

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500628

研究課題名（和文） ドーピング規制薬物（アドレナリン受容体作動薬）の影響における分子機構の解明

研究課題名（英文） Research of the molecular mechanism in effects of doping drugs (adrenergic agonists)

研究代表者

北浦 孝（KITAURA TAKASHI）

金沢大学・保健管理センター・准教授

研究者番号：00143868

研究成果の概要（和文）：ドーピング規制薬物である喘息治療薬の $\beta_2$ アドレナリン受容体作動薬の影響を解明するために、クレンプテロールの鏡像異性体の(+)-S-体と(-)-R-体を用いて、遺伝子及び蛋白質レベルで検討を行った。その結果、心臓と骨格筋の筋肥大を誘発するが受容体の少ない速筋への作用が大きく、核内転写調節因子の発現が筋によって異なること及び蛋白質の結果が mRNA の結果と同期しないことや(+)-S-体が骨の成長を強く抑制することを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Clenbuterol (CLE) is one of the beta-2 adrenergic receptor agonists with powerful muscle anabolic and lipolytic effects and is prohibited to use as doping drug for athletes. It is manufactured as a 1:1 racemic mixture of two enantiomers, (-)-R and (+)-S isomers.

The both enantiomers induced the increased cardiac and skeletal muscles mass. Particularly, fast-twitch extensor digitorum longus muscle having less beta-2 adrenergic receptor was affected more strongly. The expression of MyoD mRNAs by enantiomers was different between fast and slow-twitch muscles, but the results in proteins were not synchronized with the changes of mRNAs. Furthermore, the (+)-S isomer strongly inhibited the femurs and tibiae bones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：スポーツ生命科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ スポーツ科学

キーワード：ドーピング，筋肥大，シグナル伝達，アドレナリン受容体，薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

2008年（平成20年）中国で北京オリンピックが開催され、ハンマー投げでドーピング問題が話題となった。また2007年12月に

米国で報告された「ミッチェル・レポート」や陸上短距離界の女王と呼ばれたマリオン・ジョーンズ（米）選手の薬物使用の告白などで話題となった。ドーピング問題は社会的影響も大きいことから、文部科学省はその

防止と根絶を目指す反ドーピング条約を2006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、スポーツの健全化に努めている。しかし、10年前と比べ2倍以上に増え、今尚増加傾向にある喘息患者に対する治療薬として使用されるものの中に $\beta_2$ アゴニスト(アドレナリン受容体作動薬)があり、クレンブテロール (Clenbuterol, Cle) はその代表的なものとして知られている。Cleは治療以外に、骨格筋肥大と筋の速筋化という筋タイプ移行を引き起こし、運動能力を増強することからドーピング規制薬物に指定されている。それでも脂肪燃焼を促進するところから生活習慣病の危険性のある者や若い男女やボディービルダーたちにも魔法の薬と呼ばれ、そのプロドラッグ (BRL-47672 等) の開発を含めて、海外でもさらに普及する傾向がある。

ドーピング規制薬物ではあるが筋萎縮の顕著な高齢者のサルコペニアなどの治療薬の候補でもあるが、その作用機序の詳細は不明で、心肥大や高血圧の誘導や癌化促進など副作用の危険性が指摘されているところから、ドーピングを防止する上でも明確な薬理学的な作用機構の解明が必要と着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究はCleの全身への影響を遺伝子と蛋白質レベルで解明する事を目的とした。また、薬物には鏡像異性体の(+)-S-体と(-)-R-体があり、その混在がサリドマイド事件のような社会的問題となる場合があり副作用の除去による安全な薬物使用の観点から異性体の運動器(骨・筋肉)と心臓に及ぼす作用の違いを明確にする事を目指した。

## 3. 研究の方法

主として7週齢のSprague Dawley系雄ラット(日本SLC)を用いて、筋肥大を誘導するためCleの鏡像異性体の(+)-S-体と(-)-R-体を単独および混合ラセミ体として2週間投与し、投与後の大腿骨と脛骨の骨長と骨密度、筋湿重量を測定する一方、各筋組織から蛋白質とtotal RNAを抽出し、筋肉細胞の核内調節因子に影響を及ぼすことが予測される因子(IGF-I・IGF-2・MyoD・myogenin・PGC-1など)と未分化幹細胞関連因子(Wnt・Numb・Jaggedなど)と $\beta_2$ アドレナリン受容体と蛋白質合成と分解に関連する因子(Foxo1・

Atrogin・wwp1など)のmRNA量をqRT-PCR法により定量解析し、比較検討した。更に一部の蛋白質ではウェスタンブロット法を用いて蛋白質分子レベルからもこれら関連する因子群の変化を定量解析し、比較検討した。

更に、骨への影響は大腿骨と脛骨の骨密度(BMD)と長さから検討を行った。

## 4. 研究成果

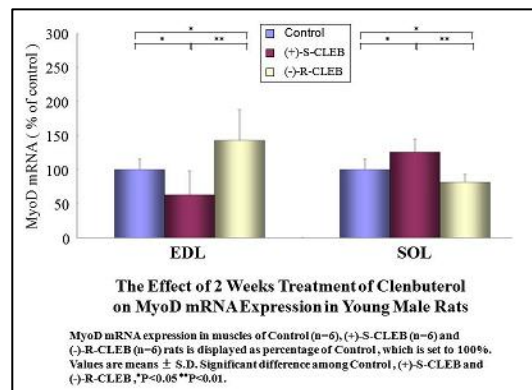
アドレナリン受容体作動薬のCleの鏡像異性体の(+)-S-体と(-)-R-体が心臓のみならず骨格筋の速筋モデルの長指伸筋(EDL)と遅筋モデルのヒラメ筋(SOL)に対してもどちらも筋肥大を誘導するものの(表1参照)

	Control (n=6)	(+)-S-CLEB (n=6)	(-)-R-CLEB (n=6)
Body weight (g)	365.5±12.7	354.3±14.1	361.3±6.5
EDL wet weight (mg)	155.7±7.6	198.8±10.8**	210.7±12.1**
ratio (mg/g)	0.426±0.020	0.561±0.019**	0.583±0.031**
SOL wet weight (mg)	133.8±11.7	167.5±5.7*	173.2±15.1*
ratio (mg/g)	0.366±0.031	0.473±0.005**	0.479±0.040*

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

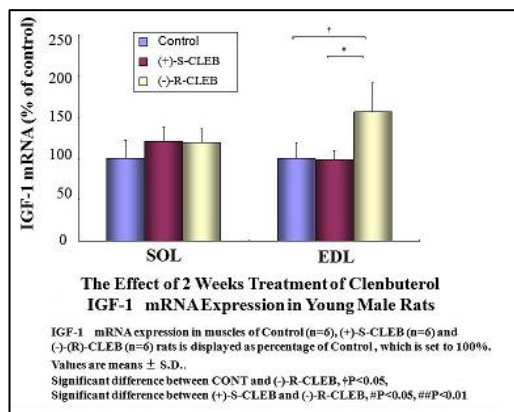
Body weight and muscle wet weight of Control (n=6), (+)-S-CLEB (n=6) and (-)-R-CLEB (n=6) rats are shown. The ratio represents relative weight of muscle wet weight to body weight. Values are means ± S.D. Significant difference between Control and (+)-S-CLEB, \*P<0.05 \*\*P<0.01. Significant difference between Control and (-)-R-CLEB, †P<0.05 ††P<0.01

(表1)



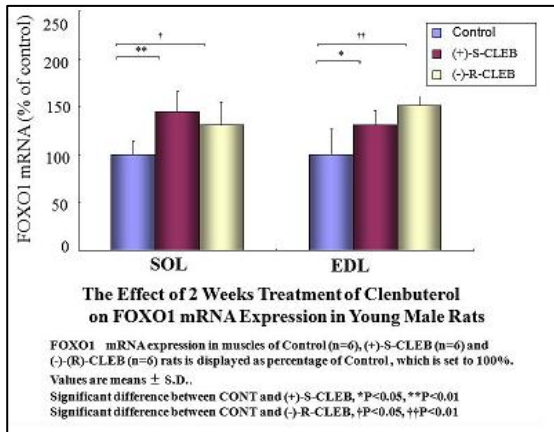
(図1)

$\beta_2$ アドレナリン受容体の少ないと言われていたEDLへの作用が大きくその原因と考えら



(図2)

れる核内転写調節因子 (MyoD) や蛋白質合成の促進因子 (IGF-1) の発現には EDL と SOL で異なる作用を有することが明らかとなった (図1と図2参照)。また、蛋白質レベルでの結果が mRNA の結果と必ずしも同期しない変化があることが判明した。これらは特にアポトーシス関連の蛋白分解に関連する因子 (Foxo1・Atrogin・wpl) の量の調節差が速筋と遅筋で異なっている事がその一因であることが示唆された (図3参照)。また同時



(図3)

に、この鏡像異性体のうち(+)-S-体で骨の成長を抑制する作用が強くと表れることが判明した (表2参照)。

	Control (n=6)	(+)-S-CLEB (n=6)	(-)-R-CLEB (n=6)
Femure Bone Length (mm)	33.24 $\pm$ 0.568	32.83 $\pm$ 0.459	32.85 $\pm$ 0.708
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	130.42 $\pm$ 4.00	122.98 $\pm$ 2.68*	119.73 $\pm$ 2.59**
Tibia Bone Length (mm)	39.33 $\pm$ 0.432	38.86 $\pm$ 0.256*	39.06 $\pm$ 0.900
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	108.53 $\pm$ 2.81	104.50 $\pm$ 1.54	103.10 $\pm$ 2.64

**The Effect of 2 Weeks Treatment of Clenbuterol on Bone Length and Bone Mineral Density in Male Rats**

Bone Length and Bone Mineral Density of Control (n=6), (+)-S-CLEB (n=6) and (-)-R-CLEB (n=6) rats are shown. Values are means  $\pm$  S.D. Significant difference between Control and (+)-S-CLEB, \*P<0.05 \*\*P<0.01. Significant difference between Control and (-)-R-CLEB, †P<0.05 ††P<0.01

(表2)

これにより、通常薬物がラセミ体 ((+)-S-体と(-)-R-体の混合型) として使用された場合、サリドマイドのような副作用の危険を取り除き、薬物が安全に使用されるために必要な貴重な資料を提供するものであり、これらの結果をアメリカスポーツ医学会を始め国内の学会で発表し、大きな反響が得られた。

結果的に生じる筋肥大は同じでも、そこに至る調節の過程では直接的または間接的な作用で影響を及ぼす可能性を示唆し、安全な薬物使用のためには、単なるパフォーマンス向上を目的とした安易な薬物使用を止まらせ、不要な使用を抑制することが期待される。

今後は薬物がドーピング目的の使用ではなく、治療薬として個々人に合ったものとし

て利用されるための遺伝子多型の影響を解明し、副作用を除去するための必要条件を明らかにしたい。更に、筋肥大等の運動能力を改善するための基礎資料を収集し、薬物に依存しない体力トレーニング方法を明らかにしたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Furuichi, Y., Masuda, K., Sugiura, T., Kato, Y., Kitaura, T. Expression of Novel Organic Cation/carnitine Transporter (octn2) In the Skeletal Muscle. Med. Sci. Sports Exerc. 41(5) (2009), S336, 査読無

2. Kitaura, T., Suzuki, S. Effects of clenbuterol on Pgc-1, Foxo1 and Atrogin-1 In Presenile Rats. Med. Sci. Sports Exerc. 41(5) (2009), S515, 査読無

3. 鈴木翔輝, 北浦孝, クレンプテロール鏡像異性体の運動器への影響. 体力科学 58(6) (2009), 761, 査読無

4. Kitaura, T. Effects Of Clenbuterol On Bone and Muscles of Young Rat. Med. Sci. Sports Exerc. 42(5) (2010), S271, 査読無

5. Matoba, H., Yada, K., Kitaura, T. Effect of Resistance Training on Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Rats. Med. Sci. Sports Exerc. 42(5) (2010), S208-209, 査読無

6. 北浦孝 クレンプテロール鏡像異性体の骨格筋肥大作用の解析. 体力科学 59(6) (2010), 941, 査読無

7. 春日規克, 竹倉宏明, 北浦孝, 的場秀樹, スポーツ科学における骨格筋の研究の動向と今後の方向性. 体力科学 60(1) (2011), 74, 査読無

8. Kitaura, T. Effects Of Clenbuterol Enantiomers On Muscles of Male Rat. Med. Sci. Sports Exerc. 43(5) (2011), S287-288, 査読無

9. Yada, K. Matoba, H. Kitaura, T. Effects Of Clenbuterol Enantiomers On Muscles of Male Rat. Med. Sci. Sports Exerc. 43(5) (2011), S299, 査読無

〔学会発表〕 (計 10 件)

1. Kitaura, T., Suzuki, S. Effects of clenbuterol on Pgc-1, Foxol and Atrogin-1 In Presenile Rats, 56<sup>th</sup> American College of Sports Medicine, 2009. 5. 29, Washinton St. Convention and Trade Center (USA)

2. Furuichi, Y., Masuda, K., Sugiura, T., Kato, Y., Kitaura, T. Expression of Novel Organic Cation/carnitine Transporter (octn2) In the Skeletal Muscle, 56<sup>th</sup> American College of Sports Medicine, 2009. 5. 28, Washinton St. Convention and Trade Center (USA)

3. 鈴木翔輝, 北浦孝, クレブテロール鏡像異性体の運動器への影響, 第 64 回日本体力医学会, 2009 年 9 月 19 日, 新潟コンベンションセンター (新潟県)

4. Kitaura, T. Effects Of Clenbuterol On Bone and Muscles of Young Rat. 57<sup>th</sup> American College of Sports Medicine, 2010. 6. 2, Baltimore Convention Center (USA)

5. Matoba, H., Yada, K., Kitaura, T. Effect of Resistance Training on Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Rats, 57<sup>th</sup> American College of Sports Medicine, 2010. 6. 2, Baltimore Convention Center (USA)

6. 北浦孝, 春日規克, 竹倉宏明, 的場秀樹 スポーツ科学における骨格筋の研究の動向と今後の方向性— (生化学的立場から) —, 第65回日本体力医学会, 2010年9月16日, 千葉商科大学 (千葉県)

7. 北浦孝, クレブテロール鏡像異性体の骨格筋肥大作用の解析, 第 65 回日本体力医学会, 2010 年 9 月 18 日, 千葉商科大学 (千葉県)

8. Kitaura, T. Effects Of Clenbuterol Enantiomers On Muscles of Male Rat, 58<sup>th</sup> American College of Sports Medicine,

2011. 6. 1, Denver, Colorado St. Colorado Convention Center (USA)

9. Yada, K. Matoba, H. Kitaura, T. Effects Of Clenbuterol Enantiomers On Muscles of Male Rat, 58<sup>th</sup> American College of Sports Medicine, 2011. 6. 1, Denver, Colorado St. Colorado Convention Center (USA)

10. 北浦孝, 遺伝子からみた骨格筋の運動能力への関わり, 第 19 回日本運動生理学会, 2011 年 8 月 25 日, 徳島大学常三島キャンパス (徳島県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北浦 孝 ( KITAURA TAKASHI )  
金沢大学・保健管理センター・准教授  
研究者番号 : 00143868

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし