





(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
			

2020年 12月 22日

Year Month Day

学位 (博士) 論文要旨  
(Doctoral thesis abstract)

論文提出者	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 30 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 市丸 亮太  (Your Name(Family, First) and Seal)				
主指導教員 氏名 Chief Advisor's Name	稲田 全規	副指導教員 氏名 Education Advisor's Name	宮浦 千里	副指導教員 氏名	
論文題目 Title	加重変化による筋骨格系への作用に関する研究				

論文要旨 (和文要旨(2000 字程度)または英文要旨(500words))  
※欧文・和文どちらでもよい。但し、和文の場合は英訳を付すこと。

【第一章 諸言】

ベッドレスト (寝たきり) や宇宙微小重力といった加重負荷の減少は廃用性筋萎縮や廃用性骨萎縮を急速に進行させる。そのため、高齢者や宇宙飛行士の健康を守る面から加重変化が筋骨格系を制御するメカニズムを解析することや改善策を立てることが重要な課題となっている。これらの骨格筋量の減少はリハビリテーションやトレーニングによる加重負荷により予防が期待できるが、その詳細な方法は未だ確立されていない。また、イソフラボンやレスベラトロールはポリフェノール類に分類される食品由来天然因子であり、骨量減少を抑制することが報告されており、廃用性骨萎縮の予防に期待できる。

そこで本研究では、加重負荷の減少が筋骨格系に与える影響を経時的に解析するとともに、廃用性筋萎縮や廃用性骨萎縮への対応策として、加重力や食品由来天然因子が筋量減少や骨量減少を予防できるのではないかと考え、それらの筋骨格系への効果を検討した。

【第二章 加重負荷の減少が筋骨格系に及ぼす効果】

廃用性筋萎縮や廃用性骨萎縮の実験モデルとして後肢懸垂が広く使用されているが、経時的に骨格筋を解析している報告はほとんどない。本章では、後肢懸垂マウスを使用し、骨量や筋量の経時的な変化や筋量を制御する分子メカニズムの変化を経時的に解析した。μCT により後肢懸垂飼育 Day 1, 4, 7, 14 における骨格筋量を解析した結果、Day 14 において大腿骨骨量の減少が見られ、Day 4-7 において下腿三頭筋体積の減少が見られた。筋肉ではタンパク質合成とタンパク質分解が厳密に制御され、筋量が維持されている。筋分解は主に、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系が担う。ヒラメ筋および前脛骨筋を単離し RNA を回収後、RT-qPCR 法により筋制御因子の mRNA 発現を解析した。後肢懸垂飼育 Day 1, 4, 7, 14 における筋分解因子の mRNA 発現を解析した結果、Atrogin-1、MuRF-1 といったユビキチン E3 リガーゼおよび LC3B、Atg7 といったオートファジー関連因子の発現が早期に上昇し、徐々に減衰した。また、これらの筋分解因子の転写因子である Foxo (Forkhead box-containing protein, O sub-family) 1/3 の発現も同様であった。

【第三章 加重力および微小重力が筋骨格系に及ぼす効果】

加重力は *in vitro* 試験において骨形成や筋分化を促進することが報告されているが、加重力が生体に与える影響について解析している研究は十分ではない。本章では、遠心飼育装置を用いて 2G 加重負荷がマウ

スに与える影響およびマウス筋骨格系に与える影響について解析を行った。2G 飼育による体重を測定した結果、Day 1 において加重力の影響により体重減少が見られ、Day 1 以降は減少した体重が徐々に回復した。次に、2G 飼育 Day 14 における筋量を解析した結果、2G 加重負荷により下腿三頭筋体積の上昇が見られた。さらに、大腿四頭筋における筋分化制御因子および筋分解因子の mRNA 発現を解析した。その結果、2G 加重負荷により Myod、Myf5 といった筋分化制御因子の発現が上昇し、LC3b、Atg5、Atg7、Atg16l といった筋分解因子の発現が減少した。次に、2G 飼育 Day 14 における骨量を解析した結果、上腕骨、大腿骨、脛骨の海綿骨量が増加した。また、脛骨骨髓において骨形成因子および骨吸収因子の mRNA 発現を解析した。その結果、BMP-2、Colla1 といった骨形成因子の発現が上昇し、RANKL といった骨吸収因子の発現に上昇傾向が見られた。地上において 2G 加重負荷により骨量の増加が見られたことから、次に、宇宙微小重力における人工 1G 加重負荷の骨量への影響を検討した。人工 1G 飼育 34 日目における骨量を解析した結果、人工 1G 加重負荷により上腕骨、脛骨において骨量減少が抑制された。

#### 【第四章 大豆イソフラボンおよびレスベラトロールが後肢懸垂マウスに及ぼす効果】

ポリフェノールであるイソフラボン (ISO) およびレスベラトロール (RES) は閉経後骨粗鬆症における骨量減少を抑制することが報告されている。本章では、後肢懸垂マウスを用いて、廃用性骨萎縮に対する ISO/RES の影響を解析した。後肢懸垂マウスの大腿骨骨量を解析した結果、ISO/RES の単独摂取により骨量の増加傾向が見られ、ISO/RES の併用摂取により骨量が有意に増加した。また、脛骨骨髓における骨吸収因子の mRNA 発現を解析した結果、ISO/RES の単独および併用摂取により RANKL/OPG 比が減少した。

#### 【第五章 結論】

本研究により、加重負荷の減少は早期に筋分解因子の発現を上昇させ筋量を減少させた。また、加重力負荷は筋分化制御因子の発現上昇、筋分解因子の発現減少、骨形成因子の発現上昇を介して骨格筋量を正に制御した。さらに、イソフラボンおよびレスベラトロールは廃用性骨萎縮による骨量減少を抑制した。以上より、加重力負荷がベッドレスト患者における廃用性筋萎縮・廃用性骨萎縮に対して有効であることが示唆された。また、宇宙微小重力環境では加重負荷に加え、イソフラボンやレスベラトロールといった食品由来天然因子が廃用性骨萎縮に対して有効であることが示唆された。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English. (300 words)

Bed rest on the ground and long-term exposure of microgravity ( $\mu\text{G}$ ) result in severe osteoporosis and muscle atrophy whereas mechanical loading by exercise recover the bone and muscle mass. It has reported that mechanical stress regulates bone metabolism and myogenic differentiation *in vitro*. However, the mechanisms *in vivo* are not known. In this study, we examined the effects of mechanical stress on musculoskeletal system *in vivo*.

A hindlimb-suspension model is widely accepted as an animal model for simulating and investigating weightlessness. We examined time-course analysis of muscle mass with time on hindlimb-suspension mice. Hindlimb-suspension upregulated the expression of muscle-specific ubiquitin ligases and autophagy-related genes in early stage and downregulated the triceps surae muscle volume.

Next, we examined the effects of 2G hypergravity on musculoskeletal system. 2G hypergravity upregulated the expression of myogenic regulatory genes and bone formation related genes and downregulated the expression of autophagy-related genes, leading to muscle hypertrophy and increased bone mass. We also compared the bone mass in artificial 1G and in  $\mu\text{G}$  in the space. Artificial 1G in space inhibited  $\mu\text{G}$  induced bone loss.

Soy Isoflavones (ISO) and resveratrol (RES), a natural polyphenol compound presented in several plant foods, have been reported to be useful to maintain a positive balance for bone metabolism. We found that ISO and RES inhibited hindlimb-suspension induced bone loss.

In conclusion, we demonstrated that altered mechanical stress regulated the bone and muscle mass with altered mRNA expression of bone and muscle regulatory factors. The reduction of mechanical stress induced bone and muscle mass. On the other hand, increasing mechanical stress increased bone and muscle mass via the upregulation of myogenic factors and bone formation factors. We further indicated ISO and RES are useful compounds for maintaining of bone and muscle health in disuse osteoporosis and muscle atrophy.