

原 著

除神経手術による不活動とエネルギー摂取制限が ラット骨格筋重量に及ぼす影響 —入院にともなう骨格筋萎縮におけるエネルギー 摂取制限の寄与度に関する基礎的検討—

筒井 桃子、小池 温子、柄澤 拓也、寺田 新

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

【目的】

重度の怪我などにより手術・入院が余儀なくされた場合、不活動状態になることに加え、エネルギー摂取量が制限されることが多い。本研究では、そのように不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさった場合、骨格筋にどの程度の萎縮が生じるのか、さらにその時の筋萎縮に対してエネルギー摂取制限による影響がどの程度寄与しているのかという点について、実験動物を用いて基礎的検討を行うこととした。

【方法】

20週齢のFischer344系雄性ラットを、飼料を自由に摂取するCon群、Con群よりも33%少ない飼料を摂取するER群、ER群と同程度に飼料を制限しながら、除神経手術により左後肢を不活動状態にしたDen-ER群の3群に分けた。2週間の介入期間終了後に左後肢からヒラメ筋（遅筋型）および足底筋（速筋型）を摘出し、筋重量を測定した。

【結果】

Den-ER群のヒラメ筋および足底筋の筋重量は、Con群に比べてそれぞれ40%、48%有意に低い値を示した。一方、Den-ER群と同程度のエネルギー摂取制限を行なったER群では、ヒラメ筋への影響は認められなかったものの、足底筋の筋重量がCon群に比べて7%有意に低い値を示した。

【結論】

不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさることで骨格筋が大きく萎縮するが、エネルギー摂取制限による影響は主に速筋型の骨格筋で生じ、その寄与率は全萎縮量のうち～15%程度と推察される。

キーワード：不活動 エネルギー摂取制限 骨格筋萎縮 オートファジー ユビキチン-プロテアソーム

I 緒言

スポーツ選手が怪我をした場合、患部の固定や練習等の休止などによって骨格筋の活動量が大きく減少する。このような不活動状態、すなわち力学的負荷の減少は、骨格筋量および筋力の減少^{1), 2)}、さらには競技パフォーマンスの低下を生じさせる³⁾。また、一度萎縮した筋量および筋力の回復には、萎縮にかかった時間よりも長い期間を要することが報告されており⁴⁾、骨格筋萎縮の程度が大きいほど、それだけ競技復帰が遅れることになる。以上のことから、怪我をしたスポーツ選手においては、骨格筋の萎縮をできるだけ最小限

にとどめることが必要となる⁵⁾。

しかしながら、重度の怪我を負った場合には、手術および入院が余儀なくされ、さらに大きな筋萎縮が生じることが予想される。それは、入院の長期化にともなって不活動状態となる期間も長くなることに加え、入院期間中は、普段の食事量が多いスポーツ選手に対しても、一般人と同じ量の治療食が提供されることで、食事量・エネルギー摂取量が大きく制限された状態となるためである。スポーツ選手のエネルギー摂取量は、競技種目による違いはあるものの、男性では3,000 kcal程度と推定される^{6)~8)}。一方、整形外科的な理由で入院が必要となった成人男性に提供される一般

治療食は、性別、年齢、体位、病状などによる違いはあるものの、概ね2,000 kcal程度である⁹⁾。

このように食事量・エネルギー摂取量が制限されるだけでも、スポーツ選手の骨格筋は萎縮することが知られている¹⁰⁾。たとえば、国際レベルの試合に出場している重量挙げ選手が、減量のためにエネルギー摂取量を約40%制限した場合、体重だけでなく除脂肪体重も有意に減少したことが報告されている¹¹⁾。また、減量により体重や除脂肪体重のみならず、大腿四頭筋の筋横断面積が減少した大学レスリング選手では、その減量期間中に水分および食事（エネルギー）摂取量が有意に減少していたことも報告されている¹²⁾。

したがって、スポーツ選手の手術・入院時に生じる筋萎縮には、不活動状態による力学的負荷の減少という要因に加えて、エネルギー摂取制限というもう一つの要因が大きく寄与している可能性が高いと考えられる。しかしながら、スポーツ選手を含むヒトを対象として、手術・入院をともなう介入研究を行うことは倫理上難しいため、これまでに怪我・手術をともなう入院時のように不活動状態とエネルギー摂取制限の両者が組み合わさった際に、どの程度大きな筋萎縮が生じるのかは必ずしも明らかとなっていない。さらに、その際に生じた筋萎縮全体に対して、上記のようなエネルギー摂取制限による影響がどの程度寄与しているのかということについても不明なままである。

そこで、本研究では実験動物（ラット）を対象として、外科的手術（除神経）をともなう不活動状態とエネルギー摂取制限を同時に負荷した場合の筋萎縮の程度を評価することで、手術・入院が余儀なくされた際に生じるであろう筋萎縮量を推定することとした。さらに、エネルギー摂取制限のみを負荷した場合の影響と直接比較することで、その時の筋萎縮におけるエネルギー摂取制限の寄与度に関する予備的な検討もあわせて行うこととした。

II 方法

1. 実験動物および飼育環境

実験動物として19週齢（体重320～375 g）のFischer344系雄性ラット24匹を日本エスエルシー株式会社より購入した。本研究では、スポーツ選手のようなトレーニングを実施したラットを用いることができなかったものの、成熟期（20週齢前後）のFischer344系雄性ラットは、体脂肪量が他の系統よりも少なく、スポーツ選手の体組成により近い特徴をもつことから、このFischer344系ラットを用いることとした^{13), 14)}。ラットは室温23±2℃、午後9時～午前9時を暗期に設定した飼育室において、ステンレス製ワイヤーケージで1匹ずつ飼育した。新たな飼育環境に慣れさせるために、1週間の馴化飼育期間を設定した。馴化

飼育期間には、実験動物用の標準精製飼料AIN-93Mの組成をもとに、入院時に用いられる一般的な病院治療食と同様の栄養素組成⁹⁾（たんぱく質：脂質：糖質のエネルギー比率＝15：22：63）になるように改変した飼料と、飲料として水道水を自由摂取させた。飼料1 kg中の各飼料材料の配合量は以下の通りである：コーンスターチ（オリエンタル酵母工業株式会社）550.7 g、ミルクカゼイン（オリエンタル酵母工業株式会社）160 g、スクロース（株式会社パールエース）100 g、大豆油（株式会社花正）92 g、セルロース（オリエンタル酵母工業株式会社）48 g、AIN-93Mミネラル混合（オリエンタル酵母工業株式会社）35 g、AIN-93ビタミン混合（オリエンタル酵母工業株式会社）10 g、コリン酒石酸水素塩2.5 g、L-シスチン（富士フイルム和光純薬工業株式会社）1.8 gおよびt-ブチルヒドロキノン（富士フイルム和光純薬工業株式会社）0.01 g。

2. 実験プロトコル

1週間の馴化飼育終了後、ラットを体重および馴化飼育期間中の飼料効率（摂餌量100 g当たりの体重増加量）が同等となるように、以下の3群に分けた：1）飼料を自由摂取させるコントロール群（Control [Con] 群：n = 8）、2）Con 群の摂餌量の3分の2に相当する量の飼料を摂取させるエネルギー摂取制限群（Energy Restriction [ER] 群：n = 8）、3）介入前日に不活動モデルである除神経を施した上で、ER群と同程度に飼料の摂取量を制限する不活動-エネルギー摂取制限群（Denervation-Energy Restriction [Den-ER] 群：n = 8）。

介入期間は2週間とし、毎日午前9時に摂餌量と体重の測定を行った。Con群には馴化飼育期間と同じ飼料を自由摂取させ、ER群およびDen-ER群に対しては、Con群の摂餌量の3分の2に相当する量（33%のエネルギー摂取制限）の飼料を摂取させた。このエネルギー摂取制限の割合の根拠は以下の通りである：一般的なスポーツ選手のエネルギー摂取量は、「日本人の食事摂取基準 2020年版」に示されている18～29歳男性の基礎代謝量（1,530 kcal）に、活発な運動習慣を持っている場合の身体活動量（Physical Activity Level : PAL）である2.0を乗じた3,060 kcalと推定される⁶⁾。実際に、バトミントン男子日本代表選手の1日のエネルギー摂取量が3,022 kcalであったことや⁷⁾、大学男子バスケットボール選手の推定エネルギー必要量が3,077 kcalであったという報告からも⁸⁾、男性のスポーツ選手における1日のエネルギー摂取量は概ね3,000 kcal程度と考えられる。これに対し、病院に入院した際に成人男性に提供される一般治療食は、2,000 kcal程度である⁹⁾。以上のことから、スポーツ選手が入院した場合のエネルギー摂取量は、普段の食事量の

3分の2程度になると推定される。

本研究では、不活動によって筋萎縮を惹起するモデルとして除神経（Denervation）法を用いることとした。除神経法は、脱神経支配による電氣的興奮性の変化や細胞内のインスリン情報伝達経路の活性化といったヒトの不活動時において認められる現象とは異なる応答が生じる可能性があることが指摘されている^{15), 16)}。しかしながら、ギプス固定法や後肢懸垂法といった他の手法とは異なり、「手術（切開と縫合）」という要素を含む点が、「手術をともなう入院による影響」を検討するうえで、より適したモデルであると考えられたため、本研究では除神経法を採用することとした。また、本研究において除神経のみを施す群は設けていない。予備実験において、除神経を施した群では、飼料を自由摂取させたとしても、Con群に比べて摂餌量が有意に減少し、さらにその摂餌量の減少量には大きな個体差・ばらつきが認められた。このことから、除神経のみを施した群でも、摂餌量の減少（エネルギー摂取制限）による影響が生じてしまう可能性があり、またその影響を、ペアフィーディング法等を用いて排除することも難しいと考えられた。以上のような理由により、本研究では除神経のみを施す群は設定せず、Con群、ER群およびDen-ER群の3群で検討することとした。

Den-ER群に対しては、2週間の介入期間の前日に、左後肢に除神経手術を施した。高濃度のイソフルランを吸引させて麻酔を施し、数分後に、尾部圧迫による反射が生じないことを確認した上で、完全麻酔下にてラットの大腿骨の軸に沿って皮膚を1 cm程度切開し、そこから坐骨神経を分離した。神経の再結合を防ぐため、坐骨神経を約5 mm切り取り、その後、筋および皮膚の縫合を行った。なお、Con群およびER群に対しては、偽手術を施していない。上述したように、本研究では怪我および手術をともなうような入院によって誘発される骨格筋の萎縮に関する検討を行うことを目的としており、そのような筋萎縮には不活動状態による影響だけではなく、手術にともなう侵襲ストレスおよび炎症反応などによる影響も少なからず含まれる。Con群およびER群に偽手術を施した場合には、これら手術による侵襲ストレスおよび炎症反応の要因が取り除かれ、単に不活動状態の影響を検討するだけのモデルになってしまうため、本研究においては、Con群およびER群に対して偽手術を施さないこととした。なお、本研究は、東京大学大学院総合文化研究科・教養学部実験動物委員会の承認を得て行われた（承認番号：29-10）。

3. サンプルの採取および保存

2週間の介入期間終了後に解剖を実施した。高濃度のイソフルランを吸引させて麻酔を施し、数分後に、

尾部圧迫による反射が生じないことを確認した上で、完全麻酔下にて速やかに左後肢の骨格筋を摘出した。筋線維組成の違いによる影響を検討するために、本研究では、ヒラメ筋（遅筋線維優位型：Type I 線維が84%）および、足底筋（速筋線維優位型：Type II 線維が94%）を対象とした¹⁷⁾。ヒラメ筋および足底筋は、重量測定後、直ちに液体窒素で凍結した。摘出した骨格筋は、分析を行うまで-80℃の超低温フリーザーにて保存した。

4. 分析方法

1) 骨格筋における総筋タンパク質量

骨格筋における総筋タンパク質量は、Nishimuraらの手法に基づき¹⁸⁾、Bicinchoninic Acid (BCA) 法により測定した。まず、骨格筋サンプル（ヒラメ筋・足底筋）を氷上にて冷却したガラス製のホモジナイザーに入れ、19倍量の冷却したホモジナイズバッファー（Radio-immunoprecipitation Assay (RIPA) lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 2.5% Deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Merck Millipore社))とともにホモジナイズした（希釈倍率:20倍）。なお、ホモジナイズバッファーには、Protease inhibitor (SIGMA-Aldrich社)とPhosphatase inhibitor (Roche社)をそれぞれ10 μL/mL、1錠/10 mLの割合で添加した。骨格筋ホモジネートは、凍結・溶解を2回繰り返すことで細胞内小器官を破碎し、その中に含まれるタンパク質を放出させた。ホモジネートのタンパク質濃度 (μg/μL) は、BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いて測定した。骨格筋湿重量 (mg) に希釈倍率である20を乗じることでホモジネートの総量 (μL) を算出し、そのホモジネートの総量と測定で得られたホモジネートのタンパク質濃度 (μg/μL) を乗じることで、総筋タンパク質量 (mg) を算出した。

2) オートファジー系経路の活性

筋タンパク質分解経路の1つであるオートファジー系の状態を反映する指標として、Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) -IおよびLC3-IIの発現量をウエスタンブロッティング法により測定した。まず、上述のタンパク質濃度測定時に得られた骨格筋ホモジネートの一部をマイクロチューブローターで回転させながら4℃で1時間半インキュベートすることでタンパク質を可溶化した。インキュベート終了後、700×gで5分間遠心し、上清を得た。回収した上清サンプルは、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いてタンパク質濃度 (μg/μL) を測定し、タンパク質濃度が2.0 μg/μLとなるようにRIPA lysis bufferとSample buffer

(62.5 mM Tris-HCl, 0.005% (w/v) Bromophenol Blue (BPB)、1% (w/v) Lithium Dodecyl Sulfate (LDS)、10% (w/v) Glycerol、31 mg/mL Dithiothreitol、Bio-Rad社) を添加し、95 °C で5分間加熱したものを電気泳動用のサンプルとした。タンパク質の分離はLaemmliの方法に基づき¹⁹⁾、ポリアクリルアミド濃度が15%の Resolving gel および 4% のStacking gel を用いてSodium Dodecyl Sulfate (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した。1レーンあたり40 µgのタンパク質サンプルをアプライし、サンプルがゲルの下端に達するまで100 Vで通電した。電気泳動終了後、速やかにゲルを取りはずし、ウェット式プロットング装置 (Mini Trans-Blot Cell、Bio-Rad社) を用いて、200 mA/Tankで90分間通電し、Polyvinylidenedifluoride (PVDF) メンブレン (Merck Millipore社) にタンパク質を転写した。次に、5% (w/w) スキムミルク/Tris buffered saline - 0.1% Tween20 (TBS-T) 溶液を用いてブロッキング処理を室温で1時間行った。その後、5% BSA/TBS-T溶液で一次抗体 (Anti-LC3 mAb、MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES社) を1,000倍希釈し、冷蔵庫内で4 °C に保ち、一晚シェーカー上で揺らしながら一次抗体反応を行った。翌日、メンブレンをTBS-Tで洗浄し、二次抗体反応 (HRP-conjugated anti-Mouse IgG、Jackson ImmunoResearch社、5,000倍希釈) を室温で1時間行った。TBS-TおよびTBSで十分に洗浄した後、化学発光検出試薬 (Immunostar LD、和光純薬株式会社) で1分間反応させた。反応終了後、抗原検出装置 (C-DiGit、LI-COR社) を用いて、抗原の検出を行った。検出されたバンドは定量解析ソフトウェア (Image Studio Lite Ver. 33.1、LI-COR社) を用いて定量し、その値をCon群の平均値に対する相対値で示した。なお、本実験で用いたメンブレンはすべてPonceau S染色を行い、等しいサンプル量がローディングされていることを確認した。

3) ユビキチン-プロテアソーム系経路の活性

筋タンパク質分解に関わるもう1つの主要な経路であるユビキチン-プロテアソーム系経路の状態を反映する指標として、ポリユビキチン化タンパク質濃度をCycLex Poly-Ubiquitinated Protein ELISA Kit (CycLex社) を用いて測定した。ウエスタンブロットングに用いたものと同じ上清サンプルを、タンパク質濃度が2.5 µg/µLとなるようにRIPA lysis bufferを用いて調製した後、キット付属のマニュアルに従ってポリユビキチン化タンパク質濃度を測定した。

5. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で表した。群間の比較には、一元配置の分散分析を用いた。一元配置の

分散分析の結果、主効果が認められた場合、Tukey-Kramer法を用いて多重比較検定を行った。統計解析は、Excel統計2015 (株式会社社会情報サービス社) を用いて行い、危険率 5%未満をもって有意とした。

III 結果

1. 総摂餌量、介入開始・終了時体重

総摂餌量と介入開始時および終了時における体重の結果を表1に示した。ER群およびDen-ER群における総摂餌量および介入終了時の体重は、Con群に比べて有意に低い値であった ($p < 0.001$)。一方、ER群とDen-ER群の間に、総摂餌量および体重の差は認められなかった (表1)。

2. 筋重量、総筋タンパク質量

遅筋線維優位型であるヒラメ筋の筋重量は、Con群およびER群と比較して、Den-ER群でそれぞれ40%、41%有意に低い値を示した (vs. Con群: $p < 0.001$ 、vs. ER群: $p < 0.001$)。一方、ER群とCon群の間に有意な差は認められなかった (図1A)。

ヒラメ筋の総筋タンパク質量も、筋重量の結果と同様に、Con群およびER群と比較して、Den-ER群ではそれぞれ51%、52%有意に低い値を示した (vs. Con群: $p < 0.001$ 、vs. ER群: $p < 0.001$)。一方、ER群とCon群の間に有意な差は認められなかった (図1C)。

速筋線維優位型である足底筋の筋重量は、Con群およびER群と比較して、Den-ER群でそれぞれ48%、44%有意に低い値を示した (vs. Con群: $p < 0.001$ 、vs. ER群: $p < 0.001$)。さらに、ER群の足底筋の重量も、Con群に比べて7%有意に低い値を示した ($p < 0.01$) (図1B)。

足底筋の総筋タンパク質量も、筋重量の結果と同様に、Con群およびER群と比較してDen-ER群でそれぞれ56%、52%有意に低い値を示した (vs. Con群: $p < 0.001$ 、vs. ER群: $p < 0.001$)。さらに、ER群の足底筋における総筋タンパク質量も、Con群に比べて9%有意に低い値を示した ($p < 0.05$) (図1D)。

3. 筋タンパク質分解に関わる因子

先行研究において、除神経やエネルギー摂取制限による筋萎縮は、主に筋タンパク質分解が亢進することで生じることが報告されている^{20), 21)}。そこで本研究でも、筋タンパク質分解における主要な機構として知られるオートファジー系およびユビキチン-プロテアソーム系について検討を行うこととした。

1) オートファジー系経路

オートファジー系によるタンパク質の分解過程にお

表 1 2 週間の介入開始時および終了時の体重、介入期間中の総摂餌量

	Con	ER	Den-ER
介入開始時体重 (g)	368 ± 4.0	368 ± 5.1	368 ± 3.3
介入終了時体重 (g)	389 ± 5.0	346 ± 5.7***	337 ± 2.8***
総摂餌量 (g)	257 ± 5.5	170 ± 0.2***	170 ± 0.6***

Con: コントロール群、ER: エネルギー摂取制限群、Den-ER 群: 除神経-エネルギー摂取制限群
 数値は全て平均 ± 標準誤差で表した。n = 8

*** p < 0.001 vs. Con

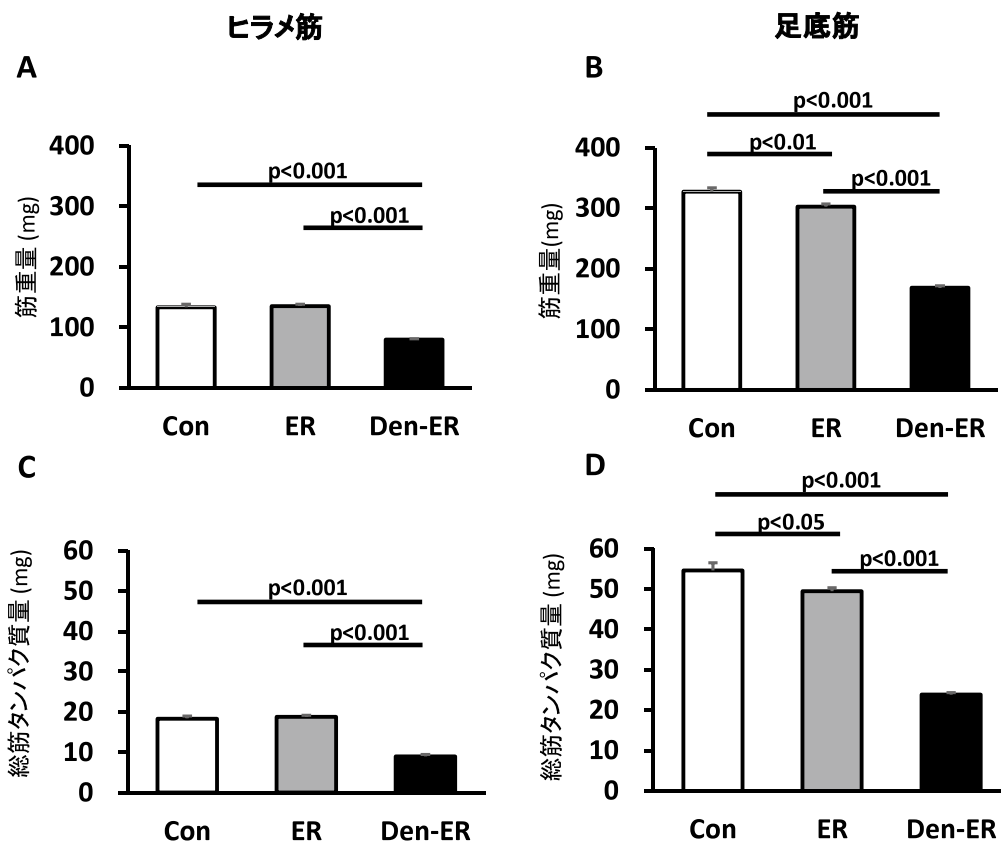


図 1 ヒラメ筋および足底筋の筋重量および総筋タンパク質量

A: ヒラメ筋重量、B: 足底筋重量、C: ヒラメ筋総タンパク質量、D: 足底筋総タンパク質量
 Con: コントロール群、ER: エネルギー摂取制限群、Den-ER 群: 除神経-エネルギー摂取制限群
 数値は全て平均 ± 標準誤差で表した。n = 8

いて、細胞質に存在するLC 3-I と呼ばれるタンパク質がLC 3-IIに変換され、オートファゴソームへと結合する。このLC 3-IIの発現量はオートファゴソームの形成量を示す指標として用いられており²²⁾、また、LC 3-II と LC 3-I の発現量の比率 (LC 3-II/I 比) は、オートファジー系経路によるタンパク質分解が正常に機能しているかどうかの指標として用いられている²³⁾。したがって、本研究においても、これらの指標の測定を行った。

ヒラメ筋におけるLC 3-I 量には、3 群間で差は認められなかった (図 2 A)。一方、LC 3-II 量はCon群およびER群と比較してDen-ER群で有意に高い値を示した (vs. Con群: p < 0.001、vs. ER群: p < 0.001、図 2 C)。LC 3-II/I 比は、Con群およびER群と比較してDen-ER群で有意に高い値を示した (vs. Con群: p < 0.001、vs. ER群: p < 0.001、図 2 E)。ER群 と Con群の間にはLC 3-II 量およびLC 3-II/I 比の差は認められなかった (図 2 C、E)。

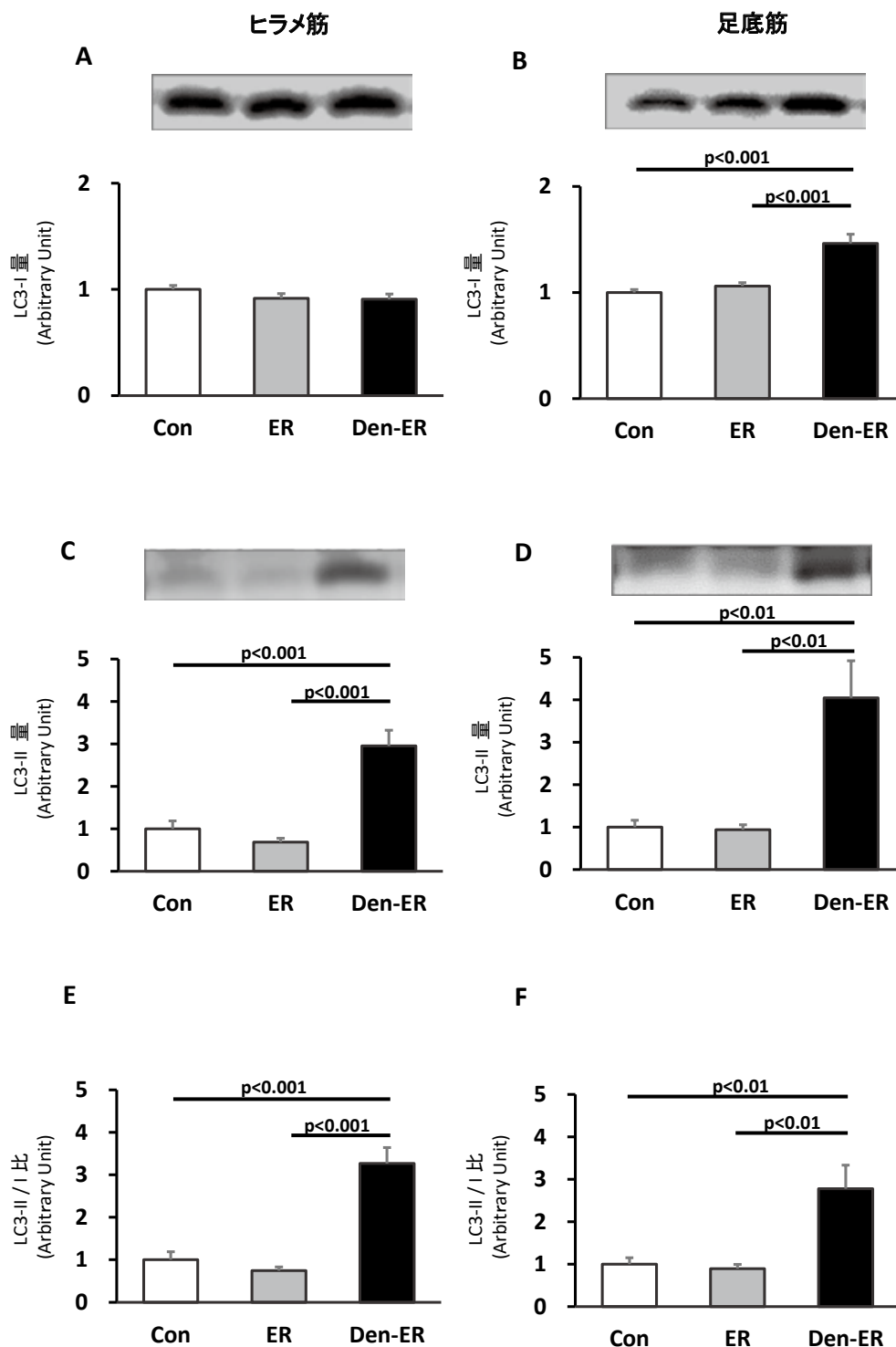


図2 ヒラメ筋および足底筋におけるLC3-I量、LC3-II量およびLC3-II/I比

A: ヒラメ筋 LC3-I 量、B: 足底筋 LC3-I 量、C: ヒラメ筋 LC3-II 量、D: 足底筋 LC3-II 量、E: ヒラメ筋 LC3-II/I 比、F: 足底筋 LC3-II/I 比

Con: コントロール群、ER: エネルギー摂取制限群、Den-ER 群: 除神経-エネルギー摂取制限群

数値は全て平均±標準誤差で表した。n = 8

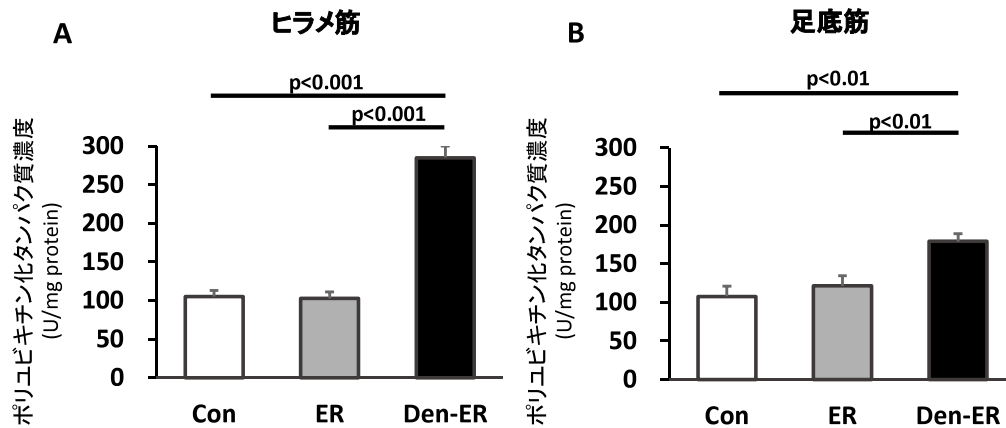


図3 ヒラメ筋および足底筋におけるポリユビキチン化タンパク質濃度

A: ヒラメ筋ポリユビキチン化タンパク質濃度、B: 足底筋ポリユビキチン化タンパク質濃度

Con: コントロール群、ER: エネルギー摂取制限群、Den-ER 群: 除神経-エネルギー摂取制限群

数値は全て平均±標準誤差で表した。n = 8

足底筋におけるLC 3-I 量およびLC 3-II 量はともに、Con群およびER群と比較してDen-ER群で有意に高い値を示した (LC 3-I : vs. Con群: $p < 0.001$ 、vs. ER群: $p < 0.001$ 、図2 B)、(LC 3-II : vs. Con群: $p < 0.01$ 、vs. ER群: $p < 0.01$ 、図2 D)。さらに、LC 3-II / I 比も、Con群およびER群と比較してDen-ER群で有意に高い値を示した (vs. Con群: $p < 0.01$ 、vs. ER群: $p < 0.01$ 、図2 F)。一方、ER群とCon群の間には、LC 3-I 量、LC 3-II 量およびLC 3-II / I 比の差は認められなかった (図2 B、D、F)。

2) ユビキチン-プロテアソーム系経路

基質タンパク質に複数のユビキチンが結合することで、プロテアソームによる分解の標的となる。このようにユビキチンが結合したタンパク質 (ポリユビキチン化タンパク質) の細胞・組織内濃度は、ユビキチン-プロテアソーム系におけるタンパク質分解経路の活性化状態を示す指標として用いられており²⁴⁾、本研究でもその測定を行った。

ヒラメ筋におけるポリユビキチン化タンパク質濃度は、Con群およびER群と比較してDen-ER群で有意に高い値を示した (vs. Con群: $p < 0.001$ 、vs. ER群: $p < 0.001$)。一方、Con群とER群の間にはポリユビキチン化タンパク質濃度の差は認められなかった (図3 A)。

足底筋におけるポリユビキチン化タンパク質濃度は、Con群およびER群と比較してDen-ER群で有意に高い値を示したものの (vs. Con群: $p < 0.01$ 、vs. ER群: $p < 0.01$)、Con群とER群の間にはポリユビキチン化タンパク質濃度の差は認められなかった (図3 B)。

IV 考察

ラットに対して除神経手術を行うことやエネルギー摂取制限を行うことで筋重量の減少、すなわち筋萎縮が生じることが数多く報告されている^{25)~27)}。しかしながら、それぞれ単独の影響を検討した研究がほとんどであり、手術をともなう入院時のように、両者が組み合わさった場合にどの程度の筋萎縮が生じるのかについては、これまでにほとんど明らかとなっていなかった。図1に示すように、除神経による不活動状態とエネルギー摂取制限を組み合わせたDen-ER群のヒラメ筋および足底筋の筋重量・総筋タンパク質量の減少率は40~56% (1日あたり3~4%) であった。調査研究ではあるものの、不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさった状態となることが多い集中治療室の患者では、骨格筋の萎縮率が1日あたり最大で3%程度に達するという可能性が示唆されている²⁸⁾。本研究の結果は、この調査研究の結果を支持するものであり、不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさることで、大きな筋萎縮が生じると考えられる。

以上のように、不活動状態とエネルギー摂取制限が同時に生じることが多い手術・入院時において骨格筋が大きく萎縮する可能性が示唆されたが、この筋萎縮において、エネルギー摂取制限による影響がどの程度であるか不明であった。本研究では、入院中のスポーツ選手におけるエネルギー摂取制限の割合を33%と推定し、そのようなエネルギー摂取制限を行なったDen-ER群と同等のエネルギー摂取制限を行ったER群における筋萎縮率も合わせて評価・比較することで、手術・入院時に生じるであろう筋萎縮に対するエネルギー摂取制限による寄与率を算出することとした。その結果、ヒラメ筋ではエネルギー摂取制限の影響が認めら

れなかったものの、足底筋ではER群の筋重量および総筋タンパク質量がCon群に比べて～10%程度低値を示した。この値は、Den-ER群で生じた全萎縮量のうち～15%ほどに相当するものであり、不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさるような手術・入院時のような状況において、エネルギー摂取制限による影響は決して大きなものではないが、筋萎縮に対して一部寄与している可能性を示唆している。なお、最近の研究において、代償性過負荷によって肥大した骨格筋では、通常の骨格筋に比べて、エネルギー摂取制限によって大きな筋萎縮が生じたことが報告されている²⁹⁾。したがって、スポーツ選手などにみられる肥大した骨格筋では、不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさった場合に、本研究で認められたものよりも大きな萎縮が生じる可能性やエネルギー摂取制限による寄与率がより大きなものとなる可能性も考えられる。

ヒト骨格筋の筋線維組成には、大きな個人差があるものの、陸上競技短距離種目のエリート選手では、主導筋である外側広筋や腓腹筋において速筋線維が70%以上を占めることが報告されている^{30), 31)}。したがって、短距離選手のように、速筋線維が重要となる競技種目の選手が、重度の怪我などにより手術および長期間の入院を余儀なくされた場合には、食事量・エネルギー摂取量を制限しすぎないことが、速筋線維の萎縮を最小限に留める上で重要であるかもしれない。一方、これまでの研究において、エネルギー摂取制限をおこなった際には、たんぱく質摂取量を維持・増加させることで筋萎縮を一部軽減できることや^{32), 33)}、n-3系脂肪酸の摂取によっても、不活動に伴う筋萎縮を一部抑制できる可能性が示唆されている^{34), 35)}。したがって、重度の怪我などにより手術および長期間の入院を余儀なくされた場合には、食事量・エネルギー摂取量を制限しすぎないことに加えて、上記のような機能を有する栄養素の摂取も組み合わせることで、骨格筋の萎縮をより効果的に抑制できるかもしれない。

先行研究において、除神経による不活動状態やエネルギー摂取制限による筋萎縮の主な原因は、オートファジー系およびユビキチン-プロテアソーム系による筋タンパク質分解の亢進であることが報告されている^{20), 21)}。本研究でも、Den-ER群の骨格筋では、オートファジー系の指標であるLC3-II/I比およびユビキチン-プロテアソーム系の指標であるポリユビキチン化タンパク質濃度がともに大きく増加しており、重度の怪我などにより手術および入院を余儀なくされた場合のように不活動状態とエネルギー摂取制限が同時に負荷された場合には、この両タンパク質分解経路が大きく亢進することで、総筋タンパク質量の減少さらには骨格筋萎縮が生じると考えられる。

一方、筋萎縮が認められたER群の足底筋ではオー

トファジー活性の指標であるLC3-II/I比の増加は認められなかった(図2F)。このことは、Den-ER群で増加したLC3-II/I比は、主に除神経にともなう不活動状態によって生じたものであることを示唆している。先行研究の中には、絶食によって低栄養状態となったマウス骨格筋では、オートファジー系による筋タンパク質分解が亢進するという結果を報告しているものもある³⁶⁾。しかしながら、Gutiérrezらは、エネルギー摂取量を40%制限することで萎縮したマウス骨格筋において、本研究と同様にLC3-II/I比が高い値を示さなかったことを報告している³⁷⁾。したがって、本研究で用いた程度(33%)のエネルギー摂取制限・低栄養状態では、オートファジー系による筋タンパク質分解は活性化されることはなく、それ以外の要因によって骨格筋萎縮が引き起こされていた可能性が高いと考えられる。

図3に示すように、Den-ER群と同程度のエネルギー摂取制限を行なったER群では、ポリユビキチン化タンパク質濃度の増加も認められなかった。このことは、ER群の足底筋において生じた筋萎縮には、ユビキチン-プロテアソーム系も関与しないこと、さらには、Den-ER群で増加したポリユビキチン化タンパク質濃度も、除神経にともなう不活動状態によって引き起こされたという可能性を示唆している。先行研究では、本研究と同様のエネルギー摂取制限でも、足底筋のポリユビキチン化タンパク質濃度が増加することが報告されている²¹⁾。本研究において、この先行研究とは異なる結果が得られた要因は明らかではないものの、飼料の給餌方法の違いが関係していたかもしれない。本研究では、エネルギー摂取量を制限したER群およびDen-ER群に対しては、活動量および摂食量が増加する暗期の開始時間にあわせて給餌することで、エネルギーバランスが大きくマイナスとなる時間をできるだけ少なくし、異化作用が亢進しすぎないようにした。エネルギー摂取制限によってポリユビキチン化タンパク質の濃度が増加することを報告している先行研究では、このような方法を用いているかどうかは不明であるが、本研究で用いたような給餌方法を用いることで、ユビキチン-プロテアソーム系による筋タンパク質分解が亢進されなかったのかもしれない。いずれにしても、ER群およびDen-ER群の足底筋においてエネルギー摂取制限によって生じた骨格筋重量と総筋タンパク質量の減少には、オートファジー系およびユビキチン-プロテアソーム系の両経路とは異なる筋タンパク質分解経路が関与していた可能性が考えられる。

今回測定を行った2つの筋タンパク質分解経路は、骨格筋において主要な分解経路として機能しているが、カルパインと呼ばれる酵素が関与する分解系もタンパク質量の調節に関与していることが知られている³⁸⁾。このカルパインは、Ca²⁺依存性のタンパク質分

解酵素であるが、低栄養状態によっても、その活性が高まる可能性が示唆されている^{39), 40)}。したがって、本研究では測定を行うことができていないものの、エネルギー摂取制限を行ったER群およびDen-ER群においても、カルパイン系による筋タンパク質分解が亢進し、それにより筋萎縮が一部引き起こされたという可能性が考えられる。

本研究の限界点として、先述したように、除神経のみを施す群を設定できなかった点が挙げられる。これは、除神経手術により摂餌量の減少が生じ、さらにその減少量に大きな個体差が認められたためである。除神経のみを施す群を設定しなかったことで、除神経による不活動状態とエネルギー摂取制限との間で相乗効果・交互作用が生じていたかどうかについて検討を行うことができていない。また、エネルギー摂取制限による寄与率についても、そのような相乗効果・交互作用がないことを前提とした推定量となっている。今後の研究においては、摂餌量の減少やその個体差が生じにくい手術・不活動モデルを用いて、手術・不活動状態だけで筋萎縮がどの程度生じるのか検討する必要があるだろう。また、重度の怪我を負い入院したスポーツ選手に生じると考えられるエネルギー摂取量の減少率については、一般的なスポーツ選手におけるエネルギー摂取量の推定値と一般治療食のエネルギー量から概算した。実際にスポーツ選手が入院となった場合には、活動量が減少することで、エネルギー消費量が減少するため、本研究で想定したほどのエネルギーバランスの悪化は生じていないかもしれない。ただし、手術およびその治療過程においては、組織を回復させるために多くのエネルギー量が必要となることも知られており⁴¹⁾、スポーツ選手が入院中にエネルギーバランスを保つ上で、どの程度のエネルギー摂取量が必要なのかは明らかとなっていない。今後、手術・入院を余儀なくされたスポーツ選手を対象としたエネルギー消費量に関しても、さらに検討する必要があると考えられる。

V 結論

重度の怪我などにより手術および入院を余儀なくされた場合のように、不活動状態とエネルギー摂取制限が組み合わさることで、骨格筋が大きく萎縮することが明らかとなった。また、エネルギー摂取制限による影響が生じるのは主に速筋型の骨格筋であり、その寄与率は全萎縮量のうち~15%程度であると推察された。

利益相反

本研究内容に関して利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Farthing, J. P., Krentz, J. R., Magnus, C. R.: Strength training the free limb attenuates strength loss during unilateral immobilization, *J. Appl. Physiol.*, 106, 830-836 (2009)
- 2) Wall, B. T., Snijders, T., Senden, J. M., et al.: Disuse impairs the muscle protein synthetic response to protein ingestion in healthy men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 98, 4872-4881 (2013)
- 3) Tipton, D. K.: Nutritional support for exercise-induced injuries, *Sports. Med.*, 45, 93-104 (2015)
- 4) Jones, W. J., Hill, J. R., Krasney, A. P., et al.: Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass, *FASEB J.*, 18, 1025-1027 (2004)
- 5) Wall, B. T., Morton, J. P., Van, L. J.: Strategies to maintain skeletal muscle mass in the injured athlete: nutritional considerations and exercise mimetics, *Eur. J. Sport. Sci.*, 15, 53-62 (2014)
- 6) 伊藤貞嘉, 佐々木敏監修: 日本人の食事摂取基準 2020 年版, pp.74-76 (2020), 第一出版, 東京
- 7) 井上なごさ, 飯塚太郎, 朴 柱奉, 他: バドミントン日本代表選手におけるビタミン D 不足に対する栄養介入の有効性, 日本スポーツ栄養研究誌, 12, 68-75 (2019)
- 8) 藪田 望, 松本範子: 期分けにおける栄養教育の有無が大学スポーツ選手の身体組成やエネルギーと各種栄養素摂取量に与える影響, 日本スポーツ栄養研究誌, 12, 52-67 (2019)
- 9) 逸見幾代, 津田とみ編: 三訂臨床栄養学実習, pp.73 (2016), 建帛社, 東京
- 10) Degoutte, F., Jouanel, P., Begue, R. J., et al.: Food restriction, performance, biochemical, psychological, and endocrine changes in judo athletes, *Int. J. Sports. Med.*, 27, 9-18 (2006)
- 11) Durguerian, A., Bougard, C., Drogou, C., et al.: Weight loss, performance and psychological related states in high-level weightlifters, *Int. J. Sports. Med.*, 37, 230-238 (2015)
- 12) Kukidome, T., Shirai, K., Kubo, J., et al.: MRI evaluation of body composition changes in wrestlers undergoing rapid weight loss, *Br. J. Sports. Med.*, 42, 814-818 (2008)
- 13) Gordon, C. J., Jarema, K., Johnstone, A. F. M., et al.: Effect of genetic strain and gender on age-related changes in body composition of the laboratory rat, *J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 79, 376-392 (2016)
- 14) Kasaoka, S., Yamagishi, H., Kitano, T.: Differences in the effect of iron-deficient diet on tissue weight, hemoglobin concentration and serum triglycerides in Fischer-344, Sprague-Dawley and Wistar rats, *J.*

- Nutr. Sci. Vitaminol.*, 45, 359–366 (1999)
- 15) Kotsias, B. A., Muchnik, S.: Mechanical and electrical properties of denervated rat skeletal muscles, *Exp. Neurol.*, 97, 516–528 (1987)
- 16) MacDonald, E. M., Mateos, A. E., Mejias, R., et al.: Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition, *Dis. Model. Mech.*, 7, 471–481 (2014)
- 17) Delp, D. M., Duan, C.: Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle, *J. Appl. Physiol.*, 80, 261–270 (1996)
- 18) Nishimura, S., Inai, M., Takagi, T., et al.: Preventive Effects of the Dietary Intake of Medium-Chain Triacylglycerols on Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Rats, *J. Oleo Sci.*, 66, 917–924 (2017)
- 19) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.*, 227, 680–685 (1970)
- 20) Tischler, T. M., Rosenberg, S., Satarug, S., et al.: Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle, *Metabolism.*, 39, 756–763 (1990)
- 21) Nonaka, Y., Urashima, S., Inai, M., et al.: Effects of rapid or slow body weight reduction on intramuscular protein degradation pathways during equivalent weight loss on rats, *Physiol. Res.*, 66, 823–831 (2017)
- 22) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., et al.: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, *EMBO J.*, 19, 5720–5728 (2000)
- 23) Dutta, D., Xu, J., Dirain, M. L., et al.: Calorie restriction combined with resveratrol induces autophagy and protects 26-month-old rat hearts from doxorubicin-induced toxicity, *Free. Radic. Biol. Med.*, 74, 252–262 (2014)
- 24) Medina, R., Wing, S. S., Goldberg, A. L.: Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy, *Biochem. J.*, 307, 631–637 (1995)
- 25) Haddad, F., Arnold, C., Zeng, M., et al.: Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression, *Muscle. Nerve.*, 20, 1487–1496 (1997)
- 26) Sander, F. M., Richard, T., Jaspers, D. J., et al.: Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle, *Muscle. Nerve.*, 43, 212–222 (2011)
- 27) Hoek, A. M., Zondag, G., Verschuren, L., et al.: A novel nutritional supplement prevents muscle loss and accelerates muscle mass recovery in caloric-restricted mice, *Metabolism.*, 97, 57–67 (2019)
- 28) Nakanishi, N., Oto, J., Tsutsumi, R., et al.: Upper and lower limb muscle atrophy in critically ill patients: an observational ultrasonography study, *Intensive. Care. Med.*, 44, 263–264 (2017)
- 29) 永瀬麻梨凜, 白井隆長, 北岡 祐, 他: 代償性過負荷により肥大した骨格筋に対するカロリー制限の影響, *日本運動生理学雑誌*, 28, 1–8 (2021)
- 30) Powers, S. K., Howley, E.T.: Exercise physiology: theory and application to fitness and performance 3rd ed, pp.125–150 (1997), Brown & Benchmark Publishers, Madison
- 31) Costill, D. L., Daniels, J., Evans, W., et al.: Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes, *J. Appl. Physiol.*, 40, 149–154 (1976)
- 32) Zangarelli, A., Chanseume, E., Morio, B., et al.: Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats : amitochondria-mediated pathway, *FASEB J.*, 14, 2439–2450 (2006)
- 33) Mettler, S., Mitchell, N., Tipton, K. D.: Increased protein intake reduces lean body mass loss during weight loss in athletes, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 42, 326–337 (2010)
- 34) You, J. S., Park, M. N., Song, W., et al.: Dietary fish oil alleviates soleus atrophy during immobilization in association with Akt signaling to p70s6k and E3 ubiquitin ligases in rats, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 35, 310–318 (2010)
- 35) Miotto, M.P., McGlory, C., Bahniwal, R., et al.: Supplementation with dietary ω -3 mitigates immobilization-induced reductions in skeletal muscle mitochondrial respiration in young women, *FASEB J.*, 33, 8232–8240 (2019)
- 36) Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., et al.: In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker, *Mol. Biol. Cell.*, 15, 1101–1111 (2004)
- 37) Gutiérrez, C. E., Khraiwesh, H., López, D. A., et al.: The impact of aging, calorie restriction and dietary fat on autophagy markers and mitochondrial ultrastructure and dynamics in mouse skeletal muscle, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 74, 760–769 (2019)
- 38) Furuno, K., Goodman, M. N., Goldberg, A. L.: Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy, *J. Biol. Chem.*, 265, 8550–8557 (1990)
- 39) Belcastro, A. N., Albisser, T. A., Littlejohn, B.: Role of calcium-activated neutral protease (calpain) with diet and exercise, *Can. J. Appl. Physiol.*, 21, 328–346 (1996)
- 40) Aweida, D., Rudesky, I., Volodin, A., et al.: GSK3- β

promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy, *J. Cell. Biol.*, 217, 3698-3714 (2018)

41) Demling, H. R.: Nutrition, Anabolism, and the Wound Healing Process: An Overview, *Eplasty.*, 9, e9 (2009)

(受付日：2021年5月14日)
(採択日：2021年7月12日)

Original Article

Physical inactivity- and energy restriction-induced muscle atrophy in rats: A preliminary study on the effects of energy restriction during hospitalization

Momoko TSUTSUI, Atsuko KOIKE, Takuya KARASAWA, Shin TERADA
Department of Life Science, Graduate School of Arts and Science, The University of Tokyo

ABSTRACT

【Aim】

During hospitalization, injured athletes are frequently exposed to energy restrictions as well as physical inactivity, which may induce substantial muscle atrophy. To obtain preliminary data on muscle atrophy induced by energy restriction and its combination with physical inactivity during hospitalization, we evaluated the skeletal muscle weights in rats subjected to energy restriction with/without denervation-induced physical inactivity.

【Methods】

Twenty-week-old male Fischer rats were divided into the following 3 groups: fed ad libitum (Con); subjected to 33% energy restriction (ER); or unilateral denervation in combination with the 33% energy restriction (Den-ER). After a 2-week intervention, the slow-twitch soleus and fast-twitch plantaris muscles were dissected and the muscle weights were measured.

【Results】

The soleus and plantaris muscle weights in the Den-ER group were 40% and 48% lower than those in the Con group, respectively. While no significant difference in the soleus muscle weight was observed between the ER and Con groups, the plantaris muscle weight was 7% lower in the ER group than in the Con group.

【Conclusion】

Our results suggest that simultaneous physical inactivity and energy restriction, such as during hospitalization, can induce substantial atrophy in both slow- and fast-twitch muscles. They also suggest that energy restriction alone might exert atrophic effects only in fast-twitch muscle, accounting for 15% of the muscle atrophy during hospitalization.

Keywords: physical inactivity, energy restriction, muscle atrophy, autophagy, ubiquitin-proteasome