

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17792

研究課題名(和文)ドーピング禁止薬物の投与による代謝的適応にエピジェネティクスな制御は関わるか

研究課題名(英文)Effects of anti-doping drugs on metabolic adaptation

研究代表者

星野 太佑 (Hoshino, Daisuke)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：70612117

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、筋肥大を引き起こすクレンブテロール摂取およびレジスタンストレーニングが骨格筋と脂肪組織に代謝的適応に与える影響を検証した。クレンブテロール摂取は、骨格筋のミトコンドリアの融合・分裂に関わるタンパク質の発現量の減少させ、ミトコンドリアの異常な形態変化を誘導した。そのような変化が起きる時、ヒストン脱アセチル化酵素4(HDAC4)の核移行に変化はなかった。4週間のレジスタンストレーニングは、皮下白色脂肪細胞の大きさを減少させ、褐色脂肪細胞のミトコンドリアの酵素のタンパク質を増加させることを明らかにした。以上のような現象のメカニズムについて今後さらに検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クレンブテロール摂取は筋肥大を引き起こすため、アスリートのパフォーマンス向上に悪用されてきた経緯がある。本研究ではエピジェネティックな制御に違いは見られなかったが、もしエピジェネティックな変化を伴うと、薬剤をやめた後にも、さらにはその後の世代にも薬剤の影響が受け継がれることになる。このことは、ドーピング検査をさらに難しくし、不平等なスポーツに繋がりがかねないと思われる。また、筋肥大を目的としたレジスタンストレーニングでも、脂肪細胞を小さくすることがわかった。肥満や代謝疾患の改善に、脂肪細胞の変化の面からもレジスタンストレーニングが有効となりうる可能性が考えらる。

研究成果の概要(英文):We examined the effects of clenbuterol administration and resistance training that induce muscle hypertrophy on metabolic adaptation in skeletal muscles and adipose tissues. Clenbuterol administration decreased the expression of proteins involved in mitochondrial fusion and fission, and increased abnormal morphological mitochondria in skeletal muscle. At the same time, there was no change in nuclear translocation of histone deacetylase 4 (HDAC4). Four-week resistance training reduced subcutaneous white adipocyte size and increased the protein levels of mitochondrial enzymes in brown adipose tissue. It is necessary to further clarify the mechanism of the above experimental results.

研究分野：運動生理生化学

キーワード：クレンブテロール 骨格筋 脂肪組織 ミトコンドリア

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アドレナリン受容体のアゴニストであるクレンブテロールの慢性摂取やレジスタンストレーニングは、筋を肥大させ解糖系酵素活性を増加させる一方で、体内の脂肪組織の減少や機能の変化を誘導する。しかし、このような代謝的適応を引き起こす分子メカニズムが完全には解明されていない。そこで私たちは、この代謝的適応の分子メカニズムにエピジェネティクスが関わっているのではないかと仮説を立てた。なぜなら、クレンブテロールが beta2 アドレナリン受容体を介した経路で、エピジェネティクスに関わる酵素の遺伝子発現を増加させたという報告があるからである。また、エピジェネティクスは、長期間保存されることがわかっているため、このドーピング禁止薬物投与が骨格筋や脂肪細胞に記憶され、トレーニング効果を増幅させる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

ドーピング禁止薬物やレジスタンストレーニングによって、骨格筋や脂肪組織はどのように代謝的に適応するのか、またその適応はどのようなメカニズムによるか明らかにすること

3. 研究の方法

実験 1

12 匹の Wistar 系雄性ラットを 2 つの群 ($n=6$) に分けた。すべてのラットは室温 20-24°C で 12 時間の明暗サイクルで管理された飼育室において、飼料および水、もしくはクレンブテロールを含ませた水 (30 mg/L) をそれぞれ自由に摂取できる状態で 3 週間飼育した。3 週間後、前脛骨筋、ヒラメ筋、足底筋を摘出した。筋線維組成を調べるために、骨格筋の切片を作成し、myosin heavy chain (MHC) のサブタイプの抗体を用いて免疫染色をおこなった。前脛骨筋においては、ウエスタンブロットによるミトコンドリアタンパク質発現量の定量と電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の評価をおこなった。また、ヒラメ筋、足底筋に対しては、エピジェネティックな制御を明らかにするために、Histone deacetylase 4 (HDAC4) の蛍光免疫染色をおこなった。すべての実験は、電気通信大学実験委員会の承認を得たものであり、本学動物実験規定にしたがっておこなわれた。

実験 2

本実験は被験動物として、Wistar 系雄性ラット ($n=8, 10$ 週齢) (235±5 g) を用いた (三協ラボサービス株式会社)。すべての動物実験は電気通信大学動物実験委員会によって承認され (承認番号第 29 号)、本学動物実験指針に則って実施した。1 週間の飼育後、ラットを対照 (Control) 群およびレジスタンストレーニング (RT) 群に分けた。Control 群はイソフルラン麻酔 (マイラン製薬) 下で 5 分間置いた。RT 群は麻酔下で腓腹筋に対する電気刺激を 3 回/週 × 4 週間行なった。電気刺激は先行研究において 4 週間で筋肥大が起こることが報告されているプロトコル (刺激頻度: 100Hz, 刺激強度: 6.0~22 V, 刺激時間: 3 sec, 刺激間インターバル: 7 sec を 1 回とし、これを 10 回繰り返したものを 1 セット × 5 セット) を使用した。最後のトレーニングの 48 時間後、すべてのラットをイソフルラン麻酔下で導入麻酔した後、ペントバルビタールナトリウム (共立製薬) の腹腔内投与 (1mL/kg) によって麻酔し、両後肢の腓腹筋、鼠径部皮下白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織および心臓から 3 mL の血液を採取した。血液はヘパリンでコートした 1.5 mL エッペンチューブ 2 本に分けた後、4°C の冷蔵庫中で 20 分 2,000 rpm で遠心分離した。上清と組織は、液体窒素で急速冷凍し、-80°C の冷凍庫で保存した。脂肪細胞の形態を評価するために、脂肪組織のヘマトキシリン-エオジン (HE) 重染色をおこなった。ミトコンドリアなどのタンパク質発現量を定量するために、ウエスタンブロッティングをおこなった。また、meteorin-like (Metrnl) の血中濃度を調べるために、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法を用いて、測定をおこなった。

4. 研究成果

実験 1

クレンブテロールの摂取が、骨格筋の代謝的および形態的な変化に与える影響を解析した。ミトコンドリアの量のマーカーであるタンパク質を測定したところ、有意に減少していた (Figure 1)。

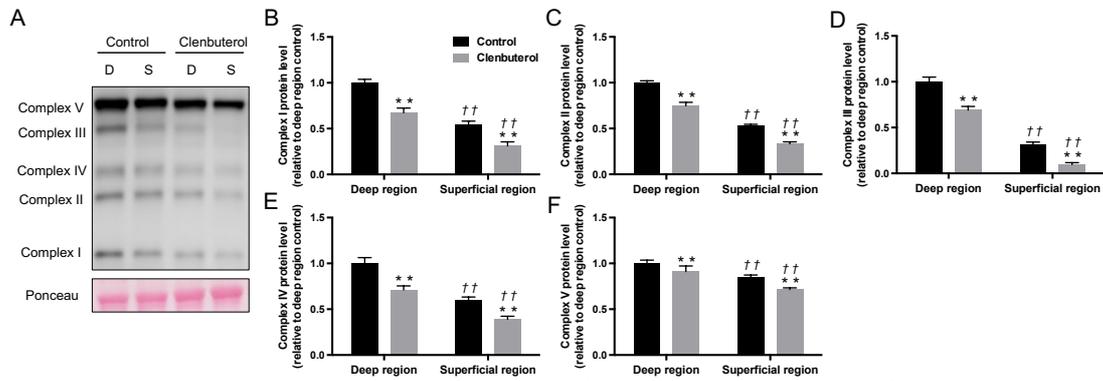


Figure 1 クレブテロールによるミトコンドリア複合体のタンパク質量の変化 Mean±SE. n = 6 rats. **P < 0.01, significant effect on control group vs. clenbuterol group. ††P < 0.01, significant effect on superficial region vs. deep region.

このミトコンドリアタンパク質発現量の変化に伴い、ミトコンドリアの融合・分裂に関連するタンパク質も減少していた (Figure 2).

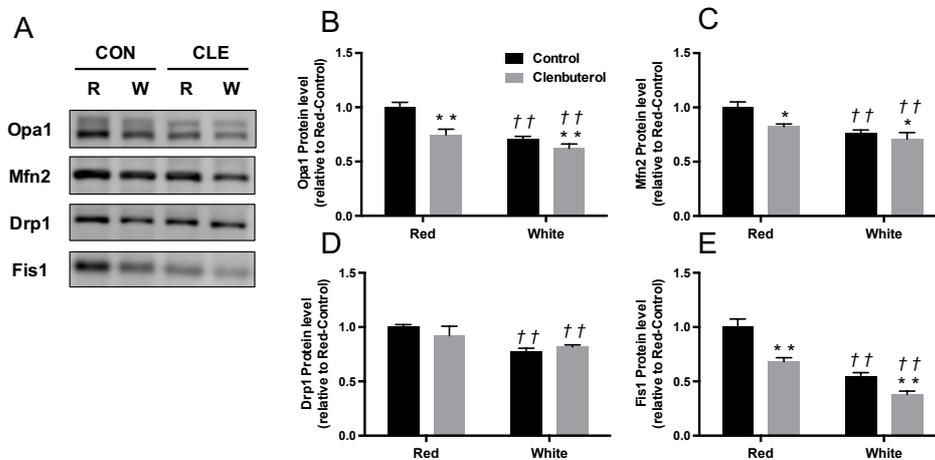


Figure 2 クレブテロールによるミトコンドリアの融合・分裂に関連するタンパク質の変化 Mean±SE. **P < 0.01, significant effect on control group vs. clenbuterol group. ††P < 0.01, significant effect on superficial region vs. deep region.

次に、そのようなタンパク質の変化があったときに、実際にミトコンドリアの形態に影響が見られるのか検証したところ、体積は減少したが、ミトコンドリア同士の相互作用や接している割合は増加し、異常の形態のミトコンドリアも増加していた。

以上のことから、クレブテロールによって、ミトコンドリアの融合・分裂に関わるタンパク質発現量が変わるとともに、ミトコンドリアの形態が変化することが明らかとなった。

さらに、このような変化がエピジェネティックな制御を受けているのか、HDAC4の核内移行を定量化したところ、クレブテロールによる変化はみられなかった (Figure 3).

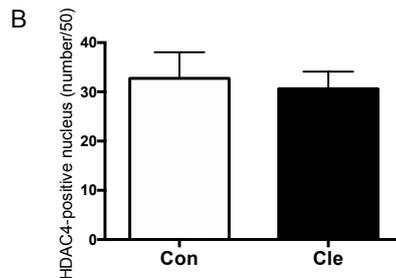
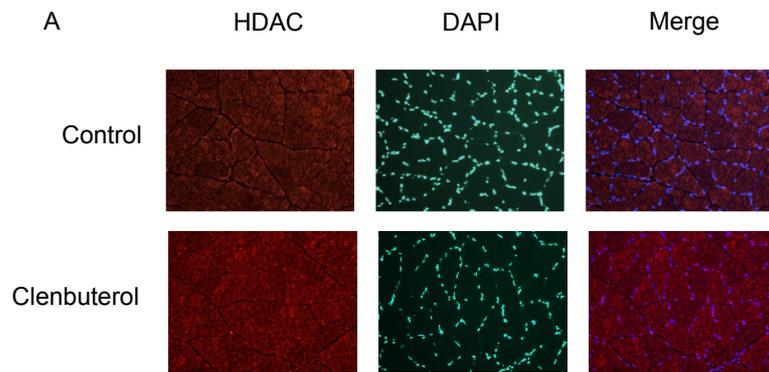


Figure 3 HDAC4 (A 左), DAPI(核の標識, A 中央), HDAC4 と DAPI の重ね合わせ (A 右), 50 個の核の中で, HDAC4 の蛍光が確認された核数 (B), Mean±SE, n = 4, 5.

実験 2

骨格筋重量の増加を目的とした 4 週間の RT は体重あたりの腓腹筋重量を有意に増加させた。4 週間の RT は, 皮下白色脂肪細胞の大きさを減少させた (Figure 4). そのような脂肪細胞の大きさの変化がみられたものの, ミトコンドリアに関するタンパク質量は変化しなかった。一方で, 褐色脂肪細胞のミトコンドリアの酵素が対照群と比較して RT 群で有意に増加し, PGC-1 α が増加傾向であった。さらに, 血中の *Metrn1* 濃度は RT 群で有意に高値を示した。このような脂肪組織・細胞の変化には *Metrn1* が関連する可能性が考えられた。

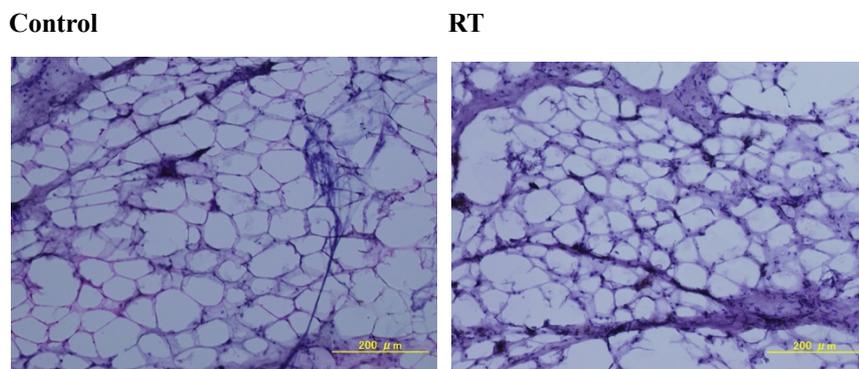


Figure 4 Control と RT (レジスタンストレーニング)の皮下白色脂肪細胞の代表的な HE 重染色画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yu Kitaoka, Daiki Watanabe, Yudai Nonaka, Kazuyoshi Yagishita, Yutaka Kano, Daisuke Hoshino	4. 巻 7
2. 論文標題 Effects of clenbuterol administration on mitochondrial morphology and its regulatory proteins in rat skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Daisuke Hoshino
2. 発表標題 Lactate as a signaling molecule for exercise adaptation
3. 学会等名 European College of Sport Science 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuhei Amano, Yudai Nonaka, Yutaka Kano, Daisuke Hoshino
2. 発表標題 EFFECTS OF RESISTANCE TRAINING ON WHITE AND BROWN ADIPOCYTES IN RATS
3. 学会等名 European College of Sport Science 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野悠平、星野太佑
2. 発表標題 ラットへの電気刺激によるレジスタンストレーニングが脂肪細胞へ与える影響
3. 学会等名 第40回肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野悠平、竹田怜央、野中雄大、狩野豊、星野太佑
2. 発表標題 レジスタンストレーニングはラットの褐色脂肪細胞のミトコンドリア酵素のタンパク質量を増加させる
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	天野 悠平 (Amano Yuhei)		