

## 遅発性筋痛症におけるアポトーシスと小胞体ストレスの関与

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学

(旧講座：整形外科)

(主任：土屋弘行教授)

高 橋 竜 平

遅発性筋痛症 (delayed onset muscle soreness, DOMS) は運動から1~2日後に生じる筋の不快感であり、その原因として筋損傷や炎症などの諸説があるが、一定の見解は得られていない。今回遅発性筋痛症の原因を考えるにあたり、筋損傷によるアポトーシスに着目した。またアポトーシスの誘因の1つである小胞体ストレスは、過剰な活性化によりアポトーシスを誘導すると報告されている。しかし、これまでDOMSとアポトーシス及び小胞体ストレスとの関係については報告がない。本研究の目的は、ラットの高負荷遠心性運動を行い、筋細胞のアポトーシスを確認し、小胞体ストレスとDOMSの関係を検討することである。ラットに小動物用トレッドミルを用いて、下り坂走による運動を負荷した。下り坂走による運動負荷は、下り傾斜15°、速度20m/minで5回繰り返した。このモデルでは、後肢の大腿四頭筋が遠心性運動となる。コントロール (C群; N=5)、運動負荷直後 (E0群; N=5)、24時間後 (E1群; N=5)、48時間後 (E2群; N=5)、72時間後 (E3群; N=5)、7日後 (E7群; N=5) にそれぞれ大腿四頭筋を採取し、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) 染色を行い、アポトーシスを評価した。またDOMSと小胞体ストレスとの関係をGRP78 (78-kDa glucose-regulated protein) とCHOP/GADD (C/EBP homologous protein/growth arrest- and DNA damage-inducible gene) 153のmRNAレベルの変化を指標に評価した。その結果アポトーシスは、48時間後にピークとなり、7日後に正常レベルに低下した。一方GRP78ならびに、CHOP/GADD153のmRNAレベルは、アポトーシスの変化と同様に、48時間後にピークとなり、7日後に正常レベルに低下した。以上の結果からDOMSにおいて筋のアポトーシスが起ることがわかり、小胞体ストレスがアポトーシスへの誘因の1つとして働いている可能性が考えられた。

**Key words** delayed onset muscle soreness, muscle injury, apoptosis, endoplasmic reticulum stress

不慣れな運動後、あるいは激しい運動後の筋肉の不快感にはスポーツ選手だけでなく、一般的な運動後にも発生する。その不快感には運動後24時間で増加し、24~72時間でピークに達し、5~7日程度で消えると報告されている<sup>1)</sup>。この運動後の現象は遅発性筋痛症 (delayed onset muscle soreness, DOMS) と呼ばれている<sup>2)</sup>。日常で非常によく遭遇するスポーツ障害の1つであり、時としてスポーツ活動の中止を余儀なくされることも少なくない。また近年、中高年層における生涯スポーツの普及により、スポーツ活動に取り組む人が増加しており、いかにしてDOMSの予防を行うかがスポーツ整形外科の取り組むべき重要な課題となっている。

これまでにスクワッティング、ランディングやダウンヒルランニングなどの高負荷遠心性運動がDOMSを引き起こすと報告されている<sup>3) 4)</sup>が、その発生原因などは様々な説がある。これまでわかっているDOMSの発生メカニズムの1つとして、繰り返す筋の遠心性収縮などのメカニカルストレスにより筋損傷が生じ、炎症反応や酸化ストレスなどによってDOMSを引き起こすと報告されている<sup>5) 6)</sup>。運動ストレスによる筋損傷に関しては、筋繊維に対して部分的な損傷を誘発し、筋核、細胞質の融解や除去を引き起こし、その結果アポトーシスになると報告されている<sup>7) 8)</sup>。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

平成25年10月11日受付、平成25年12月17日受理

Abbreviations: CHOP/GADD, C/EBP homologous protein/growth arrest- and DNA damage-inducible gene; DOMS, delayed onset muscle soreness; GRP78, 78-kDa glucose-regulated protein; ROS, reactive oxygen species; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling; UPR, unfolded protein response

ーシス小体の形成を過程とする細胞死形態と定義されており<sup>8)</sup>、筋損傷においては修復過程の1つと考えられている<sup>9)</sup>。しかしいずれも DOMS 以外のモデルでの報告であり、DOMS においてアポトーシスとの関係を示した報告はない。そこで本実験ではまず、DOMS 発生メカニズムにおいてアポトーシスが関与しているかを検討した。

一方 Ogata ら<sup>10)</sup>は老齢ラットにおいて、筋萎縮ではアポトーシスが起これ、その誘因として小胞体ストレスが関与していると報告した。小胞体内では、タンパク質分泌機能を正常に保つために、分泌されたタンパク質が正常に折りたたまれ、異常な折りたたみ構造となってしまうタンパク質を除去・分解する機能が行われている。しかしこの折りたたみ機構が破綻した場合や、過剰なタンパク質が小胞体内に送り込まれた場合などには、このバランスが崩れ、異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積される<sup>11)</sup>。この状態が小胞体ストレスと定義されている<sup>12)</sup>。小胞体ストレスというバランスの崩れた状態を解消するために、細胞は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response, UPR) と呼ばれる細胞内情報伝達経路を活性化させる<sup>13) 14)</sup>。UPRの活性化により、まずはタンパク質の容量の増加を図るが、小胞体ストレスの状態が続くと、UPRは恒常性維持からアポトーシスの促進へと変わる。UPRのアポトーシス誘導への経路としては、主に3経路が報告されている<sup>15)</sup>。1つ目は転写活性化遺伝子である CHOP/GADD (C/EBP homologous protein/growth arrest- and DNA damage-inducible gene) 153 産生経路で、2つ目は UPR の中心的な調節分子である IRE1 が関連し、TRAF2 と ASK1 の複合体によって活性化される JNK 経路である。3つ目は小胞体関連因子の caspase-12 の活性化経路である。ただし、ヒトではこの caspase-12 は欠損している。この中で CHOP/GADD153 は、増殖停止や DNA 損傷誘導性遺伝子として知られており、caspase 経路の活性化を介在して、アポトーシス産生を起こすと報告されている<sup>15)</sup>。また分子シャペロンは、他の蛋白質分子が正しい折りたたみをして機能を獲得するのを助ける蛋白質の総称である。分子シャペロンには多くの種類があるが、小胞体ストレスが負荷されたときに特異的に発現が誘導される分子シャペロンの1つが GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein) であり、GRP78 の発現量は UPR の指標となる<sup>1) 16)</sup>。これまでに代謝性疾患、腫瘍や脳神経疾患などで様々な小胞体ストレスの関与が報告されており<sup>15) 17) 18)</sup>、筋疾患に関しても、前述のように Ogata ら<sup>10)</sup>が筋萎縮にアポトーシスと小胞体ストレスの関係を報告している。しかし DOMS モデルでは小胞体ストレスとの関係を示した報告はなく、今回 DOMS モデルでもアポトーシスが起これるのなら、その誘因に小胞体ストレスが関与しているのではと仮説した。

そこで本研究の目的は、DOMS におけるアポトーシ

スの関与を、アポトーシスとなった細胞の特徴の1つであるクロマチン DNA を組織化学的に検出する TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) 染色を用い確認することと、そこに小胞体ストレスがその誘因として関与しているかを、小胞体ストレス関連因子である GRP78 と小胞体ストレスシグナル経路の1つである CHOP/GADD153 を用いて検討することである。

### 【対象および方法】

すべての動物実験は金沢大学動物実験委員会の承認を受け、ガイドラインに従い実施した。(平成22年6月10日承認、承認番号：AP-122501「ラット遅発性筋痛症モデルにおける小胞体ストレスの関係」)

#### I. 実験動物

被験動物には生齢7週齢の雌のウイスター系ラット (n=30, 体重170-210g) を用い、12時間ごとに明暗を与え、22±2℃で設置された部屋で飼育を行い、十分な水分と食料の補給を行った。30匹のラットをコントロール群 (C群：N=5) と高負荷遠心性運動を行った群 (E群：N=25) に分けた。ダウンヒルランニングによってラット後肢の大腿四頭筋が DOMS モデルとなると報告があり<sup>19)</sup>、これを高負荷遠心性運動とし、両後肢の大腿四頭筋をそれぞれ採取した。またダウンヒルランニングには、走行速度と傾斜角を変えることのできる小動物用トレッドミル (室町機械社製、Treadmill for rats and mice Model MK680, 東京) を使用した (図1)。ただし同機種はアップヒルランニングのみの設定が可能であり、ダウンヒルランニングにはジャッキアップ用のデバイスを使用し、同機種の後方部分を挙上して行った。DOMS モデルにおけるダウンヒルランニングは、Armstrong の方法に準じて<sup>19)</sup>、傾斜15°、走行速度20m/分、走行時間30分×5回の150分で行い、各クールの間には30分の休憩を設けた。なおトレッドミル後方に設置された電気刺激装置を利用し、ラットが規定の運動速度より遅れた場合にはラットの尾部に電気刺激を加えて走行を促した。E群は運動負荷直後 (E0群：N=5)、運動後24時間後 (E1群：N=5)、運動後48時間後 (E2群：N=5)、運動後72時間後 (E3群：N=5) と運動後7日後 (E7群：N=5) に分け、大腿四頭筋を採取した。屠殺に関しては、吸入麻酔 (ジエチルエーテル) とペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し、深麻酔で安楽死させ大腿四頭筋を採取した。大腿四頭筋は、右後肢を TUNEL 染色に用いるため、採取後10%ホルマリン溶液で固定し、脱灰後パラフィン処理を行い、左後肢を GRP78 と CHOP/GADD153 の mRNA 定量に用いるために、液体窒素で凍結させた。

#### II. アポトーシスの検出

アポトーシス核の組織化学的検出には、In Situ 細胞死検出キット (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein) (Cat. No.1684795; Roche IN) を用いて TUNEL 染色を行



Fig. 1. Appearance of the treadmill test for rats. The velocity and inclination of the treadmill are variable.

った。パラフィン処理後の組織を脱パラフィン化し、エタノールと蒸留水での希釈系列で親水化して、21～37℃で15～30分間、プロテナーゼKでインキュベートした。PBSで2回洗浄し、乾燥後TUNEL反応液を加え、暗室で37℃60分間インキュベートした。再びPBSで2回洗浄し、抗退色剤で封入した。対比染色にはDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) を用いて行った。ラット大腿四頭筋の横断面におけるアポトーシス陽性核の数の割合を、動物1匹あたり3切片から200倍の倍率で、無作為に選んだ計5視野について蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-900, キーエンス, 大阪) を用いてカウントし、5匹の動物について分析した。

### Ⅲ. 小胞体ストレスシグナル活性化の検出

採取した組織を液体窒素で凍結させ、粉々に砕き、RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社, 東京) を加えホモ

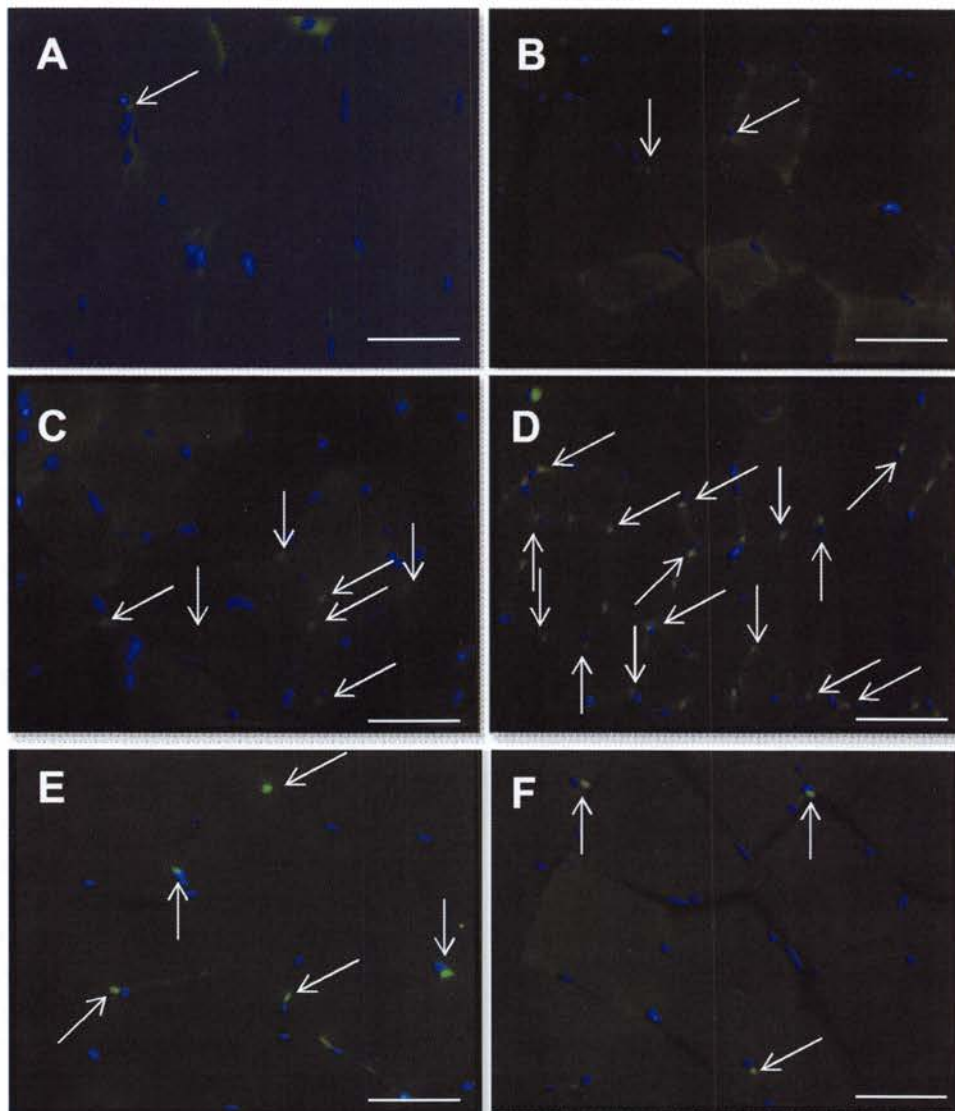


Fig. 2. Distribution of apoptotic nuclei in quadriceps femoris muscle. (A) Control. (B) Immediately after downhill running. (C) 24 hours after downhill running. (D) 48 hours after downhill running. (E) 72 hours after downhill running. (F) 7 days after downhill running. Scale bar = 50  $\mu$ m. Apoptotic nuclei (arrows) are stained green with TUNEL. TUNEL-negative nuclei appear blue with DAPI staining.

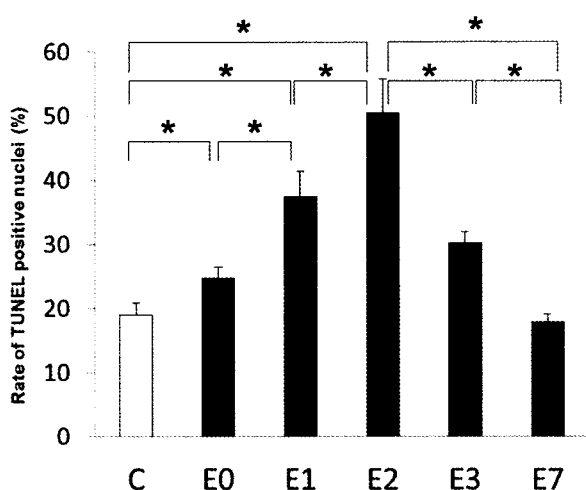


Fig. 3. Apoptotic change in nuclei in quadriceps femoris muscle as evaluated by TUNEL. The rate of TUNEL-positive nuclei in E2 was significantly higher than in C (\* $P < 0.05$ ), and returned to the same level as C in E7.

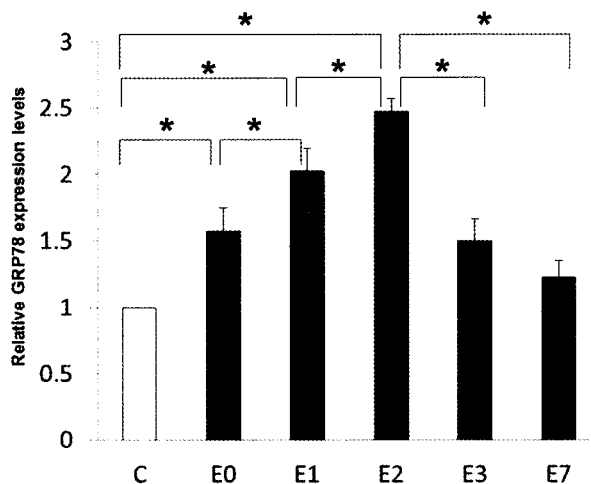


Fig. 4. Change in the activation status of ER stress signaling in quadriceps femoris muscle as evaluated by GRP78 mRNA expression levels. The expression level of GRP78 mRNA in E2 was significantly higher than in C (\* $P < 0.05$ ), and returned to the same level as C in E7.

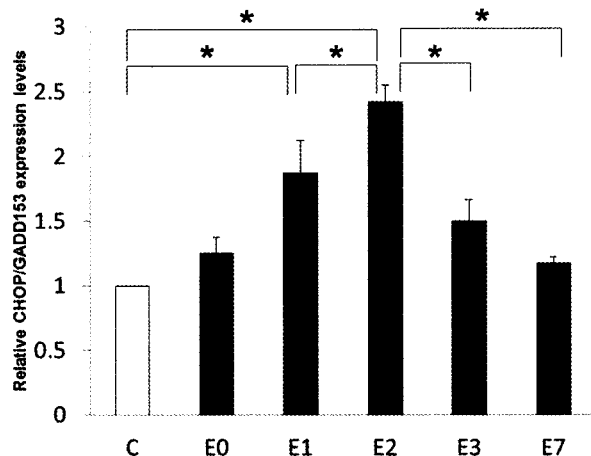


Fig. 5. Change in the activation status of ER stress signaling in quadriceps femoris muscle as evaluated by CHOP mRNA expression levels. The expression level of CHOP/GADD153 mRNA in E2 was significantly higher than in C (\* $P < 0.05$ ), and returned to the same level as C in E7.

ジナイズした。全RNAはRNase-free水を溶解し、繰り返し遠心分離器で抽出し、分光光度測定法で定量化した。その後Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems, Foster) を用いて、逆転写を行った。定量的PCRはABI Step One (ライフテクノロジーズ, 東京) を用い、製造者の説明書に従って行った。プライマーはGADD 153 (sc-7351, Santa Cruz Biotechnology Dallas) と GRP 78 (sc-13539; Santa Cruz Biotechnology Dallas) を使用した。筋組織中のGRP78とCHOP/GADD153のmRNAのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) mRNAに対する相対的発現をすべての実験で検量線法を用い、5匹の動物について分析した。

IV. 統計

本実験での定量的結果は、平均値±標準偏差 (SD) (N=5) として表記した。群間比較には一元分散分析法 (One-way ANOVA) を用いて、その後の2群間の検定をTukey-Kramer法を用い検討した。5%以下の危険率 (P値) を有意水準とした。

【結 果】

I. 大腿四頭筋におけるアポトーシスの誘導

それぞれC群, E0群, E1群, E2群, E3群とE7群 (図2A-F) と、大腿四頭筋におけるTUNEL染色による断片化DNA核を観察した。各断面におけるアポトーシス陽性核の割合は、運動後徐々に増加をし、E2群 (50.5 ± 5.3%) でピークとなり、C群 (19 ± 1.8%) と有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。その後、徐々に陽性核の割合は低下し、E7群 (18 ± 1.2%) ではC群とほぼ同じ割合となった (図3)。

II. 大腿四頭筋における小胞体ストレス関連シグナルの活性化

小胞体ストレス時に活性化するシグナルである、GRP78とCHOP/GADD153の発現レベルを図4に示した。GRP78のmRNAの発現量は、運動後徐々に増加をし、E2群 (2.5 ± 0.1) でピークとなり、C群 (1.0 ± 0.1) と有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。その後、徐々に発現量は低下し、E7群 (1.2 ± 0.1) ではC群とほぼ同じ発現量となった (図4)。

CHOP/GADD153のmRNAの発現量も同様に、運動後徐々に増加をし、E2群 (2.4 ± 0.1) でピークとなり、C群 (1.0 ± 0.1) と有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。その後、徐々に発現量は低下し、E7群 (1.2 ± 0.1) ではC群とほぼ同じ発現量となった (図5)。

【考 察】

DOMSの発生メカニズムについては、これまで筋痙攣、筋損傷、炎症や活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) などとの関連が報告されている<sup>1) 20) 21)</sup>。特に筋損傷に関しては、遠心性運動後に顕微鏡でZ-lineでの筋繊維の分裂やより広がったサルコメア構造の分裂を認めた

と報告されており<sup>2)</sup><sup>22)</sup>, また血清CKにおいても筋組織の分裂に相関して, 増加を認めたと報告されている<sup>23)</sup>. しかしこれらは遠心性運動後48時間までの報告が多く, 3~6日後での報告では意見の相違を認める<sup>23)</sup>-<sup>25)</sup>. それゆえ, 遠心性運動後早期では筋損傷そのものは起こっているが, その後のメカニズムははっきりしていない. 運動ストレスによる筋損傷に関しては, Sandriら<sup>7)</sup>がアポトーシスと関係を初めて報告した. 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1つであるDNAの断片化が有意に増加していることを示した. また Podhorska-Okolowら<sup>8)</sup>が同モデルを用いた研究で, DNA断片化を同定するTUNEL染色法と電子顕微鏡を用いて, 運動直後と6時間後の筋組織で, アポトーシスの有意な増加を報告した. この際に, アポトーシス抑制タンパク質Bcl-2の発現が運動後96時間まで減少し, 一方促進タンパク質Baxが運動後96時間まで継続して増加していると報告した. つまり筋損傷ではアポトーシスにより筋の再生を促していると考えられる. DOMSの不快感が運動後24時間から始まり, 24~72時間でピークとなり, 7日で消失するという経過の特徴から, DOMSにおいてもアポトーシスが関与しているのではと考えた.

本実験では, DOMSとアポトーシスとの関係を確認するために, TUNEL染色で確認した. その結果, TUNEL染色ではアポトーシス核の割合が運動後2日後にピークとなり, その後徐々に低下し, 運動後7日目にはコントロール群と同等になった. これは, これまでわかっているDOMSの不快感の経過<sup>1)</sup><sup>2)</sup>と矛盾しない結果となった. 今後, サルコメア構造の顕微鏡的検査, 血清CKやBcl-2やBaxといった他のアポトーシス関連因子などを評価することでDOMSの筋損傷からアポトーシスへのより詳しい流れが解明できると考えられる.

小胞体ストレスはアポトーシスの誘導への重要な調整機構の1つである. またUPRは小胞体ストレスシグナルであり, 小胞体ストレスが生じてUPRが正常に機能している限り, 細胞はタンパク質の恒常性が保たれるため, 小胞体ストレスは細胞毒性を生じない. しかしUPRが機能しない状態, つまりアポトーシス関連因子が活性化してしまった場合, 細胞は不可逆な障害を受けて死に至る<sup>11)</sup>. アポトーシスを誘導する因子の1つとして, CHOP/GADD153がある. Songら<sup>26)</sup>はCHOP遺伝子をノックアウトすると, 種々の小胞体ストレス動物モデルにおいて糖尿病の症状が軽減されたと報告しており, CHOP遺伝子がアポトーシスの促進に重要な働きを担っていると考えられた. Ogataら<sup>10)</sup>は老化骨格筋において, 筋萎縮の進行にアポトーシスが起り, その誘因として小胞体ストレス時に活性化するシグナルであるGRP78, caspase-12, CHOP/GADD153が関与していること報告している. 筋萎縮と筋損傷では発生メカニズムの違いはあるが, 同様にアポトーシスが起っていると

すれば, DOMSにおいても不快感の経過と関連して, UPRの機能が働いているのではと考えた. そこで本実験においてもGRP78とCHOP/GADD153のmRNAの発現量を評価したところ, 運動後2日でmRNAの発現量がピークとなり, その後徐々に発現量も低下し, 運動後7日目でコントロール群とほぼ同等になった. この結果も, DOMSの不快感の発現<sup>1)</sup><sup>2)</sup>と同様な経過をたどった. GRP78やCHOP/GADD153がUPRのマーカーであることから, DOMSにおいて小胞体ストレスがアポトーシスへの誘因の1つとして働いている可能性が考えられた.

最後にDOMSの予防法については, これまでに低負荷遠心性トレーニングによってメカニカルストレスを軽減させること<sup>5)</sup>や, 温熱ストレスによりストレス軽減因子を増加させること<sup>6)</sup>などが報告されている. 特に, 温熱ストレスによる予防法は, あらかじめ温熱ストレスを誘発させ, 耐性をつけるというプレコンディショニングの機能を利用して行っている. 今後これを応用してUPRを誘導させる小胞体ストレス関連分子の機能を評価することで, DOMSの発生メカニズム及び予防法について, さらなる解明が期待できると考えた.

## 【結 論】

ラットでの今回の実験から, DOMSにおいてアポトーシスの関与が確認され, さらに小胞体ストレスがアポトーシスの発現に関与している可能性が考えられた.

今後, アポトーシスを抑制する, すなわち小胞体ストレスの機能をコントロールすることにより, DOMSの予防につながると考えられた.

## 【謝 辞】

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました恩師土屋弘行教授に深甚の謝意を捧げると共に, 終始直接の御助言と多大なる御指導をいただきました金沢大学整形外科 中瀬順介助教に深謝いたします. さらに本研究の遂行に際し, 多大なる御協力と御助言を頂きました金沢大学医薬保健研究域医学系神経分子標的学 堀修教授に深く御礼を申し上げます.

## 文 献

- 1) Cheung K, Hume P, Maxwell L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. *Sports Med* 33(2): 145-164, 2003
- 2) Armstrong RB. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscle soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 16(6): 529-538, 1984
- 3) Stauber WT. Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev* 17: 157-185, 1989
- 4) Nosaka K, Clarkson PM. Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 27(9): 1263-1269, 1995
- 5) Maruhashi Y, Kitaoka K, Yoshiki Y, Nakamura R, Okano A, Nakamura K, Tsuyama T, Shima Y, Tomita K. ROS scavenging activity and muscle damage prevention in eccentric exercise in rats. *J Physiol Sci* 57(4): 211-216, 2007

- 6) Shima Y, Kitaoka K, Yoshiki Y, Maruhashi Y, Tsuyama T, Tomita K. Effect of heat shock preconditioning on ROS scavenging activity in rat skeletal muscle after downhill running. *J Physiol Sci* 58(5): 341-348, 2008
- 7) Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolow M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 372(2): 291-295, 1995
- 8) Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(6): 518-531, 1998
- 9) Collins RJ, Harmon BV, Souvlis T, Pope JH, Kerr JF. Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. *Br J Cancer* 64(3): 518-522, 1991
- 10) Ogata T, Machida S, Oishi Y, Higuchi M, Muraoka M. Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. *Mech Ageing Dev* 130: 328-336, 2009
- 11) Siu PM, Tam EW, Teng BT, Pei XM, Ng JW, Benzie IF, Mak AF. Muscle apoptosis is induced in pressure-induced deep tissue injury. *J Appl Physiol* 107: 1266-1275, 2009
- 12) Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529, 2007
- 13) Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H, Yura T. Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 9912-9920, 1998
- 14) Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-1233, 1999
- 15) Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11: 381-389, 2004
- 16) Vattemi G, Engel WK, McFerrin J, Askanas V. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle. *Am J Pathol* 164(1): 1-7, 2004
- 17) Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 7: 335-345, 2002
- 18) Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Tamatani T, Taniguchi M, Koyama Y, Katayama T, Tohyama M, Stem DM, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes to Cells* 9: 457-469, 2004
- 19) Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54(1): 80-93, 1983
- 20) Cleak MJ, Eston RG. Delayed onset muscle soreness: mechanisms and management. *J Sports Sci* 10(4): 325-341, 1992
- 21) Gulick DT, Kimura IF, Sitler M, Paolone A, Kelly JD. Various treatment techniques on signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. *J Athl Train* 31(2): 145-52, 1996
- 22) Friden J, Lieber RL. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 24(5): 521-530, 1992
- 23) Lieber RL, Friden J. Morphologic and mechanical basis of delayed onset muscle soreness. *J Am Acad Orthop Surg* 10(1): 67-73, 2002
- 24) Cleak MJ, Easton RG. Muscle soreness, swelling, stiffness and strength loss after intense eccentric exercise. *Br J Sports Med* 26(4): 267-272, 1992
- 25) Newham DJ, Jones DA, Edwards RH. Large delayed plasma creatine kinase changes after stepping exercise. *Muscle Nerve* 6(5): 380-385, 1983
- 26) Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 8(3-4): 517-528, 2006

**Involvement of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in delayed onset muscle soreness** Ryohei Takahashi, Department of Restorative Medicine of Musculoskeletal System, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Juzen Med. Soc., **122**, 102 – 108 (2013)

**Key words** delayed onset muscle soreness, muscle injury, apoptosis, endoplasmic reticulum stress

#### Abstract

Delayed onset muscle soreness (DOMS) is characterized by muscular discomfort that develops 1-2 days after exercise. It is thought to be caused by muscle injury and inflammation, and reactive oxygen species are also considered to be involved, but no consensus has yet been reached. Therefore, in this study, we focused the role of apoptosis in muscle injury. The apoptosis cascade consists of a range of different pathways, in which endoplasmic reticulum (ER) stress has been reported to induce apoptosis as a result of overactivation. The relationship between muscle injury and apoptosis has not been previously reported. The objective of this study was to investigate the cause of muscle injury and to detect the presence of apoptosis in rats after high-intensity exercise and investigate its association with ER stress. Wistar rats were made to exercise by downhill running on a small animal treadmill. The exercise challenge consisted of five repetitions of a downhill run along a downward slope of 15° at 20 m/min. Quadriceps femoris muscles (N=30) were harvested from rats in a control group (C: N=5); immediately after exercise (E0: N=5); and on hours 24 (E1: N=5), 48 (E2: N=5), 72 (E3: N=5), and days 7 (E7: N=5) after exercise. Apoptosis was evaluated by TUNEL staining. The association of exercise with ER stress was evaluated by RT-PCR analysis of the GRP78 and CHOP/GADD153 mRNA. Apoptosis expression peaked at E2 compared to C, and was almost equivalent to C on E7. Similarly, the levels of GRP78 and CHOP/GADD153 mRNA also peaked at E2 and were almost equivalent to C at E7. Our results suggest that apoptosis is involved in DOMS, and it is at least partly induced by ER stress, which provide one possible explanation of the pathology of DOMS.