

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 13 日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21240062
 研究課題名（和文）アスリートの薬剤および遺伝子によるドーピングを検出する
 技術創成のための基盤研究
 研究課題名（英文）Basic study on detecting strategy for drug/gene doping for athlete

研究代表者
 武政 徹（TAKEMASA TOHRU）
 筑波大学・体育系・教授
 研究者番号：50236501

研究成果の概要（和文）：アスリートの遺伝子ドーピングを検出する方法を確立するためには、まず実験動物を使って、アスリートの遺伝子ドーピングを再現できるモデル実験系を確立することが必須である。そこでマウスを対象動物として、shRNA を使ったミオスタチン遺伝子のノックダウンを試み、遺伝子ドーピング検出研究を行う基盤となるモデル実験系を確立した。さらにそのモデル実験系を使って血液や筋サンプルからの検出を試み、一部導入遺伝子の検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the feasibility of developing a method for detection of gene doping in power-athletes, we devised an experimental model system. Myostatin is a potent negative regulator of skeletal muscle development and growth, and myostatin-knockout mice exhibit a double-muscle phenotype. To achieve knockdown, we constructed plasmids expressing short hairpin interfering RNAs (shRNAs) against myostatin. These shRNAs were transfected into C2C12 cultured cells or injected into the tibialis anterior (TA) muscle of adult mice. By performing *in vitro* and *in vivo* experiments, we found that some shRNAs effectively reduced the expression of myostatin, and that the TA muscle showed hypertrophy of up to 27.9%. Then, using real-time PCR, we tried to detect the shRNA plasmid in the serum or muscles of mice into which it had been injected. Although we were unable to detect the plasmid in serum samples, it was detectable in the treated muscle at least four weeks after induction. We were also able to detect the plasmid in muscle in the vicinity of the TA. This gene doping model system will be useful for further studies aimed at doping control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2010 年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2011 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2012 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
総計	36,100,000	10,830,000	46,930,000

研究分野：骨格筋の分子運動生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学／スポーツ科学

キーワード：運動生理学、分子生物学、筋肥大、ミオスタチン、遺伝子ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

ドーピングはスポーツの価値を否定し、競技者の健康を害し、フェアプレーの精神に反する反社会的行為である。申請者は競技アスリートの間で蔓延しつつある薬剤ドーピングあるいは遺伝子ドーピングを素早く、しかも簡単に検出するための技術およびデバイスを開発することを最終目標としており、本研究はその中核となる検出機構を創成するための基盤研究である。研究のヒントは、研究代表者が平成 19~20 年度に獲得した基盤研究 B：課題番号 19300219「サルコペニアの進行を運動負荷が抑制するメカニズムの解明」を進めていた際、運動負荷に応じて多種多様な遺伝子が経時的に様々な形で変化することを観察したことによっている。この技術が実用化されれば、競技アスリートの薬剤ドーピングあるいは遺伝子ドーピングの検出の他、エリートアスリートのタレント発掘やガンの早期発見などにも応用可能であり、スポーツ生理学発信の研究成果を広く国民に還元できるものと期待されていた。

2. 研究の目的

「アスリートから遺伝子ドーピングを検出する」ための第一歩として、我々が遺伝子ドーピングを検出する手段を開発するためのモデル実験系を確立し、さらにそのモデル実験系を使ってドーピング遺伝子として導入したプラスミドを RealTime PCR 法により検定することが可能かどうかを検証することが目的である。

3. 研究の方法

遺伝子ドーピングを検出するためには、遺伝子ドーピングによってその効果が明らかなモデル実験系が必要であり、パワー系アスリートの基本である骨格筋量に着目し、これを増加する作用を持つ遺伝子ドーピングモデルの作成を試みた。ミオスタチンは骨格筋の過剰な成長を制限しているネガティブレギュレーターとして知られているタンパク質であり、これが壊れてしまった突然変異体（ヒト、ウシ、イヌなどで知られている）では全身の骨格筋量が倍加している。ミオスタチンがどのように肥大シグナルを抑制しているかについては図 1 にまとめておく。

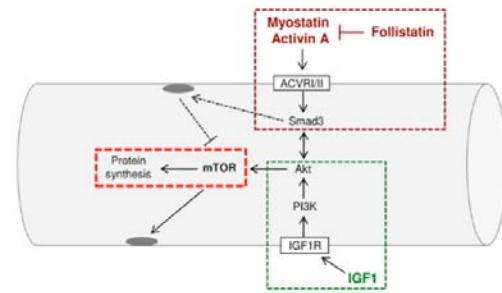


図 1: 運動性筋肥大カスケードに関わるミオスタチンの役割。筋肥大には抑制的に働いていることが判る。Schiaffino S et al. FEBS J. 2013 Mar 21. doi: 10.1111/febs.12253.

遺伝子ドーピングでは、遺伝子操作や遺伝子治療で用いられている手法を応用して、ターゲットとするタンパク質の発現量を操作するが、アスリートのドーピングは「後天的に必要な部分だけ、必要な期間筋力をアップしたい」という希望に添うものを想定し、先天的に筋量を増やすノックアウトではなく、ノックダウン法を採用した。この方法を使い、数週間、前脛骨筋におけるミオスタチン遺伝子の発現を抑え、タンパク量を減少させる操作をマウスに施した（図 2）。

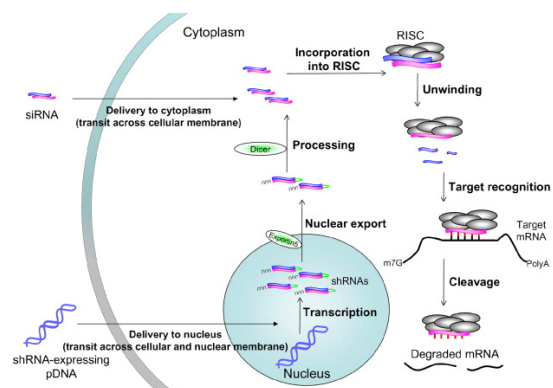


図 2: shRNA による RNA 干渉。プラスミドによって組織内に導入された shRNA はターゲットの mRNA を破壊し、遺伝子発現レベルを低下させる。今回の実験ではミオスタチン mRNA がターゲットである。

さらに、実際にアスリートの検体から遺伝子ドーピングを検出することを想定し、血液と筋サンプルから導入したプラスミドの RealTime PCR 法による増幅を試みた。

4. 研究成果

まず遺伝子ドーピングモデル実験系の確立について。3種類作成したミオスタチンのノックダウンベクターのコンストラクトのうち、まずマウス骨格筋由来培養細胞 C2C12 を用いて、その有効性を観察した（データ不提示）。コントロール（U6 と標記）に比べ、有効性が認められた2種類のコンストラクト（それぞれ K2、K3 と標記）をマウスの前脛骨筋に注射し、電氣的刺激を加え、形質転換を試みた。結果、ミオスタチン mRNA およびミオスタチンタンパク質量が減少するのに伴って（図3）、前脛骨筋量が27.9%程度増加し、人為的にレジスタンストレーニングなしに骨格筋を肥大させることに成功し、モデル実験系を確立した（図4）。

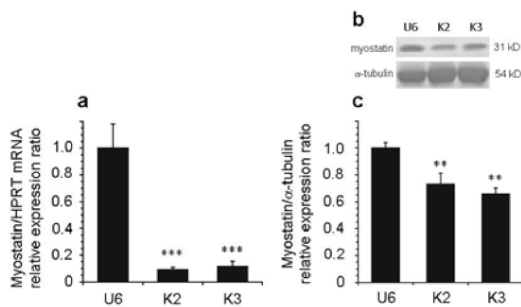


図3：マウスの前脛骨筋に導入した shRNA により、ミオスタチンの mRNA (a) およびタンパク質 (c) の発現レベルが有意に低下した。典型的なウエスタンブロットの写真を b に示す。U6 はコントロール、K2、K3 が有効な shRNA を含むプラスミドである。

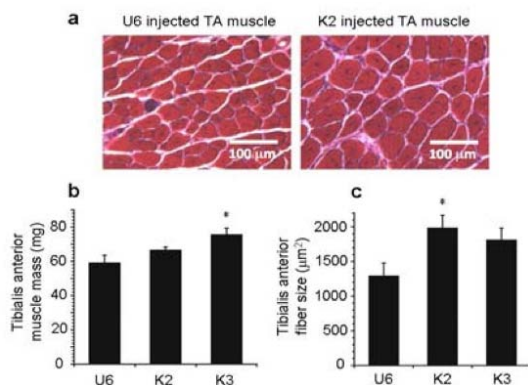


図4：ミオスタチン mRNA が shRNA による RNA 干渉により、低下した結果、前脛骨筋の筋繊維の肥大が確認された (a)。筋量 (b)、筋繊維横断面積 (c)、ともに増加していることが判る。

さらにこのモデル実験系を使って、プラスミドに組み込まれているドーピング遺伝子を導入した組織と血液から検出を試みた。その結果、血液からの検出は導入直後でも困難であったものの、導入後1ヶ月以内であれば、導入した組織（前脛骨筋とその極近傍の骨格筋）から直接検出できることを示した（図5）。

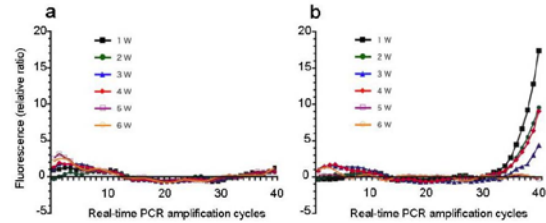


図5：ドーピング遺伝子として導入した shRNA を含むプラスミドが血液 (a) もしくは導入した筋組織 (b) から直接 RealTime PCR 法により検出（増幅）できるかを確認した。前者からは無理であったが、後者からは4週間までなら検出可能なが判った。

今後はこのモデル実験系を使って、ドーピング遺伝子の直接検出ではなく、遺伝子のドーピングにより攪乱された生体の代謝に注目して、間接的に遺伝子ドーピングの検出が血液サンプルからも可能かどうかを検討したい。

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12件）

- ① Kitaoka Y, Mukai K, Aida H, Hiraga A, Masuda H, Takemasa T, Hatta H.: Effects of high-intensity training on lipid metabolism in Thoroughbreds. *Am J Vet Res*. 73: 1813-1818, 2012（査読有）
- ② Tohru Takemasa, Naohisa Yakushiji, Dale Manjiro Kikuchi, Custer Deocaris, Widodo, Masanao Machida, Hidenori Kiyosawa: Fundamental study of detection of muscle hypertrophy-oriented gene doping by myostatin knock down using RNA interference. *J. Sport. Sci. Med.*, 11: 294-303, 2012（査読有）
- ③ Tohru Takemasa, Yousuke Abe, Chiaki Kumagai, Hidenori Kiyosawa: Possible involvement of microRNA-21 in skeletal muscle hypertrophy. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, 18: 5-15, 2012（査読有）
- ④ Masanao Machida, Kohei Takeda, Hiroyuki Yokono, Sachiko Ikemune, Yuka Taniguchi, Hidenori Kiyosawa, Tohru Takemasa:

Reduction of ribosome biogenesis with activation of the mTOR pathway in denervated atrophic muscle. *J. Cell Physiol.*, 227: 1569-1576, 2012 (査読有)

- ⑤ Chihiro Kohama, Hidemasa Kato, Koji Numata, Michiko Hirose, Tohru Takemasa, Atsuo Ogura, Hidenori Kiyosawa: ES cell differentiation system recapitulates the establishment of imprinted gene expression in a cell-type-specific manner. *Hum. Mol. Genet.*, 21: 1391-1401, 2012 (査読有)
- ⑥ Yu Kitaoka, Masanao Machida, Tohru Takemasa, Hideo Hatta: Expression of monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in overloaded mice plantaris muscle. *J. Physiol. Sci.*, 61: 467-472, 2011 (査読有)
- ⑦ Kitaoka Y, Hoshino D, Mukai K, Hiraga A, Takemasa T, Hatta H.: Effect of growth on monocarboxylate transporters and indicators of energy metabolism in the gluteus medius muscle of Thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.*, 72: 1107-1111, 2011 (査読有)
- ⑧ Kohei Takeda, Masanao Machida, Akiko Kohara, Naomi Omi, Tohru Takemasa: Effects of ctrulline supplementation on fatigue and exercise performance in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 57: 246-250, 2011 (査読有)
- ⑨ Yu Kitaoka, Hiroyuki Masuda, Kazutaka Mukai, Atsushi Hiraga, Tohru Takemasa, Hideo Hatta: Effect of training and detraining on monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in Thoroughbred horses. *Exp. Physiol.*, 96: 348-355, 2011 (査読有)
- ⑩ Masanao Machida, Tohru Takemasa: Ibuprofen administration during endurance training cancels running-distance-dependent adaptations of skeletal muscle in mice. *J. Physiol. Pharmacol.*, 61: 559-563, 2010 (査読有)
- ⑪ Masanao Machida, Tohru Takemasa: Increased macrophages following endurance exercise without severe injury play a role in angiogenesis in skeletal muscle. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, 15: 39-44, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 30 件)

- ① 福田麦穂, 武政徹: シトルリン摂取による廃用性筋萎縮の抑制効果の検討. **第157回日本体力医学会関東地方会**, 東京, 2013. 3.30
- ② 武政徹: 筋肥大の分子メカニズム-遺伝子ドーピング検出技術創成の試み-. **第157回日本体力医学会関東地方会**, 東京, 2013. 3.30
- ③ 駒形康文, 北岡祐, 菊池デイル万次郎, 武田紘平, 武政徹: スプリントトレーニングと持久性トレーニングが乳酸脱水素酵素に

及ぼす影響. **第67回日本体力医学会大会**, 岐阜, 2012. 9.15

- ④ 武政徹: ドーピング研究最前線 迫りくる危機に研究者はどう立ち向かうのか? 周辺研究領域の専門家がアスリートのドーピングの今と今後を考える(シンポジウム3). **第20回日本運動生理学会**, つくば, 2012.7.29
- ⑤ Shin Fujimaki, Masanao Machida, Kohei Takeda, Tohru Takemasa: High-Frequency Acupuncture Represses the Atrophy of Fast-Fiber Rich Skeletal Muscle. 59th Annual Meeting of American College of Sports Medicine in San Francisco, California/USA, 2012.6.1
- ⑥ 町田正直, 武田紘平, 横野裕行, 武政徹: 筋萎縮時におけるリボソームRNAの合成とmTOR経路の変化. **2012年生体運動研究合同班会議**, つくば, 2012.1.6
- ⑦ 新谷浩章, 小澤哲夫, 武政徹, 沼田治: 紅茶由来高分子ポリフェノール(MAF)がAMPKを介して培養筋細胞C2C12の有酸素代謝を向上させるメカニズム. **BMB2011 (第34回日本分子生物学会年会・第84回日本生化学会大会合同大会)**, 横浜, 2011.12.14
- ⑧ 菊池デイル万次郎, 沼田治, 武政徹: 高強度水泳トレーニングはマウス骨格筋においてHIF-1 α を介して解糖系代謝を亢進する. **BMB2011 (第34回日本分子生物学会年会・第84回日本生化学会大会合同大会)**, 横浜, 2011.12.15
- ⑨ 北岡祐, 遠藤友香里, 向井和隆, 間弘子, 武政徹, 八田秀雄: 骨格筋乳酸トランスポーターは一過性運動により増加する. **第66回日本体力医学会大会**, 山口, 2011.9.17
- ⑩ 藤巻慎, 町田正直, 武田紘平, 武政徹: 除神経モデルを用いた鍼通電刺激の筋萎縮抑制効果の検討. **第66回日本体力医学会大会**, 山口, 2011.9.17
- ⑪ 町田正直, 武田紘平, 横野裕行, 池宗佐知子, 北岡祐, 大野秀樹, 武政徹: 筋萎縮時におけるリボソームRNA合成低下を引き起こす因子の検討. **第66回日本体力医学会大会**, 山口, 2011.9.18
- ⑫ 横野裕行, 町田正直, 武政徹: 打撲損傷後の早期運動介入が骨格筋再生と線維化に及ぼす影響. **第66回日本体力医学会大会**, 山口, 2011.9.18
- ⑬ 北岡祐, 町田正直, 八田秀雄, 武政徹: 代償性過負荷による乳酸トランスポーター(MCT)の増加. **第19回日本運動生理学会**, 徳島, 2011.8.25
- ⑭ 町田正直, 武田紘平, 武政徹: 自発性走運動による骨格筋遅筋化に対するイブプロ

- フェン摂取の影響. **第19回日本運動生理学会**, 徳島, 2011.8.19
- ⑮小原亜希子, 町田正直, 麻見直美, **武政徹**: EMR (酵素処理ルチン) の摂取が協働筋切除による筋肥大モデルマウスに与える影響. **第19回日本運動生理学会**, 徳島, 2011.8.19
- ⑯Yu Kitaoka, Yukari Endo, Kazutaka Mukai, Atsushi Hiraga, **Tohru Takemasa**, Hideo Hatta: Acute Exercise and Monocarboxylate Transporter (MCT)1 and MCT4 in Thoroughbred Horses. 58th Annual Meeting of **American College of Sports Medicine** in Denver, USA, 2011.6.2
- ⑰町田正直, 北岡祐, 大野秀樹, **武政徹**: 除神経後の筋萎縮は、mTOR 経路の活性化状況下でのリボソーム合成の低下とタンパク分解の促進により進行する. **第65回日本体力医学会大会**, 千葉, 2010.9.18
- ⑱北岡祐, 遠藤友香里, 向井和隆, 平賀敦, **武政徹**, 八田秀雄: 高強度トレーニングがモノカルボン酸トランスポーター (MCT) および乳酸代謝に及ぼす影響. **第65回日本体力医学会大会**, 千葉, 2010.9.17
- ⑲町田正直, 武田紘平, 横野裕行, 北岡祐, **武政徹**: 除神経による筋萎縮に伴う mTOR 経路の活性化とリボソーム合成の低下. **第18回日本運動生理学会**, 鹿児島, 2010.8.1
- ⑳武田紘平, 町田正直, **武政徹**: シトルリンの摂取が運動による疲労および運動パフォーマンスに及ぼす影響. **第18回日本運動生理学会**, 鹿児島, 2010.7.31
- ㉑モノカルボン酸トランスポーター (MCT) は代償性筋肥大により増加する. **第18回日本運動生理学会**, 鹿児島, 2010.7.31
- ㉒Yu Kitaoka, Yukari Endo, Kazutaka Mukai, Atsushi Hiraga, **Tohru Takemasa**, Hideo Hatta: High-intensity Training Increases Fatty Acid Oxidation In Thoroughbred Horses. 57th Annual Meeting of **American College of Sports Medicine** in Florida Miami Beach, USA, 2010.6.3
- ㉓Tomoaki Eguchi, **Tohru Takemasa**, Tetsuo Ozawa, Osamu Numata: Black Tea High-Molecular-Weight Polyphenol (MAF; Mitochondria Activation Factor) Increases Oxidative Slow Muscle Fibers and Improves Endurance Capacity via AMPK in Mice. 4th International Conference on Polyphenol and Health, Yorkshire, England, 2009.12.8
- ㉔北岡祐, 向井和隆, 平賀敦, **武政徹**, 八田秀雄: トレーニングおよびデトレーニングが

- モノカルボン酸トランスポーター (MCT) タンパク質量に及ぼす影響. **第64回日本体力医学会**, 新潟, 2009.9.18
- ㉕町田正直, 大野秀樹, **武政徹**: 代償性過負荷による筋肥大過程で起こる遺伝子発現の解析と新規経路の探索. **第64回日本体力医学会**, 新潟, 2009.9.19
- ㉖**武政徹**: 骨格筋運動適応メカニズムの分子レベルでの解明を目指して (シンポジウム The Myogenesis - 骨格筋の発生・分化・再生・適応の分子機構 - オーガナイザー: 竹倉宏明, 町田修一). **第64回日本体力医学会**, 新潟, 2009.9.18
- ㉗江口友昭, **武政徹**, 小澤哲夫, 沼田治: 紅茶ポリフェノール (MAF) がマウス骨格筋の遅筋化に及ぼす影響. **日本動物学会第80回**, 静岡, 2009.9.18
- ㉘熊谷千明, **武政徹**: 代償性筋肥大における miR-21 の動態とその特性. **第17回日本運動生理学会**, 東京, 2009.7.25
- ㉙町田正直, **武政徹**: 代償性過負荷による筋肥大の過程における遺伝子発現の網羅的解析と重要経路の解析. **第17回日本運動生理学会**, 東京, 2009.7.25
- ㉚緒方知徳, 石倉恵介, **武政徹**, 宮川俊平: 超音波刺激の温熱効果によるラット骨格筋 Heat Shock Protein 発現量の増加. **第17回日本運動生理学会**, 東京, 2009.7.25

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 筋肥大促進のための食品、補助食品、及びサプリメント

発明者: 小原亜希子、**武政徹**、麻見直美、後藤一成

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2010-149911

出願年月日: 平成22年6月30日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武政 徹 (TAKEMASA TOHRU)

筑波大学・体育系・教授

研究者番号: 50236501

(2) 研究分担者

清澤秀孔 (KIYOSAWA HIDENORI)

高知大学・医学部・特任准教授

研究者番号: 30295422