

Analysis of molecular mechanism on the training effects using prohibited doping drugs

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-01-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kitaura, Takashi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049895

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ドーピング規制薬物を利用した トレーニング適応の分子機構の解析

課題番号 17500421

平成17～18年度科学研究費補助金(基盤研究(C))
研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 **北浦 孝**
(金沢大学保健管理センター・助教授)

金沢大学附属図書館



0800-04406-1



ドーピング規制薬物を利用したトレーニング
適応の分子機構の解析

(研究課題番号：17500421)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 北浦 孝

金沢大学保健管理センター・助教授

は し が き

昨年 2006 年の秋、日本人にとってドーピングに関する大きなニュースが報道された。それは 10 月 1 日にフランスで行われた競馬の競走、第 85 回凱旋門賞に出走し 3 位に入った日本競馬界の大スターのディープインパクト（日本中央競馬会所属）から禁止薬物のイプラトロピウムが検出され、失格となった事件である。このイプラトロピウム（抗コリン薬）は気管支拡張の作用があるため呼吸器疾患の治療に使われるが、フランスやアメリカ合衆国の競馬界では禁止薬物に指定されていたが、日本競馬界では動物用のイプラトロピウムがあまり市場に流通していない理由で、当時は禁止薬物に指定していなかった。しかし、この事件をきっかけに 2008 年 1 月から禁止薬物となった。

最近、スポーツ界におけるドーピング問題は社会的影響も大きいことから、文部科学省はドーピングの防止と根絶を目指す反ドーピング条約を昨年末締結したことを受け、「スポーツにおけるドーピングの防止に関するガイドライン」を策定し、違反認定の手続きや制裁内容を定めた。制裁については資格停止に加え、文部科学省や各種団体から選手や指導者への補助金の給付停止が新たに加えられた。しかし、禁止薬物の中には喘息患者に対する治療薬などもあり、喘息の子供の割合が 10 年前と比べ 2 倍以上に増え過去最高となり、今尚増加傾向にあるという現状の中でテオフィリンの喘息の子供への投与に問題が発生し、喘息問題をいかに解決するか難しい問題となっている。また、近づく高齢化社会における老人の筋萎縮による寝たきり老人の増加に対する薬物療法と筋力トレーニングによる治療はより科学的で適切な方法の設定が求められて来ている。そこでトレーニングによる生体の適応効果を明らかにするひとつの手段として、ドーピング規制薬物を利用し、それらの詳細な作用機序を遺伝子またはタンパク分子レベルで明らかにする必要がある、その検討が求められている。本研究ではアテネオリンピックでもその使用によって 2 名の選手が失格となったドーピング規制指定薬で喘息の治療薬である β_2 アドレナリン受容体作動薬を用いてトレーニングにおいて生じる様々な現象を解析した。この薬物は筋肥大と速筋化を誘導すると言われている。しかし、そのプロセスはガン疾患の進行と類似しており、トレーニングによる筋の効果的適応の誘導だけでなく薬物の副作用防止の観点からも、この作用機序の解明は重要である。そこでこの薬物によるラット骨格筋の速筋（長指伸筋：EDL）と遅筋（ヒラメ筋：SOL）における特異的变化を RT-PCR 法で検討し、 β_2 -adrenoceptor mRNA の減少と筋分化のマスター遺伝子の MyoD mRNA の顕著な増加を SOL で認めた。さらに筋芽細胞から筋管細胞への分化に働く myogenin の mRNA 発現が両筋肉で増加するのを認めた。トレーニングによる筋肥大の重要因子である IGF-1 と MGF では、この薬物による変化はなかった。また骨格筋形成の negative regulator の Myostatin の mRNA 発現も両筋肉で変化がなかった。衛星細胞膜上の Notch1 受容体は筋芽細胞の増殖をもたらす、細胞増殖に関連するシグナルを伝達し、衛星細胞は筋細胞膜上の Delta1（Notch のリガンド）から増殖のシグナルを受け、筋への核の提供を行い筋肥大に寄与すると言われている。そこで Notch Signaling への影響を調べるため、Notch1 とそのリガンドの Jagged1 と Delta-like1、Notch の細胞内ドメイン NICD の核移行を制御する Numb の mRNA 発現を見た結果、Notch1、Jagged1 の mRNA 発現は両筋肉で変化がなかったが、Delta-like1 と Numb の mRNA 発現は EDL において有意な増加が認められ、これらの因子が速筋の筋肥大に関与していることが示唆された。しかし、これらのマーカーはガン細胞の増殖時にも増加することが知られていることから、薬物による急激な筋肥大刺激には十分な注意が必要であると判断

され、薬物作用の複雑さから、安易な薬物使用に警告を発する重要な知見をもたらすものである。更にPax7やWntなどのガン疾患と関連の深い因子の変化に関する詳細な検討がさらに必要であることが示された。以上の結果から、適切な筋力トレーニングプログラムの作成には、さらなる詳細なメカニズムの探求という新しい課題が発生しており、当初の目的は十二分に達成されたとは言いが、スポーツ界における適切な薬物使用への注意を喚起する貴重な参考になることが期待される。

研究組織

研究代表者 : 北浦 孝 (金沢大学保健管理センター・助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	3,000	0	3,000
平成18年度	700	0	700
総計	3,700	0	3,700

研究発表

(ア) 学会誌等

- 1) Kitaura T., Matsumoto K., Effects of clenbuterol on MyoD, UCP3, MCT1, CD147, and myosin-HC isoforms of rat skeletal muscles. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37(5); S245, (2005)
- 2) 松本健太郎, 北浦 孝. クレブテロール投与のラット骨格筋における myogenin 発現への影響. *体力科学*, 54(6);648, (2005)
- 3) Kitaura T., Effects Of Clenbuterol On Notch1 Of Male Rat Skeletal Muscles.. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(5); S546, (2006)
- 4) 上田 晃一、金丸 雄志、北浦 孝, クレブテロール投与のラット骨格筋における Notch シグナルへの影響. *体力科学*, 55 卷 (6) ; 908, (2006)

(イ) 口頭発表

(海外)

- 1) Kitaura Takashi, Matsumoto Kentaro, Effects of clenbuterol on MyoD, UCP3, MCT1, CD147, and myosin-HC isoforms of rat skeletal muscles.. 52th Annual Meeting of ACSM, 6.2, Nashville, USA (2005)
- 2) Kitaura Takashi, Effects of clenbuterol on Notch1 of male rat skeletal muscles. , 53th Annual Meeting of ACSM 6.2, Denver, USA (2006)
- 3) Kitaura Takashi, Distinct effects of Clenbuterol on Numb of rat soleus and EDL muscles. , 54th Annual Meeting of ACSM 5.30, New Orleans, USA (2007)

(国内)

- 1) 松本健太郎, 北浦 孝: クレブテロール投与のラット骨格筋における myogenin 発現への影響. 第 60 回日本体力医学会, 9. 24, 岡山 (2005)
- 2) 上田 晃一、金丸 雄志、北浦 孝: クレブテロール投与のラット骨格筋における Notch シグナルへの影響. 第 61 回日本体力医学会, 9. 26, 兵庫 (2006)

様 式 C-20

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID
FOR SCIENTIFIC RESEARCH (2006)

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 13301

2. RESEARCH INSTITUTION : Kanazawa University

3. CATEGORY : Grant-in-Aid for Scientific Research (C)

4. TERM OF PROJECT (2005 ~ 2006)

5. PROJECT NUMBER : 17500421

6. TITLE OF PROJECT :

Analysis of molecular mechanism on the training effects using prohibited doping drugs

7. HEAD INVESTIGATOR REGISTERED NUMBER NAME INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION
00143861 Takashi Kitaura Kanazawa University, Health
Service Center, Associate Professor

8. INVESTIGATORS (1) REGISTERED NUMBER NAME INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION
None

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Clenbuterol is one of the beta-2 adrenergic receptor agonists with powerful muscle anabolic effects and is prohibited to use as doping drug for athletes. Recently it is well documented that the muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number, a proportionate increase in myonuclear number. And it is established that Notch1 becomes activated in satellite cells as they progress from a state of quiescence to one of active proliferation as myogenic precursor cells. However, we already reported that the Notch 1 mRNA showed no changes in both SOL and EDL. Furthermore, the effect of clenbuterol on the Numb, a plasma membrane-associated cytoplasmic protein, regulating differentiation of satellite cells is still not clear. In this study, we tried to examine the hypertrophic effects of clenbuterol on the Numb regulating system of both fast- and slow-twitch muscles. It is said that clenbuterol increased the MyoD as the myogenic master regulator and might induce the muscle hypertrophy and the transformation from slow- to fast-twitch muscle.

The muscle wet weights increased in both SOL and EDL muscles with clenbuterol. The myogenin mRNA showed the increase in both muscles. The MyoD mRNA increased drastically in SOL. They may explain the accumulated fast-twitch fibers with fiber type transition from slow-to-fast and may explain the muscle hypertrophy in SOL, but not in EDL. However, the IGF-1, MGF, Myostatin, and Notch1 mRNA showed no changes in both SOL and EDL. The Delta-like1 mRNA showed no changes in SOL (CLEB: 100.7±20.3%, Control: 100.0±9.5%), but significantly increased in EDL (CLEB: 167.3±28.0%, Control: 100.0±25.0%; P<0.01). The Numb mRNA also showed no changes in SOL (CLEB: 104.1±19.9%, Control: 100.0±10.3%), but significantly increased in EDL (CLEB: 131.0±20.0%, Control: 100.0±21.5%; P<0.05%). The increased Numb in EDL may explain the muscle hypertrophy according to progressed differentiation of myoblast. These results suggested that the hypertrophic effects of drugs should be explained in either myofibers or satellite cells, respectively. But these markers like Notch and Numb are known as the markers of progressive cancer. Therefore, we have to examine the relationship with Notch-signaling system and carcinogenic process by doping drugs.

10. KEY WORDS

(1) doping	(2) differentiation	(3) Notch Signaling
(4) Delta-like1	(5) Jagged1	(6) Satellite cells
(7) clenbuterol	(8) Numb	

(CONTINUE TO NEXT PAGE)

11. REFERENCES

AUTHORS, TITLE OF ARTICLE	JOURNAL, VOLUME-NUMBER, PAGES CONCERNED, YEAR
<ul style="list-style-type: none"> • Kitaura Takashi, Matsumoto Kentaro, Effects of clenbuterol on MyoD, UCP3, MCT1, CD147, and myosin-HC isoforms of rat skeletal muscles. 	<p>Med. Sci. Sports Exerc. 37(5); S245, 2005</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Matsumoto Kentaro, Kitaura Takashi, Effects of clenbuterol on the expression of myogenin in rat skeletal muscles. 	<p>Jap. J. Phys. Fitness Sports Med., 54(6);468 , 2005</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Kitaura Takashi, Effects of clenbuterol on Notch1 of male rat skeletal muscles. 	<p>Med. Sci. Sports Exerc. 38(5); S546, 2006</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Ueda Koichi, Kanemaru Yushi , Kitaura Takashi, Effects of clenbuterol on Notch signaling of rat skeletal muscles. 	<p>Jap. J. Phys. Fitness Sports Med., 55(6);908 , 2006</p>

研 究 成 果

目 次

第1章	はじめに	2
第2章	骨格筋での検討	4
I	序論	4
II	方法	17
III	結果	24
IV	考察	43
V	引用文献	53
第3章	まとめ	63

オリンピックではいつもドーピング問題が話題となる。日本人選手が活躍した2004年のギリシャのアテネでのオリンピックではハンマー投げでハンガリーのアドリアン・アヌシュ選手のドーピングが発覚し、室伏選手の繰上げ優勝となった事件が記憶に新しい。また2006年のトリノ冬季オリンピックではバイアスロン男子10キロスプリント4位のウォルフガング・ペルナー、スキー距離男子15キロクラシカル8位のマルティン・タウバーらオーストリアの6選手がドーピング（禁止薬物使用）違反のため失格となった。オリンピック中に実施されたドーピング検査では禁止薬物は検出されていなかったが、選手村外のチーム宿舎でイタリア警察の家宅捜索を受け、所持していた禁止薬物や輸血用器具を押収されたためである。これは禁止薬物の使用方法がより複雑になってきていることを暗示している。

更に、2006年の秋、日本人にとってドーピングに関する大きなニュースが報道された。それは10月1日にフランスで行われた競馬の競走、第85回凱旋門賞に出走し3位に入った日本競馬界の大スターのディープインパクト（日本中央競馬会所属）から禁止薬物のイプラトロピウムが検出され、失格となった事件である。このイプラトロピウム（抗コリン薬）は気管支拡張の作用があるため呼吸器疾患の治療に使われるが、フランスやアメリカ合衆国の競馬界では禁止薬物に指定されている。しかし、日本競馬界では動物用のイプラトロピウムがあまり市場に流通していないので、当時は禁止薬物に指定していなかったが、この事件をきっかけに2008年1月から禁止薬物となった。

最近、スポーツ界におけるドーピング問題は社会的影響も大きいことから、文部科学省はドーピングの防止と根絶を目指す反ドーピング条約を昨年末締結したことを受け、「スポーツにおけるドーピングの防止に関するガイドライン」を策定し、違反認定の手続きや制裁内容を定めた。制裁については資格停止に加え、文部科学省や各種団体から選手や指導者への補助金の給付停止が新たに加えられた。しかし、

禁止薬物の中には喘息患者に対する治療薬などもあり、喘息の子供の割合が10年前と比べ2倍以上に増え、過去最高となり、今尚増加傾向にあるという現状をいかに解決するか難しい問題となっている。また、近づく高齢化社会における老人の筋萎縮による寝たきり老人の増加に対する薬物療法と筋力トレーニングによる治療はより科学的で適切な方法の設定が求められて来ている。そこでトレーニングによる生体の適応効果を明らかにするひとつの手段として、ドーピング規制薬物を利用し、それらの詳細な作用機序を遺伝子またはタンパク分子レベルで明らかにする必要がある、今回は骨格筋を対象にその検討を行った。

I 序論

2006年3月、日本が奇跡的に優勝した国別対抗戦「ワールド・ベースボール・クラシック (WBC)」で、国際野球連盟 (IBAF) は、準決勝に進出した韓国代表の朴明桓投手のドーピング検査陽性で違反処分をしたことは記憶に新しい。また少し前の2004年のギリシャでのアテネ・オリンピックでもハンマー投げのアドリアン・アヌシュ (ハンガリー) 選手がドーピング違反となり、日本の室伏選手の繰上げ優勝が認められ大変話題となった。こういった華やかなスポーツ大会の裏では必ず問題となる薬物の不正使用、いわゆるドーピング問題があり、国際オリンピック委員会 (IOC: International Olympic Committee) はドーピング禁止薬物として、興奮剤、麻薬性鎮痛剤、蛋白同化剤などを指定している (Table. 1)。近年、米国カリフォルニア州にあるベイエリア研究所 (BALCO: Bay Area Laboratory Co-Operative) が、禁止薬のリストには載っていないドーピングの新物質 THG (Tetra hydro gestrinon) を開発していたことが明らかとなった。これは、禁止物質に記載されている Gestrinon の構造の一部を組み替えて、それまでのドーピング検査方法では検出できないように意図的に作られた筋肉増強を目的とした物質であった。また、2005年2月に、アメリカ大リーグで1980年代後半から90年代に活躍した強打者 Jose Canseco 選手が、自身のドーピング使用や、メジャーリーガーの薬物使用について暴露し、世界のスポーツ界に衝撃を与えた。これらの衝撃的な事件は、社会のドーピングへの関心をますます高めることとなった。

さて近年、喘息患者が世界的に増加傾向にあるが、ひとえに喘息といっても、一般的な喘息のほかに、一流運動選手にも見られる運動誘発性喘息もある³⁵⁾。喘息の諸症状を緩解するために用いられている薬物として、 β_2 -agonist があげられるが、Clenbuterol など一部の β_2 -agonist は筋肥大作用を有することから、ドーピング禁止薬物としても指定されている。オリンピックにおいて、喘息あるいは運動誘発性の

喘息を持つ選手については、事前申告があれば、ドーピング禁止薬ではあるが、喘息の発作を止めるサルブタモールなどの β_2 -agonist の吸入は筋肉増強作用が弱いということで使用が認められていた。しかし、2000年に開催されたシドニーオリンピックでは事前申告する選手の数があまりにも多く、喘息治療目的以外の作為的なドーピング使用が疑われ、IOCは2002年に開催されたソルトレークシティ冬季オリンピックから、これまでの簡単な申告ではなく、発作時の諸検査のデータや誘発試験の結果など、医学的に吸入が必要であるという証拠をつけての、より詳細な申告書の提出を義務付けるようになった。

β_2 -agonist である Clenbuterol は β_2 -adrenoceptor を介し、細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、PKA (protein kinase A) を活性化させる。その結果、解糖系の亢進、遊離脂肪酸やエピネフリンの動員など、様々な体内動態に影響することが知られている⁶⁰⁾。また PKA の活性化は CREB (cAMP response element binding protein) の活性化を経由して様々なタンパク質の転写を促進することが知られている¹⁰⁾。 β_2 -agonist の CREB を介したタンパク質の転写活性化を表す模式図を Fig. 1 に示した。Clenbuterol は、体内で代謝を受けにくく、持続的な強い平滑筋弛緩作用を有している。日本では、製薬企業の帝人(株)から「スピロペント」の製品名で発売されており、気管支喘息、慢性気管支炎、気道閉塞障害に基づく呼吸困難など諸症状の緩解に用いられている。他にもテオフィリンやツロブテロールなどが気管支喘息の治療に用いられることもあるが子供への投与で死亡事故が起きたり、作用時間が短かすぎたりで結局 Clenbuterol に依存する医療機関は多い。また、この薬物は膀胱平滑筋を弛緩し、膀胱内圧を低下することから腹圧性尿失禁にも適用されている。Clenbuterol は、臨床においてこのような様々な疾患を治癒する目的で使用されているが、スポーツ界では骨格筋肥大作用や、心肥大、高血圧亢進などの副作用を有することから、ドーピング禁止薬物として指定されている。2004年のアテネオリンピックでは、2人の選手が Clenbuterol の不正使用により、処分を受けた。また

Clenbuterol は、スポーツ界だけではなく、より肉付きの良い家畜を得ようとする食肉改善の目的での使用や、脂肪燃焼作用によるダイエット目的での使用が行われる可能性があり⁴⁴⁾、このような不適切な使用を防止する必要がある。特に、マイナスの作用として心筋の肥大⁶³⁾と骨の成長抑制⁵⁶⁾をもたらすことが報告されており、医薬品の適正使用ならびに副作用に関する正しい情報が求められている。

β_2 -agonist による PKA 活性化によって引き起こされる CREB の活性化に影響されるものとして、筋肉細胞内の乳酸の代謝において重要な役割を果たす LDH (Lactate dehydrogenase : 乳酸脱水素酵素) がある^{26, 51)}。Clenbuterol は代謝特性の面における影響として、乳酸の代謝に関与する LDH のアイソザイム分布にも変化をもたらすことが知られている⁵⁵⁾。LDH には心筋と骨格筋において5つのアイソザイムがあり、遅筋には LDH-H (心臓型 : H 型) が多く、速筋には LDH-M (筋肉型 : M 型) が多く発現している。主として、LDH-H は乳酸の酸化に、LDH-M は細胞内プロトンを減少させ、乳酸への還元に関与している。常川らは Clenbuterol の投与により、雄ラットにおいて、より無酸素的な速筋タイプへの LDH アイソザイム分布の移行が引き起こされることを報告している⁵⁵⁾。遅筋と速筋における乳酸代謝の違いについては Fig. 2 に簡単に示した。この LDH-M の発現亢進は、そのプロモーター部位に CREB の結合部位があることが理由の1つとして考えられる。また一般に、LDH-M の増加はガン細胞を始めとして細胞増殖のシグナルと関連するとも言われており^{40, 50)}、薬物による筋肥大におけるメカニズムを考える上で非常に興味深い。

筋肉の発生は多能性中胚葉細胞が筋形成へと決定づけられ、筋芽細胞になり、一定の細胞数に達すると互いに融合して多核の筋管細胞になり、成熟後に筋線維となる。これらの過程を制御する因子として、MyoDファミリーがある。MyoDファミリーは basic helix-loop-helix (bHLH) 構造を有する骨格筋に特異的に発現している転写調節因子であり、様々な骨格筋特異的遺伝子の転写を促進することにより、骨格筋細胞の運命決定と細胞分化を正に調節している⁶⁾。MyoDファミリーには Myo

D、myogenin、Myf5、MRF4 の 4 種類が存在し、MyoD は速筋に、myogenin は遅筋に多く発現していることが知られている³⁷⁾。そのうち、MyoD と Myf5 は非筋細胞から筋芽細胞への運命決定に、myogenin と MRF4 は筋芽細胞から筋管細胞への最終分化に働いていることが知られている⁶⁾。筋原性分化における MyoD family の役割については、簡単な模式図を Fig. 3 に示した。現在のところ Clenbuterol がこれらの筋細胞特異的な核内調節因子である MyoD や myogenin に影響を及ぼすという多数の報告がされているが、見解は一致しておらず、詳細は明らかとはなっていない^{15, 33, 37, 64)}。常川は Clenbuterol の投与により、雄ラットにおいて、筋線維タイプの速筋化が引き起こされることを報告しており、筋線維タイプの速筋化については MyoD の結合部位が速筋型ミオシンの DNA 配列の上流に存在することが報告されていることからその関与が強く示唆されている^{37, 47)}。

筋肉の成長に関与するものの 1 つとして、成長因子である IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) があげられる。IGF-1 は筋成長を促進することが知られており、IGF-1 受容体を介して Akt が活性化されると、GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) や mTOR (mammalian target of rapamycin) のリン酸化が促進され、結果としてタンパク質合成が促進されると言われている^{53, 57)}。持続して肉体運動を行うと、IGF-1 の発現は増大する¹⁷⁾。また、IGF-1 は、satellite cell の増殖もしくは活性化を刺激するという報告もある²⁾。骨格筋で特異的に発現される IGF-1 の 2 つのアイソフォームの IGF-1Ea と MGF (mechanogrowth factor) は骨格筋の機械的負荷により発現が制御されていることが知られており、これらの骨格筋特異的な IGF-1 アイソフォームがオートクライン、あるいはパラクラインにより骨格筋機能を制御すると考えられている²¹⁾。Awede らは Clenbuterol の投与により、SOL において 3 日目に IGF-1 mRNA が増加するが、その後は減少し、9 日目には元のレベルまで下がるという一過性の IGF-1 の増加について報告している¹⁾。Clenbuterol の投与による筋肥大における IGF-1 の役割の重要性については、多数の議論がおこなわれてはい

るものの、現在のところ明確な結論は得られていない。

骨格筋の成長を負に制御する因子の 1 つとして、Myostatin が知られている。Myostatin は TGF(Transforming growth factor)- β super family に分類され、骨格筋形成の negative regulator として機能することが知られており、Myostatin 欠損の変異体は、著しい筋肥大の表現型、「double muscle」を示すことがわかっている²⁷⁾。最近ではその遺伝子欠損のある子供が異常に体格が大きく力持ちであると言うニュースも流れていて興味深い。Myostatin はオートクラインにより、筋肉特異的調節因子である MyoD と myogenin の発現を抑制し、筋原性の分化を制御することが報告されている^{29, 45)}。また、Myostatin は ActRIIB (activin type IIB receptor) に結合し、Smad を介して作用を示すことも知られている⁶¹⁾。Clenbuterol の投与による Myostatin の発現への影響については今までのところ報告されてはならず、Clenbuterol の投与が Myostatin の発現に変化をもたらす可能性も考えられるが、詳細は不明であり早急に解析が求められている。

基底層と筋線維の間に存在する satellite cell は、未分化の筋肉前駆細胞であり、筋肉の損傷などの刺激により活性化され、細胞分裂を開始して増殖し、分化した後に筋肉細胞に融合することにより、骨格筋を再生する⁴⁸⁾。そして satellite cell は、出生後の筋肉の成長にもまた重要な役割を果たしている⁶⁾。筋肉の肥大には、筋肉細胞への satellite cell からの核の供給が重要であると考えられている。satellite cell の細胞膜上には Notch1 受容体が存在し、細胞増殖に関連するシグナルを伝達していることが知られており¹²⁾、satellite cell は、隣接する筋肉細胞もしくは他の satellite cell の細胞膜上に存在する Notch のリガンドからの増殖のシグナルを受けて、筋肉の増大に寄与していると考えられる。また、興味深いことにこの Notch Signaling は、細胞増殖を促進する一方で、筋原性前駆細胞の分化を阻害することが報告されている^{12, 25)}。Notch Signaling は、他の分泌型リガンドを介したシグナル伝達とは異なり、リガンド、受容体ともに細胞膜上に存在するため、細胞同士の接

触によって活性化されるという特徴を持つ。哺乳類における Notch のリガンドは、Delta-like、Jagged などが知られている。Notch Signaling は発生期における細胞分化運命決定など、さまざまな生命現象に大きく関わっていることが知られている。骨格筋において、Delta-like1 が Notch1 を活性化して筋肉前駆細胞の増殖を促進する一方、筋原性の分化を抑制することが報告されており¹²⁾、Jagged1 においても同様に Notch1 を介して筋原性分化を抑制するという報告がされている³¹⁾。Notch Signaling を調節する因子の一つとして Numb があげられる。細胞質に存在する Numb は、Notch の細胞内ドメイン(NICD : Notch intracellular cytoplasmic domain)に結合することにより、NICD の核内移行を阻害し、Notch Signaling を抑制することが知られている⁵⁹⁾。Numb による Notch Signaling の阻害は、増殖する細胞を cell cycle から出して筋原性の分化を引き起こすことが報告されている¹²⁾。筋原性前駆細胞が増殖する際には、Numb の不斉の局在が見られ、様々な細胞内 Numb レベルの細胞が産生されるということもまた報告されている¹²⁾。筋原性分化における Notch Signaling の役割については、模式図を Fig. 4 に示した。Notch Signaling が筋肥大において重要な役割を果たすことから、Clenbuterol によって引き起こされる筋肥大との関連が考えられるが、Clenbuterol による Notch Signaling への影響は現在のところ報告されてはおらず、詳細は不明である。

Clenbuterol の骨格筋肥大作用に関してはこれまでに多くの報告がなされているが、肥大の詳細なメカニズムについては、現時点においてはあまり明らかにされてはいない。Clenbuterol と β -antagonist を同時に投与すると、Clenbuterol の筋肥大作用が減弱するという報告⁵⁾や β -adrenoceptor を欠損したマウスにおいてはClenbuterol は筋肥大作用を示さない²⁴⁾という報告がされており、Clenbuterol の筋肥大作用には β_2 -adrenoceptor が関与すると考えられている。しかし、遅筋よりも速筋において筋肥大の影響が強く見られることが報告されており^{28, 47, 55)}、遅筋の方が速筋よりも β_2 -adrenoceptor が多く発現していることを考慮すると³⁴⁾、Clenbuterol

の筋肥大作用においては、 β_2 -adrenoceptor を介した直接的な作用だけではなく、IGF-1 などの関与による蛋白合成系の亢進¹⁾、ユビキチン-プロテアソーム経路を介する蛋白分解系の抑制⁶⁵⁾、さらには Satellite cell の活性化など、様々な間接的作用を介する可能性が考えられ、複雑な機構によって制御されていることが推察される。しかし、この筋肥大のメカニズムの解明は、高齢者の筋萎縮症（サルコペニア）や筋ジストロフィーのような筋肉萎縮性疾患の治療にとって重要な情報をもたらすこともまた予測される。しかし、薬物による強制的な激しい刺激は他の臓器細胞やガン細胞などの増殖活性化作用の危険性も含有している。

そこで Clenbuterol の骨格筋に及ぼす影響の詳細を解明する一端として、成長期の雄ラットを用いて、Clenbuterol の骨格筋肥大作用に関与すると推測される種々の因子へ及ぼす Clenbuterol の影響を mRNA レベルで明らかにすることを本研究の目的として実験を行った。

なお、本文で頻用される用語は以下のように略記した。

CLEB : clenbuterol treatment group

CREB : cAMP response element binding protein

EDL : extensor digitorum longus

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

IGF-1 : insulin-like growth factor 1

LDH : lactate dehydrogenase

MGF : mechanogrowth factor

NICD : notch intracellular cytoplasmic domain

PKA : protein kinase A

PMS : phenazine methosulfate

PMSF : phenylmethanesulfonylfluoride

SOL : soleus

<p>I. 常に禁止される物質と方法 (競技会検査及び競技外検査)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>蛋白同化剤</u> 2. <u>ホルモン関連物質</u> 3. <u>β₂作用剤</u> 4. <u>抗エストロゲン作用を有する物質</u> 5. <u>利尿剤と隠蔽剤</u>
<p>II. 禁止方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>酸素運搬能の強化</u> 2. <u>化学的・物理的操作</u> 3. <u>遺伝子ドーピング</u>
<p>III. 競技会検査で禁止対象となる物質</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>興奮剤</u> 2. <u>麻薬性鎮痛剤</u> 3. <u>カンナビノイド</u> 4. <u>糖質コルチコイド</u>
<p>IV. 特定競技において禁止される物質</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>アルコール</u> 2. <u>β遮断剤</u>

Table. 1 The 2005 Prohibited List International

Standard by The World Anti-Doping Code

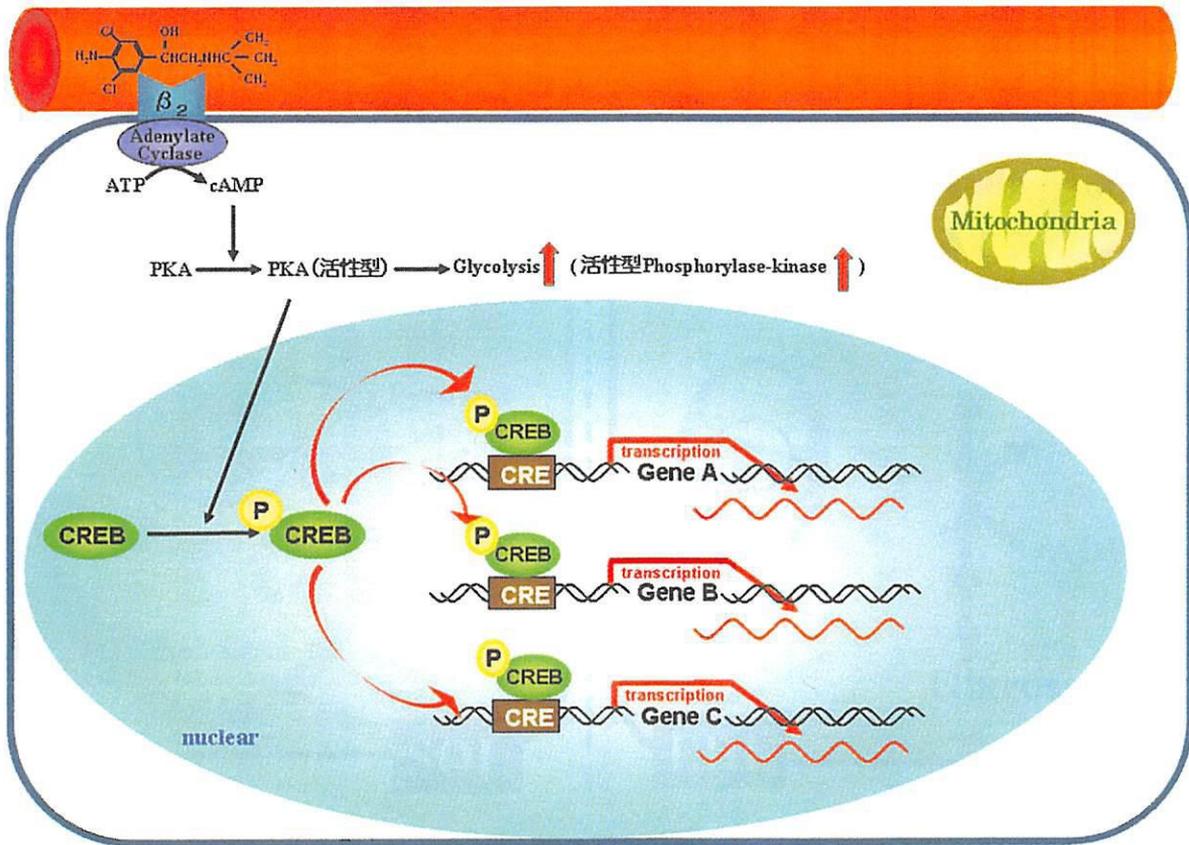


Fig. 1 Transcription Regulation via cAMP-PKA-CREB
Pathway by β_2 -agonist

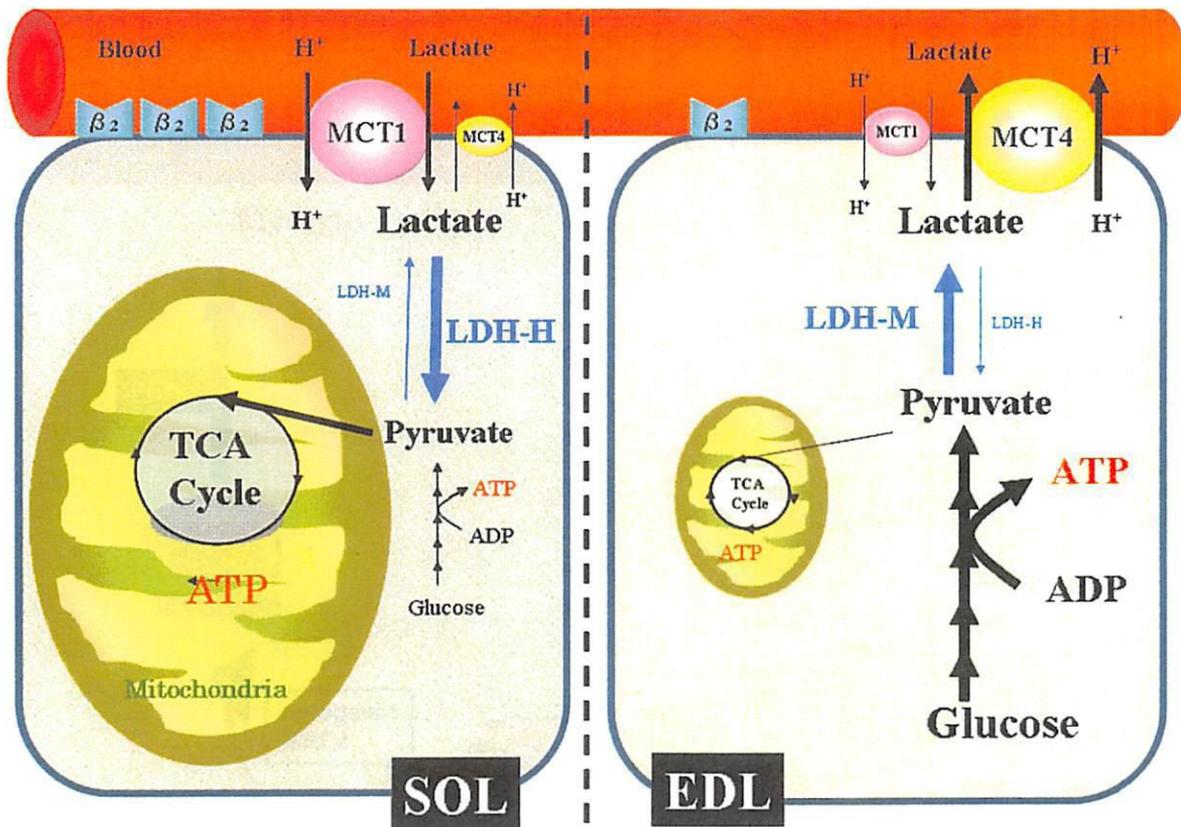
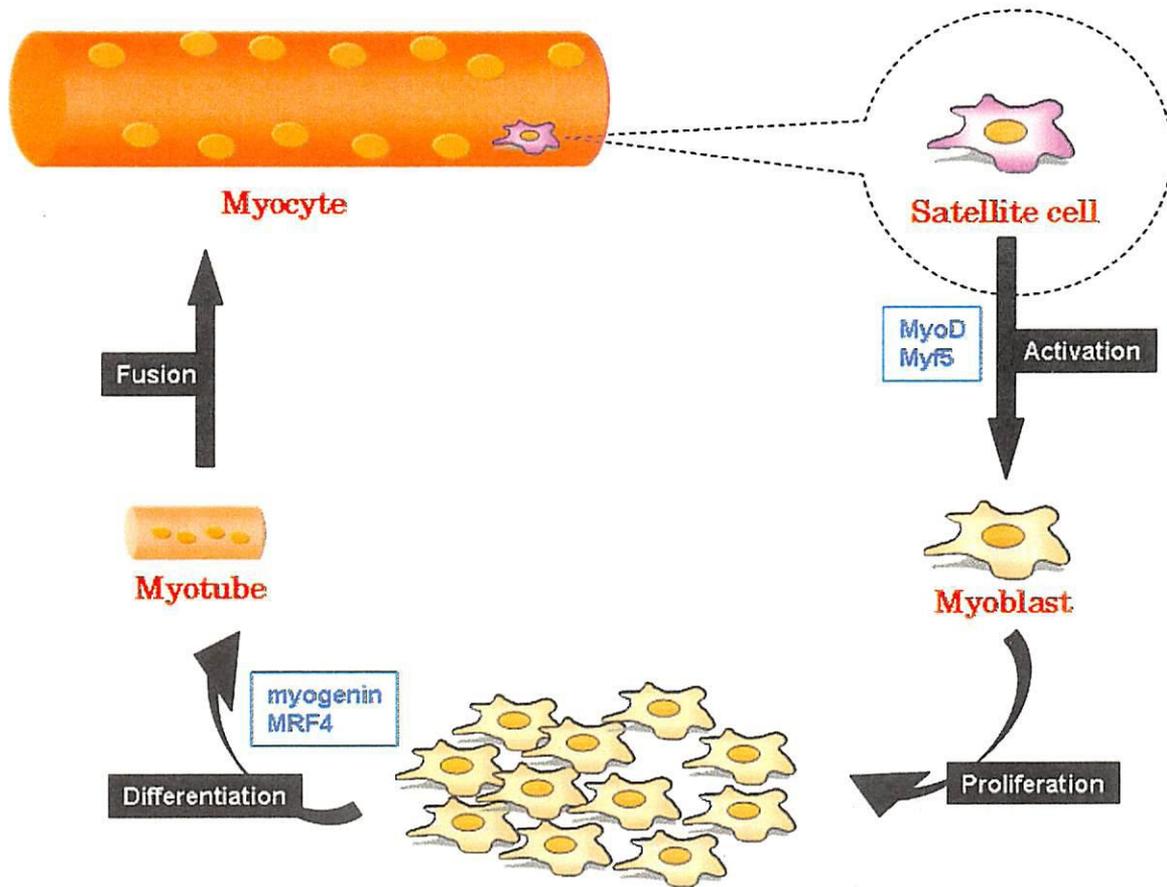
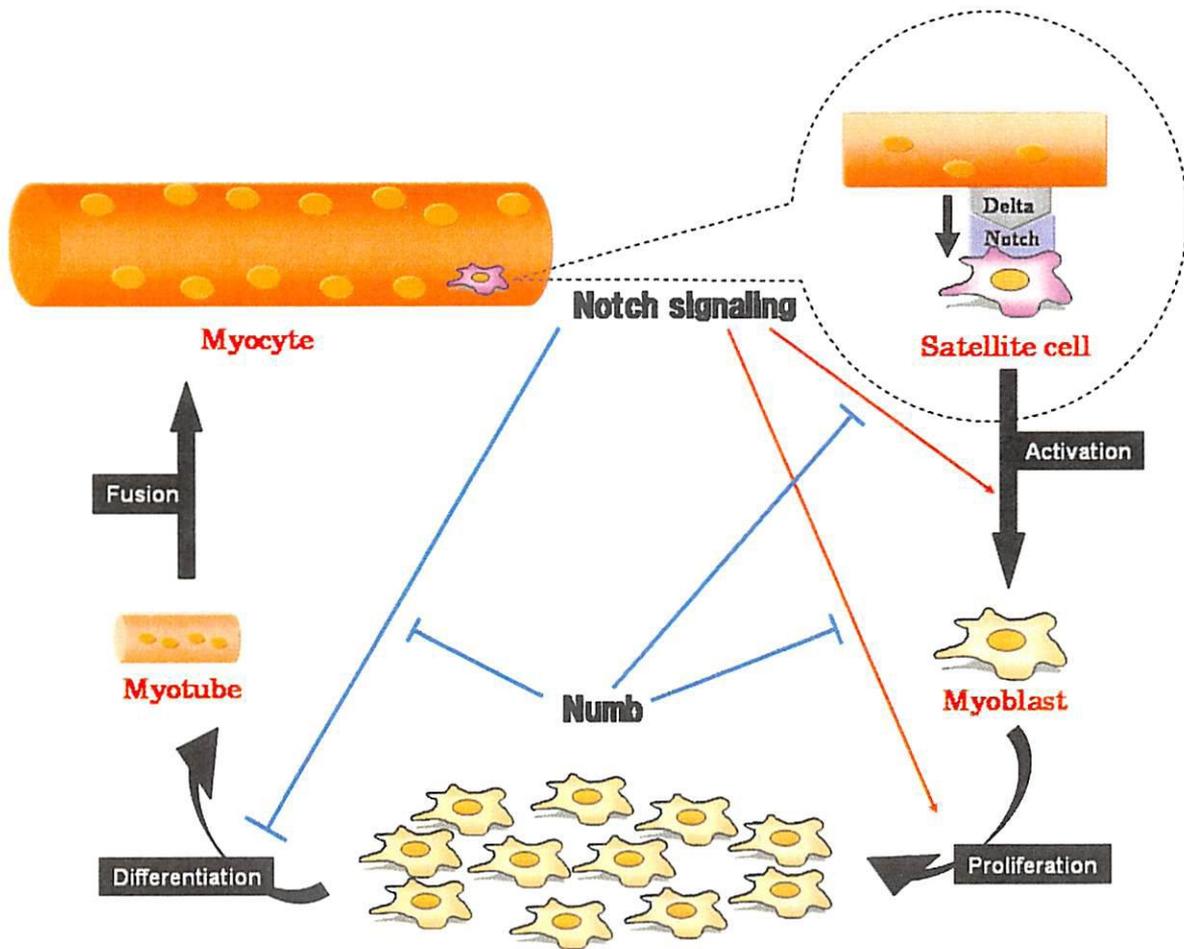


Fig. 2 Scheme of Differences between SOL and EDL Lactate Metabolism



**Fig. 3 The Role of MyoD Family
on Myogenic Differentiation**



**Fig. 4 The Role of Notch Signaling
on Myogenic Differentiation**

II 方法

投与条件

実験は7週齢の Sprague Dawley 系雄ラット（日本 SLC, Hamamatsu）12匹を用いて行った。入手後1週間の予備飼育をした後、無作為に対照群（Control : n=6）,Clenbuterol 投与群(CLEB : n=6)の2群に分け、プラスチックケージ（25×40×20cm）にて群ごとに3匹ずつ飼育した（室温 26±1℃）。

CLEB には15日間、生理食塩水に溶かした Clenbuterol（Sigma-ALDRICH, Steinheim, Germany）を皮下注射（2mg/kg/day）により投与し、Control には同量の生理食塩水を同様に投与した。Clenbuterol の投与量は通常喘息治療に用いる濃度の1500倍であるが、LD50の1/150であり、他の先行研究⁴⁷⁾を参考とした。

実験期間中、飼料（CRF-1, Charles River Japan, Yokohama）と飲水は自由摂取とし、毎日午前10時から11時の間に体重測定を行った。なお、本実験は金沢大学宝町地区動物実験指針に従って行った（承認番号：050257）。

臓器摘出及び重量測定

15日間投与後、過剰のペントバルビタールナトリウム（ネンブタール、ABBOTT LABORATORIES, North Chicago, Illinois）の腹腔内注射（50mg/kg）により麻酔し、さらに頸椎脱臼により安楽死処置を行った後、即座に筋肉を摘出し、湿重量を測定した。試料として、遅筋線維の多いヒラメ筋（Soleus : SOL）と速筋線維の多い長指伸筋（Extensor digitorum longus : EDL）を用いた。SOLとEDLの重量は両肢それぞれの重量を測定し、その平均値を採用した。

筋肉の凍結保存

筋湿重量を測定後、LDH 活性値測定及びアイソザイム分析に使用しない筋肉試料は、液体窒素で冷却したイソペンタン（和光, Osaka）中で凍結した。凍結した筋肉は、使用時まで -80°C で保存した。

LDH 活性値測定及びアイソザイムの分析

筋湿重量を測定後、筋肉組織片（約 50mg）に 50 倍量の試料処理液(0.3 M Sucrose, 0.1 M KCl, 3 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM PMSF, pH 7.4) を加え、ホモジナイザー（ULTRA-TURRAX, JANKE & Kunkel, Deutschland, Germany）で均質化した後、オートバランス遠心機(KA-1000, KUBOTA, Tokyo) で遠心分離(600 \times g, 10 分)を行った。上清の一部は、ラクテートデヒドロゲナーゼ C II -テストワコー(和光, Osaka)を用いて LDH 活性値の測定を行った。同様に上清の一部を用いて LDH アイソザイムの分析を行った。LDH アイソザイム分析は、Dietz の方法¹⁸⁾に従い、LDH の電気泳動 (T=7.0%, C=2.0%) を行い、泳動終了後に乳酸を基質とし、発色剤として PMS を用いて活性染色を行った。

RT-PCR 法

各組織からの total RNA 抽出

ラットから採取した SOL と EDL から、ISOGEN（ニッポンジーン社, Tokyo）を用いて、指定のマニュアルに従い、total RNA を抽出した。それぞれの組織片（約 50mg）に ISOGEN（1 mL）を加え、ホモジナイズ用ペッスルを用いてホモジナイズし、室温で約 5 分間放置した。その後、0.2mL のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスし、3 分間室温で放置後、15 分間遠心（ 4°C , 12,000 \times g）した。水相を採取し、0.5mL の isopropanol を加えて転倒混和し、室温で 7 分間放置後、10 分間

遠心 (4°C, 12,000×g) した。上清を取り除き、RNA の pellet を 70%エタノール (1 mL) で洗浄後、5 分間遠心 (4°C, 7,500×g) した。再度、上清を取り除き、total RNA の pellet を室温にて風乾した。

Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)の作製

風乾した RNA を 0.1%(v/v)diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理滅菌精製水に溶解した。逆転写反応は、total RNA (約 2µg) に逆転写反応液 (50mM Tris-HCl(pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 1.0mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 20unit RNase inhibitor, 200unit M-MLV reverse transcriptase, 50pmoles random primer) を加え、総量 40µL で行った。total RNA 溶液と逆転写反応液を穏やかに攪拌し、30°C で 10 分間プレインキュベートした後、42°C で 20 分間インキュベートし、cDNA を合成した。

PCR による mRNA 量の検討

得られた cDNA 溶液 2µL に、10×PCR buffer 2µL, 0.2mM dNTP Mixture, 10pmoles primer(forward 及び reverse), 0.5unit KOD Dash DNA Polymerase を加え、滅菌精製水で 20µL とし、穏やかに攪拌した後、チューブにミネラルオイルを重層して thermal cycler (PCR System 9700, Applied Biosystems 社, Tokyo) で PCR 反応を行った。

増幅された cDNA 産物は、1µg/µL の ethidium bromide を加えた 2%アガロースゲルで電気泳動し、UV Transilluminator (BioDoc-It System, UVP, Upland, CA) によりフラグメントの位置とサイズを Ladder marker (100bp DNA Ladder, TOYOBO, Osaka) を用いて確認した。

ラット 18s rRNA に対するプライマー配列は、

forward 5'- TACATGCCGACGGGCGCTGACC -3'

reverse 5'- CCTGCTGCCTTCCTTGGATG -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 310 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 98°C 10 秒、アニーリング反応 65.2°C 10 秒、増幅反応 74°C 30 秒、30 サイクルで行った。

ラット β_2 -adrenoreceptor に対するプライマー配列は、

forward 5'- GGCACGGACTCCGAAGTTCCTC -3'

reverse 5'- AGGCACAGTACCTTGACAGTTCAC -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 437 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 95°C 60 秒、アニーリング反応 61°C 120 秒、増幅反応 72°C 45 秒、30 サイクルで行った。

ラット MyoD に対するプライマー配列は、

forward 5'- GGGTTCTGCATCTACGCG -3'

reverse 5'- CTCCGCTTTCTGTTCTTTGG -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 303 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 65°C 10 秒、増幅反応 72°C 20 秒、35 サイクルで行った。

ラット myogenin に対するプライマー配列は、

forward 5'- ACTACCCACCGTCCATTCAC -3'

reverse 5'- TCGGGGCACTCACTGTCTCT -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 233 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 98°C 10 秒、アニーリング反応 63°C 10 秒、増幅反応 72°C 8 秒、35 サイクルで行った。

ラット IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) に対するプライマー配列は、

forward 5'-GCCAGCTGGTATTATTTGGA-3'

reverse 5'-CAGTATGGGAGGCACACACT-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 203 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 61°C 4 秒、増幅反応 72°C 10 秒、35 サイクルで行った。

ラット MGF (Mechano growth factor) に対するプライマー配列は、

forward 5'-GCTTGCTCACCTTTACCAGC-3'

reverse 5'-AAATGTA CTTCTTCCTTCTC-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 353 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 57°C 10 秒、増幅反応 72°C 20 秒、35 サイクルで行った。

ラット Myostatin に対するプライマー配列は、

forward 5'-AGAGAGAGGCGAATGTGGAA-3'

reverse 5'-TCACTGCTGTCATCCCTCTG-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 226 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 98°C 10 秒、アニーリング反応 63°C 4 秒、増幅反応 72°C 10 秒、35 サイクルで行った。

ラット Notch1 に対するプライマー配列は、

forward 5'- CTGGTTCCTGAGGGTTTCAA -3'

reverse 5'- GGAAGTTCTTGGTCTCCAGGT -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 361 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 45 秒、アニーリング反応 60°C 10 秒、増幅反応 72°C 20 秒、35 サイクルで行った。

ラット Jagged1 に対するプライマー配列は、

forward 5'- GCCAGGAACAACACATCAAAGA -3'

reverse 5'- CCTGCCTTAAGTGAGGACATGA -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 163 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 56°C 4 秒、増幅反応 72°C 10 秒、35 サイクルで行った。

ラット Delta-like1 に対するプライマー配列は、

forward 5'- GGACTATAACCTCGTTCG -3'

reverse 5'- TTCTGTCAGGAATCTCCCA -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 149 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 53°C 4 秒、増幅反応 72°C 10 秒、35 サイクルで行った。

ラット Numb に対するプライマー配列は、

forward 5'- CATGGGATGTTCTGTTTCATGGT -3'

reverse 5'- TGGGTCTTAATGGGTCTGTCC -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 104 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 55°C 4 秒、増幅反応 72°C 10 秒、35 サイクルで行った。

統計処理

すべての統計値は平均値±SD で示した。得られた結果は F-test の後、unpaired t-test を行い、LDH アイソザイム分布については、Mann-Whitney's U-test により有意差検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ または $p < 0.01$ とした。

Ⅲ 結果

Ⅲ-1. ラットの体重及び筋湿重量変化

予備飼育時からの Control 群及び CLEB 群の体重の推移を Fig. 5 に示した。投与開始時、各群のラット平均体重は、ほぼ同じであった(Control 群: 297±9 g, CLEB 群: 299±8 g)。投与 1 日後、CLEB 群において一過性の体重減少を示したが、その後 CLEB 群の体重増加が見られ、投与 6 日後には Control 群の体重を上回った(Control 群: 336±20 g, CLEB 群: 339±7 g)。その後も CLEB 群が高値を示し、投与 2 週間後まで増加傾向を示した(Control 群: 385±26 g, CLEB 群: 403±10 g)。これらの変化は従来から報告されているものと同じであった。

筋湿重量については、Table. 2 に示すように、SOL(Control 群: 186±16 mg, CLEB 群: 209±16 mg; $P<0.05$)、EDL (Control 群: 217±12 mg, CLEB 群: 280±12 mg; $P<0.01$)及び心臓(Control 群: 1093±82 mg, CLEB 群: 1282±110 mg; $P<0.01$)においてそれぞれ有意な増加が見られた。また、それぞれの体重の差異を考慮して算出した体重比に関しては、SOL(Control 群: 0.48±0.04 mg/g, CLEB 群: 0.52±0.03 mg/g)においては有意な増加は見られなかったものの、EDL(Control 群: 0.57±0.05 mg/g, CLEB 群: 0.69±0.04 mg/g; $P<0.01$)及び心臓(Control 群: 2.84±0.17 mg/g, CLEB 群: 3.17±0.23 mg/g; $P<0.05$)ではそれぞれ有意な増加が観察され、心肥大と骨格筋の肥大が認められた。

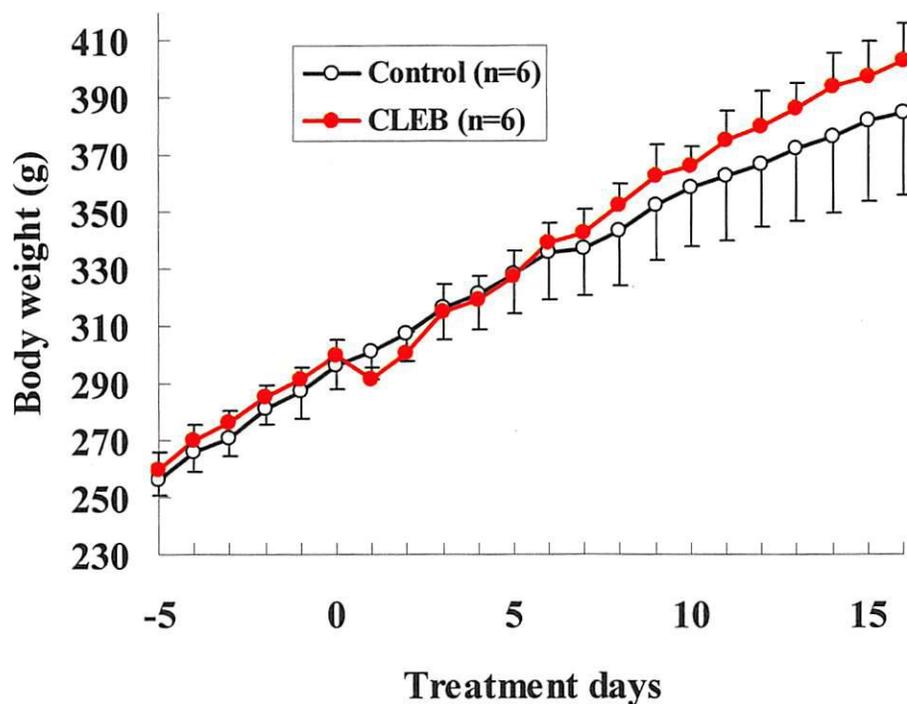


Fig. 5 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Body Weight in Male Rats

Body weight changes of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats are shown. At 0 day(8-week-old), CLEB and Control groups started to be injected daily with clenbuterol and equal volume of saline for 2weeks,respectively. Values are means \pm S.D.

Table. 2 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Body Weight and Muscle Wet Weight in Male Rats

	Control(n=6)	CLEB(n=6)
Body weight (g)	386±25	404±10
SOL wet weight (mg)	186±16	209±16*
Ratio (mg/g)	0.48±0.04	0.52±0.03
EDL wet weight (mg)	217±12	280±12**
Ratio (mg/g)	0.57±0.05	0.69±0.04**
Heart wet weight (mg)	1093±82	1282±110**
Ratio (mg/g)	2.84±0.17	3.17±0.23*

Body weight and muscle wet weight of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats are shown.

The ratio represents relative weight of muscle w.wt.to body weight.

Values are means ± S.D.

Significant difference between Control and CLEB, **P<0.01, *P<0.05

III-2. LDH の解析

III-2.1 LDH 活性に及ぼす Clenbuterol の影響

Table. 3 に LDH 比活性値を湿重量当たり(IU/g w.wt.)で示した。
 SOL(Control 群: 116.8±20.9 IU/g w.wt, CLEB 群: 131.8±36.5 IU/g w.wt)、
 EDL(Control 群: 390.0±63.4 IU/g w.wt, CLEB 群: 416.0±44.6 IU/g w.wt)ともに有意

な変化は見られなかったものの、それぞれ増加傾向が観察された。

III-2.2 LDH アイソザイムに及ぼす Clenbuterol の影響

LDH アイソザイムを Dietz 法による電気泳動により分析し、有酸素的性質の強い心臓型(H型)の四量体である H4 型から、MH3 型、M2H2 型、M3H 型、M4 型へと順番に筋肉型(M型)の無酸素的性質の強くなる 5 つのアイソザイムの構成比を Fig. 6 に示した。SOL、EDL ともに移動度の大きい方から H4 型、MH3 型、M2H2 型、M3H 型、M4 型の 5 本のバンドが認められた。

SOL では、CLEB 群において、H4 型(Control 群: $20.5 \pm 2.2\%$, CLEB 群: $10.2 \pm 1.1\%$; $P < 0.01$)、MH3 型(Control 群: $32.7 \pm 6.1\%$, CLEB 群: $23.5 \pm 4.4\%$; $P < 0.05$)の有意な減少と、M2H2 型(Control 群: $22.9 \pm 1.5\%$, CLEB 群: $26.8 \pm 3.3\%$; $P < 0.05$)、M3H 型(Control 群: $22.4 \pm 6.6\%$, CLEB 群: $36.5 \pm 5.7\%$; $P < 0.01$)の有意な増加が観察された。また、M4 型では有意な増加はみられなかったものの、増加傾向を示した。Clenbuterol 投与によって、有酸素的な遅筋タイプのアイソザイム分布から、無酸素的な速筋タイプのアイソザイム分布への移行が認められた。しかし、EDL においては、有意な変化は認められなかった。これらの変化もすでに報告されているものと同じ傾向であった。

Table. 3 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on
Muscle LDH Specific Activity in Male Rats

	Control(n=6)	CLEB(n=6)
SOL (IU/g w.wt)	116.8±20.9	131.8±36.5
EDL (IU/g w.wt)	390.0±63.4	416.0±44.6

Muscle LDH specific activity in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats are shown.

Values are means ± S.D.

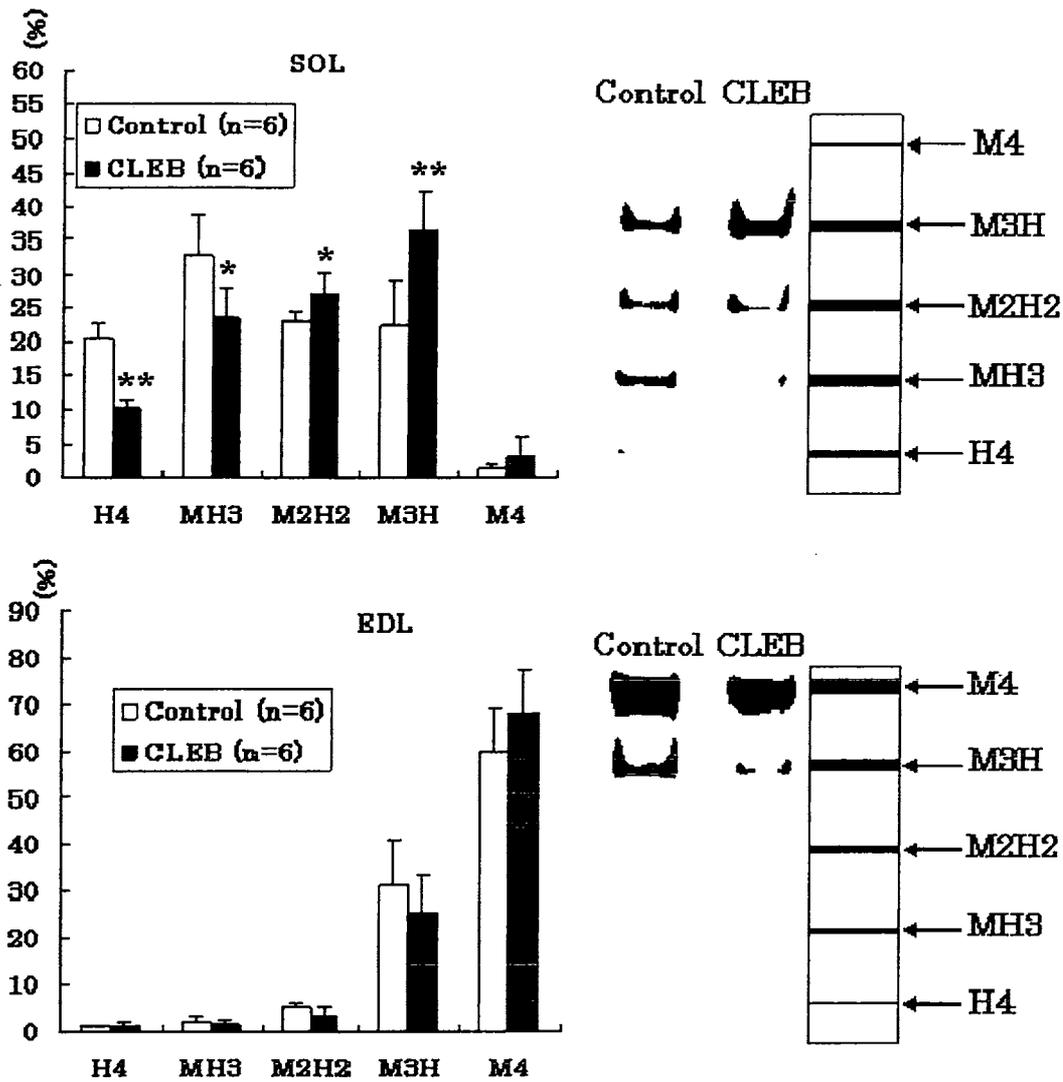


Fig. 6 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on LDH Isozyme Distribution in Male Rats

[Left] LDH isozyme distribution in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats are shown. Values are means \pm S.D.

Significant difference between Control and CLEB, **P<0.01, *P<0.05

[Right] Gels represent typical LDH isozyme pattern from SOL(upper) and EDL(lower) of Control and CLEB rats.

III-3. RT-PCR 法による解析

III-3.1 β_2 -receptor の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

慢性的な β -agonist の投与により down regulation が起こることが知られている β_2 -adrenoceptor の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 7 に示した。SOL(Control 群: $100.0 \pm 9.6\%$, CLEB 群: $82.7 \pm 5.1\%$; $P < 0.01$)、EDL(Control 群: $100.0 \pm 7.6\%$, CLEB 群: $78.1 \pm 7.5\%$; $P < 0.01$)ともに、CLEB 群において有意な減少が確認された。

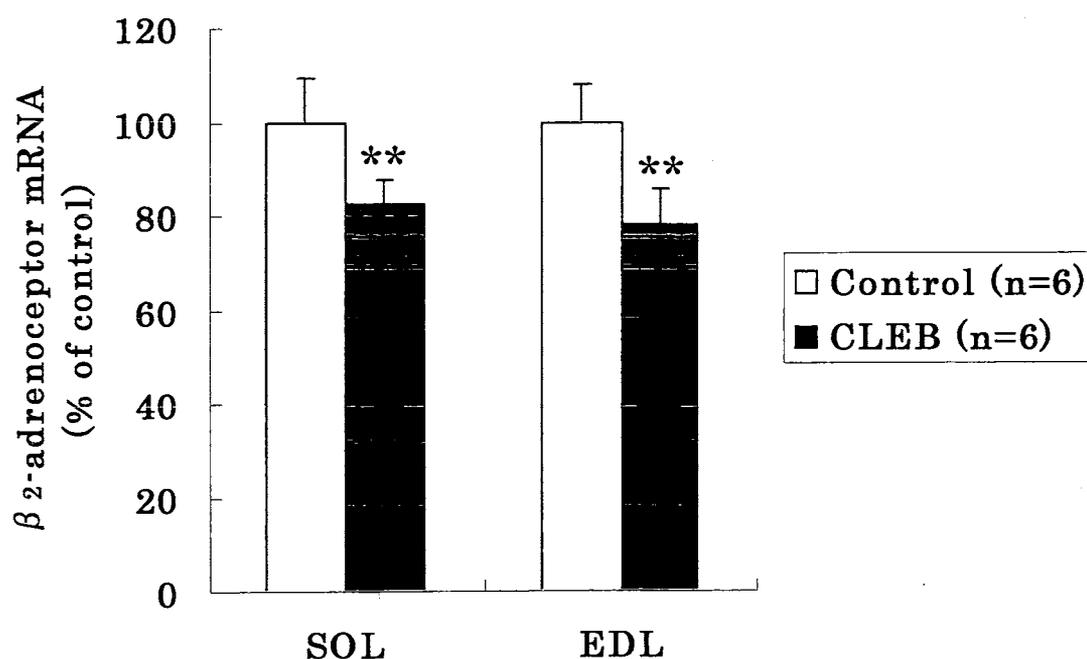


Fig. 7 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on β_2 -adrenoceptor mRNA Expression in Male Rats

β_2 -adrenoceptor mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

Significant difference between Control and CLEB, ** $P < 0.01$

III-3.2 MyoD family の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

RT-PCR 法による MyoD の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

骨格筋特異的に発現し、非筋細胞から筋芽細胞への運命決定に働く転写因子として知られている MyoD の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 8 に示した。SOL(Control 群: $100.0 \pm 17.9\%$, CLEB 群: $131.4 \pm 18.8\%$; $P < 0.05$) においては有意な増加が見られたものの、EDL(Control 群: $100.0 \pm 13.9\%$, CLEB 群: $104.1 \pm 21.9\%$)においては有意な変化は観察されなかった。

これは遅筋の速筋化を示唆するものである。

RT-PCR 法による myogenin の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

骨格筋特異的に発現し、筋芽細胞から筋管細胞への最終分化に働く転写因子として知られている myogenin の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 9 に示した。SOL(Control 群: $100.0 \pm 5.7\%$, CLEB 群: $127.6 \pm 5.9\%$; $P < 0.01$)、EDL(Control 群: $100.0 \pm 7.3\%$, CLEB 群: $127.3 \pm 9.1\%$; $P < 0.01$)ともに、CLEB 群において有意な増加が確認された。

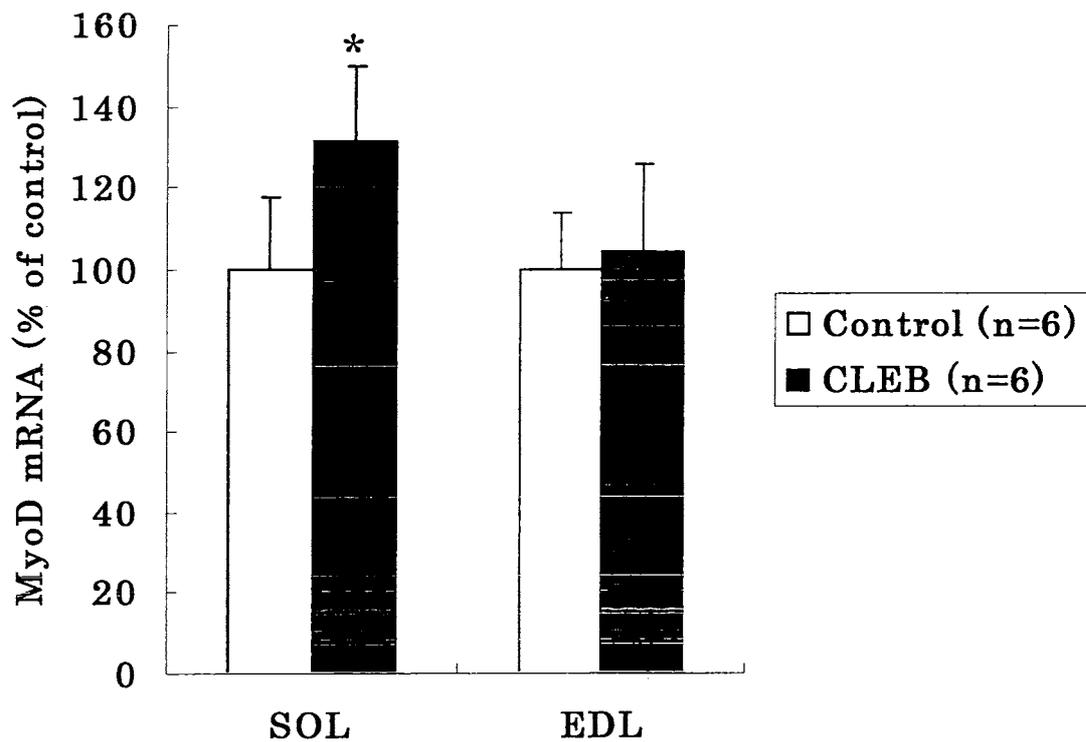


Fig. 8 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on MyoD mRNA Expression in Male Rats

MyoD mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

Significant difference between Control and CLEB, *P<0.05

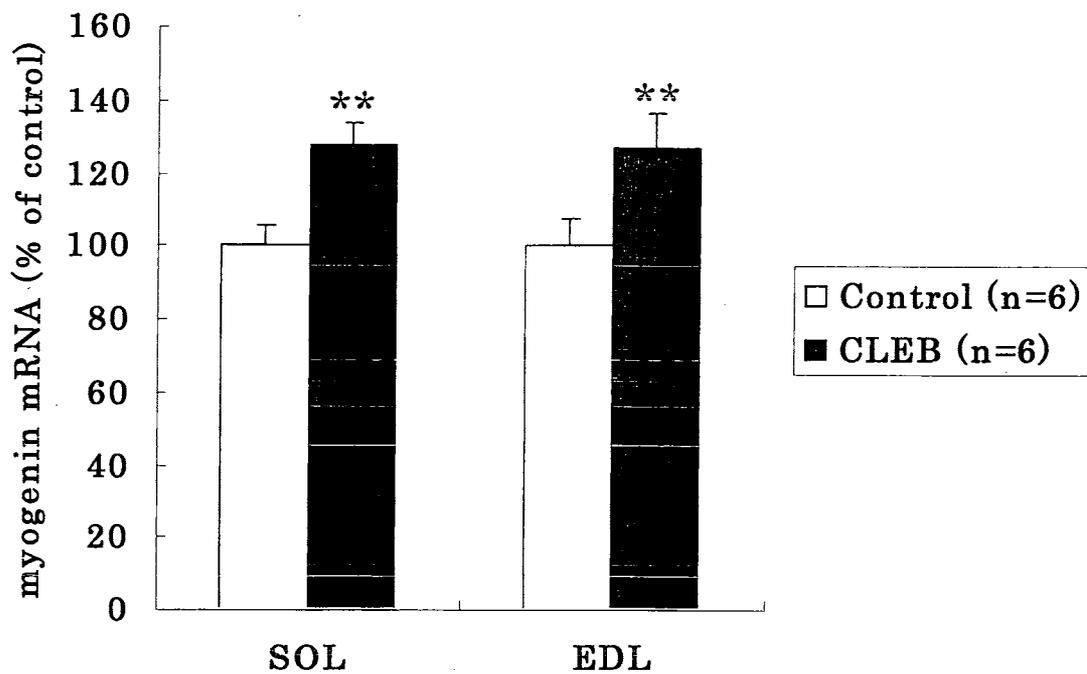


Fig. 9 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on myogenin mRNA Expression in Male Rats

Myogenin mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

Significant difference between Control and CLEB, **P<0.01

III-3.3 骨格筋成長に関与する因子に及ぼす Clenbuterol の影響

RT-PCR 法による IGF-1 (Insulin-like growth factor 1)の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

タンパク質合成を促進させ、筋成長に関与するとされる IGF-1 の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 10 に示した。SOL(Control 群: 100.0±3.8%, CLEB 群: 101.6±12.4%)、EDL(Control 群: 100.0±11.9%, CLEB 群: 113.3±18.4%)ともに有意な変化は見られなかった。

RT-PCR 法による MGF (Mechano growth factor)の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

機械的な負荷により発現が誘導されることが知られている MGF の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 11 に示した。SOL(Control 群: 100.0±6.3%, CLEB 群: 105.3±9.1%)、EDL(Control 群: 100.0±14.3%, CLEB 群: 107.7±19.4%)ともに有意な変化は見られなかった。

RT-PCR 法による Myostatin の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

TGF(Transforming growth factor)- β super family に分類され、骨格筋形成の negative regulator として機能することが知られている Myostatin の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 12 に示した。SOL(Control 群: 100.0±5.7%, CLEB 群: 92.1±11.8%)、EDL(Control 群: 100.0±6.6%, CLEB 群: 98.5±16.1%)ともに有意な変化は認められなかった。

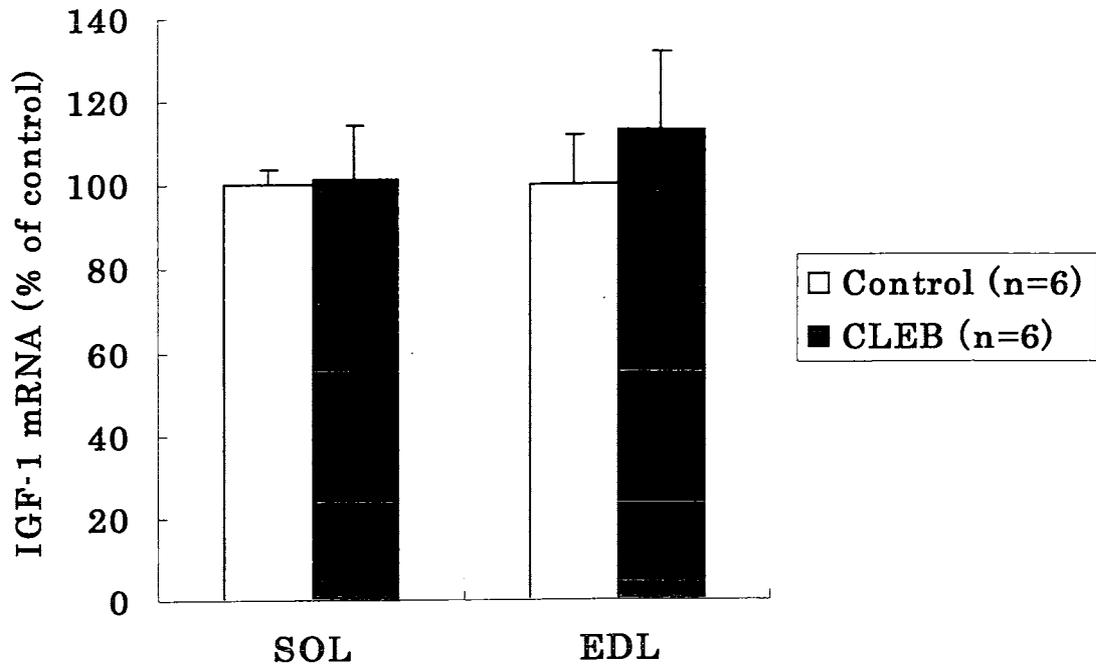
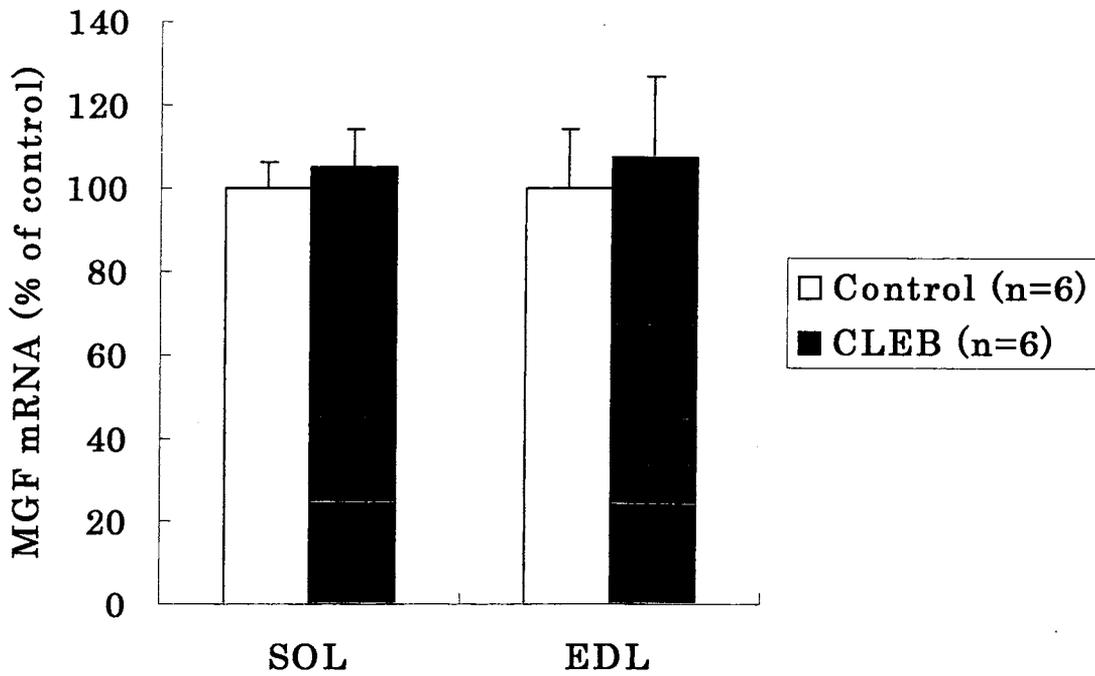


Fig. 10 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on IGF-1 mRNA Expression in Male Rats

IGF-1(Insulin-like growth factor 1) mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%. Values are means \pm S.D.



**Fig. 11 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol
on MGF mRNA Expression in Male Rats**

MGF (Mecano growth factor) mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%. Values are means \pm S.D.

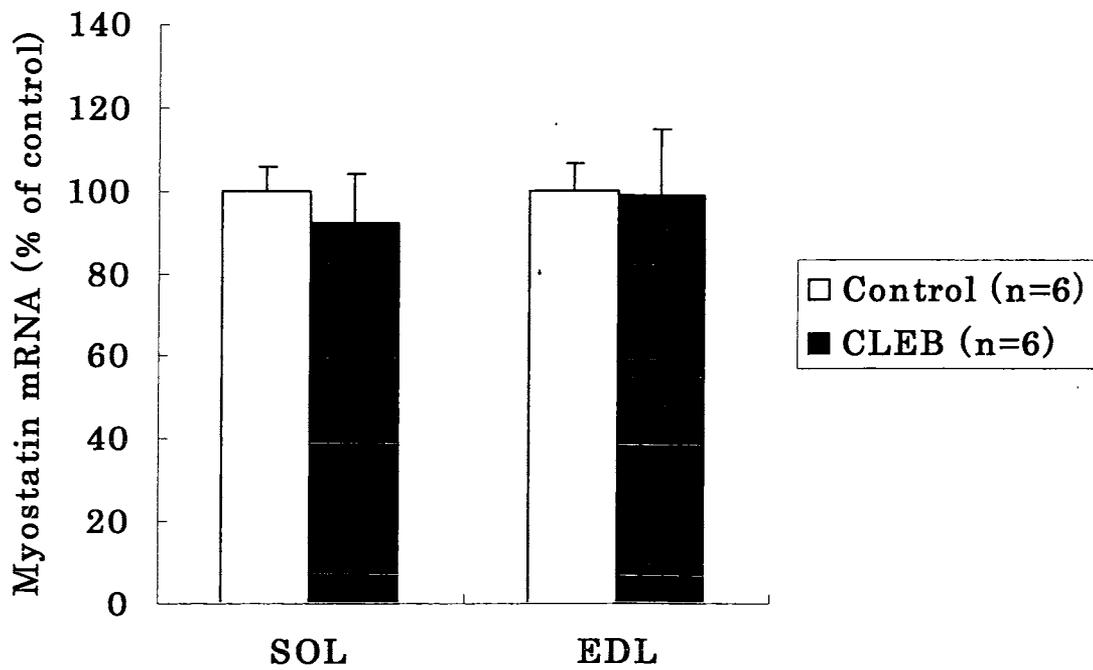


Fig. 12 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Myostatin mRNA Expression in Male Rats

Myostatin mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

III-3.4 Notch signaling に及ぼす Clenbuterol の影響

RT-PCR 法による Notch1 の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

Notch1 の活性化は筋芽細胞の増殖を強力に促進することが知られている。Notch1 の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 13 に示した。SOL(Control 群: 100.0±24.9%, CLEB 群: 100.6±25.1%)、EDL(Control 群: 100.0±19.6%, CLEB 群: 101.3±13.5%)ともに有意な変化は見られなかった。

RT-PCR 法による Jagged1 の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

Notch のリガンドの 1 つである Jagged1 の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 14 に示した。SOL(Control 群: 100.0±18.8%, CLEB 群: 97.1±18.2%)、EDL(Control 群: 100.0±12.6%, CLEB 群: 102.2±16.4%)ともに有意な変化は見られなかった。

RT-PCR 法による Delta-like1 の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

哺乳類の Notch のリガンドの 1 つであり、satellite cell の活性化に関与することが知られている Delta-like1 の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 15 に示した。SOL(Control 群: 100.0±9.5%, CLEB 群: 100.7±20.3%)では有意な変化は見られなかったが、EDL(Control 群: 100.0±25.0%, CLEB 群: 167.3±28.0%; $P < 0.01$)では CLEB 群において有意な増加が観察された。

RT-PCR 法による Numb の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響

Notch の細胞内ドメイン NICD(Notch Intracellular Cytoplasmic Domain)の核への移行を制御する調節因子として知られる Numb の mRNA 発現量の分析結果をそ

れぞれ Control の平均値に対する割合(%)で Fig. 16 に示した。SOL(Control 群: 100.0±10.3%, CLEB 群: 104.1±19.9%)では有意な変化は見られなかったが、EDL(Control 群: 100.0±21.5%, CLEB 群: 131.0±20.0%; P<0.05) では CLEB 群において有意な増加が観察された。

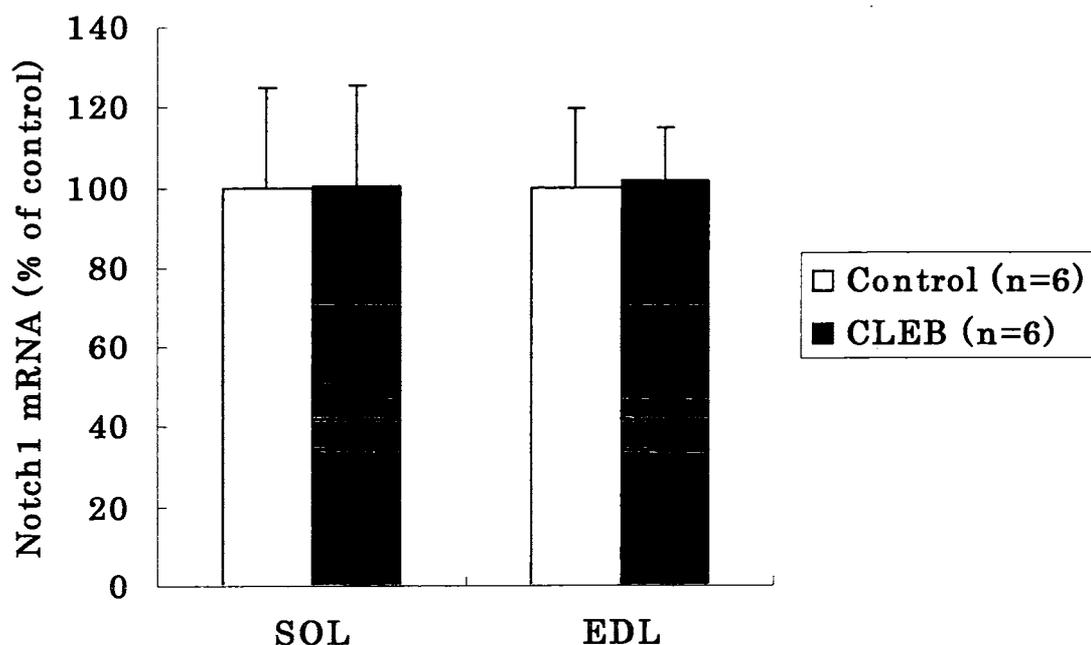


Fig. 13 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Notch1 mRNA Expression in Male Rats

Notch1 mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means ± S.D.

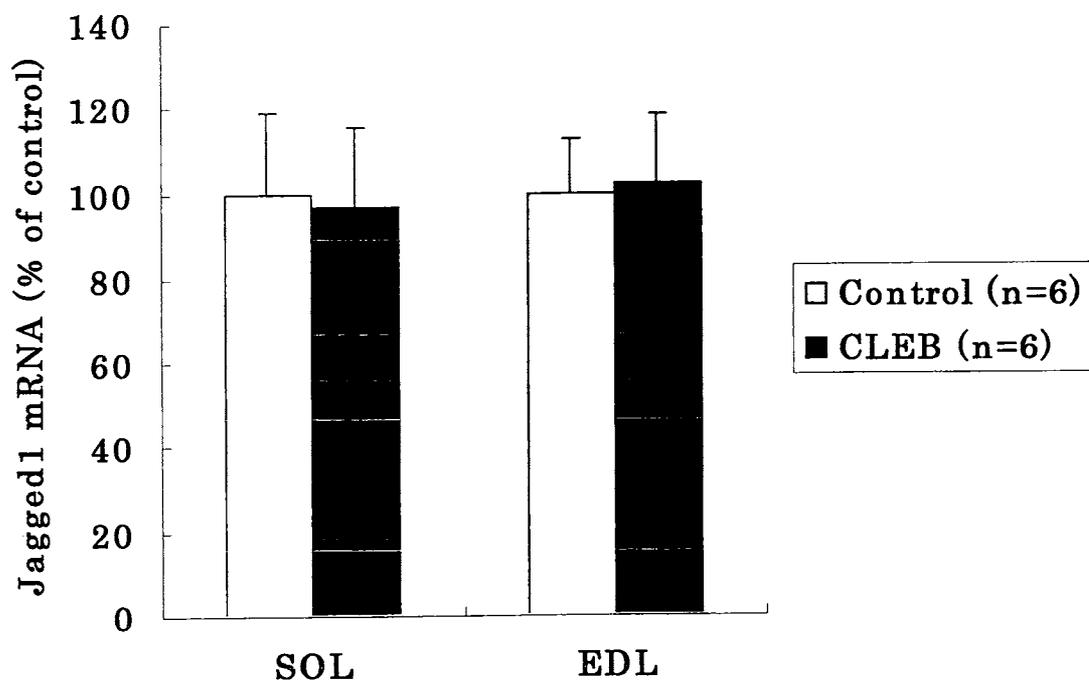


Fig. 14 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Jagged1 mRNA Expression in Male Rats

Jagged1 mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

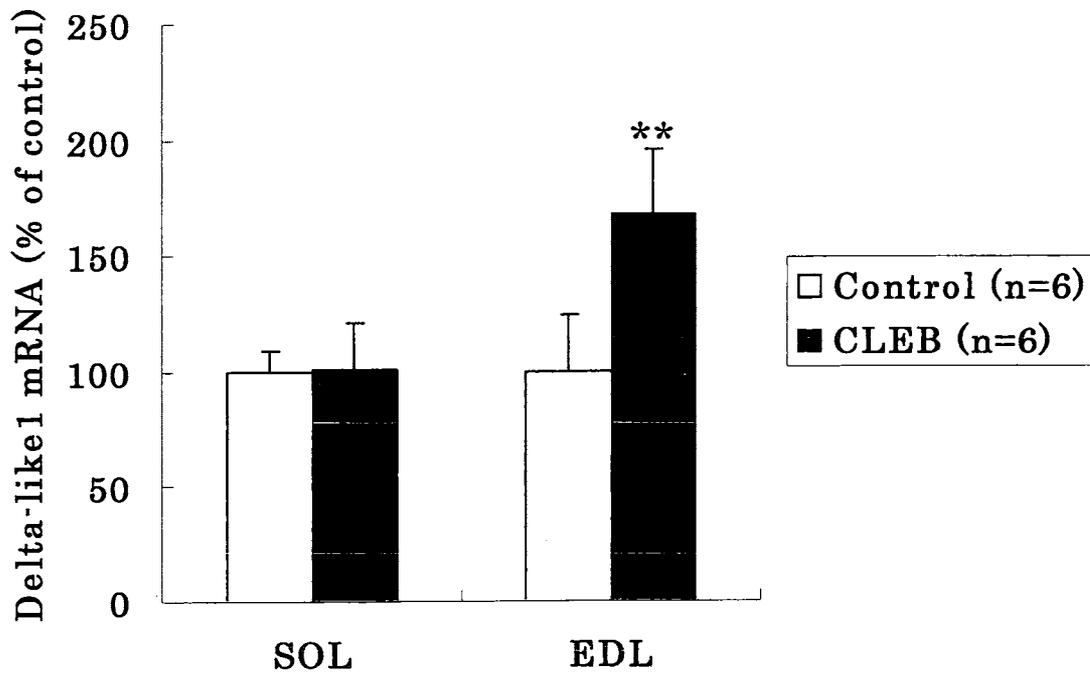
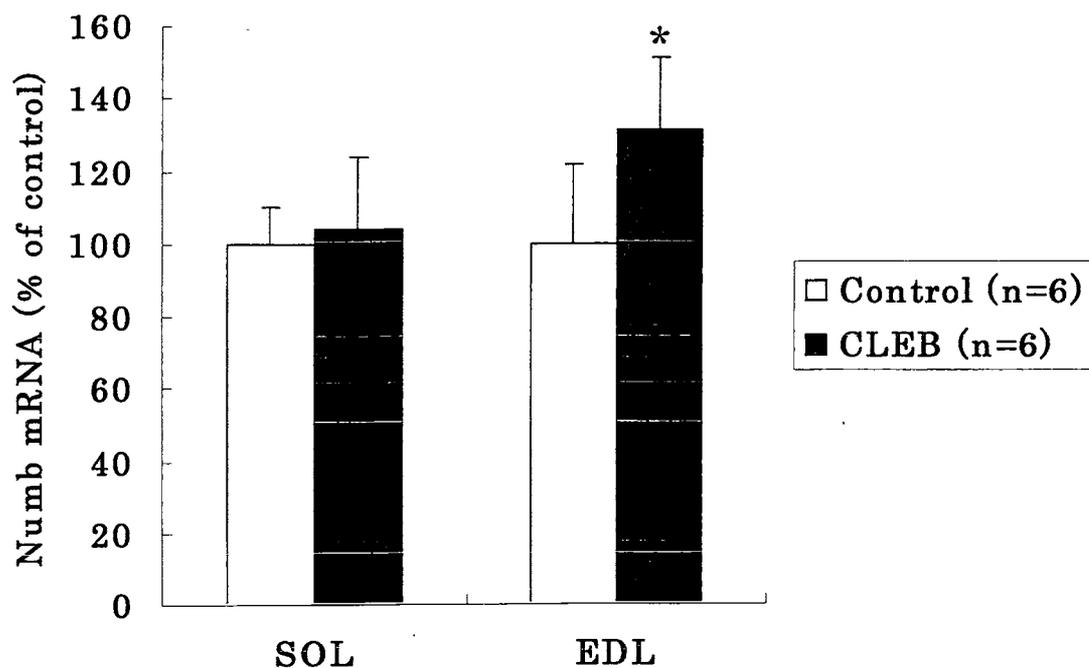


Fig. 15 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Delta-like1 mRNA Expression in Male Rats

Delta-like1 mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

Significant difference between Control and CLEB, **P<0.01



**Fig. 16 The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol
on Numb mRNA Expression in Male Rats**

Numb mRNA expression in muscles of Control (n=6) and CLEB (n=6) rats is displayed as percentage of Control, which is set to 100%.

Values are means \pm S.D.

Significant difference between Control and CLEB, *P<0.05

Values are means \pm S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, **P<0.01

IV 考察

筋湿重量へ及ぼす影響については、Table. 2 に示すように、SOL($P<0.05$)、EDL ($P<0.01$)においてそれぞれ有意な増加が見られた。また、それぞれの体重の差異を考慮して算出した体重比に関しては、SOL においては有意な増加は見られなかったものの、EDL($P<0.01$)では有意な増加が観察され、骨格筋の肥大が観察された。筋肥大に関しては先行研究^{47,55)}においても、雄、雌ともに同様の傾向が観察されており、ほぼ同じ結果となった。また、遅筋である SOL よりも速筋である EDL において筋肥大の影響が強く見られ、遅筋よりも速筋において強く影響するという Kim らの報告を支持するものであった²⁸⁾。Clenbuterol と β -antagonist を同時に投与すると、Clenbuterol の筋肥大作用が減弱するという報告⁵⁾や β -adrenoceptor を欠損したマウスにおいては Clenbuterol は筋肥大作用を示さない²⁴⁾という報告がされており、Clenbuterol の筋肥大作用には β_2 -adrenoceptor が関与すると考えられているが、遅筋の方が速筋よりも β_2 -adrenoceptor が多く発現していること³⁴⁾を考慮すると、遅筋である SOL よりも速筋である EDL において筋肥大が強く見られたことは、 β_2 -adrenoceptor を介した直接的な作用だけでは説明することができない。したがって、Clenbuterol の筋肥大作用においては、 β_2 -adrenoceptor を介した直接的な作用とは異なった他の因子を介する可能性が考えられる。Yimlamai らは、Clenbuterol 投与が速筋において特異的にユビキチン-プロテアソーム経路を介する蛋白分解系の活性化を抑制し、後肢懸垂による筋萎縮を減弱するということを報告している⁶⁵⁾。Clenbuterol の筋肥大作用を説明するためには、Satellite cell の活性化や、IGF-1 などの関与による蛋白合成系の亢進¹⁾、蛋白分解系の抑制など、様々な間接的作用を考慮することが必要であると推測される。

また、Table. 2 で示したように、心臓においても、筋湿重量の有意な増加が見られ ($P<0.01$)、心肥大が観察された。また、それぞれの体重の差異を考慮して算出した体重比に関しても、有意な増加が観察された($P<0.05$)。この結果は、Wong らをはじめ

とする雄ラットでの報告と一致するものであった^{55, 63)}。佐藤らは、雌ラットにおいては Clenbuterol 投与により心筋の筋湿重量の増加が起こったものの、体重比では変化が見られないという結果を報告している⁴⁷⁾。これらのことから、Clenbuterol が引き起こす心肥大においては、性差がある可能性が考えられる。これについては、性ホルモンの関与や、薬物代謝や排泄速度での性差の関与⁶⁶⁾などが考えられるが、詳細は不明である。本研究では詳細な検討ができなかったが、これまで心肥大に関しては、IGF-1 やカルシニューリンやレニン-アンギオテンシン系の関与が示唆されている。圧負荷によって心筋の IGF-1 の mRNA 発現量の増加が見られる⁵⁸⁾ことなど、心肥大形成における IGF-1 の役割を示唆する報告が数多くなされている。β-agonist による心肥大の原因には、βアドレナリン作用性の収縮反応とカルシニューリンの関連⁴²⁾や、レニン-アンギオテンシン系の関与によるものなど⁷⁾、種々のものが考えられているが、現時点において明確な結論は得られていない。また、β₂-agonist 投与による心肥大に伴い、プトレシン、スペルミジンなどの細胞増殖と関わりのあるポリアミンの濃度変化が起こることも報告されているが¹⁴⁾、それらはガン細胞の増殖時にも見られる現象であり、ガン疾患の促進作用との関連についても明らかにはされてはならず今後の検討待ちである。したがって、Clenbuterol によって引き起こされる心肥大は、骨格筋の肥大とは異なったメカニズムで誘発される可能性も考えられ、今後の興味深い検討課題である。

Clenbuterol の代謝特性への影響に関しては、Fig. 6 に示した LDH アイソザイム分布の解析結果より、SOL においては有酸素的な遅筋タイプのアイソザイムから無酸素的な速筋タイプのアイソザイムへの移行が認められたが、EDL において変化が見られなかった。これらのことから、Clenbuterol 投与により SOL において特異的に無酸素的解糖系の代謝が促進しているものと推察された。また Table. 3 に示したように、有意な差ではなかったが、SOL、EDL ともに LDH 比活性値の増加傾向を示した。これは、ピルビン酸に対する Km 値の高い M 型の活性値が高いことを考慮

に入れると、ピルビン酸から乳酸を生成する無酸素的解糖系が亢進していることを裏付けるものである。常川らは Clenbuterol 投与により、SOL において無酸素的解糖系の亢進が起こることを報告しており⁵⁵⁾、今回の結果とほぼ一致した。以上の結果は、Clenbuterol 投与による解糖系の促進により SOL における乳酸濃度が有意に増加するという MacLennan&Edwards の報告³²⁾や、Clenbuterol 投与によって SOL で解糖系の律速酵素である PFK(phosphofructokinase)の総活性値が上昇し、遅筋で強く解糖系の亢進が観察されるという Dodd らの報告¹⁹⁾を支持するものであった。遅筋の方が速筋よりも β_2 -receptor が多く発現している³⁴⁾ことも考慮すると、今回の結果は、 β_2 -receptor を介した cAMP の増加に伴い、無酸素的解糖系の亢進がもたらされたと考えられる。さらに LDH 活性の増加は、がん細胞の増殖と関連することが示唆されており^{40, 50)}、本研究では詳細な検討を行ってはいないが、薬物による筋肥大におけるメカニズムを考える上で非常に興味深く、今後の検討課題である。

慢性的な β -agonist の投与による β_2 -adrenoceptor への影響を調べるために、 β_2 -adrenoceptor の mRNA 発現量について検討を行った。Fig. 7 で示したように、SOL、EDL ともに有意な減少が確認された。慢性的な β -agonist の投与は β_2 -adrenoceptor の down regulation を起こすことが知られている²⁰⁾。7 日間の Norepinephrine の投与により、 β_2 -adrenoceptor とその mRNA が減少し、それらの分布の挙動が一致するという Nishikawa らの報告を考慮すると、今回は mRNA レベルでの検討しか行ってはいないが、タンパク質レベルでの減少が起こっていることも十分に考えられ、 β_2 -adrenoceptor の down regulation が起こっていることが推察される。今回の結果は Clenbuterol の 12 日間投与により、 β_2 -adrenoceptor の down regulation が起こるといふ Lavoie らの報告と同様の結果となった³⁰⁾。

骨格筋細胞の運命決定と細胞分化を正に調節している MyoD family に及ぼす Clenbuterol の影響を調べるため、MyoD family に属するもののうち、非筋細胞から筋芽細胞への運命決定に働く転写因子として知られている MyoD と、筋芽細胞か

ら筋管細胞への最終分化に働く転写因子として知られている myogenin の mRNA 発現量についてそれぞれ検討を行った。Fig. 8 に示したように、MyoD については、SOL では有意な増加が見られたものの、EDL においては変化が見られなかった。これは、佐藤らの雌ラットでの報告とほぼ一致する結果となった⁴⁷⁾。また、Fig. 9 に示したように、myogenin については、SOL、EDL ともに有意な増加が観察された。Clenbuterol 投与による MyoD family への影響については、MyoD に関しては影響を及ぼさないが myogenin の mRNA 発現は増加するという Dalday の報告¹⁵⁾や、MyoD の mRNA は増加するが myogenin の mRNA は減少するという Mozdziak の報告³⁷⁾もあり、また MyoD、myogenin ともに発現が抑制されるといった Maltin の報告³³⁾など、これまでに数多く報告されてはいるが、意見は一致しておらず、明確な結論は得られていない。これらの報告の違いの原因は、種差や年齢、投与期間、投与量などが異なるためであると考えられるが、詳細は不明であり、今後の検討課題であると考えられる。しかしながら、MyoD、myogenin はともに骨格筋細胞への運命決定や分化に関与することが知られており、Clenbuterol 投与が、MyoD、myogenin の発現を上昇させることにより除神経後の筋萎縮を遅延させるという Wu らの報告⁶⁴⁾を考慮すると、今回の結果で観察された MyoD、myogenin の mRNA 発現増加は何らかの形で筋肥大に寄与している可能性が考えられる。また、本研究では検討を行っていないが、MyoD は Clenbuterol によって誘発される myosin heavy chain isoform の速筋タイプへの移行に関与しているということが報告されており⁴⁷⁾、Table. 2 で示した筋湿重量において SOL よりも EDL で筋肥大の影響が強く見られたことから考えると、MyoD に関しては筋肥大よりも筋線維タイプの速筋化に関与することも考えられる。しかし、詳細は不明であり、これらのことも含め、今後の興味深い検討課題といえる。

骨格筋成長に関与する因子の mRNA 発現量に及ぼす Clenbuterol の影響を調べるため、タンパク質合成を促進させて筋成長に関与するとされる IGF-1 と、機械的な

負荷により発現が誘導されることが知られている MGF の mRNA 発現について検討を行った。Fig. 10 に示したように、IGF-1 については、SOL、EDL ともに有意な変化は観察されなかった。IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) は、受容体を介して Akt を活性化し、GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase- 3 β) や mTOR (mammalian target of rapamycin) のリン酸化を促進し、タンパク質合成を促進する結果、筋肥大に寄与することが報告されている^{53, 57)}。Awede らは Clenbuterol の投与により、SOL において 3 日目に IGF-1 mRNA が増加するが、その後は減少し、9 日目には元のレベルまで下がるという IGF-1 の一過性の増加について報告しているが、このことを考慮すると、本研究では 2 週間投与後に筋肉を摘出して解析を行ったため、すでに IGF-1 の mRNA は元のレベルまで下がってしまったということも考えられる。これらのことから Clenbuterol の誘発する筋肥大のうち投与初期における筋肥大においては、局所的な IGF-1 産生の増加が寄与することも考えられるが、この一過性の IGF-1 産生増加については SOL における報告しかされておらず、SOL においては顕著な筋肥大が見られなかったという本研究の結果からも、Clenbuterol の誘発する筋肥大への IGF-1 の寄与は少ないものと考えられ、別の機序がこの筋肥大に関与する可能性が考えられる。しかし、本研究の結果では Clenbuterol の誘発する筋肥大における IGF-1 の役割を除外することはできず、今後の検討が必要であると思われる。

また、Fig. 11 に示したように、筋肉の機械的刺激によって誘発されることが知られている MGF についても、SOL、EDL ともに有意な変化は見られなかった。MGF の mRNA 発現においては Clenbuterol の直接的影響はほとんどないということが考察される。一過性の IGF-1 産生増加が起こるとする Awede らの報告を考慮に入れると、IGF-1 の場合と同様に、MGF の発現も Clenbuterol 投与によって一過性の変化を示す可能性も考えられるが、Clenbuterol の誘発する筋肥大においては、MGF はあまり重要な役割を果たさないことが示唆される。しかし、筋量の変化や中枢刺激における変化が生じた場合には、二次的に変動する可能性も残されており、今後検

討する余地があると思われる。

また骨格筋形成の *negative regulator* として機能することが知られている Myostatin の mRNA 発現についても検討を行った。Fig. 12 に示したように、SOL、EDL ともに有意な変化は見られなかった。このことは、Clenbuterol が筋成長を負に制御している Myostatin の発現には影響を及ぼさず、他の機構を介して筋肥大を誘発するというを示唆する。

Clenbuterol が Notch Signaling に及ぼす影響を調査するため、myoblast の増殖を強力に促進することが知られている Notch1、Notch の哺乳類のリガンドとして知られており筋分化過程に関与することが示唆されている Jagged1 と Delta-like1、Notch の細胞内ドメイン NICD(Notch Intracellular Cytoplasmic Domain)の核への移行を制御する調節因子として知られる Numb の mRNA 発現量についてそれぞれ検討を行った。Notch は現在4つの受容体 (Notch 1 ~ 4) が知られているが、筋の分化には Notch 1 が関与している。Fig. 13 に示したように、Notch1 については、SOL、EDL ともに有意な変化は見られなかった。Notch1 の活性化は myoblast の増殖をもたらすといわれているが¹²⁾、Clenbuterol は Notch1 の mRNA 発現においては影響しないことが示唆される。次に、Fig. 14 に示したように、Jagged1 について検討を行ったところ、SOL、EDL ともに有意な変化は見られなかった。Jagged1 に関しては Notch1 を介して筋原性分化を抑制するという報告がされている³¹⁾が、Clenbuterol は Jagged1 の mRNA 発現においても変化をもたらさないことが考えられる。また、Fig. 15 に示したように、Delta-like1 に関しては、SOL では変化が見られなかったものの、EDL では CLEB 群において有意な増加が観察された。Comboy らは、筋損傷が起こると Delta-like1 発現の急速な増加が起こり、それによって開始される Notch Signaling によって Satellite cell の活性化や細胞の運命に影響を与える¹¹⁾ことを報告しており、このことを考慮に入れると、今回の結果は Clenbuterol によって引き起こされる筋肥大において、Delta-like1 の増加による Satellite cell の

活性化や増殖が重要な役割を果たす可能性を示唆する。また Fig. 16 に示したように、Numb についても、SOL では変化が見られなかったが、EDL では CLEB 群において有意な増加が観察された。Numb による Notch シグナルの阻害は、増殖する細胞を cell cycle から出して筋原性の分化を引き起こすことが報告されており¹²⁾、このことから、Numb の増加による筋原性の分化の促進が、Clenbuterol の誘発する筋肥大に寄与している可能性が示唆される。また Table. 1 で示した筋湿重量において SOL よりも EDL で筋肥大の影響が強く見られたことも、EDL において Delta-like1 と Numb が増加するという結果と一致し、Delta-like1 と Numb の増加が Clenbuterol の誘発する筋肥大に関与するということを支持するものである。また、筋原性前駆細胞が増殖する際、Numb の不斉の局在が見られ、様々な細胞内 Numb レベルの細胞が産生されるということが報告されている¹²⁾。このことを考慮すると、Numb の上昇は筋芽細胞の増殖に伴って起こったものとも考えられるが、筋前駆細胞が増殖しているかどうかは本研究では検討していないので、これについては明言することはできない。これらをまとめると、Clenbuterol の投与により Delta-like1 の発現が増加し Notch Signaling が促進され、そのシグナルを受けた筋前駆細胞は増殖し、この増殖においては、様々な Numb 発現レベルの細胞が産生され、高い Numb レベルを有する細胞に関しては Notch Signaling を阻害することにより筋肉細胞への分化が促進され、低い Numb レベルを有する細胞に関しては再度 Notch Signaling を受けて増殖するという推論が考えられる。しかし、Numb 増加が制御されている仕組みはまだまだ不明である。この推論を簡単に表した模式図を Fig. 17 に示す。これは推測であり、この Notch Signaling に関してはまだ不明な点が多く、今後の研究課題であると考えられる。Fig.18 に筋形成のプロセスからとケガやトレーニングによる成熟した組織から satellite cell を介して肥大するプロセスをまとめた。またこのような細胞増殖のシグナルは前述した LDH 活性の増大とも関連しており、この薬物が骨格筋など特異的臓器にのみ作用するのであれば問題ないが、がん細胞の増殖の誘導

に關与する可能性もあり、注意深い検討が必要であると思われる。

本研究の結果より、Clenbuterol の誘発する筋肥大において、myogenin、Notch Signaling が關与する可能性が示唆された。しかし、この Clenbuterol のアナボリック作用に關与すると考えられる因子は多岐にわたっており、複雑な機構によって制御されていることが推察される。最近、PKA を介したアデニル酸シクラーゼシグナル伝達とその標的転写因子 CREB が Wnt による筋原性遺伝子発現に必要であるという報告がされている⁹⁾。分泌型糖タンパク質である Wnt ファミリーの特定メンバーの一部は、哺乳類の胚発生の際に筋発生決定因子である Pax3、MyoD、Myf5 遺伝子の誘導に關与するといわれている⁴³⁾。本研究では実施できなかったが、この CREB を介した PKA シグナル伝達による Wnt の筋発生の制御が、Clenbuterol の筋肥大作用に關与する可能性も考えられ、今後の興味深い検討課題である。Clenbuterol が誘発する筋肥大のメカニズムについては、まだまだ不明な点が多く残っており、詳細を明らかにするためには、これらを含めた様々な因子についての解析が必要であり、さらなる研究が必要であると考えられる。更に Notch 経路 (Notch pathway) は神経、造血、血管、体節などの様々な分化過程に關係し、ヒトを含め脊椎動物から節足動物まで多くの後生動物でよく保存された遺伝子調節 (シグナル伝達) 経路であり、Notch カスケードは Notch と Notch 受容体、それと核へ Notch シグナルを伝える細胞内タンパク質から成っている。哺乳類においては現在 5 種類のリガンドと 4 種類の受容体が発見されていて、Notch の受容体にリガンドが結合すると細胞表面の Notch タンパクはあるプロテアーゼに切断されて、細胞内ドメインが細胞質へ遊離して核内の CBF1 と結合することで、標的遺伝子の転写活性が行われると言われている。興味深い事に、Notch シグナリング経路は青春期に達すると新しい細胞の成長を抑制し、成人では神経ネットワークを安定にする。しかし、最近白血病の一種、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) と notch1 の協同するシグナル伝達経路が特定されるなどガン進行プロセスとの關係が明らかになり、薬物は骨格筋以外の組織への影響を

無視することが出来ない状況に成りつつある。従って、運動によるトレーニングの効果をもっと有用にするためには単なる薬物利用による筋肉組織の改善だけではなく自然な運動での変化と薬物による変化の違いを明らかにするなどの更なる努力が求められる時期に来ていると思われる。

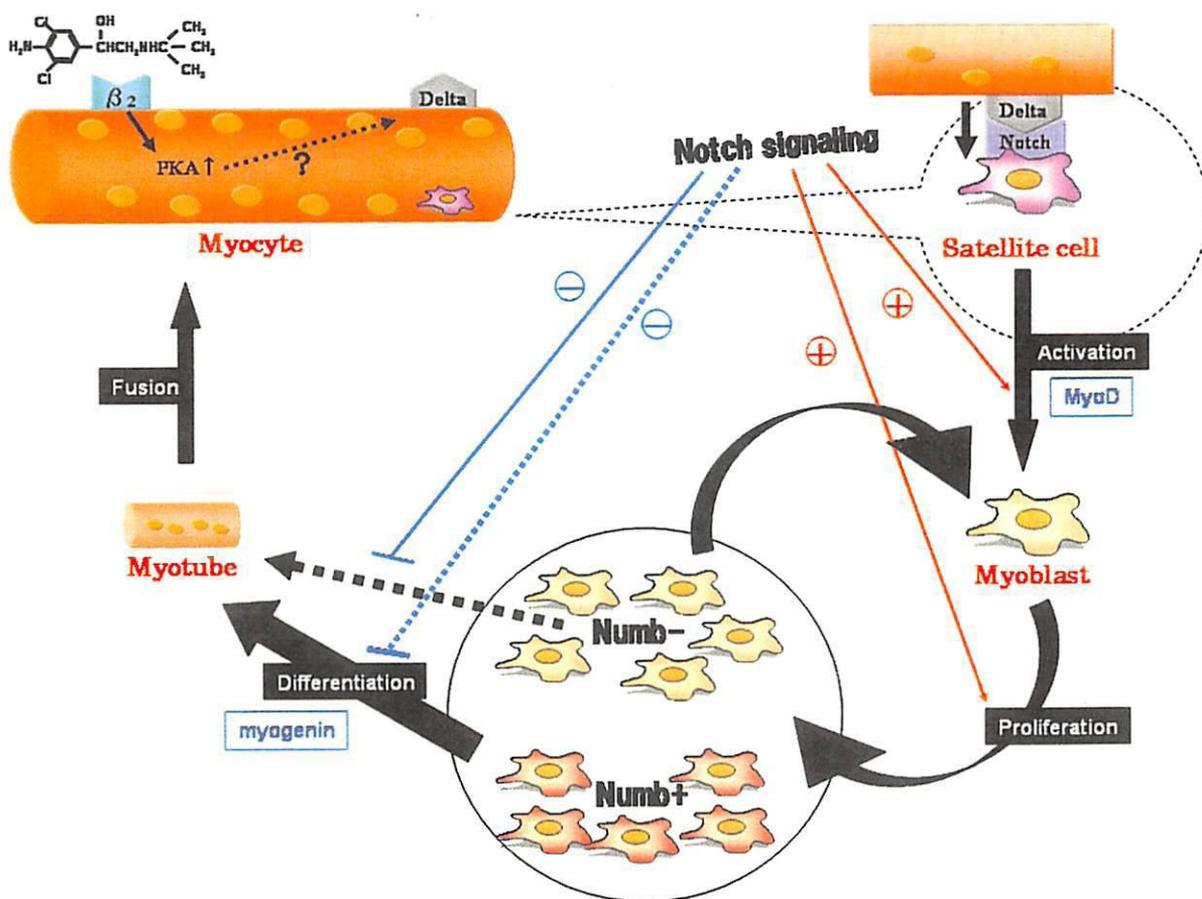


Fig. 17 The Speculation of Skeletal Muscle Hypertrophy via Notch Signaling by Clenbuterol Treatment

Scheme of skeletal muscle hypertrophy

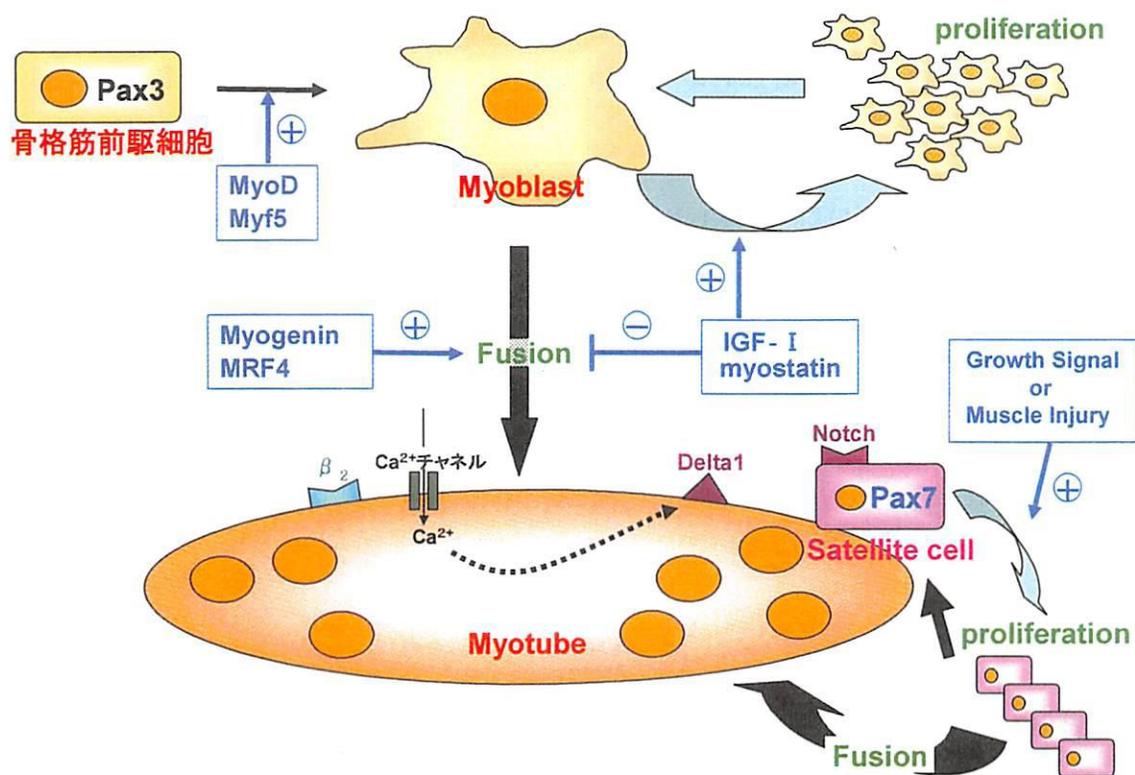


Fig. 18 The Scheme of Skeletal Muscle Hypertrophy

V 引用文献

- (1) Awede, B.L., Thissen, J.P., and Lebacqz, J. (2002) Role of IGF-I and IGF-BPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282(1): E31-37.
- (2) Barton, ER., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H.L. (2002) Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell. Biol.* 157(1):137-148.
- (3) Bates, P.C., and Pell, J.M. (1991) Action and interaction of growth hormone and the beta-agonist, clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *Br. J. Nutr.* 65(2):115-129.
- (4) Beckers, J., Clark, A., Wunsch, K., Hrabe, De. Angelis. M., and Gossler A. (1999) Expression of the mouse *Delta1* gene during organogenesis and fetal development. *Mech. Dev.* 84(1-2):165-168.
- (5) Benson, D.W., Foley-Nelson, T., Chance, W.T., Zhang, F.S., James, J.H., and Fischer, J.E. (1991) Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J. Surg. Res.* 50(1):1-5.
- (6) Buckingham, M. (2001) Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(4):440-448.

- (7) Busatto, V.C., Cunha, V., Cicilini, M.A., and Mill, J.G. (1999) Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32(3):355-360.
- (8) Cheema, U., Brown, R., Mudera, V., Yang, S.Y., McGrouther, G., and Goldspink, G. (2005) Mechanical signals and IGF-I gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* 202(1):67-75.
- (9) Chen, A.E., Ginty, D.D., and Fan, C.M. (2004) Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature.* 433(7023):317-322.
- (10) Colangelo, A.M., Mallei, A., Johnson, P.F., and Mocchetti, I. (2004) Synergistic effect of dexamethasone and beta-adrenergic receptor agonists on the nerve growth factor gene transcription. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 124(2):97-104.
- (11) Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2005) Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell. Cycle.* 2005 4(3):407-410.
- (12) Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2002) The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell.* 3(3):397-409.
- (13) Criswell, D.S., Powers, S.K., and Herb, R.A. (1996) Clenbuterol-induced

fiber type transition in the soleus of adult rats. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 74(5):391-396.

- (14) Cubria, J. C., Reguera, R., Balana-Force, R., Ordonez, C., and Ordonez, D. (1998) Polyamine-mediated heart hypertrophy induced by clenbuterol in the mouse. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:91-96.
- (15) Delday, M.I., and Maltin, C.A. (1997) Clenbuterol increases the expression of myogenin but not myoD in immobilized rat muscles. *Am. J. Physiol.* 272(5 Pt 1): E941-944.
- (16) Delfini, M.C., Hirsinger, E., Pourquie, O., and Duprez, D. (2000) Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development.* 127(23):5213-5224.
- (17) DeVol, D.L., Rotwein, P., Sadow, J.L., Novakofski, J., and Bechtel, P.J. (1990) Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am. J. Physiol.* 259(1 Pt 1):E89-95.
- (18) Diets, A A., and Lubrano, T. (1967) Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 20:246-257.

- (19) Dodd, S.L., Powers, S.K., Vrabas, I.S., Criswell, D., Stetson, S., and Hussain, R. (1996) Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 28(6):669-676.
- (20) Finney, P.A., Donnelly, L.E., Belvisi, M.G., Chuang, T.T., Birrell, M., Harris, A., Mak, J.C., Scorer, C., Barnes, P.J., Adcock, I.M., and Giembycz, M.A. (2001) Chronic systemic administration of salmeterol to rats promotes pulmonary beta(2)-adrenoceptor desensitization and down-regulation of G(s alpha). *Br. J. Pharmacol.* 132(6): 1261- 1270.
- (21) Goldspink, G. (2003) Gene expression in muscle in response to exercise. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 24(2-3):121-126.
- (22) Goldspink, G. (2005) Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37(10):2012-2022.
- (23) Hill, M., and Goldspink, G. (2003) Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J. Physiol.* 549(Pt 2):409-418.
- (24) Hinkle, R.T., Hodge, K.M., Cody, D.B., Sheldon, R.J., Kobilka, B.K., and Isfort, R.J. (2002) Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle. Nerve.* 25(5): 729-734.

- (25) Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M.C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. (2001) Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development*. 128(1):107-116.
- (26) Jungmann, R.A., Huang, D., and Tian, D. (1998) Regulation of LDH-A gene expression by transcriptional and posttranscriptional signal transduction mechanisms. *J. Exp. Zool.* 282(1-2):188-195.
- (27) Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., and Bass, J.J. (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome. Res.* 7(9):910-916.
- (28) Kim, Y.S., and Sainz, R.D. (1992) Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life. Sci.* 50(6):397-407.
- (29) Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277(51):49831-49840.
- (30) Lavoie, J. L., Calderone, A., and Beliveau, L. (2002) A farnesyltransferase inhibitor attenuated beta-adrenergic receptor downregulation in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282(1): R317-322.

- (31) Lindsell, C.E., Shawber, C.J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995) Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell*. 80(6):909-917.
- (32) MacLennan, P.A., and Edwards, R.H. (1989) Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates muscle beta-adrenoceptors to induce hypertrophy. *Biochem. J.* 264(2):573-579.
- (33) Maltin, C.A., Delday, M.I., Campbell, G.P., and Hesketh, J.E. (1993) Clenbuterol mimics effects of innervation on myogenic regulatory factor expression. *Am. J. Physiol.* 265(1 Pt 1):E176-178.
- (34) Martin, W.H. 3rd, Murphree, S.S., and Saffitz, J.E. (1989) Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. *Circ. Res.* 64(6):1096-1105.
- (35) McFadden, E.R., and Gilbert, I. A. (1994) Exercise-induced asthma. *N. Engl. J. Med.* 330:1362-1367.
- (36) McGraw, DW., and Liggett, S.B. (2005) Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function and regulation. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2(4): 292-96; discussion 311-312.

- (37) Mozdziak, P. E., Greaser, M. L., and Schultz, E. (1998) Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 84(4):1359-1364.
- (38) Mumm, J.S., and Kopan, R. (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228(2): 151-165.
- (39) Nishikawa, M., Mak, J.C., Shirasaki, H., Harding, S.E., and Barnes, P.J. (1994) Long-term exposure to norepinephrine results in down-regulation and reduced mRNA expression of pulmonary beta-adrenergic receptors in guinea pigs. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10(1): 91-99.
- (40) Pan, L. X., Xu, J.N., and Isaacson, P.G. (1991) Cellular H- and M-type lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and tumour diagnosis-an immunohistochemical assessment. *J. Pathol.* 163(1):53-60.
- (41) Park, I.H., Erbay, E., Nuzzi, P., and Chen, J. (2005) Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase activity and S6K1. *Exp. Cell. Res.* 309(1):211-219.
- (42) Petrashevskaya, N.N., Bodi, I., Rubio, M., Molkenkin, J.D., and Schwartz, A. (2002) Cardiac function and electrical remodeling of the calcineurin-overexpressed transgenic mouse. *Cardiovasc. Res.* 54(1):117-132.

- (43) Polesskaya, A., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003) Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*. 113(7):841-852.
- (44) Prather, I.D., Brown, D.E., North, P., and Wilson, J.R. (1995) Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med. Sci. Sports. Exerc.* 27(8): 1118-1121.
- (45) Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M., and Devesa, J. (2002) Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282(5):C993-999.
- (46) Rothwell, N. J., and Stock, M. J. (1987) Effect of a selective beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol) on energy balance and body composition in normal and protein deficient rats. *Biosci. Rep.* 7(12):933-940.
- (47) 佐藤厚志 (2004) mRNA から見たラット横紋筋に及ぼすクレンブテロールの影響【修士論文】
- (48) Seale, P., and Rudnicki, M. A. (2000) A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 218(2):115-124.

- (49) Semsarian, C., Wu, M. J., Ju, Y.K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D.G., Harvey, R.P., and Graham, R.M. (1999) Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. 400(6744):576-581.
- (50) Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. (1997) c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94(13):6658-6663.
- (51) Short, M.L., Huang, D., Milkowski, D.M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C.J., Chung, K.C., and Jungmann, R.A. (1994) Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. *Biochem. J.* 304 (Pt 2):391-398.
- (52) Siriett, V., Nicholas, G., Berry, C., Watson, T., Hennebry, A., Thomas, M., Ling, N., Sharma, M., and Kambadur, R. (2006) Myostatin negatively regulates the expression of the steroid receptor co-factor ARA70. *J. Cell. Physiol.* 206(1):255-263.
- (53) Song, Y.H., Godard, M., Li, Y., Richmond, S.R., Rosenthal, N., and Delafontaine, P. (2005) Insulin-like growth factor I-mediated skeletal muscle hypertrophy is characterized by increased mTOR-p70S6K signaling without increased Akt phosphorylation. *J. Investig. Med.* 53(3):135-142.

- (54) Tsunekawa, N., and Kitaura, T. (2000) Effect of drinking administration of clenbuterol on SOL and EDL of mice. *Jpn. J. Fitness Sports. Med.* 49(1):149-156
- (55) 常川直子 (2000) ラット骨格筋及び心筋における乳酸代謝と MyoHC isoform に対するクレンブテロールの影響【修士論文】
- (56) Tsunekawa, N., Kitaura, T., and Kremer, W.J. (2002) Inhibited longitudinal growth of bones in young male rats by clenbuterol. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 34(2):267-273
- (57) van, der. Velden. J.L., Langen, R.C., Kelders, M.C., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M., and Schols, A.M. (2006) Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3{beta} activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290(2):C453-462.
- (58) Wahlander, H., Isgaard, J., Jennische, E., and Friberg, P. (1992) Left ventricular insulin-like growth factor I increases in early renal hypertension. *Hypertension.* 19(1):25-32.
- (59) Wakamatsu, Y., Maynard, T.M., Jones, S.U., and Weston, J.A. (1999) NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron.* 23(1):71-81.

- (60) Wallukat G. (2002) The beta-adrenergic receptors. *Herz.* 27(7): 683-690.
- (61) Walsh, F.S., and Celeste, A.J. (2005) Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 6):1513-1517.
- (62) Wittenberger, T., Steinbach, O.C., Authaler, A., Kopan, R., and Rupp, R.A. (1999) MyoD stimulates delta-1 transcription and triggers notch signaling in the *Xenopus* gastrula. *EMBO. J.* 18(7): 1915-1922.
- (63) Wong, K., Boheler, K.R., Bishop, J., Petrou, M., and Yacoub, M.H. (1998) Clenbuterol induces cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features. *Cardiovasc. Res.* 37(1):115-122.
- (64) Wu, Z., Jin, H., and Gu, Y. (2002) The effect of MyoD family proteins on muscular atrophy induced by brachial plexus injury in rats. *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* 82(8):561-563.
- (65) Yimlamai, T., Dodd, S. L., Borst, S. E., and Park, S. (2005) Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Appl. Physiol.* 99(1):71-80.
- (66) Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G., and Tulliez, J. (1998) Metabolism of clenbuterol in rats. *Drug. Metab. Dispos.* 26(9):891-899.

- (67) Zecchin, E., Conigliaro, A., Tiso, N., Argenton, F., and Bortolussi, M. (2005) Expression analysis of jagged genes in zebrafish embryos. *Dev Dyn.* 233(2):638-645.

第3章 まとめ

本研究では、ドーピング規制対象薬に指定されている Clenbuterol を成長期の雄ラットに投与し、骨格筋肥大作用について mRNA レベルから検討を行った。得られた結果は次の通りである。

- (1) SOL、EDL、心臓において筋湿重量の有意な増加が認められた。また、EDL、心臓においては、体重比においても有意な増加が認められた。
- (2) 代謝特性に及ぼす影響に関しては、SOL における LDH アイソザイムの LDH-M 型の増加が観察された。また、LDH 活性においては SOL、EDL ともに有意な変化は見られなかった。Clenbuterol 投与により SOL において特異的に無酸素的解糖系の代謝の促進が考察され、乳酸代謝の速筋型化が起こっているものと考えられた。
- (3) Clenbuterol 投与により、 β_2 -adrenoceptor の mRNA 発現の減少が見られ、down regulation が起こっているものと考察された。
- (4) Clenbuterol 投与の MyoD family への影響については、MyoD の mRNA 発現の SOL における増加が観察された。また Myogenin に関しては SOL、EDL ともに有意な増加が観察された。
- (5) Clenbuterol 投与の骨格筋成長に関与する因子への影響については、IGF、MGF の mRNA 発現はいずれも SOL、EDL ともに変化が見られなかった。また、Myostatin の mRNA に関しても SOL、EDL ともに変化が見られなかった。
- (6) Clenbuterol 投与の Notch Signaling への影響については、Notch1、Jagged1 の mRNA 発現は SOL、EDL ともに変化が見られなかった。しかし、Delta-like1、Numb の mRNA 発現はともに SOL では変化が見られなかったものの、EDL においては有意な増加が見られた。

遅筋である SOL よりも速筋である EDL において筋肥大の影響が強く見られたことから、Clenbuterol の筋肥大作用においては、 β_2 -receptor を介した直接的な作用だけでは説明がつかず、それとは異なった他の因子の生成を介する可能性が示唆される。本研究の結果より、Clenbuterol の誘発する筋肥大においては Delta-like1 の増加に引き続く Notch Signaling の増大と Numb の増加による筋分化の促進が関与することが示唆された。また、myogenin においても Clenbuterol の筋肥大作用に寄与する可能性が考察された。MyoD に関しては筋肥大よりも速筋化において重要な役割を果たしているように考えられる。IGF-1 においては、Clenbuterol の筋肥大作用に寄与する可能性も捨てきれないが、その寄与はあまりないと思われる。MGF、Myostatin の mRNA 発現に関しては、Clenbuterol 投与による影響はほぼないと考えられ、筋肥大作用に寄与する可能性も低いと考察される。また、心肥大が起こるといったことから、体に悪影響をもたらすことが考えられ、筋肥大を目的に Clenbuterol をドーピング目的で安易に用いることは、危険であると考えられる。

Clenbuterol が誘発する筋肥大のメカニズムについては、まだ不明な点が多く残っており、詳細を明らかにするためには、従来から言われている Pax3 や Pax7 の動態だけでなく最近報告された Wnt による筋分化の制御を含めたその他の様々な因子についての解析とトレーニングによる筋肥大との違いを詳細に検討するためにさらなる研究が必要であると考えられる。

謝辞

本研究は数多の皆様のご協力を頂いて実施することができました。厚く御礼申し上げます。特に、金沢大学自然科学研究科 辻 彰 教授、金沢大学医学部附属病院薬剤部 宮本 謙一 教授、北海道医療大学薬学部 小林 大祐 助手、ならびに大学院生の松本 健太郎君（現、大塚製薬 修士）、病院薬剤部の駒谷 直子さん、山下 真理子さんの多大な援助を受けました。ここに記して謝意を表します。