

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650324

研究課題名（和文）

ガンに伴う悪液質に対する低強度・高強度運動の萎縮予防効果の検証

研究課題名（英文）

Protective effects of exercise on muscle wasting caused by cachexia

研究代表者

藤野英己 (FUJINO HIDEMI)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20278998

研究成果の概要（和文）：

本研究では、分子生物的手法により悪液質に伴う骨格筋の筋萎縮を捉え、TNF- α 等のレギュレータとなる主要因子であるサイトカインや筋特異的なプロテアソーム系の発現について検証した。また、運動による悪液質に伴う筋萎縮の予防についても検証を行い、悪液質に対する運動を提案することを目的としている。悪液質の骨格筋では、TNF- α の増加が観察され、Atrogin-1 の発現も増加した。一方、運動は TNF- α を抑制し、Atrogin-1 の発現も低下させた。また、筋線維代謝も低下したが、運動により代謝の低下を予防できた。一方、運動による IL-6 の発現は観察されなかった。本研究で使用した中等度の運動は、IL-6 等のマイオカインの発現は観察されなかったが、悪液質による炎症性サイトカインの増加に伴う筋萎縮を予防することができた。これらの結果からガンに伴う悪液質は、進行性の異化亢進にともなう全身性機能低下であり、運動は全身調整や全身性機能低下を予防するために推奨できるツールと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to investigate the effects of exercise on muscle wasting caused by disuse and cancer. Cachexia resulted in the reduction of muscle cross-sectional area and metabolic enzyme, and the overexpression of TNF- α and atrogin-1/MAFbx. Exercise training attenuates muscle atrophy and the overexpression of TNF- α and atrogin-1/MAFbx. Thus, exercise training attenuates muscle wasting associated with some catabolic conditions. These results provide further evidence for the effects of exercise on muscle wasting. It was found that not only resistance exercise protocols, but also chronic endurance exercises could attenuate skeletal muscle wasting induced by disuse and cancer through down-regulation of TNF- α and indirect down-regulation of atrogin-1/MAFbx gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮，運動，悪液質，サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

本邦では、ガンを罹患し、治療中、あるいは治療後の生存者は 2015 年には 533 万人に達すると予測されており、ガンが「不治の病」から「ガンと共存」する時代になってきたと

いえる。ガンに伴う悪液質は、進行性の異化亢進にともなう全身性機能低下であり、ガン患者の 50% にみられる症状である (DeWys, 1980; Tisdale, 1997)。悪液質状態は、細胞レベルにおける代謝異常を生じ、骨格筋では、

収縮タンパク質を減少させるため、筋断面積が縮小し、筋力や筋持久力の低下を引き起こし、廃用症候群をきたしやすい(Tisdale, 2000)。また、この機序にはいくつかのサイトカインが関与するが、主に筋タンパク質の異化作用を促進するサイトカインとしては TNF- α (腫瘍壊死因子) が知られている。この TNF- α は、異化反応、特にユビキチンプロテアソームの活動を惹起するリガンドとして作用していることが知られている (Granado, 2006; Deuster, 1985)。一方、悪液質に対する運動療法は、確立した状態でなく、科学的なエビデンスを示す報告は散見される程度で一定した見解も得られていない状態にある。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物的手法により悪液質に伴う骨格筋の筋萎縮を捉え、TNF- α 、IL-6 等のレギュレータとなる主要因子であるサイトカインや筋特異的なプロテアソーム系の発現について検証する。また、運動による悪液質の治療・予防について検証する。

3. 研究の方法

マウスを用いて悪液質に伴う筋萎縮の発症について検討を行った。また、悪液質のトリガーになるのは TNF- α ・IL-6 等のサイトカインが関与していると考えられている。本研究においても、TNF- α ・IL-6 の関与があるかどうかについて検証を行う。マウスより得られた骨格筋から TNF- α ・IL-6 の検出を行う。測定方法はリアルタイム PCR 法、ELISA 法を使用する。さらに骨格筋のタンパク質の減少に深く関する筋特異的に発現するユビキチンプロテアソーム系の mRNA 活性をリアルタイム PCR 法、Western Blotting 法により検出する。

4. 研究成果

悪液質のモデルを作製するために各種濃度の LPS (リポポリサッカライド) を投与して、筋萎縮や代謝活性が変化するかどうかについて検証した。その結果、LPS を 20mg/kg 投与することにより 24 時間後に筋萎縮が発生

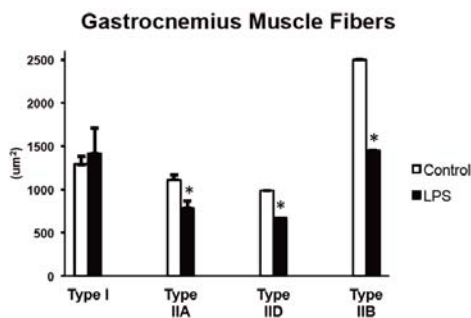


図 1. 筋線維横断面積
LPS: LPS 投与をしたマウスの骨格筋
*Control との有差 (p < 0.05)

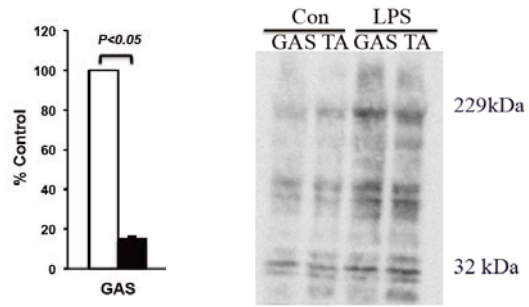


図 2. 骨格筋線維の代謝活性

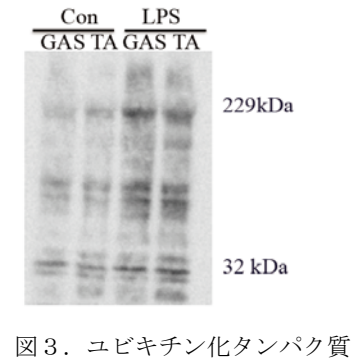


図 3. ユビキチン化タンパク質

することが明確となった (図 1)。また、同様に骨格筋線維の代謝活性 (SDH 活性) を測定すると LPS 付加により急激な低下を示すことが明らかとなった (図 2)。ユビキチン化タンパク質についても増加した (図 3)。さらに悪液質に伴う骨格筋の萎縮のトリガーとして作用すると考えられている TNF- α を測定すると、骨格筋、及び血漿とも増加が

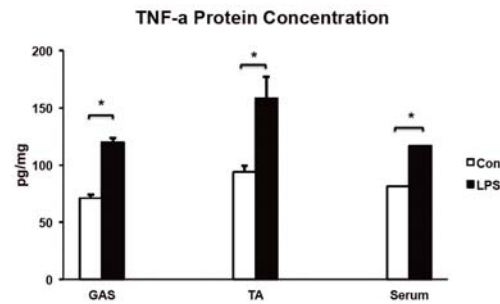


図 4. TNF- α の発現

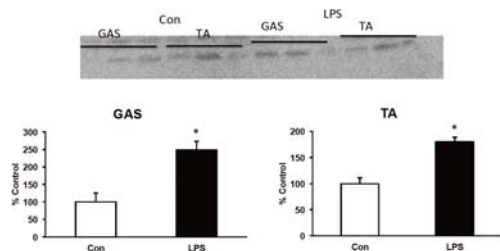


図 5. Atrogin-1 の発現

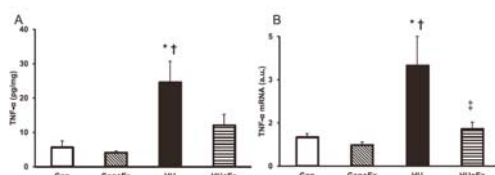


図 6. TNF- α の発現
Con+Ex: 正常群に運動をした群, HU: 筋萎縮誘発群, HU+Ex: 筋萎縮誘発群に運動をした群
*, †, 及び ‡ はそれぞれ Con 群, Con+Ex 群, 及び HU 群に対しての有差 (P < 0.05)。

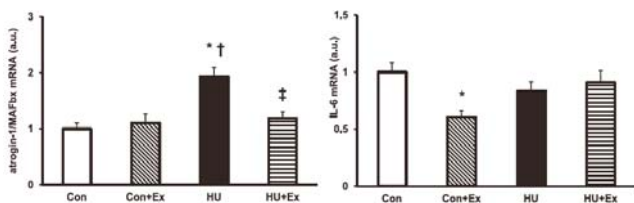


図7. Atrogin-1, IL-6 の発現

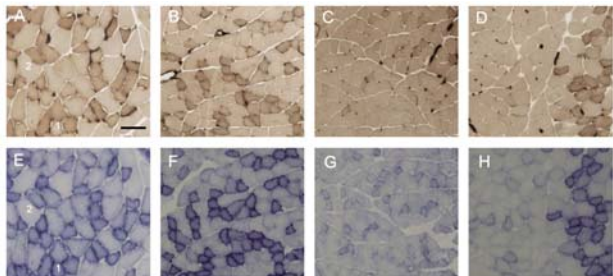


図8. 筋横断(上段, A-D)と筋代謝(下段, E-H)
Con (A, E), Con+Ex(B, F), HU(C, G), HU+Ex(D, H)

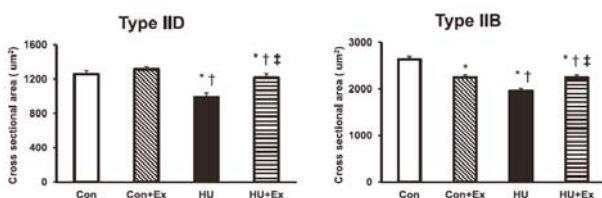


図9. 筋線維横断面面積

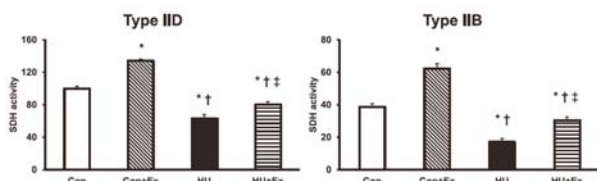


図10. 筋代謝活性

認められた(図4)。

筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 を観察すると、LPS による悪液質により増加することが明らかとなり、筋萎縮を誘導していることが確認できた(図5)。これらの結果から LPS により TNF- α の発現が増加し、Atrogin-1 が誘導され、筋萎縮が生じることが確認された。運動は筋萎縮を予防することが知られている。そこで、低負荷の運動を行うことにより TNF- α の発現を抑制させ、筋萎縮を予防できるかどうかについて検討した。

その結果、運動により TNF- α の発現を抑制させた(図6)。運動は筋特異的ユビキチンである Atrogin-1 の発現も抑制した。一方、IL-6 は有意差を認めなかった(図7)。筋萎縮や代謝を観察すると、運動は筋萎縮や筋代謝活性の減少を抑制させた(図8, 9, 10)。

これらの結果から運動は悪液質に伴う TNF- α の発現を抑制させ、筋萎縮を予防でき

ることが確認された。悪液質は、進行性の異化亢進ともなう全身性機能低下であり、運動は全身調整や全身性機能低下を予防するために推奨できるツールと考えられる。

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31件)

1. Comparison of premodulated interferential and pulsed current electrical stimulation in prevention of deep muscle atrophy in rats. Tanaka M, Hirayama Y, Fujita N, Fujino H. *J Mol Histol* 44, 203-211, 2013.

2. Influence of magnetic stimulation on muscle atrophy in the rat unloading hindlimb muscles. Fujiwara Y, Arakawa T, Fujita N, Fujino H, Miki A. *Bulletin Health Sciences Kobe* 27, 19-26, 2012.

3. Differences in capillary architecture, hemodynamics, and angiogenic factors in rat slow and fast plantarflexor muscle. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. *Muscle Nerve* 45, 242-249, 2012.

4. Oxidative stress levels in rats depending on oxygen concentrations. Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ishihara A. *Oxid Med Cell Long*, 2012:381763, 5 pages, 2012.

5. Chronic exercise training down-regulates TNF- α and atrogin-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading. Saad Al-Nassan, Fujita N, Kondo H, Murakami S, Fujino H. *Acta Histochem Cytochem* 45, 343-349, 2012.

6. Lifestyle-related disease and skeletal muscle: A review. Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Tsuda K. *J Phys Fitness Sports Med* 1, 1-11, 2012.

7. The combined effect of electrical stimulation and high-load isometric contraction on protein degradation pathways in muscle atrophy induced by hindlimb unloading. Fujita N, Murakami S, Fujino H. *J Biomed Biotechnol* doi:10.1155/2011/401493, 2011.

8. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. *Bosn J Basic Med Sci* 11(2): 1-6, 2011.

〔学会発表〕(計 77 件)

1. 田中稔, 平山佑介, 藤田直人, 藤野英己. ラット下腿深層筋の萎縮に対する矩形波及び正弦波電気刺激の予防効果. 第 20 回日本物理療法学会学術大会, 京都, 2012. 10. 27

2. Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Ameliorative effects of antioxidant astaxanthin on capillary regression in hindlimb unloading-induced atrophied muscle. *Integrative Biology of Exercise VI*, Westminster, 2012. 10. 10.

3. 金指美帆, 藤田直人, 藤野英己. 廃用性筋萎縮におけるミトコンドリア機能低下に対する荷重及びアスタキサンチン併用の効果. 第 67 回日本体力医学会, 岐阜, 2012. 9. 14.

4. 平山佑介, 田中稔, 藤田直人, 村上慎一郎, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦, 藤野英己. 中周波および低周波電気刺激が後肢非荷重ラットの深層骨格筋における毛細血管退行に及ぼす影響. 第 20 回日本運動生理学会, 筑波, 2012. 7. 28.

5. 田中稔, 平山佑介, 藤田直人, 村上慎一郎, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦, 藤野英己. 深層筋の萎縮に対する矩形波及び正弦波電気刺激の予防効果. 第 20 回日本運動生理学会, 筑波, 2012. 7. 28.

6. 田中雅侑, 村上慎一郎, 藤田直人, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦, 藤野英己. 異なる運動強度が遅筋・速筋の毛細血管新生及び代謝活性に与える影響. 第 20 回日本運動生理学会, 筑波, 2012. 7. 28.

7. Murakami S, Fujita N, Morifuji T, Kondo H, Fujino H. Effect Of Aerobic Training On Three-dimensional Capillary Architecture In Soleus Muscle. 59th American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 43(5): S274, San Francisco, 2012. 5. 29.

8. Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Antioxidant Supplementation to Prevent

The Progression of Microangiopathy in Hindlimb Unloading-induced Atrophied Soleus Muscle in Rats. 59th American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 43(5): S187, San Francisco, 2012. 5. 29.

9. Al-Nassan Saad, 藤田直人, 近藤浩代, 村上慎一郎, 藤野英己. 長期間の持久運動はマウス腓腹筋の廃用性筋萎縮に伴う TNF- α と atrogen-1/MAFbx の発現を抑制する. 第 47 回日本理学療法学会学術大会, 神戸, 2012. 5. 25.

10. Tanaka M, Fujita N, Fujino H. Preventive effects of premodulated interferential and pulsed currents on muscle atrophy in deep layer of rat hindlimb muscle. *FASEB J* March 29, 2012 26:1074.3. *Experimental Biology 2012*, San Diego. 2012. 04. 24.

11. Fujino H, Kanazashi M, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A. Three-dimensional visualization of capillary and prevention of capillary regression by antioxidant supplementation in disused skeletal muscle. The 51th annual meeting of American society for cell biology, Denver, 2011. 12. 3.

12. 田中稔, 藤田直人, 藤野英己. ラット後肢深層筋の廃用性萎縮に対する中周波及び低周波電気刺激の予防効果. 第 19 回日本物理療法学会学術大会, 徳島. 2011. 10. 15.

13. 藤田直人, 村上慎一郎, 藤野英己. 廃用性筋萎縮の予防に対する等尺性収縮を用いた治療的電気刺激の効果. 第 19 回日本物理療法学会学術大会, 徳島. 2011. 10. 15.

14. Kanazashi M, Okumura Y, Fujita, Murakami S, Fujino H. Beneficial effect of nutritional support against regression of capillary network in atrophied slow muscle. *The World Confederation for Physical Therapy 2011*, 2011. 06. 20. Amsterdam

15. Fujita N, Fujino H. Protective effects of isometric contraction using electrical stimulation on muscle atrophy. *The World Confederation for Physical Therapy 2011*, 2011. 06. 20. Amsterdam

〔図書〕(計 1 件)

運動生理学のニューエビデンス (宮村実晴編), 真興交易医書出版部 (東京), 藤野英己・他 54 名, p250-p258, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-fujino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野英己 (FUJINO HIDEMI)

神戸大学大学院・保健学研究科・教授

研究者番号：20278998

(2) 研究分担者

石原昭彦 (ISHIHARA AKIHIKO)

京都大学・大学院人間環境学研究科・教授

研究者番号：90184548

村上慎一郎 (MURAKAMI SHINICHIRO)

姫路獨協大学・医療保健学部・准教授

研究者番号：30454763

近藤浩代 (KONDO HIROYO)

名古屋女子大学・家政学部・講師

研究者番号：50333183