

## 論文の内容の要旨

### ビタミン C 投与が骨格筋肥大に及ぼす効果

The effects of vitamin C administration on skeletal muscle hypertrophy

蒔苗 裕平

#### 【諸言】

骨格筋は可塑性に富む器官であり、力学的過負荷によって肥大し、負荷の減少により萎縮する。骨格筋量の維持や増加は、スポーツ選手のパフォーマンス向上のみならず、サルコペニアや生活習慣病の予防など、人々の健康の維持増進に重要である。骨格筋肥大のメカニズムを明らかにすることを目的とした研究はこれまでに多くなされてきたが、そのメカニズムは未だ不明な点が多く残されている。

運動によって産生量が増加する活性酸素種 (ROS) は、体内で過剰に生成された場合、疾病や障害の原因となることが知られている。しかしながら、近年の研究により、ROS が運動適応に関する様々なシグナル伝達経路に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。さらに、骨格筋量を制御するシグナル伝達経路にも ROS が関与する可能性が示されている (Handayaningsih *et al.* 2011)。Insulin-like growth factor-I (IGF-I) 刺激によって、筋タンパク質合成に関わるシグナル伝達経路である p70 ribosomal s6 kinase (p70s6k) や p42/44 extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2) の活性化が引き起こされるが、抗酸化物質の一種である N-アセチルシステイン (NAC) を添加すると、その活性化が抑制されることが Handayaningsih ら (2011) によって示されている。また、彼らは、筋タンパク質分解に関与する atorgin-1 と muscle RING finger protein 1 (MuRF1) の IGF-I 刺激による発現量低下が、抗酸化物質の添加により阻害されることも報告している (Handayaningsih *et al.* 2011)。そこで本研究では、抗酸化物質を投与し、ROS を除去することで、骨格筋肥大が抑制されると仮説を立てて研究を行った。本研究では、代表的な抗酸化物質であり、サプリメントとして摂取されることが多い、ビタミン C を

抗酸化物質として用いた。

【第1章：14日間の継続的なビタミンC投与が力学的過負荷による骨格筋肥大に及ぼす効果（研究1）】

継続的なビタミンC投与が力学的過負荷によりもたらされる骨格筋肥大とそれに関連するシグナル伝達に及ぼす影響について検討した。ラット右後肢に対し、足底筋の共働筋（腓腹筋とヒラメ筋）切除手術を行うことで、足底筋に力学的過負荷を与えた。左後肢には、偽手術を施した。実験期間中、ビタミンC ( $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ body weight}$ ) の経口投与を1日1回行い、手術14日後に筋サンプルおよび血清サンプルを採取した。

ビタミンC投与は、14日間の力学的過負荷によって生じた足底筋の肥大（152%反対肢）を減弱した（141%反対肢）。さらに、その筋肥大減弱効果には、骨格筋肥大に関わるシグナル伝達タンパク質である、リン酸化Erk1/2やリン酸化p70s6kの含量、atrogin-1の発現量の変化が関与する可能性が示された。しかしながら、力学的過負荷によって増加した筋中ビタミンC濃度や酸化ストレスマーカー濃度に対して、ビタミンC投与は影響を及ぼさなかった。

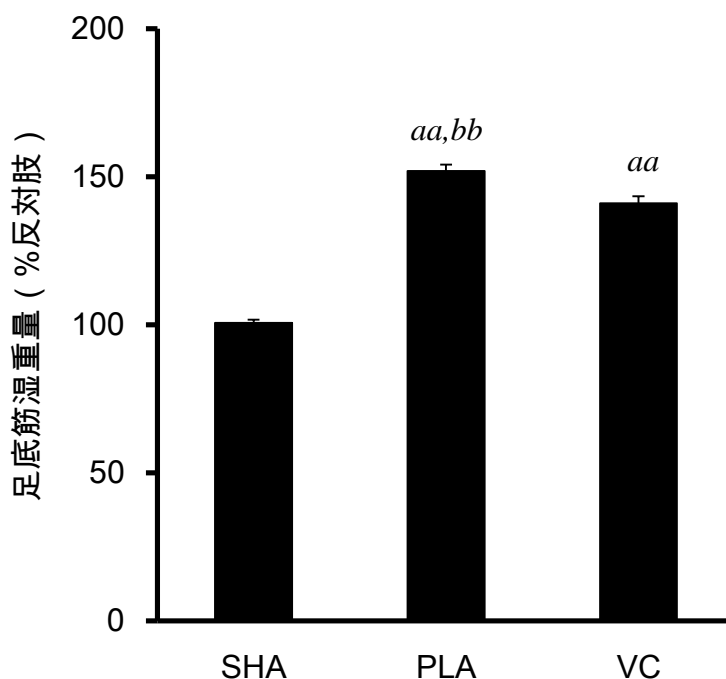


図. 筋肥大に及ぼすビタミンC投与の効果

<sup>aa</sup> SHA との間での有意差 ( $P < 0.01$ ) .

<sup>bb</sup> VC との間での有意差 ( $P < 0.01$ ) .

## 【第2章：ビタミンC経口投与が代償性筋肥大初期時の応答に及ぼす効果（研究2）】

研究1において、筋中ビタミンC濃度や酸化ストレスマーカー濃度に対するビタミンC投与の効果を確認できなかった原因として、1) 実験期間の長さ、2) 筋サンプル採取のタイミング、という2つの要因が考えられた。そこで、研究2では、共働筋切除手術2日後の経口投与1時間後に筋サンプルを採取することによって、ビタミンC経口投与が筋中ビタミンC濃度や酸化ストレスマーカー濃度、筋細胞内シグナル伝達に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

力学的過負荷は、筋タンパク質合成に関わるシグナルタンパク質（リン酸化 p70s6k とその下流に位置するリン酸化 ribosomal protein s6）の含量を増加させたが、それらに対するビタミンCの効果は確認されなかった。また、研究1と同様に、筋中ビタミンC濃度や酸化ストレスマーカー濃度に対するビタミンC投与の影響は確認されなかった。

## 【第3章：ビタミンC添加がIGF-I刺激により引き起こされるシグナル応答に及ぼす効果—培養筋管細胞を用いた研究—（研究3）】

研究1, 2どちらにおいても、筋中ビタミンC濃度や酸化ストレスマーカー濃度に対するビタミンC投与の影響を観察することができなかった。そのため、ビタミンCの効果は1) ビタミンCの抗酸化作用によってもたらされたものか、2) 骨格筋中で生じたのか、それとも他の組織を介して生じたのか、について明らかにできなかった。そこで、研究3では、ラット由来培養筋芽細胞株 L6 細胞を用いて実験を行った。培養筋細胞を用いる実験は、他の組織の影響を排除できるため、筋細胞に直接ビタミンCが作用しているのか明らかにすることができる。また、他の抗酸化物質との比較も容易に行うことができる。研究3では、筋管細胞に分化させた後に、骨格筋肥大の重要な因子であるIGF-Iを加えることで、筋タンパク質合成に関わるシグナル伝達経路を刺激し、それらのシグナルに及ぼすビタミンCの効果について検討した。また、ビタミンCと同じく水溶性の抗酸化物質であるNACとの効果の比較を行った。

ビタミンC添加は、IGF-I刺激による p70s6k と Erk1/2 のリン酸化を抑制することが示唆された。しかしながら、p70s6kの上流に存在するAktに対する影響は小さかった。一方、NACはAkt, p70s6k, Erk1/2のいずれの経路のリン酸化も減弱した。これらの結果から、ビタミンCはNACとは一部異なる経路で p70s6k や Erk1/2 のリン酸化を減弱する可能性が示された。NACなどの抗酸化物質はIGF-Iレセプターの活性化を抑制することで、その下流に位置するAktおよびp70s6kを抑制することが報告されている (Handayaningsih *et al.* 2011)。したがって、ビタミンCがIGF-Iレセプターに及ぼす効果は他の抗酸化物質よりも小さく、IGF-Iレセプター以外の経路にも作用することで p70s6k のリン酸化を減弱するものと推察された。

#### 【第4章：総括論議】

本研究によりビタミン C 投与が力学的過負荷による骨格筋肥大を減弱することが明らかとなった。さらに、その骨格筋肥大減弱効果には、筋タンパク質合成 (p70s6k, Erk1/2) や筋タンパク質分解 (atrogin-1) を制御するシグナル伝達経路の調節が関与することが示唆された。ただし、ビタミン C は他の抗酸化物質とは一部異なる機序で p70s6k のリン酸化を減弱する可能性が示された。また、実験期間を変えることによってビタミン C 投与の効果が異なったことから、運動強度やビタミン C 投与の方法、投与量によって、筋肥大に及ぼすビタミン C の効果の程度が異なる可能性が考えられた。さらに、本研究では、力学的過負荷が酸化ストレスを増加し、体内の抗酸化能を亢進する可能性が示された。

本研究の結果は、筋肥大のメカニズムを明らかにする上で重要な知見となるにとどまらず、スポーツ競技者や一般健常者の体力づくりの現場において、栄養補給やコンディショニングのあり方を見直すきっかけとなりうるものであった。