

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19722

研究課題名（和文）運動を「やめる」刺激が筋機能を向上させるか？

研究課題名（英文）Does stimulation to stop exercise improve muscle function?

研究代表者

河上 敬介（Kawakami, Keisuke）

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：60195047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、運動停止直後に活性化するオートファジーが、運動による筋機能向上に寄与するかどうかを検証することである。この目的のために、筋萎縮モデルと高齢モデルを用いた。ただ、我々の実験の運動負荷モデルでは、培養細胞で起こるような現象は認められなかった。運動負荷の量や時間が関係していると考えられる。また、オートファジーによる代謝後産物のクリアランスに重要な筋内リンパ管の運動による形態応答は、高齢マウスと若齢マウスでは異なる事、また速筋と遅筋とでも異なる事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋肥大に至適とされる高強度の運動は、高齢者や疾患を対象とするリハビリテーションにおいては現実的でない。また、実際の臨床現場では、筋肥大が望めない低強度の負荷で運動処方を行うことが多い。この低強度運動において、筋肥大はみられなくとも筋出力は向上するという“不思議”な現象を多くの療法士が経験する。我々が明らかにしたトリ培養筋管細胞の収縮運動で、収縮運動停止直後数時間でおこるオートファジー活性化による筋細胞内のクリアランスがカギとなると考えられる。本現象とメカニズムが明らかになれば、筋萎縮の患者や高齢者に対して有効な、新たな運動療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to determine the effect of autophagy, which is activated immediately after exercise cessation, on exercise-induced improvement of muscle function. We used muscle atrophy and aging models for this purpose. The exercise load model of our experiments did not show the same results as occur in cultured cells. We conclude that the cause is related to the amount and duration of exercise load. If this phenomenon is clarified in animals, it will lead to the development of new exercise therapies that are effective for patients with muscle atrophy and for the elderly.

研究分野：基礎理学療法学

キーワード：骨格筋 筋機能 オートファジー マウス

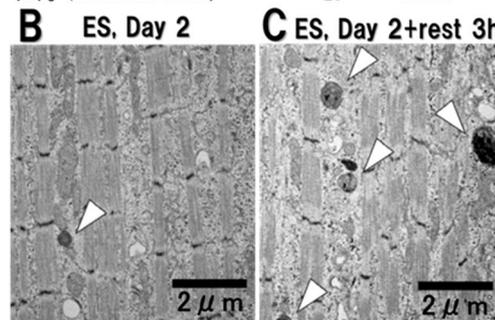
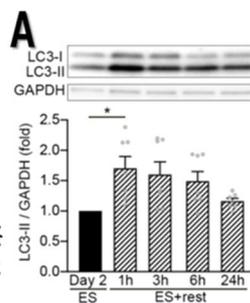
### 1. 研究開始当初の背景

運動による筋機能向上の検証は、筋出力と筋横断面積との正の相関を理由に、筋肥大やそれをもたらすタンパク質合成系シグナルに着目して行われている。しかし、筋肥大に至適とされる高強度の運動は、高齢者や疾患を対象とするリハビリテーションにおいては現実的でない。また、実際の臨床現場では、筋肥大が望めない低強度の負荷で運動処方を行うことが多い。この低強度運動において、筋肥大はみられなくとも筋出力は向上するという“不思議”な現象を多くの理学療法士が経験する。この現象は、システマティックレビューでも報告されている(Bao, Aging and Disease 2020)。ところが未だ、臨床現場においては、筋出力向上のために筋肥大を目標とするストラテジーが形式的にとられる現状がある。

これまで、運動による筋機能向上のメカニズム探求は、筋肥大応答を中心に検証されてきた。運動時の筋収縮で起こる mTOR の活性化は、タンパク質の合成系促進と分解系抑制を誘導し、筋肥大に寄与することがよく知られている (Bodine, Nat Cell Biol 2001)。一方で、運動により大量発生する活性酸素は、変性細胞内小器官を蓄積させる。この蓄積は細胞にとって有害で、機能低下を引き起こす (Castets, Cell Metab 2013)。よって、筋収縮による分解系の抑制は筋機能の低下につながるという矛盾が生じる。加えて、加齢や長期臥床により萎縮した筋中にも、不要な変性細胞内小器官が蓄積される (Yoshioka, Front in Cell Dev 2019)。運動や加齢、萎縮によりダメージを受けた細胞の回復には、タンパク質分解系の始動が必要なはずである。この様に、一見単純な運動と筋機能向上の間には、様々な生理応答の説明が未解決のまま存在している。

(経緯)我々は、トリ培養 myotube の収縮運動で筋肥大が確認できたモデルで、これまで日単位の報告しかなかった分解系変化を時間単位で調べた。その結果、収縮運動停止直後数時間で起こるオートファジー活性化を見出した(図, Yoshioka, BBRC 2020)。この活性化は、一見矛盾にも見える筋収縮と筋機能向上の間にある生理応答を説明しうる、重要なイベントであると考えた。以上より、『低負荷の運動で高齢者の筋機能が向上する理由には、この運動を「やめる」刺激で活性化されるオートファジーが関与しているのでは?』、それでは『最低どのくらいの負荷運動でこのスイッチは入るのか?』、『このスイッチは、筋機能の向上の視点で、タンパク質合成と同じ、もしくはそれ以上に重要なイベントかもしれない。』など、本研究の根幹をなす疑問が湧き出るに至った。

【図】 2日間の電気刺激収縮運動により抑制された、オートファジーが、運動終了数時間活性化した(A)。運動時に少ない筋細胞内のオートリソソーム(B, 矢じり)が、終了3時間後に増加した(C)。(Yoshioka 2020)



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、筋収縮運動停止直後に活性化するオートファジーが、筋肥大とは別の観点から、運動による筋機能向上に寄与するかどうかを、マウス個体レベルで明らかにすることである。また、オートファジー活性に有効な至適運動強度や時間などを明らかにすることである。そして萎縮筋や加齢筋への影響を検証することである。更に、オートファジーによる代謝産物のクリアランスやエネルギーサプライに重要と考えられる、運動における加齢筋内のリンパ管や毛細血管の形態応答を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

以下に示した実験のうち、モデル作製や至適運動強度の検証は研究代表者河上と研究分担者伊東が、組織学的検証に関する実験は研究代表者河上が、生化学的検証や分子生物学的検証に関する実験は研究分担者紀が実施した。

#### (1) モデル作製と至適運動強度の検証

筋萎縮モデルに尾部懸垂モデルマウスを用いる。一般的に用いられる2週間の尾部懸垂に加え、4週間の尾部懸垂を行い、臨床により近いと考えられるモデルを検証した。負荷運動は、我々の開発した麻酔下のマウスの下腿筋群に対して、電気刺激を用い負荷量を自由にコントロールできる足関節運動・評価装置を用い、電気刺激強度や頻度を変えて検証した。

#### (2) 組織学的検証

組織学的には、HE染色により筋の基本構造を検証した。また、抗CD31抗体を用いて毛細血管を、抗LIVE1抗体を用いてリンパ管を染色し、量や大きさの変化を検証した。

#### (3) 生化学的検証

生化学的検証においては、タンパク質合成系のシグナル分子としては p-Akt/t-Akt について、分解系シグナル分子としては LC3 /LC3 , p62 について検証した。また、毛細血管やリンパ管新生に関わるシグナル分子の活性や不活性に関わる mRNA の増減を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) モデルと至適運動強度

筋萎縮モデルマウスには、一般的に用いられる 2 週間の尾部懸垂よりも、4 週間の尾部懸垂の方が適切であると考えられた。その理由を以下に述べる。非尾部懸垂群に比した尾部懸垂群のヒラメ筋の筋線維横断面積は、2 週間の尾部懸垂で 63%、4 週間の尾部懸垂で 67%と、有意な低値を示した。この尾部懸垂群の筋力（最大底屈トルク）は、非尾部懸垂群に比べて 54%であった。Sandona (2012) の報告では、マウスのヒラメ筋 CSA は 13 週間の宇宙飛行で 65%に減少したことから、筋萎縮は尾部懸垂 2 週間までに急速に進行し、その後の進行は少ないと考えられた。よって、4 週間の尾部懸垂による筋萎縮モデルマウスは、臨床で理学療法の対象となる慢性的な寝たきりモデルとして使用できる可能性があると考えられた。

この 4 週間の尾部懸垂による筋萎縮モデルマウスに対して低強度の負荷運動の量を決定するために、運動強度と運動持続時間との関係を検証した。下腿後面に電気刺激（50 Hz, 0.2~0.4 mA）を 5 秒に 1 回与え等尺性収縮を行わせることにより、運動開始時のトルクが最大トルクの 20%となり、5 秒間収縮、5 秒間弛緩を 18 分間繰り返し続けられることが判明した。ただ、運動終了時のトルクは最大トルクの平均 7.8%にまで低下していた。

##### (2) 筋萎縮モデルや高齢モデルマウスに対する運動後の生化学的応答

4 週間の尾部懸垂によるモデルマウスに対して、最大トルクの 20%の負荷運動を実施し、負荷運動直後及び 1 時間後のタンパク質合成系と分解系シグナル分子の活性化について検証した。タンパク質合成系のシグナル分子としては p-Akt/t-Akt について、分解系シグナル分子としては LC3 /LC3 , p62 について検証した。合成系に関しては、これまでの研究と同様に運動後の p-Akt/t-Akt の上昇傾向が認められた。一方、分解系の LC3 /LC3 , p62 に関しては、若干上昇する個体があるものの、CON とほぼ変わらない例が多いことが判明した。即ち、我々の筋萎縮モデルマウスや高齢モデルマウスにおいては、培養系では認められ、筋収縮運動停止直後に起こると予想された分解系の活性化に関しては認められなかった。高齢マウスの骨格筋に集積するオートファゴゾームが、自由運動飼育により減少する。この自由運動飼育では、1 日平均 5-8km 走行する。また、培養系のモデルでも、2 日間持続的に収縮を繰り返す刺激を用いている。今回の検証で用いたモデルは、収縮運動を 1 日 18 分間繰り返し行うことが可能なモデルであった。しかし、この 18 分間で収縮力が開始時の 10%以上減少していた。培養細胞と同様の結果が起こらなかった理由には、刺激時間や強度の違いが原因であるかもしれない。今後検討が必要である。

##### (3) 高齢モデルマウスに対する毛細血管やリンパ管の組織学的、生化学的検証

オートファジーによる代謝後産物のクリアランスやエネルギーサプライに重要と考えられる、加齢筋内のリンパ管や毛細血管が運動によりどう形態応答をするか検証した。リンパ管は抗 LIVE1 抗体を用いて、毛細血管は抗 CD31 抗体を用いて染色し、密度や大きさの変化を追った。その結果、高齢マウスは若齢マウスの運動による応答と異なる応答を示す事、また速筋と遅筋とも異なる応答を示す事が判明した。

#### 文献

Bao W, Sun Y, Zhang T, et al.: Exercise Programs for Muscle Mass, Muscle Strength and Physical Performance in Older Adults with Sarcopenia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Aging Dis.* 2020 Jul 23;11(4):863-873. doi: 10.14336/AD.2019.1012. eCollection 2020 Jul.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al.: Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):1014-9. doi: 10.1038/ncb11011014. PMID: 11715023

Castets P, Lin S, Rion N, et al.: Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy. *Cell Metab.* 2013 May 7;17(5):731-44. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.015. Epub 2013 Apr 18.

Yoshioka K, Fujita R, Seko D, et al.: Distinct Roles of Zmynd17 and PGC1 in Mitochondrial Quality Control and Biogenesis in Skeletal Muscle. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Dec 10;7:330. doi: 10.3389/fcell.2019.00330. eCollection 2019.

Yoshioka K, Sasai N, Kurogi Y, et al.: Cessation of electrically-induced muscle contraction activates autophagy in cultured myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Dec 10;533(3):410-416. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.009. Epub 2020 Sep 22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Kawashima Takafumi, Ji Rui Cheng, Itoh Yuta, Agata Nobuhide, Sasai Nobuaki, Murakami Taro, Sokabe Masahiro, Hamada Fumihiko, Kawakami Keisuke | 4. 巻<br>64              |
| 2. 論文標題<br>Morphological and biochemical changes of lymphatic vessels in the soleus muscle of mice after hindlimb unloading                             | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Muscle & Nerve  | 6. 最初と最後の頁<br>620 ~ 628 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/mus.27402   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Yuma Tamura, Takafumi Kawashima, Rui-Cheng Ji, Nobuhide Agata, Yuta Itoh, Keisuke Kawakami  | 4. 巻<br>12      |
| 2. 論文標題<br>Histological and biochemical changes in lymphatic vessels after skeletal muscle injury induced by lengthening contraction in male mice | 5. 発行年<br>2024年 |
| 3. 雑誌名<br>Physiological Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.14814/phy2.15950.  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田村悠磨, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介 |
| 2. 発表標題<br>筋損傷後のリンパ管は毛細血管よりも早く変化する          |
| 3. 学会等名<br>第27回日本基礎理学療法学会学術大会               |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊東佑太, 吉岡潔志, 田村悠磨, 縣信秀, 清島大資, 河上敬介  |
| 2. 発表標題<br>筋力トレーニングによる筋委縮回復促進効果への筋衛星細胞取り込みの関与 |
| 3. 学会等名<br>第27回日本基礎理学療法学会学術大会                 |
| 4. 発表年<br>2022年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田村悠磨, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介 |
| 2. 発表標題<br>マウス骨格筋損傷からの回復過程におけるリンパ管の変化       |
| 3. 学会等名<br>第26回 日本基礎理学療法学会学術大会              |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>川島隆史, 田村悠磨, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 濱田文彦, 河上敬介 |
| 2. 発表標題<br>廃用性筋萎縮時に生じるマウスヒラメ筋内リンパ管の分布応答           |
| 3. 学会等名<br>日本解剖学会第77回九州支部学術集会                     |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田村悠磨, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介           |
| 2. 発表標題<br>骨格筋損傷後のリンパ管の分布・形態変化-伸長性収縮による筋損傷モデルマウスを用いて- |
| 3. 学会等名<br>日本解剖学会第77回九州支部学術集会                         |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田村悠磨, 志賀さくら, 森菜穂, 藪口爽那, 山口実乃里, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介 |
| 2. 発表標題<br>骨格筋損傷後のマクロファージとリンパ管の分布変化とその関係性                            |
| 3. 学会等名<br>第28回日本基礎理学療法学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田村悠磨, 川島隆史, 橋本実央, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介 |
| 2. 発表標題<br>C57/BL6J雄性マウスのヒラメ筋、足底筋におけるリンパ管の分布の違い   |
| 3. 学会等名<br>第129回日本解剖学会総会・全国学術集会                   |
| 4. 発表年<br>2024年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊東佑太, 吉岡潔志, 田村悠磨, 縣信秀, 清島大資, 河上 敬介      |
| 2. 発表標題<br>廃用性筋萎縮からの回復促進下で生じる筋衛星細胞由来細胞の既存筋線維への取り込み |
| 3. 学会等名<br>第129回日本解剖学会総会・全国学術集会                    |
| 4. 発表年<br>2024年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>河上敬介                            |
| 2. 発表標題<br>筋損傷からの早期回復のための治療戦略は？            |
| 3. 学会等名<br>第23回日本超音波骨軟組織学会学術総会（全国大会）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

〔図書〕 計1件

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>和田誠, 熊井司, 河上敬介 他  | 4. 発行年<br>2023年 |
| 2. 出版社<br>日本医事新報社           | 5. 総ページ数<br>352 |
| 3. 書名<br><スポーツ障害>筋損傷のエコー活用術 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                          | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 伊東 佑太<br><br>(Ito Yuta)<br><br>(30454383)    | 名古屋学院大学・リハビリテーション学部・准教授<br><br><br><br>(33912) |    |
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 紀 瑞成<br><br>(Ji Rui-Cheng)<br><br>(60305034) | 大分大学・福祉健康科学部・准教授<br><br><br><br>(17501)        |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |