

骨格筋線維の損傷－再生過程
におけるアポトーシス応答

須藤 みず紀

電気通信大学 電気通信学研究科
博士(理学)の学位申請論文

2010年3月

骨格筋線維の損傷－再生過程におけるアポトーシス応答

博士論文審査委員会

主査 狩野 豊 准教授

委員 中村 整 教授

委員 丹羽 治樹 教授

委員 白川 英樹 准教授

委員 藤井 宣晴 教授

(首都大学東京)

著作権所有者

須藤 みず紀

2010年

Myofiber apoptosis responses in the inflammation and regeneration phase

Mizuki Sudo

Abstract

Mechanical and metabolism stress with exercise leads to adaptation of skeletal muscle via various intracellular signal transduction mechanisms. This study focused on the apoptosis responses of skeletal muscle damage to the recovery process after exercise stress. It is known that eccentric contractions induced muscle damage leads to myofiber necrosis, accompanied with ultrastructural collapse, edema and inflammation. These inflammatory reactions achieve their peak responses in ~3 days after eccentric contractions, and subsequently, the muscle fibers shift to the process of regeneration in ~7 days. The elimination of damaged myofibers by necrosis constitutes one of a series of responses in the process of myofiber regeneration. However, it is not clarified whether apoptosis contributes in these processes. The aim of this present study was to determine the inflammatory and regenerative phase of apoptosis responses induced by eccentric contractions. The main conclusions were as follows:

1) A small animal model for exercise stress induced muscle damage study was established. In addition, the relationship between exercise stress condition and extent of muscle damage were clarified. 2) Eccentric contractions appear to cause greater apoptosis to skeletal muscle than isometric contractions as well as histological muscle damage. Furthermore, there are gender-related differences in the apoptosis responses to

eccentric contractions as well as inflammatory responses after muscle damage. 3) Apoptosis responses in myocyte generate not only an inflammatory phase but also a regenerative phase after eccentric contractions. 4) Eccentric contractions-induced skeletal muscle damage and apoptosis responses were suppressed by concomitant hypoxia stress. 5) Eccentric contractions-induced inflammation-regeneration response is delayed in diabetes. In this occasion, the apoptosis responses were increased in the inflammation phase in the diabetic model.

骨格筋線維の損傷—再生過程におけるアポトーシス応答

須藤 みず紀

和文要旨

骨格筋は、多核細胞である筋線維の集合体であり、筋収縮によって誘発される様々なストレスに対して高い可塑性を有する。伸張性(エキセントリック)の筋収縮は、筋線維微細構造の崩壊、浮腫、貪食細胞の浸潤などの炎症反応を引き起こす。このような反応は、筋線維全体に生じるものではなく、線維の一部に起こる。損傷した筋線維部位は浸潤作用によって除去されるが、再生過程を経てすみやかに回復する。したがって、筋線維の再生は部分的な修復と捉えることができる。これまで細胞死・細胞再構築に関する機能として、遺伝的にプログラムされた機構により自らを除去する「アポトーシス」が知られている。しかしながら、骨格筋の損傷—再生過程において多核細胞である筋線維に対するアポトーシスの関与は未だ明らかにされていない。本論文は、運動ストレスにともなう筋損傷とその再生機構に着目し、特にその過程で生じるアポトーシスの発生とその機序について明らかにすることを目的として以下の研究課題を遂行した。

本論文は、以下の9章から構成されている。第1章では、骨格筋におけるアポトーシスのメカニズムについて述べ、筋線維におけるアポトーシス発生に関する文献研究をおこなった。そして、第2章において、筋線維における運動ストレスによるアポトーシス応答を解明する必要性を指摘した上で、具体的な研究課題を設定した。第3章では、実験動物(ラット)を対象に運動誘発性筋損傷モデルを確立するために、収縮負荷条件(実験1)と損傷の発生割合やその範囲(実験2)について検証した。

そして、この運動誘発性筋損傷モデルを用いて、第4章では運動ストレスによるアポトーシス応答における性差について検証(実験3)し、その結果を受けて第5章では筋収縮により誘発された骨格筋の損傷-再生期のアポトーシス応答とその機序の解明(実験4)を試みた。さらに、第6章では低酸素ストレス、第7章では糖尿病による代謝的ストレスをともなった運動負荷に対するアポトーシス応答(実験5, 6)について検証した。以下に各々の研究課題とその概要について示した。

研究課題 1 (実験1, 2):動物モデルを対象とした骨格筋における運動誘発性筋損傷モデルの確立を目的として、エキセントリック収縮負荷の回数依存性、および、筋損傷部位を解析した。その結果、筋損傷は、収縮回数が20回以上の負荷では筋損傷が発生するが、10回以下では誘発されないことが明らかとなった(実験1)。また、前脛骨筋におけるエキセントリック収縮負荷は、近位部、中央部、遠位部では一様な損傷を誘導することが示された(実験2)。

研究課題 2 (実験3, 4):オス・メスラット骨格筋を対象にエキセントリック、およびアイソメトリック収縮を負荷し、損傷期のアポトーシス発生における性差について検討した。その結果、筋損傷と同様に筋組織におけるアポトーシス発生はアイソメトリック収縮よりもエキセントリック収縮で多く観察され、さらに、エキセントリック収縮に対するアポトーシス応答はオスにおいて顕著であることが明らかになった(実験3)。

また、損傷-再生期における筋線維のアポトーシス応答を組織・生化学的手法から検討することで、アポトーシス発生の生理学的意義の解明を試みた。その結果、エキセントリック収縮による筋線維でのアポトーシス応答は、損傷-再生期において持続的に誘発されることを明らかにした。これらの知見は、アポトーシスが損傷部位の除去に関与することに加えて、再生期の衛星細胞由来の新生核と既存の核との間における

核数調節などの役割を果たしていること示唆するものである(実験4).

研究課題 3 (実験5):筋収縮が生み出す運動ストレスに加えて,活動筋における低酸素刺激負荷をともなったエキセントリック収縮モデルを確立し,複合的なストレス刺激が筋組織へおよぼすアポトーシス応答および細胞内情報伝達物質について検証した.その結果,エキセントリック収縮中の血流制限による活動筋への低酸素刺激の増大は,血流制限をとまわらない筋収縮負荷と比較して筋損傷,およびアポトーシス応答を抑制することが明らかとなった.また,血流制限下では損傷,アポトーシス応答を抑制するにもかかわらず筋肥大因子は活性化することが示された.したがって,低酸素刺激環境下における筋収縮モデルは,筋損傷を生じない効果的な筋肥大を引き起こすプログラムであることが示唆された.

研究課題 4 (実験6):糖尿病の発症は,骨格筋の形態や機能に大きな変化をもたらす.形態的には顕著な筋萎縮を引き起こす.さらに,筋収縮負荷に対する抵抗性や損傷時の修復応答が劣ることが考えられる.したがって,1型糖尿病ラットモデルを作成し,エキセントリック収縮に対する細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答についてアポトーシスという観点に着目し検証をおこなった.その結果,エキセントリック収縮による損傷-再生応答が正常な骨格筋よりも遅延すること,さらに損傷期においてアポトーシス応答が増加することを明らかにした.

第8章および第9章では,本研究から得られた知見を統合的に捉えて骨格筋におけるアポトーシス応答について考察するとともに,各研究課題における成果を検討し,運動ストレスによるアポトーシス応答とその機序について総括した.さらに今後の課題として,同モデルにおけるアポトーシス発生阻害による損傷-再生機構へ

の影響について検証することの必要性について言及した.

本研究の知見より, 多核細胞である筋線維の損傷-再生の各段階において, アポトーシスの関与が明らかになった. 特に, 再生過程におけるアポトーシスの果たす役割は, 多核細胞である筋線維に特徴的なユニークな生物学的応答である. これらの知見は新たな筋損傷修復メカニズムとして注目するべき点であり, 運動のような複合的なストレスに対する骨格筋の高い可塑性を説明するメカニズムの一つでもあるだろう.

目次

第1章 背景

1.1. 緒言 ……1

1.2. 先行研究 ……3

1.2.1. アポトーシスの提唱

1.2.2. アポトーシスの定義

1.2.3. アポトーシスの発生要因

1.2.4. アポトーシスの発生機構

1.2.5. 骨格筋とアポトーシス

1.2.5.1. 運動ストレスとアポトーシス応答

1.2.5.2. 骨格筋再生とアポトーシス応答

1.2.5.3. 低酸素ストレスとアポトーシス応答

1.2.5.4. 糖尿病とアポトーシス応答

第2章 研究目的及び研究課題 ……23

第3章 運動誘発性筋損傷モデルの確立 ……26

3.1. 収縮回数と損傷割合の関係 (実験1) ……26

3.1.1. 背景と目的

3.1.2. 方法

3.1.3.	結果	
3.1.4.	考察	
3.2.	筋損傷の発生部位 (実験 2)	…36
3.2.1.	背景と目的	
3.2.2.	方法	
3.2.3.	結果	
3.2.4.	考察	
3.3.	要約	
第 4 章	オス・メスラット骨格筋における収縮負荷による アポトーシス応答 (実験 3)	…47
4.1.	背景と目的	
4.2.	方法	
4.3.	結果	
4.4.	考察	
4.5.	要約	
第 5 章	エキセントリック収縮による損傷－再生期における アポトーシス応答 (実験 4)	…63
5.1.	背景と目的	
5.2.	方法	
5.3.	結果	
5.4.	考察	

5.5. 要約	
第6章 低酸素環境下におけるエキセントリック収縮による アポトーシス応答 (実験5)	…81
6.1. 背景と目的	
6.2. 方法	
6.3. 結果	
6.4. 考察	
6.5. 要約	
第7章 糖尿病骨格筋におけるアポトーシス応答 (実験6)	…104
7.1. 背景と目的	
7.2. 方法	
7.3. 結果	
7.4. 考察	
7.5. 要約	
第8章 討論	…121
第9章 総括	…127
謝辞	…130
引用文献	…131
参考論文	…148

第1章 背景

1.1. 緒言

細胞死は、生理的および病的諸要因により、不要になった細胞や損傷細胞などを積極的に自ら排除するアポトーシス (apoptosis) と、それとは対照的な外部からの物理的要因によって発生するネクローシス (necrosis) に分類される。アポトーシスの概念が確立する以前は、細胞死は全てネクローシスとして認識されていた。しかしながら、Kerr ら (1972) によってネクローシスとは全く異なる細胞死形態であるアポトーシスが提唱された。アポトーシスは、遺伝子にプログラムされた高度な制御機構を有した能動的細胞死であり、ホメオスタシスなど多岐にわたる生命現象に重要な役割を果たしている。つまり、ネクローシスとは異なり、細胞分裂・増殖と表裏一体となって生物の統一性維持に重要な役割を果たす細胞死である。

生体の各組織における細胞は、種々のストレス (物理的, 化学的, 代謝的) に対して、適応する能力を持つことが知られている。我々の身体を構成している骨格筋は、筋収縮によって誘発される様々なストレスに対して高い可塑性を有する。骨格筋を形成している筋線維は、多核細胞であり、各々の核により支配される領域が細胞質中に存在する。筋収縮における運動ストレスは、筋線維に対して部分的な損傷を誘発し、筋核、細胞質の崩壊・除去を引き起こすが、これらはネクローシスによる作用であることが指摘されている (Clarkson & Hubal, 2002)。しかしながら、運動ストレスによる筋損傷において、アポトーシスも関与していることが示唆されている (Podhorska-Okolow *et al.*, 1998)。筋損傷におけるアポトーシスは、筋線維に対して、筋核が支配する領域ごとに自ら細胞除去を誘発しているのかもしれない。筋収縮により部分的に損傷した筋線維は、新しい核を有する衛星細胞由来の筋芽細胞などが融

合・分化を繰り返し再生される。この過程は、筋線維の修復と捉えることができるだろう。近年、アポトーシスは筋損傷における細胞除去のみならず、骨格筋における細胞分化の過程にも関与していることが指摘されている (King & Cidlowski, 1995; Asakura *et al.*, 2007)。しかしながら、筋線維の再生過程におけるアポトーシスの役割については、明らかにされていない。したがって、本研究は、運動ストレスにともなう骨格筋線維における筋損傷とその再生機構に着目し、特にその過程で生じるアポトーシスの発生とその機序について明らかにすることを目的とした。

1.2. 先行研究

1.2.1. アポトーシスの提唱

19世紀末期から20世紀前半頃まで、細胞死に関しては形態学、発生学的視点からいくつかの報告がされてきた。現在の典型的なアポトーシスは、Flemmingら(1885)が、ラットの卵胞に染色体が凝固、分断化された細胞死を観察し”chromatolytic cell death”と命名したことが始まりである。1960年代より、電子顕微鏡が研究に導入されたことで、形態学的な知見が蓄積され、アポトーシス様の細胞死も多く報告された(Lockshin, 1969; Makman, 1971)。Kerrら(1972)は肝虚血に対するリソソームの形態学的検証より、急性期にみられる膨潤もしくは破裂した細胞、すなわちネクローシス細胞のほかに、丸くて小さい、凝縮から分裂に至る染色体を有する死細胞を同定した。さらに、この形態を示す細胞死は生物種を越えて様々な組織で観察されることを発見し、この細胞死を細胞数の制御における細胞分裂(mitosis)との機能的対比を強調するために「アポトーシス(apoptosis)」と命名した(Kerr *et al.*, 1972)。

1.2.2. アポトーシスの定義

アポトーシスは、染色体の凝縮、核膜近傍への濃縮、核と細胞質の凝縮・断片化、アポトーシス小体の形成を過程とする細胞死形態である(Collins *et al.*, 1991)。アポトーシスの代表的な形態学的な特徴は、クロマチンの凝集と核の断片化である(Kroemer & Jaattela, 2005)。

対照的にネクローシスによる細胞死の形態変化は、ミトコンドリアから始まる。初めに

細胞内小器官が膨化し、細胞全体も次第に膨らむ。エネルギー産生の場合であるミトコンドリアを損なうことにより ATP 産生能を失い、浸透圧制御不全も引き起こし、最終的には細胞溶解を誘発する。さらに、細胞質におけるその他の細胞内小器官も崩壊する。一方、核は膨化することを除けば比較的正常に保たれているが、最終的にはクロマチンが核周辺に粗い顆粒状に凝集し消失する (Lockshin & Zakeri, 2004) (Fig. 1)。

1.2.3. アポトーシスの発生要因

アポトーシスという現象は、正常な胚における成長過程および病的状況下において観察される。実際には、異常な細胞の成長や損傷、または変異した細胞が “better death than wrong” のルールに従って除去される (Adhietty & Hood., 2003)。逆にアポトーシスが抑制されると、生体内において腫瘍形成や癌細胞の成長が生じる (Thompson, 1995; Reed, 2002)。アポトーシスを誘導する要因は、増殖因子や神経栄養因子の除去、活性酸素、紫外線や X 線照射などがあげられる (Fig. 2)。例えば、14 日間の尾部懸垂における不活動状態により萎縮したヒラメ筋では DNA の断片化を生じるが、成長ホルモンと IGF- I (インスリン様成長因子) を投与することにより DNA 断片化と筋線維数の減少が抑制されることが報告されている (Allen *et al.*, 1997)。このことは、機械的ストレスの減少により、IGF- I などの増殖因子の自己分泌や傍分泌が低下し、その結果、生存シグナルの減少によりアポトーシスが起きることを示唆している。

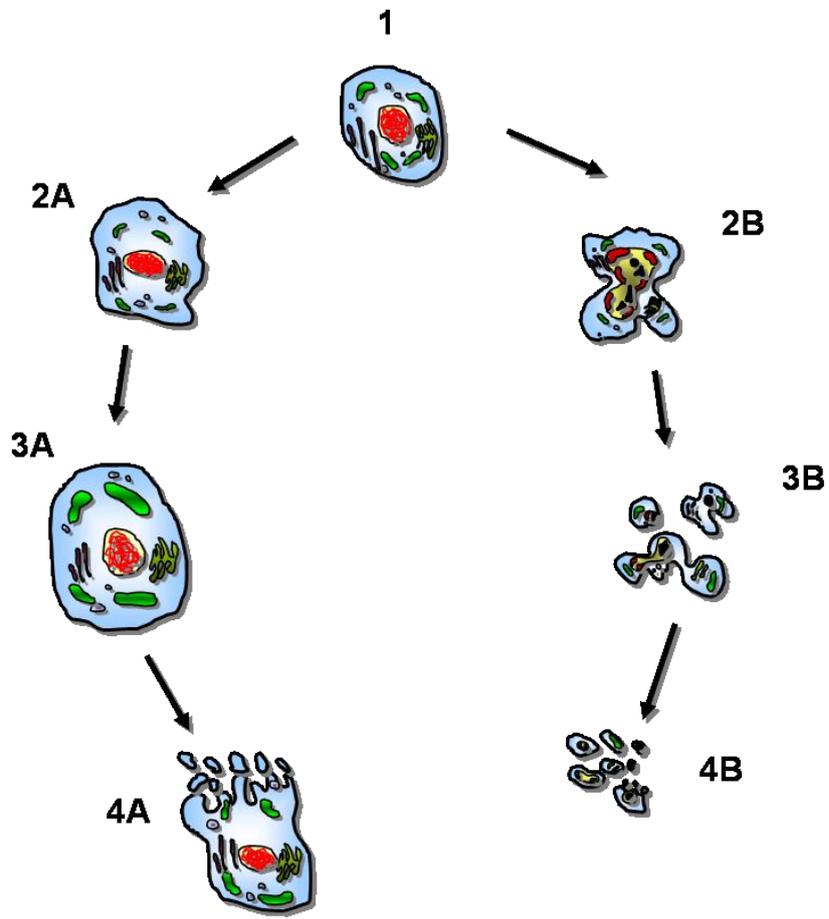


Fig. 1 Morphological features of cell death by necrosis (A) or apoptosis (B). 1, normal cell. Route A = necrosis. 2A, swelling due to accumulation of electrolytes and water; 3A, cytosolic vacuoles, blebbing and disruption of membranes, including intracellular organelles, e.g. mitochondria; 4A, necrotic stage with tissue disintegration and shrinkage. Route B = apoptosis. 2B, cell shrinkage and nuclear condensation; 3B, membrane budding and DNA fragmentation; 4B, necrotic break up into smaller apoptotic bodies. (modified from Majno et al., 1995)

1.2.4. アポトーシスの発生機構

アポトーシスは細胞における様々な現象により前述した要因が作用することで惹起される。細胞内におけるアポトーシスの誘導・決定・実行機構は、多くの分子により制御されている。本項では、アポトーシス発生における細胞膜受容体を介した外因性経路、およびミトコンドリアを介した内因性経路に焦点をあてた (Fig. 2)。

外因性によるアポトーシスの発生は、デスレセプターである TNF (腫瘍壊死因子) 受容体ファミリーの細胞外受容器にリガンドが結合することで誘発される (Baker & Reddy, 1998)。これまでに6種類のレセプターが知られているが、対応するリガンドとしては、TNF- α , FAS, TRAIL があげられる。これらのリガンドが受容体へ結合することで、特異的なプロテアーゼ (caspase ファミリー) が活性化しアポトーシスを誘導する。caspase は、不活性な procaspases の状態で存在し、自己あるいは他の caspase の作用により限定分解され、二量体化して活性型に変換することで作用する (Kumar, 1999)。

デスレセプターシグナルによるアポトーシス発生において、caspase-8 の関与が多く報告されている (Baker & Reddy, 1998; Li *et al.*, 1998; Salvesen & Dixit, 1999; Sun *et al.*, 1999)。活性化した caspase-8 は、FADD / MORT-1 と結合し、DISC (death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体を形成し、DISC の中で caspase-8 が活性化しアポトーシスシグナルが細胞内へ伝達される (Kischkel *et al.*, 1995)。caspase-8 により直接的に活性化される caspase-3 は、アポトーシスの実行因子である (Nicholson, 1999)。しかしながら、caspase-3 が直接 DNA の断片化を引き起こすのではなく、ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) と CAD (caspase-activated DNase) の結合を介して核内へシグナルを伝えていることが明らかとなっている (Lechardeur *et al.*, 2000)。また、この caspase-8 の活性は、実行因

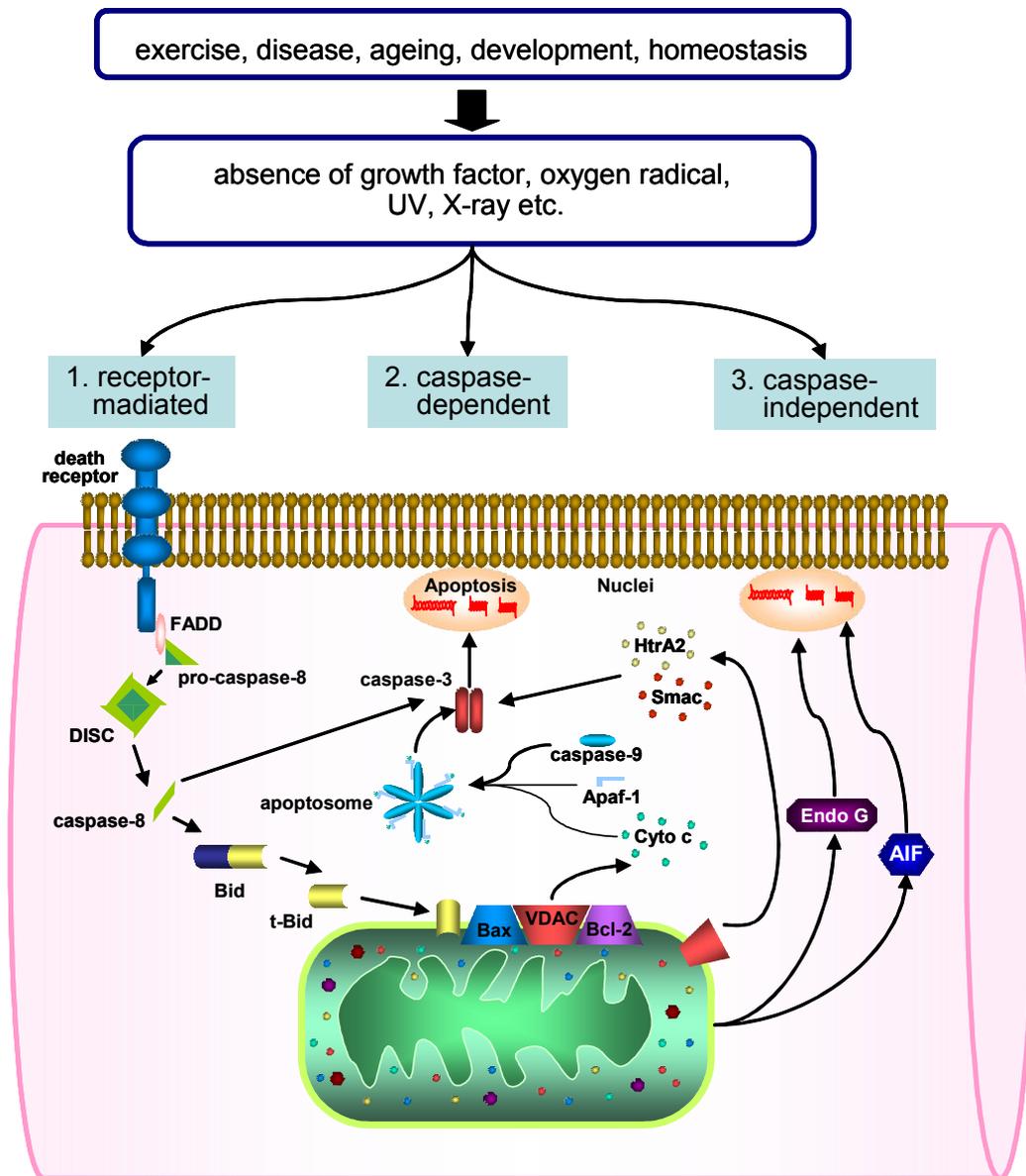


Fig. 2 Overview of the extrinsic and intrinsic pathway leading to either caspase-dependent or –independent apoptosis. 1) Receptor-mediated apoptosis. 2) Caspase-dependent apoptotic pathway. 3) Caspase-independent pathway.

子である caspase-3, -7 の切断活性化 (Salvesen & Dixit, 1997), および Bid を切断活性 (truncated Bid; tBid) することによってミトコンドリアを介して実行因子が活性化させる (Li *et al.*, 1998) ことが報告されている. 通常, DNA 修復酵素は, 不活性型 caspase-3, -7 によって活性化される (Nicholson, 1999). したがって, 活性化した CAD と阻害された DNA 修復酵素によって, 遺伝子的に制御されたアポトーシスが発生する (Nicholson, 1999; Lechardeur *et al.*, 2000).

内因性発生経路の一つである caspase 依存経路は, 主に, ミトコンドリアに局在するアポトーシス開始因子によりアポトーシスを惹起する. ミトコンドリアは細胞質が膜によって内と外に分けられた構造をしている. ミトコンドリアがアポトーシス開始の刺激を受けると, その膜透過性が亢進し, 内, 外膜により区画された膜間スペースに存在するシトクロム c や Smac / Diablo, HtrA2 / Omi などのアポトーシス誘導タンパク質が細胞質に漏出する (Fig. 2). このアポトーシス誘導タンパク質の漏出は, ミトコンドリア膜の透過性を制御する Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2; Bcl-2) ファミリータンパク質により調整されている (Adams & Cory, 1998; Tsujimoto, 2003; Brunelle & Letai, 2009). Bcl-2 ファミリータンパク質は, 促進因子 (i.e. Bax, Bak, Bok), 抑制因子 (i.e. Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w) としてミトコンドリア外膜に局在し, アポトーシス発生やミトコンドリアにおける膜の透過性を制御する.

促進タンパク質である Bax (Bcl-2-associated X protein), Bak (Bcl-2 antagonist/killer-1) は, BH1-3 ドメインとの相互作用により活性化する. 特に BH3-only protein は, Bax を発現させてミトコンドリア膜透過性を亢進し, シトクロム c の放出を促進させることでアポトーシスを誘導することが報告されている (Murphy *et al.*, 2000). Bax や Bak の同時ノックアウトマウスは, 約 90% が胎生致死となり, 生まれてきたマウスにおいてはリンパ節, 胸腺, 脾臓の腫大や過剰な神経細胞が観察される (Lindsten *et al.*, 2000). 細胞質中における Bax の活性型機構に関しては, 未だ

十分に明らかになっていないが、電位依存アニオンチャネル (VDAC) が関与していることが指摘されている (Brdiczka, 1991; Shimizu *et al.*, 1999).

抑制タンパク質である Bcl-2 は、線虫と同様、哺乳類においても確認されており (Hengartner and Horvitz, 1994), ミトコンドリア依存性経路においてアポトーシスを抑制に重要な役割を持つことが知られている. ミトコンドリアのオルガネラ膜に局在する BH ドメイン (Bcl-2-homology-domain) 1-4 は、アポトーシスを誘導する要因となるようなストレス刺激によりミトコンドリア外膜に局在するアポトーシス制御タンパク質と相互作用を起し、アポトーシス発生の on/off を決定するトリガーの機能を有する (Chittenden *et al.*, 1995; Danial & Korsmeyer, 2004). Bcl-2 が過剰発現した細胞では、ミトコンドリア膜の透過活性が抑制されるためシトクロム c の放出は観察されなかった (Kluck *et al.*, 1999). また、Bcl-2 ノックアウトマウスでは、アポトーシスの亢進により、発育不良、リンパ系組織や腸上皮の萎縮などをともなう. したがって、Bcl-2 / Bcl-xL のアポトーシス抑制活性は、主に膜透過性制御であると考えられている.

放出されたシトクロム c は、CADR (caspase recruitment domain) を有する Apaf-1 (apoptotic activating factor-1) と結合することで構造変化を起し、caspase-9 を活性化させアポトソームと呼ばれる複合体を形成する (Li *et al.*, 1997; Daugas *et al.*, 2000). アポトソームは、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性化を促し、結果的に DNA の断片化及び細胞崩壊を発生させる.

ミトコンドリアが関与したアポトーシス発生では、caspase を介さない経路も存在する. ミトコンドリア内膜に局在するタンパク質である AIF (apoptosis inducing factor), および Endo G (endonuclease G) は、caspase の活性とは関係なく細胞核に転移しアポトーシスを誘発する (Li *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 2000). AIF は、ヒトの心筋及び骨格筋において多く局在することが示されており (Susin *et al.*, 2000), クロマチンの濃縮, DNA 断片化を引き起こす. AIF を介したアポトーシス発生は胚発生時におい

て惹起されることが報告されている (Joza *et al.*, 2001).

Endo G は、ミトコンドリア DNA の複製を補助するヌクレアーゼであるが、Li ら (2001)は、ミトコンドリアから放出されることで Endo G が活性化することを示した。Endo G は、caspase 依存性 DN ase である CAD と類似した機能を有しているものの、caspase に非依存的な DNA の断片化を誘導する。また、Parrish ら (Parrish *et al.*, 2001) は、線虫におけるアポトーシスの正常な進行に必要な caspase-6 が、BLAST 解析によってマウスの Endo G との相同性が 48%であることを確認し、両者が機能する相同体であるかを検証するために caspase-6 変異体に Endo G を発現させたところ突然変異表現型を完全に修復できることを明らかにした。

1.2.5. 骨格筋とアポトーシス

骨格筋は、数百から数千本の筋線維と呼ばれる細胞により構成されている。筋線維内には、多くの核やミトコンドリア、筋小胞体などの細胞内小器官と筋原線維が存在しており、多数存在する核の多くは、発生の過程で融合した筋芽細胞に由来するものである。筋原線維の直径は約 1 μm の円柱状の構造体で、筋線維の長軸方向（収縮方向）に平行に存在し、細いフィラメントであるアクチンフィラメントが一定間隔で規則的に配列し、その間を太いミオシンフィラメントが位置している。筋細胞は多核細胞であるため、1つの核がタンパク質合成により構造や機能を維持できる細胞質の体積に限界が存在する。この核の支配領域（核ドメイン）を調節することで、筋線維のサイズが制御される (Gallegly *et al.*, 2004; Favier *et al.*, 2008)。これらの構造的、機能的特性は、筋線維におけるアポトーシス機構にも影響を及ぼすことが予想される。

1.2.5.1. 運動ストレスとアポトーシス応答

筋の収縮様式は、アイソメトリック(等尺性)、コンセントリック(短縮性)、エキセントリック(伸張性)に分類され、身体動作の多くには、これら 3 つの活動様式が全て含まれている。

筋損傷とは、光学および電子顕微鏡レベルにおける形態学的特徴、筋機能の低下・損失である (Brooks *et al.*, 1995; Warren *et al.*, 1999)。アイソメトリック収縮などの他の収縮様式よりも高い張力を発揮するエキセントリック収縮負荷後の骨格筋は、1) サルコメアの崩壊、2) 張力発揮に関与する細胞骨格成分の欠損、3) 細胞膜の崩壊、4) 興奮収縮連関障害、5) 発揮張力の低下を誘発する (Proske & Morgan, 2001)。Friden ら (1998) は、エキセントリック収縮を繰り返し負荷した 1 日後に筋線維を摘出し、縦断的に損傷発生部位を検証した。その結果、筋線維おける損傷は、散在的に生じていること示した (Fig. 3)。筋線維の損傷は、筋線維全体に生じるものではなく、線維の一部分に起こるため、筋線維の再生は部分的な修復と捉えることができる。

筋収縮による損傷－再生過程の経時的変化 (Friden & Lieber, 1992; Takekura *et al.*, 2001; Pizza *et al.*, 2002; Kano *et al.*, 2004) とアポトーシスの関連性については、いくつかの報告がなされている。運動による筋線維のアポトーシス応答は、Sandri ら (1995) によって初めて報告された。マウスの自発性ランニングを 16 時間負荷したモデルにおいて、ランニング終了 2 日後では、アポトーシスの特徴の一つである DNA の断片化が有意に増加することが示された。その後、Podhorska-Okolow ら (1998) は、同モデルを用いた研究において、DNA の断片化を同定する TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) 法と電子顕微鏡を用いた形態学的観察より、運動直後と 6 時間後の筋組織において、アポトーシス応答の有意な増加を報告した。このときアポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 の発現は、運動後 96 時間まで減少し、対照的に促進タンパク質 Bax は、運動後 96 時間まで継続した増加がみられた。

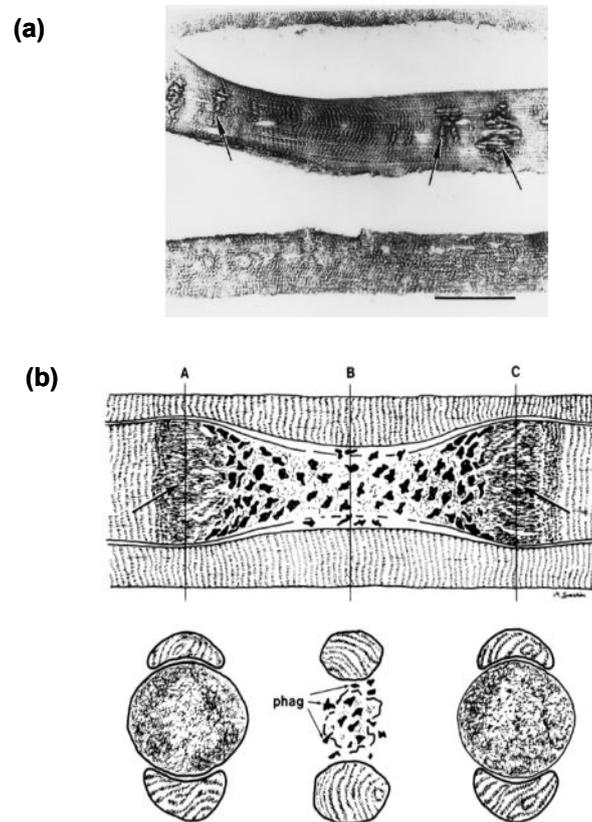


Fig. 3 (a) Titin immunoreactivity in a longitudinal section of EDL muscle, 1 day after eccentric contractions. Disturbances of the sarcomere lattice are observed. Sarcomere lengths and thus fiber diameter vary along the damaged fibers. Bar = 50 μ m. (b) Schematic drawing of longitudinal (top) and cross (bottom) sections of a muscle fiber with segmental damage surrounded by two normal fibers. Vertical lines A, B, and C indicate the planes of cross sections. Hypercontraction zones (arrow) are bilateral to the necrotic zone. In the region of necrosis, phagocytes (phag) are present both within and outside the partially damaged muscle fiber membrane. The hypercontraction zones displace and compress the adjacent fibers, but in the region of lesion, these normal fibers taper along the damaged and narrow fiber (Friden *et al.*, 1998).

Biral ら (2000) は、電気刺激を連続的に負荷させるエキセントリック収縮モデルにおける筋細胞アポトーシス応答について検証した。Biral らが対象とした後肢筋では、TUNEL 法による陽性核が筋細胞膜タンパク質ジストロフィンの欠損した箇所に観察された。筋細胞膜タンパク質であるジストロフィンが先天的に欠損している mdx マウス筋では、筋収縮による機械的ストレスに対して正常マウス筋よりもアポトーシスを発生しやすいことが報告されている (Sandri *et al.*, 1997; Podhorska-Okolow *et al.*, 1998)。さらに、アポトーシス制御タンパク質 Bcl-2, Bax を組織学的に評価した。正常な筋細胞ではほとんど発現はみられなかったが、mdx マウス筋の筋細胞では両タンパク質が筋細胞中に発現していたことから、常にアポトーシス抑制－促進の制御が細胞内で行われていることが示唆された。

エキセントリック収縮後の筋損傷は性差が生じることが報告されている (Amelink *et al.*, 1990; Komulainen *et al.*, 1999; Stupka *et al.*, 2000; Stupka *et al.*, 2001; Clarkson & Hubal, 2002; Kendall & Eston, 2002; Tiidus, 2005; Tiidus *et al.*, 2005a; Tiidus *et al.*, 2005b)。Komulainen ら (1999) は、130 分のダウンヒルランニング負荷直後のオス・メスラットにおいて、オスはメスよりも筋細胞浮腫において有意な増加を示した。また、運動 4 日後の炎症反応を検証したところオスでは貪食細胞が観察されたが、メスの筋細胞においてはほとんどみられなかった (Komulainen *et al.*, 1999)。さらに、Stupka ら (2000, 2001) はヒトの骨格筋における性差について、運動負荷 3 日後において、筋損傷の指標の一つである血漿クレアチンキナーゼ (CK) 値が女性よりも男性の方が有意な上昇を示したと報告している。筋細胞内の血漿 CK 値の上昇は、筋細胞の崩壊にともない CK が血漿中に放出したことを意味しており、筋細胞崩壊に性差が生じることを示した証拠である。運動誘発性筋損傷における性差の原因については、様々な要因が研究されているが未だ明らかにされていない部分が多い。Kendall and Eston (2002) はメスの性ホルモンであるエストロゲンが、細胞膜

の保護作用および酸化ストレス緩和物質として作用していることを指摘している。近年では、運動時の血流増加にともない損傷部位に運搬されるエストロゲンによる炎症防御・再生促進における効果についても報告されている (Tiidus, 2005; Tiidus *et al.*, 2005a; Tiidus *et al.*, 2005b).

筋収縮負荷後の骨格筋におけるアポトーシスの性差についての研究は非常に少ない (Stupka *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2007). Stupka ら (2000) は、エキセントリック運動後のヒトの筋において、アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 の発現を組織学的手法により同定・定量を行った。運動 48 時間後の筋において、女性よりも男性の Bcl-2 陽性細胞が有意に高い値であったことを示した。しかしながら、Sanz ら (2006) は、正常ラット骨格筋においてアポトーシスの実行因子である caspase-3, -9 を定量した結果、性差はなかったことを報告している。アポトーシスの性差については、caspase 非依存経路も存在することもふまえて検討する必要があるかもしれない。

骨格筋は、一過性の高強度な筋収縮により筋損傷を誘発するが、運動を継続することで損傷に対する抵抗性を獲得する。損傷に対する抵抗性の上昇は、筋組織内におけるアポトーシス発生の抑制が関与していることが指摘されている。

Siu ら (2004) は、若齢ラットの後肢筋を対象にした 8 週間のトレッドミル運動を負荷させ、最終運動 48 時間後の DNA 断片化率およびアポトーシス制御因子の生化学的評価を行った。トレーニング群における DNA 断片化率は、対象群との有意な差は得られなかった。継続的なトレーニングによりアポトーシス応答が見られなかった要因として、HSP 70 (Heat Shock Protein 70) と Mn-SOD (Mangan-Superoxide dismutase) の関与を示唆している。HSP 70 は、運動刺激により発現が増加し、タンパク質合成や損傷したタンパク質の修復を促進させることが報告されている (Siu *et al.*, 2005a; Siu *et al.*, 2005b). さらに、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出を抑制 (Li *et al.*, 1998) もしくは、HSP 70 が Apaf-1 に結合することからアポトソームの形成

を阻害し、caspase-3 の活性を抑えることが明らかとなっている (Beere *et al.*, 2000). また、運動により産生された活性酸素によりアポトーシスが誘発されることが報告されている (Powers *et al.*, 2008) が、Mn-SOD は活性酸素を除去する機能を持つことからアポトーシスの発生を抑制することが可能である. Siu らの実験では、トレーニング後の HSP 70 と Mn-SOD を対照群と比較しそれぞれ、~ 170%, 64% の著しい増加を示した. したがって、運動トレーニングは HSP 70 と Mn-SOD を上昇させ、骨格筋におけるアポトーシス発生を抑制する効果があると考えられている.

長期的な運動トレーニングは、アポトーシス制御因子にも抑制的な効果を与えることが報告されている. Song ら (2006) は、加齢ラットを対象に 12 週間にわたりトレッドミル運動を負荷させた結果、トレーニング無負荷の加齢ラットと比較して、アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 は増加し、促進タンパク質 Bax および caspase-3 活性が減少したことを示した. さらに、DNA 断片化率も有意に減少したことから、加齢ラットにおける運動トレーニングはアポトーシス制御因子に関与することが示唆された.

これまでの先行研究より、運動トレーニングは、骨格筋におけるアポトーシスの発生を抑制する傾向がある. しかしながら、運動トレーニングによる骨格筋における適応が、運動様式、強度、トレーニング期間により異なるように、アポトーシスの発生においても条件により応答性が異なるのかもしれない.

1.2.5.2. 骨格筋再生とアポトーシス応答

近年、再生医学が急速に発展し、多分化能を示す ES 細胞 (embryonic stem cells, 胚性幹細胞) や幹細胞 (stem cells) に関連する研究が盛んである. 現在では、様々な組織に幹細胞が存在することが明らかにされ、各々の幹細胞は多分化能として機能する可能性が期待されている. 成熟した骨格筋にも衛星細胞 (satellite cell) と呼ばれる幹細胞が存在し (Fig. 4), 筋の成長, 損傷後の筋の再生・再構築に

関与している。衛星細胞は自己増殖が可能であり、トレーニングや損傷などにより生じた各種ストレスに応じて増殖し、Myf 5 や MyoD などの筋特異的転写調節因子 (muscle-specific transcriptional factor) の発現によって筋形成前駆体となる。その後、Pax3, Lbx1, Praxis などの遺伝子発現を経て筋芽細胞 (myoblast) となる。一つの筋細胞は複数の体節に由来する筋芽細胞から形成される。筋芽細胞は増殖した後、一方向に配列しながら細胞融合をして筋管細胞 (myotube) という多核の幼若な筋細胞を経て、増殖・融合を繰り返して骨格筋細胞へ分化する (Fig. 5)。

骨格筋再生に関連したアポトーシス応答研究の多くは、筋衛星細胞を対象としたものが多く (Podhorska-Okolow *et al.*, 1998; Krajnak *et al.*, 2006; Asakura *et al.*, 2007), その生理学的意義は、筋核ドメインの制御を目的としたものであると考察されている。筋細胞は多核細胞であるため、1つの核がタンパク質合成により構造や機能を維持できる細胞質の体積に限界が存在する。再生過程における衛星細胞のアポトーシスの発生は、核の支配領域 (核ドメイン) を調節するために重要な役割を有するのではないかと示唆されている (Siu & Alway, 2009)。Krajnak ら (2006) は、若齢および加齢ラットを対象とした筋収縮負荷後の骨格筋の衛星細胞アポトーシスについて検討した。電気刺激による連続的なアイソメトリック収縮を負荷後の衛星細胞から筋芽細胞へ増殖を促す MyoD とアポトーシス促進タンパク質 Bax の共発現は、加齢ラットでは若齢ラットよりも高い割合を示した。また、骨格筋の再生過程における筋分化誘導能を持つ MyoD が、アポトーシスを積極的に誘導する機能も有することが報告されている (Asakura *et al.*, 2007)。筋の再生過程におけるアポトーシス応答の生理学的意義については、知見が非常に少ないことから、多核細胞特異的な現象であるか否かは未だ明らかにされていない。

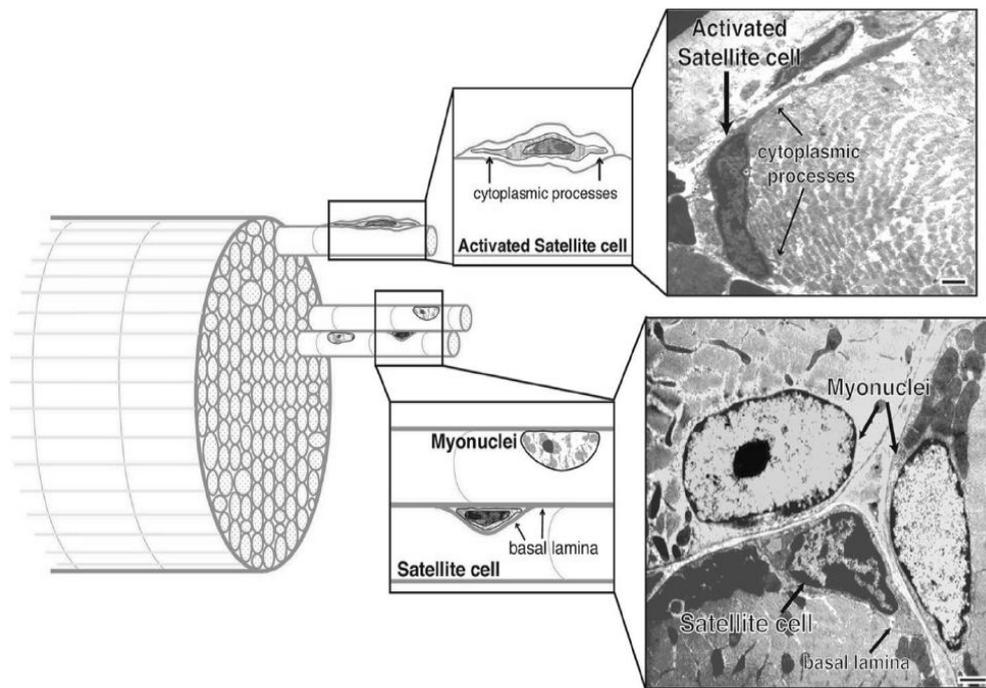


Fig. 4 Satellite cells occupy a sublamellar position in adult skeletal muscle. In the uninjured muscle fiber, the satellite cell is quiescent and rests in an indentation in the adult muscle fiber. The satellite cells can be distinguished from the myonuclei by a surrounding basal lamina and more abundant heterochromatin. When the fiber becomes injured, the satellite cells become activated and increase their cytoplasmic content. The cytoplasmic processes allow for chemotaxis of the satellite cell along the myofiber. Bar = 1 μ m (*Hawke et al., 2001*).

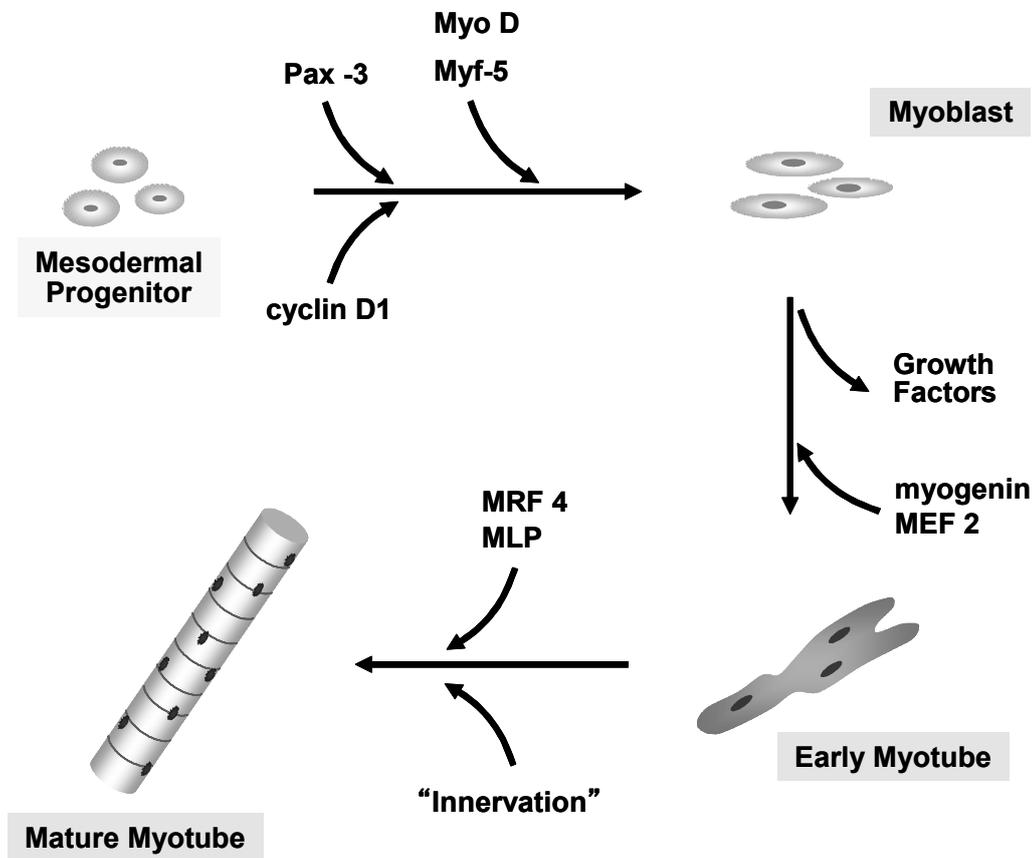


Fig. 5 Member of the MyoD and myf-5 expression is involved in determination of precursor cells to a myogenic fate, whereas myogenin and MRF 4 expression is associated with terminal differentiation (*modified for Konieczny et al., 2002*).

1.2.5.3. 低酸素ストレスとアポトーシス応答

生体組織にとって虚血は、エネルギー供給の遮断を意味し、組織によって虚血に対する感受性は異なるものの、最終的には細胞死に至る。虚血による細胞死は、ATPレベルの低下をトリガーとする。細胞内では、ATPレベルが低下するとカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度が上昇し、ミトコンドリア機能不全、細胞膜の破綻が生じアポトーシスおよびネクローシスを誘発することが報告されている (Elsasser *et al.*, 2001; Gujral *et al.*, 2001)。培養細胞に低酸素刺激を与えた場合、グルコースの濃度が高ければ嫌気的条件下でも解糖系によって ATP は補完され、アポトーシスが多く誘導されない。一方でグルコース濃度が低い場合、ATP は枯渇し、細胞内酵素の漏出が起これり、多くはネクローシスによって細胞死が誘導される。アポトーシス発生の実行因子である caspase の活性化は、ATP に依存していることから、アポトーシス発生の決定は細胞内の ATP 濃度に関与していることが示唆されている (Eguchi *et al.*, 1997)。しかしながら、アポトーシス発生には、AIF や Endo G などによる caspase 非依存経路も存在することも報告されている (Bonde *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2002)。また、虚血などによる低酸素ストレスは、筋細胞内において好中球の活性を促すことで活性酸素を誘導し、発生した活性酸素はアポトーシスを惹起することも報告されている (Raj *et al.*, 1998)。

1.2.5.4. 糖尿病とアポトーシス応答

糖尿病はインスリン作用の不足による慢性高血糖症という特徴的な代謝異常をはじめとして、脂肪やタンパク質の代謝などに広範囲な異常を示し、その結果、末梢循環不全や神経障害などの合併症を引き起こす疾患である。

糖尿病は発生要因に基づき 2 種類に分類できる。膵臓 β 細胞の機能異常により、インスリン分泌障害が生じ、正常な身体活動のためにインスリン投与が必須なものをインスリン依存型糖尿病 (1 型糖尿病)、肥満等の要因から糖代謝に異常が生じ、標的組織におけるインスリン作用の低下、すなわちインスリン抵抗性を引き起こすものをインスリン非依存性糖尿病 (2 型糖尿病) と定義している。

糖尿病実験動物として、1 型糖尿病はストレプトゾトシン (STZ) を用いて薬理的に誘発させることができ、自然発症型 1 型糖尿病ラットには、LETF ラット、NOD マウスが用いられる。また、自然発症型 2 型糖尿病である OLETF ラット、GK ラット、KK-Ay マウス、WBN/Kob ラットなどがあげられる。各モデルによって糖尿病発生時期、体重増加速度、血糖値は様々である (McGuire & MacDermott, 1999; Yamamoto *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2007; Najemnikova *et al.*, 2007)。

糖尿病は、持続する高血糖を中心とした代謝障害である一方、並行して血管内皮細胞や前駆体細胞の機能障害 (Emanuelli *et al.*, 2007) などの様々な臓器障害をもたらす。加えて、糖代謝における恒常性破綻を招くことから同時に骨格筋萎縮の合併症も引き起こす。そのため、活動量の低下を招くため、さらなる糖代謝能の低下が誘発されることが考えられる。

通常、筋のタンパク合成と分解のバランスは保たれているが糖尿病を発症するとそのバランスは崩れる。1 型糖尿病ラットでは、速筋線維である長指伸筋におけるタンパク質合成速度は正常ラットを有意に下回り、タンパク質分解速度は有意な高い値を示すことが報告された (Farrell *et al.*, 1999; Baviera *et al.*, 2007)。しかしながら、腓腹筋やヒラメ筋などの遅筋線維においては、タンパク質合成速度の有意な差異がみられなかった (Farrell & Keefe, 1998; Farrell *et al.*, 1999)。

糖尿病の合併症の一つでもある筋萎縮についても多くの報告がされている。筋萎縮は、個々の筋線維の萎縮、筋線維の減少あるいはそれら両方の結果である。1 型糖尿病モデルの骨格筋では、速筋線維のサイズが正常ラットと比較して有意に減少するこ

とが報告されている (Armstrong *et al.*, 1975; Ozaki *et al.*, 2001). しかしながら, ヒトの 2 型糖尿病モデルでは, 健常人と比較して速筋線維が増加し, 遅筋線維が減少するという報告もある (Marin *et al.*, 1994).

これまでに, 加齢によるサルコペニア (廃用性筋萎縮), ギブス固定 (不動性筋萎縮) による骨格筋の萎縮においてアポトーシスが重要な役割を有することが多くの研究により指摘されてきた. 廃用性, および, 不動性筋萎縮は, DNA の断片化や筋核の脱落をともなうことが報告されている (Allen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000). さらに, Siu and Alway (2009) は, 筋萎縮は多核細胞である筋線維における単一のアポトーシス発生に起因していることを示唆した. 単核単位によるアポトーシスによる筋核の脱落は, 筋核ドメインの範囲を縮小させることから筋タンパク質合成が制御不能となり, 結果的に筋萎縮が誘発されることが考えられる. したがって, 糖尿病による筋萎縮骨格筋においても核の脱落を目的としたアポトーシスの発生が予想される. また, 糖尿病骨格筋のミトコンドリアにおける機能不全がもたらすアポトーシス発生も指摘されている (Stark & Roden, 2007; Peterson *et al.*, 2008). しかしながら, これらの詳細な機構については不明な点が多いのが現状である.

現在, 糖尿病疾患の対策として取り入れられている運動療法は, 血糖値の低下を目的とした有酸素性運動を主体としたプログラムがほとんどである. Usui ら (1998) は, 2 型糖尿病患者において, 30 分間の低強度な自転車運動がインスリン由来の血糖取り込みを高めると報告した. また, 低強度な有酸素性運動が糖尿病疾患患者の外側広筋における筋内トリグリセリドレベルの減少, 脂肪酸酸化能力の増加, 毛細血管数の増加を引き起こすことが指摘されている (Kim *et al.*, 2004) ことから血糖レベルの維持に有効であることが示唆された.

また, 筋量増加を目的とした運動処方についても報告がなされている. 筋力増加を目的としたトレーニングは, GLUT 4 (glucose transporter 4), インスリン受容体, 肥大因子である Akt のタンパク質量を増加させることが示された (Holten *et al.*, 2004).

しかしながら, Katta ら (2008) は, 糖尿病ラットの後肢筋を対象にレジスタンストレーニングを負荷した結果, タンパク質分解促進因子である MAPKs や p38 を亢進することを報告した. このように, 糖尿病疾患対策として運動療法は盛んに取り入れられているが, 合併症の筋萎縮に対する筋量維持を目的としたレジスタンス運動が骨格筋へ及ぼす影響・効果については, 未解明な部分が多い.

第2章 研究目的及び研究課題

生体の各組織における細胞は、種々のストレス(物理的, 化学的, 代謝的)に対して適応する能力を持つことが知られている. 身体活動を担う運動器である骨格筋は, 多核細胞である筋線維によって構成され, 他の細胞と異なった形態的, 機能的特性を示す. その機能特性の一つに筋収縮によって誘発される様々なストレスに対して高い可塑性を有することがあげられる. 筋収縮は, メカニカル, 低酸素, 代謝ストレス等を含んだ複合的な刺激を誘発する運動ストレスである. 筋収縮による機械的刺激は, 一次的損傷である筋線維微細構造の崩壊を生じさせ, 細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することで筋線維の浮腫, 貪食細胞の浸潤などの炎症反応の過程で二次的損傷を引き起こすが, その後, 損傷した筋線維は再生される. 筋線維の損傷は, 筋線維全体に生じるものではなく, 線維の一部に起こるため, 筋線維の再生は部分的な修復と捉えることができる. 細胞死・細胞再構築に関する機能として, 遺伝子によってプログラムされた機構により自らを除去する「アポトーシス」が知られている. しかしながら, 骨格筋の損傷-再生過程において多核細胞である筋線維に対するアポトーシスの関与は未だ明らかにされていない. したがって, 本研究は, 運動ストレスにともなう筋損傷とその再生機構に着目し, 特にその過程で生じるアポトーシスの発生とその機序について明らかにすることを目的とした.

研究課題 1 運動誘発性筋損傷モデルの確立

ラットの骨格筋を対象に小動物運動装置を用いて運動を負荷し, 収縮回数が損傷程度に与える影響を検討する (実験 1). さらに, 収縮負荷による損傷部位を組織学により検証し (実験 2), ラットを対象とした運動誘発性筋損傷モデルを確立する.

研究課題 2 骨格筋損傷モデルにおけるアポトーシス応答の検証

オス・メスラット骨格筋を対象にエキセントリック収縮による筋損傷を誘発させ、損傷過程のアポトーシス発生における性差について比較・検討をおこなう（実験 3）。また、損傷－再生過程における筋細胞、および内皮細胞のアポトーシス応答を組織・生化学的手法を用いて検討することで、多核細胞である筋線維におけるアポトーシス発生の生理学的意義について明らかにする（実験 4）。

研究課題 3 低酸素環境下におけるエキセントリック収縮による

アポトーシス応答

ラットの骨格筋を対象に血流制限による細胞内低酸素誘導モデルを作成し、低酸素環境下におけるエキセントリック収縮との同時負荷が筋細胞アポトーシス応答および細胞内情報伝達経路に及ぼす影響について検討する（実験 5）。

研究課題 4 糖尿病骨格筋におけるアポトーシス応答

糖尿病は、糖代謝における恒常性破綻を招くと同時に骨格筋萎縮の合併症を引き起こす。これらの対策として筋量の維持、すなわち筋肥大を促す運動療法が推奨されているが、筋収縮による細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答（再生・治癒・肥大）が正常状態であることは考えにくい。したがって、薬理的投与による1型糖尿病モデルを作成し、エキセントリック収縮誘発性筋損傷におけるアポトーシス応答を検証することで細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答について明らかにする（実験 6）。

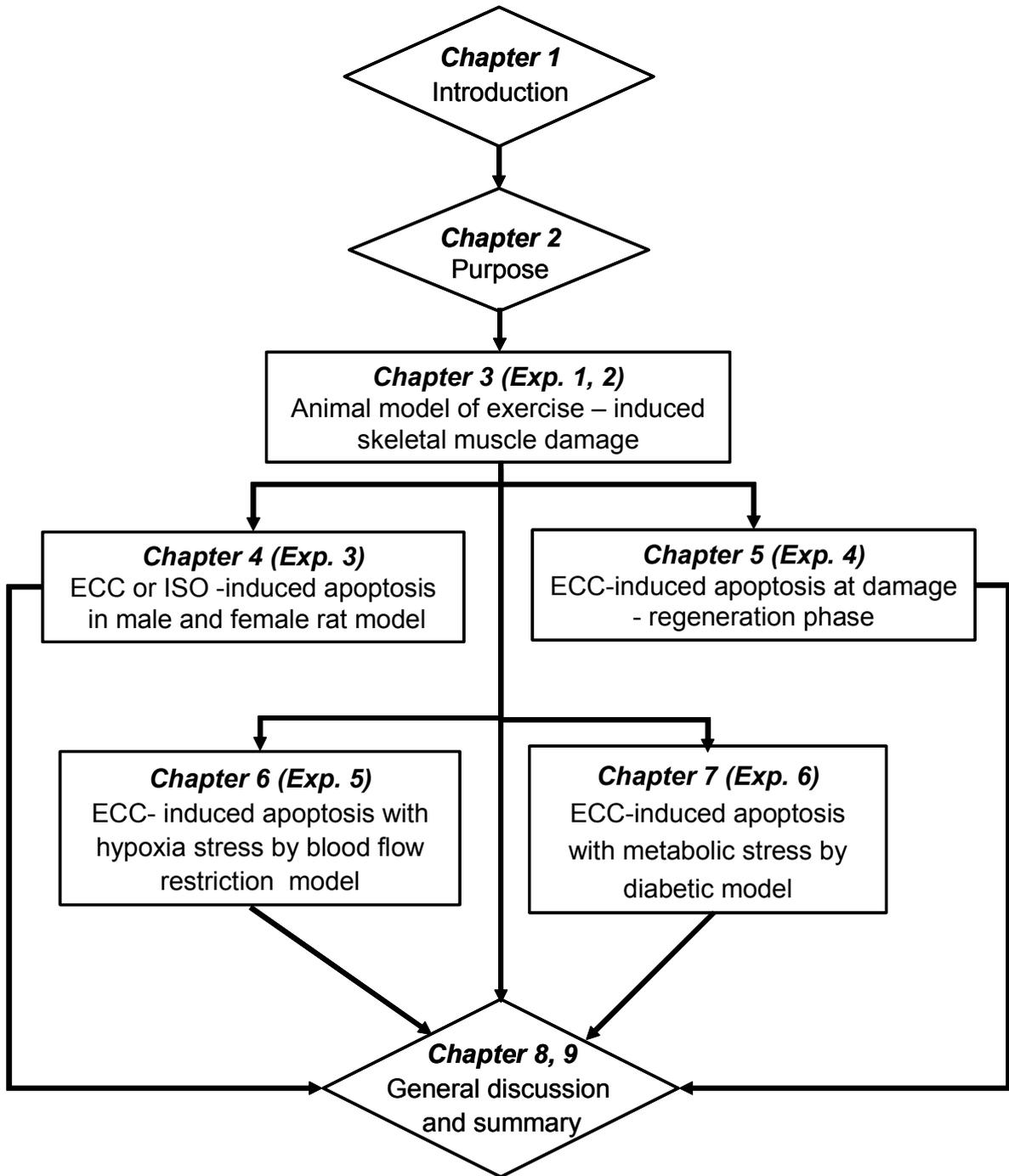


Fig. 6 Organization of thesis

第3章 運動誘発性筋損傷モデルの確立

3.1. 収縮回数と損傷割合の関係 (実験 1)

3.1.1. 背景と目的

筋の収縮様式は、アイソメトリック(等尺性)、コンセントリック(短縮性)、エキセントリック(伸張性)に分類され、身体動作の多くには、これら 3 つの活動様式が全て含まれている。エキセントリック (ECC) 収縮は、アイソメトリック (ISO) 収縮などの他の収縮様式よりも、張力発揮が高く、物理的ストレスが大きい (Enoka, 1996)。ECC 収縮は、物理的ストレスにより筋節 (サルコメア) レベルにおける Z 膜の配列の乱れなどの筋原線維の微細構造の崩壊を引き起こす。さらに、伸張による細胞膜の崩壊、機械受容チャネル (stretch-activated channel: SAC) の開孔を誘発し、 Ca^{2+} が筋細胞内へ流入することで Ca^{2+} 濃度上昇によるタンパク質分解酵素 (i.e. カルパイン) の活性を惹起する。その結果、浮腫および貪食細胞における浸潤などの筋損傷を引き起こすことが報告されている (Lieber *et al.*, 1991; Proske & Morgan, 2001; Clarkson & Hubal, 2002)。ECC 収縮負荷により筋損傷が誘発される要因としては、収縮頻度、速度、回数、強度などにおける収縮条件との関与が指摘されている。これまでの先行研究では、筋損傷の程度は筋長に依存しており、筋がより引き伸ばされた状態で伸張性負荷がかかると、筋損傷の程度も激しくなることが報告されている (Nosaka *et al.*, 2001)。また、伸張性筋活動の回数に依存し、回数が多くなると運動直後の筋力低下も大きくなり、筋損傷程度も増加する (Nosaka & Newton, 2002)。Sonobe ら (2008) は、*in vivo* モデルにおける ECC 収縮回数と Ca^{2+} の蓄積動態について報告した。その結果、ECC 収縮負荷における回数が増すごとに、筋細胞内での SAC 由来

の Ca^{2+} 濃度が上昇することを示した. すなわち, 筋損傷の程度は, 筋収縮負荷の回数増加による筋線維内における Ca^{2+} 濃度上昇が関与しているかもしれない. しかしながら, ECC 収縮回数と損傷割合の関連性について示した知見は少ない. したがって, 実験 1 は, ECC 収縮負荷による異なる収縮回数と損傷割合の関係を明らかにすることを目的とした.

3.1.2. 方法

3.1.2.1. 実験動物

本実験は, 13 週齢の Wistar 系オスラット (体重: 285 ± 17 g, $n = 40$, : 日本 SLC) を用いた. すべてのラットは, 室温 22 ± 2 °C, 湿度 $55 \pm 10\%$ で 12 時間の明暗サイクルに管理されている飼育室において 1 つのケージに 3 ~ 4 匹ずつ飼育した. 餌と水は, それぞれ自由摂取させた. 本研究は電気通信大学動物実験委員会の承認を得たものであり, 全ての実験処置は本学動物実験指針に則って行われた.

3.1.2.2. ECC 収縮負荷プロトコル

ラットは, ペントバルビタナールナトリウム (70 mg / kg, i.p.: 大日本製薬) の腹腔内投与による麻酔下にて, 小動物運動負荷装置 (RU-72 形 : NEC メディカルシステムズ) に固定した (Fig. 7-a) . 電気刺激装置 (3F46 : NEC 三栄) を使用し, 右後肢前脛骨 (tibialis anterior : TA) 部皮膚上から表面電極 (ビトロード, A-50 : 日本光電) を用いて電気刺激 (パルス幅 : 4.0 msec, 頻度 : 100 Hz, 刺激時間 : 0.7 sec, 電圧 : ~ 10 V, Fig. 8) により右後肢 TA 筋を最大強縮させ, 刺激開始から 0.2

秒後に足関節を 120 degree 伸展させる ECC 収縮を 3 秒毎に負荷し, 1~100 回の収縮をそれぞれ施した (Fig. 7-b) . ラットは, 7 つのグループ (n = 4 - 7, each group) に ECC 収縮における回数ごとに分類した; ECC 1 (n = 6), ECC 5 (n = 6), ECC 10 (n = 7), ECC 20 (n = 7), ECC 30 (n = 4), ECC 40 (n = 4), ECC 100 (n = 6). 対照は, 収縮を負荷させない左脚とし, 除毛後に運動装置に設置して擬似的な処理を行った.

3.1.2.3. 組織学的評価

ECC 負荷 3 日後, 麻酔下において両脚の TA 筋を摘出し, 筋腹部 (中央部) を長方向に対して垂直に切り採取した. 凍結組織包埋剤 (Tissue-Tek. O.C.T.コンパウンド, 4583 : SAKURA) を用いて, 液体窒素により冷却したイソペンタンにて凍結包埋を施した. 凍結サンプルは, クリオスタット (CM1510 : LEICA) によって -20°C 下で 10 μm の横断薄切標本としてシリコンコーティングスライドガラス (s-9441 : MATSUNAMI) に接着した. 筋損傷の評価のために, 組織切片は, ヘマトキシリン-エオジン (H&E) 重染色を施した. これらは, マウント剤 (大道産業) により封入し, 光学顕微鏡 (ECLIPSE : E800NIKON) を用いて観察を行った.

3.1.2.4. 評価・分析

組織切片は, 重複が無いように異なる 3 箇所 (表層, 中央, 深層; 総解析面積 = 2.13 mm^2) を撮影し解析を行った. 筋損傷の割合は, 取得した筋組織画像に 24 \times 33 マス (総格子数 792 マス; 1 マス 30 μm^2) の格子を合成し, ポイントカウンティング法 (Fig. 9) により定量した. 損傷筋は, 炎症による浸潤細胞, 細胞質が蒼白に染

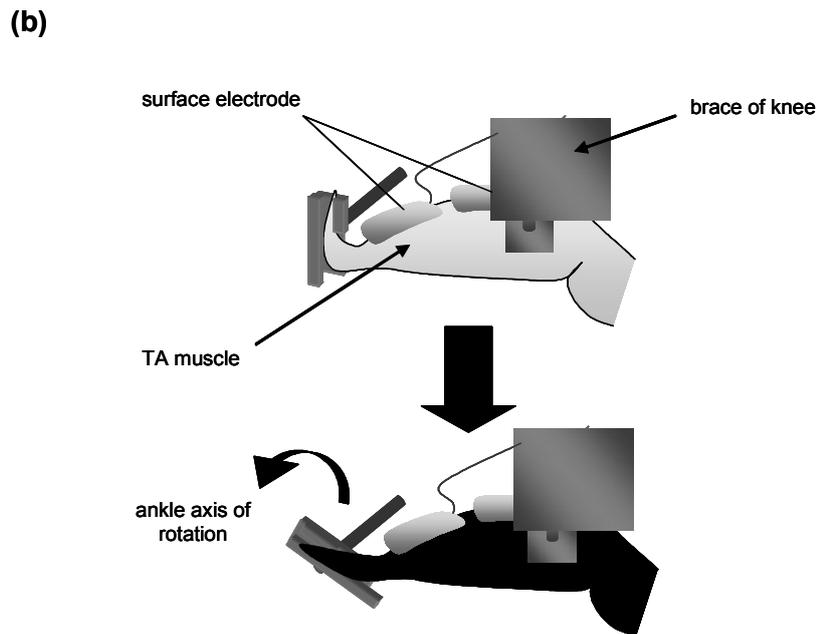
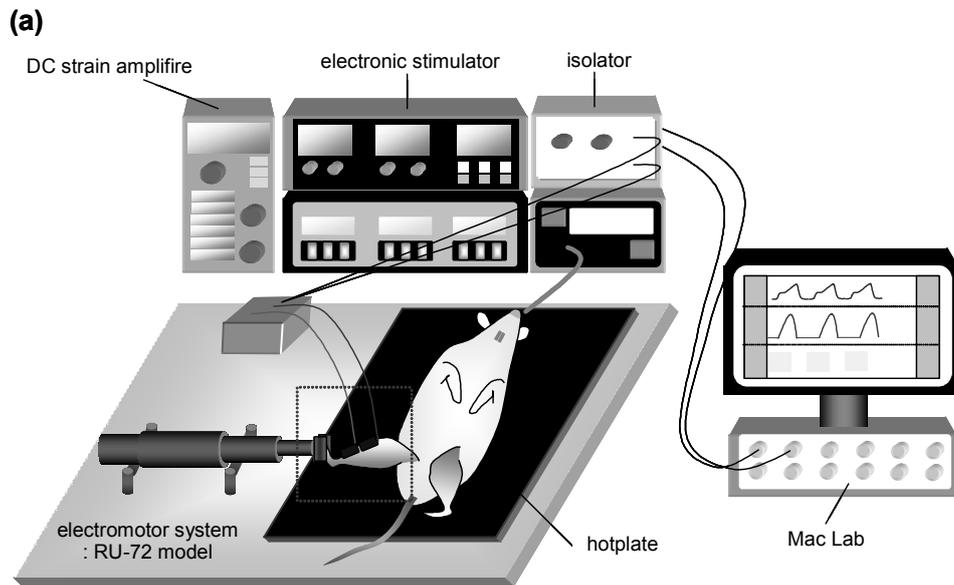


Fig. 7 An anaesthetized rat is put in a dorsal position on hot plate (a), and a knee and an ankle joint are fixed (b). Muscle contraction is induced through surface electrode on skin after epilation. Joint motion is performed by motor by an electric control. Torque is recorded with strain gauge incorporated in motor part.

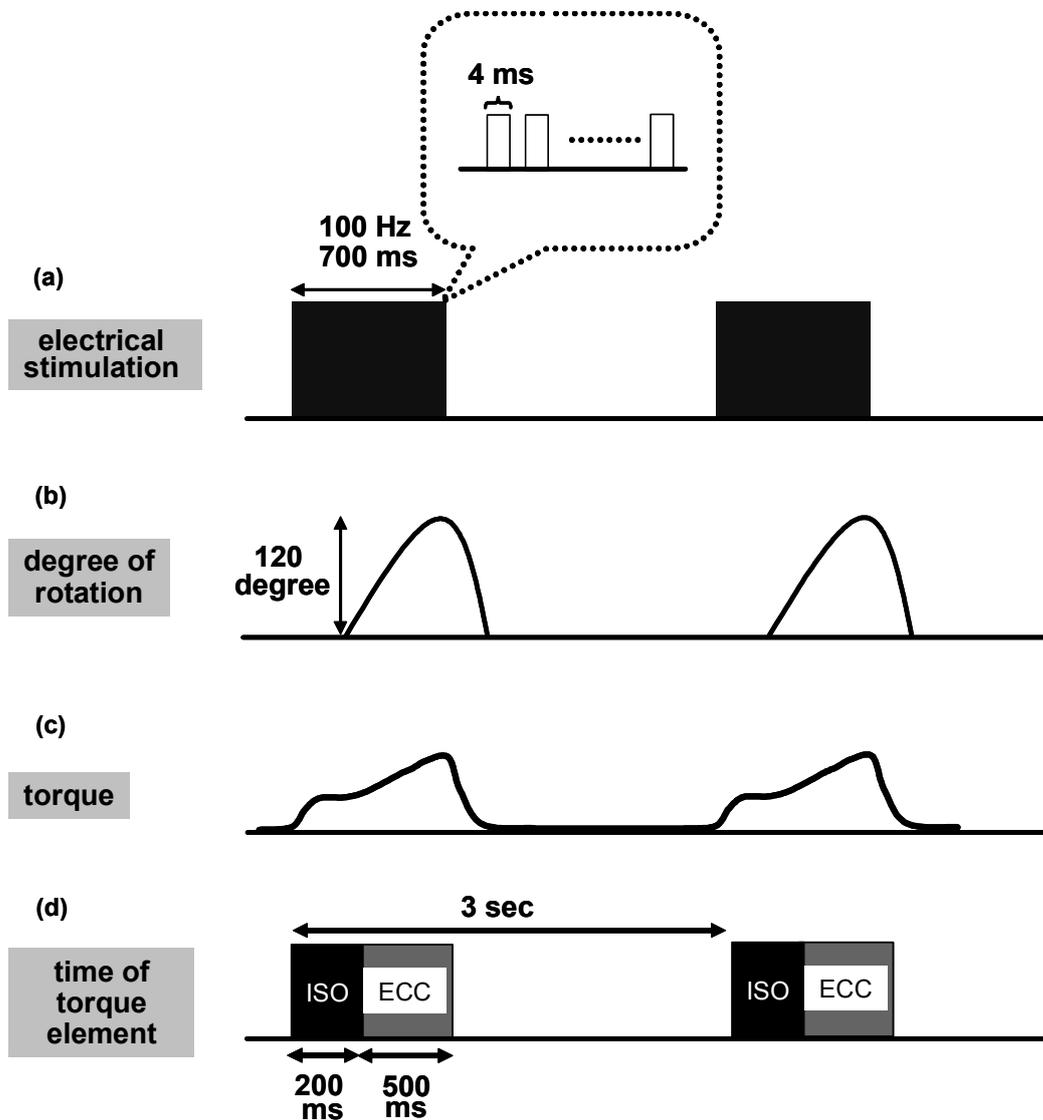
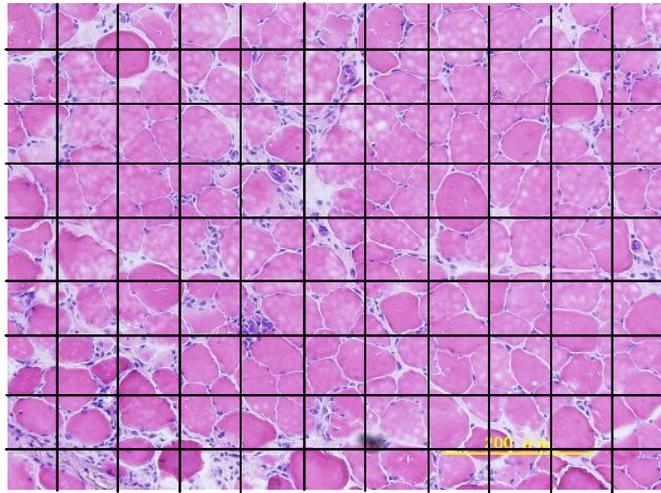


Fig. 8 Experimental protocol of eccentric contraction with electrode stimulation. (a) electrical stimulation; 100 Hz frequency, 700 ms stimulation period i.e. 70 pulses. (b) degree of rotation; 120 degree, (c) torque by ECC contractions, (d) ISO and ECC torque elements contraction times (ISO; 200 ms, ECC; 500 ms).

(a)



(b)

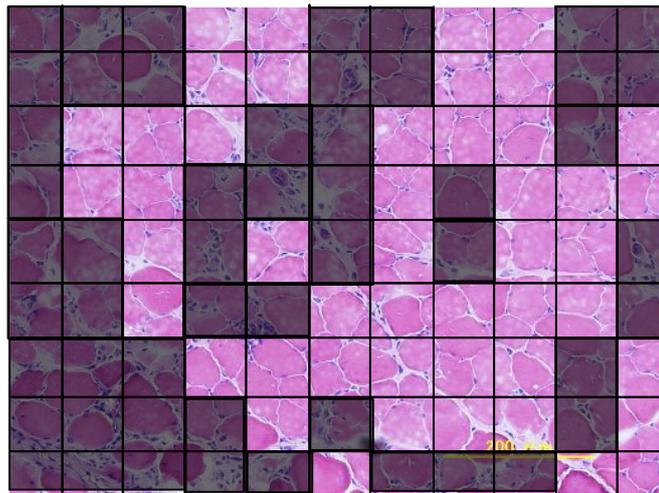


Fig. 9 (a) The damage area at 3 days after ECC contractions. (b) Black grid areas are damage areas in TA muscle.

色された細胞, 細胞の浮腫, 複数の中心核を有する細胞と定義し, 分析を行った. 筋損傷は, 全格子数に対する損傷発生格子の割合で評価した.

3.1.2.5. 統計処理

本実験における統計量は, 平均値 \pm 標準偏差 (SD) として示した. 群間比較には, 一元配置の分散分析とボンフェローニによる多重比較を用いた. なお, 5%未満の危険率を有意水準とした.

3.1.3. 結果

ECC 収縮負荷の筋組織では, 単球細胞の浸潤, および細胞の浮腫などの炎症反応が観察された (Fig. 10). 無負荷の対照脚の筋組織においては, 炎症応答は観察されなかった.

ECC 1, ECC 5, ECC 10 における TA 筋の損傷程度は, $3.9 \pm 1.4\%$ 以下であった. その一方, ECC 20 ($49.1 \pm 6.8\%$), ECC 30 ($60.6 \pm 3.6\%$), ECC 40 ($53.7 \pm 15.6\%$), ECC 100 ($65.7 \pm 6.1\%$) においては, 筋損傷の特徴である浮腫, 貪食細胞の浸潤などが広範囲で観察された (Fig. 11). ECC 20 は, ECC 10 と比較して, 筋損傷は有意な増加 ($p < 0.05$) を示すことが明らかとなった. また, ECC 20, ECC 30, ECC 40, ECC 100 の群間における損傷割合において有意差はみられなかった.

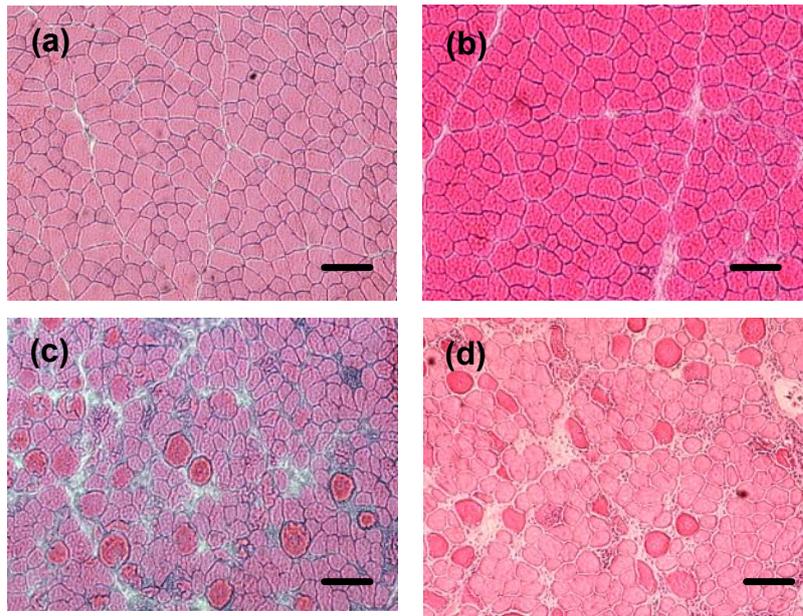


Fig. 10 Light micrographs of cross-section TA muscle for control (a), ECC 10 (b), ECC 20 (c), and ECC 100 (d). Bar = 100 μ m.

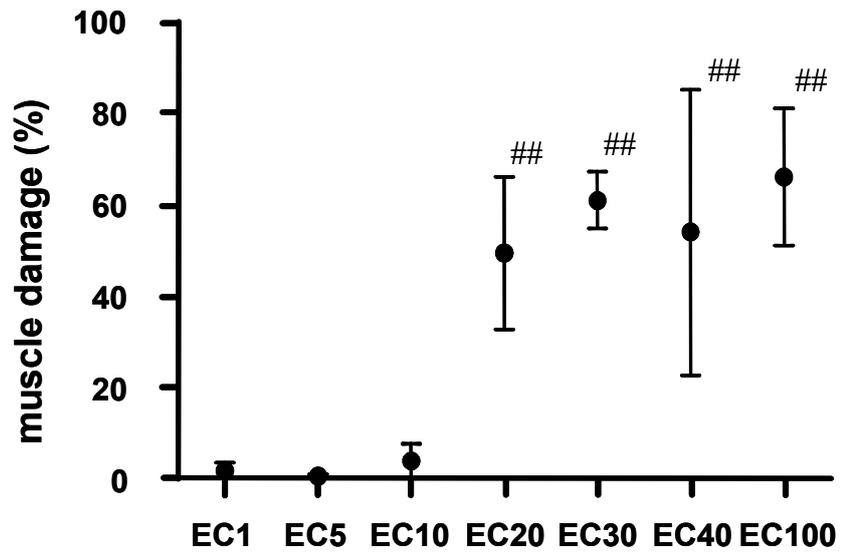


Fig. 11 Percentage of the damaged TA muscle fiber area by ECC. Results are expressed as means +/- SD. ## $p < 0.01$ vs. ECC 10.

3.1.4. 考察

これまでの先行研究から、ECC 収縮は ISO 収縮などの他の収縮様式と比較して、著しい筋損傷を誘発することが知られている。筋線維における炎症応答の主要因は、筋線維内の Ca^{2+} 濃度が上昇することに起因すると指摘されている (Gissel & Clausen, 2001; Allen *et al.*, 2005)。Sonobeら (2008) は、*in vivo*モデルにおいて、ISO 収縮負荷では Ca^{2+} の蓄積が少ないが、対照的に ECC 収縮負荷後の筋線維内の Ca^{2+} 濃度は収縮回数に依存して上昇することを示した。すなわち、ECC 収縮の回数に依存して損傷程度が増加する要因には、 Ca^{2+} の蓄積が関与しているかもしれない。ECC 収縮は筋節における過伸展を誘発する (Lieber *et al.*, 1991; Friden & Lieber, 1998; Clarkson & Sayers, 1999; Proske & Morgan, 2001; Allen *et al.*, 2005)。筋節における過伸展とは、伸張と収縮を繰り返すことで、筋節長が静止状態よりも延長した状態を指す。収縮を繰り返すことで過伸展の程度が上がる可能性がある。そのため、細胞膜表面に局在する SAC の開孔率が高くなる可能性が考えられる。SAC の開孔率が高くなることは、細胞外からの Ca^{2+} の流入が亢進され、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇に寄与する。すなわち、ECC 収縮を繰り返すことで、細胞内 Ca^{2+} 濃度は漸増的に変化し、タンパク質分解酵素であるカルパインの活性が促される (Armstrong, 1984; Clarkson & Sayers, 1999; Proske & Morgan, 2001; Smith & Dodd, 2007; Warren *et al.*, 2007)。しかしながら、本実験の結果では収縮回数 10 回と 20 回の間には損傷程度の有意な差異がみられたことから、筋損傷に対する閾値の存在が示唆された。すなわち、細胞内 Ca^{2+} 濃度、もしくは、カルパイン活性値における損傷閾値が存在するかもしれない。

3.2. 筋損傷の発生部位 (実験 2)

3.2.1. 背景と目的

運動誘発性筋損傷は、筋線維における微細構造の崩壊、筋線維の浮腫、貪食細胞の浸潤などの炎症を引き起こす (Friden & Lieber, 1992; Takekura *et al.*, 2001; Pizza *et al.*, 2002; Kano *et al.*, 2004) . 筋線維の損傷は、筋線維全体に生じるものではなく、筋線維の一部に起こるため、筋線維の再生は部分的な修復と捉えることができる. 筋収縮による損傷は、いくつかの報告によると筋-腱接合部周辺の筋線維において炎症を誘発しやすいことが示唆されている (Lehto & Jarvinen, 1991; Kirkendall & Garrett, 2002) . 一方では、*in vivo* モデルにおける筋損傷は、中央部において著しく引き起こされるという報告もある (Pizza *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2007) . さらに、Lovering ら (2009) は、TA 筋における筋収縮負荷により、中央部から遠位部にかけて筋損傷が発生することを指摘している. このように、これまでの先行研究では、筋収縮により誘発された筋損傷の局在についての知見は一致していない.

筋線維は、1 個の運動ニューロンとそれにより神経支配を受けている運動単位毎に張力を発揮する. 損傷部位における知見が一致しない理由として、運動負荷に依存した運動単位の動員パターンに違いが生じ、これにより筋損傷における発生部位の相違が起こると考えられる. 例えば、随意収縮と電気刺激による収縮では、筋線維における動員パターンが異なる. さらに、神経刺激と直接的な筋への電気刺激では動員パターンが異なるかもしれない. そこで、本実験の運動モデルにおける筋損傷の部位的な特徴を明らかにする必要がある. したがって、実験 2 では、ECC 収縮を負荷したラット TA 筋の筋全体における筋損傷の局在を明らかにすることを目的とした.

3.2.2 方法

3.2.2.1. 実験動物

本実験は, 13 週齢の Wistar 系オスラット (体重: 237 +/- 1 g, N = 20 : 日本 SLC) を用いた. 飼育方法は実験 1 と同様とした.

3.2.2.2. ECC 収縮プロトコル

ECC 収縮負荷は, 実験 1 と同様のプロトコルで行った. 実験 2 では, 実験 1 の結果を受けて ECC 収縮回数を 40 回に設定し負荷を施した. 対照は, 収縮を負荷させない左脚とし, 除毛後に運動装置に設置して擬似的な処理を行った.

3.2.2.3. 組織学的評価

ECC 負荷 3 日後, 麻酔下において両脚の TA 筋を近位部 (20%), 中央部 (50%), 遠位部 (80%) に分割し, 各部位を長軸方向に対して垂直に切り取った (Fig. 12-a). 採取した筋サンプルは, 実験 1 と同様に凍結包埋後, H&E 染色を施した.

3.2.2.4. 評価・分析

組織切片は, 各部位において重複が無いように異なる 5 箇所: anterior (P1), medial (P2), center (P3), lateral (P4), posterior (P5) を撮影し解析を行った (総

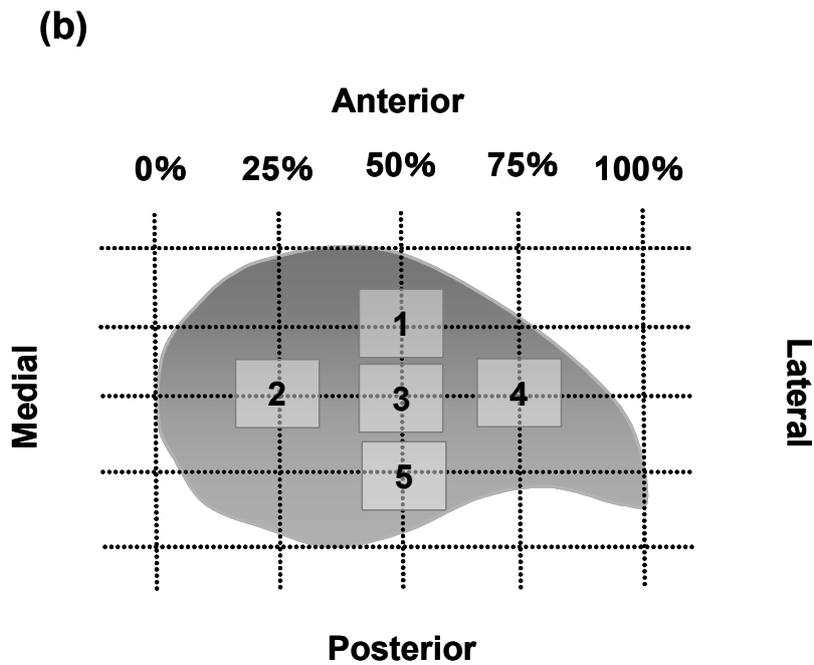
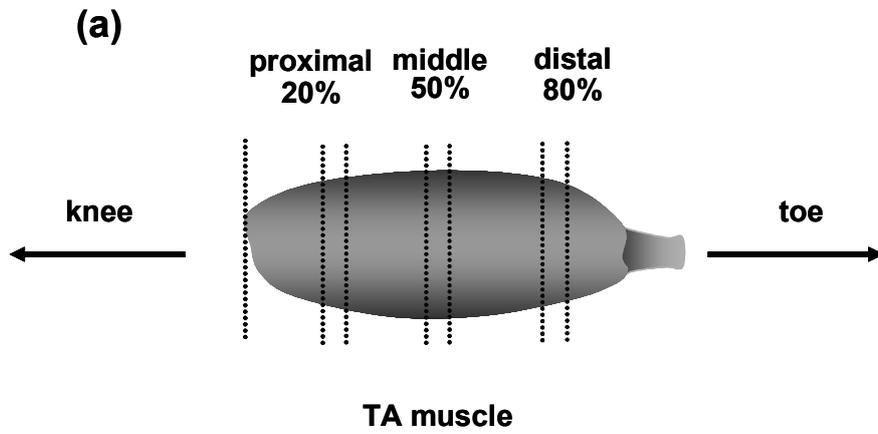


Fig. 12 Schematic drawing of the rat TA muscle showing the zones sampled for this study. (a) longitudinal analysis positions. (b) cross-section analysis position.

解析面積範囲 = 3.55 mm², Fig. 12-b) .

筋損傷は、取得した筋組織画像に 30 × 40 マス (総格子数 1200 マス; 1 マス 18 × 18 μm) の格子を合成し、ポイントカウンティング法により定量した。損傷筋は、実験 1 にて定義した条件のもと評価された。また、損傷率の解析は実験 1 のプロトコルと同様に行った。

3.2.2.5 統計処理

実験 2 における統計量は、平均値 +/- 標準誤差 (SE) として示した。群間比較には、一元配置の分散分析とシェッフェによる多重比較を用いた。なお、5%未満の危険率を有意水準とした。

3.2.3 結果

3.2.3.1. 長軸方向における筋損傷の発生割合

ECC 収縮 3 日後の筋組織では、単球細胞の浸潤、および細胞の浮腫などの著しい炎症応答が観察された。無負荷の対照脚においては、炎症応答は観察されなかった (Fig. 13)。長軸方向に対する部位別の炎症応答は、近位、中央、遠位部の全てにおいて炎症応答が観察された。損傷割合は、近位部: 22.0 +/- 3.8%, 中央部: 26.4 +/- 3.9%, 遠位部: 17.7 +/- 5.2% であり、統計学的に有意な差異は認められなかった (Fig. 14)。

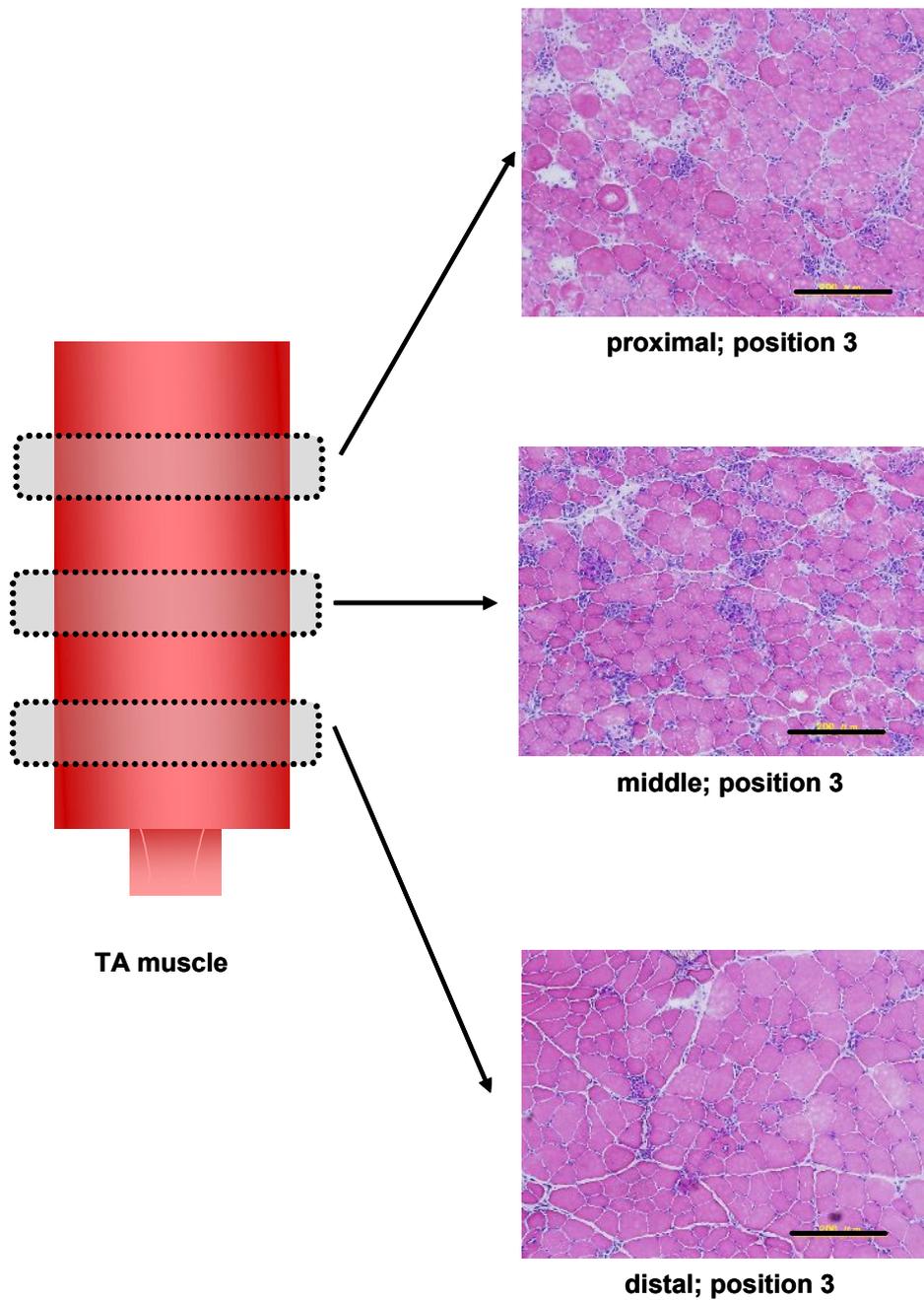


Fig. 13 Histological damage to myofibers after ECC. The micrographs shows cross-sections stained with H&E from each position of an injured TA muscle. Bar = 200 μm .

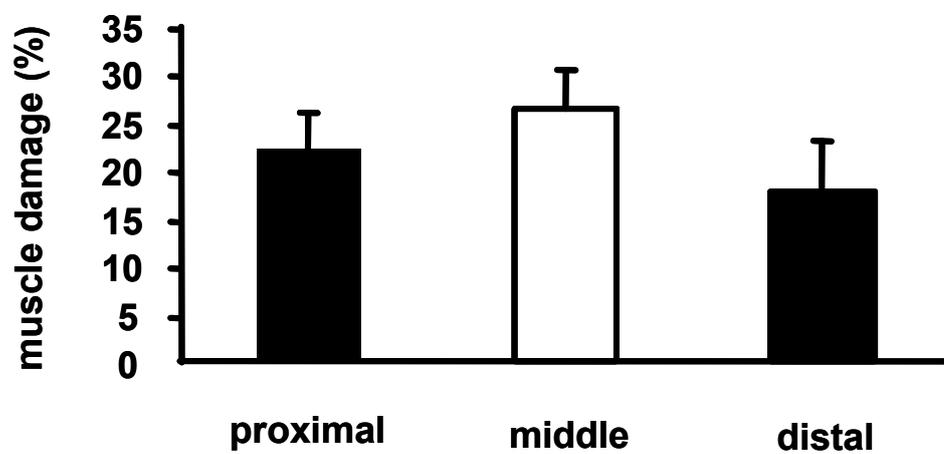


Fig. 14 The numbers of inflammation myofibers were quantified at proximal, middle and distal position. The data are mean \pm SE.

3.2.3.2. 筋損傷における横断的損傷割合

筋組織の横断面における各部位の筋損傷率は、表層部 (P1) と比較すると内側 (P2), 中央部 (P3), 外側 (P4), 深層部 (P5) で有意に高い値を示した ($p < 0.05$, Fig. 15). 近位, 中央, 遠位部における各 P1 ~ P5 の損傷割合を比較すると, すべての部位において P5 で最大であった. また, 近位部においては, P1 における損傷割合が他の部位よりも高い傾向を示した (Fig. 16) .

3.2.4. 考察

ラット TA 筋において ECC 収縮により近位, 中央, 遠位部での筋損傷の発生に差異は認められなかった. しかしながら, Lovering ら (2009) は, 筋収縮負荷後 2 時間, 24 時間, 7 日のラット TA 筋を部位別 (近位, 中央, 遠位部) に磁気共鳴画像法 (MRI) により損傷の評価を行ったところ, 収縮負荷後 2 時間, および 24 時間の TA 筋において中央部から遠位部にかけて炎症応答が観察された. さらに, エバンスブルー (EBD: evans blue dye) 陽性細胞 (細胞膜の損傷により血清アルブミンと結合した EBD が筋細胞の外から内へ流入し筋細胞内が染色された細胞) による評価 (Lovering & De Deyne, 2004; Lovering *et al.*, 2007) の結果, TA 筋の中央部では他の部位と比較して有意な増加を示した. したがって, Lovering ら (2009) は TA 筋に対する筋収縮が中央部において近位, 遠位部よりも炎症反応を誘発することを示唆している. 本実験の知見と一致しなかったその要因としては, 筋収縮負荷のプロトコルが異なることがあげられる. 収縮における足関節の伸展範囲が本実験のプロトコル (120 degree) よりも Lovering ら (2009) のプロトコルでは小さい (80 degree) . 運動誘発性筋損傷の条件には, 回数, 角度, 強度, 速度などの様々な要因が関与して

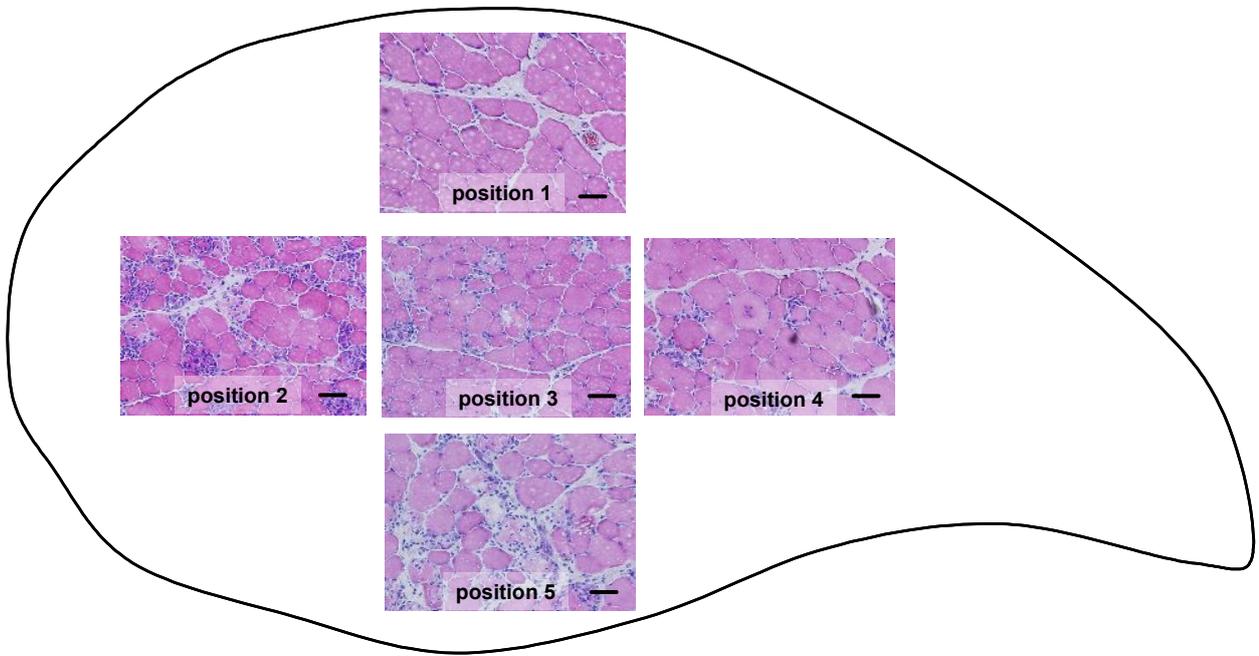


Fig. 15 The scheme shows the region which evaluated muscle damage on cross - section. Bar = 50 µm.

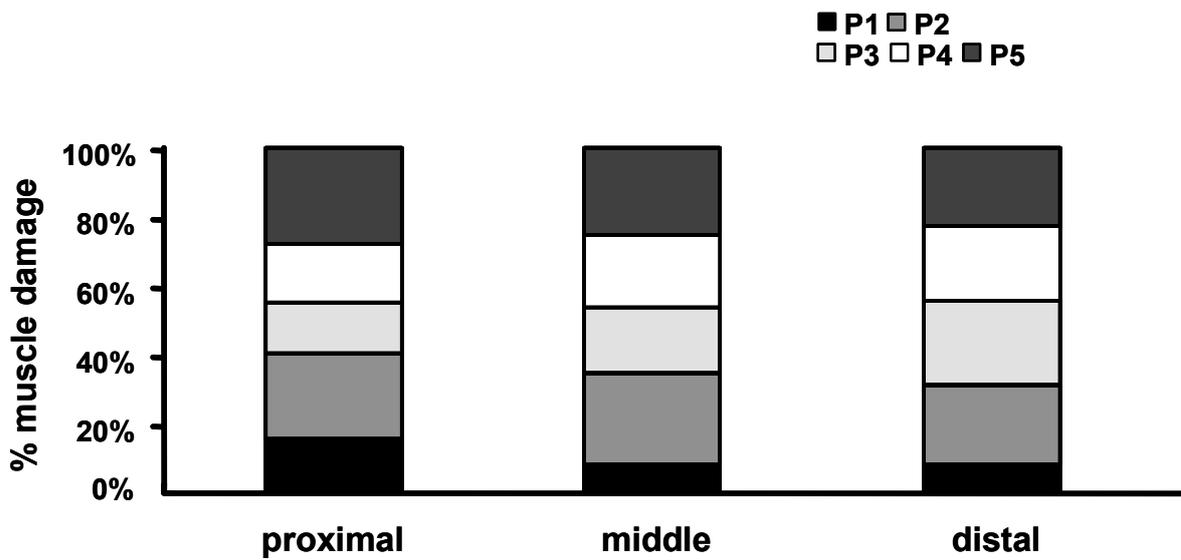


Fig. 16 Stacked bar diagrams showing the percentage of muscle damage in each muscle field (P1-P5) at (proximal, middle and distal position).

いることが指摘されている (Nosaka & Newton, 2002) ことから, 伸展範囲の違いは炎症反応の発生部位にも影響を及ぼすことが考えられる.

TA 筋の近位, 中央, 遠位部における筋線維タイプは主に速筋線維であるが, 脛骨に近い深層部 (P3, P5) では遅筋線維の占める割合が高い (Torrella *et al.*, 2000). 本実験における ECC 収縮による横断的な部位別評価では, 近位, 中央, 遠位部の全てで P2 ~ P5, すなわち表層を除く部位において顕著な炎症細胞が観察された. 筋線維タイプと運動誘発性筋損傷の関連性は明らかではないが, 本実験モデルにおける筋線維動員パターンが関与しているかもしれない.

3.3. 要約 (実験 1, 2)

本実験では, ラットの後肢骨格筋を対象として, 筋収縮の回数が筋損傷に及ぼす影響, さらに, 筋損傷における局在について形態学的に定量し検証を行った. その結果, 以下の知見を得た.

- ① ECC 1, ECC 5, ECC 10 における TA 筋の損傷程度 $3.9 \pm 1.4\%$ 以下であった (Fig. 11).
- ② ECC 20 ($49.1 \pm 6.8\%$), ECC 30 ($60.6 \pm 3.6\%$), ECC 40 ($53.7 \pm 15.6\%$), ECC 100 ($65.7 \pm 6.1\%$) においては, 筋組織における炎症・損傷が観察され, 著しい損傷割合を示した (Fig. 11).
- ③ ECC 収縮 40 回による筋損傷は, TA 筋における近位部 ($22.0 \pm 3.8\%$), 中央部 ($26.4 \pm 3.9\%$), 遠位部 ($17.7 \pm 5.2\%$) では有意な差はなかった (Fig. 14).

- ④ 筋横断面における筋損傷局在は、中央部から深層部において著しい炎症反応が観察されたが、表層では損傷の発生割合は低かった (Fig. 16).

ECC収縮は20回以上の負荷により運動誘発性筋損傷を誘導し、10回以下では損傷が発生しないことが明らかとなった。したがって、ECC収縮による筋損傷には、収縮回数に対して閾値が存在することが示唆された。また、TA筋におけるECC収縮負荷は、近位部、中央部、遠位部では一様な損傷を誘導することが示された。

第4章 オス・メスラット骨格筋における収縮負荷による

アポトーシス応答 (実験3)

4.1. 背景と目的

ECC 収縮をともなう運動後の骨格筋において損傷が発生することが知られている (Proske & Morgan, 2001; Clarkson & Hubal, 2002; Kano *et al.*, 2004; Kano *et al.*, 2008). この運動誘発性筋損傷は筋線維微細構造の崩壊を生じることに加えて, 筋線維の浮腫や炎症をともなった筋細胞壊死を引き起こすことが明らかにされている (Armstrong, 1984; Clarkson & Sayers, 1999; Stupka *et al.*, 2001). 細胞死は, 形態学的な発生過程に着目すると, ネクロシスの他にアポトーシスと呼ばれる DNA 断片化をともなう細胞死形態が存在する. 近年, 運動誘発性の筋損傷形態に関して, 多くの研究によって骨格筋のアポトーシス発生について報告されている (Sandri *et al.*, 1997; Podhorska-Okolow *et al.*, 1998; Podhorska-Okolow *et al.*, 1999; Arslan *et al.*, 2002; Boffi *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2004; Podhorska-Okolow *et al.*, 2004).

筋収縮後の骨格筋損傷程度は収縮様式やその強度によって異なり, 特に ECC 収縮においては ISO 収縮などの他の収縮様式と比較して損傷程度は顕著である (Armstrong *et al.*, 1983; Friden, 1984; Friden & Lieber, 1998). これまでの先行研究では, 運動誘発性アポトーシスは一過性の持久性運動負荷を対象としたものが多い (Sandri *et al.*, 1997; Podhorska-Okolow *et al.*, 1998; Podhorska-Okolow *et al.*, 1999; Arslan *et al.*, 2002; Boffi *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2004; Podhorska-Okolow *et al.*, 2004). 収縮様式と運動誘発性アポトーシスの関係を調べた報告は少なく (Biral *et al.*, 2000), 収縮様式の違いと筋損傷の形態については

明らかにされていない。

また、運動による筋損傷は、男性と比較して女性において抑制される (Clarkson & Hubal, 2002) と指摘されている。Komulaine ら (1999) は、ラットのダウンヒルランニング後に筋損傷程度がオスよりメスにおいて低いことを示しており、その要因として、メスの生体内におけるエストロゲン発現を示唆している。エストロゲンは、成長、遺伝子発現、代謝、収縮特性、筋量の維持に関与している (Tiidus, 2005; Tiidus *et al.*, 2005a; Tiidus *et al.*, 2005b)。すなわち、エストロゲンは、細胞膜、細胞質、核への作用 (Nadal *et al.*, 2001a; Nadal *et al.*, 2001b)、もしくは、抗酸化作用 (Moosmann & Behl, 1999) などの機能により細胞に対する保護効果を有すると指摘されている。

性差とアポトーシスについては、Stupka ら (2001) が運動後の骨格筋において、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 を定量したところ性差が生じることを報告した。また、ヒトの脚を対象とした ECC 収縮負荷後では、クレアチンキナーゼレベルの違いより女性と比較して男性において激しい筋損傷が発生したが、24 時間後において、アポトーシスの特徴である断片化 DNA の含有量は男女とも低い値であった。しかしながら、負荷 6 時間後の Bax / Bcl-2 ratio は女性のみ有意な低下を示したことが報告されている (Kerksick *et al.*, 2008)。すなわち、骨格筋におけるアポトーシス応答に関するこれまでの知見では、制御機構の変動に対して発生過程では矛盾点があるため、アポトーシスの発生における性差を明らかにするためにメカニズムの解明が必要である。

以上のことより実験 3 では、1) ECC 収縮および ISO 収縮後の骨格筋において異なるアポトーシス応答が生じる、2) そのアポトーシス応答には性差がみられるという仮説を立て、ラットを対象とした運動誘発性筋損傷モデル (実験 1, 2) を用いて検証した。

4.2. 方法

4.2.1. 実験動物および筋収縮プロトコル

本実験には、13 週齢の Wistar 系ラット（体重 オス: 283 +/- 24 g, メス: 166 +/- 7 g, N = 23: 日本 SLC）を用いた。ラットの飼育方法は、実験 1 と同様のプロトコルをした。また、ISO 収縮は、実験 1 における ECC 収縮の電気刺激条件のみ（伸展範囲 0 degree）を負荷するプロトコルとした。ECC 収縮、および ISO 収縮の回数は、オス、メスともに 20 回に設定した。オス・メスともにコントロール群（CONT）と筋収縮負荷群に分類し、さらに ECC 収縮ならびに ISO 収縮負荷後、1 時間群（1H）、1 日群（1D）、3 日群（3D）、7 日群（7D）の 4 グループ（N = 4–6, each group）に分けた。

4.2.2. 分析項目

4.2.2.1. 発揮張力解析

筋収縮負荷時における発揮張力はひずみ計を介してコンピューター（Power Book. 1400c/133）と解析装置（Mac Lab/8s : AD Instruments Pty. Ltd.）にてモニターし、解析ソフト（chart 3.5.6/s : AD Instruments Pty. Ltd.）を用いて定量した。電気刺激による発揮張力は、記録された張力波形から最大値を解析し、mN・m に換算した後プロットした。解析対象は、ECC 収縮、および ISO 収縮における各 20 回の平均発揮張力とした。

4.2.2.2. 筋損傷における形態学的評価

筋収縮による筋損傷の評価は、実験1と同様のプロトコルにより、筋横断面における筋損傷割合の定量を行った。

4.2.2.3. TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling assay) アポトーシス発生の評価

アポトーシスの生化学的特徴は、DNAが二本鎖のままヌクレソーム単位 (180-200bpの整倍数)であり、3'-OH で切断されることである。本実験では、組織学的なアポトーシス評価として TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling 法 (TUNEL 法) による断片化 DNA 標識を施し定量を行った。

薄膜上にスライスした筋標本をパラフォルムアルデヒド溶液 (4%, pH 7.4) に室温にて 20 分間浸透させ組織固定後、リン酸塩緩衝溶液 (0.1M, pH7.2) にて洗浄し、過酸化水溶液 (0.3%) によるブロッキングを施した (30 min, RT)。TUNEL 法における DNA 断片化のビオチン標識は、検出キット (MEBSATIN Apoptosis Kit Direc, Co. 8445: MBL) のプロトコルにしたがって組織学的染色法により同定した。標識終了後、退色を防ぐために速やかに VECTASHIELD Mounting Medium (H-1000: VECTOR) を用いて標本を封入し、蛍光顕微鏡 (CKX41: OLYMPUS) を使用し TUNEL 法によるアポトーシス陽性核を観察した。

解析対象範囲は、観察部位が重複しないように 1 検体あたりオスは 9ヶ所、メスは 6ヶ所を無作為に決定した。筋標本は、写真撮影装置 (Penguin 600CL: PIXERA) にて20倍の蛍光画像を撮影し、画像解析ソフト (Instudio Application) を用いて画像をパソコンに取り込んだ。画像解析は、Photoshop Elements (Adobe) を用い、H&E 染色画像を照らし合わせながら、核の位置を確認した上でアポトーシス陽性核を定量した。アポトーシス陽性核数を単位面積 (mm²) あたりに換算し、各群間にお

いて比較検討を行った。

4.2.3. 統計処理

実験の統計量は、平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示した。個体間の ECC 群と ISO 群の比較ならびに性差の比較には二元配置の分散分析により行い、有意な p 値が得られたとき、Fisher PLSD 法によりグループ間の多重比較を行った。なお、5%未満の危険率を有意水準とした。

4.3. 結果

4.3.1. 発揮張力と筋横断面積

筋収縮負荷中の 20 回の発揮張力の絶対値は、オス、メスともに ISO 群より ECC 群が高値を示した (Fig. 17-a, 18-a)。また、ECC 群の平均発揮張力は、メス (58.9 ± 3.87 mN \cdot m) よりもオス (76.9 ± 4.4 mN \cdot m) において有意に高かった (Fig. 17-b, $p < 0.05$) が、単位面積当たりの張力 (オス: 2.08 ± 0.15 , メス: 2.39 ± 0.58 mN \cdot m / mm²) には有意な差異は観察されなかった (Fig. 17-c)。ISO 群においても、張力はメスよりオスにおいて高い傾向を示し (Fig. 18-b)、平均発揮張力は、オスでは有意に高かった (オス: 7.77 ± 0.96 , メス: 5.33 ± 0.66 mN \cdot m)。ISO 収縮における単位面積当たりの張力 (オス: 0.21 ± 0.02 , メス: 0.24 ± 0.05 mN \cdot m / mm²) では有意差はみられなかった (Fig. 18-c)。

筋収縮負荷 1 時間から 7 日後に摘出した TA 筋 (中央部位) の筋横断面積は、ECC 収縮ならびに ISO 収縮後のオス、メスにて経時的に有意な差異が認められなか

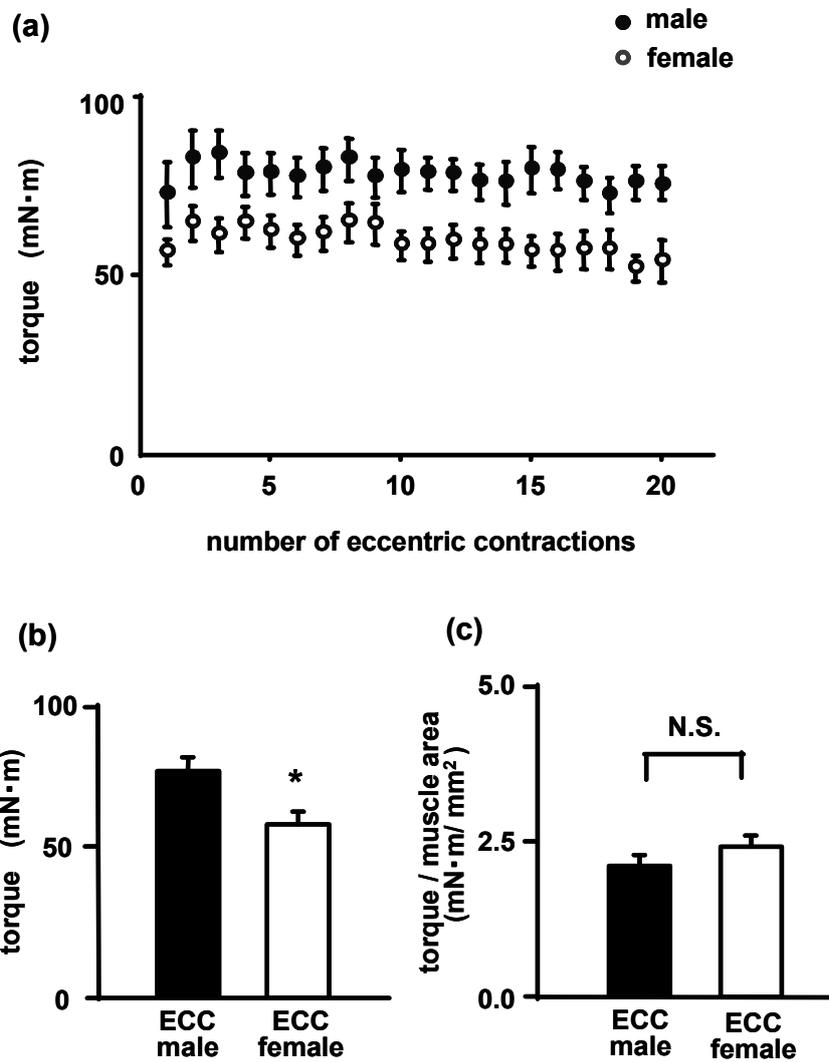


Fig. 17 An average value of 20 times of muscle contractions. (a) The peak torque of ECC in male and female. (b) absolute value, (c) value per cross-sectional area. Values are mean +/- SE. *p < 0.05, N.S.: no significant.

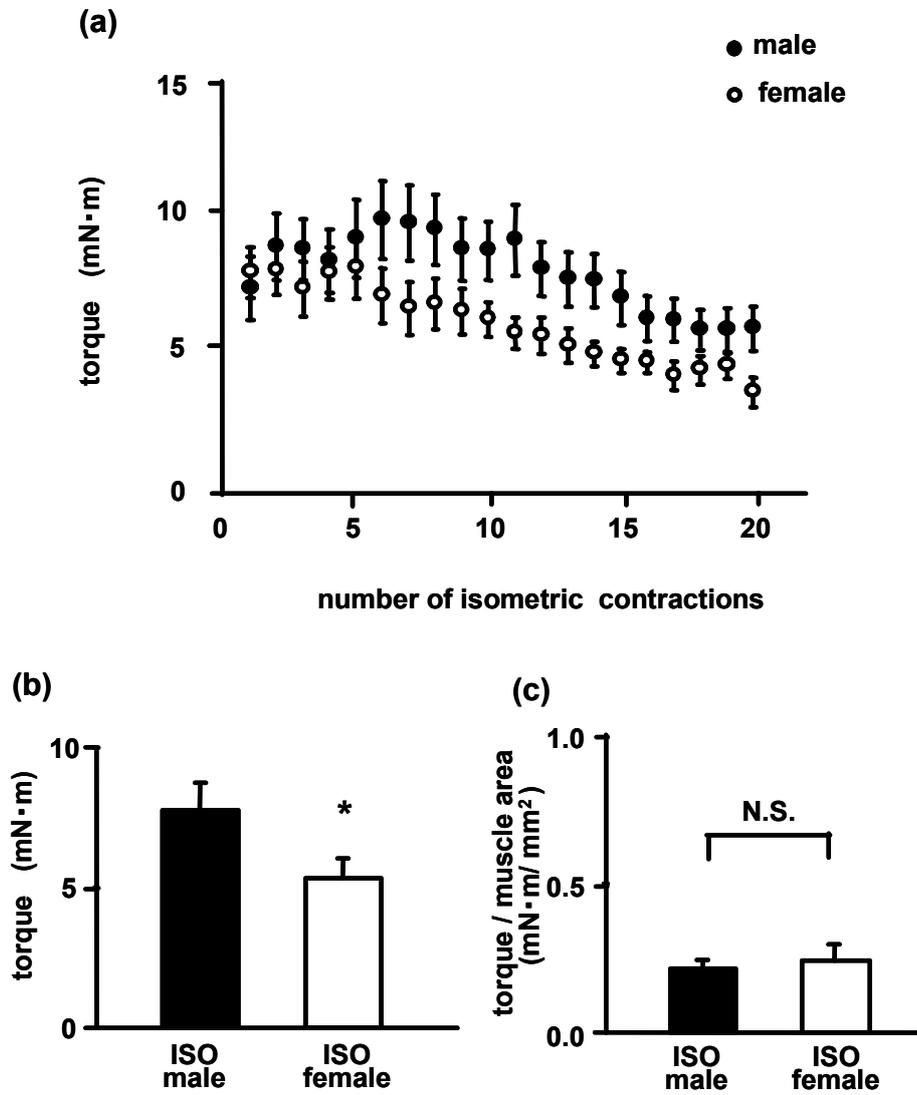


Fig. 18 An average value of 20 times of muscle contractions. (a) The peak torque of ISO in male and female. (b) absolute value, (c) value per crss-sectional area. Values are mean +/- SE. *p < 0.05, N.S.: no significant.

Table1. TA muscle cross-sectional area (mm²) after ECC and ISO in male and female rats (n = 4-6).

	CONT		1H	1D	3D	7D
male	33.4±1.5	ECC	35.8±3.0	36.7±2.2	37.8±2.1	42.1±3.6
		ISO	32.2±2.3	36.6±2.1	36.0±1.8	37.9±2.4
female	24.8±1.5	ECC	23.1±2.1	25.7±1.7	23.6±1.7	24.9±2.6
		ISO	22.9±2.2	24.8±1.2	21.0±1.6	23.7±1.6

Values are mean +/- SE. ECC, Eccentric contraction ; ISO, Isometric contraction ; CONT, control; 1H, 1D, 3D and 7D, rats 1hour, 1day, 3days and 7days, respectively, after ECC or ISO.

った (Table. 1).

4.3.2. 筋損傷における組織学的評価

ECC 収縮, および ISO 収縮 3 日後の H&E 染色による筋組織の顕微鏡画像を示した (Fig. 19-a, -c). ECC 収縮負荷 3 日後のオスの筋組織において, 筋細胞の浮腫, 白血球の浸潤, 非染色細胞が観察された. しかしながら, メスではオスで観察された炎症反応を示す筋細胞はほとんどみられなかった. また, ISO 収縮後では, オス, メスともに ECC 収縮で見られたような筋細胞の損傷は観察されなかった (Table. 2).

4.3.3. アポトーシス発生と経時的変化

ECC 収縮, および ISO 収縮後のアポトーシス核 (TUNEL-positive nuclei / mm²) の発生を観察・定量した (Fig. 19-b, -d). オスの筋組織では, ECC 収縮負荷 (CONT: 0.25 +/- 0.14, 1 H: 0.80 +/- 0.16, 1 D: 0.74 +/- 0.24, 3 D: 2.61 +/- 1.08, 7 D: 2.34 +/- 0.89 TUNEL-positive nuclei / mm²) が ISO 収縮負荷 (CONT: 0.25 +/- 0.14, 1 H: 0.09 +/- 0.05, 1 D: 0.54 +/- 0.45, 3 D: 0.18 +/- 0.09, 7 D: 0.38 +/- 0.24 TUNEL-positive nuclei / mm²) よりもアポトーシスの発生が有意に高いことが示された ($p < 0.05$). メスにおいても, アポトーシス発生割合は, ECC 収縮負荷 (CONT: 0.15 +/- 0.09, 1 H: 0.17 +/- 0.13, 1 D: 0.40 +/- 0.19, 3 D: 1.72 +/- 0.27, 7 D: 1.06 +/- 0.54 TUNEL-positive nuclei / mm²) が ISO 収縮負荷 (CONT: 0.15 +/- 0.09, 1 H: 0.27 +/- 0.19, 1 D: 0.15 +/- 0.08, 3 D: 0.86 +/- 0.64, 7 D: 0.15 +/- 0.08 TUNEL-positive nuclei / mm²) と比較して有意に増加していた ($p < 0.05$). 経時的なアポトーシス発生は, 対照群と比較してオスでは 3 日後 ($p < 0.01$) および 7 日後 ($p < 0.05$) で有意な増加が観察された. また, メスは 3 日後において有意に増

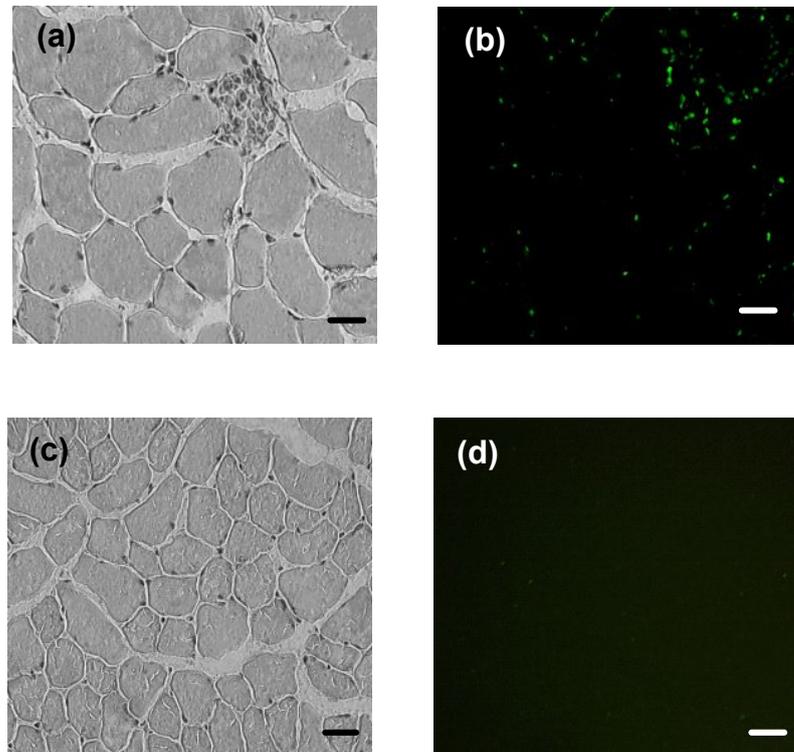


Fig. 19 Serial cross - section in male (a, b) and female(c, d) after ECC in TA muscle. H&E staining (a, c) was performed to examine the histological features of muscle damage, fluorescence staining (b ,d) for myofiber apoptotic nuclei by TUNEL assay. Bar = 50 μ m.

Table 2. Morphological findings in TA muscle after ISO and ECC in male and female rats.

		CONT	1H	1D	3D	7D
ISO	Male	-	-	-	-	-
	Female	-	-	-	-	-
ECC	Male	-	-	++	+++	+
	Female	-	-	+	++	+

-, no damage fiber observed : +, ~ 1% of fibers were damaged : ++, ~ 3% of fibers were damaged : +++, 5% ~ of fibers were damaged.

加し ($p < 0.01$), 7 日後でも高い発生割合が観察された ($p = 0.09$). さらに, ECC 収縮によるアポトーシス核の発生においては, オスがメスよりも有意に高いことが示された ($p < 0.05$). ISO 収縮での性差を比較したところ, 統計的な有意差は認められなかった (Fig. 20).

4.4. 考察

4.4.1. 収縮様式とアポトーシス発生

これまでの先行研究では, 一過性の持久性運動とアポトーシスの関係が報告されている (Sandri *et al.*, 1997; Podhorska-Okolow *et al.*, 1998; Podhorska-Okolow *et al.*, 1999; Arslan *et al.*, 2002; Boffi *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2004; Podhorska-Okolow *et al.*, 2004). Sandri ら (1997) は, マウスの Wheel running による 16 時間の自発性運動後におけるアポトーシス応答を TUNEL 法を用いて検証したところ, 自発性ランニング終了直後と 6 時間後において有意な増加を示した. さらに, 内皮細胞のアポトーシス核の発現が運動 4 日後において増加した. 本実験では, ECC 収縮後の 3 日から 7 日にかけて, アポトーシス核の発生がみられた (Fig. 20). 本実験手法は, H&E 染色と TUNEL 法による蛍光染色の組み合わせによってアポトーシス核を同定したため, 筋細胞, 衛星細胞あるいは血管内皮細胞のそれぞれの核を区分することが困難であった. したがって, Sandri ら (1997) の結果より, 本実験によって検出されたアポトーシス核のいくつかが内皮細胞に由来していた可能性がある. しかしながら, Kano ら (2004) は, 本実験と同様の運動モデルにおいて, ECC 収縮後に筋細胞は損傷を受けるものの血管内皮細胞の微細構造に大きな変化はみられないことを報告している. したがって, 本実験の運動モデルが血管内皮細胞に対し

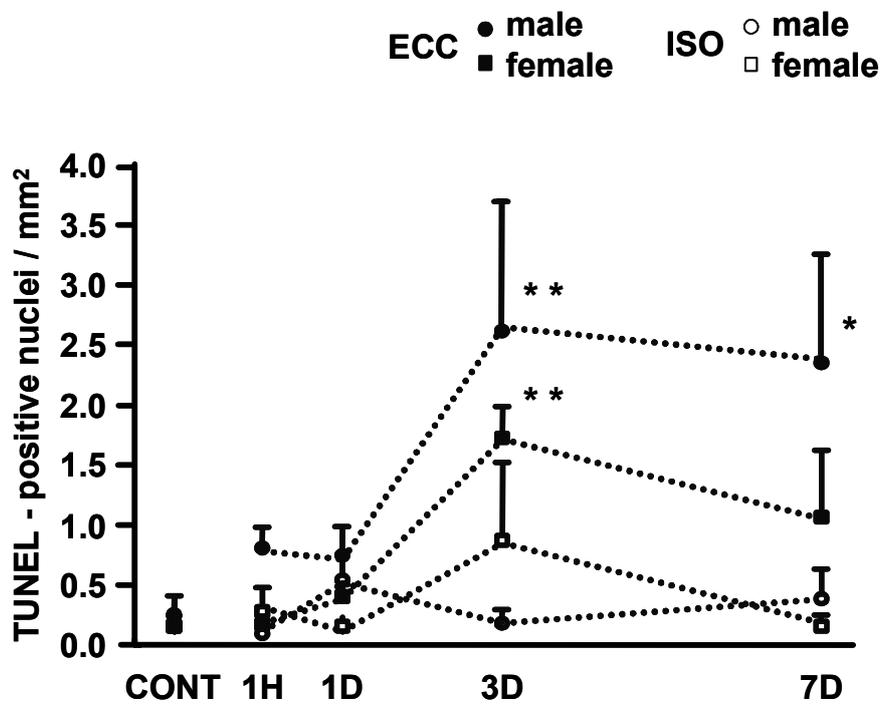


Fig. 20 Time course of changes in ECC and ISO induced apoptosis nuclei. TUNEL-positive nuclei per mm² in ECC and ISO in rats. Values are means +/- SE. *p < 0.05 vs. Male CONT in ECC, **p < 0.05 vs. CONT in ECC.

て何らかの影響を与えてアポトーシスを誘導するか否かについては細胞種の同定をふまえた手法によるさらなる検証が必要である。

本実験は ISO 収縮よりも ECC 収縮後のアポトーシス核の発現割合が有意に高い値を示し、オス・メスともにコントロール群と比較して収縮 3 日後に最も顕著な応答が観察された。ECC 収縮は、ISO 収縮などの他の収縮様式よりも発揮張力が大きく、筋の組織学的な構造変化を生じやすい (Enoka, 1996)。Biral ら (2000) は、ラットの骨格筋において、電気刺激による筋収縮の負荷によりジストロフィンの欠損とアポトーシス核が同一箇所にも局在していることを観察したことから、細胞の膜タンパク質の消失が結果としてアポトーシスを誘導するのではないかと指摘している。本実験において、ISO 収縮より ECC 収縮による張力発揮が高かったことから組織学的な構造変化、すなわち、筋細胞膜の損傷を生じやすいことが考えられる (Table. 2)。したがって、収縮様式の違いによる筋損傷割合の差異は、アポトーシス発生が ECC 収縮では ISO 収縮よりも顕著であった要因の一つであると考えられる。また、運動中に発生する活性酸素は、アポトーシスを引き起こすことが報告されている (Dirks & Leeuwenburgh, 2004)。しかしながら、Boffi ら (2002) は、サラブレッドのトレーニング 24 時間後の骨格筋において、対照群よりも有意に高い DNA 断片化を検出したが、活性酸素との関連性は見られなかったことを報告している。ECC 収縮は ISO 収縮と比較して高い張力発揮を生じるが、その際の代謝コストは低い (Bigland-Ritchie & Woods, 1976)。本実験モデルにおいても ECC 収縮による骨格筋のアポトーシス誘導が酸化ストレスのみの影響によるものとは考えにくく、機械的ストレスによる影響を考慮するべきであろう。

4.4.2. アポトーシス応答と性差

メスの骨格筋は、オスよりも運動後の筋細胞における構造変化が小さい。Amelink

ら (1990) は *in vitro* の筋に対して電気刺激による筋収縮後の CK 量を比較したところ、オスはメスよりも有意に増加したことを示した。また、Komulaine ら (1999) は、ダウンヒルランニング後により、細胞骨格タンパク質がメスよりオスにおいて著しい崩壊・消失を生じることを明らかにした。これらの原因として、女性ホルモンのエストロゲンの関与を指摘している。エストロゲンは細胞膜を安定化させ、また活性酸素から膜を保護する抗酸化作用を持つことが報告されている (Kendall & Eston, 2002)。ECC 収縮による筋細胞への機械的ストレスによる細胞膜タンパク質の崩壊が、エストロゲンの作用によって防がれ、筋損傷の発生を抑えているかもしれない。したがって、メスは機械的ストレスにおける抵抗性が高いため、運動による筋損傷を起こしにくい可能性があるだろう。

本実験におけるオスとメスの筋断面積あたりの発揮張力を比較した結果、ECC 収縮における発揮張力は差がなかった (Fig. 17-c)。しかしながら、ECC 収縮後のオスのみの筋組織において、筋細胞の浮腫 (1 日後) と白血球の浸潤をともなった炎症反応 (3 日後) が観察された。その一方でメスでは炎症応答はほとんどみられなかった (Table. 2)。同様に、アポトーシスの発生にも有意な差が認められた (Fig. 20)。Stupka ら (2000) はヒトの骨格筋内におけるアポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 の発現量に性差があることを指摘している。これらのことから、運動負荷後の筋損傷の性差の要因には、アポトーシスの発生が関与していることが考えられる。

本実験により一過性の筋収縮ストレスにおいて発生するアポトーシスと収縮様式およびオス・メスによる応答性の違いが明らかにされた。アポトーシスの発生は生体における恒常性の維持や防御機構と深く関わりを持っていると考えられている。したがって、筋収縮後のアポトーシス関連タンパク質の調節機構などの解明によって、運動とアポトーシスの生体内での役割がより明確になるとと思われる。

4.5. 要約

実験 3 では、オスおよびメスラットの آپトーシスの発現における ECC 収縮と ISO 収縮の及ぼす影響について検証を行った。 آپトーシス応答は、ECC 収縮および ISO 収縮後の 1 時間、1 日、3 日、7 日において観察し、 آپトーシスは、以下のような知見を得た。

- ① ECC 収縮後では、局所的な炎症を示す筋線維の損傷は、オスでは観察されたが、メスラットではほとんどみられなかった (Table. 2).
- ② オス、メスラットにおいて、 آپトーシス発生は ISO 群 (オス : CONT: 0.25 ± 0.14 , 1 H: 0.09 ± 0.05 , 1 D: 0.54 ± 0.45 , 3 D: 0.18 ± 0.09 , 7 D: 0.38 ± 0.24 , メス : CONT: 0.15 ± 0.09 , 1 H: 0.27 ± 0.19 , 1 D: 0.15 ± 0.08 , 3 D: 0.86 ± 0.64 , 7 D: 0.15 ± 0.08 TUNEL-positive nuclei / mm²) よりも ECC 群 (オス : CONT: 0.25 ± 0.14 , 1 H: 0.80 ± 0.16 , 1 D: 0.74 ± 0.24 , 3 D: 2.61 ± 1.08 , 7 D: 2.34 ± 0.89 , メス : CONT: 0.15 ± 0.09 , 1 H: 0.17 ± 0.13 , 1 D: 0.40 ± 0.19 , 3 D: 1.72 ± 0.27 , 7 D: 1.06 ± 0.54 TUNEL-positive nuclei / mm²) において有意な増加が認められた (Fig. 20).
- ③ ECC 収縮による آپトーシス発現において、性差が認められた (Fig. 20).

以上のことから、組織学的筋損傷と同様に骨格筋における آپトーシスは ISO 収縮よりも ECC 収縮で多く観察され、さらに、ECC 収縮に対する آپトーシス応答はオスにおいて顕著であることが明らかになった。

第5章 エキセントリック収縮による損傷—再生過程における

アポトーシス応答 (実験4)

5.1. 背景と目的

繰り返しの ECC 収縮によって筋損傷が誘発されることは知られている。この運動誘発性筋損傷は、筋線維微細構造の崩壊を生じることに加えて、筋線維の浮腫や炎症をともなった筋細胞壊死を引き起こすことが明らかにされている (Armstrong, 1984; Clarkson & Sayers, 1999; Stupka *et al.*, 2001; Clarkson & Hubal, 2002)。これらの炎症は、ECC 収縮負荷 3 日後にピークに達し、7 日目以降に再生過程へ移行することが指摘されている (Armstrong *et al.*, 1983; Friden, 1984; Friden & Lieber, 1998)。ネクロシスによる損傷筋線維の除去は、筋線維再生の過程における応答の一連として構成されている。

損傷、または機能不全の細胞や筋線維は、遺伝的な制御を介したアポトーシスによって除去される (Lockshin & Zakeri, 2004; Henriquez *et al.*, 2008)。アポトーシスとは、遺伝子プログラムされた高度な制御機構をもった能動的な細胞死であり、生物個体の発生、維持に必須の意義と役割をもつ (Kerr *et al.*, 1972)。近年、運動により誘発された損傷した骨格筋においてもネクロシスと同時にアポトーシスの発生が惹起される (Sandri *et al.*, 1997; Podhorska-Okolow *et al.*, 1998; Podhorska-Okolow *et al.*, 1999; Arslan *et al.*, 2002; Boffi *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2004; Podhorska-Okolow *et al.*, 2004) ことが明らかにされている。また、これまでの先行研究より、アポトーシスが骨格筋における細胞分化の過程を制御する重要な作用に関与していることが指摘されている (King & Cidlowski, 1995; Asakura *et al.*, 2007)。例えば、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性化は、骨格筋に

における分化を促す (Fernando *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2007). また, Asakura ら (Asakura *et al.*, 2007) は, 筋分化誘導因子である MyoD が増殖および, 分化においてアポトーシスを積極的に誘導すること報告した.

したがって, 本実験は, ECC 収縮によるアポトーシスは, 骨格筋における損傷過程のみならず再生過程においても発生するという仮説を立て ECC 収縮による運動誘発性筋損傷モデルにおける損傷-再生過程の筋線維および内皮細胞におけるアポトーシス応答を明らかにすることを目的とした.

5.2. 方法

5.2.1. 実験動物と ECC 収縮プロトコル

本実験は, 12 週齢の Wistar 系オスラット (体重: 246 +/- 13 g, N = 45: 日本 SLC) を用いた. 飼育および ECC 収縮負荷は実験 1 と同様のプロトコルにしたがい, ECC 収縮負荷回数は 40 回に設定し行った.

5.2.2. TUNEL 染色法による蛍光免疫組織重染色

ECC 収縮負荷後, 麻酔下にて右後肢の TA 筋を摘出し, 液体窒素により冷却されたイソペンタンを用いて凍結し-80°C で凍結保存した. 筋損傷程度は, H&E 染色を施し, ポイントカウンティング法を用いて定量を行った (Fig. 21).

各サンプルは連続横断および縦断切片 5 μ m に作成し切片を乾燥させた後, 1% BSA (bovine serum albumin) 溶液によりブロッキングを行った (30 min, RT). 筋細胞膜タンパク質の同定にはジストロフィン を 1 次抗体; Anti-Dystrophin

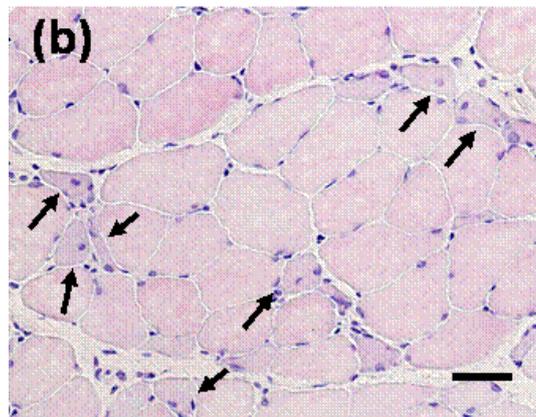
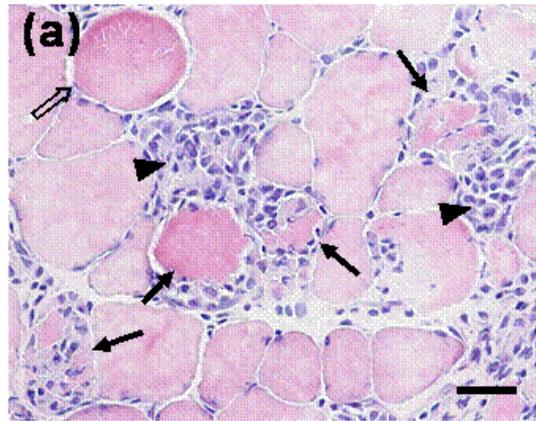


Fig. 21 (a) H&E staining 3 D after ECC. Damaged myofibers were defined as those inflammatory cells with swollen (outlined arrows), swollen with infiltration (arrows), and infiltration (arrow-heads) appearance. (b) The multiple central nuclei can be detected (arrows) after 7 Dof ECC. Bar = 50 μ m.

C-terminal, Mouse-Mono (VP-D505: VECTOR,) によるインキュベーション(1:30, 60 min, RT) 後, 2次抗体; anti-mouse IgG rhodamin-conjugated anti body (R0207: Dako, 1:100, 60 min, 37°C) により標識し染色を施した. ジストロフィン蛍光免疫染色後, アポトーシス核の同定は, MEBSATIN Apoptosis Kit Direct (Co. 8445: MBL) のプロトコルにしたがい TUNEL 法を行った. 封入時に DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole, H-1200: VECTOR) による核染色を施し, 蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E800: NIKON) を使用し観察した. 組織観察は, 重複しないように 1 切片あたり, 表層 3 箇所, 深層 3 箇所の計 6 箇所を無作為的に抽出し (Fig. 22), 写真撮影装置にてジストロフィン免疫染色像, TUNEL 染色像, DAPI 染色像をそれぞれ撮影し, 合成することでアポトーシス核の同定を行った. 細胞膜タンパク質ジストロフィンの内側に存在する TUNEL 陽性および DAPI が共発現している核を筋細胞アポトーシス核と定義し, 定量した (Fig. 23). また, 内皮細胞アポトーシスは, Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) および Alkaline Phosphatase (AP) 二重染色 (Grim & Carlson, 1990; Koyama *et al.*, 1998) により毛細血管を同定し, TUNEL 陽性核画像と照合し定量を行った.

5.2.3. アポトーシス制御タンパク質の定量

アポトーシス制御タンパク質の定量は, Western blot 法によって定量した. 抽出した筋は, ホモジナイズバッファー (50mM Tris, 1mM EDTA, PMSF) 中でホモジネートし, 遠心分離機により遠心後 (8000g, 15 min, 4°C) の上清を分注して凍結保存 (-80°C) した. SDS 緩衝液中において, 12% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動おこないタンパク質をゲル上で分離させた. ゲルをセミドライ式によりメンブレン (20V, 30 分: PVDF: milipoa) に転写し, 10% スキムミルクでブロッキング (60 min, RT) を行った. その後, アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 (sc-7382: SANTA

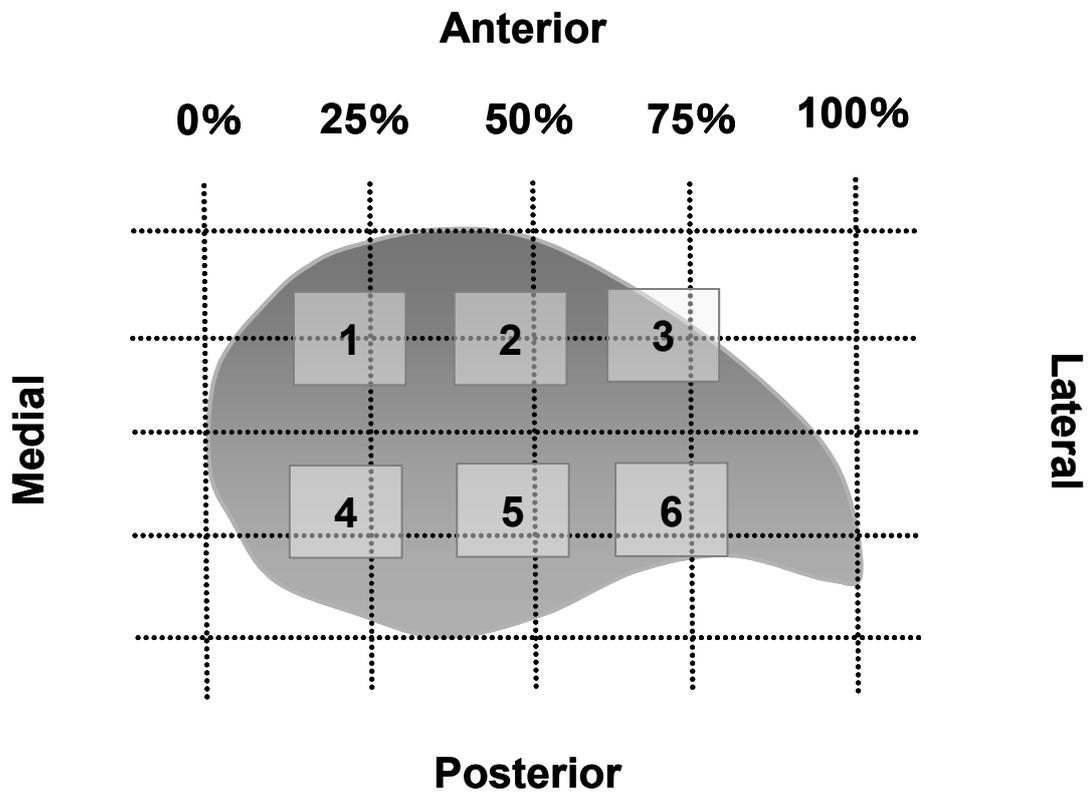


Fig. 21 Equatorial cross section of rat TA muscle stained by H&E, TUNEL assay and AP-DPPiV. Numbers (1-6) indicate the sample areas (positions) from where muscle damage, apoptotic myofibers and endothelial cells were obtained.

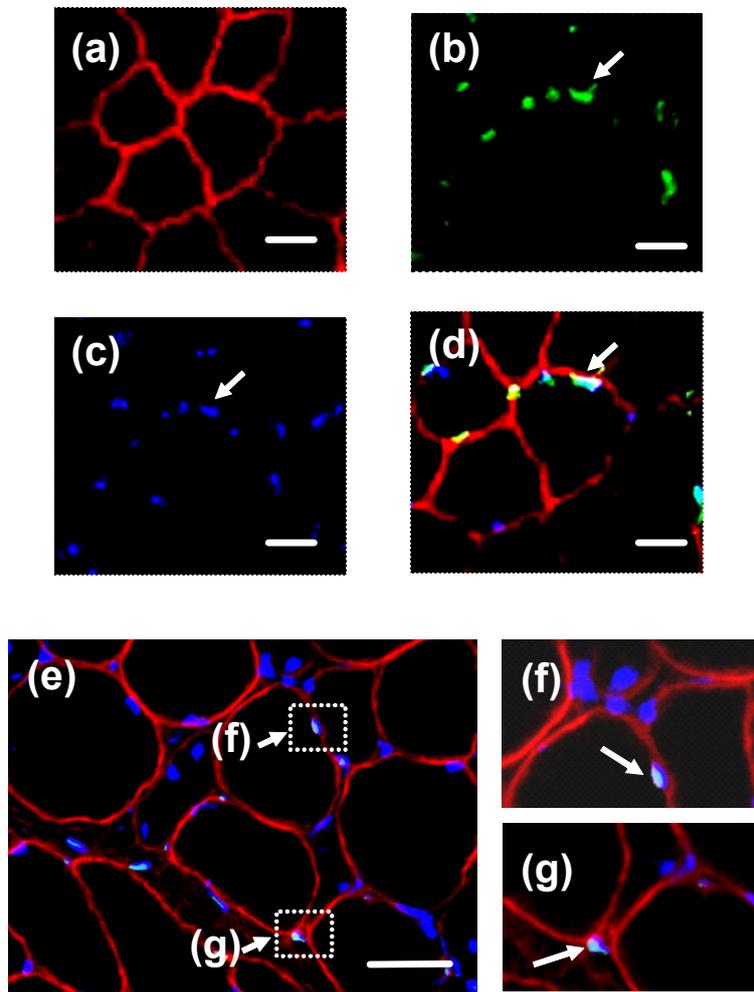


Fig. 23 Muscle cross-sections were immunofluorescent-stained with dystrophin antibody to identify the sarcolemma (red, a), fluorescein-mediated TUNEL assay (green, b) was performed to identify apoptotic nuclei (light blue, d), and all nuclei were labeled by DAPI staining (blue, c). TUNEL-positive nuclei (e) were found both inside (f) and outside (g) myofibers. TUNEL-positive nuclei positioned inside the dystrophin stain (f) were identified as myofiber nuclei, whereas other nuclei located outside (g) were counted as endothelial or interstitial cell nuclei. Bar = 50 μm .

CRUZ), および, アポトーシス促進タンパク質 Bax (sc-493: SANTA CRUZ) を抗原抗体反応により同定した. 検出方法は, ECL plus Western Blotting Detection System (RPN2132: Amersham Biosciences) を用いて Bcl-2, Bax を発光検出した. 検出されたバンドは, 対照群を基準として CS analyzer 解析ソフト (ATTO) によりデンストメトリー評価を行った.

5.2.4. 統計処理

実験の統計量は平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示した. 個体間比較には一元配置の分散分析により行い, 有意な p 値 ($p < 0.05$) が得られたとき, Dunnet 法によりグループ間の多重比較を行った.

5.3. 結果

5.3.1. 筋損傷の組織学的評価

ECC 収縮による筋損傷と再生筋の発生割合を示した (Table. 3). ECC 収縮 1 日後は, 筋細胞の浮腫 ($6.3 \pm 5.7\%$) などによる炎症が観察された. 3 日後は, 筋細胞の崩壊, 白血球の浸潤などのネクローシス的な形態学的変化がピークに達し, 対照群と比較して損傷割合が有意に増加 ($33 \pm 12\%$) した ($p < 0.05$). 再生過程である収縮負荷 7 日後, 14 日後には, 損傷はほとんどみられなかったが, 中心核をもつ筋細胞や内径が非常に小さい再生筋 (7D: $4.0 \pm 3.1\%$, 14D: $3.8 \pm 1.6\%$) が観察された (Fig. 24).

Table 3. Percentage of inflammation and regeneration muscle fiber after ECC.

	CONT	1 D	3 D	7 D	14 D
inflammation fiber (%)	0.0+/-0.0	2.4+/- 2.2	23.4+/- 6.2**	0.0+/-0.0	0.0+/-0.0
regeneration fiber (%)	0.0+/-0.0	0.0+/-0.0	0.0+/-0.0	4.5+/-1.3*	3.7+/-1.4*

Values are mean +/- SE . Significant difference from control (*p < 0.05, **p < 0.01) .

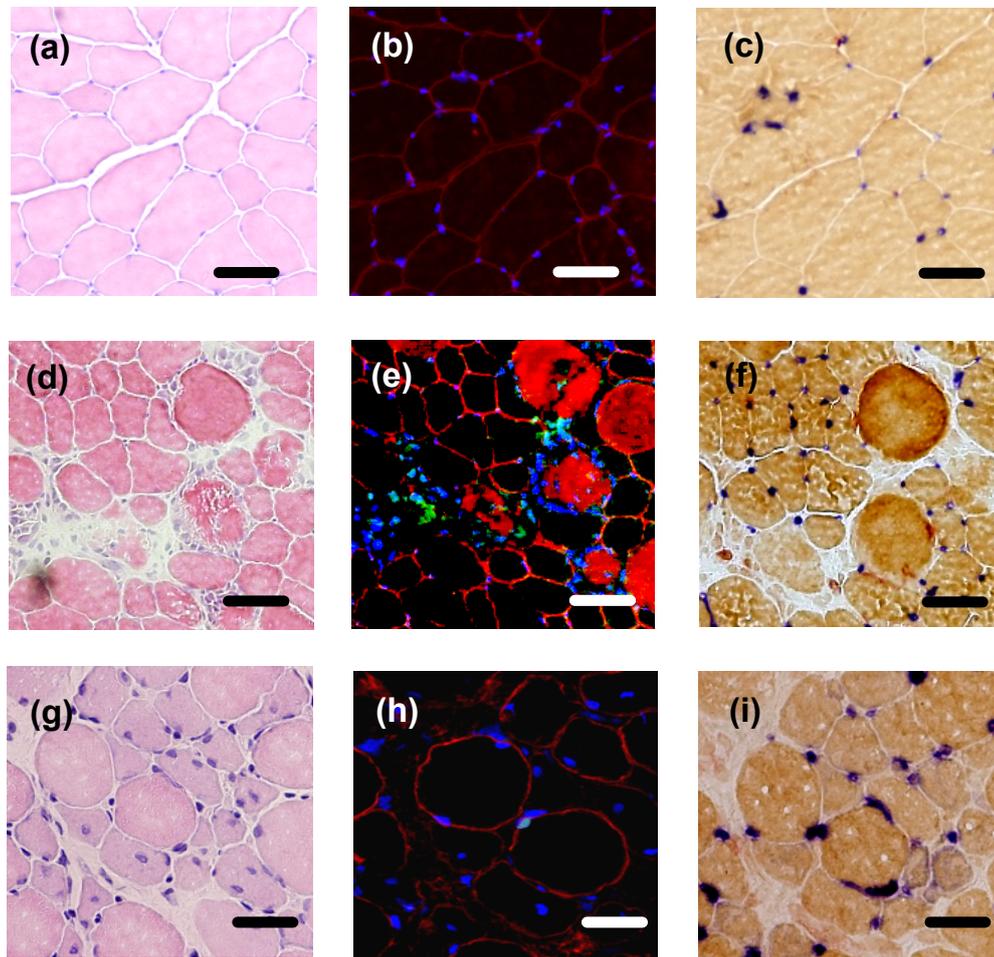


Fig. 24 Serial transverse sections from control (a–c), 3 D (d–f), and 7 D (g–i) after ECC in TA muscle. H&E staining (a, d, g) was performed to examine the histological features of muscle damage, triple histochemical staining (b, e, h) for myofiber apoptotic nuclei was used as shown in Fig. 23, and AP-DPPIV staining was performed to identify endothelial cells (c, f, i). Bar = 50 μ m.

5.3.2. 筋細胞および内皮細胞アポトーシス

対照群, および ECC 収縮 1 日後群の筋細胞において, ジストロフィンの欠損はみられず, またアポトーシス核は少量の発生のみ観察された. ECC 収縮 3 日後群では, 顕著なジストロフィンの欠損とアポトーシス核が観察された. しかしながら, 筋細胞膜の崩壊が激しいため, 筋細胞アポトーシス核の分類および定量は不可能であった. ECC 収縮 7 日および 14 日後群は, 内径が小さい筋細胞, および, 中心核の出現が観察された筋の細胞膜直下付近に筋細胞アポトーシス核が観察された (Fig. 24).

筋細胞, 血管内皮細胞アポトーシス核における経時的変化を示した (Fig. 25). 損傷-再生過程では筋細胞数, 細胞直径の変化をとまなうことから, それぞれの細胞核あたりのアポトーシス核を定量・算出した. 筋細胞アポトーシス陽性核は, 筋細胞アポトーシスは, 1 日後では $2.5 \pm 1.1 \%$ (apoptosis nuclei / myonuclei) は変化がみられなかったが, 7 日後では対照群と比較して $7.0 \pm 1.5 \%$ (apoptosis nuclei / myonuclei) の有意な増加 ($p < 0.01$) が観察された. また, アポトーシス核の発生は, 再生完了期である収縮後 14 日まで有意に高い値を示した ($3.8 \pm 1.1 \%$, $p < 0.05$). また, ECC 収縮 7 日後の血管内皮細胞におけるアポトーシス核数は, 対照群と比較し, $7.6 \pm 3.6\%$ (apoptosis nuclei / endothelium nuclei, $p < 0.05$) の有意な増加を示したが, 筋細胞とは異なり ECC 収縮 14 日後には対照群と同じレベル ($0.9 \pm 0.3\%$ apoptosis nuclei / endothelium nuclei) であった.

5.3.3. 再生筋における縦断的な筋核アポトーシス

再生過程である ECC 収縮 7 日後, 14 日後群の TA 筋を縦断的に観察することにより, アポトーシス発生部位の詳細について検証した. 両群における筋細胞アポトーシス核は, 筋細胞膜直下で観察された. ECC 収縮 7 日後群のアポトーシス核は, 再

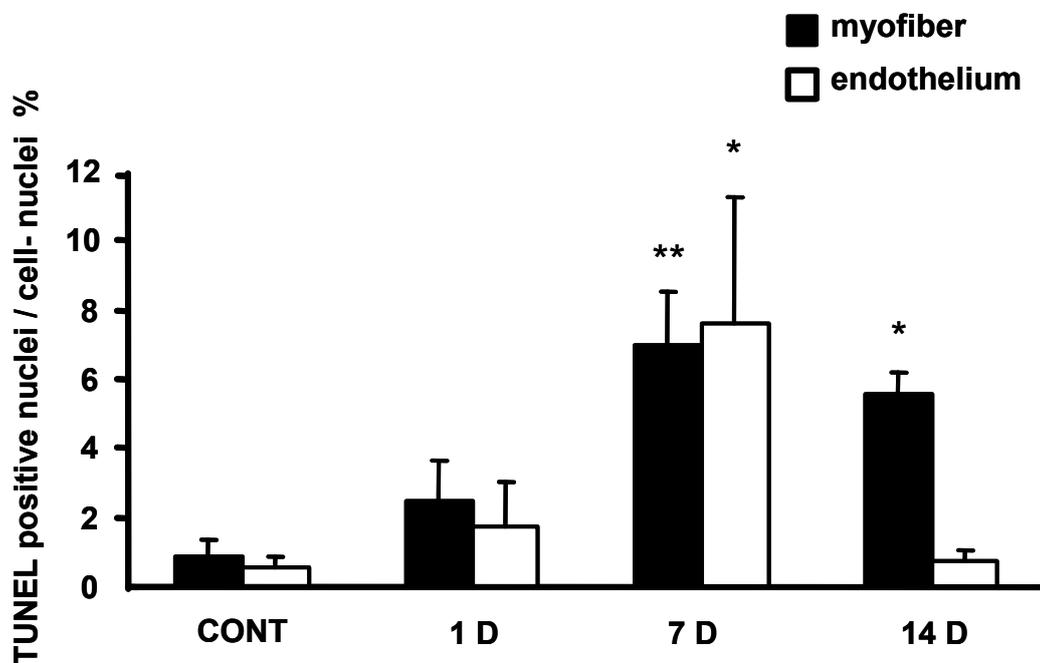


Fig. 25 Percentage of myofiber and endothelial cell nuclei identified as apoptotic in control and post-ECC muscles at 1, 7, and 14 D. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from control.

生筋の中心核には観察されなかった。また、ECC 収縮 14 日後における筋組織中のアポトーシス核は、細胞膜直下に隣接する核付近で発生していた (Fig. 26)。

5.3.4. アポトーシス制御タンパク質の発現

ECC 収縮後におけるアポトーシス制御タンパク質の経時変化を定量した。抑制タンパク質 Bcl-2 は、損傷過程である 1 日後群, 3 日後群, 再生過程の 7 日後群において対照群 (100%) よりもそれぞれ, -35%, -60%, -56% の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。また、促進タンパク質 Bax は、統計学的な有意さは得られなかったが、3 日後 (+88%), 7 日後 (+51%) に増加した ($p = 0.09$)。これらの結果より ECC 収縮後の Bax / Bcl-2 ratio は、対照群と比較して 3 日後 (4.5 +/- 0.9), 7 日後 (3.4 +/- 0.5) において有意な減少が認められた ($p < 0.05$, Fig. 27)。

5.4. 考察

本実験は、ECC 収縮による筋損傷における炎症期のみならず、再生過程にも筋細胞アポトーシスが発生することを初めて明らかにした。さらに、再生過程における筋細胞アポトーシスは、新生筋線維の中心に位置する核ではなく、細胞膜直下において観察された。

5.4.1. 炎症期における筋細胞アポトーシス

ECC 収縮後の炎症応答は、収縮負荷後 3 日目でピークに達し、細胞の損傷が観察される (Best & Hunter, 2000; Henriquez *et al.*, 2008)。これまでの研究では

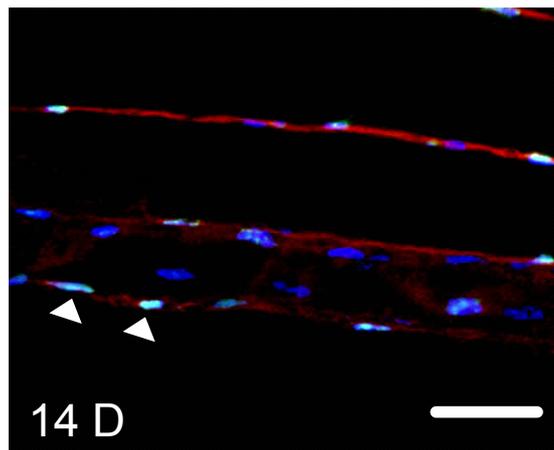
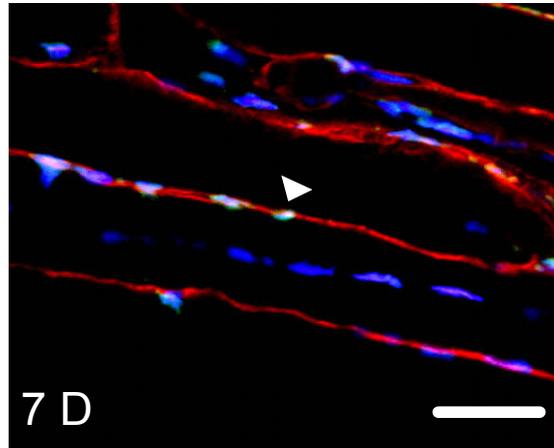


Fig. 26 Longitudinal sections taken 7 and 14 D after ECC in TA muscle. All nuclei were stained with DAPI (blue), and nuclei with internal dystrophin stain (red) were defined as myofiber nuclei. TUNEL-positive myofiber nuclei (arrow) were located in the subsarcolemma, but central nuclei were not detected. Bar = 50 μ m.

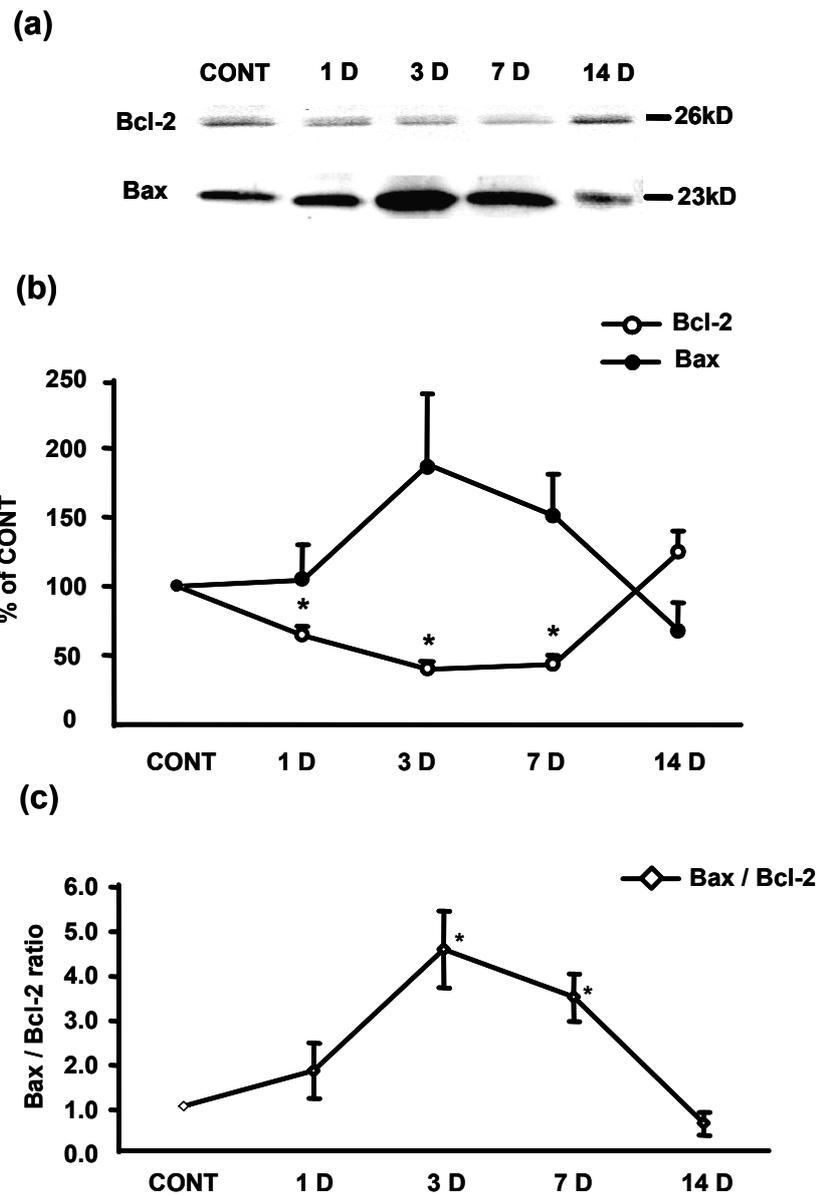


Fig. 27 Immunoblot analysis of the protein expression of Bcl-2 and Bax. Inset displays representative images for control and ECC muscles (a). Quantification by densitometry of Bcl-2 protein was significantly decreased 1, 3, and 7 days after ECC compared with control (b). Values are expressed as the percentage of the mean values of the control. Bax/Bcl-2 ratio was significantly higher at 3 and 7 days after ECC (c). * $p < 0.05$, significant difference from control.

ECC 収縮後の骨格筋において、炎症に関連する多くの遺伝子発現が報告されている (Chen *et al.*, 2003; Barash *et al.*, 2004; Hubal *et al.*, 2008; Mahoney *et al.*, 2008). Urso らは (2005), ヒトの骨格筋における ECC 収縮 8 時間後に発現する. 全ての遺伝子のうち 9% がアポトーシスに関連したものであることを示した. 本実験は, ECC 収縮誘発性筋線維アポトーシスにおける形態の空間分解能と時系列の同定を試みた. その結果, ECC 収縮 1 日後では, 筋細胞内においてわずかなアポトーシス核が観察された. 3 日後になると著しく損傷した筋細胞は, 細胞膜の崩壊をともなっていたため筋細胞核の同定は不可能であった. しかしながら, 多くの TUNEL 陽性核が細胞膜であるジストロフィンの欠損した箇所で見られる. 一般的に, 細胞膜タンパク質のジストロフィンを欠損した筋ジストロフィーを発症した筋線維は崩壊すると考えられているが, いくつかの研究ではアポトーシスにより筋線維の損傷が発生することを示唆している (Sandri *et al.*, 1997; Tews & Goebel, 1997; Sandri *et al.*, 1998; Abmayr *et al.*, 2004). Biral ら (2000) は, TUNEL 陽性核が, ECC 収縮負荷 6, 24 時間後ではジストロフィンとサルコグリカンの欠損した筋線維で同定されたことを報告した. すなわち, ECC 収縮後の細胞膜骨格タンパク質の欠損とアポトーシス応答の関連性が考えられる.

5.4.2. 再生過程における筋細胞アポトーシス

本実験は, ECC 収縮後の再生過程における筋細胞アポトーシスの発生を初めて証明した. これらの知見は, 筋細胞の再生過程におけるアポトーシスの関連性を示唆している. 筋細胞は多核細胞であるため, 一定の筋核ドメインを維持することが必要である. すなわち, 再生過程におけるアポトーシスは, 細胞の除去を目的としたものではないかもしれない. 筋細胞の再生における核の局在やドメインを制御するにあたり, アポトーシスは重要な役割を有するのではないかと推測している. それは, 核の数が筋線

維のサイズの制御する要因であるためである (Gallegly *et al.*, 2004; Favier *et al.*, 2008). 例えば, 萎縮筋では, 筋細胞核もしくは衛星細胞の除去に起因したアポトーシスが起る (Allen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000; Siu *et al.*, 2005c; Alway & Siu, 2008; Bruusgaard & Gundersen, 2008). 同様な機構が筋線維の再生過程の筋核ドメインの空間的な決定に寄与しているのではないかと考えられる.

縦断像で示したとおり, 筋細胞核のアポトーシスは, ECC 収縮の 7 日, 14 日後において細胞質の中心よりも細胞膜直下にて発生していた. もし, 衛星細胞由来の中心核が移動した先に既存の筋細胞核が局在していた場合, 筋核ドメイン調節のためにいずれかを核の脱落を目的としたアポトーシスを誘導することが推測される. 筋衛星細胞は, 筋幹細胞としての機能を有し再生応答を示す (Adams, 2006; Bhagavati, 2008). 筋分化を制御する因子である MyoD, Myf 5 および myogenin は衛星細胞の活性化プログラムを制御するために必須のものである. Okada ら (2008) は, ECC 収縮負荷モデルにおいて, ECC 収縮負荷 3 日から 7 日後に MyoD における高い発現を報告している. さらに, 薬理的な筋損傷モデルでも 5 日から 21 日間にかけての MyoD の発現が見られる (Richard-Bulteau *et al.*, 2008). さらに, Asakura ら (2007) は MyoD が衛星細胞の増殖および分化だけでなく再生過程におけるアポトーシス応答も制御していることを示唆している. 本実験では, ECC 収縮負荷後 7 日から 14 日において, Bcl-2 と Bax の間において, 相反する動態を示した. Bax / Bcl-2 発現割合は, ECC 収縮 14 日後には, 対照レベルまで回復した. これは, ECC 収縮後 14 日目では, アポトーシス誘導因子である Bax, Bcl-2 による制御ではなく, 他の実行因子などが筋細胞内でアポトーシス発生を促していると考えられる.

5.4.3. 内皮細胞におけるアポトーシス応答

本実験では, ECC 収縮後の筋細胞だけではなく血管内皮細胞においてもアポト

シス応答がみられた。これまでの先行研究では、ECC 収縮は、内皮細胞におけるネクローシス的な損傷は誘導されないと報告されている (Kano *et al.*, 2004)。しかしながら、運動により毛細血管のアポトーシスが誘発されることが指摘されている。例えば、自発的な一過性の持久的運動を負荷したマウスの場合、内皮細胞におけるアポトーシスが惹起される (Podhorska-Okolow *et al.*, 1998)。これらの要因としては、ECC 収縮誘発性筋損傷に関与する活性酸素 (Kon *et al.*, 2007; Maruhashi *et al.*, 2007) と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が考えられる。特に高い細胞内 Ca^{2+} 濃度はカルパイン活性を促し、好中球の活性を誘導する刺激となる (Raj *et al.*, 1998)。活性化した好中球は活性酸素を産生し、タンパク質分解や DNA の損傷を惹起する (Powers & Jackson, 2008)。したがって、活性酸素は、内皮細胞における好中球の活性を促し、毛細血管の内側から内皮細胞のアポトーシスを誘導しているのかもしれない。

5.5. 要約

実験 4 は、オスラット後肢骨格筋を対象として、ECC 収縮による損傷—再生過程の細胞別のアポトーシス応答の検証を行った。その結果以下のような知見を得た。

- ① 損傷過程および再生過程におけるアポトーシス応答を明らかにした。特に、ECC 収縮 7 日後の再生過程に筋細胞 (7.0 +/- 1.5 % apoptosis nuclei / myonuclei)、血管内皮細胞 (7.6 +/- 3.6% apoptosis nuclei / endothelium nuclei) の各細胞におけるアポトーシス応答の有意な増加を示した (Fig. 25)。
- ② アポトーシス制御タンパク質は、抑制タンパク質 Bel-2 が収縮負荷直後から低下し (1 D: -35%, 3 D: -60%, 7 D: -56%), 7 日目以降に回復した。対照的に促進タ

ンパク質 Bax は, 運動直後から 7 日目まで上昇傾向が持続されていた (1 D: +8%, 3 D: +88%, 7 D: +51%) (Fig. 27) .

- ③ ECC 収縮 7 日および 14 日後における筋線維膜直下のアポトーシス応答を筋組織による縦断的所見より明らかにした (Fig. 26).

以上のことから, ECC 収縮による筋細胞におけるアポトーシス応答は, 損傷-再生過程において誘発されることを明らかにした. また, これらの知見は, アポトーシスにおける生理学的意義が損傷過程, 再生過程によって異なることを示唆しており, 多核細胞である骨格筋特異的な特性を示していると考えられる.

第6章 低酸素環境下におけるエキセントリック収縮による

アポトーシス応答 (実験5)

6.1. 背景と目的

筋収縮によって誘発される低酸素, および物理的ストレスは複合的に作用することから, 各々ストレス因子と生体適応の関連性を明らかにすることが重要である. ECC 収縮は, 筋損傷を誘発する一方, ISO 収縮等と比較して著しい hypertrophy (筋肥大) (Hortobagyi *et al.*, 1996)と hyperplasia (細胞増殖) (Tamaki *et al.*, 1997)を引き起こすことが知られている. また, 筋収縮における複合ストレスの一つである低酸素ストレスを活動筋への血流制限 (BFR) によって増強させることを目的とした血流制限運動は, 低強度・短期間で筋肥大を惹起させることが報告されている (Takarada *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2006). しかしながら, 低酸素ストレスは, 筋細胞内において好中球の活性を促すことで活性酸素を誘導し (Raj *et al.*, 1998), 発生した活性酸素はアポトーシスを惹起することが報告されている (Power *et al.*, 2008). したがって, 低酸素環境下での ECC 収縮と筋損傷のアポトーシス応答に着目することは, 複合的ストレスによる骨格筋への影響について明確にする可能性がある.

本実験では, 筋収縮によって発生する低酸素ストレスの上昇が筋損傷およびアポトーシス応答を増強させるという仮説を立て, 筋収縮中における活動筋への BFR 負荷による影響の検証を試みた. 小動物用運動装置を用いて, 張力, 酸素分圧動態, 筋伸張量を指標とした BFR をともなった ECC 収縮の確立, さらに, 複合的ストレスの評価, 筋細胞の形態的变化, およびアポトーシス応答の解明を目的とした.

6.2. 方法

6.2.1. 実験動物および血流制限 ECC 収縮プロトコル

本実験には, 12 週齢の Wistar 系オスラット (体重 261 \pm 4 g, n = 64 : 日本 SLC) を用いた. ラットの後肢を運動負荷装置に固定し, 大腿部にカフ (WA98005, Hokanson) を巻き, 圧負荷 (強度: 120, 140, 160, 200 mmHg) を施すことにより TA 筋への血流を制限した. 圧負荷のタイミングは, ECC 収縮負荷 30 秒前に開始し, 収縮終了 30 秒後に除圧にした.

6.2.2. 分析項目

6.2.2.1. 発揮張力解析

筋収縮負荷時における発揮張力はひずみ計を介してコンピューター (Power Book, 1400c/133) と解析装置 (Mac Lab/8s : AD Instruments Pty. Ltd.) にてモニターし, 解析ソフト (chart 3.5.6/s : AD Instruments Pty. Ltd.) を用いて定量した. 電気刺激による発揮張力は, 記録された張力波形から ISO 張力および ECC 張力の両成分 (Fig. 8-d) ごとに最大値をプロットし $\text{mN}\cdot\text{m}$ として表記した.

6.2.2.2. 酸素分圧動態

収縮中の TA 筋における酸素分圧は, 酸素クエンチング法により測定した. 麻酔下において頸動脈にカニューレーション処置を施したラットに燐光プローブ R2 (0.014 g / kg body wight : Oxygen Enterprise, Ltd) をヘパリン (ヘキスト・マリオン・ルセス) を含んだ生理食塩水 (大塚製薬) に溶解し, カニューレを通して血管内へ注入した.

その後 37 °C に温めたホットプレート（バイオリサーチセンター：BWT-100）上にラットを仰臥位にして、対象となる脚をラット後肢運動計に固定した。測定する TA 筋は、励起光が直接筋に照射できるように、皮膚および筋膜を切開し露出させた。電気刺激による ECC 収縮を行うため、露出させた脛骨神経に双極鉤電極（TOG 205-053：ユニークメディカル）を設置した。微小血管内酸素分圧（ PO_{2m} ）は、TA 筋の中心部位から 2-4 mm 離して設置し、PMOD 2000（Oxygen Enterprises Ltd.）を使用して測定された。励起光（524 nm）は、TA 筋へと照射して燐光（700 nm）の Lifetime を測定した。 PO_{2m} は、電気刺激中 1 秒間隔で測定された。露出した筋の乾燥、温度低下を防ぐために Ringer 緩衝液（ $NaHCO_3$, $NaCl$, KCl , $MgSO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ / DW, pH 7.4, 37°C）を対象部位へ適時に滴下した。

測定された PO_{2m} 値は、単指数関数的なモデル式に回帰され、負荷前と負荷後の最小値の差とした。

6.2.2.3. 筋伸張量

ECC 収縮 1 回目、および 40 回目の収縮中における TA 筋の伸張程度の測定を行った。麻酔下のラットの後肢を運動装置に固定し、大腿部にカフを装着した。皮膚を切開し、開始、近位、中央、遠位、終点にマーカを置き、前脛骨筋神経に電極をセットした状況で、収縮負荷中のマーカの移動度を筋に対して垂直方向よりハイスピードカメラによって撮影を行った。露出した TA 筋の筋温維持と乾燥防止のために Ringer 緩衝液（pH 7.4, 37°C）を筋にかけながら実験を試みた。記録した動画は、FD-DAIS ソフトを用いてモーションキャプチャとして各部位のマーカの移動距離を解析した。

6.2.2.4. 筋損傷評価における形態学的分析

筋損傷の評価は、実験 4 と同様のプロトコルにより行った。

6.2.2.5. TUNEL 法による断片化 DNA の検出

アポトーシス核の同定は、実験 4 と同様のプロトコルにより行った。

6.2.2.6. 筋肥大因子 (S6K1) 活性の定量

収縮負荷 2 時間後に筋は摘出され、ホモジナイズバッファー中 (4°C) にてホモジナイザー (ポリロン, PT-3100: Kinematic AG) でホモジネートし、遠心分離機を用いて遠心し (8000 g, 15 min, 4°C), 上清を採取した。SDS 緩衝液中において、7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルをセミドライ式転写法によりメンブレン (PVDF: milipor) に転写 (20V, 45 min) し、10% スキムミルクでブロッキング (60 min, RT) を行った。筋肥大因子タンパク質 p70S6K の活性を評価は、p70S6 kinase Ab (# 9202: Cell Signaling), Phospho-p70S6K-Thr389 Ab (# 9205: Cell Signaling) を用いて同定した。最後に、ECL plus Western Blotting Detection System (RPN2132: Amersham Biosciences) により検出されたバンドは、p70S6K における総タンパク質発現量に対する phospho-p70S6K 発現量を CS analyser を用いてデンシトメトリーから評価した。

6.2.3. 統計処理

実験の統計量は平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示した。個体間の ECC 群と BFR+ECC 群の比較には一元配置の分散分析により行い、有意な p 値が得られたとき、Fisher PLSD 法によりグループ間の多重比較を行った。なお、5%未満の危険率

を有意水準とした。

6.3. 結果

6.3.1. 発揮張力

200-BFR+ECC 群の張力は、ECC 群と比較して、収縮 20 回目以降では、ISO 張力成分では低下したが (Fig. 28), ECC 張力成分においては維持されていた (Fig. 29). 収縮負荷中の ISO 張力成分の平均は、ECC 群 ($8.51 \pm 1.64 \text{ mN}\cdot\text{m}$) よりも 200-BFR+ECC 群 ($5.5 \pm 1.09 \text{ mN}\cdot\text{m}$) において有意に低い値を示した ($p < 0.05$). しかしながら、ECC 張力成分の平均は、ECC 群 ($15.45 \pm 2.09 \text{ mN}\cdot\text{m}$) と 200-BFR+ECC 群 ($16.46 \pm 1.82 \text{ mN}\cdot\text{m}$) において有意な差異はみられなかった。

6.3.2. 酸素分圧動態

本実験では、測定した $\text{PO}_{2\text{m}}$ 動態における回帰式より得られたベースラインと $\Delta \text{PO}_{2\text{m}}$ の差を最低酸素分圧値 ($\text{PO}_{2\text{m}, \text{min}}$) とした。収縮中の $\text{PO}_{2\text{m}, \text{min}}$ は、ECC 群 ($5.2 \pm 0.4 \text{ mmHg}$) と比較して 120-BFR+ECC ($3.1 \pm 0.3 \text{ mmHg}$), 200-BFR+ECC 群 ($1.8 \pm 0.2 \text{ mmHg}$) において有意に低値であった ($p < 0.05$, Fig. 30).

6.3.3. 筋伸張量

ECC 収縮 1 回, および 40 回目における各部位の筋伸張量について解析を行っ

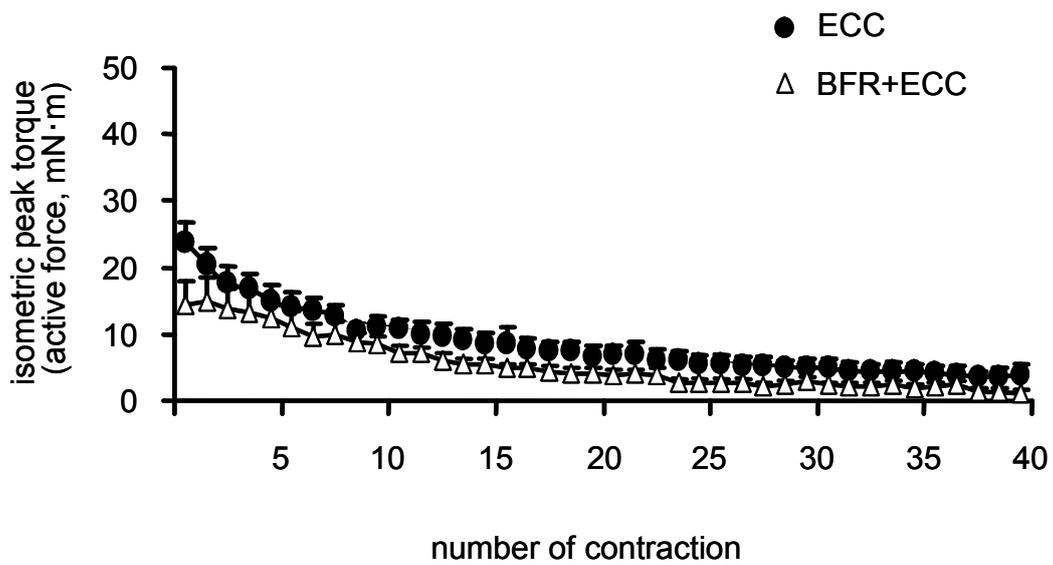


Fig. 28 The peak torque of ISO element were measured in 40 times-repeated ECC and 200-BFR+ECC. Values are mean +/- SE.

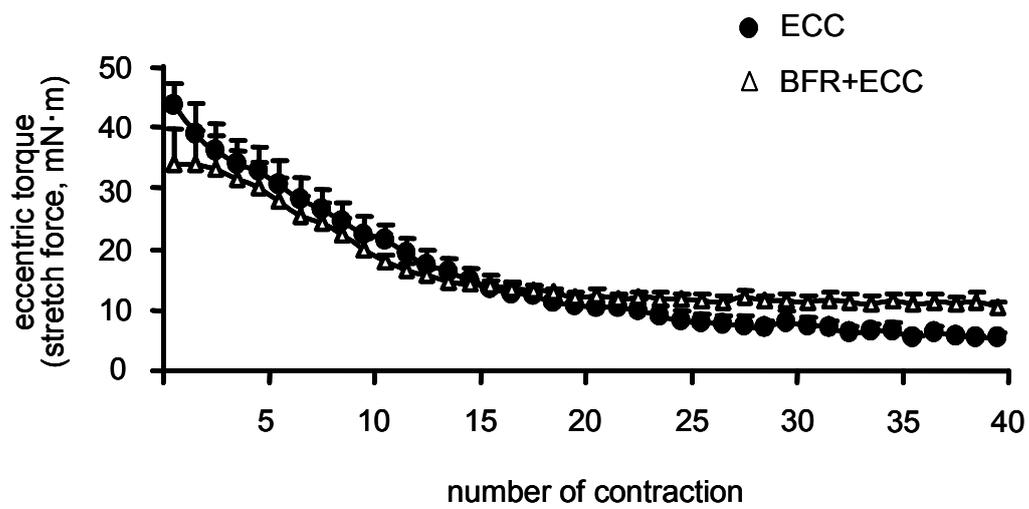


Fig. 29 The peak torque of ECC element were measured in 40 times-repeated ECC and 200-BFR+ECC. Values are mean +/- SE.

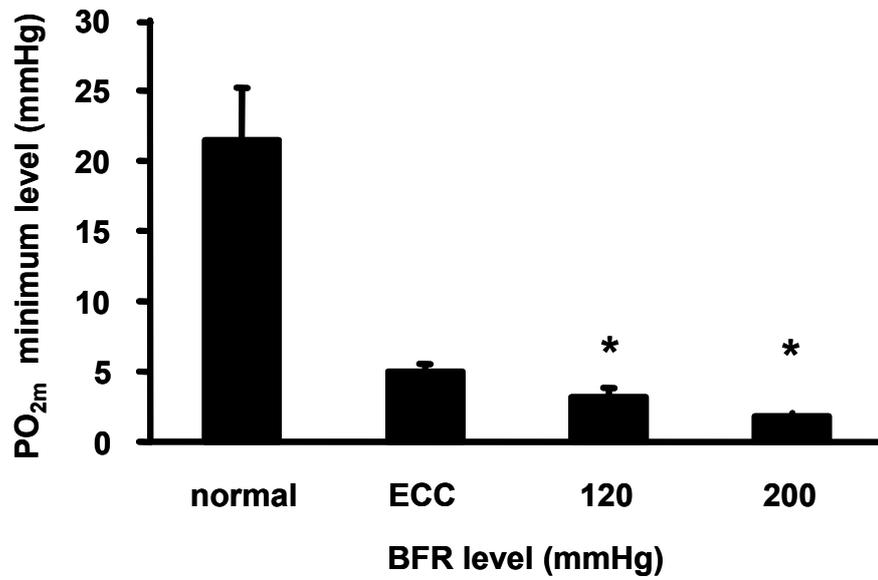


Fig. 30 PO_{2m} minimum level during ECC and 120-, 200- BFR+ECC. Values are mean +/- SE. *p < 0.05 vs. ECC.

た. ECC 収縮 1 回, 40 回目の伸張量は, ECC 群, BFR+ECC 群ともに, 遠位部が近位・中央部よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$, Fig. 31). ECC 収縮 1 回目における近位部の伸張量は, ECC 群と BFR+ECC 群の間に有意差はみられなかった (Fig. 31-a). しかしながら, ECC 収縮 40 回目においては, 近位部での伸張量は, 両群間で有意な差が観察された (Fig. 31-d).

6.3.4. 筋損傷の組織学的評価

ECC 群における収縮負荷後の筋損傷は, 1, 3 日後に筋細胞の浮腫・血球の浸潤などの炎症応答, 7, 14 日後では中心核の出現などの再生応答が観察された. 筋損傷割合は, ECC 群 ($26.4 \pm 4.0\%$) と比較して, 120-BFR+ECC 群 ($26.2 \pm 7.0\%$) では差異はなかったが, 140- ($2.6 \pm 0.5\%$), 160- ($2.7 \pm 0.7\%$), 200- ($0.3 \pm 0.01\%$) BFR+ECC 群においては有意に低かった ($p < 0.05$). したがって, 120 mmHg と 140 mmHg BFR の間には筋損傷の誘発閾値が存在することが明らかとなった (Fig. 32, 33).

6.3.4. 単位面積当たりのアポトーシス応答

本実験では, 筋細胞, および, 間隙細胞における単位面積に対する TUNEL 陽性核の定量を行った. 200-BFR+ECC 収縮負荷による筋細胞中のアポトーシス核は, ほとんど観察されなかった (1 D: 0.11 ± 0.11 , 3 D: 0.43 ± 0.43 , 7 D: 0.43 ± 0.43 , 14 D: 0.53 ± 0.53 , myofiber apoptosis nuclei / mm^2). 間隙細胞におけるアポトーシス核は, 収縮負荷 3, 7, 14 日後にて高い値を示した (1 D: 0.21 ± 0.11 , 3 D: 1.39 ± 0.91 , 7 D: 0.96 ± 0.55 , 14 D: 1.60 ± 1.28 , extraxellular apoptosis nuclei / mm^2). しかしながら, 単独の ECC 収縮負荷によるアポトーシス核の発生 (実

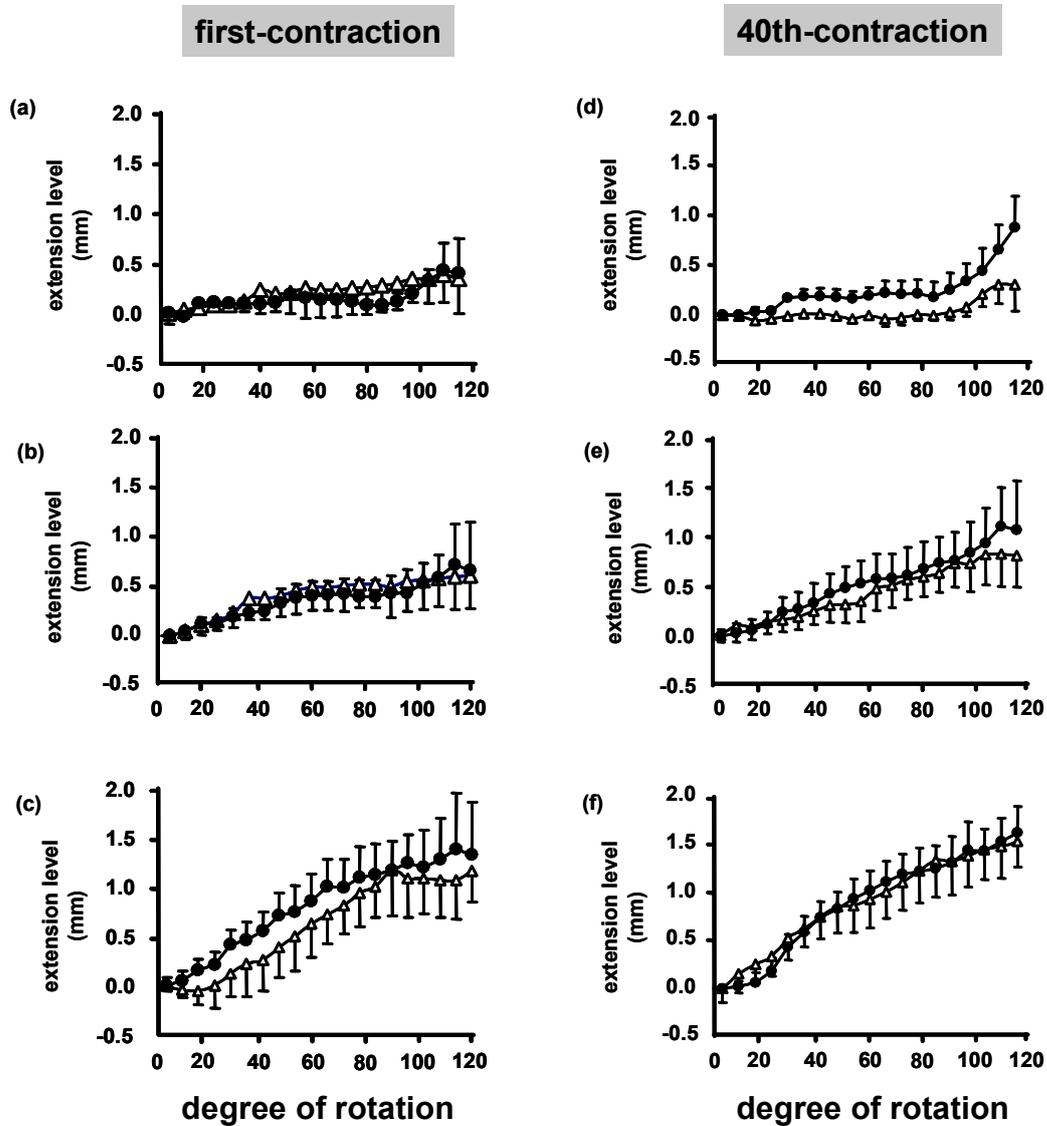


Fig. 31 The extension level of TA muscle during 0 to 120 degree in ECC (circle) and BFR+ECC (triangle) at first (a-c) and 40th (d-f) contraction. The proximal position (a, d), middle position (b, e), distal position (c, f). Values are mean +/- SE.

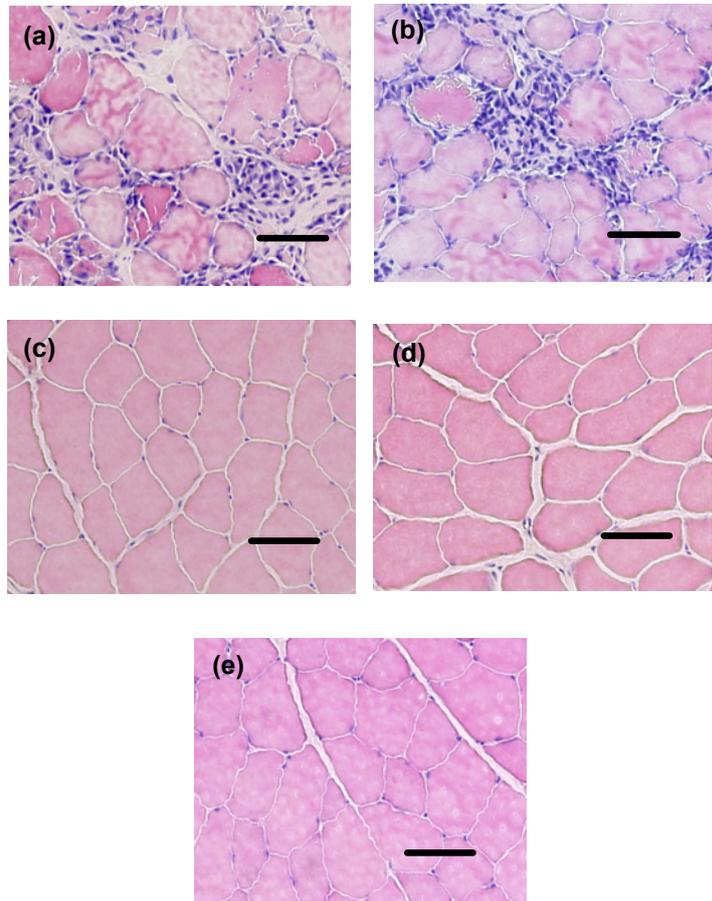


Fig. 32 The photomicrographs of cross sections of TA muscle 3 D after ECC (a), 120-BFR+ECC (b), 140-BFR+ECC (c), 160-BFR+ECC (d), 200-BFR+ECC (e) by H&E satined. Bar = 50 μ m.

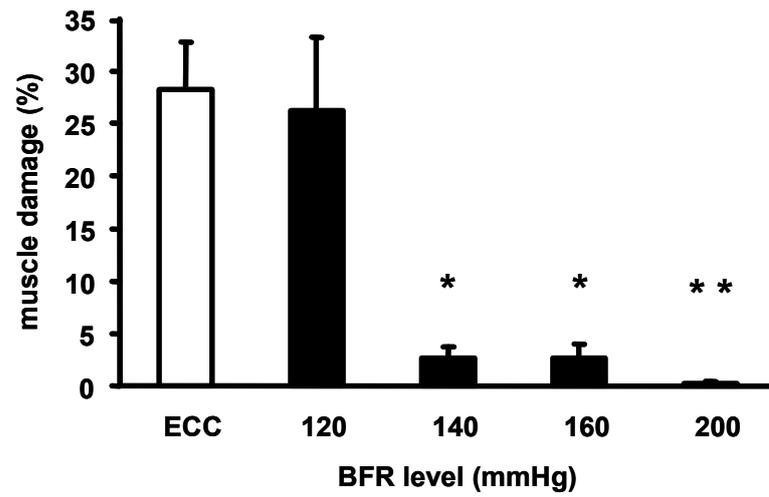


Fig. 33 Percentage of muscle damage after ECC and 120-, 140-, 160- and 200- BFR+ECC. Values are mean +/- SE. * $p < 0.05$ vs. ECC, ** $P < 0.01$ vs. ECC.

験 4) よりもいずれも低い値であった (Fig. 34, 35).

6.3.5. 筋肥大因子の定量

p70S6K1 のリン酸化活性発現比は、ECC 群, 200- BFR+ECC 群とも対照群 (無負荷) よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$). さらに、ECC 群と BFR+ECC 群における差はみられなかった (Fig. 36).

6.4. 考察

本研究は、ラットを対象とした ECC 収縮中における活動筋への血流制限を施すことで低酸素ストレスを増強させるモデルを確立し、運動と低酸素の複合的ストレスが骨格筋へおよびアポトーシス応答について検証した。

6.4.1. 血流制限運動モデルの確立

筋収縮における活動筋は、酸素を必要とし、それらは血液によって運搬されている。特に末梢循環における血流は、酸素や栄養物など組織が必要とする物質を供給するとともに、二酸化炭素や代謝産物などの老廃物を洗い出す重要な役割を果たしている。近年、活動筋の血流制限をともなった運動が、通常の運動トレーニングよりも低強度・短時間で骨格筋の肥大を誘発することが報告されている (Takarada & Ishii, 2002; Abe *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2007; Nakajima *et al.*, 2008; Madarame *et al.*, 2009; Manini & Clark, 2009; Suga *et al.*, 2009). Abeら (2006) は、ヒトの大腿部を対象として、止血帯を用いて外部から血流制限を施し、日常レベルの負荷強度

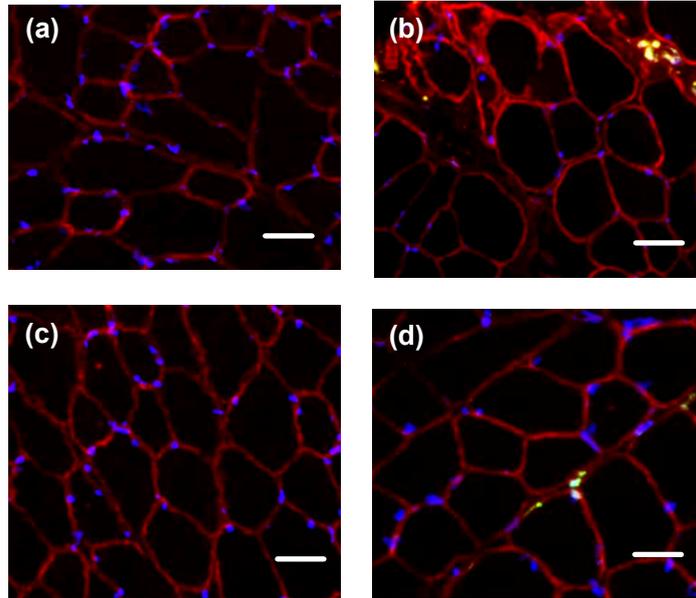


Fig. 34 Cross-sections from 1 D (a), 3 D (b), 7 D (c) and 14 D (d) after 200- BFR+ECC in TA muscle. Triple histochemical staining for myofiber apoptotic nuclei. Bar = 50 μ m.

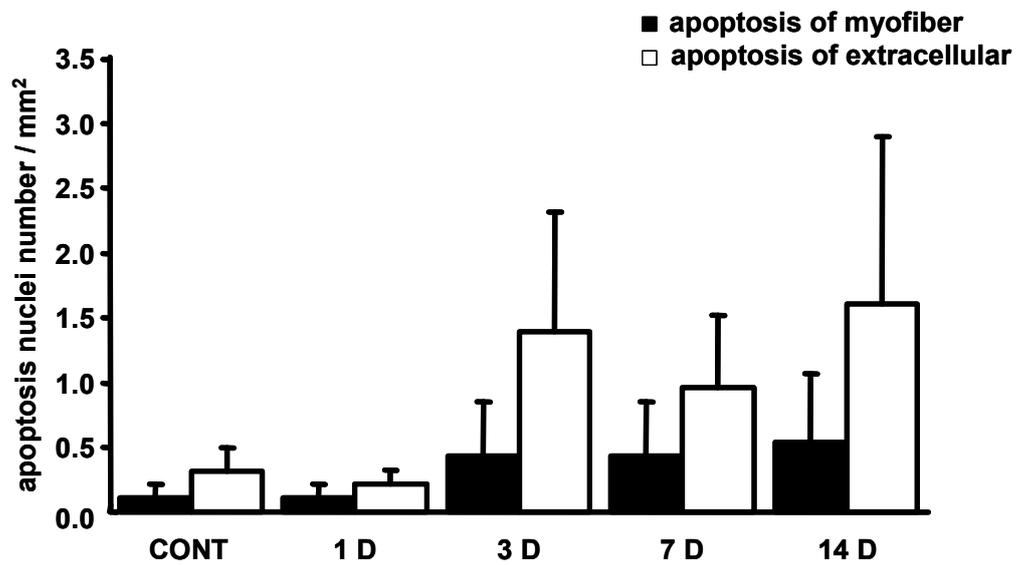


Fig. 35 Time course of changes in ECC with BFR induced in myofiber and extracellular apoptosis nuclei. TUNEL-positive nuclei per mm² in ECC with BFR in rats. Values are means +/- SE.

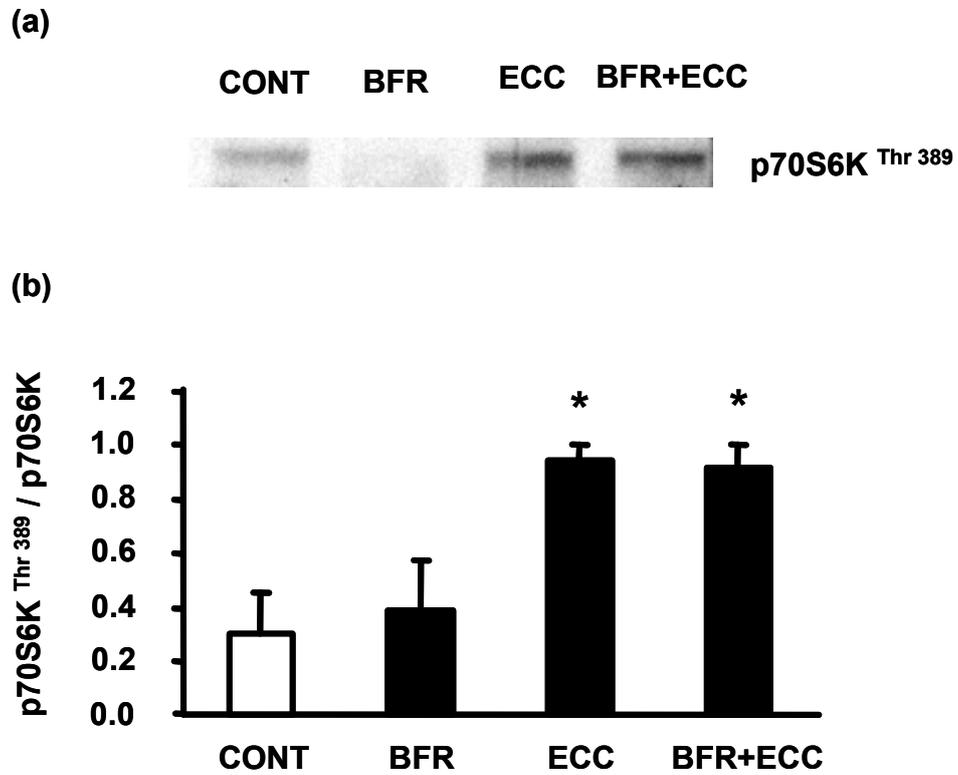


Fig. 36 Phosphorylation of downstream indicator of mTOR signaling (p70S6K) in CONT, BFR, ECC and BFR+ECC. Values are expressed as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. CONT.

(20% 1 RM, 1 RM: 最大挙上負荷) の運動トレーニング (期間: 2 週間) により, 約 8% の筋断面積の増加が起こることを見出した. 筋力トレーニングでは, 通常, 筋肥大を誘発するトレーニングに必要とされる負荷強度は, 65% 1 RM 以上であると指摘されており, 先立って筋力増加が起こり, 有意な筋肥大が検出されるまでには最低 10 週を要するとされていた (McDonagh & Davies, 1984). この知見は, これまでの常識をくつがえすのもであったが, いくつかの疑問点があげられる. 一つ目は, これらの知見は, 全てヒトを対象とした研究であり, 筋肥大の指標の一つである筋の横断面積は非侵襲的技術 (MRI) を用いて測定されたことである. MRI では, 増加した横断面積が, 筋線維で発生した浮腫などの炎症応答, もしくは, 筋の肥大のどちらに起因したものかを判断することはできない. 二つ目は, 血流制限をとまなう運動により筋肥大が誘発されるメカニズムについては, 明確になっていない点である. Takarada ら (2000) は, 血流制限をとまなった運動直後における血液中の成長ホルモンの濃度上昇を報告したが, 実際, 筋細胞内においてどのような機序により肥大が誘発されるのかを明らかにした論文は少ない (Fujita *et al.*, 2007). 三つ目は, 血流制限による低酸素状況下が骨格筋へ与える影響である. 細胞は虚血や低酸素環境下では, ATP 合成能力が低下するため, エネルギー供給が遮断されることから, ATP を必要とする caspase に関連するアポトーシス制御系が機能不全を起こし細胞死に至る可能性が高い.

これらの問題点を明確にするには, 骨格筋に対するマイクロなアプローチが試行可能である動物モデルが必要であった. しかしながら, 血流の制限をとまなないながら運動を負荷する動物モデルはこれまでの皆無であった. そこで, 実験 5 では, ラットの大腿部にカフを装着させ, 運動装置を用いた筋収縮を施すモデルを作成した. 本実験より 120 mmHg 以上の圧負荷をとまなった ECC 収縮の場合, 微小血管内の酸素分圧は, 単独の ECC 収縮よりも有意な低値を示した (Fig.30). 一般に, 低酸素状態では, 筋は疲労しやすいといわれている. Takarada ら (2000) は, ヒトをモデルとした研究に

において、血流制限中の筋活動では、多数の筋線維が活動することを報告した。すなわち、筋への酸素供給の低下とともに、乳酸などの代謝産物の除去が阻害された結果、疲労による筋張力の低下が生じる。そのため、疲労した筋線維の代わりに多数の筋線維が動員されることを指摘している。本実験では、ISO 張力成分 (Fig. 28) は BFR + ECC 群において収縮回数に依存して低下し、ECC 張力成分 (Fig. 29) では、収縮回数が 20 回目以降では低下することなく一定に保たれていた。これは、本実験では麻酔下のラットモデルを用いているため、電気刺激による ECC 収縮においてはほとんどの筋線維が動員されることから、Takarada ら (2000) が指摘した疲労に関連した選択的な筋線維動員メカニズムに起因する張力上昇ではないと推測される。低酸素により疲労した筋は、単収縮張力の低下に比べて大幅な弛緩時間の延長が認められる (Walling, 1999)。これは、極度のエネルギー欠乏状態などで筋内の ADP 濃度が上昇し、クロスブリッジ (アクチン-ミオシン結合) が離れにくくなることに起因すると考えられており、このような状況下では筋は拘縮という現象を引き起こす。筋のスティフネスが上昇、すなわち硬くなると、受動張力の上昇が起こることが指摘されている (Proske & Morgan, 2001)。したがって、ECC 収縮中の低酸素状況下により筋が疲労し結果的に ECC 張力成分では受動張力が上昇したと考えられる。

また、本実験では、TA 筋における ECC 収縮中の伸張量について検証した。近位・中央・遠位部における筋表面の伸張量は、遠位では近位・中央部よりも高い値を示した。また、近位部における ECC 収縮 1 回目と 40 回目の伸張量を比較すると、BFR による低酸素状況下の ECC 収縮 40 回目では、伸展範囲 0-100 degree の伸張量が 1 回目よりも低い値であった (Fig. 31)。BFR をともなった ECC 収縮 1 回目よりも 40 回目では筋線維内の低酸素レベルが増しているのは明らかであり、その影響が近位部における伸張量の違いに表れているのかもしれない。

6.4.2. 筋損傷の抑制

本実験では、仮説とは異なり、血流制限による低酸素環境下における ECC 収縮は、筋損傷を誘発しないことが明らかとなった (Fig. 33). 単独の ECC 収縮による筋損傷の主な要因は、第 3 章でも述べたとおり、機械的刺激による細胞膜の損傷が細胞内の Ca^{2+} 濃度の恒常性を破綻させることであると考えられている (Armstrong, 1984; Stauber & Smith, 1998; Clarkson & Sayers, 1999; Friden & Lieber, 2001; Warren *et al.*, 2007; Sonobe *et al.*, 2008). したがって、本実験モデルでは細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するような状況に至らなかったことが予想される. 筋細胞内における Ca^{2+} 濃度の上昇については、細胞膜表面に局在する機械受容チャネル (stretch-activated channel: SAC) の関与が指摘されている (Yeung & Allen, 2004). Yeung ら (2005) は、SAC 阻害剤により細胞外からの Ca^{2+} の流入をブロックした上で ECC 収縮負荷について検証したところ、細胞内での Ca^{2+} 濃度の上昇は観察されなかった. 対照的に、細胞膜タンパク質であるジストロフィン欠損マウスの筋細胞では SAC の構造変化が起きやすいことから筋線維の脆弱性を有することを報告した. ラットの骨格筋を対象とした *in vivo* イメージングの研究において、ECC 収縮負荷では筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇がみられたが、ISO 収縮負荷および SAC ブロック下の ECC 収縮負荷においてはわずかな上昇しか観察されていない (Sonobe *et al.*, 2008). 本実験では、低酸素ストレスの増大をともなった ECC 収縮では、筋線維における伸張程度が抑制され SAC の構造変化が誘導されないことから、細胞外からの Ca^{2+} の流入が阻害され、結果的に筋損傷の発生を抑制されたのかもしれない. その要因としては、低酸素下における ECC 収縮負荷による近位部の伸張程度が単独の ECC 収縮より低い値を示したこと、または、筋の拘縮に起因すると思われる受動張力の上昇がみられたことから推察される.

6.4.3 アポトーシス応答の抑制

アポトーシスを誘導する要因は様々であるが、低酸素と運動ストレスに関係するものとしては、 Ca^{2+} 濃度の上昇、cAMP レベル、エネルギー代謝などが考えられる。細胞内における Ca^{2+} 濃度の上昇は、結果的にエンドヌクレアーゼの活性化により DNA の断片化を誘導するが、本実験では、筋損傷が誘発されなかったことから細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が抑制されていると推測される。また、アポトーシスを誘導する cAMP は、ATP より産生される (McConkey *et al.*, 1990)。低酸素環境下により ATP 合成能力が低下したため cAMP の産生が減少しアポトーシス誘導が抑制されたかもしれない。さらに、アポトーシス実行因子である caspase の活性化は ATP 濃度に依存することが報告されている (Eguchi *et al.*, 1997) ことをふまえると、caspase 依存経路によるアポトーシスの発生の抑制も要因として考えられる。

低酸素ストレスを増大させた ECC 収縮モデルは、筋細胞アポトーシス応答の発生を抑制したが、間隙細胞においては負荷後 3 日から 14 日にかけて無負荷群よりも高い値を示した。本実験における間隙細胞は、細胞膜タンパク質であるジストロフィンの外側に局在する細胞（内皮細胞、衛星細胞、貪食細胞など）を指している。虚血と内皮細胞アポトーシスの関係において、これまで、虚血 - 再灌流による活性酸素の発生がアポトーシスを誘発することが指摘されている (Wang *et al.*, 2006)。本実験においても興味深いことに、間隙細胞におけるアポトーシスの発生が、収縮負荷から 7, 14 日後において観察された。今後、細胞種の同定をふまえて検証していく必要がある。

6.4.4. 筋肥大因子の活性化

骨格筋の肥大は、筋タンパク質合成能の増加と衛星細胞の活性により起こる。それらの機構は細胞内シグナル伝達経路により制御されているが、その中でもインスリンや IGF-I などの成長を促進するホルモンは、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ

(PI3K) やプロテインキナーゼ B (PKB) などの上流のキナーゼを断続的に活性化させることによって mTOR (mammalian target of rapamycin: 哺乳類における免疫抑制剤ラパマイシン標的タンパク質) と呼ばれるセリン / スレオニンタンパク質を制御している (Sekulic *et al.*, 2000). その下流のターゲットがリボソームタンパク質 S6 プロテインキナーゼ (S6K1) である. S6K1 のリン酸化による活性化は最終的に細胞タンパク質合成能力を増大させる. Fujita ら (2007) は, ヒトにおける血流制限をともなったレジスタンス運動負荷 3 時間後において, 筋タンパク質合成能が 46%も増加したこと示し, 同時に S6K1 の活性が単独の運動群よりも 3 倍も上昇したことを報告した. しかしながら, 血流制限運動による筋肥大に関連した再構築において発現する遺伝子の検討では, 衛星細胞の活性 (p21, MyoD), および, タンパク質の代謝回転シグナル (MurF1) は上昇し, 筋成長抑制因子 (myostatin) は減少したが, 血流制限を施さなかった群との有意差は得られなかった (Drummond *et al.*, 2008). Fujita ら (2007) および Drummond ら (2008) のモデルは同一であることから, 遺伝子発現の時間差がタンパク質合成経路因子と筋線維の増殖・分化関連因子における発現の相違を招いたのかもしれない (Manini & Clark, 2009). 本実験で用いたラットの BFR+ECC モデルにおける S6K1 の活性ピークは, 予備実験により, 運動負荷 2 時間後であったことから, そのタイミングを評価ポイントと設定した. S6K1 のリン酸化活性は, 運動無負荷群と比較して有意に高い活性が得られたが, 単独の ECC 収縮群との差はみられなかった (Fig. 36). したがって血流制限による低酸素環境下における ECC 収縮は, タンパク質合成経路の亢進を促すことが示唆された.

6.5. 要約

実験 5 では, ECC 収縮による活動筋への血流を制限するモデルを作成し, 収縮負

荷中における低酸素刺激下での ECC 収縮による筋組織への影響, およびアポトーシス応答について検証した. その結果, 以下のような知見を得た.

- ① 血流制限をともなった ECC 収縮では, ISO 張力成分が低下し (ECC 群: 8.51 ± 1.64 mN·m, BFR+ECC 群: 5.5 ± 1.09 mN·m), ECC 張力成分が上昇する (ECC 群: 15.45 ± 2.09 mN·m, BFR+ECC 群: 16.46 ± 1.82 mN·m) ことから受動張力が高まることが示唆された (Fig. 28, 29).
- ② 収縮負荷中の微小血管中の最低酸素分圧 ($PO_{2m,min}$) は, 単独の ECC 収縮負荷 (5.2 ± 0.4 mmHg) と比較して, 200-BFR (3.1 ± 0.3 mmHg), 120-BFR (1.8 ± 0.2 mmHg) において有意に低い値であった (Fig. 30).
- ③ ECC 収縮時の筋伸張量は, 近位部において ECC 収縮 1 回目よりも 40 回目では BFR をともなったことで低下する傾向が示された (Fig. 31).
- ④ ECC 収縮誘発性筋損傷は, 120-BFR+ECC ($26.2 \pm 7.0\%$) では観察されたが, 140- ($2.6 \pm 0.5\%$), 160- ($2.8 \pm 0.7\%$), 200- ($0.3 \pm 0.01\%$) BFR をともなう ECC 収縮においては抑制されることが明らかになった (Fig. 35).
- ⑤ 200-BFR+ECC 収縮負荷により, 筋細胞におけるアポトーシス応答 (1 D: 0.11 ± 0.11 , 3 D: 0.43 ± 0.43 , 7 D: 0.43 ± 0.43 , 14 D: 0.53 ± 0.53 , myofiber apoptosis nuclei / mm²) はみられなかった. また, 間隙細胞では収縮負荷 3, 7, 14 日後においてアポトーシス応答 (1 D: 0.21 ± 0.11 , 3 D: 1.39 ± 0.91 , 7 D: 0.96 ± 0.55 , 14 D: 1.60 ± 1.28 , extracellular apoptosis nuclei / mm²) が観察されたが単独の ECC 収縮負荷よりも低い値であった (Fig. 35).

⑥ 血流制限をともなった ECC 収縮負荷は単独の ECC 収縮と同様に筋肥大因子を活性化することが示された (Fig. 36).

以上のことから, ECC 収縮中の血流制限による活動筋への低酸素ストレスの増大は, 筋損傷とアポトーシス応答を抑制することが明らかとなった. また, 損傷, アポトーシス応答を抑制するにもかかわらず筋肥大因子は活性化することが示された. したがって, 低酸素ストレスをともなった筋収縮負荷は, 筋損傷を誘発せずに筋のタンパク質合成能を上昇させ筋肥大を導くプログラムであると考えられる.

第7章 糖尿病骨格筋におけるアポトーシス応答 (実験 6)

7.1. 背景と目的

糖尿病は、糖代謝における恒常性破綻を招くと同時に骨格筋萎縮の合併症を引き起こす。糖尿病患者は40歳代以降に急激な増加を示すことが報告されている(2008年, 厚生労働省)。糖尿病骨格筋における筋収縮による細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答(再生・治癒・肥大)が正常状態であることは考えにくい, これらに関する知見は極めて少ない。通常, 筋タンパク質の合成と分解バランスは保たれているが, 糖尿病ラットモデルにおける筋では, タンパク質合成速度は正常ラットよりも有意に低く, 対照的にタンパク質分解速度は極めて高いことが報告されている(Farrell *et al.*, 1999; Baviera *et al.*, 2007)。

一般的に, 筋萎縮を生じた筋線維において, アポトーシスが発生することが知られている。筋萎縮に関与したアポトーシス発生機序には, 二通りあると考えられる(Siu & Alway, 2009)。一つは, 筋タンパク質合成能の低下により, 筋核の支配領域に変動が生じ, その結果, 筋核の脱落がアポトーシスによって行われる機序が報告されている。また, 対照的に筋核がアポトーシスによって除去されることで, 残り筋核による支配領域が広範囲となるため筋タンパク質の分解, すなわち筋萎縮が発生すると考えられている。糖尿病の骨格筋においてもアポトーシス応答が観察されることから, 筋萎縮における核の脱落に起因するものでないかと考えられる。さらに, 糖尿病の発症に起因したミトコンドリアの機能不全によるアポトーシスの発生も報告されている(Stark & Roden, 2007; Peterson *et al.*, 2008)。

このような糖尿病の進行にともなう筋萎縮・筋量の低下は, 糖代謝の破綻を促すだけでなく, 筋機能低下による活動水準の減少も引き起こす。糖尿病による加速度的な

筋量の減少が Quality of life (QOL) の低下を招くことは明らかであり、筋量維持を促す運動療法が必要とされている。これまで、代謝の恒常性維持を目的とする運動療法は多く推奨されてきたが、筋肥大を促すような ECC 収縮運動についての報告は少ない。これまでの先行研究では、筋力トレーニングは、GLUT4、インスリン受容体、肥大因子である Akt のタンパク量を増加させることが示されている (Holten *et al.*, 2004)。さらに、糖尿病患者における 6 ヶ月の高強度レジスタンストレーニングは、筋量を維持する効果があったと指摘されている (Dunstan *et al.*, 2005)。しかしながら、Katta ら (2008) は、糖尿病ラットにおけるレジスタンストレーニングがタンパク分解促進因子である MAPKs や p38 を促進することを報告していることから、レジスタンス運動が糖尿病骨格筋に及ぼす影響について、さらなる検討が必要である。したがって実験 6 では、薬理的投与による 1 型糖尿病ラットモデルを作成し、ECC 収縮誘発性筋損傷におけるアポトーシス応答を経時的に検証することで細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答について明らかにすることを目的とした。

7.2. 方法

7.2.1. 糖尿病モデル作成および ECC 収縮プロトコル

本実験には、11 週齢の Wistar 系オスラット (体重 209 \pm 9 g, N = 30 : 日本 SLC) を用いた。ラットの飼育は、実験 1 のプロトコルにしたがった。

1 型糖尿病モデルは、ストレプトゾトシン (STZ, S0130: Sigma) を腹腔内に投与し (45 mg / kg of body weight in saline solution) 作成した。尿試験紙 (新ウリエース Ga, テルモ) を用いて毎日尿糖値測定を行い、500 mg / dl 以上であることを確認をした。STZ 投与後、1 週間飼育した後に糖尿病モデルラット (D 群) として実験に用い

た. 実験終了後において, 尾部より採血を行い, 血糖値が 300 mg / dl 以上であるものを評価対象とした. ECC 収縮負荷は, 実験 4 と同様のプロトコルで行った. また, 正常モデル (N 群) における各データは, 実験 4 で得られたものを用いた.

7.2.2. 分析項目

7.2.2.1. 発揮張力解析

筋収縮負荷時における発揮張力はひずみ計を介してコンピューター (Power Book, 1400c/133) と解析装置 (Mac Lab/8s: AD Instruments Pty. Ltd.) にてモニターし, 解析ソフト (chart 3.5.6/s: AD Instruments Pty. Ltd.) を用いて定量した. 筋収縮による発揮張力は, 記録された張力波形から最大値をプロットし $\text{mN}\cdot\text{m}$ に換算し, 40 回の平均張力を算出した.

7.2.2.2. 筋損傷評価における形態学的分析

摘出した筋は, 実験 4 のプロトコルと同様に H&E 染色を施し, 筋横断像における画像を取得した. 筋損傷割合は, 実験 4 と同様に定量を行った.

筋収縮無負荷の対照群 (CONT) における筋横断面積は, 各画像の筋細胞の輪郭をトレースし, パソコンに取り込んだ画像を Image J を用いて定量した. 解析対象は, TA 筋における横断面の中央部 (筋線維数 N 群; 271 \pm 16 本, D 群 316 \pm 18 本, N = 4 - 6, each group) とした.

アポトーシス応答における筋組織学的評価は, 実験 4 と同様のプロトコルにしたがって行った.

7.2.3. 統計処理

実験の統計量は平均値 \pm 標準誤差として示し, 二元配置の分散分析により行い, 有意な p 値 ($p < 0.05$) が得られたとき, Fisher PLSD 法によりグループ間の多重比較を行った. なお, 5%未満の危険率を有意水準とした.

7.3. 結果

7.3.1. 無負荷モデルにおける筋重量・筋横断面積・血糖値

無負荷モデル (CONT) の体重 (BW.) および筋重量 (MW.) は, D 群 (BW.: 209 \pm 9 g, MW.: 0.28 \pm 0.16 g) が N 群 (BW.: 272 \pm 14 g, MW.: 0.46 \pm 0.26 g) よりもそれぞれ有意に低い値を示した ($p < 0.05$). また, BW.あたりの MW.では, D 群 (1.35 \pm 0.03 mg / g) は, N 群 (1.71 \pm 0.03 mg / g) と比較して有意に低い値であった ($p < 0.05$, Table. 4).

CONT 群における筋線維横断面積は, N 群 (3140 \pm 319 μm^2) よりも D 群 (1698 \pm 107 μm^2) において有意に低値を示した ($p < 0.05$, Table. 4).

筋摘出時の血糖値は N 群 (107 \pm 11 mg / dl) よりも D 群 (485 \pm 33 mg / dl) において極めて高い値を示した.

7.3.2. 発揮張力

ECC 収縮中における平均発揮張力は, D 群 (26.2 \pm 5.42 mN \cdot m) では N 群 (118 \pm 17.94 mN \cdot m) と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.05$). また, 単位面

Table 4. General characteristics of experimental animals.

	BW (g)	MW (g)	CSA (μ m ²)	blood glucose level (mg/dl)
Normal	272 +/- 14	0.46 +/- 0.26	3140 +/- 319	107 +/- 11
Diabetes	209 +/- 9	*0.28 +/- 0.16	*1698 +/- 107	*485 +/- 33

**Values are mean +/- SE (n = 5 - 6, each group). CSA : cross-section area.
*p < 0.05 vs. Normal.**

積あたりの平均発揮張力においても D 群 ($175 \pm 2 \text{ mN}\cdot\text{m} / \text{mm}^2$) は N 群 ($398 \pm 3 \text{ mN}\cdot\text{m} / \text{mm}^2$) よりも有意に低い値であった ($p < 0.05$, Fig. 37).

7.3.4. 組織学的筋損傷評価

N, D 群の CONT における炎症は観察されなかった. D 群における ECC 収縮負荷後の筋損傷率 (1 D: $0.9 \pm 0.4\%$, 3 D: $9.7 \pm 1.7\%$, 7 D: $3.7 \pm 2.6\%$, 14 D: $0.1 \pm 0.0\%$) は, 3 日後において有意な上昇がみられた ($p < 0.05$, Fig. 38, 39). 中心核を有する再生筋は, N 群 (7 D: $3.2 \pm 1.8\%$, 14 D: $2.4 \pm 1.9\%$) では 7 日後に多く観察されたが, D 群 (7 D: $0.5 \pm 0.1\%$, 14 D: $6.3 \pm 4.2\%$) では 14 日後に観察された ($p < 0.05$, Fig. 40). したがって, 損傷-再生過程は, D 群では N 群よりも遅延したことが明らかとなった. また, D 群における筋損傷割合は, N 群と比較して各時系列において有意に低い値 ($p < 0.05$) であることが示された.

7.3.5. アポトーシス応答

本実験より, D 群における損傷過程において筋細胞アポトーシスの発生が観察された. 特に, ECC 収縮負荷 1 日後の浮腫を起こした筋細胞において, D 群ではアポトーシス発生が顕著であった (Fig. 41).

N, D 群における ECC 収縮負荷による筋細胞の TUNEL 陽性核の発生を単位面積あたりに換算して定量を行った. 本実験では, 両群ともに収縮負荷 3 日後については, 炎症応答が著しく細胞種の判別が不可能だったため定量を行なうことが不可能であった. 筋細胞アポトーシスは, N 群では無負荷モデル (CONT: $1.04 \pm 0.73 \text{ myofiber apoptosis nuclei} / \text{mm}^2$) と比較して収縮負荷 7 日後 (7 D: $7.21 \pm 3.78 \text{ myofiber apoptosis nuclei} / \text{mm}^2$) に有意な増加を示した. D 群では収縮 1 日後

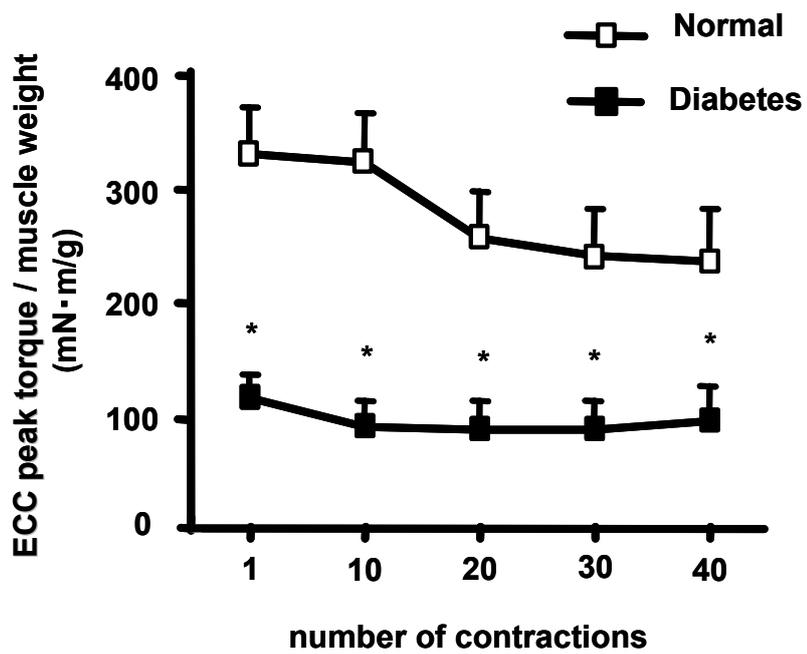


Fig. 37 Peak torque per muscle weight of ECC in normal and diabetes models. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. normal.

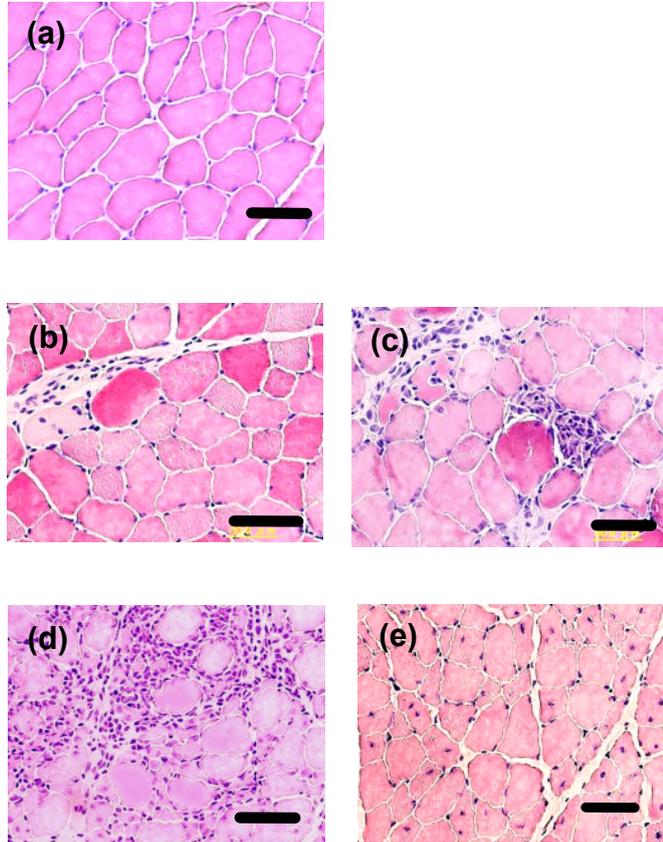


Fig. 38 Light micrographs of transversely section tibialis anterior muscle in diabetes. (a) CONT, (b) 1 D, (c) 3 D, (d) 7 D and (e) 14 D after ECC. Bar = 50 μm .

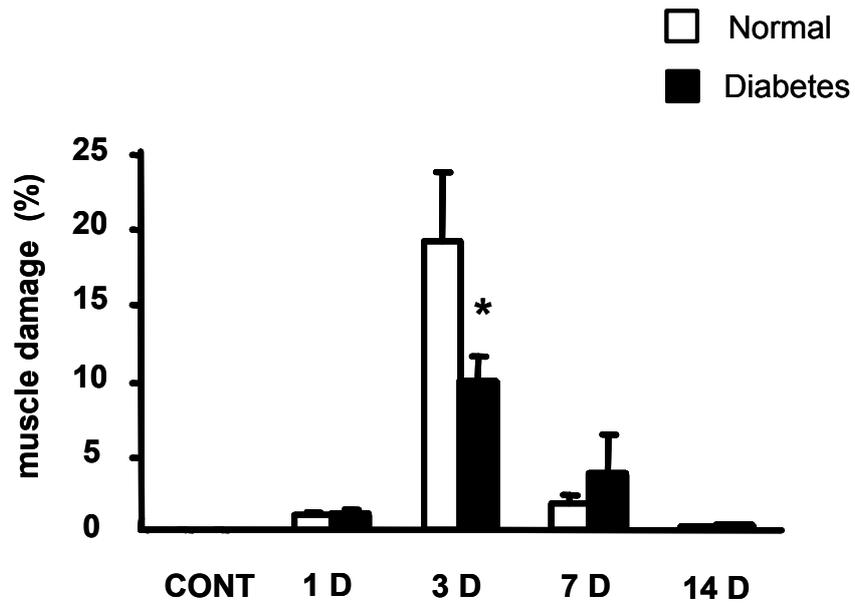


Fig. 39 Percentage of the damage muscel fiber area in normal ad diabetes moels. Values are mean +/- SE. * $p < 0.05$ vs. Normal 3 D.

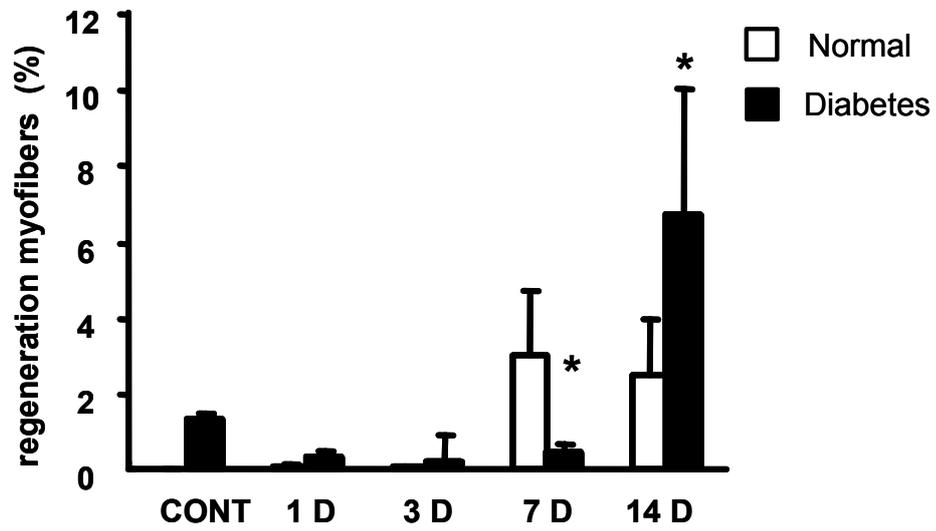


Fig. 40 The numbers of regeneration myofibers were quantified and shown in the histogram . Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. Normal.

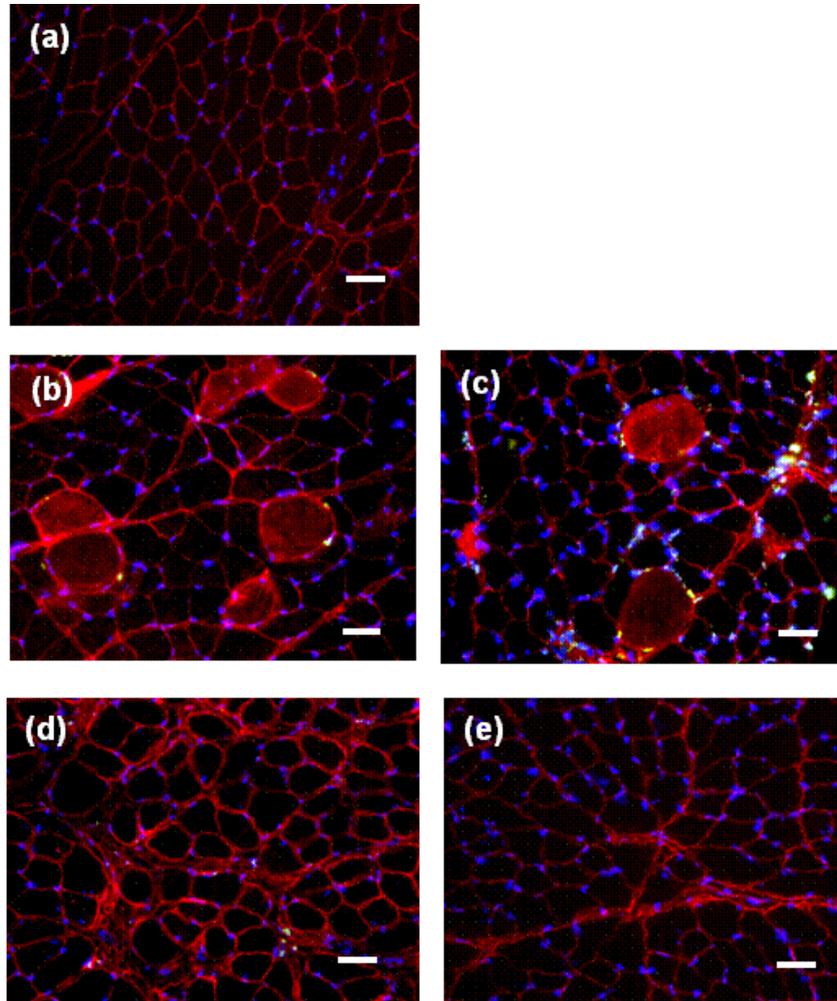


Fig. 41 Transverse sections from CONT (a), 1 D (b), 3 D (c), 7 D (d) and 14 D (e) after ECC in diabetes model. Triple histochemical staining for myofiber apoptotic nuclei. Bar = 50 μm .

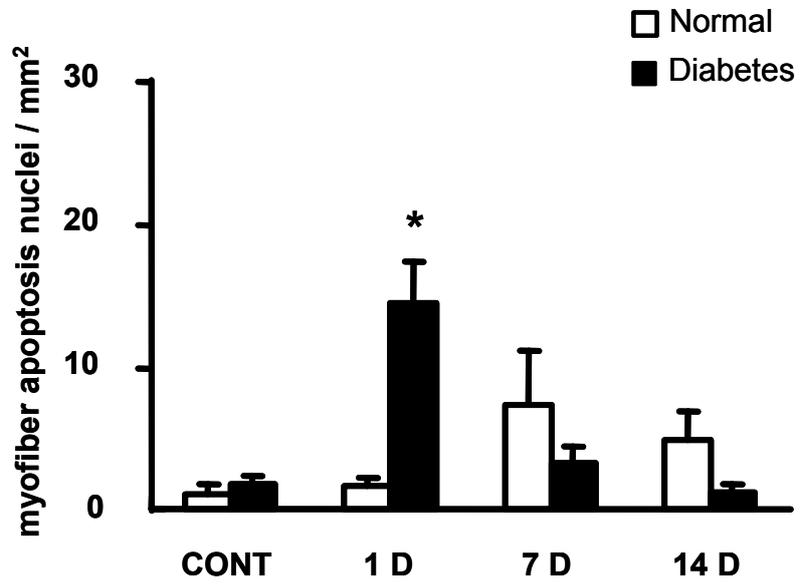


Fig. 42 Time course of changes in ECC induced myofiber apoptosis nuclei in normal and diabetes models. TUNEL-positive nuclei per mm² after ECC in rats. Values are means +/- SE. *p < 0.05 vs. Normal.

(1D: 14.32 +/- 2.86 myofiber apoptosis nuclei / mm²) において CONT(CONT: 1.74 +/- 0.57 myofiber apoptosis nuclei / mm²)よりも有意に高い値であった (Fig. 42).

7.4. 考察

7.4.1. 糖尿病における損傷筋と再生筋

本実験では、薬理的に誘発させる 1 型糖尿病モデルを用いた。薬理的処理による 1 型糖尿病モデルは多くの研究において使用されており (Atalay *et al.*, 2004; Maiti *et al.*, 2005; Aughsteen *et al.*, 2006), Aughsteen (2006) によると, STZ による糖尿病モデルは, 体重の減少, 血糖値の上昇, および筋萎縮を誘発すると報告されている。本実験における運動無負荷群の糖尿病モデルにおいても, 体重, 筋重量および筋横断面積の減少と血糖値の上昇が認められた (Table. 4)。

糖尿病ラットモデルでは, 代謝的異常の他にも末梢循環能が低下すること (Kindig 1998), タンパク質合成速度が低く分解速度が高いこと (Farrell *et al.*, 1999; Baviera *et al.*, 2007) が報告されている。さらに, 筋萎縮を合併症として誘発することが知られている。したがって, このような脆弱化した糖尿病モデルにおける骨格筋は, ECC 収縮負荷において正常モデルよりも著しい筋損傷を誘発することが予想された。しかしながら, 本実験結果は, 正常モデルよりも糖尿病モデルでは, 筋損傷割合が有意に低い値を示すことを明らかとした (Fig. 39)。筋損傷割合が低値を示した要因の一つとして, 各筋細胞における横断面積の減少による発揮張力の低下があげられる。これまでの先行研究からも筋萎縮による横断面積の低下が, 発揮張力を減少させることが指摘されている (Challiss *et al.*, 1989; Stephenson & Fuller, 1994; McGuire

& MacDermott, 1999). 本実験においても, D 群における筋細胞横断面積の減少および, 単位断面積あたりの発揮張力の低下が明らかとなった. また, ECC 収縮に対して, 糖尿病では Ca^{2+} の筋線維内への流入が少ないことが示されている (Kano *et al.*, 2009). これらの要因により, ECC 収縮による損傷割合が, N 群よりも D 群では有意に低かったことが考えられる.

糖尿病モデルでは損傷割合は低かったものの, 炎症状態が正常モデルよりも持続されていることが示された (Fig. 39). 正常な筋細胞における貪食作用を有する好中球は, 収縮負荷後 2 時間以内に浸潤を開始し, 1 日後に最大密度に到達してから 7 日後まで発現することが報告されている (Pizza *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 2003; McLoughlin *et al.*, 2003; Tsivitse *et al.*, 2003; Pizza *et al.*, 2005). しかしながら, インスリン分泌障害をともなう 1 型糖尿病骨格筋においては, インスリンが有する炎症性サイトカイン (i.e. $\text{TNF-}\alpha$, IL-6) の分泌亢進の機能 (Straczkowski *et al.*, 2002) が作用しない可能性がある. 糖尿病モデルにおける炎症の遅延は, インスリン機能不全に起因した好中球やマクロファージの浸潤・遊走能力の低下によるものかもしれない.

また, 再生筋を示す中心核を有する筋細胞は, 正常モデルでは負荷後 7 日に顕著に観察された (Fig. 40) が, 糖尿病モデルでは負荷後 14 日に有意な増加がみられた. この結果は, 本実験における炎症応答が遅延したこと, および 1 型糖尿病ラットモデルにおける筋では, タンパク質合成速度が正常ラットよりも有意に低く, 対照的にタンパク質分解速度は極めて高い (Farrell *et al.*, 1999; Baviera *et al.*, 2007) ことが影響しているのではないかと推測される. したがって, 糖尿病骨格筋では炎症-再生過程において正常な骨格筋よりも遅延を生じることが本実験より明らかとなった.

7.4.2. 糖尿病骨格筋におけるアポトーシス応答

糖尿病は合併症として筋萎縮を発症する。筋萎縮を生じた筋線維において、アポトーシスが発生することが知られている。筋細胞におけるタンパク質合成の低下により筋核による支配領域が変動するにともない筋核の脱落がアポトーシスによって実行される (Siu & Alway, 2009)。したがって、筋萎縮を発症している糖尿病の骨格筋においてもアポトーシスは発生していると考えられる。しかしながら、糖尿病骨格筋とアポトーシスに関する報告は少なく、そのメカニズムについては解明されていない。糖尿病によるインスリン抵抗性の亢進は、ミトコンドリアの機能不全を誘発し、結果的にアポトーシスを誘導することが報告されている (Stark & Roden, 2007; Peterson *et al.*, 2008)。しかしながら、インスリンの分泌障害は、アポトーシス発生における外因性経路に関与する炎症性サイトカイン TNF 産生の減少を招くことから、糖尿病骨格筋におけるアポトーシス応答の抑制を招く可能性が考えられる。本実験より、糖尿病、および、正常モデルの筋収縮無負荷の骨格筋において、アポトーシス発生に有意な差はみられなかったが、ECC 収縮 1 日後の浮腫を起こした筋細胞において顕著なアポトーシス応答が観察された (Fig. 42)。糖尿病の骨格筋が脆弱性を有することが指摘されていることから、ECC 収縮 1 日後である炎症初期に観察された筋細胞アポトーシスは、損傷に対する抵抗性が正常な筋細胞よりも低いため誘発されたのではないかと推測できる。しかしながら、筋細胞アポトーシス応答は、収縮 7 日後においてはわずかであった。ECC 収縮による炎症応答が遅延しているにもかかわらず、アポトーシスの発生が低かったことは、インスリン抵抗性による TNF 産生減少に起因するかもしれない。詳細なメカニズムは不明だが、ECC 収縮によりアポトーシス応答が生じることは明らかになった。

7.5. 要約

実験 6 では、糖尿病ラットモデルの後肢骨格筋を対象として、萎縮筋における ECC

収縮負荷によるアポトーシス応答について検証を行った。その結果以下のような知見を得た。

- ① 糖尿病モデルは、正常モデルと比較して、体重 (N 群 : 272 +/- 14 g, D 群 : 209 +/- 9 g), 筋重量の減少 (N 群 : 0.46 +/- 0.26 g, D 群 : 0.28 +/- 0.16 g), 血糖値の上昇 (N 群 : 107 +/- 11 mg/dl, D 群 : 485 +/- 33 mg/dl), 筋横断面積の低下 (N 群: 3140 +/- 319 μm^2 , D 群: 1698 +/- 107 μm^2) がみられた (Table. 4).
- ② ECC 収縮中における単位断面積あたりの発揮張力は、糖尿病モデル (175 +/- 2 $\text{mN}\cdot\text{m} / \text{mm}^2$) では正常モデル (398 +/- 3 $\text{mN}\cdot\text{m} / \text{mm}^2$) よりも有意に低い値を示した (Fig. 37).
- ③ 糖尿病骨格筋における ECC 収縮負荷による炎症 (1 D : 0.9 +/- 0.4%, 3 D : 9.7 +/- 1.7%, 7 D : 3.7 +/- 2.6%, 14 D : 0.1 +/- 0.0%) は、正常モデルと比較して遅延した (Fig. 39). さらに、再生過程における再生筋の出現は、糖尿病モデル (7 D: 0.5 +/- 0.1%, 14 D: 6.3 +/- 4.2%) では正常モデル (7 D: 3.2 +/- 1.8%, 14 D: 2.4 +/- 1.9%) よりも遅延を生じた (Fig. 40).
- ④ アポトーシス応答は、糖尿病モデルでは対照群 (CONT: 1.74 +/- 0.57 $\text{myofiber apoptosis nuclei} / \text{mm}^2$) と比較して、収縮 1 日後 (14.32 +/- 2.86 $\text{myofiber apoptosis nuclei} / \text{mm}^2$) に高い値を示した (Fig. 41).

以上の結果から、糖尿病を発症した骨格筋において、ECC 収縮による損傷割合が正常モデルよりも低いにもかかわらず、炎症-再生応答は遅延することが明らかになった。さらに、アポトーシス応答は ECC 収縮 1 日後において有意に増加することが示

された。

第8章 討論

運動誘発性筋損傷は、筋線維全体に損傷が誘発するのではなく、筋線維に対して散在的に生じる。筋線維は、多核細胞という構造的な特徴を有しているため、部分的な損傷は、衛星細胞や多能性細胞の増殖・分化・融合により再生することができる。生体形成における細胞の除去・再構築をサポートする生理学的機能には「アポトーシス」がある。遺伝子によりプログラムされているアポトーシスは、運動誘発性筋損傷における損傷－再生過程では、筋線維に特異的な細胞の崩壊－修復の制御に関与している可能性がある。そこで、本研究では、筋収縮による損傷－再生過程のアポトーシス応答に着目し、骨格筋線維におけるアポトーシスの発生とその機序を明らかにすることを目的とした。

運動ストレスが誘発する筋損傷－再生過程におけるアポトーシス応答を検証するにあたり、本研究ではラットの TA 筋における ECC 収縮誘発性筋損傷モデルの確立を目指した。ECC 収縮は、筋原線維の微細構造の崩壊を引き起し、さらに、伸張による細胞膜の崩壊、機械受容チャネル (stretch-activated channel: SAC) の開孔を誘発し、 Ca^{2+} が筋細胞内へ流入することで濃度上昇によるタンパク質分解酵素 (i.e. カルパイン) の活性を惹起する。Sonobe ら (2008) は、*in vivo* モデルにおいて、ECC 収縮負荷後の筋線維内の Ca^{2+} 濃度が、収縮回数を増すごとに、SAC に由来して上昇することを報告した。すなわち、ECC 収縮の回数に依存した損傷程度の増加要因には、 Ca^{2+} の蓄積が関与しているかもしれない。したがって、研究課題 1－実験 1 では異なる ECC 収縮負荷回数と損傷割合の関係を検証した。実験 1 の結果において、ECC 収縮 10 回と 20 回の間筋損傷発生における閾値が観察された。このような運動回数に対する損傷閾値の存在は、運動誘発性筋損傷モデルの確立に重要な知

見となった。実験 2 以降の運動プロトコルではすべて、運動回数を 20 回以上に設定することで、損傷量を考慮したモデルでの実験が可能になった。

次に着目した点は、運動プロトコルと損傷発生の部位的な関係であった。これは、分析部位の決定において重要な知見となる。これまでの先行研究では、筋収縮により誘発された筋損傷の局在についての知見は一致していない。実験 2 では、ECC 収縮を負荷したラットの TA 筋における筋全体の筋損傷の局在を検証した結果、近位、中央、遠位部での筋損傷の発生に差異は認められなかった。しかしながら、Lovering ら (2009) は、磁気共鳴画像法 (MRI) により収縮負荷後 2 時間、および 24 時間のラットの TA 筋において中央部から遠位部にかけて炎症応答が観察されたことを報告している。実験 2 の結果も含め、近位から遠位部にかけて損傷の発生部位にばらつきが生じる要因としては、筋収縮負荷のプロトコルに依存した筋線維の動員パターンが異なることが考えられる。例えば、収縮における足関節の伸展範囲が実験 2 のプロトコル (120 degree) よりも Lovering ら (2009) のプロトコルでは小さい (80 degree)。実験 2 における ECC 収縮による横断的な部位別評価では、中央から深層部位にかけて顕著な炎症細胞が観察された。筋線維タイプと運動誘発性筋損傷の関連性は明らかではないが、運動誘発性筋損傷の条件には、回数、伸展範囲、強度、速度などの様々な要因が関与していることが指摘されている (Nosaka & Newton, 2002)。これらの因子の組み合わせ条件が、損傷の発生部位に影響を及ぼすのかもしれない。

研究課題 2 では、研究課題 1 において確立された ECC 収縮誘発性筋損傷モデルを用いて、収縮様式、性差に着目した筋線維アポトーシス応答の検証を行った (実験 3)。ISO 収縮では ECC 収縮よりも筋損傷およびアポトーシスの発生は低く、また、メスでは筋損傷およびアポトーシスはほとんど発生しないことが明らかとなった。Biral ら (2000) は、オスラットの骨格筋において、細胞膜ジストロフィンの欠損とアポトーシス

核が同一箇所には局在していることを観察したことから、細胞の膜タンパク質の消失が結果としてアポトーシスを誘導すると報告した。メスは、エストロゲンによる細胞膜の保護が指摘されている。また、ISO 収縮は筋節の過伸展を引き起こさないことから、細胞膜の損傷が起きにくいことが考えられる。アポトーシス発生の抑制は、これらの要因が関係しているのかもしれない。

研究課題 2-実験 4 では、オスラットでの ECC 収縮後の筋線維アポトーシスの発生について検証した。近年、アポトーシスが骨格筋における細胞分化の過程を制御する重要な作用に関与していることが指摘されている (King & Cidlowski, 1995; Asakura *et al.*, 2007)。例えば、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性化は、骨格筋における分化を促す (Fernando *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2007)。また、Asakura ら (2007) は、筋分化誘導因子である MyoD が増殖および、分化においてアポトーシスを積極的に誘導すること報告した。したがって、筋線維の再生とアポトーシスの発生は関連性が高いことが考えられる。そこで、実験 4 では、特に、ECC 収縮後の再生過程におけるアポトーシス発生に着目した。その結果、損傷した筋線維が再生される段階において、細胞膜直下に局在する筋核を対象としたアポトーシスを発生することを明らかにした。この結果は、核数が筋線維のサイズを制御するために衛星細胞由来の新生核と既存の核との間における核数調節する際、アポトーシスが重要な役割を果たしていること示唆しているのかもしれない。例えば、同様な機構が筋萎縮の過程で見られる。萎縮筋では、筋細胞核の脱落を目的としたアポトーシスが発生する (Allen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000; Siu *et al.*, 2005c; Alway & Siu, 2008; Bruusgaard & Gundersen, 2008)。すなわち、再生過程では、筋核ドメインの空間的な決定に寄与したアポトーシスが筋線維において発生したのではないかと考えられる。しかしながら、実験 4 の知見は、筋核ドメインの調節を目的としたアポトーシス応答であると断定するには必ずしも十分ではない。もし、再生過程におけるアポトーシス応

答が筋核ドメインの調節に関与するならば、筋線維内のアポトーシス実行因子の阻害モデルにおける損傷－再生機構が正常に機能するか否かを検証する必要がある。さらに、再生過程において観察された筋核アポトーシスが既存の核であるのか、あるいは衛星細胞由来の新生核であるのかを区別することで、筋線維核における寿命や核－核の間における情報伝達機構の存在を明らかにできる可能性がある。

実験 5 では、低酸素環境下の ECC 収縮によって筋損傷が誘発されないことが示された。この結果から、低酸素ストレスの増大をともなった ECC 収縮では、筋線維における伸張程度が抑制され、 Ca^{2+} 流入チャネルである SAC の構造変化が誘導されず、細胞外からの Ca^{2+} の流入が阻害されるため筋損傷が抑制されたのかもしれない。

また、実験 5 では、タンパク質合成 mTOR 経路の下流因子である S6K1 タンパク質の活性化が示されたが、この結果は、タンパク質合成だけでなくアポトーシスの抑制にも関与している可能性がある。タンパク質合成 mTOR 経路の上流因子である Akt は、増殖因子が存在することでアポトーシス発生の促進因子である Bad を活性化させる。通常、Bad は、アポトーシスの発生を誘導するが、活性化されたことで Bad 本来の機能を失うためアポトーシスの発生を抑制する方向に作用する。実験 5 における S6K1 の活性は、mTOR 経路の上流因子である増殖因子（成長ホルモン、IGF-1 など）および Akt が活性化されたことを意味している。すなわち、Akt の活性はアポトーシス発生を間接的に抑制していることが考えられる。

実験 5 では、筋細胞だけでなく細胞膜タンパク質であるジストロフィンの外側に局在する間隙細胞においても、負荷後 3 日から 14 日にかけて無負荷群よりも高い値のアポトーシス発生を示した。血流制限（虚血）中は、TA 筋において低酸素ストレスが増大するが、除圧による血流再開（再灌流）時には、血流量が急激に増すことにより活性酸素が生じ、組織に酸素障害を及ぼすかもしれない。細胞種別の検証が必要ではあるが、間隙細胞におけるアポトーシスは、低酸素ストレスによるものではなく、虚血－

再灌流の際に生じた酸化ストレスにより内皮細胞に発生した可能性が高いと考えられる。

本研究では、筋線維アポトーシスにおける代謝的ストレスの影響を明らかにするために糖尿病モデルの骨格筋に対する ECC 収縮による応答についても検証した。糖尿病モデルでは、各筋細胞の横断面積の減少に起因した張力低下がみられたことから、筋収縮による物理的ストレスレベルが低かったことが推察される。実験 6 では ECC 収縮による筋損傷が正常モデルよりも糖尿病骨格筋では有意に低い割合であった。この結果は、発揮張力レベルの低下、および糖尿病骨格筋における Ca^{2+} の細胞内流入が少ない (Kano *et al.*, 2009) ことが関係しているのかもしれない。しかしながら、興味深いことに、糖尿病筋線維における筋収縮による炎症は、正常モデルが再生過程に達する時期においても継続していた。実験 6 で用いた 1 型糖尿病ラットは、薬理学的手法によりインスリンの分泌を阻害したモデルである。それにより、炎症性サイトカインやマクロファージの遊走・活性がインスリン抵抗性の亢進により抑制されたことで、炎症応答の遅延を招いたことが予想される。また、実験 6 では、炎症の遅延と炎症性サイトカイン産生の低下は、再生筋の出現にも遅れをもたらしたと考えられる。

このように、ECC 収縮による損傷-再生過程において遅延が生じる糖尿病骨格筋は、アポトーシス応答にも正常モデルとの相違をもたらした。実験 6 の結果では、ECC 収縮 1 日後の浮腫を起こした筋細胞において顕著なアポトーシス応答が観察された。糖尿病の骨格筋が脆弱性を有することが指摘されていることから、ECC 収縮 1 日後である炎症初期に観察された筋細胞アポトーシスは、損傷に対する抵抗性が正常な筋よりも低いため誘発されたのかもしれない。ECC 収縮による炎症応答が遅延していることから、ECC 収縮負荷 7 日後における筋細胞アポトーシスの発生を予想していた。しかしながら、損傷-再生過程における筋細胞アポトーシス応答が低かったことから、インスリン抵抗性による TNF 産生減少によるアポトーシス経路の抑制が関与しているのかも

しれない.

本研究では, 運動ストレスにともなう筋損傷とその再生機構に着目し, 特にその過程で生じるアポトーシスの発生について検証を行った. 現在, 多核細胞である筋線維に対するアポトーシスの詳細な機構は明らかにされていない. しかしながら, 本研究における知見は, 多核細胞である筋線維に特徴的なユニークな生物学的応答を示すものであり, 運動のような複合的なストレスに対する骨格筋の高い可塑性を説明する新たなメカニズムとなるだろう.

第9章 総括

本研究では、運動ストレスにともなう筋損傷とその再生機構に着目し、特にその過程で生じるアポトーシスの発生とその機序について明らかにすることを目的として以下の研究課題を遂行した。

研究課題1： 運動誘発性筋損傷モデルの確立

動物モデルを対象とした骨格筋における運動誘発性筋損傷モデルの確立を目的として、ECC 収縮負荷の回数依存性、および、筋損傷部位を解析することで運動ストレスによる損傷割合を検証した。その結果、筋損傷は、収縮 20 回以上の負荷では誘導されるが、10 回以下ではほとんど発生しないことが明らかとなった（実験 1）。また、TA 筋における ECC 負荷は、近位部、中央部、遠位部では一様な損傷を誘導することが示された（実験 2）。

研究課題2： 骨格筋損傷モデルにおけるアポトーシス応答の検証

オス・メスラット骨格筋を対象に ECC 収縮、および、ISO 収縮を負荷し、アポトーシス発生における性差について検討を行った。その結果、筋組織におけるアポトーシスは、ISO 収縮よりも ECC 収縮で多く観察された。さらに、ECC 収縮に対するアポトーシス応答は、オスにおいて顕著であることが明らかになった（実験 3）。

また、損傷－再生過程における筋細胞、および内皮細胞のアポトーシス応答を組織・生化学的手法から検討することで、アポトーシス発生の生理学的意義の解明を試

みた。その結果、ECC 収縮による筋細胞でのアポトーシス応答は、損傷過程において観察されるだけでなく、再生過程の細胞膜直下の筋核においても誘発されることを明らかにした。これらの知見は、アポトーシスが有する生理学的意義が発生時期によって異なる可能性を示唆している（実験 4）。

研究課題 3： 低酸素環境下におけるエキセントリック収縮による

アポトーシス応答

筋収縮が誘発する運動ストレスに加えて、活動筋における低酸素刺激負荷をともなつた ECC 収縮モデルを確立し、複合的なストレス刺激が筋組織へ及ぼすアポトーシス応答について検証した。その結果、ECC 収縮中の血流制限による活動筋への低酸素刺激の増大は、単独の ECC 収縮負荷と比較して筋損傷とアポトーシス応答を抑制することが明らかとなった。また、損傷、アポトーシス応答を抑制するにもかかわらず筋肥大因子は活性化することが示された。したがって、低酸素環境下における筋収縮モデルは、筋損傷をともなわない効果的な筋肥大を引き起こすプログラムであることが示唆された（実験 5）。

研究課題 4： 糖尿病骨格筋におけるアポトーシス応答

糖尿病を発症した骨格筋は、脆弱性を有することが指摘されている。特に、糖代謝における恒常性破綻による筋萎縮と同時に細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答性の低下が考えられる。したがって、薬理的投与による糖尿病ラットモデルを作成し、ECC 収縮に対する細胞構造の抵抗性や損傷時の修復応答についてアポトーシスという観点から検証を試みた。その結果、ECC 収縮による炎症－再生応答が正常な骨

格筋よりも遅延すること, さらに炎症初期においてアポトーシス応答が増加することを明らかにした (実験 6).

本研究の知見より, 多核細胞である筋線維の損傷-再生の各段階において, アポトーシスの関与が明らかになった. 特に, 再生過程におけるアポトーシスの果たす役割は, 多核細胞である筋線維に特徴的な生物学的応答である. この知見の新たな筋損傷修復メカニズムとして注目すべき点であり, 運動のような複合的なストレスに対する骨格筋の高い可塑性を説明するメカニズムの一つでもあるだろう.

謝 辞

本論文の作成にあたり, 終始懇切丁寧な御指導を賜りました電気通信大学 量子・物質工学科 狩野 豊 准教授, ならびに中村 整 教授に深甚なる謝意を表します. また, 本稿の作成に際して御校閲賜りました電気通信大学 量子・物質工学科 丹羽 治樹 教授, 白川 英樹 准教授, 御校閲ならびに実験において御指導を賜りました首都大学東京 人間健康化学研究科 藤井 宣晴 教授に心から感謝の意を表します. さらに, 研究に対する実験御指導および多くの助言を賜りましたカンザス州立大学 Dr. David Poole 氏, 東京大学 総合文化研究科 山田 茂 准教授, 電気通信大学 量子・物質工学科 長澤 純一 准教授, 宇都宮大学 農学部 吉澤 史昭 教授, 豊橋技術科学大学 佐久間 邦弘 准教授, 電気通信大学 機械制御工学科 岡田英孝 准教授, 電気通信大学 量子・物質工学科 仲村 厚志 助教をはじめ諸先生方に厚く御礼を申し上げます. また, 実験に際し御協力頂いた狩野研究室の皆様にも心から御礼申し上げます. 最後に, 学位取得にあたり多大なる支援を賜りました家族に心から感謝の意を表します.

引用文献

Abe T, Kearns CF & Sato Y (2006). Muscle size and strength are increased following walk training with restricted venous blood flow from the leg muscle, Kaatsu-walk training. *J Appl Physiol* **100**, 1460-1466.

Abmayr S, Crawford RW & Chamberlain JS (2004). Characterization of ARC, apoptosis repressor interacting with CARD, in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **13**, 213-221.

Adams GR (2006). Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Appl Physiol Nutr Metab* **31**, 782-790.

Adams JM & Cory S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.

Allen DG, Whitehead NP & Yeung EW (2005). Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *J Physiol* **567**, 723-735.

Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V & Edgerton VR (1997). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol* **273**, C579-587.

Alway SE & Siu PM (2008). Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev* **36**, 51-57.

Amelink GJ, Koot RW, Erich WB, Van Gijn J & Bar PR (1990). Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation. *Acta Physiol Scand* **138**, 115-124.

Armstrong RB (1984). Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* **16**, 529-538.

Armstrong RB, Gollnick PD & Ianuzzo CD (1975). Histochemical properties of skeletal muscle fibers in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res* **162**, 387-394.

Armstrong RB, Laughlin MH, Rome L & Taylor CR (1983). Metabolism of rats running up and down an incline. *J Appl Physiol* **55**, 518-521.

Arslan S, Erdem S, Sivri A, Hascelik Z & Tan E (2002). Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam. *Rheumatol Int* **21**, 133-136.

Asakura A, Hirai H, Kablar B, Morita S, Ishibashi J, Piras BA, Christ AJ, Verma M, Vineretsky KA & Rudnicki MA (2007). Increased survival of muscle stem cells lacking the MyoD gene after transplantation into regenerating skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16552-16557.

Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hanninen O & Sen CK (2004). Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* **97**, 605-611.

Aughsteeen AA, Khair AM & Suleiman AA (2006). Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. *Jop* **7**, 382-389.

Baker BA, Mercer RR, Geronilla KB, Kashon ML, Miller GR & Cutlip RG (2007). Impact of repetition number on muscle performance and histological response. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 1275-1281.

Baker SJ & Reddy EP (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17**, 3261-3270.

Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J & Lieber RL (2004). Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C355-364.

Baviera AM, Zanon NM, Carvalho Navegantes LC, Migliorini RH & do Carmo Kettelhut I (2007). Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E702-708.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM & Green DR (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**,

469-475.

Best TM & Hunter KD (2000). Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* **11**, 251-266.

Bhagavati S (2008). Stem cell based therapy for skeletal muscle diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**, 219-228.

Bigland-Ritchie B & Woods JJ (1976). Integrated electromyogram and oxygen uptake during positive and negative work. *J Physiol* **260**, 267-277.

Biral D, Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Sandri M, Rossini K, Carraro U & Betto R (2000). Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta Neuropathol* **100**, 618-626.

Boffi FM, Cittar J, Balskus G, Muriel M & Desmaras E (2002). Training-induced apoptosis in skeletal muscle. *Equine Vet J Suppl*, 275-278.

Bonde C, Noraberg J & Zimmer J (2002). Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett* **327**, 49-52.

Brdiczka D (1991). Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* **1071**, 291-312.

Brooks SV, Zerba E & Faulkner JA (1995). Injury to muscle fibres after single stretches of passive and maximally stimulated muscles in mice. *J Physiol* **488 (Pt 2)**, 459-469.

Brunelle JK & Letai A (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* **122**, 437-441.

Bruusgaard JC & Gundersen K (2008). In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest* **118**, 1450-1457.

Challiss RA, Vranic M & Radda GK (1989). Bioenergetic changes during contraction

and recovery in diabetic rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **256**, E129-137.

Chen YW, Hubal MJ, Hoffman EP, Thompson PD & Clarkson PM (2003). Molecular responses of human muscle to eccentric exercise. *J Appl Physiol* **95**, 2485-2494.

Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G & Lutz RJ (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* **14**, 5589-5596.

Clarkson PM & Hubal MJ (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* **81**, S52-69.

Clarkson PM & Sayers SP (1999). Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* **24**, 234-248.

Collins RJ, Harmon BV, Souvlis T, Pope JH & Kerr JF (1991). Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. *Br J Cancer* **64**, 518-522.

Cook SB, Clark BC & Ploutz-Snyder LL (2007). Effects of exercise load and blood-flow restriction on skeletal muscle function. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 1708-1713.

Danial NN & Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.

Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J & Kroemer G (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* **14**, 729-739.

Dirks AJ & Leeuwenburgh C (2004). Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic Biol Med* **36**, 27-39.

Drummond MJ, Fujita S, Abe T, Dreyer HC, Volpi E & Rasmussen BB (2008). Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 691-698.

Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, Vulikh E, Shaw J & Zimmet P (2005). Home-based resistance training is not sufficient to maintain improved glycemic control following supervised training in older individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **28**, 3-9.

Eguchi Y, Shimizu S & Tsujimoto Y (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* **57**, 1835-1840.

Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C & Schaper J (2001). The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol* **96**, 219-226.

Emanueli C, Caporali A, Krankel N, Cristofaro B, Van Linthout S & Madeddu P (2007). Type-2 diabetic Lepr(db/db) mice show a defective microvascular phenotype under basal conditions and an impaired response to angiogenesis gene therapy in the setting of limb ischemia. *Front Biosci* **12**, 2003-2012.

Enoka RM (1996). Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. *J Appl Physiol* **81**, 2339-2346.

Farrell FJ & Keeffe EB (1998). Diabetes and the hepatobiliary system. *Clin Liver Dis* **2**, 119-131, vii.

Farrell PA, Fedele MJ, Hernandez J, Fluckey JD, Miller JL, 3rd, Lang CH, Vary TC, Kimball SR & Jefferson LS (1999). Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *J Appl Physiol* **87**, 1075-1082.

Favier FB, Benoit H & Freyssenet D (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* **456**, 587-600.

Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS & Megeney LA (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11025-11030.

Friden J (1984). Changes in human skeletal muscle induced by long-term eccentric exercise. *Cell Tissue Res* **236**, 365-372.

Friden J & Lieber RL (1992). Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* **24**, 521-530.

Friden J & Lieber RL (1998). Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell Tissue Res* **293**, 165-171.

Friden J & Lieber RL (2001). Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand* **171**, 321-326.

Fujita S, Abe T, Drummond MJ, Cadenas JG, Dreyer HC, Sato Y, Volpi E & Rasmussen BB (2007). Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* **103**, 903-910.

Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA & Dupont-Versteegden EE (2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* **97**, 1082-1090.

Gissel H & Clausen T (2001). Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol Scand* **171**, 327-334.

Grim M & Carlson BM (1990). Alkaline phosphatase and dipeptidylpeptidase IV staining of tissue components of skeletal muscle: a comparative study. *J Histochem Cytochem* **38**, 1907-1912.

Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A & Jaeschke H (2001). Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* **33**, 397-405.

Henriquez M, Armisen R, Stutzin A & Quest AF (2008). Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Curr Mol Med* **8**, 187-206.

Holten MK, Zacho M, Gaster M, Juel C, Wojtaszewski JF & Dela F (2004). Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 294-305.

Hortobagyi T, Barrier J, Beard D, Braspeninx J, Koens P, Devita P, Dempsey L & Lambert J (1996). Greater initial adaptations to submaximal muscle lengthening than maximal shortening. *J Appl Physiol* **81**, 1677-1682.

Hubal MJ, Chen TC, Thompson PD & Clarkson PM (2008). Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1628-1637.

Hunter AL, Zhang J, Chen SC, Si X, Wong B, Ekhterae D, Luo H & Granville DJ (2007). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) inhibits myogenic differentiation. *FEBS Lett* **581**, 879-884.

Iwata S, Taki Y, Kawai Y, Kanai M & Takabayashi A (2002). Mitochondrial membrane potential is reduced in peripheral natural killer cells following partial hepatectomy. *Immunol Lett* **82**, 225-233.

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G & Penninger JM (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554.

Kano Y, Masuda K, Furukawa H, Sudo M, Mito K & Sakamoto K (2008). Histological skeletal muscle damage and surface EMG relationships following eccentric contractions. *J Physiol Sci* **58**, 349-355.

Kano Y, Sampei K & Matsudo H (2004). Time course of capillary structure changes in rat skeletal muscle following strenuous eccentric exercise. *Acta Physiol Scand* **180**, 291-299.

Katta A, Preston DL, Karkala SK, Asano S, Meduru S, Mupparaju SP, Yokochi E, Rice KM, Desai DH & Blough ER (2008). Diabetes alters contraction-induced mitogen activated protein kinase activation in the rat soleus and plantaris. *Exp Diabetes Res* **2008**, 738101.

Kendall B & Eston R (2002). Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. *Sports Med* **32**, 103-123.

Kerksick C, Taylor Lt, Harvey A & Willoughby D (2008). Gender-related differences in muscle injury, oxidative stress, and apoptosis. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 1772-1780.

Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.

Kim HJ, Lee JS & Kim CK (2004). Effect of exercise training on muscle glucose transporter 4 protein and intramuscular lipid content in elderly men with impaired glucose tolerance. *Eur J Appl Physiol* **93**, 353-358.

King KL & Cidlowski JA (1995). Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* **58**, 175-180.

Kirkendall DT & Garrett WE, Jr. (2002). Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin Orthop Relat Res*, S81-89.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH & Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**, 5579-5588.

Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR & Newmeyer DD (1999). The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol* **147**, 809-822.

Koh EH, Kim MS, Park JY, Kim HS, Youn JY, Park HS, Youn JH & Lee KU (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation prevents diabetes in OLETF rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes* **52**, 2331-2337.

Komulainen J, Koskinen SO, Kalliokoski R, Takala TE & Vihko V (1999). Gender differences in skeletal muscle fibre damage after eccentrically biased downhill running in rats. *Acta Physiol Scand* **165**, 57-63.

Kon M, Tanabe K, Lee H, Kimura F, Akimoto T & Kono I (2007). Eccentric muscle contractions induce greater oxidative stress than concentric contractions in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**, 273-281.

Koyama T, Xie Z, Gao M, Suzuki J & Batra S (1998). Adaptive changes in the capillary network in the left ventricle of rat heart. *Jpn J Physiol* **48**, 229-241.

Krajnak K, Waugh S, Miller R, Baker B, Geronilla K, Alway SE & Cutlip RG (2006). Proapoptotic factor Bax is increased in satellite cells in the tibialis anterior muscles of old rats. *Muscle Nerve* **34**, 720-730.

Kroemer G & Jaattela M (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**, 886-897.

Kumar S (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1060-1066.

Lechardeur D, Drzymala L, Sharma M, Zylka D, Kinach R, Pacia J, Hicks C, Usmani N, Rommens JM & Lukacs GL (2000). Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol* **150**, 321-334.

Lehto MU & Jarvinen MJ (1991). Muscle injuries, their healing process and treatment. *Ann Chir Gynaecol* **80**, 102-108.

Li H, Zhu H, Xu CJ & Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES & Wang X (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.

Lieber RL, Woodburn TM & Friden J (1991). Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain. *J Appl Physiol* **70**, 2498-2507.

Lim JH, Kim DY & Bang MS (2004). Effects of exercise and steroid on skeletal muscle apoptosis in the mdx mouse. *Muscle Nerve* **30**, 456-462.

Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR & Thompson CB (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**, 1389-1399.

Lockshin RA (1969). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism

involving the synthesis of protein. *J Insect Physiol* **15**, 1505-1516.

Lockshin RA & Zakeri Z (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2405-2419.

Lovering RM & De Deyne PG (2004). Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C230-238.

Lovering RM, Roche JA, Bloch RJ & De Deyne PG (2007). Recovery of function in skeletal muscle following 2 different contraction-induced injuries. *Arch Phys Med Rehabil* **88**, 617-625.

Madarame H, Kayanuma H, Shida T & Tsuchiya R (2009). Retrospective study of canine insulinomas: eight cases (2005-2008). *J Vet Med Sci* **71**, 905-911.

Mahoney DJ, Safdar A, Parise G, Melov S, Fu M, MacNeil L, Kaczor J, Payne ET & Tarnopolsky MA (2008). Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1901-1910.

Maiti R, Das UK & Ghosh D (2005). Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. *Biol Pharm Bull* **28**, 1172-1176.

Makman MH (1971). Conditions leading to enhanced response to glucagon, epinephrine, or prostaglandins by adenylate cyclase of normal and malignant cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2127-2130.

Manini TM & Clark BC (2009). Blood flow restricted exercise and skeletal muscle health. *Exerc Sport Sci Rev* **37**, 78-85.

Marin P, Andersson B, Krotkiewski M & Bjorntorp P (1994). Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM. *Diabetes Care* **17**, 382-386.

Maruhashi Y, Kitaoka K, Yoshiki Y, Nakamura R, Okano A, Nakamura K, Tsuyama T, Shima Y & Tomita K (2007). ROS scavenging activity and muscle damage prevention

in eccentric exercise in rats. *J Physiol Sci* **57**, 211-216.

Matsumoto T, Kakami M, Noguchi E, Kobayashi T & Kamata K (2007). Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H1480-1490.

McConkey DJ, Orrenius S & Jondal M (1990). Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J Immunol* **145**, 1227-1230.

McDonagh MJ & Davies CT (1984). Adaptive response of mammalian skeletal muscle to exercise with high loads. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **52**, 139-155.

McGuire M & MacDermott M (1999). The influence of streptozotocin diabetes and metformin on erythrocyte volume and on the membrane potential and the contractile characteristics of the extensor digitorum longus and soleus muscles in rats. *Exp Physiol* **84**, 1051-1058.

McLoughlin TJ, Mylona E, Hornberger TA, Esser KA & Pizza FX (2003). Inflammatory cells in rat skeletal muscle are elevated after electrically stimulated contractions. *J Appl Physiol* **94**, 876-882.

Moosmann B & Behl C (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8867-8872.

Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M & Lock RB (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* **7**, 102-111.

Nadal A, Diaz M & Valverde MA (2001a). The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci* **16**, 251-255.

Nadal A, Ropero AB, Fuentes E & Soria B (2001b). The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci* **22**, 597-599.

Najemnikova E, Rodgers CD & Locke M (2007). Altered heat stress response following

streptozotocin-induced diabetes. *Cell Stress Chaperones* **12**, 342-352.

Nakajima T, Iida H, Kurano M, Takano H, Morita T, Meguro K, Sato Y, Yamazaki Y, Kawashima S, Ohshima H, Tachibana S, Ishii N & Abe T (2008). Hemodynamic responses to simulated weightlessness of 24-h head-down bed rest and KAATSU blood flow restriction. *Eur J Appl Physiol* **104**, 727-737.

Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-1042.

Nosaka K & Newton M (2002). Repeated eccentric exercise bouts do not exacerbate muscle damage and repair. *J Strength Cond Res* **16**, 117-122.

Nosaka K, Sakamoto K, Newton M & Sacco P (2001). The repeated bout effect of reduced-load eccentric exercise on elbow flexor muscle damage. *Eur J Appl Physiol* **85**, 34-40.

Ohta H, Kurosawa H, Ikeda H, Iwase Y, Satou N & Nakamura S (2003). Low-load resistance muscular training with moderate restriction of blood flow after anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta Orthop Scand* **74**, 62-68.

Ozaki K, Matsuura T & Narama I (2001). Histochemical and morphometrical analysis of skeletal muscle in spontaneous diabetic WBN/Kob rat. *Acta Neuropathol* **102**, 264-270.

Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X & Xue D (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**, 90-94.

Peterson JM, Wang Y, Bryner RW, Williamson DL & Alway SE (2008). Bax signaling regulates palmitate-mediated apoptosis in C(2)C(12) myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1307-1314.

Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ & Brooks SV (2002). Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol* **92**, 1873-1878.

Pizza FX, Peterson JM, Baas JH & Koh TJ (2005). Neutrophils contribute to muscle

injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice. *J Physiol* **562**, 899-913.

Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Krajewska B, Ciesielska U, Jethon Z & Zabel M (2004). Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol (Warsz)* **63**, 213-216.

Podhorska-Okolow M, Krajewska B, Carraro U & Zabel M (1999). Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol* **37**, 127-128.

Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K & Carraro U (1998). Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* **24**, 518-531.

Powers SK & Jackson MJ (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* **88**, 1243-1276.

Proske U & Morgan DL (2001). Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol* **537**, 333-345.

Raj DA, Booker TS & Belcastro AN (1998). Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise. *Pflugers Arch* **435**, 804-809.

Reed JC (2002). Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 111-121.

Richard-Bulteau H, Serrurier B, Crassous B, Banzet S, Peinnequin A, Bigard X & Koulmann N (2008). Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C467-476.

Salvesen GS & Dixit VM (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-446.

Salvesen GS & Dixit VM (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10964-10967.

Sandri M, Minetti C, Pedemonte M & Carraro U (1998). Apoptotic myonuclei in human

Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* **78**, 1005-1016.

Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V, Rizzi C, Arslan P, Franceschi C & Carraro U (1997). Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 45-57.

Sanz A, Hiona A, Kujoth GC, Seo AY, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R, Prolla TA, Barja G & Leeuwenburgh C (2007). Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp Gerontol* **42**, 173-182.

Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM & Abraham RT (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* **60**, 3504-3513.

Shimizu S, Narita M & Tsujimoto Y (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.

Siu PM & Alway SE (2009). Response and adaptation of skeletal muscle to denervation stress: the role of apoptosis in muscle loss. *Front Biosci* **14**, 432-452.

Siu PM, Bryner RW, Murlasits Z & Alway SE (2005a). Response of XIAP, ARC, and FLIP apoptotic suppressors to 8 wk of treadmill running in rat heart and skeletal muscle. *J Appl Physiol* **99**, 204-209.

Siu PM, Pistilli EE & Alway SE (2005b). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1015-1026.

Siu PM, Pistilli EE, Butler DC & Alway SE (2005c). Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C338-349.

Smith HK, Maxwell L, Martyn JA & Bass JJ (2000). Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* **302**, 235-241.

Smith IJ & Dodd SL (2007). Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol* **92**, 561-573.

Sonobe T, Inagaki T, Poole DC & Kano Y (2008). Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: role of stretch-activated channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1329-1337.

Stark R & Roden M (2007). ESCI Award 2006. Mitochondrial function and endocrine diseases. *Eur J Clin Invest* **37**, 236-248.

Stauber WT & Smith CA (1998). Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem* **179**, 189-196.

Stephenson JM & Fuller JH (1994). Microalbuminuria is not rare before 5 years of IDDM. EURODIAB IDDM Complications Study Group and the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes Study Group. *J Diabetes Complications* **8**, 166-173.

Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepien A, Kowalska I, Szelachowska M & Kinalska I (2002). Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4602-4606.

Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, Bourgeois JM, Hogben C & Tarnopolsky MA (2000). Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol* **89**, 2325-2332.

Stupka N, Tarnopolsky MA, Yardley NJ & Phillips SM (2001). Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* **91**, 1669-1678.

Suga T, Okita K, Morita N, Yokota T, Hirabayashi K, Horiuchi M, Takada S, Takahashi T, Omokawa M, Kinugawa S & Tsutsui H (2009). Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol* **106**, 1119-1124.

Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR & Cohen GM (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 5053-5060.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC & Kroemer G (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-580.

Takarada Y & Ishii N (2002). Effects of low-intensity resistance exercise with short interset rest period on muscular function in middle-aged women. *J Strength Cond Res* **16**, 123-128.

Takarada Y, Takazawa H & Ishii N (2000). Applications of vascular occlusion diminish disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 2035-2039.

Takekura H, Fujinami N, Nishizawa T, Ogasawara H & Kasuga N (2001). Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol* **533**, 571-583.

Tamaki T, Akatsuka A, Tokunaga M, Ishige K, Uchiyama S & Shiraishi T (1997). Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats. *Am J Physiol* **273**, C246-256.

Tews DS & Goebel HH (1997). DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 331-338.

Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

Tiidus PM (2005). Can oestrogen influence skeletal muscle damage, inflammation, and repair? *Br J Sports Med* **39**, 251-253.

Tiidus PM, Deller M, Bombardier E, Gul M & Liu XL (2005a). Estrogen supplementation failed to attenuate biochemical indices of neutrophil infiltration or damage in rat skeletal muscles following ischemia. *Biol Res* **38**, 213-223.

Tiidus PM, Deller M & Liu XL (2005b). Oestrogen influence on myogenic satellite cells following downhill running in male rats: a preliminary study. *Acta Physiol Scand* **184**, 67-72.

Torrella JR, Whitmore JM, Casas M, Fouces V & Viscor G (2000). Capillarity, fibre types and fibre morphometry in different sampling sites across and along the tibialis anterior muscle of the rat. *Cells Tissues Organs* **167**, 153-162.

Tsivitse SK, McLoughlin TJ, Peterson JM, Mylona E, McGregor SJ & Pizza FX (2003). Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD⁺ cells in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* **90**, 633-638.

Tsujimoto Y (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* **195**, 158-167.

Walling AD (1999). Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease. *Am Fam Physician* **59**, 1489-1496.

Wang R, Miura T, Harada N, Kametani R, Shibuya M, Fukagawa Y, Kawamura S, Ikeda Y, Hara M & Matsuzaki M (2006). Pleiotropic effects of the beta-adrenoceptor blocker carvedilol on calcium regulation during oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 45-52.

Warren GL, Lowe DA & Armstrong RB (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med* **27**, 43-59.

Warren MW, Lerner SF, Kobeissy FH, Brezing CA, Jeung JA, Hayes RL, Gold MS & Wang KK (2007). Calpain and caspase proteolytic markers co-localize with rat cortical neurons after exposure to methamphetamine and MDMA. *Acta Neuropathol* **114**, 277-286.

Yamamoto T, Tomura Y, Tanaka H & Kajiya F (2001). In vivo visualization of characteristics of renal microcirculation in hypertensive and diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F571-577.

Yeung EW & Allen DG (2004). Stretch-activated channels in stretch-induced muscle damage: role in muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**, 551-556.

参考論文

■ 国際学会

- 1) *In vivo* imaging of intracellular calcium following skeletal muscle contractions in type 1 diabetes rat. Yutaka Kano, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Mizuki Sudo. International Sports Science Forum 57, 2009
- 2) Eccentric exercise training-induced skeletal muscle hypertrophy is augmented by concomitant blood flow restriction. Mizuki Sudo, Yutaka Kano. 56th Annual Congress of the American College of Sports Medicine, Med. Sci .Sport Exer. 41, S300, 2009
- 3) Delayed Inflammation-regeneration response following eccentric contractions in diabetic rat skeletal muscle. Mai Shinohara, Mizuki Sudo, Yutaka Kano. 56th Annual Congress of the American College of Sports Medicine, Med. Sci .Sport Exer. 41, S455, 2009
- 4) Eccentric contraction induced skeletal muscle damage in rats is suppressed by concomitant blood flow restriction. Mizuki Sudo, Yutaka Kano. 55th Annual Congress of the American College of Sports Medicine, Med. Sci .Sport Exer. 40, S195, 2008
- 5) Myonuclear apoptosis occurs in regenerative process following eccentric contractions in rats. Mizuki Sudo, Yutaka Kano. Experimental Biology, 2008
- 6) Effects of isometric and eccentric contractions on apoptosis of skeletal muscle In male and female rats. Mizuki Sudo, Yutaka Kano. 52th Annual Congress of the American College of Sports Medicine, Med. Sci .Sport Exer. 37, S317, 2005
- 7) Apoptosis of skeletal muscle in male and female rats after eccentric contractions. Mizuki Sudo, Yutaka Kano. 2004 American Physiological Society Intersociety Meeting, The Physiologist, 47, 294, 2004

■ 国内学会

- 1) 須藤 みず紀, 狩野 豊. 血流制限強度とエキセントリック収縮誘発性筋損傷の関係 第 64 回日本体力医学会, 体力科学 58 (6), 627, 2009

- 2) 狩野 豊, 曾野部 崇, 稲垣 薫克, 須藤 みず紀. 糖尿病ラットにおける筋収縮後の筋細胞内カルシウムイメージング 第 64 回日本体力医学会, 体力科学 58(6), 625, 2009
- 3) 芝口 翼, 杉浦 崇夫, 須藤 みず紀, 狩野 豊, 後藤 勝正, 吉岡 利忠. 伸張性収縮誘発性筋損傷からの回復過程における Akt-mTOR 系の変化 第 64 回日本体力医学会, 体力科学 58(6), 621, 2009
- 4) 須藤 みず紀, 狩野 豊. 血流制限を伴うことによりエキセントリック収縮誘発性筋損傷は抑制される 第 63 回日本体力医学会, 体力科学 57(6), 661, 2008
- 5) 篠原 麻衣, 須藤 みず紀, 狩野 豊. 糖尿病ラット骨格筋の運動誘発性筋損傷と回復過程における形態特性 第 63 回日本体力医学会, 体力科学 57(6), 662, 2008
- 6) 須藤 みず紀, 狩野 豊. ラット運動誘発性筋損傷モデルの再生過程におけるアポトーシス発生. 第 62 回日本体力医学会, 体力科学 56 (6), 598, 2007
- 7) 篠原 麻衣, 須藤 みず紀, 狩野 豊. 糖尿病ラット骨格筋における運動誘発性筋損傷の組織学的特性 第 62 回日本体力医学会, 体力科学 56 (6), 598, 2007
- 8) 須藤 みず紀, 狩野 豊. エキセントリック収縮によるラット骨格筋のアポトーシスおよび Bcl-2, Bax 発現の経時的変化. 第 61 回日本体力医学会, 体力科学 55(6), 619, 2006
- 9) 須藤 みず紀, 狩野 豊. ラット骨格筋の運動誘発性アポトーシスにおける性差と運動様式の影響. 第 60 回日本体力医学会, 体力科学 54(6), 455, 2005

■ 受賞歴

- 1) 第 63 回日本体力医学会 大塚スポーツ医科学賞 特別賞, 須藤 みず紀, 狩野 豊, 血流制限を伴うことによりエキセントリック収縮誘発性筋損傷は抑制される. 体力科学 58 (1), 46, 2009

著者略歴

須藤 みず紀 (SUDO MIZUKI)

1978年9月 福島県生まれ

2003年3月 電気通信大学 電気通信学部 電子物性工学科 卒業

2003-4年 電気通信大学 電気通信学部 量子・物質工学科 研究生

2005年4月 電気通信大学 電気通信学研究科

量子・物質工学専攻 博士前期課程 入学

2007年3月 電気通信大学 電気通信学研究科

量子・物質工学専攻 博士前期課程 修了

2007年4月 電気通信大学 電気通信学研究科

量子・物質工学専攻 博士後期課程 入学

2010年3月 電気通信大学 電気通信学研究科

量子・物質工学専攻 博士後期課程 修了 (理学)

2010年4月より福岡大学 スポーツ科学部 運動生理学研究室ポスドクターとして研究に従事。

日本体力医学会, American College of Sports Medicine 会員.

関 連 論 文

(1) Mizuki Sudo and Yutaka Kano.

Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats.

Journal of Physiological Sciences. 2009 Nov; 59(6):405-12.

(2) Yutaka Kano, Kazumi Masuda, Hirotaka Furukawa, Mizuki Sudo, Kazuyuki Mito, Kazuyoshi Sakamoto.

Histological skeletal muscle damage and surface EMG relationships following eccentric contractions.

Journal of Physiological Sciences. 2008 Oct; 58(5):349-55.

Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats

Mizuki Sudo · Yutaka Kano

Received: 19 March 2009 / Accepted: 24 June 2009 / Published online: 28 July 2009
© The Physiological Society of Japan and Springer 2009

Abstract Eccentric contractions (ECC) induce myofibrillar collapse, edema, and inflammation in muscle cells. Although apoptosis of myonuclei following ECC is activated during the inflammatory phase, the apoptosis response of the regenerative phase remains to be elucidated. The aim of the present study was to determine the inflammatory and regenerative phase of the apoptosis responses induced by ECC. In anesthetized rats, the tibialis anterior muscles were subjected to ECC repeated 40 times, evoked by surface electric stimulation (100 Hz, 10 V) with mechanical muscle stretch. Apoptosis was examined in the control group and in groups 1, 3, 7, and 14 days after ECC (each group, $n = 4-6$). Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)-positive myonuclei were assessed by further labeling with dystrophin staining and DAPI. The expression of proteins related to apoptosis (Bcl-2 and Bax) was examined by Western blot assay. At 1 and 3 days, focal edema and necrotic myofibers invaded by mononuclear phagocytes were present, whereas regenerated myofibers with central nuclei were detected at 7 and 14 days. The occurrence of TUNEL-positive myonuclei increased significantly at 7 ($7.0 \pm 1.5\%$) and 14 days ($5.6 \pm 0.6\%$) compared with control ($0.9 \pm 0.5\%$). Further we found that myonuclear apoptosis was restricted to the subsarcolemmal space at 7 and 14 days and markedly absent from the central nucleus. The Bax/Bcl-2 ratio was significantly higher at 3 (4.5 ± 0.9) and 7 days (3.4 ± 0.5) after ECC. In conclusion, myofiber apoptotic responses following ECC are

present not only in the inflammatory phase but also persist during the regenerative phase.

Keywords Muscle damage · Bcl-2 · Bax

Introduction

It is well known that repetitive eccentric muscle contractions (ECC) induce muscle damage. ECC-induced muscle damage leads to myofiber necrosis accompanied by ultrastructural collapse, edema, and inflammation of myofibers [6, 16, 17, 46]. These inflammatory reactions achieve their peak responses 3 days after ECC, and subsequently the muscle fiber shifts to the process of regeneration in ~ 7 days [6, 20, 21]. The elimination of damaged myofibers by necrosis constitutes one of a series of responses in the process of myofiber regeneration. It is also known that a damaged or dysfunctional cell or myofiber is removed by a genetic control through apoptosis [23, 31]. In fact, apoptotic induction is observed with necrosis in myofibers due to exercise [7, 12, 13, 30, 36, 42]. Previous studies demonstrated that apoptosis plays an important role in controlling the cell differentiation processes of skeletal muscle [8, 27]. For example, caspase-3 activation of apoptosis-induced factor is required for skeletal muscle differentiation [19, 25]. MyoD, a muscle-specific transcription factor, promotes differentiation of satellite cells. Recently, Asakura et al. [8] reported that MyoD plays an essential role in apoptosis during proliferation and differentiation phases. Therefore apoptosis may play an important role for controlling the cell differentiation processes of skeletal muscle. Based on these studies, we hypothesized that the apoptosis response induced by ECC would be activated in the regeneration phase as well as the inflammation phase. The purpose of the

M. Sudo · Y. Kano (✉)
Department of Applied Physics and Chemistry,
University of Electro-Communications, Chofu,
Tokyo 1828585, Japan
e-mail: kano@pc.uec.ac.jp

present investigation, therefore, was to test this hypothesis by examining the time course of the apoptotic response from the early inflammation phase through the regeneration phase following ECC.

In addition, endurance training causes apoptosis to a muscular capillary (i.e., endothelial cell), but little is known about whether ECC contraction with significant damage induces endothelial cell apoptosis. We also examined apoptosis induction in endothelial cells during inflammation and regeneration process.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats ($n = 27$, Japan SLC) 12 weeks of age were used in this study. Rats were maintained on a 12:12-h light-dark cycle and received food and water ad libitum. All experiments were conducted under the guidelines established by the Physiological Society of Japan and were approved by University of Electro-Communications Institutional Animal Care and Use Committee.

Eccentric contractions protocol

During eccentric exercise and all surgical procedures, the rats were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (70 mg kg^{-1} i.p.), and supplemental doses of anesthesia were administered as needed. The right tibialis anterior (TA) muscle was stimulated electrically via a surface electrode (10 V stimulation, 100 Hz frequency, 700 ms stimulation period, i.e., 70 pulses). In preliminary experiments and our previous study [26], we confirmed that maximum muscle tension was achieved by electrical stimulation of a surface electrode (100 Hz, $<10 \text{ V}$). In the resting condition before ECC, the right foot was attached to the clamp unit and the plate was connected to the electromotor system (Model RU-72, NEC Medical Systems). The right ankle joint was maintained at 50° as the initial angle, and during electrostimulation of the TA muscle, the electromotor was rotated at an angular velocity of 260° s^{-1} to 180° of the ankle joint, which lengthened the dorsiflexor muscle group. The muscle tension generated during ECC was monitored using a strain gauge that was incorporated into the plate fixing the foot. The strain gauge was calibrated using precision calibration weights that spanned the expected range of strains. The right TA muscle was subjected to 40 repeated ECCs. Each rat was assigned randomly to one of five groups and examined at control ($n = 5$) or 1 ($n = 6$), 3 ($n = 4$), 7 ($n = 6$), or 14 ($n = 6$) days post-ECC.

Histological evaluation for muscle damage

At 1, 3, 7, and 14 days after ECC, the TA muscles of both legs were carefully dissected and the mid-belly region cut transversely to the long axis of the muscle. The tissue blocks were frozen rapidly in isopentane cooled by liquid nitrogen. Transverse sections of $10 \mu\text{m}$ were made with a cryostat (Leica, CM1510) at -20°C and stained with hematoxylin–eosin (HE) to examine the histological features of muscle damage. To avoid sampling bias, each section was subsampled at six different regions: (1) anterior-medial, (2) anterior-central, (3) anterior-lateral, (4) posterior-medial, (5) posterior-central, and (6) posterior-lateral; each of these fields was analyzed in all muscles. Muscle fiber damage was determined by a point counting method using a 30×40 mounted grid (i.e., 1,200 points total; one square = $18 \times 18 \mu\text{m}$) on microscopic fields. Damaged myofibers were defined as those with infiltration of inflammatory cells, pale staining of the cytoplasm, swollen appearance, or multiple central nuclei (Fig. 1A, B). Muscle fiber damage was expressed as a percentage of counted grid squares.

Identification of myofiber apoptosis

Double labeling with the TUNEL assay was performed after dystrophin labeling. The sections were air dried at room temperature, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, 10 min each). The tissue was blocked by 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min at room temperature. After washing in PBS, sections were incubated with an anti-dystrophin mouse–monoclonal antibody (1:30, VP-D 505, Vector Laboratories) for 1 h at room temperature, followed by an anti-mouse IgG rhodamine-conjugated antibody fragment incubation for 1 h at 37°C (1:100, R0270, Dako).

After dystrophin labeling, apoptotic nuclei were assessed from muscle cross-sections via a TUNEL assay. Apoptotic nuclei were identified by a fluorometric TUNEL detection kit (MEBSTAIN Apoptosis Kit Direct, Co. 8445, Medical & Biological Laboratories) according to the manufacturers' instructions for both muscle cross-sections. Briefly, tissue sections were incubated with a fluorescein-conjugated TUNEL reaction. Negative control experiments were performed by omitting the TdT enzyme in the TUNEL reaction mixture on the tissue sections. After dystrophin and TUNEL labeling, the muscle sections were mounted with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; H-1200, Vector Laboratories). TUNEL- and DAPI-positive nuclei and dystrophin staining were captured under a fluorescence microscope (Eclipse E800, Nikon). The number of TUNEL and DAPI-positive nuclei was counted

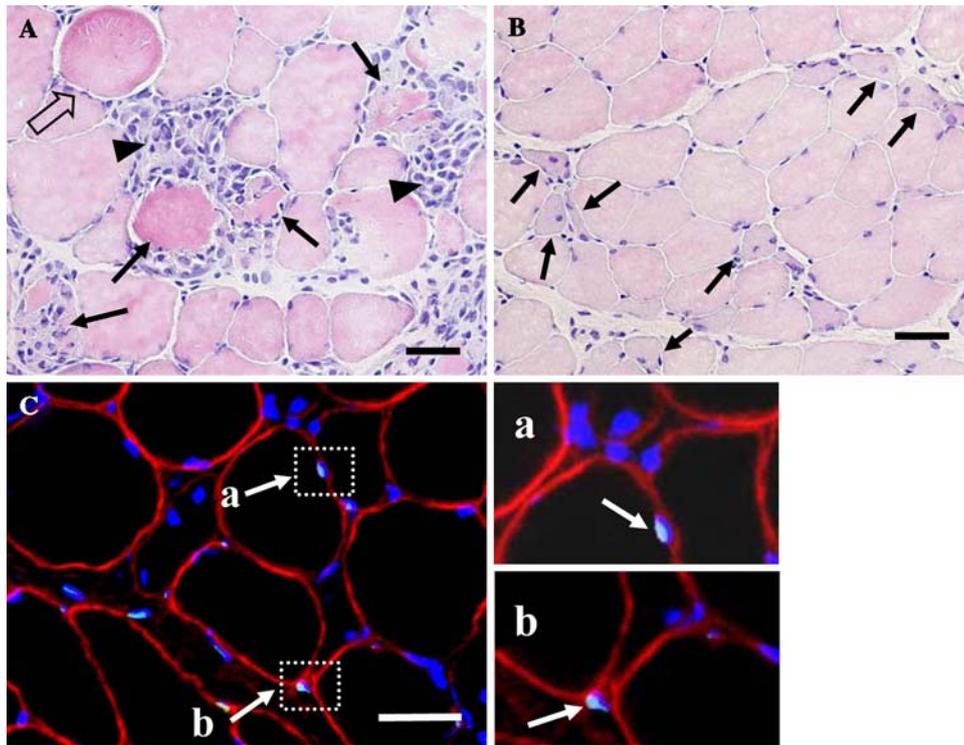


Fig. 1 **a** Hematoxylin and eosin staining 3 days after ECC. Damaged myofibers were defined as those inflammatory cells with swollen (outlined arrows), swollen with infiltration (arrows), and infiltration (arrow-heads) appearance. **b** The multiple central nuclei can be detected (arrows) after 7 days of ECC. **c** TUNEL-positive nuclei were found both inside (a) and outside (b) myofibers. Muscle transverse sections were immunofluorescent-stained with dystrophin

antibody to identify the sarcolemma (red), fluorescein-mediated TUNEL assay was performed to identify apoptotic nuclei (light blue), and all nuclei were labeled by DAPI staining (blue). TUNEL-positive nuclei positioned inside the dystrophin stain (a) were identified as myofiber nuclei, whereas other nuclei located outside (b) were counted as endothelial or interstitial cell nuclei. Bar 50 μm

from six random, nonoverlapping fields at an objective magnification of $\times 10$. Only the TUNEL-positive nuclei inside the dystrophin were quantified as myofiber apoptotic nuclei (Fig. 1C). The TUNEL labeling was quantified as the number of myofiber TUNEL-positive nuclei per total myofiber nuclei.

Identification of endothelial apoptosis

For endothelial apoptosis, serial cross-sections were stained using TUNEL and alkaline phosphatase-dipeptidyl peptidase IV (AP-DPPIV) stain [29], respectively. A small amount of substrate solution specific for DPPIV was poured onto the sections, which were maintained at 4°C overnight. The sections were rinsed with PBS and treated with the substrate solution specific for AP at 37°C for 60 min. The solution for demonstrating DPPIV consisted of glycyl-L-proline-4-methoxy-beta-naphthylamine, which is a substrate for DPPIV, dissolved in 1 ml of *N,N*-dimethylformamide, and fast blue B dissolved in 0.1 M acetate buffer (pH 7.4). The solution for AP consists of naphthol AS-MAX phosphate, which is a substrate for AP,

dissolved in *N,N*-dimethylformamide, and varamine blue salt RT dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 9.2).

Western blot analysis for Bcl-2 and Bax

Protein expressions of Bcl-2 and Bax were determined in TA muscles after ECC. The samples were homogenized in homogenizing buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, PMSF) and centrifuged at 8,000g for 15 min (4°C). Soluble protein was heated for 5 min at 95°C, loaded on each lane of a 12% polyacrylamide gel, and separated by routine SDS-PAGE for 50 min (20 V) at room temperature. The gels were blotted to PVDF membranes (Millipore) by semi-dry assay. The membranes were blocked in 10% skim milk in PBS with 0.05% Tween-20 (PBS-T) at room temperature for 1 h and probed with anti-Bcl-2 mouse monoclonal antibody (1:500, sc-7382, Santa Cruz Biotechnology) and anti-Bax rabbit polyclonal antibody (1:500, sc-493, Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS-T.

All primary antibody incubations were at room temperature for 1.5 h. Membranes were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary

antibody, AP1254 for anti-mouse IgG antibody, and AP758 for anti-rabbit IgG antibody, and the signals were developed by ECL plus Western Blotting Detection System (RPN2132, Amersham Biosciences). The resulting bands were quantified as $OD \times \text{band area}$ by CS analyzer (ATTO Corporation). The size of the immuno-detected proteins was verified by using standard molecular-weight markers (Bio-Rad Laboratories).

Statistical analyses

Statistical analyses consisted of a one-way ANOVA with Dunnett post-hoc testing using Prism version 4.0 (GraphPad software). For all statistical tests, the 0.05 and 0.01 levels of confidence were accepted for statistical significance. All values are reported as mean \pm SE.

Results

Muscle fiber damage

Histological examination of control muscles revealed no visible evidence of muscle tissue inflammation. In contrast,

typical histological lesions appeared in the exercised muscle fiber after around 1–3 days (Fig. 2, Table 1). One day after ECC, damaged muscle fiber showed the swollen condition ($2.4 \pm 2.1\%$ of total fiber area). At 3 days after ECC, focal edema and necrotic fiber invaded by mononuclear phagocytes were recognized and the extent of the damaged fiber area was significantly increased ($23.4 \pm 6.2\%$ of total fiber area, $p < 0.01$ vs. control). A regeneration process was observed at 7 and 14 days after ECC, characterized by a small-diameter fiber with multiple central nuclei (7 days: $4.5 \pm 1.3\%$, 14 days: $3.7 \pm 1.4\%$ of total fiber area, $p < 0.05$ vs. control).

Myofiber apoptosis and dystrophin

The TUNEL assay and dystrophin staining to investigate the expression of myofiber apoptosis are presented in Fig. 1. Loss of dystrophin was not observed in the control and 1 day after ECC. Myofiber TUNEL-positive nuclei were marginally detectable in control and 1 day after ECC (control: $0.9 \pm 0.5\%$, 1 day: $2.5 \pm 1.1\%$, Fig. 3). In contrast, intense staining of TUNEL-positive nuclei and loss of dystrophin were observed 3 days after ECC (Fig. 2). Because of sarcolemmal degeneration after 3 days of ECC, we were unable

Fig. 2 Serial transverse sections from control (a–c), 3 days (d–f), and 7 days (g–i) after ECC in TA muscle. H&E staining (a, d, g) was performed to examine the histological features of muscle damage, triple histochemical staining (b, e, h) for myofiber apoptotic nuclei was used as shown in Fig. 1, and AP-DPPIV staining was performed to identify endothelial cells (c, f, i). Bar 50 μm

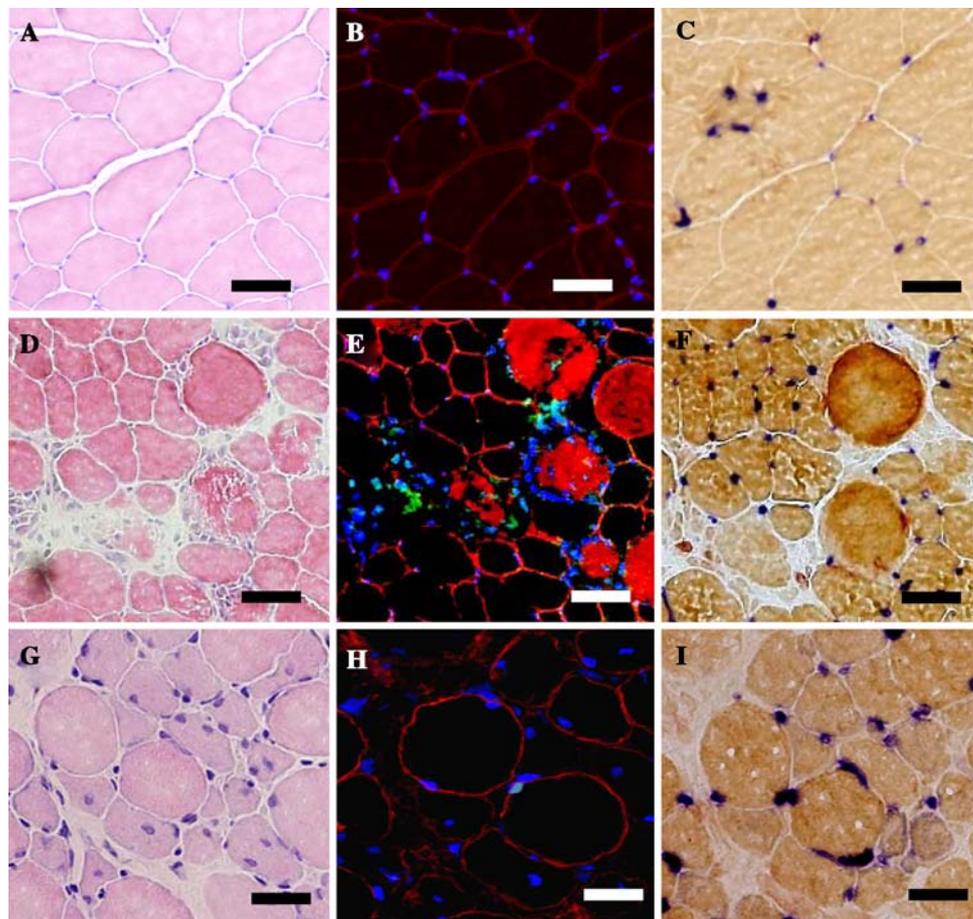


Table 1 Percentage of inflammation and regeneration muscle fiber after ECC

	Control	1 day	3 days	7 days	14 days
Inflammation fiber (%)	0.0 ± 0.0	2.4 ± 2.2	23.4 ± 6.2**	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Regeneration fiber (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.5 ± 1.3*	3.7 ± 1.4*

Values are mean ± SE

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from control

to quantify myofiber apoptosis at this time point. In the regeneration phase (7 and 14 days after ECC), loss of dystrophin was not observed, however, regenerated myofibers with central nuclei were detected. TUNEL-positive myonuclei were significantly increased at 7 ($7.0 \pm 1.5\%$, $p < 0.01$) and 14 days ($5.6 \pm 0.6\%$, $p < 0.05$) compared with control.

Figure 4 shows the longitudinal section of TA muscle at 7 and 14 days after ECC by TUNEL and dystrophin staining. We found that myonuclear apoptosis was located in the subsarcolemmal region rather than the central nucleus at 7 and 14 days.

Endothelial apoptosis

Using serial sections by TUNEL and AP-DPPiV assay, we evaluated vascular endothelial cell apoptosis (Fig. 2). We observed TUNEL-positive endothelial nuclei at 7 days ($7.6 \pm 3.6\%$, $p < 0.05$ vs. control) after ECC. The myonuclear apoptosis remained higher than control at 14 days after ECC, whereas endothelial nuclear apoptosis had returned to basal levels.

Expression of apoptotic proteins

We performed Western blotting to determine the pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) muscle protein content (Fig. 5). Bcl-2 protein significantly decreased in muscles at 1, 3, and 7 days after ECC compared with control (1 day: -35% , 3 days: -60% , 7 days: -56% , $p < 0.05$, Fig. 5b). Also, there was a tendency toward an increase in Bax protein content at 3 days (88%) and 7 days (51%). Thus the Bax/Bcl-2 ratio was significantly higher at 3 (4.5 ± 0.9) and 7 (3.4 ± 0.5) days after ECC (Fig. 5c).

Discussion

The present investigation has demonstrated for the first time that, following ECC, myofiber apoptosis is not restricted solely to the inflammation phase, but also occurs during the regeneration phase. Furthermore, this regeneration phase myonuclear apoptosis did not occur in central nuclei but rather was restricted to the subsarcolemmal region.

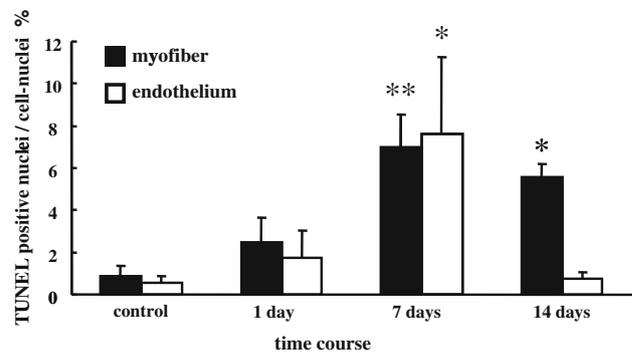


Fig. 3 Percentage of myofiber and endothelial cell nuclei identified as apoptotic in control and post-ECC muscles at 1, 7, and 14 days. Values are mean ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from control

Myofiber apoptosis during the inflammation phase

After ECC, inflammatory responses progress over the first 3 days following insult, and damaged cells undergo phagocytosis [10, 32]. Previous studies [9, 15, 24, 33] have shown that many genes related to inflammation are expressed in skeletal muscle following high-intensity ECC. Urso et al. [48] reported that gene expression related to apoptotic pathways was approximately 9% for a total expressed gene at 8 h after ECC in human skeletal muscle. In the present investigation, we attempted to determine the time course and spatial resolution of ECC-induced myofiber apoptosis histologically. One day following ECC some apoptotic nuclei could be identified within myofibers. After 3 days, most damaged myofibers were accompanied by collapse of a plasma membrane structure that precluded identification of myofiber nuclei at that time. However, many TUNEL-positive nuclei were observed within damaged myofibers that lacked sarcolemmal dystrophin. It is generally accepted that dystrophic muscle fibers are disassembled by necrotic pathways, but several studies have suggested that acute muscle fiber degeneration occurs by apoptotic pathways [1, 41, 42, 47]. Biral and co-workers [12] also reported that TUNEL-positive nuclei were detected in fibers deprived of dystrophin or a sarcoglycan sarcolemmal staining following 6 and 24 h of ECC. This latter paper considered that the loss of several membrane

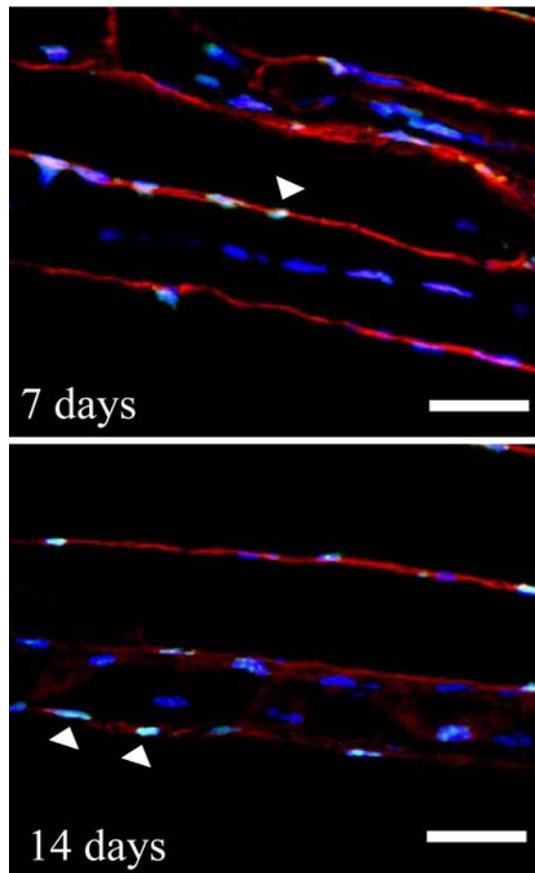


Fig. 4 Longitudinal sections taken 7 and 14 days after ECC in TA muscle. All nuclei were stained with DAPI (blue), and nuclei with internal dystrophin stain (red) were defined as myofiber nuclei. TUNEL-positive myofiber nuclei (arrow) were located in the subsarcolemma, but central nuclei were not detected. Bar 50 μ m

skeletal proteins after ECC could lead to fiber death by apoptosis or necrosis.

Myonuclear apoptosis during the regeneration phase

We have provided original evidence that myonuclear apoptosis occurs in the regeneration phase following ECC. These findings suggest the participation of apoptosis in the processes of myofiber regeneration. The myocyte is a multinucleated cell, and it is necessary to keep a fixed muscle nuclei domain. Taking into consideration physiological significance, apoptosis in the regeneration phase is not targeting damaged myofiber for removal. We predict that apoptosis plays a major role in regulating nuclear localization and domains during myofiber regeneration. It is well known that the number of nuclei is a causative factor for the regulation of muscle fiber size [18, 22]. For example, in atrophying fibers, apoptosis contributes to the elimination of myonuclei and/or satellite cells [4, 5, 14, 43, 44]. A similar mechanism may contribute to the spatial

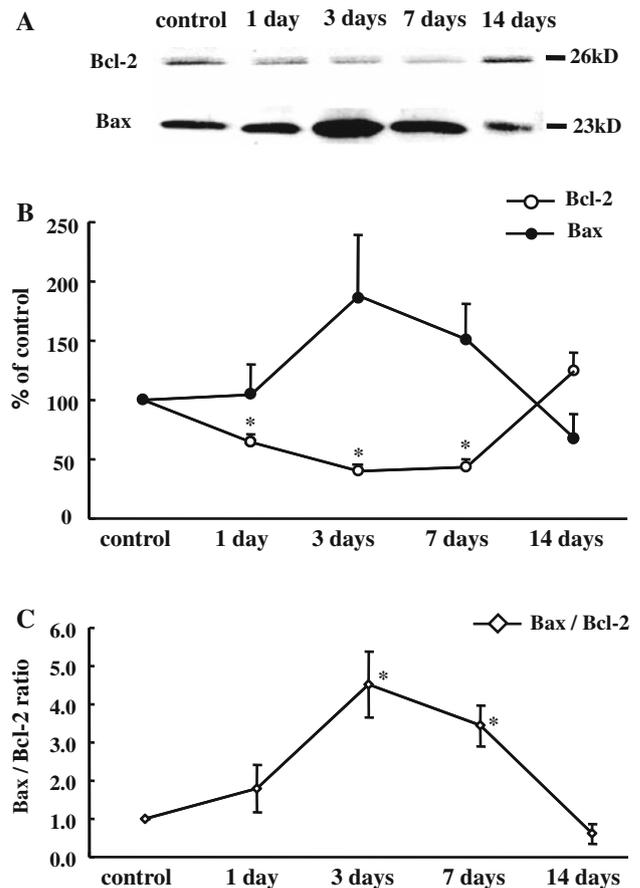


Fig. 5 Immunoblot analysis of the protein expression of Bcl-2 and Bax. Inset displays representative images for control and ECC muscles (a). Quantification by densitometry of Bcl-2 protein was significantly decreased 1, 3, and 7 days after ECC compared with control (b). Values are expressed as the percentage of the mean values of the control. Bax/Bcl-2 ratio was significantly higher at 3 and 7 days after ECC (c). * $p < 0.05$, significant difference from control

definition of muscle nuclear domains during myofiber regeneration.

As shown in the myofiber longitudinal sections in Fig. 4, myonuclear apoptosis was localized to the subsarcolemma rather than the central cytoplasm at 7 and 14 days after ECC. If a central nucleus represents a neogenic nucleus from the satellite cell, it is possible that an existing myofiber nucleus located in the sarcolemma leads to preferential apoptosis. Muscle satellite cells are responsible for repair as they function as muscle stem cells [2, 11]. The myogenic regulatory factors such as MyoD, Myf5, and myogenin play an essential role in regulating the satellite cell activation program. In the ECC animal model employed by Okada et al. [35], which was similar to the present investigation, it was reported that the MyoD protein expression level was increased markedly from 3 to 7 days after ECC. Also, it is known that myotoxic-induced muscle damage causes high MyoD expression after 5–21 days

[40]. Interestingly, Asakura et al. [8] have demonstrated that MyoD regulates not only differentiation and proliferation of satellite cells but also the apoptosis response during the regenerating phase. In the present investigation, we found a very different quantitative and temporal profile of expression of Bax and Bcl-2 between 7 and 14 days post-ECC. Though apoptosis was induced at 14 days, the Bax/Bcl-2 expression ratio declined to control levels. This profile suggests participation of other pro-apoptosis genes in the post-ECC response. Indeed, there is evidence that MyoD alters the expression of many genes involved in apoptosis [8].

Apoptosis response in endothelial cells

This study found that apoptosis occurs not only in myofibers but also in capillary endothelial cells after ECC. These findings were unexpected because we have shown that ECC does not induce necrosis of endothelial cells [26]. Little is currently known about exercise-induced capillary endothelial apoptosis. There is one report that examined apoptosis after running in mice [37]. That previous study showed that acute spontaneous running increased the number of apoptotic nuclei in endothelial cells.

There is evidence that both reactive oxygen species (ROS) [28, 34] and intracellular $[Ca^{2+}]_i$ dysregulation may participate in ECC-induced muscle damage [3, 45]. Specifically, high $[Ca^{2+}]_i$ serves to stimulate calpain activity and consequently promotes neutrophil activation [39]. Activated neutrophils are potential sources of free radicals and ROS production, which subsequently damage proteins and DNA [38]. Thus, ROS caused by neutrophilic activity acts on endothelial cells from inside the vascular lumen and may induce endothelial cell apoptosis.

In conclusion, we have discovered myofiber and endothelial cell apoptosis throughout the 14-day inflammation-regeneration period following ECC in male rat skeletal muscle. Future investigations might usefully explore the specific myonuclear domains during apoptosis found in the regeneration phase following ECC-induced damage.

Acknowledgments We gratefully acknowledge Dr. D.C. Poole at Kansas State University for helpful comments on the manuscript and Dr. S. Yamada at the University of Tokyo for excellent technical support.

References

1. Abmayr S, Crawford RW, Chamberlain JS (2004) Characterization of ARC, apoptosis repressor interacting with CARD, in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 13:213–221
2. Adams GR (2006) Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Appl Physiol Nutr Metab* 31:782–790
3. Allen DG, Whitehead NP, Yeung EW (2005) Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *J Physiol* 567:723–735
4. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR (1997) Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol* 273:C579–C587
5. Alway SE, Siu PM (2008) Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev* 36:51–57
6. Armstrong RB (1984) Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 16:529–538
7. Arslan S, Erdem S, Sivri A, Hascelik Z, Tan E (2002) Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam. *Rheumatol Int* 21:133–136
8. Asakura A, Hirai H, Kablar B, Morita S, Ishibashi J, Piras BA, Christ AJ, Verma M, Vineretsky KA, Rudnicki MA (2007) Increased survival of muscle stem cells lacking the MyoD gene after transplantation into regenerating skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16552–16557
9. Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J, Lieber RL (2004) Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C355–C364
10. Best TM, Hunter KD (2000) Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 11:251–266
11. Bhagavati S (2008) Stem cell based therapy for skeletal muscle diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 3:219–228
12. Biral D, Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Sandri M, Rossini K, Carraro U, Betto R (2000) Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:618–626
13. Boffi FM, Cittar J, Balskus G, Muriel M, Desmaras E (2002) Training-induced apoptosis in skeletal muscle. *Equine Vet J* 34(Suppl):275–278
14. Bruusgaard JC, Gundersen K (2008) In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest* 118:1450–1457
15. Chen YW, Hubal MJ, Hoffman EP, Thompson PD, Clarkson PM (2003) Molecular responses of human muscle to eccentric exercise. *J Appl Physiol* 95:2485–2494
16. Clarkson PM, Hubal MJ (2002) Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* 81:S52–S69
17. Clarkson PM, Sayers SP (1999) Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 24:234–248
18. Favier FB, Benoit H, Freyssenet D (2008) Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* 456:587–600
19. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeny LA (2002) Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11025–11030
20. Friden J (1984) Changes in human skeletal muscle induced by long-term eccentric exercise. *Cell Tissue Res* 236:365–372
21. Friden J, Lieber RL (1998) Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell Tissue Res* 293:165–171
22. Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE (2004) Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* 97:1082–1090
23. Henriquez M, Armisen R, Stutzin A, Quest AF (2008) Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Curr Mol Med* 8:187–206
24. Hubal MJ, Chen TC, Thompson PD, Clarkson PM (2008) Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1628–R1637

25. Hunter AL, Zhang J, Chen SC, Si X, Wong B, Ekhterae D, Luo H, Granville DJ (2007) Apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) inhibits myogenic differentiation. *FEBS Lett* 581:879–884
26. Kano Y, Sampei K, Matsudo H (2004) Time course of capillary structure changes in rat skeletal muscle following strenuous eccentric exercise. *Acta Physiol Scand* 180:291–299
27. King KL, Cidlowski JA (1995) Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 58:175–180
28. Kon M, Tanabe K, Lee H, Kimura F, Akimoto T, Kono I (2007) Eccentric muscle contractions induce greater oxidative stress than concentric contractions in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 32:273–281
29. Koyama T, Xie Z, Gao M, Suzuki J, Batra S (1998) Adaptive changes in the capillary network in the left ventricle of rat heart. *Jpn J Physiol* 48:229–241
30. Lim JH, Kim DY, Bang MS (2004) Effects of exercise and steroid on skeletal muscle apoptosis in the mdx mouse. *Muscle Nerve* 30:456–462
31. Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405–2419
32. Lowe DA, Warren GL, Ingalls CP, Boorstein DB, Armstrong RB (1995) Muscle function and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury. *J Appl Physiol* 79:1260–1270
33. Mahoney DJ, Safdar A, Parise G, Melov S, Fu M, MacNeil L, Kaczor J, Payne ET, Tarnopolsky MA (2008) Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1901–R1910
34. Maruhashi Y, Kitaoka K, Yoshiki Y, Nakamura R, Okano A, Nakamura K, Tsuyama T, Shima Y, Tomita K (2007) ROS scavenging activity and muscle damage prevention in eccentric exercise in rats. *J Physiol Sci* 57:211–216
35. Okada A, Ono Y, Nagatomi R, Kishimoto KN, Itoi E (2008) Decreased muscle atrophy F-box (MAFbx) expression in regenerating muscle after muscle-damaging exercise. *Muscle Nerve* 38:1246–1253
36. Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Krajewska B, Ciesielska U, Jethon Z, Zabel M (2004) Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol (Warsz)* 63:213–216
37. Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U (1998) Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:518–531
38. Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88:1243–1276
39. Raj DA, Booker TS, Belcastro AN (1998) Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise. *Pflugers Arch* 435:804–809
40. Richard-Bulteau H, Serrurier B, Crassous B, Banzet S, Peinnequin A, Bigard X, Koulmann N (2008) Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C467–C476
41. Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, Carraro U (1998) Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* 78:1005–1016
42. Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V, Rizzi C, Arslan P, Franceschi C, Carraro U (1997) Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:45–57
43. Siu PM, Pistilli EE, Butler DC, Alway SE (2005) Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C338–C349
44. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ (2000) Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 302:235–241
45. Sonobe T, Inagaki T, Poole DC, Kano Y (2008) Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: role of stretch-activated channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1329–R1337
46. Stupka N, Tarnopolsky MA, Yardley NJ, Phillips SM (2001) Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 91:1669–1678
47. Tews DS, Goebel HH (1997) DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:331–338
48. Urso ML, Clarkson PM, Hittel D, Hoffman EP, Thompson PD (2005) Changes in ubiquitin proteasome pathway gene expression in skeletal muscle with exercise and statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2560–2566