

骨格筋収縮様式の違いが生体内 Irisin 動態に及ぼす影響および
薬剤性筋萎縮症に対する遠心性収縮トレーニングの効果
-傾斜走行および Glucocorticoid 誘導性筋萎縮症モデルラットを用いた研究-

2021

吉備国際大学大学院

保健科学研究科

保健科学専攻

D311803 村尾 昌信

目次

省略文字のリスト	1
序章 序論 (総合)	2
第 1 節 研究背景	2
第 1 項 リハビリテーション医療における骨格筋の重要性	2
第 2 項 骨格筋の役割	2
第 3 項 骨格筋の新たな役割	2
第 4 項 運動療法と Myokine の接点	3
第 2 節 研究目的 (総合)	3
第 3 節 論文構成	3
第 1 章 Irisin に関する文献レビュー	4
第 1 節 緒言	5
第 2 節 研究目的	5
第 3 節 本論と考察	5
第 1 項 Irisin の発見	5
第 2 項 生体内における Irisin の役割	6
第 3 項 骨格筋の恒常性と Irisin	6
第 4 項 種々の要因によって生じる筋萎縮に対する Irisin 治療の効果	6

第 5 項	Irisin 発現と運動条件の関係	7
-------	-------------------	---

第 4 節	結論	7
-------	----	---

第 2 章 一過性の急性下り坂走行がラットの血清 Irisin 濃度および骨格筋に

おける Irisin 発現に及ぼす影響 8

第 1 節	緒言	9
-------	----	---

第 2 節	方法	9
-------	----	---

第 1 項	実験動物	9
-------	------	---

第 2 項	走行条件	9
-------	------	---

第 3 項	組織採取と保存	10
-------	---------	----

3-1	血清	10
-----	----	----

3-2	筋組織	10
-----	-----	----

第 4 項	生化学的評価	10
-------	--------	----

第 5 項	免疫組織学的評価	11
-------	----------	----

第 6 項	統計分析	11
-------	------	----

第 3 節	結果	12
-------	----	----

第 1 項	体重	12
-------	----	----

第 2 項	血清中 Irisin 濃度	12
-------	---------------	----

第 3 項	中間広筋断面における Irisin 陽性面積	13
-------	------------------------	----

第 4 節	考察	15
-------	----	----

第 1 項	結果のまとめ	15
第 2 項	収縮様式と Irisin 発現について	15
第 3 項	研究限界	16
第 5 節	結論	16

第 3 章 中期的な下り坂走行トレーニングが Glucocorticoid 誘導性筋萎縮症

モデルラットの骨格筋に及ぼす影響 17

第 1 節	緒言	18
第 2 節	方法	19
第 1 項	実験動物	19
第 2 項	実験プロトコル	19
2-1	群分けと Dexamethasone 投与	19
2-2	走行条件	19
第 3 項	組織採取と保存	20
3-1	筋組織	20
3-2	血清	20
第 4 項	筋組織の評価	20
第 5 項	生化学的評価	21
第 6 項	統計分析	21
第 3 節	結果	21

第 1 項	体重	23
第 2 項	筋湿重量	24
2-1	ヒラメ筋	24
2-2	内側腓腹筋	24
2-3	長趾伸筋	24
第 3 項	筋線維断面積	26
第 4 項	血清中 Myokine 濃度	28
4-1	Myostatin	28
4-2	IGF-1	28
4-3	Irisin	28
第 4 節	考察	29
第 1 項	筋湿重量について	29
第 2 項	筋線維断面積について	29
第 3 項	先行研究との比較	30
第 4 項	研究限界	30
第 5 節	結論	32

終章 結論 (総合)	33
謝辞	35
学位論文の基礎となる原著	36
参考文献	37

省略文字のリスト

本研究で使用する省略文字は以下の通りである。

ADL	: Activities of daily living
BCAA	: Branched-chain amino acid
BCAT2	: Branched-chain amino acid aminotransferase-2
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor
Snip3	: B-cell/Lymphoma 2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein-3
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DEX	: Dexamethasone
REDD1	: Regulated in development and deoxyribonucleic acid damage response-1
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assays
FoxO	: Fork head box O
FNDC5	: Fibronectin type III domain-containing protein-5
GC	: Glucocorticoid
HE 染色	: Hematoxylin-Eosin 染色
IGF-1	: Insulin-like growth factor -1
IL-6	: Interleukin-6
KLF15	: Kidney-enriched Krüppel-like factor
LC3	: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
mTOR	: mammalian target of rapamycin
mRNA	: messenger ribonucleic acid
MuRF1	: Muscle really interesting new gene finger protein-1
PBS	: Phosphate-buffered saline
PGC-1 α	: Peroxisome proliferator activated receptor- γ co-activator-1 α
PI3K	: Phosphatidylinositol-3 kinase
Rheb	: Ras homolog enriched in brain
Smad	: Small mothers against decapentaplegic
S6K1	: Ribosomal protein S6 kinase beta-1
TRPV1	: Transient Receptor Potential Vanilloid-1
QOL	: Quality of life
4E-BP1	: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

序章 序論 (総合)

第1節 研究背景

第1項 リハビリテーション医療における骨格筋の重要性

リハビリテーション医療の対象者は、疾患、手術、薬剤、廃用、加齢など、種々の原因によって骨格筋の筋力低下を呈している場合が多い。骨格筋の筋力低下は、基本動作能力、日常生活動作 (ADL) 能力、およびスポーツ動作能力の低下に直結し、生活の質 (QOL) の低下を招く。そのため、骨格筋の筋力強化および筋力低下の予防は、動作能力の改善において必須の条件である。

第2項 骨格筋の役割

動物の骨格筋は、心筋、平滑筋と共に筋組織を構成し、収縮と弛緩のサイクルによって関節運動を生じさせる唯一の随意的動力源である¹⁾。その他、この臓器の役割は、骨格のサポートによる姿勢の維持と調整、体温の維持、アミノ酸から全身のエネルギー源となる糖やグリコーゲンを作るためのタンパク質の貯蔵など多岐にわたる¹⁻³⁾。

第3項 骨格筋の新たな役割

Pedersen 博士ら⁴⁾ は骨格筋の新たな役割として、代表的な炎症マーカーである IL-6 が、炎症組織のみならず、筋収縮によって産生されていることを明らかにした。さらに、筋収縮によって産生された IL-6 は、自己分泌 (autocrine)、傍分泌 (paracrine)、内分泌 (endocrine) の経路で、筋組織、骨、その他全身の組織に多様な作用を及ぼすメッセンジャーとして機能することが明らかになった。彼女らは、このような物質を Myokine と名付けた。今までに少なくとも数百種類の Myokine が報告されてきた。その中でも、運動の健康増進効果の鍵である可能性を持つことから、「運動模倣タンパク質-exercise mimetic protein-」の異名を持つ Irisin は、近年最も注目を浴びている Myokine の一つである。

第4項 運動療法と Myokine の接点

Myokine が発見されてから 17 年が経過したが、リハビリテーション専門職の視点から、Myokine を有効利用して、筋収縮様式、収縮強度、収縮時間などの至適運動条件を決定し、運動療法に応用する試みは未だ不十分である。

主に運動療法を治療に用いるリハビリテーション専門職にとって、運動効果の基礎的なメカニズムの理解は、源流に立ち返ってモチベーションを維持し、日々の改善につなげていくために必要不可欠である。

第2節 研究目的

本研究の目的は、Irisin に関する先行研究を概観し、Irisin を効率的に産生する運動条件を検討するとともに、そのような運動条件が薬剤性筋萎縮症からの回復に有効であるか否かを検証することである。

第3節 論文構成

本研究の論文構成を示す。第1章では、Irisin に関する先行研究をレビューした。第2章では、一過性の急性下り坂走行がラットの血清 Irisin 濃度および骨格筋における Irisin 発現に及ぼす影響を検討した。第3章では、中期的な下り坂走行トレーニングが Glucocorticoid 誘導性筋萎縮症モデルラットの骨格筋に及ぼす影響を検討した。終章では、本研究の1章、2章、3章の結果から、Irisin 産生を促進する運動条件の治療応用について総合的に論考した。尚、第2章の内容は学術誌 Growth Factors に投稿し受理された。

第 1 章

Irisin に関する文献レビュー

第1節 緒言

2012年の発見以降、Irisinに関する研究報告は年々増加し、PubMedで、1,137件（2020年10月21日時点）の検索結果が出力される。身体の恒常性に関わるIrisinの様々な作用が解明されたにも関わらず、リハビリテーションの視点から運動療法における役割を論じたレビューは存在しない。Irisin産生を促し、その恩恵を最大限に享受できる至適運動条件を検討するために、既知の知見を整理する必要性がある。

第2節 研究目的

本研究の目的は、骨格筋を中心とした全身に対する主要なIrisinの作用と治療応用、および運動条件との関係に関する知見をレビューすることである。

第3節 本論と考察

第1項 Irisinの発見

運動の筋に対する種々の効果は、PGC-1 α が担っている。しかし、運動効果が全身に波及するための媒介因子は長らく不明であった。2012年に、マウスにおいてPGC-1 α の過剰発現が膜タンパク質であるFNDC5の発現を増加させ、それが切断（cleave）されて分泌されるペプチドが白色脂肪細胞を褐色化させることが報告された⁵⁾。Boströmら⁵⁾は、このペプチドを、ギリシャ神話において大地と天界を媒介する虹の女神“Iris”に因んで、“Irisin”と命名した。

Irisinは、ヒト、ラットの種間で高度に保存されている。当初、市販キットの特異度の低さから、ヒトにおける存在が疑われていたが⁶⁻⁸⁾、質量分析法を用いた検証⁹⁾によって証明された。現在では市販キットの精度も向上した。

第2項 生体内における Irisin の役割

Irisin は、主に骨格筋と心筋から放出され、皮下組織、脂肪組織、精巣、肝臓、膵臓、胃からもごく少量放出される。安静時のヒト血中 Irisin 濃度は、座りがちな生活を送る個体において 3.6ng/ml、長期的な有酸素インターバルトレーニングによって 4.3ng/ml まで増加する⁹⁾。濃度は、年齢依存的で、高齢になるほど低下する¹⁰⁻¹²⁾。Irisin の受容体や、FNDC5 から切断される分子機構は未だに解明されていない。

Irisin は、骨格筋をはじめ、骨、脳神経系、肝臓、膵臓、脂肪組織、心臓、末梢血単核細胞、癌細胞などに作用する。

骨においては、*in vitro* で骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化を促進し¹³⁾、Wnt 経路を活性化させ¹⁴⁾、骨形成を総合的に促進させる。*in vivo* で、マウスへの4週間の Irisin の投与は、大腿骨の骨周径、皮質骨の骨密度、極慣性モーメントへの耐性を高めた¹⁴⁾。

脳においては、BDNF の発現増加によって記憶力を向上し、アルツハイマーの抑制に関連していると考えられている^{15,16)}。また、高齢者や若年アスリートにおいて認知機能と血中の Irisin 濃度は正の相関を示す^{17,18)}。アデノウイルスベクターを介した肝臓への FNDC5 の送達で、血中の Irisin 濃度を上昇させ、海馬における BDNF やその他の神経保護因子の発現を誘導したことから、Irisin は血液脳関門を通過すると考えられる¹⁶⁾。

その他、Irisin は、肝臓においては PI3K/Akt 経路を介してグリコーゲン合成を増加し¹⁹⁾、脂肪組織においては白色脂肪細胞を褐色化(代謝改善)し⁵⁾、心臓においては心筋修復と機能を改善する²⁰⁾。すなわち、Irisin は、運動が身体の恒常性に及ぼす有益な作用の大部分に関与していると考えられる。

第3項 骨格筋の恒常性と Irisin

血中の Irisin レベルと筋量は正相関する²¹⁾。加えて、ヒトでは、筋の成長に関連する代表的な Myokine である IGF-1 遺伝子と関連する²²⁾。一方で、Irisin は、骨格筋においてタンパク分解に関与している Myostatin と拮抗すると考えられている²²⁾。Myostatin ノックアウトマウスは、全身の異常な筋肥大を示す²³⁾。Shan ら²⁴⁾ の報告では、Myostatin ノックアウトマウスでは Irisin と前駆物質の発現増加が認められ、筋量増加が Irisin 依存的であることが示唆されている。

第4項 種々の要因によって生じる筋萎縮に対する Irisin 治療の効果

Colaianni ら²⁵⁾は、マウスに対して週1回、高濃度の Irisin を腹腔内に投与し、4週間の後肢非荷重処置によって誘発される廃用性筋萎縮を完全に抑制した。同様に、Raza ら²⁶⁾は、筋ジストロフィーモデルマウスに対して高濃度の Irisin を投与し、筋肥大と握力の増加を認めた。また、Irisin 処置は、C2C12 筋管細胞における DEX 誘導性筋萎縮を抑制した²⁷⁾。

第5項 Irisin 発現と運動条件の関係

先行研究は、有酸素運動^{21,28)}、全身振動刺激²⁹⁾、および寒冷環境での震え³⁰⁾が血中 Irisin 濃度や、遺伝子およびタンパク質レベルの Irisin 発現を増加させることを示唆する。レジスタンスエクササイズ^{31,32)}の Irisin 産生増大効果は、近年の報告では否定的である^{31,32)}。Irisin を効率的に産生する運動条件を見出すことは、運動療法の選択に役立つ可能性があるが、上記のように、筋収縮様式、運動量、運動頻度などの運動条件と Irisin 発現との関係に着目した研究は少ない。

第4節 結論

Irisin などの Myokine に関する研究は、近年注目を集め集中的に研究されているトピックである。運動療法を主たる治療手段とするリハビリテーション専門職にとって、運動効果のメカニズムを可視化することは、最適な運動プログラムの立案に大きく資するであろう。

第 2 章

一過性の急性下り坂走行がラットの血清 Irisin 濃度および骨格筋に
おける Irisin 発現に及ぼす影響

第1節 緒言

骨格筋の収縮様式は、求心性収縮、等尺性収縮、遠心性収縮に大別される。骨格筋の収縮様式の違いは、ヒトおよび動物において全身に異なる適応をもたらす。げっ歯類の一過性の急性下り坂走行モデルは、求心性および遠心性収縮の身体に対する様々な影響を比較するための古典的なモデルとして用いられてきた^{33,34)}。膝関節伸展筋である中間広筋や足関節底屈筋であるヒラメ筋、腓腹筋は、上り坂走行時には求心性収縮を呈する一方で、下り坂走行時には遠心性収縮を呈する。本モデルによって、下り坂走行（遠心性収縮）は、上り坂走行（求心性収縮）と比較して、同速度条件での走行時に大きな筋損傷を生じさせるというネガティブな事実が明らかになった³⁴⁾。一方、下り坂走行のメリットは、同速度条件において上り坂走行よりも低い代謝コストで走行できることである³³⁾。異なる筋収縮様式へ明確に切り替えることができるこの古典的なモデルを用いて Irisin 動態を調査した先行研究はない。本研究の目的は、走行様式の違いが血清 Irisin 濃度に及ぼす影響を明らかにすることである。

第2節 方法

第1項 実験動物

本研究の対象動物は、10週齢の雄性 Wistar ラット（日本 CLEA, 大阪）であった（n=18）。全ての対象動物は、12時間毎に明暗が切り替わり、常時 23℃に室温管理された動物舎内のケージにて、搬入されてから約1週間、馴化飼育した。馴化飼育の間、対照動物は餌と飲用水を自由に摂取できた。本研究は、本学の動物実験委員会で承認された（承認番号：A-18-01）。

第2項 走行条件

対象を、Control 群（n=6）、上り坂走行群（n=6）、下り坂走行群（n=6）に分けた。Control 群は、あらゆる介入を与えずに飼育した。その他の走行群は、Armstrong らの研究³⁴⁾に準じて、速度 16 m/分で合計 90 分間（5分走行 + 2分休憩；18セット）、それぞれ 16°の上り坂もしくは下り坂に傾斜したげっ歯類用トレッドミル（室町機械、東京）上を1セッションのみ走行した。馴化走行は、先行研究³⁴⁾に準じて施行しなかった。

第3項 組織採取と保存

3-1 血清

Control 群は、16 週齢を迎えた時点で腹腔内にペントバルビタールナトリウムの過剰投与によって屠殺した。走行群は、走行終了の 48 時間後、同様に処置した。心停止および呼吸停止を確認した直後、左心室穿刺によって血液を採取した。採取した血液を直ちに 4 °C、3,000 rpm、10 分間遠心し、分離された血清を生化学的分析に用いるまで -80 °C で保存した。

3-2 筋組織

血液採取の直後、左後肢より中間広筋を採取した。ラットの間接広筋は、上り坂走行において求心性収縮が、下り坂走行において遠心性収縮がそれぞれ特異的に観察される³⁴⁾ため、摘出筋として選択した。摘出した中間広筋は、速やかに 10% 中性リン酸緩衝ホルマリンで、4 °C にて固定した。24 時間後、常法に従い、パラフィン包埋処理を行い、組織学的評価に用いるまでパラフィンブロックとして保存した。

第4項 生化学的評価

血清中の Irisin 濃度は、ELISA 法によって定量した。本研究に用いた ELISA キット (Phoenix Pharmaceuticals, アメリカ, EK-067-29) は、現在市販されている Irisin 定量用 ELISA キットの中で最も信頼性が高いと考えられている³⁵⁾。ELISA は、製品説明書に従って実施した。血清の吸光度の算出には、4 パラメータロジスティクス機能を有するマイクロプレートリーダー-SH-1200 および SF-6 software (コロナ電気株式会社, 日本) を用いた。

第5項 免疫組織学的評価

5 μm に薄切された中間広筋のパラフィン切片を、MAS コーティングされたスライドガラス（松浪硝子，日本）に貼付した。切片をキシレンで脱脂し，濃度の異なるエタノールに浸漬することで再水和した。抗原賦活化処理には，オートクレーブを用いた。

免疫組織化学染色は，VECSTATIN ABC キット（Vector laboratories，アメリカ）を用いて，製品の説明書に従って実施した。内因性ペルオキシダーゼは，メタノール中の 0.3% H_2O_2 中で 30 分間インキュベートすることでブロックした。ブロッキング用に希釈された正常ウサギ血清を切片上に滴下し，20 分間インキュベートした。余分な血清を除去した後，0.1 M リン酸緩衝生理食塩水，0.1% ウシ血清アルブミンを含む pH 7.2 の PBS 緩衝液で希釈（1：300）した抗 FNDC5 ポリクローナル抗体（Bioss，アメリカ）で 30 分間インキュベートした。一次抗体を添加していないネガティブコントロールスライドを用意した。PBS 緩衝液で洗浄した後，調製したビオチン標識二次抗体で 30 分間インキュベート後，VECTASTAINVR ABC 試薬で 30 分間インキュベートした。DAB ペルオキシダーゼ基質キット，ImmPACT（Vector Laboratories，アメリカ）を切片に滴下し，適切な染色強度が得られるまでインキュベートした。次いで，切片をヘマトキシリンで対比染色し，蒸留水で洗浄した。エタノールによる脱水処理，キシレンによる透徹処置の後，切片を Entellan new（Sigma-Aldric，アメリカ）で封入した。

筋断面の写真は，顕微鏡（BX50，オリンパス株式会社，日本）を用いて撮影した。各筋切片から各 5 枚の横断面画像（400 倍）を撮影し，Image J（United. States. National Institutes of Health，アメリカ）を用いて Irisin 陽性面積を定量化した。

第6項 統計分析

全てのデータは，平均 \pm 標準偏差で示した。各アウトカムにおける群の主効果を検定するため，一元配置分散分析を用いた。体重と Irisin 濃度の群間比較には，ポストホック検定として Tukey 法を用いた。中間広筋断面における Irisin 陽性面積の群間比較には，ポストホック検定として Games-Howel 法を用いた。統計分析には，SPSS 17.0 software for Windows Version（SPSS，アメリカ）を用いた。全ての検定における有意水準は $\alpha = 5\%$ に設定した。

第3節 結果

第1項 体重

Control 群は 331.2 ± 16.5 g, 上り坂走行群は 314.2 ± 15.3 g, 下り坂走行群は 307.5 ± 11.3 g であった。一元配置分散分析の結果, 群間に有意差は認められなかった。

第2項 血清中 Irisin 濃度 (図1)

Control 群は, 18.89 ± 3.37 ng/ml, 上り坂走行群は 21.27 ± 3.03 ng/ml, 下り坂走行群は 28.42 ± 6.31 ng/ml であった。一元配置分散分析の結果, 有意な主効果が認められた。多重比較の結果, 下り坂走行群の血清中 Irisin 濃度はその他の群に対して有意に高値を示した。Control 群と上り坂走行群の間に有意差は認められなかった。

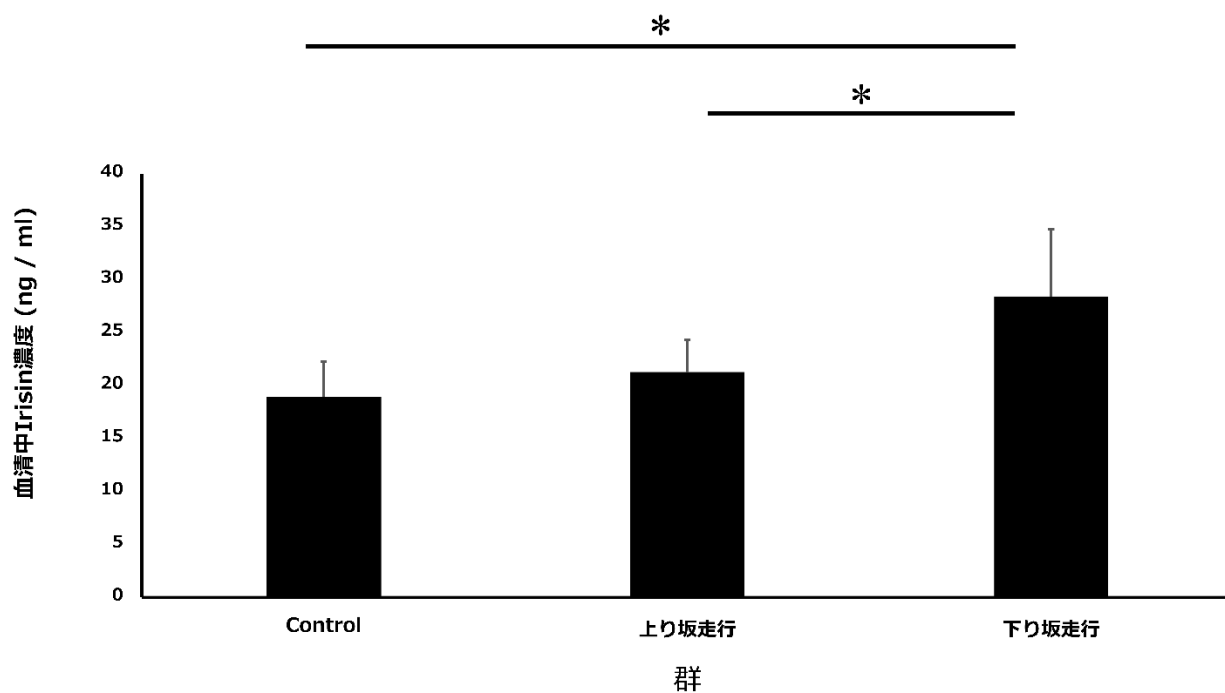


図1. 血清 Irisin 濃度

*: $p < 0.05$

第3項 中間広筋横断面における Irisin 陽性面積 (図2, 図3)

免疫染色を施された中間広筋断面の典型的な画像(オリジナル画像および発色強調像)を図2に、各群における Irisin 陽性面積を図3に示した。Irisin 一次抗体を添加した抗体陽性スライドにおいて、Control 群は、 $1017 \pm 497 \mu\text{m}^2$ 、上り坂走行群は $1103 \pm 303 \mu\text{m}^2$ 、下り坂走行群は $2107 \pm 440 \mu\text{m}^2$ であった。Irisin 二次抗体を添加しなかったネガティブコントロールスライドにおいて、Control 群は $241 \pm 97 \mu\text{m}^2$ 、上り坂走行群は $569 \pm 224 \mu\text{m}^2$ 、下り坂走行群は $214 \pm 79 \mu\text{m}^2$ であった。

同一群内における抗体陽性スライドとネガティブコントロールスライドの比較結果について述べる。下り坂走行群の抗体陽性スライドにおける Irisin 陽性面積は、同群のネガティブコントロールスライドと比較して有意に大きかった。その他の群では、抗体陽性スライドとネガティブコントロールスライドの間に有意差は認められなかった。

次に、抗体陽性スライドの群間比較結果について述べる。下り坂走行群の Irisin 陽性面積は、Control 群および上り坂走行群と比較して有意に大きかった。上り坂走行群と Control 群の間に有意差は認められなかった。

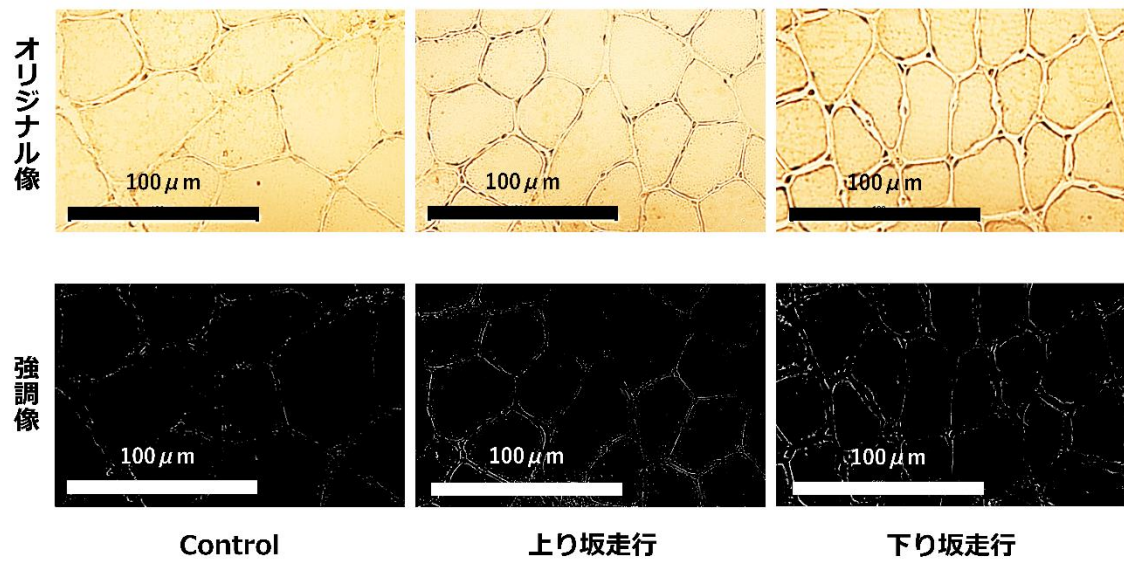


図 2. 抗体陽性スライドにおける免疫染色画像

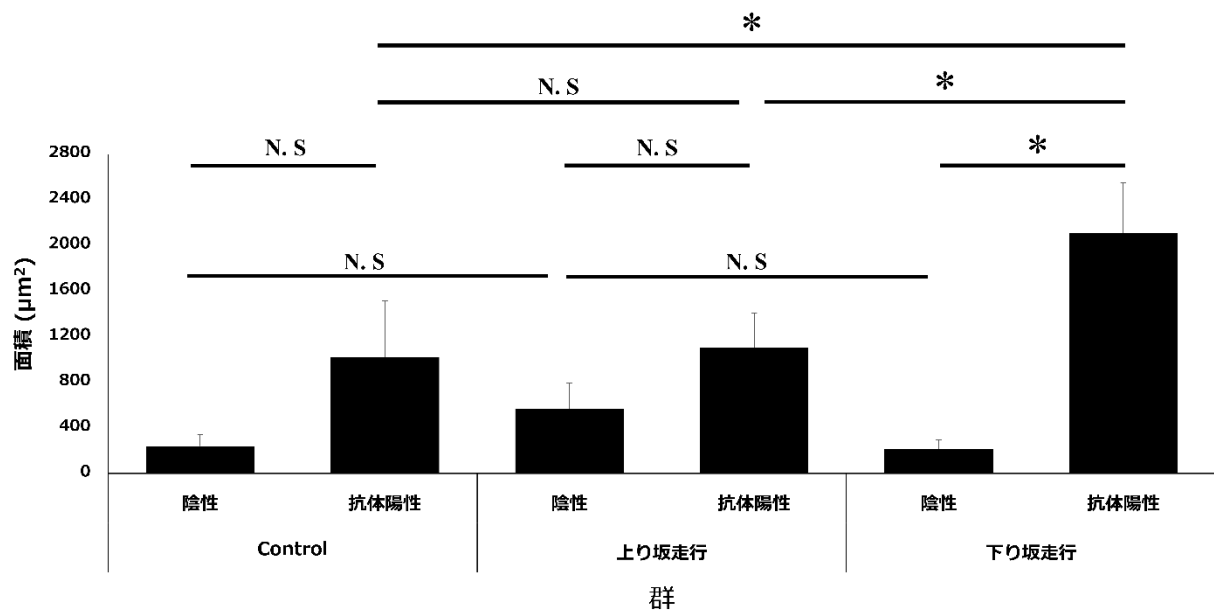


図 3. Irisin 陽性面積

N.S: 有意差なし *: $p < 0.05$

第4節 考察

第1項 結果のまとめ

本研究の結果より、ラットの一過性傾斜走行モデルにおいて、走行速度と走行時間（走行距離）と高低差が等しい（同等のメカニカルパワー）条件では、下り坂走行の方が上り坂走行よりも血清中 Irisin 濃度が高く、筋組織においても Irisin 発現が高くなることが明らかになった。

第2項 収縮様式と Irisin 発現について

第一章で述べたように、Irisin は筋細胞膜に存在する FNDC5 が切断されて放出される⁵⁾。遠心性収縮は、求心性収縮と比較して筋に大きな機械的ストレスを与え、筋の微細損傷と血中 creatinine phosphokinase 値の上昇を引き起こすと報告されている³⁴⁾。ヒラメ筋に対する機械的ストレスの違いが FNDC5 の切断を調整し、下り坂走行群の血中 Irisin 放出を促進したと推察される。

Ochi ら³⁶⁾は、電気刺激装置を用いて、ラットの足底屈筋を対象に、遠心性収縮または求心性収縮の最大収縮トレーニングを10日間または20日間行った。トレーニング後の足底筋の断面積、成長因子・サイトカイン産生量（IL-6, Myostatin など）を評価した。その結果、20日間の遠心性収縮トレーニングは、筋肥大関連 Myokine である IL-6 の増加と筋萎縮関連 Myokine である Myostatin の減少に伴う筋サイズと筋力の増加をもたらしたと結論づけた。IL-6 と Myostatin はともに Irisin と同様に筋肥大や筋萎縮に関連する Myokine である³⁷⁾。しかし、この研究の段階で未発表であった Irisin は評価されていない。このような遠心性収縮を伴うレジスタンストレーニングにおいても、Irisin が発現している可能性が高い。

本研究では、走行群の個体に負荷されるメカニカルパワーを一致させるために16°の傾斜が選択された³⁸⁾。上り坂走行は、げっ歯類の下り坂走行と比較して、傾斜角の大きさ、同じ速度、時間での酸素取り込みが有意に高い^{33,39)}。Aydin ら⁴⁰⁾が、ラットに10分間の水浮動を課したところ、心筋および骨格筋組織上清中の Irisin 濃度が上昇した。彼らは、Irisin の主な産生組織は心筋だろう⁴⁰⁾と述べているが、一般に同等のメカニカルパワー条件では下り坂群の方が上り坂群よりも心拍数は少ない⁴¹⁾にも関わらず、本研究ではより高い血清 Irisin 濃度を認めた。また、90分間のランニング負荷は、10分間の水上浮遊負荷に比べて、四肢筋への負荷が大きいため、骨格筋からの Irisin 放出を強く刺激すると考えられる。このように、負荷の量や種類によっては、骨格筋は心筋と同様に循環 Irisin 濃度に影響を与えると考えられる。Ato ら⁴²⁾は、ラットの腓腹筋では、経皮電気刺激装置を用いた実験で筋に負荷された仕事量が一致している場合、収縮様式の違いがタンパク質の合成/分解を調整する mTORC1 活性を決定しないことを示した。さらに、最近のヒトを対象とした研究では、大腿四頭筋に負荷される仕事量が一致した場合に遠心性収縮トレーニングと求心性収縮トレーニングで筋力向上効果に差がないと報告されている⁴³⁾。今後の研究では、Myokine 発現が同等になるように仕事量を調節した場合も収縮様式によって筋力向上効果の違いがあるかを評価する必要がある。遠心

性収縮の利点は、求心性収縮に比べて低代謝コストで同じ収縮力を発揮できることである。したがって、今後、遠心性収縮が低代謝コストで求心性収縮と同等の筋力向上効果を示すか調べる研究では、運動療法のアウトカムの代理指標として Myokine を用いることができるか検討すると共に、代謝コストや運動時間が同じであるプロトコルを比較する必要がある。

第3項 研究限界

この研究には多くの制限がある。動物の血液サンプルは、走行後 48 時間後に一度のみ採取した。異なる時間に採取した血液サンプルを使用した場合、血清中濃度の結果が異なる可能性がある。しかし、レジスタンストレーニング後 48 時間においてラットの血漿中の Irisin 濃度が上昇した報告⁴⁴⁾もあるため、この時間帯に Irisin 濃度がピークに達することが期待されている。走行タスクの何時間後に血中 Irisin 濃度が上昇するのかという疑問に対するコンセンサスは現状存在せず、今後の課題となる。また、本研究では 1 セッションのみの走行後の状態を評価したが、長期的なトレーニングでこれらの変化が維持されるかどうかは不明である。さらに、本研究で用いた上り坂/下り坂走行の実験デザインでは、動物個体に対して群間で仕事量をマッチングさせることができるが、各骨格筋の仕事量は厳密にマッチングできない。今後の研究を進展させながら、この限界を考慮する必要がある。

第5節 結論

本研究より、遠心性収縮を伴う一過性の運動は、生体の恒常性において重要な役割を果たす Irisin を、求心性収縮主体の運動よりも効率的に産生させることが明らかになった。この結果は、遠心性収縮が Irisin を介して筋力向上効果を示す機序を示唆する。さらに、Irisin が筋力向上効果の代理指標として有用である可能性も開かれた。Irisin の応用は、今後筋萎縮を呈す可能性のある種々の病態に対する治療や健康増進のための運動プログラムの構築に貢献するだろう。

第3章

中期的な下り坂走行トレーニングが

Glucocorticoid 誘導性筋萎縮症モデルラットの骨格筋に及ぼす影響

第1節 緒言

序章で述べたように、筋萎縮症は、リハビリテーション現場において高頻度で遭遇する主要な治療対象である。筋萎縮症の原因は、廃用性、加齢、疾患原性、薬剤性など多岐にわたり、それぞれ特徴的な萎縮を呈する。DEXに代表されるsteroid（特にGC）製剤は、極めて優れた抗炎症作用を有するため、多種多様な炎症性疾患に対して投与される⁴⁵⁾。しかし、強力な薬理作用を有する反面、有害な副作用も多数報告されている⁴⁶⁾。特にGC誘導性筋萎縮症は、著しい筋力低下に伴うADLの低下を招く、極めて重大な副作用である⁴⁷⁾。

GC誘導性筋萎縮症は、四肢近位筋に好発し、Type II線維優位の萎縮を呈する⁴⁸⁾。また、GC誘導性の筋力低下の要因は筋細胞における膜電位の興奮性や、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体発現の異常ではなく、筋萎縮による力学的要因であると考えられている^{49,50)}。ラットに対する5日間のDEX投与は、筋タンパク質の分解経路の起点となるMyokine、「Myostatin」の発現を遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで増加させてタンパク質分解を促進する⁵¹⁻⁵³⁾。実際、MyostatinノックアウトマウスにDEXを一定期間投与しても筋量の減少は認められない⁵⁴⁾。加えて、GCは、筋タンパク質合成経路の起点となるMyokine、「IGF-1」の産生を阻害して筋タンパク質合成経路を鈍化させることが示唆されている^{52,53)}。すなわちGCは、筋タンパク質の合成/分解両方の経路を阻害して筋萎縮を生じさせるらしい。

GC誘導性筋萎縮症に対する運動介入の効果は、ヒトとげっ歯類の筋萎縮モデルで検証されてきた。Gardinerら⁵⁵⁾は、ラットを対象に、軽負荷のweight-liftingプログラムによって腓腹筋のGC誘導性筋萎縮を部分的に予防できたと報告した。これ以降、GC誘導性筋萎縮に対する運動介入の効果は多数示されており、一部の報告⁵⁶⁾を除き、大半が部分的な萎縮の予防や抑制に肯定的な結果を示している⁵⁷⁻⁶²⁾。さらに近年、Myostatinと拮抗するIrisin処置によってC2C12筋管細胞におけるDEX誘導性筋萎縮を抑制できると報告された²⁷⁾。第2章で報告したように、遠心性収縮優位の下り坂走行は、上り坂走行と比較してIrisin産生を高める可能性がある⁶³⁾。著者が知る限り、筋収縮様式の異なる運動条件がGC誘導性筋萎縮症からの回復に及ぼす影響を比較した研究はなかった。GC誘導性筋萎縮症に対する遠心性収縮と求心性収縮トレーニングの効果の違いがあれば、運動療法プログラムを立案する際に有用である。本研究の目的は、遠心性収縮優位の下り坂走行トレーニングがGC誘導性筋萎縮症からの回復を促進し得るかどうかを明らかにすることである。

第2節 方法

第1項 実験動物

本研究の対象動物は、10週齢の雄 Wistar ラット(日本 CLEA, 大阪)であった (n=40)。全ての対象動物は、12時間毎に明暗が切り替わり、常時 23 °C に室温管理された動物舎内のケージにて、約1週間、馴化飼育した。馴化飼育の間、対照動物は餌と飲用水を自由に摂取できた。本研究は、本学の動物実験委員会で承認された(承認番号:A-19-03)。

第2項 実験プロトコル

2-1 群分けおよび Dexamethasone 投与

対象を、8匹ずつ5群(Vehicle群, DEX群, 上り坂走行群 [UH群], 下り坂走行群 [DH群], 下り坂高速走行群 [DHF群])に分けた。Vehicle群は、実験開始日より5日間連続で1 ml/kg¹の生理食塩水を腹腔内に投与した後、6週間自由飼育した。その他の群は、DEX誘導性筋萎縮症を生じさせるため、Vehicle群と等量の生理食塩水で希釈された600 µg/kg¹のDEX (Sigma-Aldrich, アメリカ)を5日間連続で腹腔内に投与した^{51,64})。その後6週間、DEX群はケージの中で自由飼育し、UH群, DH群, およびDHF群にはトレッドミル走行トレーニングを課した。

2-2 走行条件

全ての動物に、連続した2日間、トレッドミル上(速度10 m/分)で10分間の馴化走行を課した。尚、馴化走行は傾斜0°で実施した。

DEX投与終了後、各走行群に15分×2セット×18セッション(3セット/週×6週)の走行を課した。各セット間には5分の休憩を設けた。走行群は、先行研究⁶⁵)に準じてそれぞれ15°の上り坂もしくは下り坂に傾斜したげっ歯類用トレッドミル(室町機械, 東京)上を走行した。走行群は、トレーニング時間以外は自由飼育した。

ラットが全セッションを完走できるようにUH群の走行速度を、第1週:12 m/分, 第2週:14 m/分, 第3週以降:16 m/分と漸増させた。DH群の走行速度は、UHと同等のメカニカルパワー(走行距離と高低差)が得られるようにUH群と同様に設定した。一方、DHF群の走行速度は、UH群と同等の酸素消費量が得られるように、先行研究⁶⁵)で示された回帰式に従い、第1週:22 m/分, 第2週:26 m/分, 第3週以降:30 m/分と漸増させた。

第3項 組織採取と保存

3-1 筋組織

血液採取の直後、左後肢より、ヒラメ筋、内側腓腹筋、および長趾伸筋を採取した。ヒラメ筋の組成は Type I 線維優位であり、DEX 誘導性筋萎縮症を呈しにくい^{47,60,66}。腓腹筋の組成は Type II 線維優位であり、DEX 誘導性筋萎縮を呈する^{55,67}。長趾伸筋の組成は Type II 線維優位であり、DEX 誘導性筋萎縮を呈する⁶⁰が、抗重力筋ではないため、異なる傾斜走行において特徴的な筋収縮様式の差異は観察されないと考えられる。摘出された筋組織は、筋湿重量の測定の後、速やかに 10 % 中性リン酸緩衝ホルマリンで、4 °C にて固定した。24 時間後、常法に従い、パラフィン包埋処理を行い、組織学的評価に用いるまでパラフィンブロックとして保存した。

3-2 血清

Vehicle 群および DEX 群は、16 週齢を迎えた時点で、腹腔内にペントバルビタールナトリウムの過剰投与によって屠殺した。走行群は、最終走行終了の 48 時間後、同様に処置した。心停止および呼吸停止を確認した直後、左心室穿刺によって血液を採取した。採取した血液を直ちに 4 °C、3,000 rpm、10 分間遠心し、分離された血清を生化学的分析に用いるまで -80 °C で保存した。

第4項 筋組織の評価

5 μm に薄切された筋のパラフィン切片を、MAS コーティングされたスライドガラス（松浪硝子、日本）に貼付した。切片をキシレンで脱脂し、濃度の異なるエタノールに浸漬させることで再水和した。常法に則り、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。断面の写真は、顕微鏡（BX50、オリンパス株式会社、日本）を用いて撮影した。各筋切片から各 3 枚の横断面画像（200 倍）を撮影し、Image J（United States National Institutes of Health, アメリカ）を用いて各筋より計 100 本の筋線維断面積を定量化した。

第5項 生化学的評価

血清中の Myokine 濃度は、ELISA 法 [Myostatin (R&D systems, アメリカ, DGDF80), IGF-1 (R&D systems, アメリカ, MG100), および Irisin (Phoenix Pharmaceuticals, アメリカ, EK-067-29)] によって定量した。本研究に用いた Irisin ELISA キットは、現在市販されている Irisin 定量用 ELISA キットの中で最も信頼性が高いと考えられている³⁵⁾。ELISA は、製品説明書に従って実施した。血清の吸光度の算出には、4パラメータロジスティクス機能を有するマイクロプレートリーダー-SH-1200 および SF-6 software (コロナ電気株式会社, 日本) を用いた。

第6項 統計分析

データは、全て平均 ± 標準誤差で示した。体重の比較には、解剖時の体重を実験開始時の体重で除した値を用いた。筋湿重量の比較には、解剖時の湿重量を実験開始時の体重で除した値を用いた。Shapiro-Wilk 検定によって正規性を検定した。正規性が認められなかったアウトカムは、Steel-Dwass 法による多重比較を行った。正規性が認められたアウトカムは、Levene 検定によって等分散性を検定した。等分散性が認められたアウトカムは、Tukey 法による多重比較を行った。等分散性が認められなかったアウトカムは Games-Howell 法による多重比較を行った。統計分析には、R2.8.1 (R Foundation for Statistical Computing) を用いた。全ての検定における有意水準は $\alpha = 5\%$ に設定した。

第3節 結果

解析に供した全てのアウトカムを表1に示した。

表 1. 各群の体重, 筋湿重量, 血清中 Myokine 濃度, および筋線維断面積

		Vehicle		DEX		DEX+Uphill		DEX+Downhill		DEX+Downhill F	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
体重											
実験開始時	g	300.6	5.7	338.7	3.9	284.9	2.2	321.6	4.4	301.3	5.6
解剖時	g	419.6	10.7	425.0	10.8	380.8	5.2	398.2	9.0	399.8	8.4
体重変化率											
解剖時/実験前	%	139.5	1.6	125.4 *	2.3	133.7 †	1.9	123.8 *‡	2.1	132.7 §	1.7
筋湿重量/実験前体重											
ヒラメ筋	%	0.054	0.003	0.048	0.002	0.062 *†	0.002	0.054	0.002	0.065 †	0.003
内側腓腹筋	%	0.327	0.025	0.287 *	0.007	0.334 †	0.004	0.297 *‡	0.009	0.318 †	0.007
長趾伸筋	%	0.056	0.006	0.050	0.002	0.056	0.001	0.052	0.001	0.056	0.007
筋線維断面積											
内側腓腹筋	μm ²	3170.7	265.5	2777.0	181.2	2153.1 *	201.1	1901.5 *†	167.7	3385.3 ‡ §	261.8
血清中Myokine濃度											
Myostatin	ng/ml	7.90	0.37	6.79	0.58	9.49 †	0.86	7.42	0.56	8.15	0.35
IGF-1	ng/ml	902.9	31.1	799.5	32.1	829.0	49.7	919.0	55.6	931.4	57.1
Irisin	ng/ml	21.91	0.84	22.64	2.30	17.76 *	0.85	16.91 *	1.00	19.58	0.90

DEX: Dexamethasone 投与群 F: 高速度 IGF-1: Insulin-like growth factor-1 SE: standard error = 標準誤差

*: Vehicle に対する有意差 †: DEX に対する有意差 ‡: DEX+Uphill に対する有意差 §: DEX+Downhill に対する有意差

第1項 体重 (表1, 図4)

各群における解剖時の体重を実験開始時の体重で除した比率および Tukey 法の結果を図4に示した。DEX 群の体重変化率は, Vehicle 群 ($p < 0.01$) と UH 群 ($p = 0.04$) に対して有意に低値を示した。DH 群の体重変化率は, Vehicle 群 ($p < 0.01$), UH 群 ($P = 0.01$), および DHF 群 ($p = 0.02$) に対して有意に低値を示した。その他の群間に有意差は認められなかった。

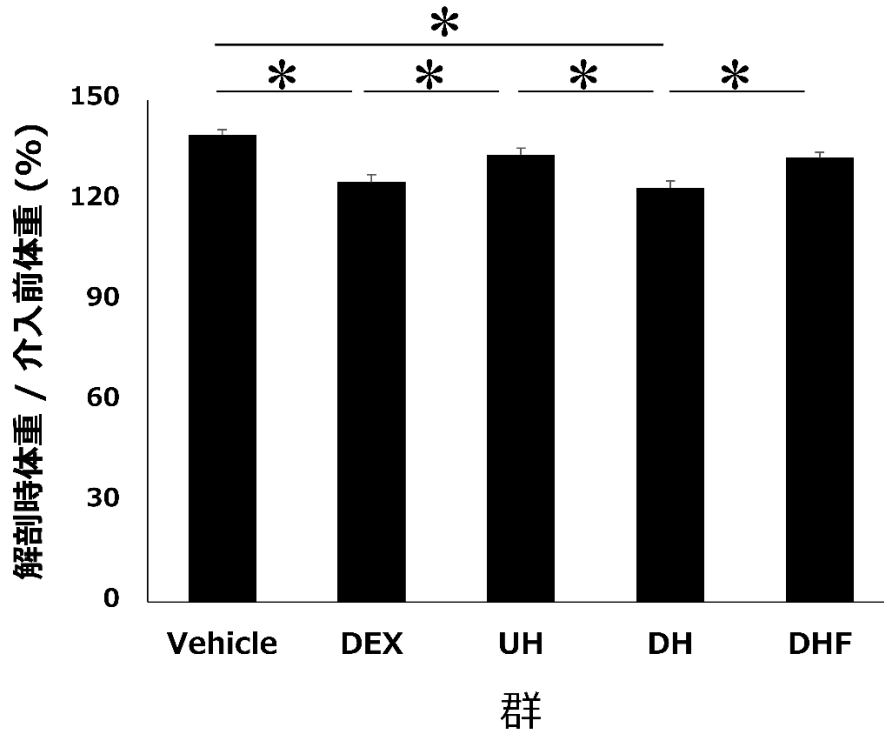


図4. 各群における体重変化率

DEX: Dexamethasone UH: 上り坂走行群 DH: 下り坂走行群 DHF: 高速下り坂走行群

*: $p < 0.05$

第2項 筋湿重量 (表1, 図5)

2-1 ヒラメ筋 (図5A)

各群におけるヒラメ筋の筋湿重量 (実験開始時の体重で除した比率) を図5Aに示した。Steel-Dwass法の結果, DEX群の筋湿重量は, UH群 ($p=0.01$) と DHF群 ($p=0.02$) に対して有意に低値を示した。その他の群間に有意差は認められなかった。

2-2 内側腓腹筋 (図5B)

各群における腓腹筋の筋湿重量 (実験開始時の体重で除した比率) を図5Bに示した。Tukey法の結果, DEX群の筋湿重量は, Vehicle群 ($p<0.01$), UH群 ($p<0.01$), および DHF群 ($p=0.04$) に対して有意に低値を示した。DH群の筋湿重量は, Vehicle群 ($p=0.04$) と UH群 ($p=0.01$) に対して有意に低値を示した。その他の群間に有意差は認められなかった。

2-3 長趾伸筋

Steel-Dwass法の結果, 全ての群間に有意差は認められなかった。

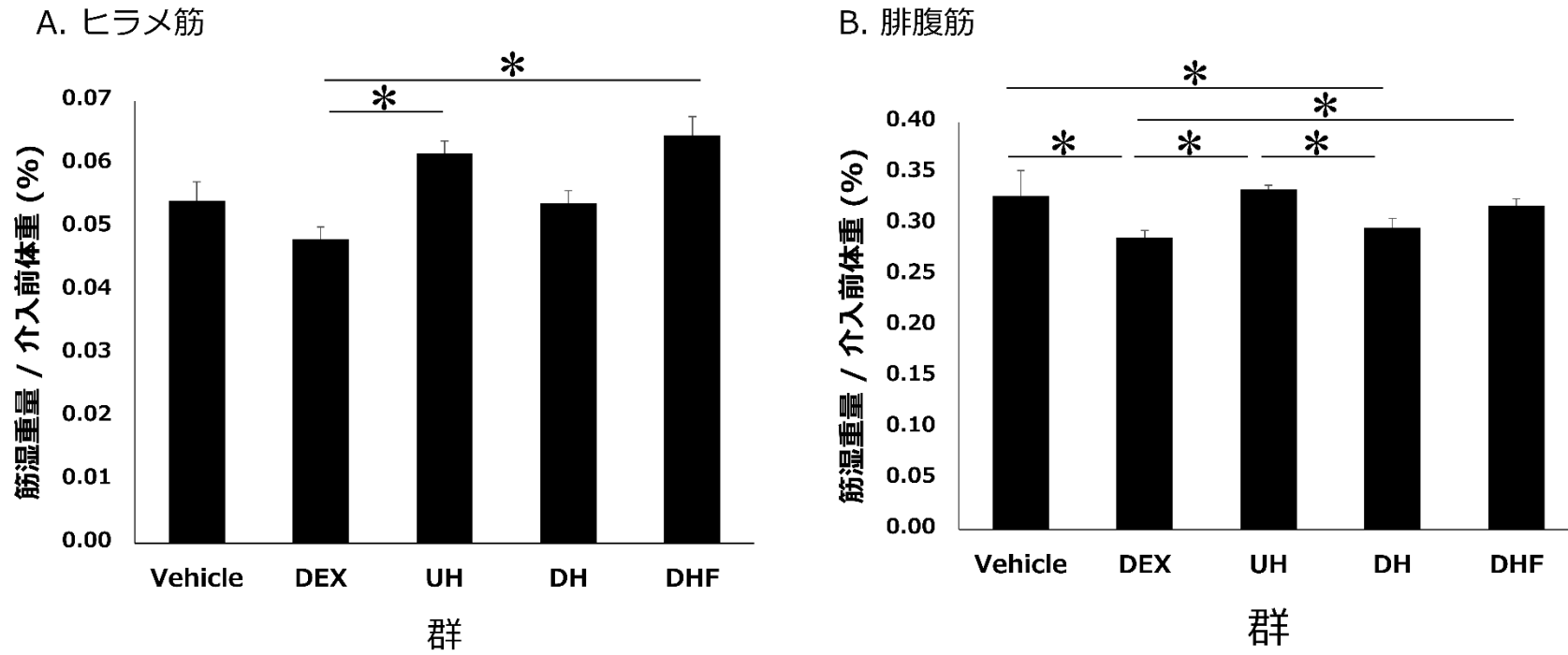


図 5. 各群における介入前体重に対する筋湿重量

DEX: Dexamethasone UH: 上り坂走行群 DH: 下り坂走行群 DHF: 高速下り坂走行群 *: $p < 0.05$

第3項 筋線維断面積 (表1, 図6, 図7)

各群における内側腓腹筋の筋線維断面積平均値および Tukey 法の結果を図6に示した。Vehicle 群の筋線維断面積は, UH 群 ($p=0.02$) と DH 群 ($p<0.01$) に対して有意に高値を示した。DHF 群の筋線維断面積は, UH 群 ($p<0.01$) と DH 群 ($p<0.01$) に対して有意に高値を示した。その他の群間に有意差は認められなかった。

各群における内側腓腹筋の筋線維断面積分布 (各範囲に含まれる線維数 / 計測された線維数) および多重比較の結果を図7に示した。500-1500 μm の範囲において, Steel-Dwass 法の結果, 全ての群間に有意差は認められなかった。1500-2000 μm の範囲において, Games-Howell 法の結果, 全ての群間に有意差は認められなかった。2500-3000 μm の範囲において, Tukey 法の結果, 全ての群間に有意差は認められなかった。3500-4000 μm の範囲において, Steel-Dwass 法の結果, DHF 群は, DH 群 ($p=0.02$) に対して有意に高値を示したが, その他の群間に有意差は認められなかった。4500-5000 μm の範囲には, Steel-Dwass 法が適用された。DEX 群は, UH 群 ($p=0.01$) と DH 群 ($p<0.01$) に対して有意に高値を示した。DHF 群は, UH 群 ($p=0.03$) と DH 群 ($p=0.02$) に対して有意に高値を示した。UH 群は Vehicle 群に対して有意に低値を示した ($p=0.01$)。その他の群間に有意差は認められなかった。

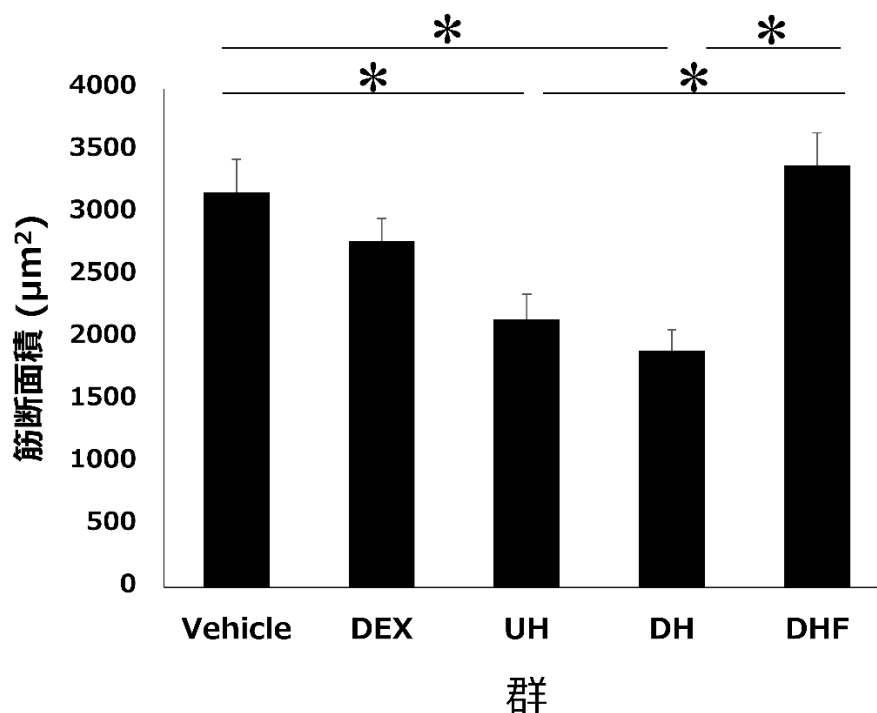


図6. 内側腓腹筋筋線維断面積

DEX: Dexamethasone UH: 上り坂走行群 DH: 下り坂走行群 DHF: 高速下り坂走行群

*: $p < 0.05$

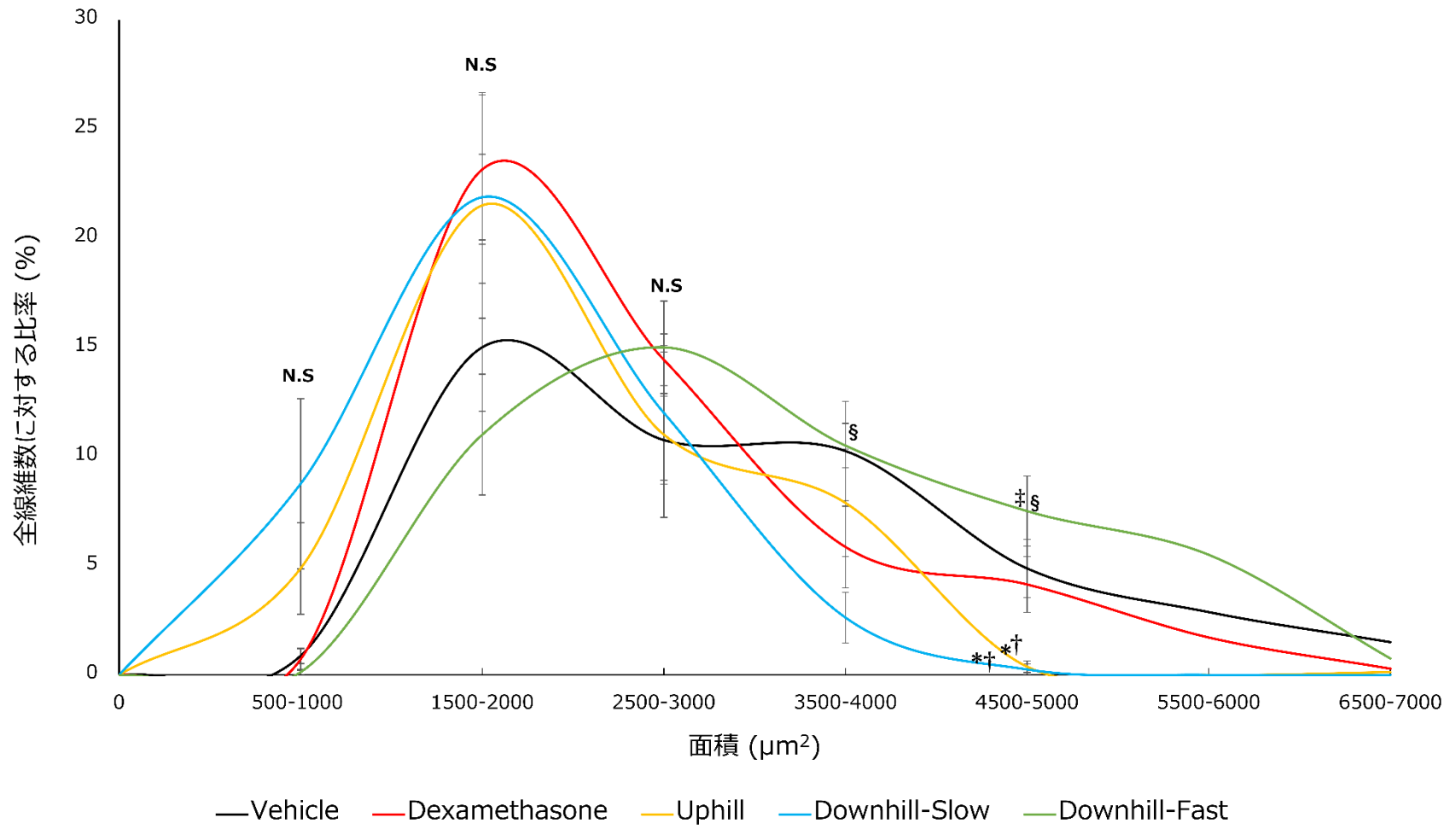


図 7. 内側腓腹筋における筋線維断面積の分布

N.S: 有意差なし *: Vehicle に対する有意差 †: Dexamethasone に対する有意差 ‡: Uphill に対する有意差 §: Downhill-Slow に対する有意差

第 4 項 血清中 Myokine 濃度 (表 1)

4-1 Myostatin

Tukey 法の結果, UH 群の Myostatin 濃度は, DEX 群に対して有意に高値を示した。その他の群間に有意差は認められなかった。

4-2 IGF-1

Tukey 法の結果, いずれの群間にも有意差は認められなかった。

4-3 Irisin

Games-Howell 法の結果, Vehicle 群の Irisin 濃度は, UH 群および DH 群に対して有意に高値を示した。その他の群間に有意差は認められなかった。

第4節 考察

第1項 筋湿重量について

体重や腓腹筋の筋湿重量は、DEX 投与によって一時的に減少すると報告されている⁵⁵⁾が、通常は DEX 投与終了時点から自然回復が始まる⁶⁸⁾。本研究で採用した DEX 投与量⁵¹⁾の場合、6 週間の自由飼育 (DEX 群) のみではそれらを Vehicle 群と同程度まで回復させられなかった。対照的に、UH と DHF 介入は、Vehicle 群と同程度までそれらの指標を回復させた。GC は、Myostatin 発現を増加させ、Smad2/3 を介してタンパク質合成経路における Akt のリン酸化を抑制する⁵³⁾ (図 8)。Irisin と IGF-1 はタンパク質合成経路を活性化させることで、Myostatin に拮抗する^{27,53)}。一般に、健常ラットではトレッドミル走行トレーニングによって血中 Irisin 濃度が向上する^{69,70)}が、本研究 (GC 投与後) では、Irisin 産生が高まることはなかった。よって、GC が Irisin の放出を誘導するシグナルや受容体との結合を抑制している可能性がある。もしくは、UH 介入と DHF 介入による筋湿重量の回復には、本研究では評価していない TRPV1 経路などの Myokine 以外のタンパク質合成経路が関与していると推察する。

以上より、中期的な走行トレーニングが GC 誘導性筋萎縮症からの筋湿重量の回復に有効であることが示された一方で、筋収縮様式の違いは影響しないことが明らかになった。なお、DH 群は代謝コストおよび筋に対するメカニカルストレスのいずれも他の走行群より小さいため、体重や筋湿重量を改善させるまでに至らなかったと考えられる。よって、以下の考察は UH 群と DHF 群の比較を中心に展開する。

第2項 筋線維断面積について

筋湿重量と同様に、腓腹筋の筋線維断面積も DEX 処置によって一時的に狭小化すると報告されている⁵⁵⁾が、本研究における 6 週間の自由飼育および DHF 介入によって Vehicle 群と同等まで回復した。対照的に、UH 介入はむしろ筋線維断面積の回復を妨げた。注目すべきは、DHF 介入が UH より有意に大径線維 (4500-5000 μm^2) の回復を促進し、筋線維断面積をより正常な組成にした点である。また、DEX 処置によって短期間で一過性に上昇する血中 Myostatin 濃度は、6 週間の自由飼育によって Vehicle 群と同等まで収束したが、UH 群では DEX 群より高値を示した。Myostatin は筋量のみならず筋線維タイプ組成にも関連⁷¹⁾し、濃度の上昇は Type II 線維の比率低下を招く。求心性収縮優位のトレッドミル走行では、主に Type I 線維が動員される⁷²⁾。Uchikawa ら⁶⁰⁾の報告では、GC 投与と並行して行われた 5 週間の中等強度のトレッドミル走行によって、Type II 線維優位である長趾伸筋において、Type I 線維の占有率が上昇した。本研究では筋線維タイプを染め分ける染色法を用いていないため推察であるが、UH 介入における Type I 線維優位の動員と血中 Myostatin 濃度の上昇傾向、および筋線維断面積の低下が関連している可能性がある。一方で、DHF 介入は、

Vehicle 群および自由飼育と同等の筋線維径組成および Myokine 発現が観察された。当初の予想に反して、DHF 介入によって Vehicle 群に対して Irisin および IGF-1 濃度の上昇と Myostatin 濃度の低下は認められなかった。下り坂走行時の腓腹筋は、遠心性収縮を呈する^{33,34)}。遠心性収縮では、サイズの原理が逆転し、Type II 線維が特異的にリクルートされる⁷³⁾。よって、UH 群と同等の代謝コストで実施された DHF 群においては、Type II 線維が特異的にリクルートされた結果、筋線維断面積を Vehicle 群と同等まで回復させることができたと考えられる。筋線維断面積が小さい UH 群において、筋湿重量は DHF 群と同等であったことから、UH 群において Type I 線維が過形成されている可能性が考えられるが、本研究のデータからは証明できない。DHF 群において筋線維断面積が維持されることは、ADL に関わる運動機能を鑑みると重要な違いである。

本研究では、血清中 Myokine 濃度を一時点のみで実施した。DEX 投与による Myokine 変動は投与開始から短期間で一過性に上昇し、それ以後は収束する⁵¹⁾。DEX 投与期間やトレーニング期間中に経時的に血液採取ができていればより詳細な群間の比較が行えた可能性があり、今後の研究に持ち越すべき課題となった。

第 3 項 先行研究との比較

先行研究では、トレッドミル走行によって部分的に GC 誘導性筋萎縮を抑制できると報告されている^{57,60,74-76)}。Hickson ら⁵⁷⁾のプロトコルは、12 週間の予防的運動介入を課し、介入期間の最後 10 日間に GC 投与を行っている。また、その他の研究では、GC 投与と運動介入を並行して実施している^{60,74-76)}。また、本研究と先行研究では、投与された GC の種類、投与経路、投与量も各々異なる。本研究では、運動プロトコルの事前に DEX 投与を行うことで、既に筋萎縮が生じた状態からの回復に適した運動条件と Myokine の関連を検討した。本研究で得られた知見が、ステロイドパルス療法後の回復を図る運動療法を検討する際の一助になることを期待する。

第 4 項 研究限界

本研究には、いくつかの限界が含まれている。第一に、走行群における走行強度の問題である。本研究では、現実的に運動療法として施行できることを前提に、全てのラットが完走できるよう、1 セッションにつき 15 分×2 セットの走行負荷を設定した。GC 誘導性筋萎縮モデルラットに対してトレッドミル走行を負荷した先行研究では、高速度で 60 分間⁷⁴⁾や 90 分間^{59,75,76)}など、長時間の激しい負荷を与えている。運動療法として効果的、かつ現実的に患者に適用できる運動強度は、今後ヒトを対象とした研究で明らかにする必要がある。第二に、二章でも述べたように、傾斜の異なるトレッドミル走行で個々の骨格筋に与えられる仕事量は必ずしも均等ではない。さらに、トレッドミル傾斜の違いが脳血流量や肺の換気血流比などの今まで報告されていない未知の因子と関連している可能性もある。真の意味で収縮様式の違いを検討するのであれば、電気刺激装置などを用いて収縮の強さや頻度、仕事量などを制御する必要がある。

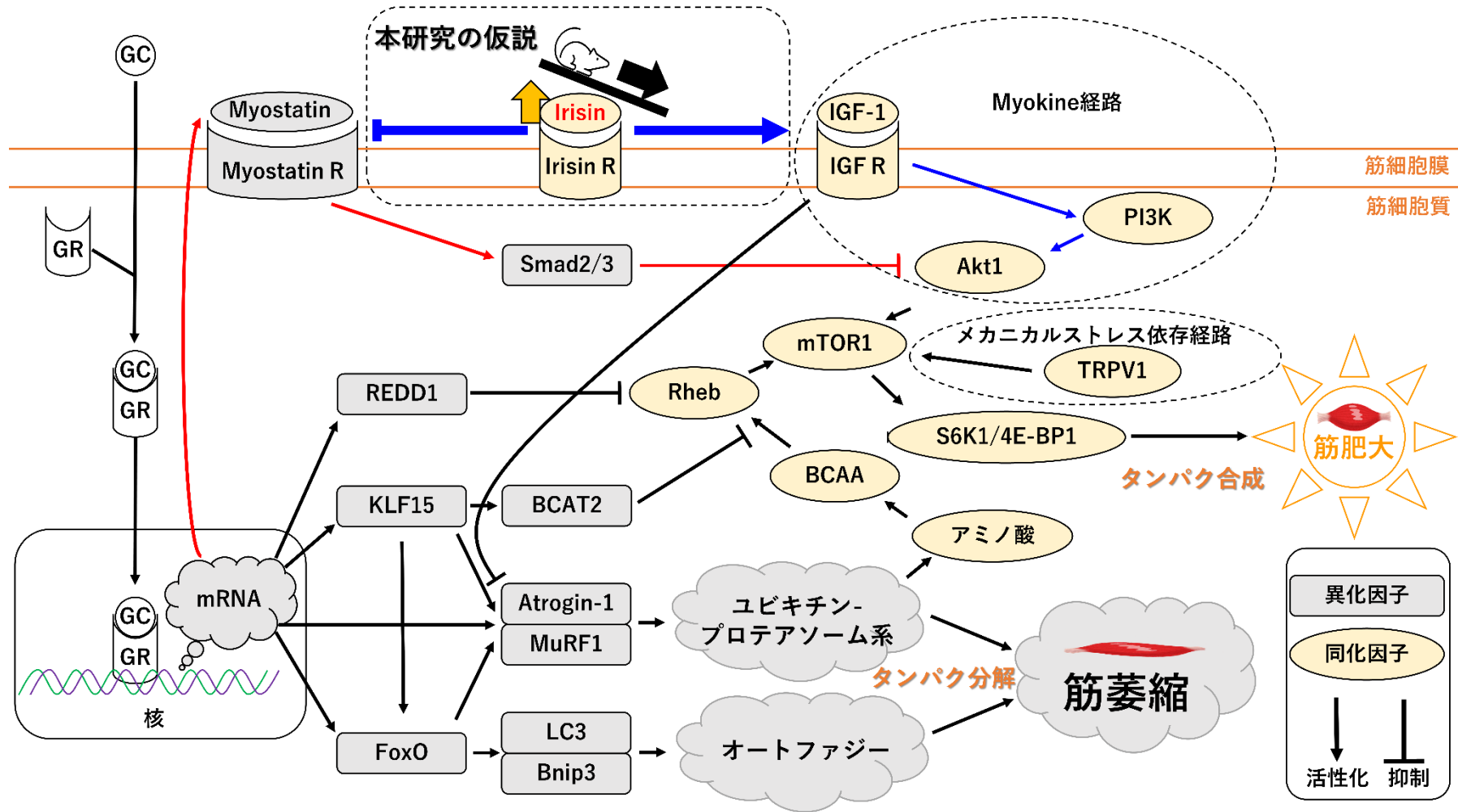


図 8. Glucocorticoid 誘導性筋萎縮のメカニズムと本研究の仮説 (文献 55 と 64 を参考に作成)

GR: Glucocorticoid 受容体 Myostatin R: Myostatin 受容体 Irisin R: Irisin 受容体

Glucocorticoid は Myostatin 発現を増加させ、Smad2/3 を介してタンパク質合成経路である Akt1 のリン酸化を抑制する。

第5節 結論

同等の代謝コストで行われた6週間の上り坂および下り坂走行トレーニングは、GC誘導性筋萎縮を呈したラット腓腹筋の筋湿重量を同様に回復させたが、この結果と Irisin との関連は不明であった。一方、下り坂走行トレーニングは、筋量調節に関わる Irisin などの血中 Myokine 濃度と腓腹筋の筋線維断面積をより正常な状態に回復させる可能性が示唆された。本研究結果より、GC誘導性筋萎縮症からの正常な回復を促進する運動療法として、相対的に下り坂走行トレーニングが適している可能性が示唆された。

終章

結論（総合）

本研究は 3 章構成で、Irisin に関する知見を整理し、一過性の急性下り坂走行がラットの生体内 Irisin 動態に及ぼす影響、および Irisin 発現を促すと期待される下り坂走行トレーニングが Glucocorticoid 誘導性筋萎縮症モデルラットの骨格筋に及ぼす影響を検討した。第 1 章から、Irisin の作用に関する知見が膨大に報告されていることが明らかになった。その一方で、Irisin 発現を最大化する至適運動条件に関する知見が乏しく、研究の余地が多分に残っていることが明らかになった。また、第 2 章から、一過性の遠心性収縮運動が Irisin 産生に適していることが明らかになった。そして、第 3 章から、Irisin などの血中 Myokine 濃度が正常に維持される遠心性収縮優位のトレーニングを継続することで Glucocorticoid 性筋萎縮症から正常な状態への回復が促進される可能性が示唆された。一方で、遠心性収縮を中心に行うトレーニングは過負荷で行えば筋損傷を助長するリスクもあるため、英語で Negative training と表現されることもある。運動強度に関しては、ヒトを対象に適切な条件を設定するための研究が望まれる。また、Myokine 産生がサルコペニアや廃用性筋萎縮など、異なるメカニズムによって生じる筋萎縮症とどのように関連するかを明らかにする研究も重要になると考える。

リハビリテーションに新たな価値と意義を付与して対象者の健康寿命を延伸するために、専門職は臨床的な技術に加えて、基礎的な知識を更新し続ける必要がある。そして、臨床で勤務するリハビリテーション専門職が、自発的に臨床的貢献度の高い基礎研究を推進することが結果的に専門職としての職能向上につながると考える。

謝辞

学部生時のゼミ活動から、長年にわたり研究をご指導いただきました吉備国際大学大学院保健科学研究科 中嶋正明准教授に最大限の敬意と謝意を表します。また、学位論文の基礎となる原著の作製に携わっていただいた吉備国際大学大学院保健科学研究科の秋山純一准教授，退官された川上照彦教授，博士課程の今野哲男先生，研究協力者の坂上康文さん，佐藤嘉展さん，およびゼミ生の皆様，そして，研究活動を理解し，支援してくれた家族に深く感謝申し上げます。

学位論文の基礎となる原著

Masanobu Murao, Tetsuo Imano, Junichi Akiyama, Teruhiko Kawakami, Masaaki Nakajima.
Effect of single bout downhill running on the serum irisin concentrations in rats: Growth Factors
37 (5-6), 257-262

参考文献

1. Dave HD, Shook M, Varacallo M. (2020) Anatomy, skeletal muscle. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
2. Wolfe RR. (2006) The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 84(3): 475-482.
3. Frontera WR, Ochala J. (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96(3): 183-195.
4. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B. (2003) Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 24(2-3): 113-119.
5. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. (2012) A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481(7382): 463-468.
6. Raschke S, Elsen M, Gassenhuber H, Sommerfeld M, Schwahn U, Brockmann B, Jung R, Wisløff U, Tjønnå AE, Raastad T, Hallén J, Norheim F, Drevon CA, Romacho T, Eckardt K, Eckel J. (2013) Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One* 8(9): e73680.
7. Erickson HP. (2013) Irisin and FNDC5 in retrospect: an exercise hormone or a transmembrane receptor? *Adipocyte* 2(4): 289-293.
8. Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, Lee S, Brenmoehl J, Thomas S, Drevon CA, Erickson HP, Maak S. (2015) Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Sci Rep* 5: 8889.
9. Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, Gerber KK, Szpyt J, Robinson MM, Nair KS, Gygi SP, Spiegelman BM. (2015) Detection and quantitation of circulating human irisin by tandem mass spectrometry. *Cell Metab* 22(4): 734-740.
10. Huh JY, Mougios V, Kabasakalis A, Fatouros I, Siopi A, Douroudos, II, Filippaios A, Panagiotou G, Park KH, Mantzoros CS. (2014) Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation. *J Clin Endocrinol Metab* 99(11): E2154-2161.
11. Loffler D, Muller U, Scheuermann K, Friebe D, Gesing J, Bielitz J, Erbs S, Landgraf K, Wagner IV, Kiess W, Korner A. (2015) Serum irisin levels are regulated by acute strenuous exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 100(4): 1289-1299.

12. Chang JS, Kim TH, Nguyen TT, Park KS, Kim N, Kong ID. (2017) Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. *Geriatr Gerontol Int* 17(11): 2266-2273.
13. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Oranger A, Mori G, Brunetti G, Colucci S, Cinti S, Grano M. (2014) Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol* 2014: 902186.
14. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, Lu P, Sartini L, Di Comite M, Mori G, Di Benedetto A, Brunetti G, Yuen T, Sun L, Reseland JE, Colucci S, New MI, Zaidi M, Cinti S, Grano M. (2015) The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(39): 12157-12162.
15. Wrann CD. (2015) FNDC5/irisin - their role in the nervous system and as a mediator for beneficial effects of exercise on the brain. *Brain Plast* 1(1): 55-61.
16. Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, Kim E, Rompala A, Oram MK, Asselin C, Aronson J, Zhang C, Miller SJ, Lesinski A, Chen JW, Kim DY, van Praag H, Spiegelman BM, Gage FH, Tanzi RE. (2018) Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science* 361(6406).
17. Belviranlı M, Okudan N, Kabak B, Erdoğan M, Karanfilci M. (2016) The relationship between brain-derived neurotrophic factor, irisin and cognitive skills of endurance athletes. *Phys Sportsmed* 44(3): 290-296.
18. Küster OC, Laptinskaya D, Fissler P, Schnack C, Zügel M, Nold V, Thurm F, Pleiner S, Karabatsiakakis A, von Einem B, Weydt P, Liesener A, Borta A, Woll A, Hengerer B, Kolassa IT, von Arnim CAF. (2017) Novel blood-based biomarkers of cognition, stress, and physical or cognitive training in older adults at risk of dementia: preliminary evidence for a role of BDNF, irisin, and the kynurenine pathway. *J Alzheimers Dis : JAD* 59(3): 1097-1111.
19. Liu TY, Shi CX, Gao R, Sun HJ, Xiong XQ, Ding L, Chen Q, Li YH, Wang JJ, Kang YM, Zhu GQ. (2015) Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. *Clin Sci* 129(10): 839-850.
20. Zhao YT, Wang J, Yano N, Zhang LX, Wang H, Zhang S, Qin G, Dubielecka PM, Zhuang S, Liu PY, Chin YE, Zhao TC. (2019) Irisin promotes cardiac progenitor cell-induced myocardial repair and functional improvement in infarcted heart. *J Cell Physiol* 234(2): 1671-1681.
21. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, Mantzoros CS. (2012) FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism* 61(12): 1725-1738.

22. Huh JY, Dincer F, Mesfum E, Mantzoros CS. (2014) Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans. *Int J Obes* (2005) 38(12): 1538-1544.
23. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387(6628): 83-90.
24. Shan T, Liang X, Bi P, Kuang S. Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1 α -Fndc5 pathway in muscle. (2013) *FASEB J* 27(5): 1981-1989.
25. Colaianni G, Mongelli T, Cuscito C, Pignataro P, Lippo L, Spiro G, Notarnicola A, Severi I, Passeri G, Mori G, Brunetti G, Moretti B, Tarantino U, Colucci SC, Reseland JE, Vettor R, Cinti S, Grano M. (2017) Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice. *Sci Rep* 7(1): 2811.
26. Reza MM, Sim CM, Subramaniam N, Ge X, Sharma M, Kambadur R, McFarlane C. (2017) Irisin treatment improves healing of dystrophic skeletal muscle. *Oncotarget* 8(58): 98553-98566.
27. Chang JS, Kong ID. (2020) Irisin prevents dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. *Pflugers Archiv : Euro J Pphysiol* 472(4): 495-502.
28. Lecker SH, Zavin A, Cao P, Arena R, Allsup K, Daniels KM, Joseph J, Schulze PC, Forman DE. (2012) Expression of the irisin precursor FNDC5 in skeletal muscle correlates with aerobic exercise performance in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 5(6): 812-818.
29. Greulich T, Nell C, Koepke J, Fichtel J, Franke M, Schmeck B, Haid D, Apelt S, Filipovic S, Kenn K, Janciauskiene S, Vogelmeier C, Koczulla AR. (2014) Benefits of whole body vibration training in patients hospitalised for COPD exacerbations - a randomized clinical trial. *BMC Pulm Med* 14: 60.
30. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, Perron RM, Werner CD, Phan GQ, Kammula US, Kebebew E, Pacak K, Chen KY, Celi FS. (2014) Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab* 19(2): 302-309.
31. Young MF, Valaris S, Wrann CD. (2019) A role for FNDC5/Irisin in the beneficial effects of exercise on the brain and in neurodegenerative diseases. *Prog Cardiovasc Dis* 62(2): 172-178.
32. He Z, Tian Y, Valenzuela PL, Huang C, Zhao J, Hong P, He Z, Yin S, Lucia A. (2018) Myokine response to high-intensity interval vs. resistance exercise: An Individual Approach. *Front Physiol* 9: 1735.
33. Armstrong RB, Laughlin MH, Rome L, Taylor CR. (1983) Metabolism of rats running up and down an incline. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 55(2): 518-521.

34. Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. (1983) Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54(1): 80-93.
35. Perakakis N, Triantafyllou GA, Fernandez-Real JM, Huh JY, Park KH, Seufert J, Mantzoros CS. (2017) Physiology and role of irisin in glucose homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 13(6): 324-337.
36. Ochi E, Nakazato K, Ishii N. (2011) Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle. *J Strength Cond Res* 25(8): 2283-2292.
37. Pedersen BK, Febbraio MA. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8(8): 457-465.
38. Isner-Horobeti ME, Rasseneur L, Lonsdorfer-Wolf E, Dufour SP, Doutreleau S, Bouitbir J, Zoll J, Kapchinsky S, Geny B, Daussin FN, Burelle Y, Richard R. (2014) Effect of eccentric versus concentric exercise training on mitochondrial function. *Muscle Nerve* 50(5): 803-811.
39. Chavanelle V, Sirvent P, Ennequin G, Caillaud K, Montaurier C, Morio B, Boisseau N, Richard R. (2014) Comparison of oxygen consumption in rats during uphill (concentric) and downhill (eccentric) treadmill exercise tests. *J Sports Sci Med* 13(3): 689-694.
40. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Celik A, Yilmaz M, Kalayci M, Sahin I, Gungor O, Gurel A, Ogeturk M, Dabak O. (2014) Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides* 52: 68-73.
41. Abe D, Fukuoka Y, Muraki S, Yasukouchi A, Sakaguchi Y, Niihata S. (2011) Effects of load and gradient on energy cost of running. *J Physiol Anthropol* 30(4): 153-160.
42. Ato S, Makanae Y, Kido K, Fujita S. (2016) Contraction mode itself does not determine the level of mTORC1 activity in rat skeletal muscle. *Physiol Rep* 4(19).
43. Maeo S, Shan X, Otsuka S, Kanehisa H, Kawakami Y. (2018) Neuromuscular adaptations to work-matched maximal eccentric versus concentric training. *Med Sci Sports Exerc* 50(8): 1629-1640.
44. Reisi J, Ghaedi K, Rajabi H, Marandi SM. (2016) Can resistance exercise alter irisin levels and expression profiles of FNDC5 and UCP1 in rats? *Asian J Sports Med* 7(4): e35205.
45. Vandewalle J, Luybaert A, De Bosscher K, Libert C. (2018) Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab: TEM* 29(1): 42-54.
46. Oray M, Abu Samra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS. (2016) Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf* 15(4): 457-465.
47. Goldberg AL, Goodman HM. (1969) Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. *J Physiol* 200(3): 667-675.

48. Clark AF, Vignos PJ, Jr. (1979) Experimental corticosteroid myopathy: effect on myofibrillar ATPase activity and protein degradation. *Muscle Nerve* 2(4): 265-273.
49. Ruff RL, Martyn D, Gordon AM. (1982) Glucocorticoid-induced atrophy is not due to impaired excitability of rat muscle. *Am J Physiol* 243(6): E512-521.
50. Shin YS, Fink H, Khuroya R, Ibebunjo C, Martyn J. (2000) Prednisolone-induced muscle dysfunction is caused more by atrophy than by altered acetylcholine receptor expression. *Anesth Analg* 91(2): 322-328.
51. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E363-371.
52. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. (2008) Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197(1): 1-10.
53. Schakman O, Kalista S, Barbe C, Loumaye A, Thissen JP. (2013) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2163-2172.
54. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP. (2007) Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148(1): 452-460.
55. Gardiner PF, Hibl B, Simpson DR, Roy R, Edgerton VR. (1980) Effects of a mild weight-lifting program on the progress of glucocorticoid-induced atrophy in rat hindlimb muscles. *Pflugers Archiv : Eur J Physiol* 385(2): 147-153.
56. Fimbel S, Abdelmalki A, Mayet MH, Sempore B, Koubi H, Pugeat M, Dechaud H, Favier RJ. (1993) Exercise training fails to prevent glucocorticoid-induced muscle alterations in young growing rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 424(5-6): 369-376.
57. Hickson RC, Davis JR. (1981) Partial prevention of glucocorticoid-induced muscle atrophy by endurance training. *Am J Physiol* 241(3): E226-232.
58. Horber FF, Scheidegger JR, Grunig BE, Frey FJ. (1985) Evidence that prednisone-induced myopathy is reversed by physical training. *J Clin Endocrinol Metab* 61(1): 83-88.
59. Falduto MT, Czerwinski SM, Hickson RC. (1990) Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. *J Appl Physiol (Bethesda, Md : 1985)* 69(3): 1058-1062.
60. Uchikawa K, Takahashi H, Hase K, Masakado Y, Liu M. (2008) Strenuous exercise-induced alterations of muscle fiber cross-sectional area and fiber-type distribution in steroid myopathy rats. *Am J Phys Med Rehabil* 87(2): 126-133.
61. Nicastro H, Zanchi NE, da Luz CR, de Moraes WM, Ramona P, de Siqueira Filho MA, Chaves DF, Medeiros A, Brum PC, Dardevet D, Lancha AH, Jr. (2012) Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. *Nutrition* 28(4): 465-471.

62. Macedo AG, Krug AL, Herrera NA, Zago AS, Rush JW, Amaral SL. (2014) Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143: 357-364.
63. Murao M, Imano T, Akiyama J, Kawakami T, Nakajima M. (2020) Effect of single bout downhill running on the serum irisin concentrations in rats. *Growth factors*: 1-6.
64. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. (2011) Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab* 13(2): 170-182.
65. Schlagowski AI, Isner-Horobeti ME, Dufour SP, Rasseneur L, Enache I, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Charloux A, Goupilleau F, Bentz I, Charles AL, Kouassi BY, Zoll J, Geny B, Favret F. (2016) Mitochondrial function following downhill and/or uphill exercise training in rats. *Muscle Nerve* 54(5): 925-935.
66. Constantino PB, Dionisio TJ, Duchatsch F, Herrera NA, Duarte JO, Santos CF, Crestani CC, Amaral SL. (2017) Exercise attenuates dexamethasone-induced hypertension through an improvement of baroreflex activity independently of the renin-angiotensin system. *Steroids* 128: 147-154.
67. Fappi A, Neves JC, Sanches LN, Massaroto ESPV, Sikusawa GY, Brandao TPC, Chadi G, Zanoteli E. (2019) Skeletal muscle response to deflazacort, dexamethasone and methylprednisolone. *Cells* 8(5).
68. Sato AY, Peacock M, Bellido T. (2018) Glucocorticoid excess in bone and muscle. *Clin Rev Bone Miner Metab* 16(1): 33-47.
69. Seo DY, Bae JH, Kim TN, Kwak HB, Kha PT, Han J. (2020) Exercise-induced circulating irisin level is correlated with improved cardiac function in rats. *Int J Environ Res Public Health* 17(11): In press.
70. Shirvani H, Rahmati-Ahmadabad S (2019) Irisin interaction with adipose tissue secretions by exercise training and flaxseed oil supplement. *Lipids Health Dis* 18(1): 15.
71. Girgenrath S, Song K, Whittemore LA. (2005) Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve* 31(1): 34-40.
72. Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL. (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 53(4): 844-850.
73. Nardone A, Schieppati M. (1988) Shift of activity from slow to fast muscle during voluntary lengthening contractions of the triceps surae muscles in humans. *J Physiol* 395: 363-381.

74. Czerwinski SM, Kurowski TG, O'Neill TM, Hickson RC. (1987) Initiating regular exercise protects against muscle atrophy from glucocorticoids. *J Appl Physiol* 1985 63(4): 1504-1510.
75. Czerwinski SM, Zak R, Kurowski TT, Falduto MT, Hickson RC. (1989) Myosin heavy chain turnover and glucocorticoid deterrence by exercise in muscle. *J Appl Physiol* 1985 67(6): 2311-2315.
76. Falduto MT, Hickson RC, Young AP. (1989) Antagonism by glucocorticoids and exercise on expression of glutamine synthetase in skeletal muscle. *FASEB J* 3(14): 2623-2628.