

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：13902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500660

研究課題名（和文） クレブテロールの筋萎縮抑制作用に関する研究

研究課題名（英文） Study on the antiatrophic effects of clenbuterol in skeletal 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

研究成果の概要（和文）： $\beta 2$ アゴニストのクレ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。本研究は固定によるラットの骨格筋の萎縮に対するクレブテロール投与の影響を調べた。本研究結果は、クレブテロールは長指伸筋の重量と筋線維横断面積の低下を抑えたが、ヒラメ筋ではその低下を抑えなかった。これらの結果は、ラット骨格筋の固定による萎縮において、クレブテロールの萎縮抑制作用は速筋に特異的であることを示唆していた。

研究成果の概要（英文）：The $\beta 2$ -agonist clenbuterol increases muscle mass by promoting muscle protein synthesis and/or attenuating protein degradation. This study was to investigate the effect of clenbuterol administration on immobilization atrophy in rat skeletal muscle. The findings of the present study showed that clenbuterol attenuated the decrease in muscle mass and single fiber cross-sectional area in the extensor digitorum longus muscle, but did not in soleus muscle. These results suggested that antiatrophic effects are specific for the fast-twitch muscle on the immobilization atrophy in rat skeletal muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合領域

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：クレブテロール、ギプス固定、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮は様々な原因により起こるが、結果的に筋機能の低下を招くことから、いかに筋萎縮を軽減するかは生活上非常に重要な問

題である。骨格筋の萎縮は、老齢、外科手術後の固定、脊髄損傷、癌、疾病による慢性的ベッドレストなどに関連した身体活動量の低下により引き起こされる。これらの筋萎縮

に共通する要因は筋の使用が低下することである。この筋の使用低下に起因する萎縮のメカニズムに関しては、様々な実験モデルを使った様々な研究で説明が行われている。

一方で、筋萎縮とは対照的な生体応答として筋肥大がある。筋肥大は運動の実施や活動量の増加により起こるが、薬物の投与によっても起こることが広く知られている。その薬物の一つで、ドーピング薬物であり喘息治療薬・体質の改善に用いられるクレンプテロールは、 $\beta 2$ -アゴニストの一つで選択的に $\beta 2$ -アドレナリン受容体と結合して、非ステロイド性タンパク同化作用により筋肥大を起こすことが知られている。近年、研究分担者らは、このクレンプテロールの肥大作用は遅筋線維や心筋線維に比べて、速筋線維で顕著であり、さらに速筋線維では筋 RNA 量の増加からタンパク合成が促進されている可能性を報告している。

そこで、筋の萎縮とクレンプテロールの筋肥大作用を組み合わせる実験を行うことによって、クレンプテロール投与による筋萎縮の抑制作用の可能性について検討するに至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、萎縮モデルにおいてクレンプテロールが選択的に作用する骨格筋の $\beta 2$ アドレナリン受容体 mRNA の発現量、その発現調節に関与する転写調節因子 (cAMP response element binding protein: CREB, glucocorticoid receptor: GR) および転写後調節因子 (Hu antigen R: HuR, AU-rich element binding / degradation factor 1: AUF1)、収縮タンパク質量、筋タンパク質量、筋線維横断面積について調べる。これらを調べることによって、速筋と遅筋で異なる萎縮のメカニズムをある程度解明できる。

(2) 固定期間中にクレンプテロールを投与して、その影響を前記した項目について同様に調べる。クレンプテロール投与は速筋に選択的に肥大を引き起こすところから、選択的に速筋の萎縮に対してその抑制作用が現れやすいと考えられる。

(3) 骨格筋は速筋線維と遅筋線維で構成されており、速筋か遅筋かを決定するのはその構成比である。したがって、組織化学的に筋線維の応答を観察することによって、骨格筋における筋線維レベルでの萎縮抑制作用も検討することができる。

3. 研究の方法

当初、本研究では萎縮モデルとしてギプス固定と後肢懸垂によるモデルを採用する予定であった。はじめに、これらの異なる萎縮

モデルの基礎データを得るための実験を行った。しかし、採血等の問題から後肢懸垂での血中基質の基礎データの収集が不可能であった。特に、血中アドレナリンレベルの測定は、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を選択的に作用するクレンプテロールを用いる研究には不可欠であった。したがって、本研究ではギプス固定によるモデルに特化して研究を進めた。

(1) ギプス固定による筋萎縮に関する研究を行った。実験には7週齢のSD系雄ラットを用い、予備飼育後の8週齢時に二群に分けた。一群にはペントバルビタール麻酔下にて、脚が弛緩した状態で、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)を行った(Booth & Kelso, 1973)。もう一群は対照群とした。ギプス固定10日後に断頭屠殺後、分析のため、採血を行い、その後各種臓器と後肢骨格筋を摘出した。

(2) クレンプテロール投与による筋肥大に関する研究を行った。実験には7週齢のSD系雄ラットを用い、予備飼育後の8週齢時に二群に分けた。一群にはクレンプテロールを毎日1.0mg/kgを脛背部皮下より投与した。もう一群は対照群として、当該量の生理食塩水(NaCl)を同様な方法で投与した。投与10日後、先の実験と同様にサンプリングを行った。

(3) クレンプテロール投与による萎縮抑制作用に関する研究を行った。実験には7週齢のSD系雄ラットを用い、予備飼育後の8週齢時に二群に分けた。両群にはペントバルビタール麻酔下にて、先と同様にギプスを行った。一群には固定と同時に毎日先と同様にクレンプテロールを投与した。もう一群は対照群として、当該量の生理食塩水を投与した。10日後、先の実験と同様にサンプリングを行った。

4. 研究成果、

(1) ギプス固定により速筋(長指伸筋)、遅筋(ヒラメ筋)共に筋重量は低下したが、その低下は遅筋で著しかった。ギプス固定による体重あたりの筋重量は、速筋では変化しなかったが、遅筋では著しく低下した。ギプス固定により速筋の筋線維横断面積は速筋線維のみで低下を示したが、タイプIIb線維の低下が著しかった。ギプス固定により遅筋の筋線維横断面積は、遅筋線維、速筋線維共に著しく低下した。これらの結果は、ギプス固定は抗重力筋である遅筋に著しい萎縮をもたらすとした過去の報告と一致していた。 $\beta 2$ アドレナリン受容体 mRNA の発現量は

固定により速筋、遅筋共に低下したが、その低下は有意ではなかった。

(2) クロンプテロールの投与により速筋(長指伸筋)、遅筋(ヒラメ筋)共に筋重量は増加したが、その増加は速筋で著しかった。クロンプテロール投与による体重あたりの筋重量は速筋では増加したが、遅筋では変わらなかった。クロンプテロール投与により速筋の筋線維横断面積は、速筋線維、遅筋線維共に増加した。クロンプテロール投与により遅筋の筋線維横断面積は、遅筋線維、速筋線維共に変化しなかった。これらの結果は、クロンプテロールは選択的に速筋を肥大させるという過去の報告と一致していた。 $\beta 2$ アドレナリン受容体 mRNA の発現量は、速筋では増加し、遅筋では低下していた。

(3) クロンプテロール投与による筋萎縮抑制作用に関する研究を行った。クロンプテロール投与により速筋の筋重量は固定筋に比べて増加し、萎縮抑制効果が示された。しかし、クロンプテロール投与により遅筋の重量は変化しなかった。クロンプテロール投与により速筋の遅筋線維は肥大を示し、速筋線維は固定筋に比べて肥大していた。一方、クロンプテロール投与により遅筋の筋線維はタイプに関わらず固定筋に違いはなかった。

これらの結果より、ギプス固定を用いた萎縮モデルにおいて、クロンプテロールの投与は萎縮の抑制作用を示すが、その効果は速筋に特異的であることが示された。また、同じタイプの筋線維であっても、どの筋に存在するかでクロンプテロールの影響は異なることが示された。

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 4 件)

① 辻本尚弥、鈴木英樹

ラット褐色脂肪組織に対する後肢ギプス固定の影響、久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要、Vol. 20、13-17、2013
<http://www.mii.kurume-u.ac.jp/kenspo/kenkyu/index.html>

② 鈴木英樹、辻本尚弥

ラット内側腓腹筋における異なる部位の形態的・組織化学的適応変化、愛知教育大学研究報告. 芸術・保健体育・家政・技術科学・創作編、Vol. 61、37-39、2012
[http://repository.aichi-edu.ac.jp/dspace/kiyo/han19/第61輯%20\(61\)](http://repository.aichi-edu.ac.jp/dspace/kiyo/han19/第61輯%20(61))

③ Shogo Sato, Hideki Suzuki, Hisaya Tsujimoto, Ken Shirato, Kaoru Tachiyashiki, Kazuhiko Imaizumi.
Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. Life Sciences. 査読有, Vol. 89, 962-967, 2011
Doi: 10.1016/j.lfs.2011.10.008

④ 辻本尚弥、鈴木英樹

ラットの臓器及び脂肪細胞重量に対するギプス固定による不活動の影響、久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要、Vol. 19、15-22、2011
<http://www.mii.kurume-u.ac.jp/kenspo/kenkyu/index.html>

[学会発表] (計 6 件)

① 西沢富江、鈴木英樹、春日規克

不活動がラット骨格筋神経筋接合部形態に及ぼす影響、第 67 回日本体力医学会、2012 年 9 月 15 日、長良川国際会議場

② 三橋亮介、白土 健、佐藤章悟、鈴木英樹、辻本尚弥、立屋敷かおる、今泉和彦

不活動に伴うラット白血球系細胞数の応答、第 66 回日本体力医学会、2011 年 9 月 18 日、海峡メッセ下関

③ 佐藤章悟、鈴木英樹、辻本尚弥、白土 健、立屋敷かおる、今泉和彦

ギプス固定によりラットヒラメ筋のグルココルチコイド受容体発現は低下する、第 66 回日本体力医学会、2011 年 9 月 17 日、海峡メッセ下関

④ 辻本尚弥、佐藤章悟、鈴木英樹、立屋敷かおる、白土 健、今泉和彦

ギプス固定によるラット褐色・白色脂肪組織における β -アドレナリン受容体、グルココルチコイド受容体、脱共役タンパク質発現の応答、第 66 回日本体力医学会、2011 年 9 月 17 日、海峡メッセ下関

⑤ Shogo Sato, Hisaya Tsujimoto, Hideki Suzuki, Kaoru Tachiyashiki, Ken Shirato, Kazuhiko Imaizumi

Effect of casted-immobilization on the expressions of β -adrenergic receptors, glucocorticoid receptor and uncoupling proteins in brown and white, The 7th congress of federations of Asian and Oceanian Physiological Societies, 2011 年 9 月 12 日、Taipei (中華民国)

⑥ Shogo Sato, Hideki Suzuki, Hisaya Tsujimoto, Kaoru Tachiyashiki, Ken

Shirato, Kazuhiko Imaizumi

Casted-immobilization downregulatea
glucocorticoid receptor level in rat
slow-twitch soleus muscle、The 7th congress
of federations of Asian and Oceanian
Physiological Societies、2011年9月12日、
Taipei (中華民國)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英樹 (HIDEKI SUZUKI)
愛知教育大学・教育学部・教授
研究者番号：40235990

(2) 研究分担者

今泉 和彦 (KAZUHIKO IMAIZUMI)
早稲田大学・人間科学学術院・教授
研究者番号：60145068

辻本 尚弥 (HISAYA TSUJIMOTO)
久留米大学・健康スポーツセンター・教授
研究者番号：70299519

(3) 連携研究者

立屋敷 かおる (KAORU TACHIYASHIKI)
上越教育大学副学長・理事
研究者番号：20119324

白土 健 (KEN SHIRATO)
早稲田大学・人間科学学術院・助手
研究者番号：60559384

(4) 研究協力者

佐藤 章悟 (SHOGO SATO)
杏林大学・医学部・博士研究員

三橋 亮介 (RYOSUKE MITSUHASHI)
早稲田大学・人間科学研究科・大学院生