の回復期におけるクレンブテロール投与は回復を促進させるが、その効果は速筋と遅筋で異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、萎縮に伴う骨格筋の機能的低下や回復期の変化を筋線維レベルで定量的にある程度解釈することが出来たと考えられる。本研究の結果は、骨格筋を形成する個々の筋線維の変化が同定でき、それぞれの骨格筋の萎縮や回復過程で異なる応答性を明らかにできた。本研究で得られた結果は、筋間のみならず異なる手法を用いた萎縮抑制や回復促進のより良好な指標となり得る可能性が高い。これらの結果は、不活動などによる筋萎縮からの通常生活への早期の復帰を図るための基礎的な資料になりうる。また、運動・スポーツ選手の場合は、ドーピングとの関係も考慮する必要があるが、より早期の競技生活への復帰が可能になる示唆が得られた。

研究成果の概要(英文)：The 2-agonist clenbuterol increases muscle mass by promoting muscle protein synthesis and/or attenuating protein degradation. This study investigated whether administration of clenbuterol accelerate recovery after immobilization-induced atrophy of fast-twitch and slow-twitch muscles. This study demonstrated that the cross-sectional area of fibers in the clenbuterol group was higher than that in the control group and that such increment was greater in soleus muscle than in plantaris muscle. Furthermore, changes in myonuclei number per muscle fiber by clenbuterol administration differed between the soleus and plantar muscles. These results suggested that clenbuterol administration accelerated recovery after muscle atrophy, but the effects differed between fast and slow muscle.

研究分野：運動生理学

キーワード：クレンブテロール ギプス固定 筋萎縮 回復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人男子の骨格筋量は体重の約 40% を占め、そのうち約 55% が下半身の骨格筋である (Janssen *et al*, 2000) . 下半身の骨格筋量の多くは下肢筋群が占め、これらの筋群が身体の運動能に大きく寄与し、日常生活における身体の移動・歩行・平衡機能等に重要な機能的役割を担っている . そのため、これらの筋量を維持・増加することはスポーツ活動能向上のみならず、高齢者や身体障害者の運動機能の改善にとっても重要な問題である . 一方、様々な要因によって筋の力学的負荷が低下すると、運動能の低下と共に骨格筋の萎縮が明らかに認められ、日常生活の身体活動の質的低下が起こる . したがって、不活動を余儀なくされた場合、下肢骨格筋の萎縮を抑制する作用や萎縮後の回復を促進する作用の機構を明らかにすることが最も重要な課題となる .

最近の研究によると、ヒトをベッドレスト (不活動) で生活させた際の下腿部・大腿筋の断面積は有意に減少し、筋力も著明に低下する (Brooks *et al*, 2008) . また、ラットやマウスなどの実験動物の下肢筋の容積についても脚部の固定・尾部懸垂・身体懸垂・微小重力環境下などによって著しく萎縮し、筋機能低下が起こる (Ishihara *et al*, 2012 ; Sato *et al*, 2012) . このような骨格筋の可塑的な変化は、その筋を構成する個々の筋線維の総和としての応答である . この骨格筋の変化については、骨格筋内の遺伝子や細胞内シグナル伝達の応答との関連についての研究が大きく進展している . また、筋萎縮に関しては個々の筋線維の横断面積に関する研究は多いが、筋萎縮に伴う個々の筋線維の収縮タンパク質の動態・筋細胞内の各種代謝関連酵素活性・筋内エネルギー基質の応答についてはそれらの現象を統合した研究が極めて少ない . そのため、不活動に伴う骨格筋の可塑的な変化の実体を系統的に明らかにするためには、筋線維の形態的变化に加え、その質的応答を総合的に測定・解析することが不可欠である .

私達のグループでは、ラットの関節固定によって惹起された骨格筋の萎縮は同一筋であっても部位毎に異なり、その応答は一様ではないこと (鈴木ら, 2008) , 後肢骨格筋の萎縮は速筋と遅筋とで β_2 -アドレナリン受容体 mRNA の発現が明らかに異なること (Sato *et al*, 2011) を見出している、また、骨格筋に対する力学的負荷の増加やドーピング薬物の一つである β_2 作動薬・クレンプテロール (以下、CLE) を投与しても筋が肥大する (Shirato *et al*, 2007; Sato *et al*, 2008; Sato *et al*, 2013; Shirato *et al*, 2013) . これらの現象は速筋線維の多い骨格筋のタンパク合成が促進されることに由来するものと推定されている (Sato *et al*, 2008) . これらの結果より、骨格筋の萎縮は CLE 投与によってタンパク合成が促進され、その結果として筋萎縮が抑制されるものと推定できる .

以上のような最近の知見に基づき、私達のグループでは下脚部をギプスで固定したラットに CLE を経口投与した後の筋萎縮が抑制されるか否かを組織化学的な方法をもちいて詳細にしらべた . その結果、その抑制作用は速筋で明らかに認められることを確認した (Suzuki *et al*, 2014) . この結果は、ラットに対する CLE の投与は萎縮筋の回復の速度を高める可能性が強く示唆された . この可能性を実証するため、ラットの下脚部を固定して骨格筋を萎縮させた後、固定を解除したラットに CLE 投与することによって回復促進効果があ

るか否かを現在詳細に検討している。

2. 研究の目的

身体運動を司る筋骨格系に各種の怪我・骨折・疾病等が惹起されると筋骨格器官が不活動を起こす。このような身体状況下では特に下肢骨格筋が著明に萎縮し、身体活動能が著しく低下する。これらの運動機能の低下や筋萎縮を正常の状態に戻す処方確立することは、スポーツ医学・リハビリテーション・運動生理学等からみて喫緊の課題である。この不明な点を明確にするには骨格筋の萎縮を抑制し、萎縮からの回復を促進させる要因を検討することが重要である。本研究では、ラットをギプスで固定した後肢骨格筋の萎縮時とその解除後に骨肥大を惹起する β_2 -作動薬 (CLE) を投与した際の萎縮抑制と回復促進作用の機構を組織化学的に検討する。

3. 研究の方法

本研究では系統的な実験データを得るためにすべて8週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いる。本研究は以下の順番で順次実施する。

- (1) ギプス固定による後肢骨格筋の萎縮と CLE 投与による萎縮抑制作用をしらべる。
- (2) (1) と同様の方法を用いて、ギプス固定の足関節角度を左右脚で変えて不活動筋の固定時の筋長さの違いによってどの程度影響を受けるかを検討する。
- (3) ギプス固定除去後の後肢骨格筋の回復過程と CLE 投与による回復促進作用についてしらべる。
- (4) (3) と同様の方法で実施し、運動と運動+CLE 投与群を設けてそれらの回復促進作用をしらべる。

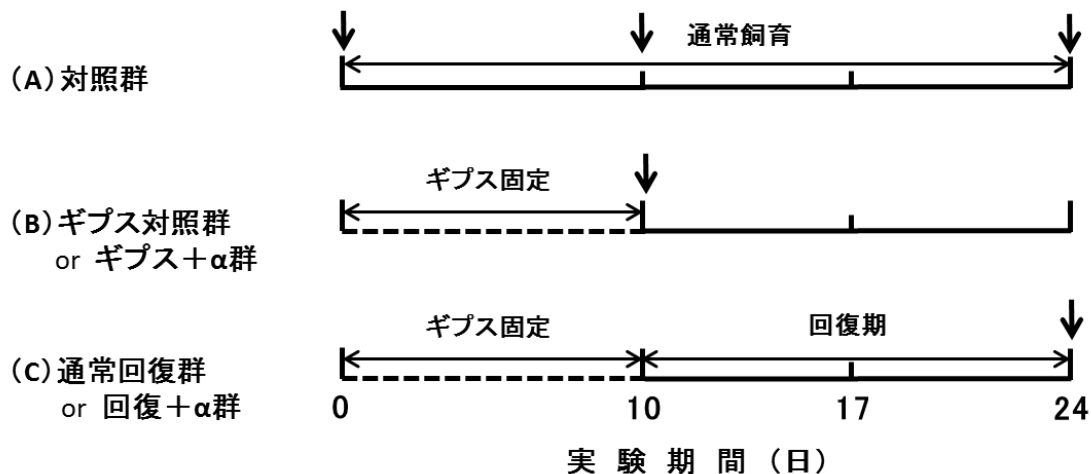


図1 実験群および実験プロトコール

実験動物：8週齢SD系雄ラット、各群8匹

A: 実験期間中通常飼育群, B: 固定群または固定+ α 群, C: 回復群または回復群+ α 群, ↓は筋摘出

私達はこれまでに受領した科学研究費の研究において CLE 投与による筋萎縮の抑制作用があることを報告した。しかし、その当時の研究は対象とした骨格筋が極めて限定的であり、その結果は組織化学的手法による形態的なデータのみであった。そこでこの点を改善し、本研究では筋萎縮の抑制作用を筋線維のタンパク質やエネルギー基質等の質的变化

に着目した定量的な研究を行う。図 1 には群分けおよび実験プロトコールを示す。8 週齢ラットを対照 (A) 群, ギプス群 (B) およびギプス + CLE 投与 (C) 群に分ける。ギプスは常法にしたがってペントバルビタール麻酔下にて弛緩した状態で、包帯式ギプス(スコッチキャスト社製)を用いて膝関節と足関節の固定(Resting angle)を 10 日間行う(Suzuki *et al*, 2014)。CLE (dose=1mg/kg 体重) はラットに毎日腹腔内に投与し, 対照群ラットには当該量の生理食塩水を同様の方法で投与する。この CLE 投与により骨格筋の肥大を惹起することは既に再現性を確認し, 方法上の困難な問題はない。

本研究では, 飼育期間後に摘出したラットの後肢右側の各種骨格筋の収縮タンパク質および全筋タンパク質量を分析する(連携研究者: 今泉和彦)。それらの分析サンプルの一部は, 電気泳動法を用いたミオシン重鎖の分析を行い, 分子レベルでの筋線維のタイプの変化を解明する(研究分担者: 辻本尚弥)。左側の骨格筋においては, 組織化学的分析により各骨格筋の筋線維タイプ別の筋線維横断面積を決定する共に, 個々の筋線維の基質濃度および代謝酵素活性を分析する。各基質濃度は定量的組織化学的手法を用いた筋線維のグリコーゲン量及び脂質量の分析を行う。代謝酵素活性も定量的組織化学的手法を用いて, succinate dehydrogenase(SDH)と glycerol phosphate dehydrogenase(GPD)の活性を分析する(研究代表者: 鈴木英樹および研究協力者: 宮道一輝)。

骨格筋の分析は遅筋としてヒラメ筋, 速筋として足底筋を被験筋として用いる。内側腓腹筋については近位部と遠位部に関して分析を行う。尚, 平成 27 年度には, 固定時の筋長の違いによって CLE 投与の作用に影響する可能性があることから, 固定時の左右の足関節角度を一方は底屈状態、他方を背屈状態で固定を行い, その違いに関しても同様な分析を実施する。

4. 研究成果

当初, 計画していた組織化学的分析に加えて, 筋の萎縮や肥大に重要な役割を担う筋核の分析を行ったため, 以下は現時点で得られている組織化学的分析結果に関して記載する。

先の一連の研究で用いたギプス固定による速筋と遅筋の萎縮時のそれぞれのタイプの筋線維の筋線維横断面積の変化を検討した。その結果, 採用したギプス固定で速筋と遅筋の双方で筋萎縮が示された。また, その萎縮は従来の研究と同様に遅筋で著しかった。遅筋における筋線維の萎縮は, 遅筋線維と速筋線維に関わらず約 45%の横断面積の顕著な減少が観察された。しかし, 遅筋のそれぞれのタイプ筋線維あたりの筋核数は減少したものの, それらの変化は有意な変化ではなかった。速筋における筋線維の萎縮は遅筋線維と速筋線維に関わらず 21%から 34%の横断面積の減少が観察されたが, タイプ の MHC (ミオシン重鎖) を発現している筋線維の萎縮が顕著だった。速筋での筋線維あたりの筋核数は遅筋の筋線維と同様に減少したものの, それらの変化は有意ではなかった。これらの結果から, 筋線維あたりの筋核数は, 遅筋・速筋そして筋線維のタイプに関わらず, 筋線維の萎縮に伴い変化しにくいことが示された。

ギプス固定解放後の 2 週間の通常飼育で, 遅筋・速筋ともに筋重量の回復を示した。遅筋の筋線維の横断面積も回復を示したが, タイプ のみの MHC を発現している筋線維の回復(50%)

に対して、タイプ MHC を発現している筋線維の回復(107% , 94%)は顕著だった。また、遅筋の筋線維あたりの筋核数は、いずれのタイプの筋線維においても、萎縮した筋線維の筋核数と違いはなかった。速筋の筋線維横断面積も回復を示したが、遅筋と同様にタイプ MHC のみの MHC を発現している筋線維の回復(27%)に対して、タイプ MHC を発現している筋線維の回復(41% , 46%)は顕著だった。また、速筋の筋線維あたりの筋核数は、いずれのタイプの筋線維も、萎縮した筋線維に比べて増加傾向を示し、タイプ MHC を発現している筋線維の回復は顕著だった。これらの結果より、不活動状態から通常活動状態への復帰は萎縮を回復させるが、回復に伴う筋核の応答は遅筋と速筋では異なることが示された。

ギプス固定解放後の 2 週間の通常飼育期間に 2 - 作動薬であるクレンプテロールを投与した場合、遅筋・速筋ともにクレンプテロール投与無に比べて顕著な回復を示した。遅筋の筋線維の横断面積もクレンプテロール投与により顕著な回復を示したが、タイプ MHC のみの MHC を発現している筋線維の回復(99%)に対して、タイプ MHC を発現している筋線維の回復(200% , 183%)は顕著だった。また、遅筋の筋線維あたりの筋核数は、いずれのタイプの筋線維においても、萎縮した筋線維の筋核数と違いはなかった。速筋の筋線維横断面積もクレンプテロール投与により顕著な回復を示したが、遅筋と同様にタイプ MHC のみの MHC を発現している筋線維の回復(98%)に対して、タイプ MHC を発現している筋線維の回復(118% , 117%)は顕著だった。また、速筋の筋線維あたりの筋核数は、いずれのタイプの筋線維も、萎縮した筋線維に比べて顕著な増加を示した。これらの結果より、通常活動状態での回復におけるクレンプテロールは、その回復を促進させるが、筋核の変化を含めたその応答は遅筋と速筋では異なることが示された。

以上のことから、不活動に伴う筋萎縮からの回復期でのクレンプテロール投与は、筋線維レベルにおいて、その回復を促進させることが確認された。また、その回復機序は遅筋と速筋間でも遺伝的要因での違いがある可能性が示された。

現在、上記の研究成果に関する論文の執筆と同時に、同様な萎縮モデルを用いた回復期での活動量の違いとクレンプテロール投与の影響に関する骨格筋の分析を継続して行っている。これらの一連の研究結果により、筋萎縮からのより速やかな日常生活やスポーツ現場への復帰の基礎的なデータが得られると思われる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

鈴木英樹, 辻本尚弥, 北浦孝, 村岡功
「萎縮ヒラメ筋の回復期におけるクレンプテロール投与の影響」
スポーツ科学研究, Vol.15, 77-87, 2018 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木英樹, 辻本尚弥, 北浦孝, 村岡功
「筋萎縮からの回復時におけるクレンプテロール投与の影響」
第 72 回日本体力医学会大会, 2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：北浦 孝

ローマ字氏名：Takashi Kitaura

所属研究機関名：福山大学

部局名：経済学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00143868

研究分担者氏名：辻本 尚弥

ローマ字氏名：Hisaya Tsujimoto

所属研究機関名：久留米大学

部局名：人間健康学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70299519

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮道 一輝

ローマ字氏名：Kazuki Miyamichi

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。