様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：１５５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ１１５２３

研究課題名（和文）酸化ストレスに着目した筋肥大制御に関する研究

研究課題名（英文）Research on the control of muscle hypertrophy focusing on oxidative stress

研究代表者
杉浦　崇夫（Sugiura, Takao）

山口大学・その他部局等　　・名誉教授

研究者番号：８０１３６１５０

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）：　加齢に伴う骨格筋萎縮（サルコペニア）の予防は、高齢者のQOLを維持する上で重要である。サルコペニアの原因として加齢に伴う酸化ストレスの亢進が考えられている一方、酸化ストレスはタンパク合成を促進させることも知られている。本研究は、若齢期と高齢期のマウスを用い、酸化ストレスを抗酸化物質あるいは窒素負荷による低酸素刺激により制御し、機能的過負荷による筋肥大への影響を比較検討した。
　その結果、若齢動物では腱切除による筋肥大への相加効果は酸化ストレスの亢進により認められるのに対し、高齢動物では酸化ストレスの亢進により認められること、またそれらは速筋と遅筋では異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
加齢に伴う骨格筋萎縮は、高齢者の骨折など健康維持に問題が生じ、医療費の増大につながる。筋萎縮を抑制することは健康寿命の延長や医療費増大の抑制などの観点からも、今日の重要なテーマである。酸化ストレスは、筋萎縮の原因として考えられている一方で、筋肥大にも関与していることが示されている。
本研究の結果は、腱切除による筋肥大への相加効果は若齢期では酸化ストレスの亢進によるのに対し、高齢期では酸化ストレスの抑制により認められたこと、またそれらは筋の収縮特性により異なることを示し、筋肥大を効果的に得るトレーニング法は年齢によって異なると考えられる。また、それらは速筋と遅筋では異なることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：　Prevention of age-related skeletal muscle atrophy (sarcopenia) is important in maintaining the quality of life of the elderly.　While increased oxidative stress associated with aging is thought to be a cause of sarcopenia, oxidative stress is also known to promote protein synthesis.　In this study, oxidative stress was controlled by hypoxic stimulation with antioxidants or nitrogen loading in young and aged mice, and the effects of functional overload on muscle hypertrophy were compared.
　The results showed that the additive effect of tendonectomy on muscle hypertrophy was observed in young animals due to increased oxidative stress, whereas it was observed in older animals due to suppression of oxidative stress.　They were also shown to differ between fast and slow twitch muscles.

研究分野：運動生化学

キーワード：酸化ストレス　代償性筋肥大　低酸素暴露　アスタキサンチン

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

加齢に伴う骨格筋萎縮（サルコペニア）の予防は、高齢者のQOLを維持する上で重要な課題の一つである。サルコペニアの原因の一つとして加齢に伴う酸化ストレスの亢進が考えられている。酸化ストレスは、筋タンパク質分解の亢進、筋タンパク質合成の低下、アポトーシスの亢進、さらに筋の前駆細胞である筋サテライト細胞の機能を減弱化し筋萎縮を招来する。一方、身体トレーニングによる酸化ストレスの亢進はサテライト細胞及び筋の再生サイクルの活性化亢進、筋タンパク合成シグナルを活性化し筋肥大をもたらすことが報告されている。

このように、酸化ストレスはサルコペニアに見られるような筋萎縮といった骨格筋へのネガティブ効果だけでなく、身体トレーニングにおける持久力向上や筋肥大などのポジティブ効果を合わせ持つが、その相反する動態は何によって決定されているのかは不明である。

２．研究の目的

本研究の目的は、若齢期と老齢期のマウスを用い、酸化ストレスを抗酸化物質あるいは窒素負荷による低酸素刺激により制御することで内因性の酸化ストレスと外因性の酸化ストレスを区別し、機能的過負荷による筋肥大への影響を筋サテライト細胞の活性化や筋線維増殖に関わる分子のmRNA発現量を比較し、酸化ストレスの制御による筋萎縮の防止及びトレーニングを効率的に行う方法を模索することである。

３．研究の方法

（１）動物と実験デザイン

被験動物には、12 週齢と 18 か月齢雄性マウス（ICR-JCL 系）を用いた。マウスをコントロール（Cont）群、代償性肥大処置（FO）群、間欠的低酸素曝露＋代償性肥大処置（LOFO）群、抗酸化物質（アスタキサンチン；Ax）摂取＋代償性肥大処置（AxFO）群の４群に分けた。実験群には、イソフルラン麻酔下で両側の腓腹筋を切除し、残った足底筋とヒラメ筋に代償性肥大を起こした。間欠的低酸素暴露はO_2が12.8%以下、CO_2が0.1%以下の常圧低酸素条件に調節されたチャンバー内で7日間行った。午前中に15分間の12.8%O_2と15分間の常酸素を6回繰り返した後、常酸素下に置いた。またAxFO群には、腓腹筋切除2週間前より実験終了まで0.04%Ax食を摂食させた。全てのマウスは12時間の明暗サイクルの下、自由摂食条件の温度23±2℃、湿度55±7%のケージ内で管理された。実験終了後直ちにマウスに対してペントバルビタール(70mg/kg)の腹腔内投与による麻酔を施し、被験筋として左右の足底筋、ヒラメ筋を採取した。採取した筋は直ちに液体窒素によって凍結し、分析まで-80℃で保存した。

（２）組織化学染色ならびに免疫組織化学染色

組織化学染色分析を行うために、-20℃のクリオスタット中で厚さ10μmの連続凍結横断切片を作成した。各筋線維の横断面積を同定するために、得られた切片をHE染色を行った。また、線維タイプ割合（%），cross-sectional area（CSA: μm^2），サテライトセル数の分析は、免疫組織化学染色により実施した。

（３）遺伝子発現の分析

筋サンプルから総RNAを抽出し、サテライトセルおよび筋肥大関連因子、筋肥大抑制因子、低酸素関連因子などにかかわるmRNA発現量を、定量的リアルタイム（RT）-PCR法により分析した。

４．研究成果

（1） 体重と筋重量

若齢マウスの筋重量はCont群と比較して足底筋、ヒラメ筋ともに実験群で有意に高い値であった。また、足底筋ではLOFO群と比較してAxFO群で有意に低く、ヒラメ筋ではFO群と比較してLOFO群で有意に高く、LOFO群と比較してAxFO群で有意に低い値であった。老齢マウスの筋重量において、足底筋ではCont群と比較して実験群で、ヒラメ筋では全ての条件群と比較してAxFO群で、それぞれ有意に高い値であった（図1）。

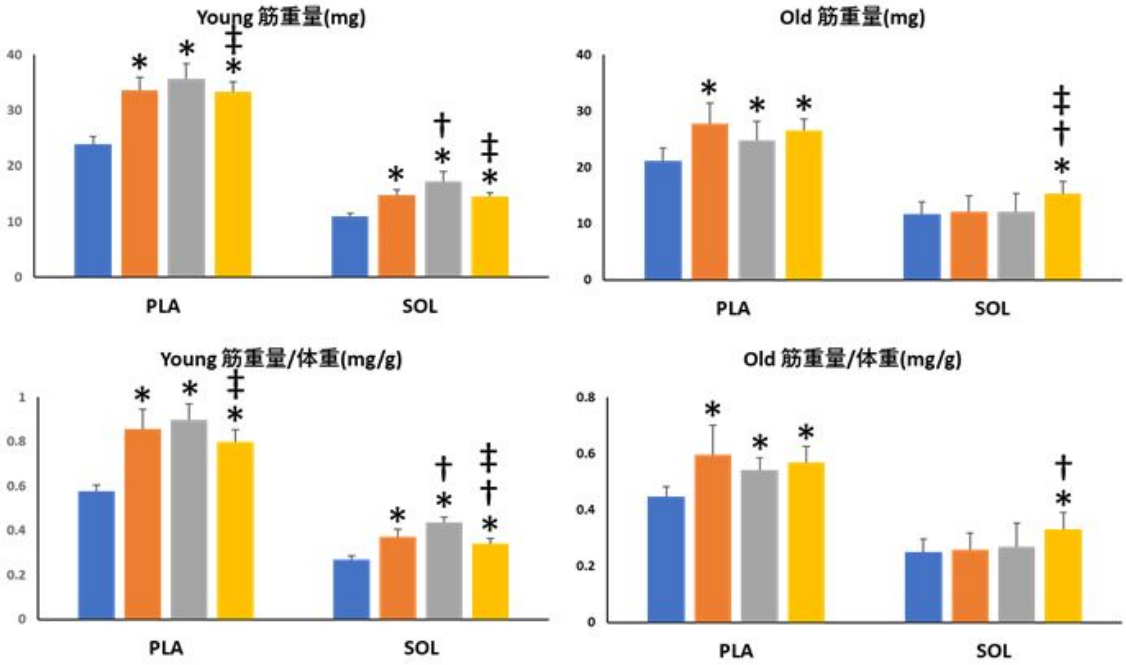

図1. 若齢および老齢マウスにおける足底筋（PLA）・ヒラメ筋（SOL）の筋重量。
Mean±SD、*vs Cont、†vs FO、‡vs LOFO、p＜0.05

（2）筋線維特性

①筋線維タイプ比

若齢マウスにおいて足底筋では有意な変化は見られなかったが、ヒラメ筋ではLOFO群のTypeⅠ線維比はFO群よりも有意に高い値であった。

一方、老齢マウスにおいては足底筋、ヒラメ筋ともに有意な変化は見られなかった。

② 線維面積

若齢マウスの足底筋においてTypeⅡx/b線維面積はFO群と比較してLOFO群とAxFO群、TypeⅡa線維面積はCont群およびFO群と比較してLOFO群、TypeⅠ線維面積はCont群およびFO群と比較してAxFO群でそれぞれ有意な高値であった。しかしながら、ヒラメ筋では有意な変化は見られなかった。

老齢マウスの足底筋において有意な変化は見られなかったが、ヒラメ筋においてTypeⅡa線維面積はFO群と比較してAxFO群、TypeⅠ線維面積は全ての条件下と比較してAxFO群でそれぞれ有意に高い値であった。

③サテライトセル

若齢マウスの足底筋のTypeⅡx/b線維において、LOFO群とAxFO群のサテライトセルはCont群よりも、またAxFO群のサテライトセルはFO群よりも有意に高い値であった。ヒラメ筋ではTypeⅡa線維のサテライトセルはCont群およびFO群と比較してLOFO群、LOFO群と比較してAxFO群、TypeⅠ線維のサテライトセルはCont群と比較してFO群およびLOFO群、FO

群と比較してLOFO群、LOFO群と比較してAxFO群でそれぞれ有意に高い値であった。

これに対し、老齢マウスの足底筋において有意な変化はみられなかったが、ヒラメ筋のTypeⅡa線維のサテライトセルはFO群と比較してAxFO群、TypeⅠ線維のサテライトセルはCont群およびFO群と比較してAxFO群でそれぞれ有意に高い値であった。

④中心核

若齢マウスの足底筋においてTypeⅡx/b線維の中心核はCont群およびLOFO群と比較してAxFO群、TypeⅡa線維はLOFO群と比較してAxFO群でそれぞれ有意に高い値であった。ヒラメ筋においては、TypeⅡa線維の中心核はCont群と比較してFO群およびLOFO群でそれぞれ有意に高い値であった。

一方、老齢マウスでは足底筋、ヒラメ筋ともに有意な変化はみられなかった。

（3）mRNA発現

① サテライトセルおよび筋肥大関連因子

IGF-1 mRNA発現量は、若齢・老齢マウスの両筋すべてにおいてCont群と比較して実験群（FO群、LOFO群、AxFO群）で有意に高い値であった。

HGF mRNA発現量は、若齢・老齢マウスの足底筋ではCont群に比べ実験群で有意に高い値であった。若齢マウスのヒラメ筋では、Cont群と比較してFOおよびLOFO群のHGF mRNA発現量は有意に高い値であった。若齢マウスのヒラメ筋においては、Cont群およびFO群と比較してAxFO群の値は有意に高かった。

IL-6 mRNA発現量は、若齢マウスの足底筋においてLOFOおよびAxFO群の値はCont群よりも有意な高値であった。若齢マウスのヒラメ筋ではFO群とLOFO群のIL-6 mRNA発現量はCont群よりも有意に高い値であった。老齢マウスでは、足底筋においてCont群と比べAxFO群で有意に高い値であった。

Pax7 mRNA発現量は、若齢マウス足底筋においてCont群と比較してFO群およびAxFO群、LOFO群と比較してAxFO群でそれぞれ有意に高い値であった。また、老齢マウス足底筋においてCont群と比較してFOおよびAxFO群で有意な高値であった。これに対し、ヒラメ筋では若齢・老齢マウスともに有意な変化は見られなかった。

MyoD mRNA発現量は、若齢マウスでは足底筋およびヒラメ筋においてCont群と比較して実験群で有意に高い値であった。老齢マウスではFO群およびAxFO群の足底筋MyoD mRNA発現量は、Cont群よりも有意な高値を示した。

Myogenin mRNA発現量は、若齢マウスでは足底筋およびヒラメ筋においてCont群と比較して実験群で有意に高い値であった。老齢マウスでは、足底筋においてCont群と比較してFO群およびAxFO群で有意な高値を示した。ヒラメ筋においてはCont群と比較してLOFO群およびAxFO群で有意な高値であった。

MHCe mRNA発現量は、若齢マウスの足底筋とヒラメ筋および老齢マウスのヒラメ筋においてCont群と比較して実験群で有意に高い値であった。老齢マウスの足底筋ではFO群およびAxFO群の値はCont群よりも有意に高かった。

② 筋肥大抑制因子

Myostatin mRNA発現量は、若齢マウス足底筋において実験群の値はCont群よりも有意な低値であった。その他では有意な変化は認められなかった。

Atrogin1 mRNA発現量は、若齢・老齢マウス足底筋および老齢マウスヒラメ筋の実験群の値はCont群よりも有意に低い値であった。若齢マウスではAxFO群の発現量はCont群、FO群およびLOFO群よりも有意に低い値であった。

③ 低酸素関連因子

HIF1αmRNA 発現量は、すべてにおいて Cont 群と比較して実験群で有意に高い値を示した。また、老齢マウスのヒラメ筋では F0 群と比較して AxF0 群で有意に高く、LOF0 群と比較して AxF0 群で有意に低い値であった。

④ 血管新生関連因子

FGF2mRNA 発現量は、0-SOL において Cont および LOF0 群と比較して AxF0 群で有意に減少した。その他では有意な変化は見られなかった。

PGC1αmRNA 発現量は、若齢マウスヒラメ筋を除くすべてにおいて Cont 群と比較して実験群で有意な低値であった。また、若齢マウス足底筋において LOF0 群の値は、F0 群よりも有意に高い値であった。

VEGF-AmRNA 発現量は、若齢マウスでは足底筋、ヒラメ筋ともに実験群の値は Cont 群よりも有意に低い値であった。老齢マウスの足底筋では LOF0 群および AxF0 群の発現量は Cont 群および F0 群よりも有意に低い値であった。老齢マウスのヒラメ筋では AxF0 群の値は他の群よりも有意に低い値であった

⑤ ROS 関連因子

若齢マウスの SOD1mRNA 発現量は、足底筋では実験群の値は Cont 群よりも有意に低かったが、ヒラメ筋では F0 群の値は Cont 群よりも有意に高い値を示した。これに対し、老齢マウスではヒラメ筋において Cont 群と比較して F0 群および AxF0 群で有意な低値を、F0 群と比較して LOF0 群で有意な高値を示した。一方、足底筋では有意差は認められなかった。

SOD2mRNA 発現量は、若齢マウスではヒラメ筋の F0 群を除く実験群の値は Cont 群よりも有意に低い値であった。これに対し、老齢マウスではヒラメ筋において Cont 群および F0 群と比較して LOF0 群および AxF0 群の発現量は有意に低い値であったが、足底筋では有意な変化は認められなかった。

SOD3mRNA 発現量は、若齢マウスヒラメ筋の AxF0 群と老齢マウスヒラメ筋の F0 群を除く実験群において Cont 群よりも有意に高い値を若齢・老齢マウスにおいて示した。

⑥ NOS 関連因子

eNOSmRNA 発現量は、すべてにおいて有意な変化は認められなかった。

iNOSmRNA 発現量は、若齢マウスでは PLA において Cont 群と比較して AxF0 群で有意に高い値であった。若齢マウスヒラメ筋では Cont 群と比較して F0 群で有意に高い値であった。老齢マウスでは足底筋において AxF0 群の発現量は LOF0 群と比較して有意に高い値であった。

nNOSmRNA 発現量は、すべてにおいて Cont 群と比較して実験群で有意な低値であった。さらに老齢マウスのヒラメ筋において F0 群および LOF0 群と比較して AxF0 群の値は有意に低い値であった。また、若齢マウスの足底筋において AxF0 群の発現量は F0 群および LOF0 群よりも有意な高値であった。

以上の結果より、筋力増大の機能的要求に対してサテライトセルの増殖・分化が優先され、血管新生が抑制されている可能性が考えられる。また、本研究で得られた所見は、代償性肥大に及ぼす間欠的低酸素および抗酸化物質摂取による影響は週齢並びに筋種によりその反応は異なり、若齢マウスでは抗酸化物質摂取により肥大抑制が速筋と遅筋で認められるのに対し、老齢マウスでは遅筋において抗酸化物質摂取により肥大を促進することを示唆する。しかしながら、その所見を裏付ける mRNA の変化は得られなかった。今後、代償性肥大処置後の経時変化を詳細に検討する必要があろう。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 中田恵太,　杉浦崇夫，宮田浩文
２．発表標題 間欠的低酸素および抗酸化物質摂取がマウス骨格筋に及ぼす影響
３．学会等名 第75回日本体力医学会大会
４．発表年 2020年

１．発表者名 Nakata K , Ayano Soeda A. , Nobuyuki Miyaji N. , Takao Sugiura T. , Miyata H
２．発表標題 Effects of intermittent hypoxia and antioxidant intake on muscle hypertrophy in the mice
３．学会等名 第76回日本体力医学会大会
４．発表年 2021年

１．発表者名 Sugiura T. , Nakata K. , Miyata H. ,Miyaji N.
２．発表標題 Effects of intermittent hypoxia and antioxidant intake on compensatory muscle hypertrophy
３．学会等名 第76回日本体力医学会大会
４．発表年 2021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
研究分担者	宮田　浩文 (Miyata Hirofumi) (90190793)	山口大学・大学院創成科学研究科　　・教授 (15501)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関