

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700703

研究課題名(和文)筋収縮様式の違いによる筋肥大のメカニズムに対する分子生物学的アプローチ

研究課題名(英文)Effect of muscle contraction mode on intracellular signaling-related muscle hypertrophy

研究代表者

柿木 亮(KAKIGI, RYO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70614931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、筋収縮様式が筋タンパク質合成や筋肥大と関連する細胞内シグナル伝達に及ぼす影響をヒト骨格筋を対象に検討した。我々は、非鍛錬者において伸張性収縮は、短縮性および等尺性収縮よりもmammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル伝達を高めること、そしてその応答はTypeIおよびTypeIIa線維において生じることを明らかにした。これらのことから、トレーニング初期においては、伸張性収縮を利用したトレーニングが筋肥大には有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the effect of muscle contraction mode on intracellular signaling involved in protein synthesis and muscle hypertrophy in human skeletal muscle. We demonstrated that maximal eccentric muscle contraction exercise rather than concentric and isometric contraction exercise stimulates mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling in untrained skeletal muscle. In addition, the increase of mTOR signaling after eccentric contraction occurred mainly in Type I and IIa muscle fiber. These results suggest that training with eccentric contraction may be effective methods to increase muscle protein synthesis and muscle mass in the early phase of exercise intervention.

研究分野：総合領域

キーワード：筋収縮様式 細胞内シグナル伝達 筋線維組成

## 1. 研究開始当初の背景

運動・トレーニングは、筋機能の向上をもたらすことから、スポーツ競技者のみならず一般人や高齢者においても健康の維持・増進のためにその必要性はますます高まっている。特に、加齢に伴う骨格筋の質的量的低下(サルコペニア)は、身体活動量および生活の質(QOL)の減退を導くことから、いかにその程度を減弱させるかは現在の体力医学研究における課題の一つとなっている。それ故、高齢者や低体力者に対して安全で、効率的なトレーニングプログラムの開発が求められており、特に筋肥大のメカニズムの観点からその証拠を得ることは非常に価値の高いものである。

骨格筋の肥大をもたらす一つの機序として、タンパク質合成がタンパク質分解以上に促進することが知られている。近年、このタンパク質合成を調節する細胞内機構が明らかとなっており、骨格筋細胞内において mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル伝達経路が重要な役割を担っている(Bodine, 2001)。レジスタンストレーニングは、筋の収縮によるメカニカルストレスのみならず、ホルモン、筋 pH 低下や低酸素状態など生体内に様々な変化をもたらす。それらが細胞内への刺激となり mTOR シグナル伝達経路を活性化させることは知られており、この経路の活性化を介してタンパク質合成が促進し、筋タンパク質量の増大、すなわち肥大につながっていると考えられている(Drummond, 2009)。これまで申請者は、一過性のレジスタンス運動と温熱負荷の組み合わせた効果をヒト骨格筋を対象に検討し、レジスタンス運動に温熱負荷を組み合わせることで mTOR シグナル伝達を増強することができることを初めて示した(Kakigi, 2011)。しかしながら、この研究で用いたトレーニング様式は、等速性運動装置により短縮性膝伸展運動を行わせており、等尺性や伸張性筋収縮に伴い同様の効果が得られるか否かについては明らかとなっていない。

短縮性収縮と伸張性収縮の様式の違いが mTOR シグナル伝達に及ぼす影響について、ヒト骨格筋を対象として検討した研究はわずか 1 編のみである(Eliasson, 2006)。しかしながら、この研究の運動は、一般的なトレーニングマシンを用いているため、短縮性運動時にも伸張性収縮が少なからず存在していることから、短縮性収縮と伸張性収縮の影響を明瞭に区別することができない問題点を有している。さらには、等尺性収縮がヒト骨格筋 mTOR シグナル伝達に及ぼす影響について検討した研究は皆無である。故に、静的な収縮(等尺性収縮)と動的な筋収縮(短縮性収縮、伸長性収縮)などの収縮様式の違いを区別し、細胞内シグナル伝達の応答を明らかにすること、そして筋線維タイプ特異的な応答を明らかにすることは、筋タンパク質合成を高めるための至適トレーニング条件

の決定と効果的なトレーニング方法や栄養摂取方法を開発するために非常に重要な証拠を提供すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、収縮様式の違いによる細胞内シグナル伝達の応答、トレーニング状況の有無による影響、筋線維タイプ特異的な応答を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 収縮様式の違いによる細胞内シグナル伝達の応答

健康な男性 17 名を被験者とした。等速性運動装置(Biodex system3)は、角速度を設定することで等尺性、短縮性、伸張性収縮運動を制御することが出来る。この装置を用いて、被験者は設定された角速度(伸張性;-90/秒、等尺性;0度/秒、短縮性;90度/秒のいずれか)にて片脚の膝伸展運動を 10 回×4 セット行った。なお、等尺性収縮は、5 秒×8 回行った。膝伸展運動前、運動 1 および 3 時間後に局所麻酔下にて筋生検を行い、被験者の大腿外側部から筋サンプルを摘出した。摘出した筋サンプルをウェスタンブロット法を用いて、タンパク質のリン酸化を分析した。

### (2) トレーニング状況の有無による影響

運動を行っていない健康な男性 8 名(Sed 群)と運動トレーニングを定期的に行っている男性 8 名(TR 群)を被験者とした。等速性運動装置(Biodex system3)を用いて設定された角速度(伸張性;-90/秒、短縮性;90度/秒のいずれか)にて片脚の膝伸展運動を 10 回×4 セット行った。膝伸展運動前および運動 1 時間後に局所麻酔下にて筋生検を行い、被験者の大腿外側部から筋バイオプシーサンプルを摘出した。摘出した筋サンプルをウェスタンブロット法を用いて、タンパク質のリン酸化を分析した。

### (3) 筋線維タイプ特異的な応答

運動を行っていない被験者において、安静時および短縮性収縮および伸張性収縮運動の 1 時間後の筋サンプルから筋横断切片を作成した。切片に対して、ミオシン重鎖の各タイプ(I、IIa、IIx)に特異的に反応する抗体を用いて免疫染色を行い、筋線維タイプを同定した。また、別の連続横断切片に対してリン酸化型 S6 に特異的に反応する抗体を用いて免疫染色を行い、筋線維タイプと照らし合わせながら、リン酸化型 S6 の輝度を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 収縮様式の違いによる細胞内シグナル伝達の応答

伸張性収縮および等尺性収縮運動時の発揮ピークトルクは、短縮性収縮のそれと比較して有意に高い値を示した( $p < 0.05$ )。mTOR

の上流に位置する Akt リン酸化は、全ての筋収縮様式で運動 1 時間後に有意に増加しており ( $p < 0.05$ )、3 時間後には運動前のレベルに戻っていた。mTOR およびその下流標的である S6K1 リン酸は、伸張性収縮のみ 1 時間後で有意に増加し (図 1,  $p < 0.05$ )、3 時間後には全ての収縮様式において安静時と比較して有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。したがって、伸張性収縮は、短縮性収縮および等尺性収縮よりも早期に mTOR シグナルを増加させることが初めて明らかとなった。

mTOR の下流の S6K1 リン酸化は、筋タンパク質合成速度や筋肥大と関連することが示されている。したがって、本研究の結果は、伸張性収縮による運動は筋肥大を引き起こす刺激として最も高かったことを示している。Roig et al. (2009) は、メタアナリシスにより短縮性収縮よりも伸張性収縮が筋力向上や筋肥大に有利に働くことを明らかにしている。本研究の成果から、収縮様式によるトレーニング効果獲得の差異を一部説明できる可能性が考えられる。

また、伸張性収縮と等尺性収縮では外的に発揮した力が同等であるにも関わらず、伸張性収縮の方が等尺性収縮よりも mTOR シグナルの増加が大きかった。したがって、動的に筋が引き伸ばされることによって、筋の基底膜や筋原線維から何らかのシグナル伝達物質が分泌され、それが筋タンパク質合成を刺激しているものと考えられる。

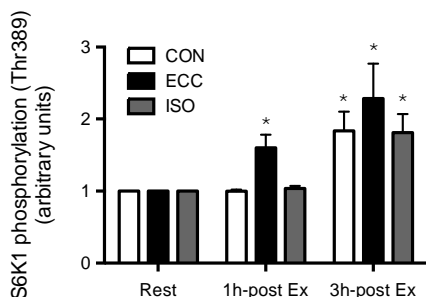


図 1. 短縮性 (CON) 伸張性 (ECC) および等尺性 (ISO) が S6K1 リン酸化反応に及ぼす影響。\*  $p < 0.05$  vs Rest.

## (2) トレーニング状況の有無による影響

各収縮様式運動時の発揮ピークトルクは、Sed 群に比べて TR 群の方が有意に高い値を示し ( $p < 0.05$ )、TR 群がトレーニングによって筋力が高いことを確認した。短縮性収縮は、トレーニング状況の有無に関わらず運動 1 時間後において有意に mTOR シグナルを変化しなかった。一方、伸張性収縮は、Sed 群および TR 群の骨格筋の mTOR のリン酸化を有意に増加させた ( $p < 0.05$ )。しかしながら、mTOR の下流の S6K1 リン酸化 (Thr389) の有意な増加は Sed 群においてのみ観察された (図 2,  $p < 0.05$ )。また、タンパク質合成や遺伝子発

現調節に關与する Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) ファミリーの ERK1/2 リン酸化反応も、Sed 群においてのみ有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。これらの結果から、トレーニング初期においては伸張性収縮が筋タンパク質合成を促進するのに有効な刺激となる可能性が示唆された。一方、トレーニングを行っている鍛錬者は、伸張性収縮の優位性が失われており、伸張性収縮や短縮性収縮のどちらにおいても同様のトレーニング効果が得られる可能性が考えられる。

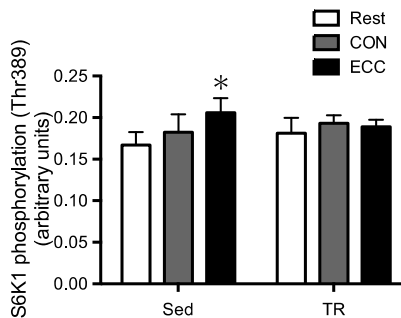


図 2. 短縮性および伸張性収縮が非鍛錬者と鍛錬者の S6K1 リン酸化に及ぼす影響。\*  $p < 0.05$  vs Rest.

## (3) 筋線維タイプ特異的な応答

筋横断切片に対して S6K1 の活性化の指標となることが知られているリン酸化型 S6 を免疫染色したところ、短縮性収縮は、安静時に比べて 1 時間後において、各線維タイプでリン酸化型 S6 の有意な増加をもたらさなかった。一方、伸張性収縮は、安静時と比べて 1 時間後で、タイプ I および IIa 線維においてリン酸化型 S6 の有意な増加をもたらした ( $p < 0.05$ )。これらのことから、伸張性収縮は、タイプ I および IIa 線維において mTOR シグナルを増加させることが初めて示された。

レジスタンストレーニングは、筋肥大をもたらす際、特に Type IIa 線維においてより顕著な肥大が認められる。本研究結果は、このことを一致していた。しかしながら、Type I 線維でもリン酸化型 S6 が増加していた点については、不明である。一般に、タンパク質代謝回転は、速筋である Type II 線維よりも遅筋である Type I 線維の方が素早く起こることが知られている。したがって、運動後 1 時間後においては、Type I および IIa 線維でリン酸化型 S6 の同様の増加が認められた可能性が考えられる。

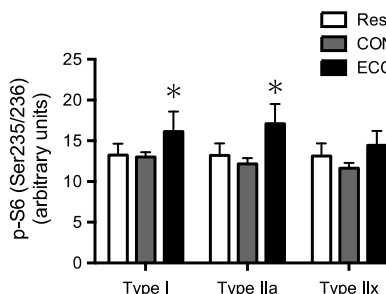


図 3 . 短縮性および伸張性収縮が各筋線維タイプにおける S6 リン酸化に及ぼす影響 . \* p<0.05 vs Rest.

本研究の最終目的は、骨格筋の適応メカニズム、特に筋タンパク質合成の調節機構である細胞内シグナル伝達に対する筋収縮様式の影響を筋線維タイプごとに明らかにし、筋機能向上に対するより効果的なトレーニング方法の開発に貢献することであった。研究機関全体を通じて、本研究は、トレーニング初期においては、伸張性収縮を用いたトレーニングが等尺性および短縮性収縮を用いたトレーニングよりも筋タンパク質合成を高める可能性を示し、特にタイプ I および IIa 線維をより筋肥大に向かわせる刺激となる可能性を示唆することができた。今後は、伸張性収縮が mTOR シグナルを増加させるためのトリガーとなっている要因について検討を加えるとともに、実際のトレーニングによる筋肥大効果を明らかにしていきたいと考えている。

#### 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 2 件)

Kakigi R, Yoshihara T, Ozaki H, Ogura Y, Ichinoseki- Sekine N, Kobayashi H, Naito H. Whey protein intake after resistance exercise activates mTOR signaling in a dose- dependent manner in human skeletal muscle. 114(4); 735-42 (2014) 査読有

Ozaki H, Kakigi R, Kobayashi H, Loenneke JP, Abe T, Naito H. Effects of walking combined with restricted leg blood flow on mTOR and MAPK signalling in young men. Acta Physiol (Oxf). 211(1); 97- 106 (2014) 査読有

[学会発表](計 8 件)

Kakigi R, Naito H, Yoshihara T, Ichinoseki-Sekine N, Okada T. Eccentric muscle contraction stimulates mTOR signaling in human skeletal muscle. The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. 2015 年 3 月, 神戸, 日本

柿木亮、内藤久士、吉原利典、坂本彰宏、中村智洋、小林裕幸、岡田隆夫 . 伸張性収縮運動によるヒト骨格筋 mTOR シグナルの増加は鍛練度によって異なる . 第 69 回日本体力医学会大会 2014 年 9 月, 長崎大学 (長崎県)

柿木亮、内藤久士、吉原利典、尾崎隼朗、都築孝允、小林裕幸、岡田隆夫 . 最大下

自転車運動によるヒト骨格筋 Akt/mTOR シグナル伝達の経時変化 . 第 58 回日本体力医学会大会 2013 年 9 月, 教育会館 (東京都)

尾崎隼朗、柿木亮、内藤久士 . ラット骨格筋の過負荷による mTOR シグナル伝達経路の活性化に持久性運動における強度の違いが及ぼす影響 . 第 58 回日本体力医学会大会 . 2013 年 9 月, 教育会館 (東京都)

中村智洋、柿木亮、関根紀子、小林裕幸、佐久間和彦、内藤久士 . 男性短距離走者の骨格筋における ACTN3 タンパク質発現量と筋線維組成 . 第 58 回日本体力医学会大会 . 2013 年 9 月, 教育会館 (東京都)

Kakigi R, Naito H, Yoshihara T, Ozaki H, Kobayashi H, Okada T. Submaximal cycling exercise stimulates mTOR signaling pathway in human skeletal muscle. Experimental biology 2013. 2013 年 4 月, ボストン, アメリカ

Kakigi R, Ozaki H, Miura S, Kobayashi H, Yoshihara T, Ichinoseki-Sekine N, Tsuzuki T, Naito H. Whey protein ingestion after exercise decreases LC3-II expression in human muscle. 15th International Biochemistry of Exercise Conference. 2012 年 6 月, ストックホルム, スウェーデン

Kakigi R, Ozaki H, Miura S, Kobayashi H, Yoshihara T, Ichinoseki-Sekine N, Tsuzuki T, Naito H. Effects of whey peptide ingestion after resistance exercise on mTOR signaling in human skeletal muscle. The American College of Sports Medicine 59th Annual Meeting. 2012 年 5 月, サンフランシスコ, アメリカ

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

柿木 亮 (Kakigi, Ryo)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 7 0 6 1 4 9 3 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし