

筋活動による骨格筋損傷とその治癒過程における一酸化窒素の関与

2013 年

櫻井 智野風

博士(運動生理学)

# 目 次

## 第1章 研究の背景と目的

- 1.1. はじめに.....3
- 1.2. 先行研究
  - 1.2.1. 一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) とは .....5
  - 1.2.2. 骨格筋活動とメカニカルストレス .....7
  - 1.2.3. 骨格筋損傷と炎症 .....9
  - 1.2.4. 骨格筋損傷の再生機序 .....10
  - 1.2.5. 骨格筋損傷と遅発性筋痛 .....13
- 1.3. 研究の目的と研究課題 .....15

## 第2章 筋活動時の NO 生成

- 2.1. 走運動負荷 .....19
- 2.2. 過重力負荷 .....34
- 2.3. 外力負荷 .....54

## 第3章 外力負荷時の NO 生成と筋損傷治癒 .....73

第4章	外力負荷時の NO 生成と遅発性筋痛	100
第5章	まとめ	116
引用文献		122
謝 辞		140

## 第1章 研究の背景

### 1.1. はじめに

われわれの生体において運動刺激は生理反応に変調をきたすストレス要因であり、身体の諸器官に影響を及ぼす。そのストレスは、時として骨格筋の組織に損傷を引き起こす。運動刺激時の骨格筋内では、酸素消費量の増大、血流の増加などの代謝的ストレス、あるいは炎症反応を伴う伸張性筋収縮などのメカニカルストレスの増加によりフリーラジカル生成が亢進するが、この生成が過剰となると、脂質の過酸化やタンパク質酸化、細胞膜障害、血管透過性亢進などにより組織の損傷を惹起する(Best et al., 1999; Tatsumi et al., 2002)。また、損傷の回復時にはこのフリーラジカルの減少が伴うことも明らかになっている(Tatsumi, 2010)。

生体内に発生するガスである一酸化窒素(Nitric Oxide, NO)は、生態現象の多くの場面で様々な現象を引き起こすメディエーターとして知られている(Anderson et al., 2000; Kobzik et al., 1995; Moncada et al., 1991; Moncada et al., 1993)。NOはフリーラジカルの一種であり、生体内において抗酸化酵素の活性を減弱させ酸化ストレスを増大させる一方で、その殺菌力により炎症を縮小しアポトーシスを抑制するという善悪両面の作用を持つことが知られている(Alderton et al., 2001; Soneja et al., 2005; Sakurai et al., 2005; Sriwijitkamol et al., 2006; Filippin et al., 2011<sup>1</sup>; Filippin et al., 2011<sup>2</sup>)。また、

NO は細胞内情報伝達物質として、炎症性メディエーターであるサイトカイン・ケモカインの分泌を調節することが知られている(Rigamonti et al., 2013).

これらメディエーターの分泌調節は、骨格筋損傷後に発生する遅発性筋痛の発症に関与すると考えられる. このように、NO は骨格筋損傷と治癒、炎症や発痛作用に関与していることが考えられるが、その詳細は不明である.

本研究では動物モデルを対象に、伸張性収縮モデル、高強度走運動、過重力負荷といった様々な筋活動時のメカニカルストレスと骨格筋内における NO 生成の関連を検討し、メカニカルストレスにより作成した骨格筋損傷とその治癒に及ぼす NO の役割について明らかにすることを目的とする.

## 1.2. 先行研究

### 1.2.1. 一酸化窒素

Furchgott と Zawadzki (1980) により内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) が発見され、後にそれが NO であることが明らかにされたことが契機となり、生体内で生成される新しい細胞間情報伝達物質としての NO に関する研究が世界中で盛んに行われるようになった。NO は血管内皮細胞や白血球 (好中球, マクロファージ) で NO シンターゼによってアルギニンから生成される。NO はグアニル酸シクラーゼの活性化により細胞内サイクリック GMP (cGMP, 環状グアノシンーリン酸) を増加させ代謝を亢進させるとともに、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を低下させることで血管弛緩作用も併せ持つ。しかし一方で NO はフリーラジカルでもあるため、炎症や異物の除去の目的で白血球などが高濃度に NO を放出する状況下では、 $\text{O}_2$  と NO が反応し、ラジカル  $\text{ONOO}^-$  (ペルオキシニトライト peroxynitrite) が発生する。 $\text{O}_2^-$ , NO,  $\text{ONOO}^-$  などのラジカルは周辺の血管や組織を破壊して炎症を引き起こす (Crow et al., 1996)。

NO により血管平滑筋が弛緩し血管拡張が引き起こされると、血圧が低下し血流は増加する。この作用は動脈だけでなく静脈やリンパ管にも及び、腎臓では血管平滑筋だけでなく腎臓交換神経中枢に作用して血管を弛緩し血圧を低下させている。また、循環系だけでなく、神経系、免疫系の各分野において内因性 NO が重要な生理機能

に関与すると共に、過剰に生成された場合には種々の病態に関与することが分かり  
NO のもつ二面性が各々の分野で明らかになった。

生体内で NO を生成する NO 合成酵素 (NOS) には、細胞内カルシウム濃度の上昇  
により活性化される構成型 NO 合成酵素 (cNOS) と、病的刺激で誘導される誘導型  
NO 合成酵素 (iNOS) の 2 種類があり、cNOS には主として血管内皮細胞にある eNOS  
と神経細胞にある nNOS がある。一般に、NO は臓器血流の維持、血小板凝集の抑制、  
抗動脈硬化作用、シナプス可塑性、神経伝達、記憶・学習などの生体保護作用を有  
している (Elrod et al., 2008)。これらは cNOS により生成される少量の NO により維持さ  
れるが、エンドトキシンショック、神経細胞死、細胞毒性、炎症などの生体障害作用は  
iNOS により生成される大量の NO により生じることが示唆されている (Thompson et al.,  
1996)。したがって、NO が関与する病態は、生理作用に関与する cNOS 由来の NO の  
機能低下と iNOS で生成される過剰の NO による細胞障害に大別できる。

### 1.2.2. 骨格筋活動とメカニカルストレス

骨格筋はその長さを収縮することにより力を発揮する。その収縮形態には 3 つのタイプが存在する。筋がその長さを短くしながら力を発揮する収縮を短縮性収縮 (concentric contraction:CON), 引き延ばされながら収縮しようと力を発揮するのを伸張性収縮 (eccentric contraction:ECC) と称し, これら短縮性と伸張性を合わせて動的収縮 (等張性収縮:isotonic contraction) と呼ぶ。短縮性の中でも収縮速度が一定の場合を等速性収縮 (isokinetic contraction) という。また, 筋がその長さを変えないで力を発揮する形態を等尺性収縮 (isometric contraction:ISO) と呼ぶ。これらの収縮形態により筋の発揮張力も異なる。収縮速度が速いほど発揮張力は低くなり, CON の発揮力は, ISO と比べて低い。また ECC は ISO と比べて高い張力を発揮する。これらの骨格筋収縮により筋や靭帯が引き伸ばされ, 関節内では軟骨や骨がひずむという現象が生じる。こうして骨格筋組織や骨格筋内の血管はメカニカルストレスを受容する。

生体内で働くメカニカルストレスとしては, ずり応力, 静水圧, 引張力, 振動・衝撃力が挙げられる。ずり応力とは, 血流により血管内皮細胞に負荷されるストレスであり, 静水圧は, 血圧によって血管内皮や血管平滑筋に加わる圧ストレスを指す。また引張力は, 血圧や筋の緊張/弛緩に伴って血管平滑筋細胞や骨格筋細胞に働くストレスであり, 振動・衝撃力とは, 骨や聴覚器官に加わるストレスを指す。メカニカルストレスは,



受容する組織・細胞において、それぞれ恒常性の維持、病気の発症、感覚、そして器官の発生や分化に関与していることが分かっている。このストレスによって骨格筋機能が改善され、あるいは骨や軟骨のマトリクス生成が亢進する。in vitro の実験において、物理的な刺激は細胞の分化や組織構築に影響を及ぼすこともわかっており、メカニカルストレスは生体組織の構築、細胞分化に重要な役割を果たしていることが示唆されている(Akimoto et al., 2005)。

骨格筋活動に伴う筋損傷は、大きな張力を発揮する ECC 時に顕著に引き起こされることが知られている(Armstrong, 1984; Smith, 1991; Nosaka et al., 1996)。しかし、ECC によって骨格筋損傷が引き起こされるメカニズムの詳細は、現在のところ明らかになっておらず、以下の二説が有力と考えられている。筋が収縮方向と反対方向に伸展される際、筋節長の不均一が生じ弱い筋節が大きく引き伸ばされるために引き起こされるという説がある(Morgan et al., 2004)。一方、ECC 時のメカニカルストレスに伴い筋細胞内膜系を含む興奮収縮連関のいずれかに損傷が生じ、筋細胞内カルシウムイオンの恒常性が破綻するという説(Peake et al., 2005) が存在するが、解明には至っていない。

### 1.2.3. 骨格筋損傷と炎症

骨格筋損傷時には、損傷部位を除去し新たな組織を再生する防御機構が動員される。すなわち損傷した骨格筋中には炎症が引き起こされるが、そこには特徴的な白血球の活動が観察できる。炎症免疫反応において重要な役割を担う白血球は、その核の形態によって、多形核白血球と単核球に分類されている。このうち多形核には、染色色素の染まる形によって好酸球、好塩基球、好中球に分類され、単核球は、リンパ球と単球に分類されている。白血球のなかで多数を占める好中球は生体の防御機能を担っている。好中球は、損傷後早期に、スーパーオキシドに依存したメカニズムにより筋膜の溶解やミエロペルオキシダーゼのリリースに寄与する (Fielding et al., 1993; Nguyen et al., 2005)。ミエロペルオキシダーゼにより生成されるマクロファージは、侵入してきた病原微生物などの異物を貪食し、活性酸素を生成して殺菌するとともに、筋原性前駆細胞の融合を維持し活性化させる (Tidball et al., 2007; Brunelli et al., 2008; Tidball et al., 2010)。マクロファージは、組織に浸潤する初期段階において腫瘍壊死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF  $\alpha$ ) や単球走化性タンパク質-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) を含むサイトカインやケモカインを生成する。これらのサイトカイン・ケモカインは血管内皮細胞に作用し、細胞接着分子であるセレクチンの発現により血中に流れる白血球の速度を低下させるとともに、白血球の血管内皮細胞表面上への接着を促す。また白血球もケモカインの影響を受けて血管内皮を通り

ぬけ損傷部位へと浸潤していき損傷部位の貪食を早める. このような炎症性サイトカインの誘導による炎症反応増強は, 自己を構成する正常な組織までも攻撃しより深刻な組織損傷を起こすことがある. こうした過剰な反応を抑制するため, 炎症の後期段階では, 骨格筋由来の IL-6 が, インスリン様成長因子 1 (IGF-1) および IL-10 といった抗炎症性のサイトカインを分泌し反応を沈静化させることにより, 筋線維の再構成を維持することが示唆されている (Pedersen, 2011).

#### 1.2.4. 骨格筋損傷の再生機序

身体活動を担う運動器である骨格筋は, 多核細胞である筋線維によって構成され, 他の細胞と異なった形態的, 機能的特性を示す. その機能特性の一つとして筋収縮によって誘発される様々なストレスに対して高い可塑性を有することがあげられる. 筋収縮は, メカニカルストレスの他に, 低酸素, 代謝ストレス等を含んだ複合的な刺激を誘発するストレスである. 筋収縮によるメカニカルな刺激は, 一次的損傷である筋線維微細構造の崩壊を生じさせる. さらに, 筋細胞膜の崩壊や機械受容チャネル (stretch-activated channel:SAC) の開孔を誘発し,  $Ca^{2+}$  が筋細胞内へ流入することでカルパイン(Calpain) などのタンパク質分解酵素の活性を惹起し, 筋タンパクの分解が促進する. 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することで筋線維の浮腫, 貪食細胞の浸潤などの

炎症反応の過程で二次的損傷を引き起こすが、その後、損傷した筋線維は再生過程に向かう。

再生医学の進歩により、様々な組織に幹細胞(stem cells)が存在することが明らかにされ、多分化能として機能する可能性が示唆されている。成熟した骨格筋にも衛星細胞(satellite cell)と呼ばれる幹細胞が存在し、筋の成長、損傷後の筋の再生に関与している(Hawke et al., 2001)。衛星細胞は自己増殖が可能であり、骨格筋損傷により生じた各種ストレスに応じて増殖し、myogenic factor 5 (Myf5) や Myogenic differentiation 1 (MyoD) などの筋特異的転写調節因子の発現によって筋形成前駆体となる。その後、myogenin, Paired box 3 (Pax3), Ladybird homeobox 1 (Lbx1) などの遺伝子発現を経て筋芽細胞となる。一つの筋細胞は複数の体節に由来する筋芽細胞から形成される。筋芽細胞は増殖した後、一方向に配列しながら細胞融合をして筋管細胞という多核の筋細胞を経て、増殖・融合を繰り返して骨格筋細胞へ分化する(Zammit et al., 2006) (Fig. 1)。骨格筋損傷の再生時には、未分化な衛星細胞が、中心的な役割を果たす。すなわち骨格筋損傷などにより、衛星細胞が活動状態になり分裂・増加し、筋管細胞を経て骨格筋を再生する。しかし、骨格筋の再生過程における筋分化誘導能を持つ MyoD が、筋細胞のアポトーシスを積極的に誘導する作用も有することなども報告されている。(Sakuma et al.,1999)。このように、骨格筋損傷の再生過程における見解は未だ明らかにされるに至っていない。

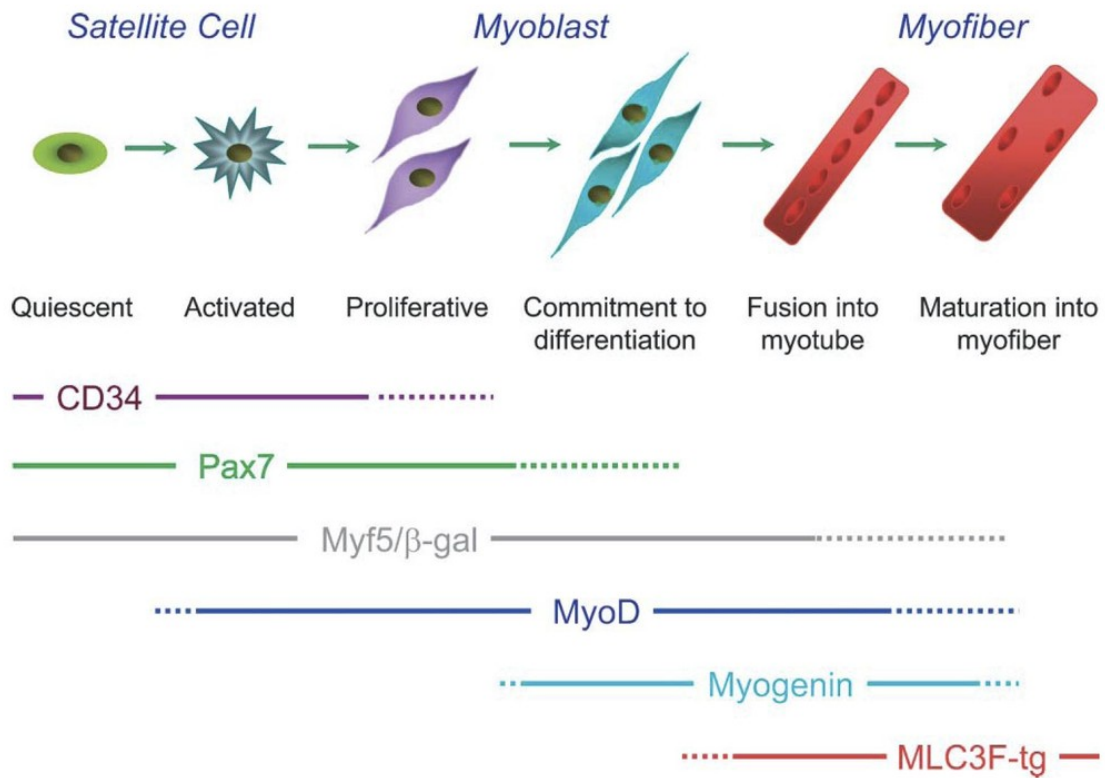


Fig. 1 Schematic of satellite cell myogenesis and markers typical of each stage. Satellite cells are quiescent in normal adult muscle and can be activated by, for example, muscle damage. Once activated, satellite cells divide to produce satellite cell-derived myoblasts that further proliferate, before committing to differentiation and fusing to form myotubes, which then mature into myofibers (for clarity, satellite cell selfrenewal is not included). CD34, Pax7, and Myf5/b-gal are expressed in quiescent satellite cells. Satellite cell activation is marked by the rapid onset of MyoD expression, whereas myogenin later marks the commitment to differentiation. The temporal expression pattern of MLC3F-tg is typical of many structural muscle genes such as skeletal muscle actin and MyHC, which mark sarcomeric assembly in the later stages of differentiation. (Zammit et al., 2006)

### 1.2.5. 骨格筋損傷と遅発性筋痛

身体運動より骨格筋損傷や筋肉痛が引き起こされることは古くから認識されており、現在に至るまで多くの研究が報告されている。1970年代からはじまった動物を対象にした骨格筋損傷モデルの作成により、筋が伸ばされながら力を発揮する伸張性筋活動は筋の微細損傷を引き起こしやすいことがわかってきた(Lieber, 1992)。しかしそのメカニズムは完全には解明されておらず、ヒトの身体運動の結果、どの程度の骨格筋損傷が生じるかについての知見や、損傷の治癒・回復過程における細胞構造の再生に関する知見も未だ乏しい。遅発性筋痛に関しては、損傷説(Hough, 1902)と温度上昇説(Armstrong et al., 1984)が有力とされているが、現在のところ、損傷・炎症が遅発性筋痛のトリガーとなるという損傷説が支持されている(Cleak et al., 1992)が詳細な解明には至っていない。骨格筋損傷や炎症反応を反映すると考えられるCPKや白血球浸潤等の間接的指標と遅発性筋痛との間には、「経時的な変化」や「損傷度と痛みの大きさの関係」においても一致をみない(Nosaka et al., 1996)。また、筋ジストロフィーなどの筋疾患においては、骨格筋損傷に伴う組織炎症時にも痛みは発生しないという報告もある(Henriksson et al., 1988)。このことから、遅発性筋痛の原因が骨格筋損傷そのものであることには疑問が残る。著者は骨格筋損傷後数日遅れて組織内に増加する一酸化窒素(NO)が、その治癒・炎症反応の制御においても関与している可能性を示した(Sakurai et al., 2005)。フリーラジカルと遅発性筋痛の関連を示唆する報告

(Close et al., 2005)もあることから、損傷の治癒をコントロールするNOを含む活性酸素種が、一方で筋痛の発生に関与していることも考えられる。しかし現在のところ遅発性筋痛と骨格筋損傷治癒との関連は国内外を問わず不明である。

### 1.3. 研究の目的と研究課題

筋活動時の伸張性収縮の繰り返しにより骨格筋損傷が生じるが、その詳細なメカニズムや治癒・回復過程に関する知見は未だ乏しい。近年、NO は組織の炎症との関連性が報告されている。その役割は酸化ストレスを増大させる一方で、その殺菌力により炎症を縮小するという善悪両面の作用を持つことが知られている。骨格筋損傷と治癒にはNOの動態が関与していることが考えられるが、その詳細は不明である。

そこで、本研究では動物モデルを用い、筋活動に伴い筋組織中におけるNOの生成と、損傷および治癒との関連を明らかにすることを目的とする。実際の身体運動により骨格筋内に生成されるNO動態を検証するために、ラットに一過性の高強度走運動を負荷したモデルを作成した。次に、身体運動の遂行は骨格筋に過重力状態を作り出すことから、過重力環境そのものが骨格筋に及ぼす影響を検証するために、ラットに過重力を負荷したモデルを作成し検討する。また、骨格筋損傷におけるNO動態を探るために、下肢筋を対象に電気刺激とモーター駆動を用いた骨格筋損傷モデルの作成を試みる。これらのモデルにより、下肢骨格筋に対し総括的なメカニカルストレスを想定したデータを収集する(表1)。NOが持つ特性から、メカニカルストレスにより引き起こされた骨格筋損傷による炎症状態の産物にとどまらず、損傷治癒との関連性も予想される。



そこで、骨格筋損傷度の作成・確認が容易であるラットの損傷モデルを対象に、骨格筋損傷の治癒・回復および同時に進行する遅発性筋痛の発症とNO生成の関連性についても検討する。以上の課題解明のために、以下の5つの研究課題を遂行する。

表 1. 本研究における骨格筋損傷モデル作成

筋活動		メカニカルストレス		
		振動・衝撃力	ずり応力・静水圧	引張力
		外的刺激	血流・血圧	筋の緊張／弛緩
研究 1	走運動負荷	◎	○	○
研究 2	過重力負荷	○	◎	○
研究 3	外力負荷	○	○	◎

◎:特に影響があると考える      ○:影響があると考える

### **研究課題 1. 走運動負荷による NO 生成**

実際の筋運動における筋内 NO 生成を調べるために、短時間の急性高強度ランニングを負荷したラットの下肢骨格筋における NO と誘導性 NO 合成酵素 (inducible Nitric oxide synthase:iNOS) の動態を観察する.

### **研究課題 2. 過重力負荷による NO 生成**

普段の筋運動と異なるメカニカルストレスである過重力が、骨格筋に及ぼす影響について検討する.

### **研究課題 3. 外的負荷による NO 生成**

ラビットの脚部にメカニカルな伸張性筋損傷モデルを作成し、筋組織内に生成される NO と iNOS の動態を観察する. これにより、損傷骨格筋に生成される NO の生成機序について検討する.

### **研究課題4. 外力負荷時の NO 生成と筋損傷治癒**

メカニカルな骨格筋損傷モデル作成後、筋タンパク分解を促進するプロテアーゼである Calpain や骨格筋損傷部位の再構築に働く酵素である Myo-D および Myogenin と、骨格筋内 NO 生成との関連について検討する.

## 研究課題5. 外力負荷時の NO 生成と遅発性筋痛

メカニカルな骨格筋損傷モデル作成後, 骨格筋内における発痛物質やその受容体の変化を調べ, NO が遅発性筋痛の発生に関与している可能性について検討する.

これらの検討により, 高強度走運動モデル, 過重力負荷モデル, 伸張性収縮モデルといった骨格筋活動と NO 生成との関係について明らかにするとともに, 骨格筋損傷治癒や筋痛の発生への NO の関与についても検討する.

## 第 2 章 筋活動時の NO 生成

### 2.1. 走運動負荷

(論文 I)

#### **The effects of high-intensity running on inducible nitric oxide synthase expression in rat skeletal muscle.**

##### 要約

電気刺激とモーター駆動による損傷モデルと、実際の走運動による骨格筋損傷と骨格筋内 NO 生成の違いを明らかにするために、Wistar 系雄性ラットに高強度(毎分 23m)および低強度(毎分 10m)の短時間のトレッドミル走運動を負荷した。ランニングは伸張性筋収縮による骨格筋損傷が増大される下り坂走行ではなく、通常の上り坂走行で行い純粋なランニングの効果を探ることを試みた。走行直後、3, 24 時間後に屠殺・解剖し速やかに腓腹筋(Gas), 長指伸筋(EDL), 前脛骨筋(TA)を摘出した。iNOS タンパク質は、低強度走行ではいずれの骨格筋組織についても観察されなかったが、

高強度の走行後に Gas と TA の両方で増加した。高強度走行後の iNOS mRNA 発現は Gas と TA でみられるものの EDL においては観察されなかった。高強度走行後のラット下肢骨格筋では、iNOSmRNA が、筋腱接合部、筋腹の順に発現し近位部には観察されなかった。これらの結果より、NO の合成酵素である iNOS の mRNA 発現は高強度走行後にみられるが、骨格筋の部位によりその発現は異なることが考えられた。各骨格筋は筋線維組成が異なることより、酸素消費の多少と NO 生成の関連や骨格筋内の NO 発生分布に関連があることが示唆された。

## (1) INTRODUCTION

NO is an important cardiovascular signaling molecule that has been reported to play an integral role in promoting exercise hyperemia in animals (Hirai et al., 1994; King et al., 1994) and humans (Schrage et al., 2004), and furthermore it is a key signaling molecule involved in adult skeletal muscle homeostasis, including its regeneration after injury (De Palma et al., 2012; Filippin et al., 2009; Stamler et al., 2001; Nisoli et al., 2007). In particular, NO promotes myogenic precursor cell activation and fusion and chronically damaged muscles (Buono et al., 2012). NO is synthesized from L-arginine

by NOS enzymes. In healthy subjects, skeletal muscle expresses the constitutive nNOS (Silvagno et al., 1996) and the eNOS isoforms. nNOS and eNOS are mostly calcium/calmodulin -dependent and usually expressed constitutively (Green et al., 1996). On the other hand, iNOS is independent of intracellular calcium/calmodulin concentration and typically is expressed when cells are stimulated by immunological stimuli. iNOS has been suggested to be responsible for the profound and long-lasting production of NO. The specific contribution of iNOS to muscle healing has not been investigated yet. Because iNOS is expressed by specific macrophage populations, understanding its function may shed light on the mechanisms and role of inflammation in muscle repair. The regeneration effects of iNOS-derived NO, particularly after dynamic exercise, remain controversial. For example, our laboratory reported recently that iNOS and NO levels are elevated in response to a controlled stretch injury (Sakurai et al., 2005).

The fibre-type and contraction-intensity dependent vascular effects of NO may account for the unchanged skeletal muscle blood flow following NOS inhibition during low speed treadmill running (Copp et al., 2010b) which recruits primarily oxidative slow- and fast twitch muscle (Gollnick et al., 1974; Laughlin & Armstrong, 1982). It is possible that high speed treadmill running which additively recruits highly glycolytic

fast-twitch muscle may unmask obligatory NO control during running exercise.

The purpose of this study was to investigate the changes in iNOS expression at 0, 3 and 24 hours following high-intensity running exercise in rat skeletal muscle.

## **(2) METHODS**

### **1) Animal care and acute exercise program**

35 untrained male Wistar rats (13 weeks of age) with initial body weight of 200-250 g were used for this study. Rats were housed individually and fed food and water ad libitum in a temperature-controlled room at 23 °C with a 12:12 hour light-dark cycle. Some of the rats were subjected to exercise on a treadmill set at a 5° incline for 60 min at 17 m/min. The sedentary control rats were not subjected to running on a treadmill. In the exercise groups, the rats were scarified to be dislocated at the cervical vertebra immediately after exercise (0 h group), 3 h after exercise (3 h group), or 24 h after exercise (24 h group), and the skeletal muscle were removed. After completion of exercise, the rats were scarified at the indicated time. All experiments conducted in this study were approved by the Animal Care Committee of the Tokyo Metropolitan University Graduate School of Science and Animal Care Committee of Tokyo University of Agriculture.

### **2) Tissue Harvest**

Rats were euthanized immediately after running exercise, the right extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) and gastrocnemius (Gas) muscles were



excised at 0 hr (n=5), 3 hr (n=5) and 24 hr (n=5) post exercise for each exercise intensity, frozen in isopentane precooled to its freezing point by liquid nitrogen, and stored at -80°C. In addition to the five rats were used to estimate baseline (rest) iNOS levels.

### **3) iNOS Protein Content**

SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in combination with an enhanced chemiluminescence plus (Amersham, Arlington Heights, IL) detection system was used to determine iNOS protein content in skeletal muscle. Tissue samples were homogenized in 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, and 0.1% phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Relative amount of iNOS was determined utilizing an anti-iNOS (IgG1) antibody (Transduction Laboratories, San Diego, CA). Autoradiographic signals were assessed using a BioRad scanning densitometer (BioRad, Hercules, CA). Results are expressed in arbitrary optical density units.

### **4) RT-PCR Analysis for expression of iNOS.**

Tissue samples were collected in RNAlater solution (Qiagen). Total RNA was extracted from the skeletal muscles using ISOGEN solution (Nippon Gene, Tokyo,

Japan). To determine the expression levels of genes, extracted RNA was reverse-transcribed and amplified with PCR using specific primers. The genes analyzed were for inducible nitric oxide synthase (iNOS). The following primer sets were used for the respective genes:

iNOS 5'-GGAAGAGTTCCCATCATTGC

5'-TCTGCAGGATGTCTTGAACG

GAPDH 5'-CCAAAAGGGTCATCATCTCC

5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTCAC

Specific GAPDH primers were used for the internal control to normalize the sample cDNA amounts. Band intensities of the RT-PCR products were quantified using Image J application (NIH).

### **(3) RESULTS**

#### **1) iNOS protein content**

Fig. 1 demonstrates the expression of the three iNOS protein content rat hindlimb muscle. Fig. 2 shows the density ratio of iNOS protein. iNOS protein was not observed in any of the tissues at rest or following low intensity exercise. iNOS protein was increased following high intensity exercise in both Gas and TA at 0 and 3 hrs.

#### **2) RT-PCR Analysis for expression of iNOS mRNA.**

Expression of iNOS mRNA (Fig. 3) and densitometric analysis (Fig. 4) demonstrated in rat hindlimb muscle. iNOS mRNA in Gas was not detectable at rest and was higher after 3 hr than 0 and 24 hr ( $6.02 \pm 1.33$  vs.  $1.76 \pm 0.91$  and  $0.38 \pm 0.07$ ,  $p < 0.05$ ). iNOS mRNA in TA was only observed 3 hr after H exercise, and its level was lower compared to that in Gas. iNOS mRNA was undetectable in EDL after either H or L exercise. In Gas 3 hours after H exercise, iNOS mRNA expression was highest at the musculotendinous junction (MTJ) and lowest in the proximal muscle (Fig 5).

#### **(4) DISCUSSION**

The present study demonstrated that the changes in iNOS expression at 0, 3 and 24 hours following high-intensity running exercise in rat skeletal muscle. This is evidenced by the following experimental results. For the first time we demonstrated that (a) generation of iNOS protein is dependent on the intensity of running exercise; (b) iNOS protein is observed in TA and Gas muscle after 3 hr high intensity exercise; and (c) iNOS mRNA expression was highest at the musculotendinous junction (MTJ) and lowest in the proximal muscle.

In the normal rat skeletal muscle, iNOS was almost undetectable and was overexpressed only after damage. This suggests the causal involvement of the NO system in the process of muscle damage. The increased iNOS protein in leg skeletal muscle after running exercise that was found in our study might have a physiological role since NO modulates vascular diameter and therefore causes vasodilatation and increased perfusion, which is essential for remodeling the damaged muscle after high intensity running exercise.

A major known function of NO is the regulation of blood vessel tone and therefore blood flow (Rådegran et al., 1999; Shen et al., 1995). We have shown that iNOS protein was not observed in any of the tissues at rest or following low intensity exercise and

was increased following high intensity exercise in both Gas and TA at 0 and 3 hrs. The blood flow in the leg skeletal muscles may be estimated by exercise intensity.

Another function of NO is to regulate the contractile force of skeletal muscles (Reid, 2001; Corona et al., 2013). The expression of iNOS mRNA in high intensity muscle was significantly higher compared with low intensity muscle, at all-time points that were measured. 3 h after the high intensity exercise muscle, the density ratio of iNOS in Gas was 185% higher than that of low intensity exercise muscle. These data are compatible with the known property of NO to regulate contractile force in skeletal muscle (Reid, 2001; Corona et al., 2013), therefore supporting our speculation of the involvement of muscle fiber type in the pathogenesis of damage.

iNOS mRNA was extensive in response to running exercise and was largely restricted to areas of high MTJ concentration and high mechanical force near the Achilles tendon. It suggests that running exercise induced muscle damage selectively increases transcription of the iNOS gene and promotes a rapid change in the iNOS at the MTJ. And NO may play a role in MTJ conductance of contractile and stretching forces.

These findings suggest that iNOS expression increases after high intensity exercise in rat skeletal muscle and the level of expression varies with muscle fiber type.

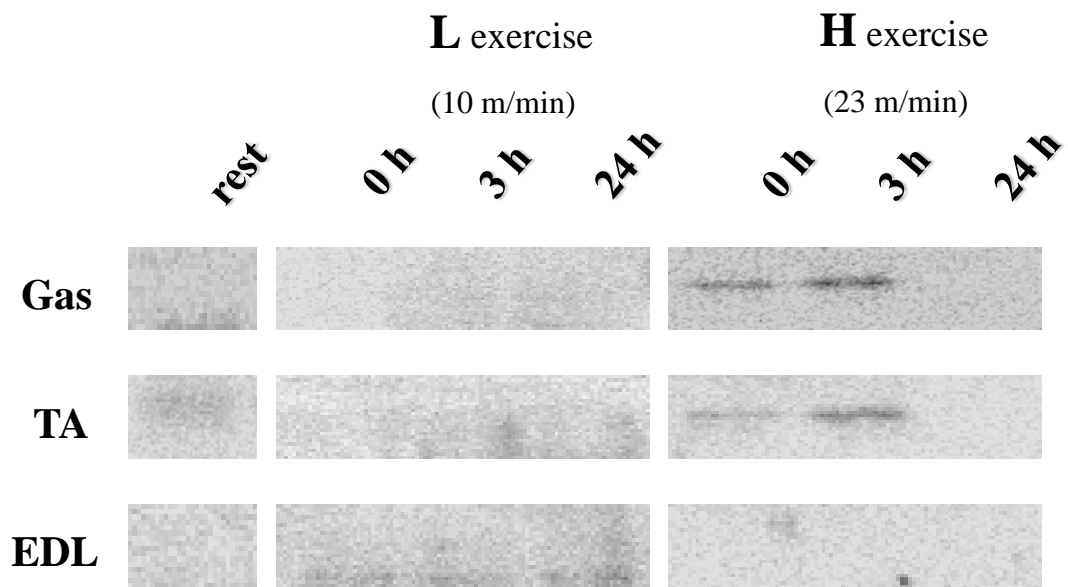


Fig. 1. Western blot analysis was performed with anti-iNOS antibody.

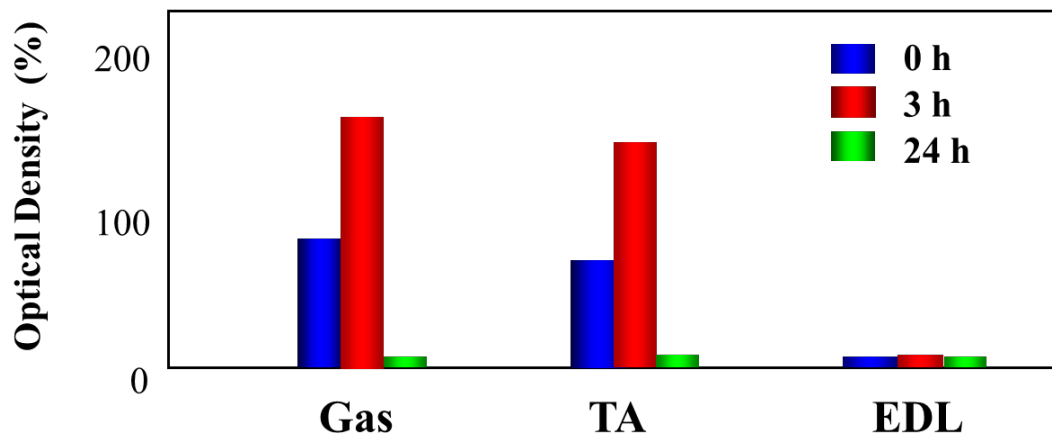


Fig.2. High intensity exercise (23m/min running) change in iNOS protein expression in rat hindlimb muscle. Data were quantified by scanning densitometry and pooled (n=5). Low intensity exercise showed no detectable iNOS expression.

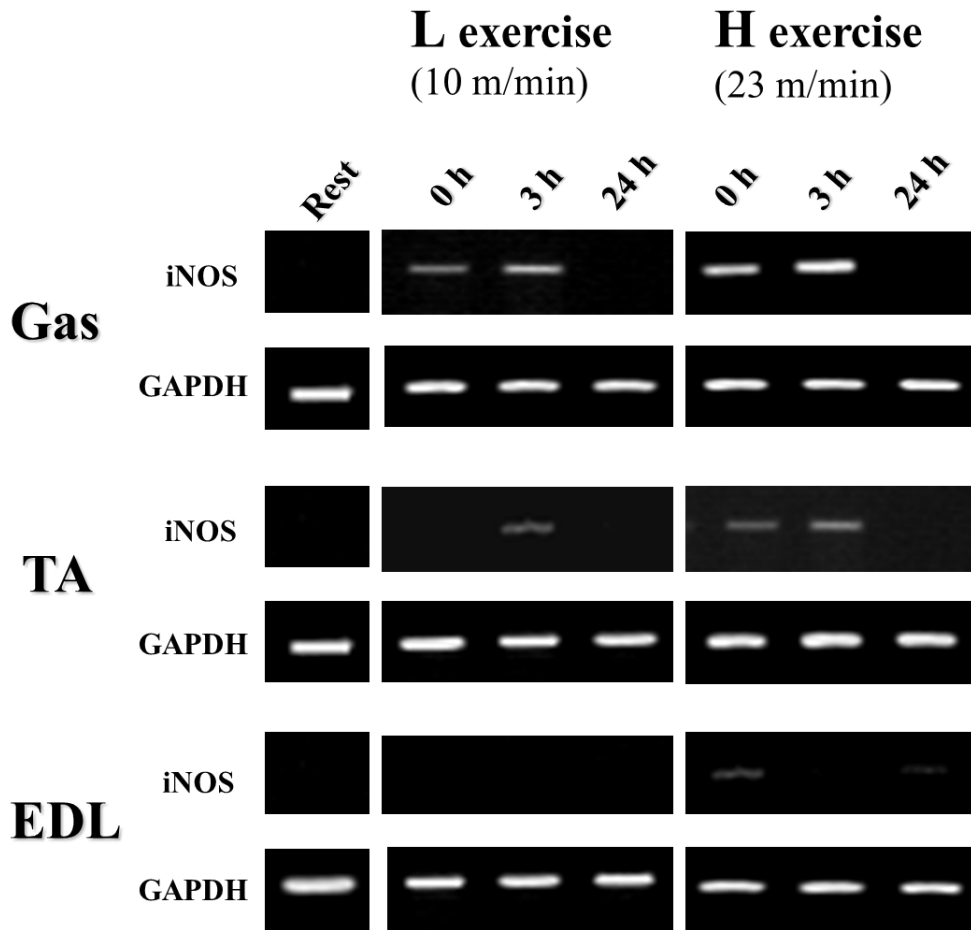


Fig.3. Running exercise specifically change iNOS mRNA expression in rat hindlimb muscle. Gas:Gastrocnemius, TA:Tibialis Anterior, EDL: Extensor Digitorum Longus. Skeletal muscles were taken from control and exercise rat immediately after treadmill running at times indicated.



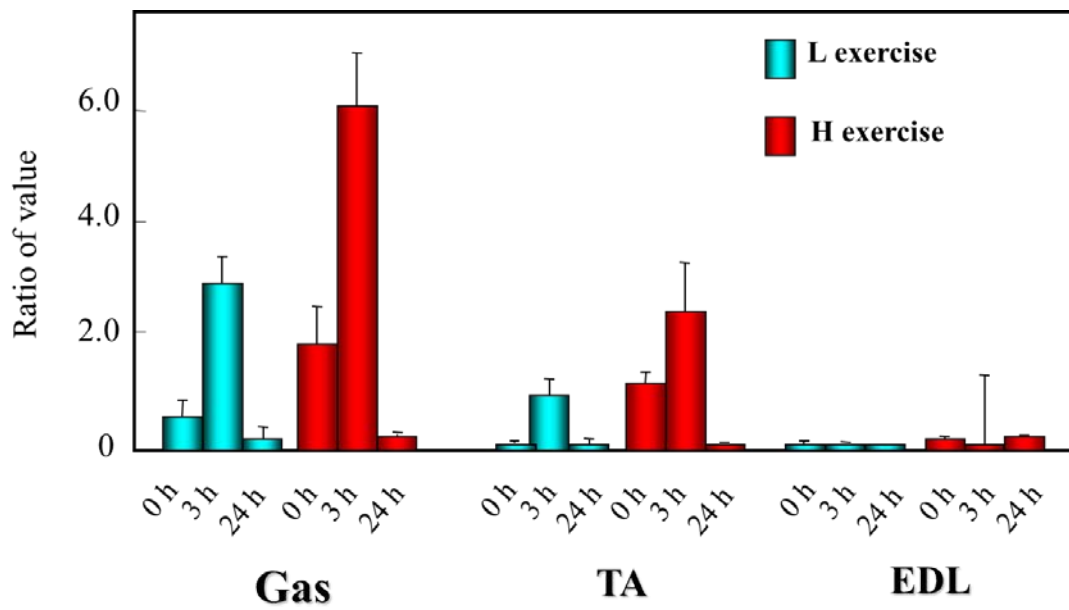


Fig.4. Relative iNOS mRNA abundance normalized with GAPDH expression. Data are Mean  $\pm$  S.E. (N=5)

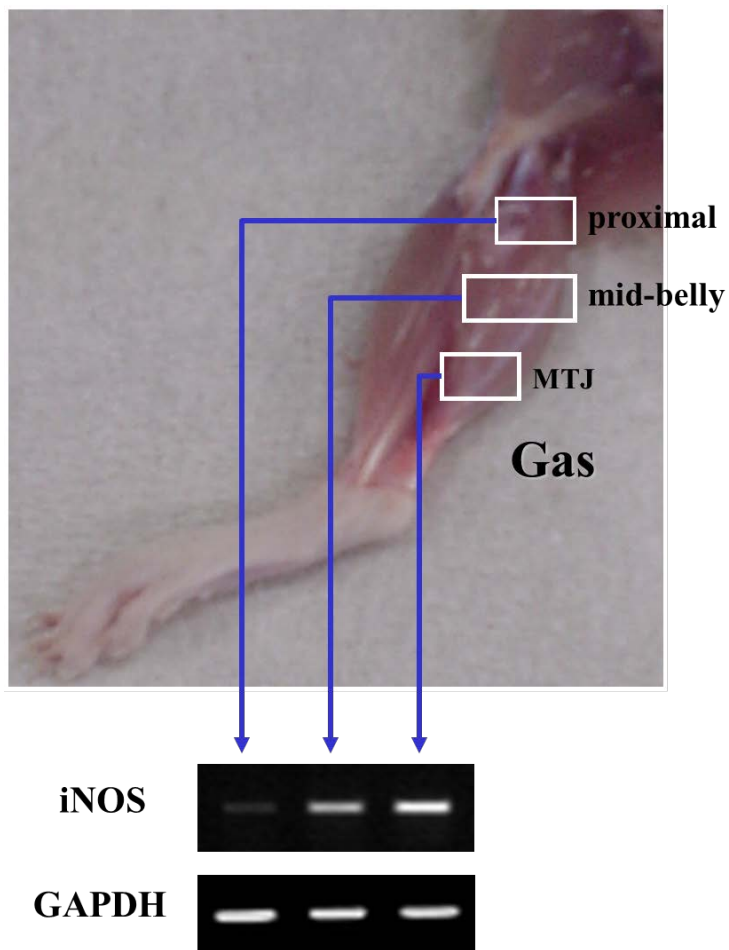


Fig.5. After 3 hour high Intensity exercise in increase iNOS mRNA expression in rat Gas. Expression was highest at the musculotendinous junction (MTJ) and lowest in the proximal muscle.

## 2.2. 過重力負荷

(論文Ⅱ)

### 短時間の過重力負荷が骨格筋内 NO 生成に及ぼす影響

#### (1) 緒言

微小重力への曝露は人間や実験動物に対して、生理学的に重要な影響を及ぼす。例えば、ラットやマウスを宇宙飛行させた研究では、主にヒラメ筋をはじめとする抗重力筋に、萎縮や変性などの大きな変化が観察されている (Allen et al.,1996; Ohira et al.,2002; 後藤ら,2007)。これらの現象は、地上での微小重力模擬実験でも確認されている (Ohira et al.,1999; Goto et al.,2003)。しかしながら、宇宙飛行を利用した研究においては、宇宙滞在中の微小重力への曝露以外に、打ち上げならびに帰還時に、急激に増加する重力(過重力)が宇宙船に加わっている。実際、スペースシャトルの場合、打ち上げ時には 3.2-G , 帰還時には 1.4-G の過重力が発生している (Stowa et al.,2008)。したがって、宇宙飛行を利用した研究により得られた結果には、宇宙滞在中の微小重力による影響に加え、この過重力の影響が含まれている可能性がある。しかしながら、これまで宇宙船の打ち上げや帰還時を想定した数分間の過重力負荷が骨格筋に及ぼす影響については、あまり明らかにされていない。

通常の地球 1G 環境下において、数分間の高強度運動を負荷した際には骨格筋に損傷が生じる。一方、過重力環境下における数十秒間のスクワット・トレーニングは、その筋への負荷量が1G 環境下での高強度トレーニングに相当することが報告されていることから (Yang et al.,2007), 過重力環境そのものが骨格筋に影響を与えることが予想される。また、1G 環境下での数分間の高強度運動による骨格筋への過負荷は、骨格筋損傷の指標物質であるβ-グルクロニダーゼ (Koskinen et al.,2001) や、炎症性サイトカイン(TNFα, インターロイキン 6(IL-6) )(Kawamura et al.,2002; Ostrowski et al.,1998) や NO の合成酵素 (Rosendal et al.,2005; Tidball et al.,1998) の生成を誘導することが報告されている。

そこで本研究では、宇宙船の打ち上げ時を想定した短時間の過重力負荷は、1G 環境下における高強度運動等の過負荷と同様に、骨格筋の組織的損傷を引き起こし、β-グルクロニダーゼ、TNFα, IL-6, iNOS および NO 生成を増加させるという仮説を立てて検討した。

## (2) 実験方法

### 1) 実験動物および飼育条件

実験動物には, Wistar 雄性ラット 14 匹(コントロール群, n=7, 過重力負荷群, n=7)を用いた. 体重は  $393.8\text{g}\pm 15.2$ (平均 $\pm$ 標準偏差)であった. ラットは個別ゲージ内で餌および水は自由摂取とし, 明暗サイクル(12 時間:12 時間)と室温の制御した環境にて飼育した. すべての実験プロトコルは, 東京農業大学動物倫理委員会規定ならびに日本大学実験動物規定に従って行った.

### 2) 過重力負荷実験

過重力負荷には日本大学医学部所有の動物用遠心過重力装置 (Kita et al.,2006)を用いた. 本装置はモーターに直結した 2 本の水平なアーム(アーム長:0.7 m)の先に 4 つのゴンドラが設置され, 回転により重力を負荷するものである. 過重力負荷としてラット 7 匹(過重力負荷群)に対し, 宇宙船の地上からの打ち上げ時を想定した 3.0-G の過重力負荷を 8 分間実施した (Stowa et al.,2008) . 各ゴンドラには 1 匹ずつラットを乗せ, 回転数 51 rpm にて過重力を負荷した.

### 3) 骨格筋標本の抽出

ラットは過重力負荷終了直後に、ペントバルビタール(0.5 mg/kg 腹腔内投与)にて深麻酔後、右後肢の膝関節下部の皮膚を切開し、ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋を摘出した。筋サンプルは摘出直後、重量を測定し液体窒素で冷却したインペタン内で急速冷凍した後、-80℃にて保存した。尚、mRNA 測定のための筋サンプルは RNeasy 溶液 (Qiagen, Hilden, Germany) 中に保存した。筋サンプルは、十分に冷やしたホモジネイトバッファー(0.1 M  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  buffer (pH 7.4; wt:vol 1:10))内でモーター駆動のポッター・グラス・ホモジナイザーにて均質化し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性、TNF $\alpha$  濃度、IL-6 濃度および NO 含有量の測定に用いた。

#### 4) 組織化学染色

すべての骨格筋サンプルにおいて凍結切片をヘマトキシリンとエオジン(HE)により染色し、過重力負荷が骨格筋に与える組織学的な影響を光学顕微鏡(BX-10, Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した(Fig.1)。

#### 5) $\beta$ -グルクロニダーゼ活性測定

$\beta$ -グルクロニダーゼ活性は Koskinen ら (2001) の方法に従い、測定した。骨格筋サンプルをホモジネイト後に  $3,000 \times g$  (4 °C) で 10 分間の遠心を行い、バッファーの上澄液 50  $\mu$ l に 450  $\mu$ l の 0.1 M acetate buffer (pH 4.2) を加え 37 °C の恒温槽にて

5 分間インキュベートした。次に，サブストレイト 250  $\mu$ l (5 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加え, 37  $^{\circ}$ C の恒温槽にて18時間反応させた。培養後, 氷冷したグリシンバッファー (0.1M, 1.5ml, pH 10)を加えた。吸光度は 420nm の波長で測定した。結果は可溶性タンパク質量と反応時間単位で規定し計算した。サンプルのタンパク質濃度は Lowry 法 (DC プロテインアッセイキット: BioRad 社 Richmond, CA, USA) により測定した。

#### 6) TNF $\alpha$ 濃度の測定

骨格筋内の TNF $\alpha$  濃度の測定には, ラット TNF $\alpha$ 免疫測定キット (BioSource International Camarillo, CA, USA) を使用した。筋サンプルはビオチン標識された抗ラット TNF $\alpha$  抗体とともに室温で 1 時間反応させた。各サンプルは, Streptavidin-ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP; Horseradish Peroxidase) 溶液と共に室温で 45 分間反応させた後, 30 分間安定させた。停止液の添加の後, 分光光度計を用い波長 450nm で測定した。

#### 7) IL-6 濃度の測定

IL-6 濃度は ELISA 法により測定した。測定にはマウス IL-6 測定キット (Endogen, Woburn, MA, USA) を使用した。筋サンプルはビオチン標識された抗マウス IL-6 抗

体とともに 20°Cで 1 時間反応させた。各サンプルは, Streptavidin-HRP 溶液と共に 20°Cで 30 分間反応させた後, 20°Cにて 30 分間安定させた。停止液の添加の後, 分光光度計を用い波長 450nm で測定した。検出限界は 1 pg/ml であった。

## 8) iNOS mRNA 分析

RNAlater 溶液中に保存した筋サンプルより, ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) により総リボ核酸を抽出し, Oligo dT プライマー逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR) 法により iNOS 遺伝子の解析を行った。PCR の条件は, Taq polymerase 活性化のため 94°Cで 7 分間温めたのちに, 94°Cで 1 分, 55°Cで 2 分, 72°Cで 3 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。使用したプライマーはそれぞれ以下に示すとおりであり, インターナルコントロールとして GAPDH を用いた。

iNOS      5'-GGAAGAGTTCCCATCATTGC

5'-TCTGCAGGATGTCTTGAACG

GAPDH    5'-CCAAAAGGGTCATCATCTCC

5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTCAC

RT-PCR のイメージ解析には, NIH イメージプログラム(Ver.1.62)を使用し定量化した。



## 9) NO 含有量の測定

筋サンプルを 15,000 × g (4 °C) で 15 分間の遠心の後, ろ過した上澄液を 5,000 × g (4 °C) で 60 分間遠心し, 上清を測定に供した. 測定には NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-CII (Dojindo, Kumamoto, Japan)を使用した.

## 10) 統計処理

すべてのデータは平均±標準誤差で表した. コントロール群と過重力負荷群の間における有意差の検定には Mann-Whitney U-tests を用い, 有意水準は 5%未満 (P<0.05)とした.

### **(3) 結果**

#### **1) HE 染色による観察**

Fig.1 は、コントロール群のヒラメ筋と、過重力負荷群における腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋および長指伸筋の筋組織画像である。各筋ともに過重力負荷群とコントロール群の間に光学顕微鏡による観察上で差はみられなかった。

#### **2) $\beta$ -グルクロニダーゼ活性**

骨格筋損傷の指標である  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性は、腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋においてコントロール群に比べて、過重力負荷群のほうが有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。しかし、ヒラメ筋では両群の間に差を認めなかった (Fig.2)。

#### **3) TNF $\alpha$ 濃度**

TNF $\alpha$  濃度は、腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋において、コントロール群に比べて、過重力負荷群のほうが有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (Fig.3)。しかしながら、ヒラメ筋では両群の間に有意な差を認めなかった。

#### **4) IL-6 濃度**

IL-6 濃度は、過重力負荷群とコントロール群の両群において前脛骨筋が他の筋よりも低い傾向を示した。しかし、いずれの筋においても過重力負荷群とコントロール群の間に有意な差を認めなかった (Fig.4)。

#### 5) iNOS mRNA

iNOS mRNA はコントロール群では検出されなかったが、過重力負荷群の腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋において検出された (Fig.5)。

#### 6) NO 含有量

NO は腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋において、コントロール群に比べて、過重力負荷群のほうが有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (Fig.6)。しかしながら、ヒラメ筋では両群の間に有意な差を認めなかった。

#### (4) 考察

本研究において、8分間という短時間の過重力負荷により下肢骨格筋の腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋において骨格筋損傷の指標である $\beta$ -グルクロニダーゼ、TNF $\alpha$ 、iNOS およびNOが増加することをはじめて明らかにした。しかしながら、骨格筋損傷を引き起こす1G環境下での高強度運動等の過負荷とは異なり、IL-6にはいずれの筋においても変化を認めなかった。また、ヒラメ筋においては他の筋とは異なりすべての指標において、過重力負荷による影響を認めなかった。

宇宙空間における微小重力への曝露は、生体の主要なシステムに影響を及ぼす。なかでも、骨格筋は最も強く影響を受けるシステムの1つであり、その変化は形態(Allen et al.,1996; Riley et al.,1996)、収縮機能(Caiozzo et al.,1996; Widrick et al.,1999)、遺伝子発現(Caiozzo et al.,1996)に及ぶことが、宇宙飛行を利用した研究により、解明されている。特にヒラメ筋などにおいて顕著な変化が認められており(Allen et al.,1996; 後藤ら, 2007; Ohira et al.,2002)、抗重力筋は微小重力曝露の影響を受けやすいと考えられる。一方、宇宙船の打ち上げや帰還時には過重力の影響を受けるが、これら数分間の過重力負荷が骨格筋の組織的損傷やその指標物質等に及ぼす影響については、あまり明らかにされていない。

本研究における8分間3.0Gの過重力負荷により、骨格筋損傷の指標である $\beta$ -グルクロニダーゼ活性には増加が認められたが、骨格筋損傷特有の組織学的な変化は観

察されなかった。通常の 1G 環境下において骨格筋損傷の指標である  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性は、レジスタンス運動による骨格筋損傷後数日で有意に増加する<sup>19)</sup>。さらに  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性の総計は骨格筋損傷を反映だけでなく (Salminen et al.,1985),  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性と病的組織変化との関連が示されている (Salminen et al.,1987)。この組織学的変化に関する先行研究との結果の違いについては、プロトコル上の時間的な違いによる可能性が考えられる。

本研究で用いたラットは、8 分間の過重力負荷終了直後に下肢筋群を摘出した。通常、骨格筋における生化学的な変化は運動等による過負荷直後に引き起こされるものもあるが、組織学的な変化は過負荷の数時間後に観察される(Brickson et al.,2001; Sakurai et al.,2005)。したがって、過重力負荷に対する生化学的な変化と組織学的変化との解離については、今後、 $\beta$ -グルクロニダーゼおよび骨格筋内の損傷状態を反映する他のリソソーム酵素(Salminen et al.,1985) の経時的な観察を行うことにより、説明することが可能となるかもしれない。

IL-6, TNF $\alpha$ , iNOS および NO などの様々なサイトカインは、組織に過負荷が加わった時に炎症の進行や治癒において重要な役割を担い、損傷骨格筋内にて増加する (Langberg et al.,2002; Rosendal et al.,2005)。また、NO やその合成酵素である NOS は筋の収縮や 1.0-G 環境下での過負荷となる高強度運動においても増加することがわかっている(Alonso et al.,2006; Gomez-Cabrera et al.,2005; Sakurai et al., 2005; Tidball

et al.,1998). 特に, 誘導型の NO 合成酵素である iNOS は, マクロファージ, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞等により発現され, 活性化されると炎症過程を刺激するのに十分な NO を生成することが知られている (Beck et al.,1999; Torres et al.,2004). 本研究では, 3.0-G の過重力負荷により, TNF $\alpha$  発現は腓腹筋, 前脛骨筋および長指伸筋において増加し, その程度は, 一過性の高強度運動で引き起こされる骨格筋損傷 (Kawamura et al.,2002) とほぼ同レベルであった. さらに, 3.0-G 過重力負荷後には iNOS も過剰発現し, NO も増加していた. しかしながら, 高強度運動時には即座に応答し増加するサイトカインである IL-6 (Heinrich et al.,1990; Rosendal et al.,2005) は, 本研究における過重力負荷では増加を示さなかった. また, IL-6 は前脛骨筋が他の筋群に比べ低いことが示された. 速筋である前脛骨筋は筋活動維持のためのグルコース取込を維持する目的で, 骨格筋内より IL-6 を放出していると考えられ (Febbraio et al.,2002), この傾向は過重力負荷時においても変化しなかったものと考えられる. すなわち, 短時間の過重力負荷により, TNF $\alpha$  は他の過負荷や炎症性反応と類似の変化を示すものの, IL-6 においては他の過負荷に対する反応とは異なっていた. このことより, 短時間の過重力負荷は高強度運動に代表されるような過負荷や炎症性反応とは異なる過程によって骨格筋に変化を及ぼしている可能性が考えられた. さらに 8 分間という短時間の過重力負荷中に, 炎症性反応と同様な生化学的変化の過程を経ることが可能かどうかは, 時間的観点からも疑問が残る.

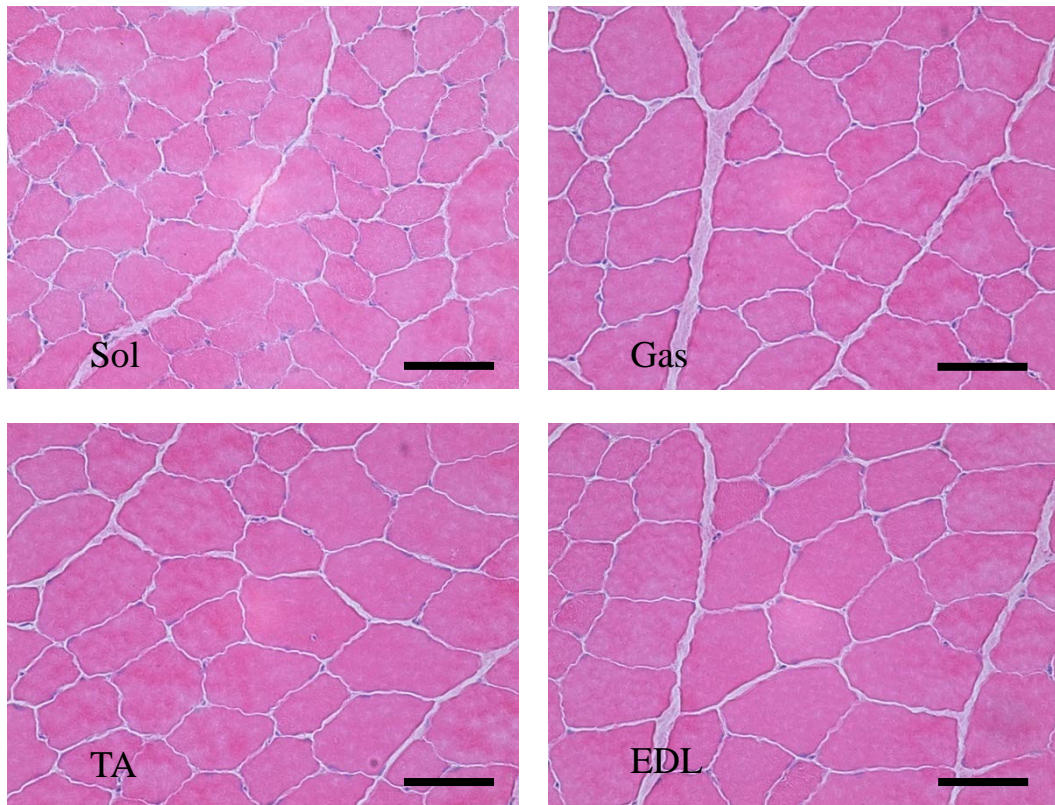
本研究の結果では、8 分間の 3.0-G 過重力負荷がヒラメ筋には明らかな影響を及ぼさなかった。先行研究において、慢性の過重力はさまざまな器官やシステムに影響することが報告されており(Kita et al.,2003; Pecaut et al.,2004; Shibata et al.,2004; Kita et al.,2006), なかでも、ヒラメ筋筋線維の発達もしくは異化は、慢性の過重力負荷と密接に関連していることが示されている (Bozzo et al.,2004; Chi et al.,1998; Pecaut et al.,2004; Picquet et al.,2005). 一方、急性の過重力負荷(2G)曝露に対しても、ヒラメ筋は 1G 環境下またはそれ以上の筋活動を示すことが報告されている (Wang et al.,2006). これらのことより、本研究においてヒラメ筋に明らかな生化学的変化を観察しなかったことは、ヒラメ筋の抗重力筋としての活動量の相違ではないと考えられる。同様に、ヒラメ筋以外の筋群で観察された TNF $\alpha$  増加による炎症性反応は、異なる筋線維タイプ特性による応答性の違いによるものと示唆される。さらに速筋である前脛骨筋においては通常の状態でも他の筋に比べ IL-6 の発現量が少ないことから、筋線維タイプによる特異性が伺える。

本研究においては iNOS の mRNA を測定した。骨格筋の収縮能や血管の緊張度、血流の調節などに重要な役割を果たしている NO (Anderson et al.,2000; Kobzik et al.,1995; Moncada et al.,1995) の合成酵素には、iNOS の他に、血管内皮性および神経性の NOS が存在する (Nathan et al.,1994). この 3 種類の酵素ともに L-アルギニンから NO を合成することから、本研究における過重力負荷により増加した NO について

は、血管内皮性もしくは神経性の NOS も関係していた可能性を完全には否定できないと考えられる。



A



B

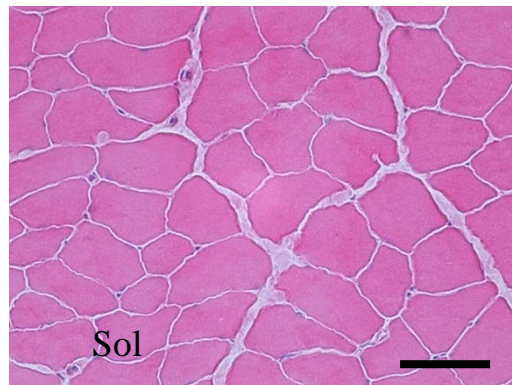


Fig. 1. Representative cross-sections of rat skeletal muscle stained with hematoxylin and eosin. A, 3.0-G hypergravity; B, control.; Sol, soleus muscle; Gas, gastrocnemius muscle; TA, tibialis anterior muscle; EDL, extensor digitorum longus muscle. Bars, 50 μm.

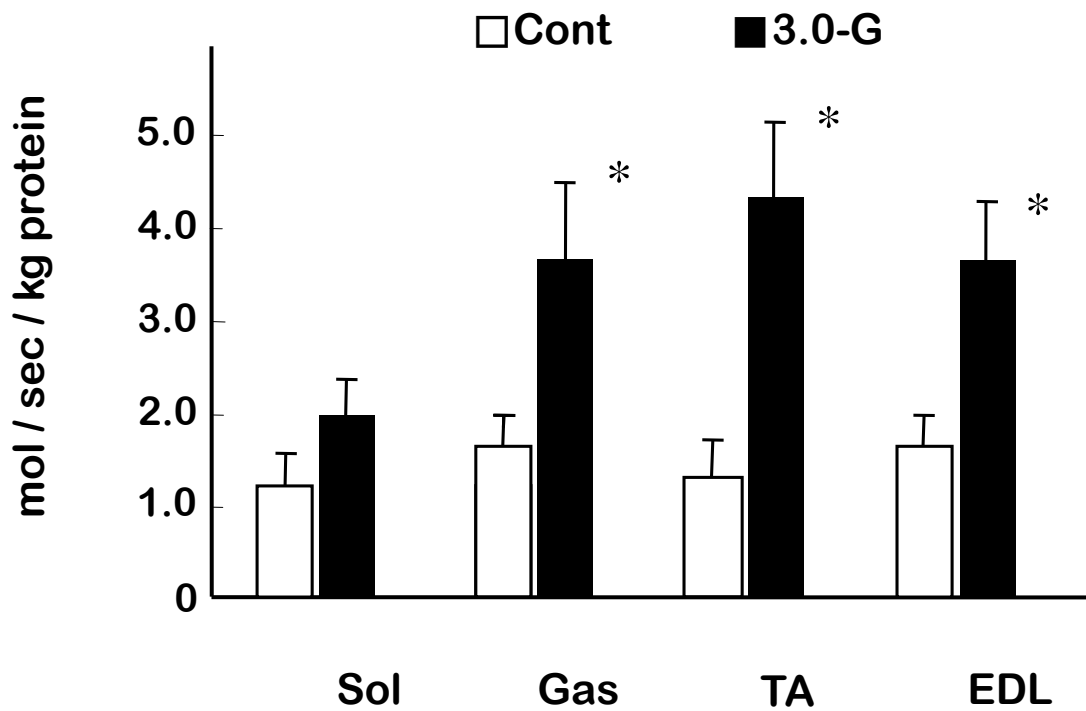


Fig. 2. Changes in  $\beta$ -glucuronidase activity in rat skeletal muscle. Cont, Control group, open column; 3.0-G, hypergravity group, closed column; Sol, soleus muscle; Gas, gastrocnemius muscle; TA, tibialis anterior muscle; EDL, extensor digitorum longus muscle. Values represent mean  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$  for 3.0-G vs. control.

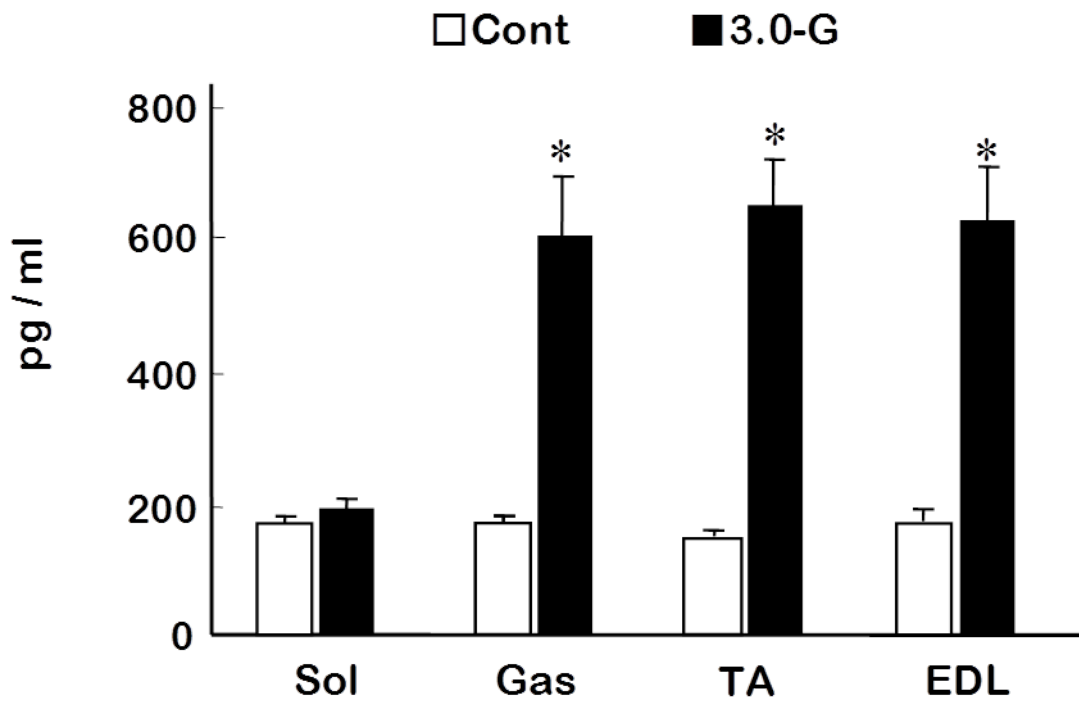


Fig. 3. Changes in tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) concentration in rat skeletal muscles. Cont, Control group, open column; 3.0-G, hypergravity group, closed column; Sol, soleus muscle; Gas, gastrocnemius muscle; TA, tibialis anterior muscle; EDL, extensor digitorum longus muscle. Values represent mean  $\pm$ SEM. \*P<0.05 for 3.0-G vs. control.

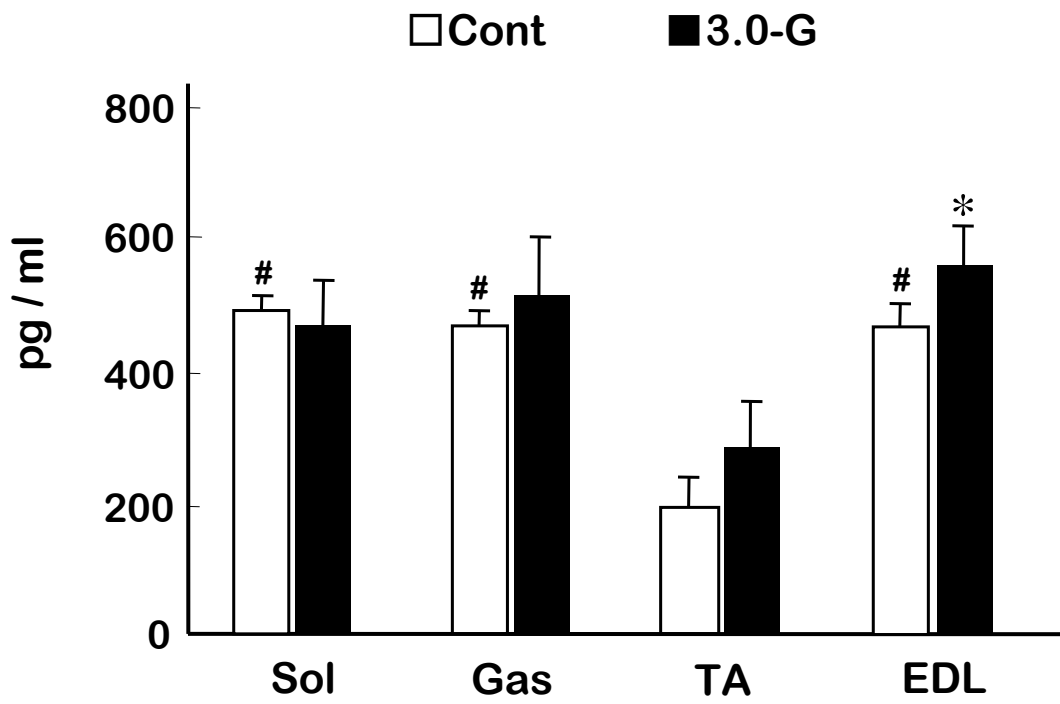


Fig. 4. Changes in Interleukin-6 (IL-6) concentration in rat skeletal muscle.

\*#P<0.05 vs. TA.

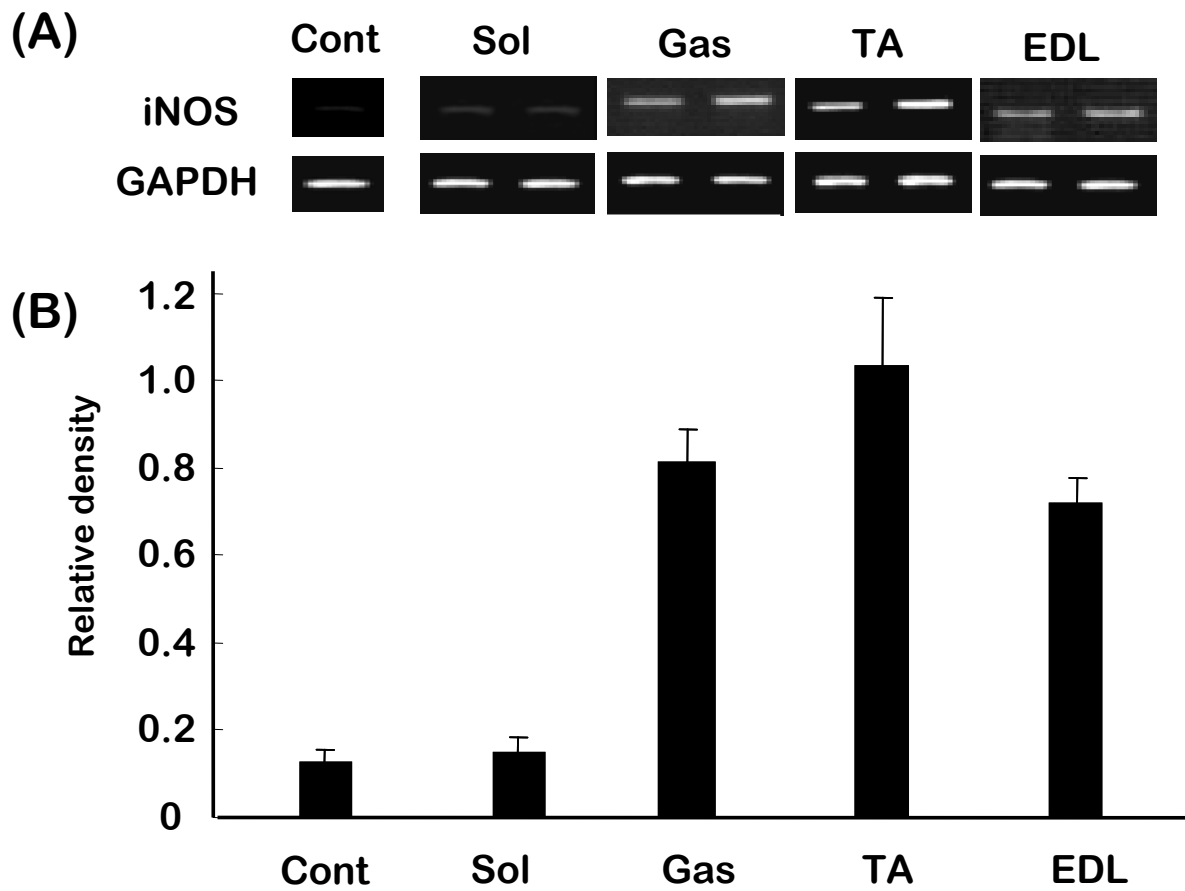


Fig. 5. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA (A) and densitometric analysis data (B) in rat skeletal muscle following 3.0-G hypergravity. The value is related to the optical density of GAPDH.

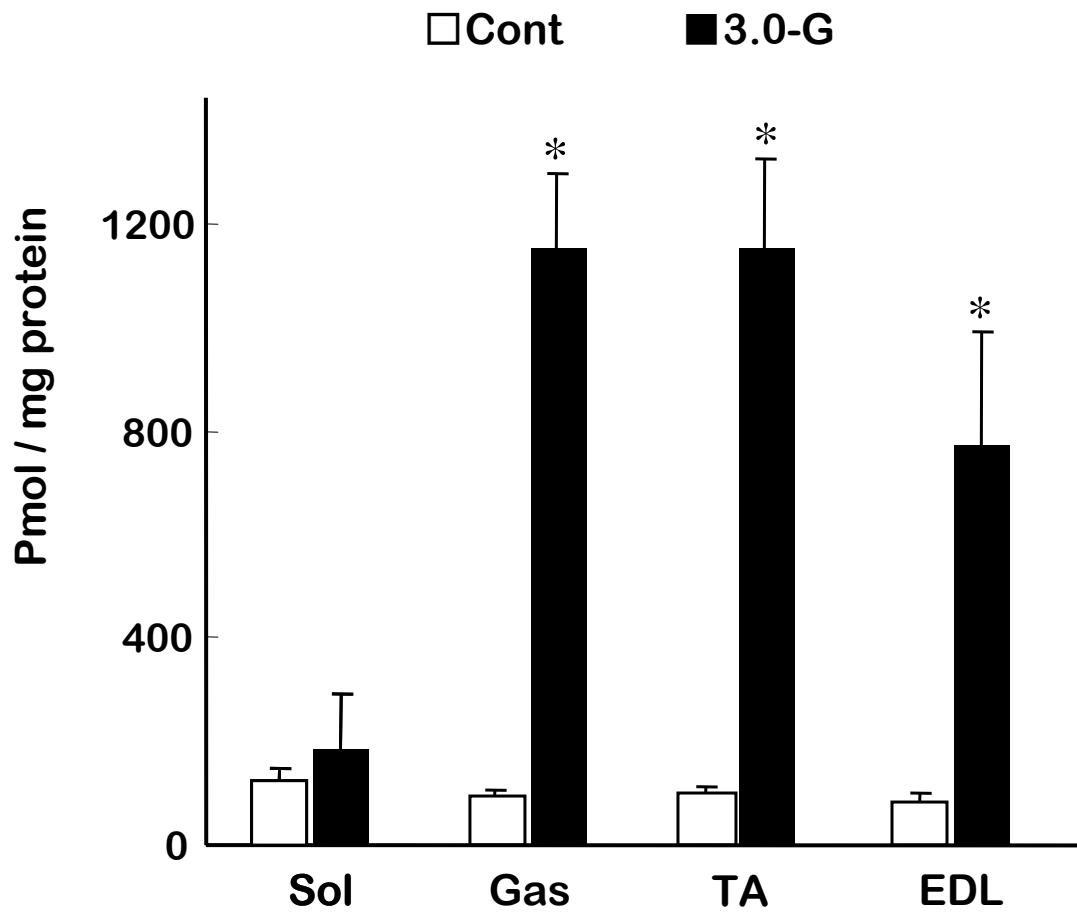


Fig. 6. Nitric oxide (NO) content in rat skeletal muscles.  
\*P<0.05 for 3.0-G vs. control.

## 2.3. 外力負荷

(論文Ⅲ)

### **Changes in nitric oxide and inducible nitric oxide synthase following stretch induced injury to the tibialis anterior muscle of rabbit**

#### 要約

麻酔下の New Zealand White Rabbits の下肢前脛骨筋遠位腱を露出させ、モーター軸にクリッピングした。モーター駆動により前脛骨筋にメカニカルな伸張性筋損傷を引き起こさせ骨格筋損傷モデルを作成し、NO 生成と骨格筋損傷の関連を検討した。伸張性筋損傷処置直後・4・12・24・48 時間後のラット骨格筋損傷モデルを作成しその変化を検討した。損傷筋における NO 生成は損傷直後より 4 時間後まで有意に上昇しその後 24 時間まで低下するが、48 時間後に再び有意な上昇を示した。また損傷筋では 4 時間及び 48 時間後に iNOS タンパク発現がみられ、iNOS 活性も 4 時間及び 48 時間後に二峰性の有意な上昇を示した。この上昇は非損傷筋に比べ有意に大きいものであり、観察期間全般においても損傷筋と非損傷筋の間には有意な差が示された。以上の結果より、伸張性筋損傷後に引き起こされる NO 生成は、骨格筋肉細胞の中に

生成される iNOS およびその活性増加によって増大することが示唆されたが、損傷後 24 時間以降に増加する NO 生成の役割は明確にされるには至らなかった。



## **(1) INTRODUCTION**

Nitric oxide (NO) generation occurs through the conversion of L-arginine to NO and L-Citrulline, which is controlled by NO synthases (NOS) (Moncada et al.,1991). There are three forms of NOS that catalyze NO production (Nathan et al., 1994). NO is a ubiquitous molecule involved in a variety of physiological functions including vascular regulation, neurotransmission, immune regulation and cell signaling (Reid et al.,1998; Reid et al.,2001; Tidball et al., 1998). NO is also known to have profound effects on skeletal muscle function, including contractility, blood vessel tone, blood flow, and satellite cell activation (Anderson et al., 2000; Kobzik et al.,1995; Moncada et al.,1991; Moncada et al.,1993). Resting skeletal muscle contains two constitutive types, neural NOS (nNOS), and to a lesser extent, endothelial NOS (eNOS) (Frandsen et al.,1996; Kobzik et al.,1994; Kobzik et al.,1995). The third or inducible form (iNOS) is expressed mainly in leukocytes and macrophages in response to inflammation. In contrast to eNOS and nNOS, iNOS can produce large amounts of NO over a prolonged period of time (Nathan et al.,1997; Xie et al.,1994), and skeletal muscle has been shown to induce iNOS mRNA and protein following endotoxin administration (Thompson et al.,1996). Because NO has both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties, several possible roles for NO in muscle injury have been postulated. For example,

leukocyte concentrations within muscle tissue following unloading and reloading can be decreased by NOS inhibitors (Joshin et al.,1999). Moreover, a recent study reported that rat skeletal muscle produced sustained increases in both iNOS activity and protein levels in response to crush injury (Rubinstein et al.,1998). In contrast to these effects of NO on inflammation, NO can also have direct effects on muscle function, growth, and repair (Tidball, 1995). However, the pathogenesis of acute muscle stretch injury and the factors that regulate inflammation and repair are not well understood. In order to clarify whether NO modulates either inflammation or regeneration/repair, or both, following muscle trauma, it would be important to simultaneously examine the time course for NO levels and nitric oxide synthase following muscle injury.

Stretch injury to skeletal muscle typically occurs following repeated stretch-contraction cycles of the joint and associated muscles and is a common problem for clinicians and patients. In this communication, we measured the time course for NO levels, iNOS protein content and iNOS activity in stretch-injured skeletal muscle, using an anesthetized rabbit model. We employed an isokinetic injury apparatus that quantifies tibialis anterior (TA) muscle-tendon shortening, while allowing us to generate a reproducible stretch injury similar to clinical muscle-tendon stretch injury in humans (Best et al.,1999).

## **(2) METHODS**

### **1) Animal care**

Thirty-three male New Zealand white rabbits (weight 2.7- 3.0 kg) were housed individually and fed food and water ad libitum in a temperature-controlled room on a 12:12 hour light-dark cycle. The University of Wisconsin-Madison Research Animals and Resource Center Review Committee approved the animal use protocol.

### **2) Injury Model and Protocol**

Our model of stretch-induced injury to skeletal muscle has been described (Best et al.,1999). Briefly, all animals were anesthetized with an intramuscular preparation of ketamine (100 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg), and acepromazine (3 mg/kg). A 6-mm incision was made over the dorsum of the right foot just distal to the ankle joint to isolate the tendinous portion of the TA. The peroneal nerve was isolated through a 4 mm skin incision at the knee. The animal was placed supine in the test apparatus and the muscle-tendon unit shortened 1.3 cm (Best et al.,1998) . With the muscle-tendon unit in the shortened position, the TA muscle was stimulated to tetany (Best et al.,1998<sup>1</sup>). Once muscle tetany was achieved, the ankle was plantarflexed through a 90° arc at 450°/sec. The torque-angular displacement-time behavior was recorded. A sham operation of skin

incisions was performed in the left foot and knee. The 4-h animals were maintained under anesthesia with 1 cc of i.m. Ketamine every 45 min until tissue harvest.

For the remaining four groups (12, 24 and 48 h), all skin incisions were closed with 4-0 Ethilon suture, and the animals were returned to their cages after recovery from anesthesia with unrestricted activity. Evaluation 7 days after single stretch-induced injury in this protocol demonstrated a functional deficit (percent ankle isometric torque; injured leg versus uninjured leg) of 47.5% +/- 5.4% (mean +/- SD) (Best et al.,1998<sup>2</sup>).

### **3) Tissue Sampling**

The entire TA muscle-tendon unit was surgically removed at its proximal attachment to the tibia and distal insertion into the foot. A one cm<sup>2</sup> block (approximately 2 g) of muscle tissue was removed from the myotendinous junction region of both the stretch-injured and sham-operated controls. This sample always contained the area of visible hematoma and maximum injury. The tissue block was cut and one section (1.8 g) was snap-frozen in liquid nitrogen. Animals were sacrificed with Beuthanasia (0.4 cc/kg), i.v., placed into the marginal ear vein immediately following muscle harvest. In addition to the thirty animals evaluated following injury, three rabbits were used to estimate baseline NO levels and iNOS activity. Measurements were made in both legs

of the three animals not exposed to stretch injury or skin incisions to ascertain the contribution of the surgical procedures to overall NO levels and iNOS activity.

#### **4) NO Content**

Samples were homogenized at 0 - 4°C in ice-cold 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) buffer (wt:vol of 1:10) with a motor-driven Potter-Elvehjem teflon glass homogenizer. Quantification of NO content was performed spectrophotometrically (Nims et al.,1996). A range of standard solutions (concentration: 0-30 μM NO) was prepared using KNO<sub>3</sub> as a standard. Because the Griess reagent measures only nitrite, and biological systems contain both nitrite and nitrate, addition of 0.01 U nitrate reductase (Sigma, St. Louis, MO) was added to each well, followed by addition of NADH (0.02 mM). Samples were read at 540 nm using a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and the results were expressed as pmol/mg protein. Pilot assays established inter/intraassay variability of less than 3% (data not shown).

#### **5) Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Protein Content**

SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in combination with an enhanced chemiluminescence plus (Amersham, Arlington Heights, IL) detection system

was used to determine iNOS protein content in skeletal muscle. Tissue samples were homogenized in 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, and 0.1% phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF). Relative amount of iNOS was determined utilizing an anti-iNOS (IgG1) antibody (Transduction Laboratories, San Diego, CA). Autoradiographic signals were assessed using a BioRad scanning densitometer (BioRad, Hercules, CA). Results are expressed in arbitrary optical density units.

#### **6) Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Activity**

Measurement of iNOS activity was performed by examination of the conversion of [<sup>3</sup>H]-arginine to [<sup>3</sup>H]-citrulline using the method of Thompson (1996). The reaction buffer contained 3 mM n-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-protein-ethanesulfonic acid (HEPES), 4 mM NADPH, 20 mM tetrahydrobiopterin, 20 μM flavin adenine dinucleotide (FAD), 20 μM flavin mononucleotide (FMN), 1 mM dithiothreitol (DTT), 4 μM L-arginine, 4 mM ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), and 2.0 mCi/ml L-[<sup>3</sup>H]-arginine (Amersham, Arlington Heights, IL). The reaction was incubated at 37°C for 1 hour, and then terminated by addition of buffer containing 40 mM HEPES, pH 5.2, 2 mM EDTA, and 2 mM EGTA. Samples were then applied to a 10 ml Dowex AG50WX-8 (Na<sup>+</sup>) column (BioRad,

Hercules, CA), and eluted with 40 mM HEPES. Effluent was collected in scintillation vials and quantified by liquid scintillation spectroscopy using a Wallac LKB 1211 Rack Beta counter (Wallac, Helsinki, Finland). 1 mM N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nonselective NOS inhibitor, served as a negative control to assess background activity and non-NOS-dependent conversion of L-[<sup>3</sup>H] arginine to L-[<sup>3</sup>H] citrulline. Results are expressed as picomoles per minute per microgram protein (pm/min/mg protein). Pilot experiments demonstrated inter/intra variability of less than 4%.

## **7) Statistical Analysis**

Means  $\pm$  SEM values were calculated for all data sets. Data were analyzed with a 2-way analysis of variance with repeated measures to evaluate the two main treatment effects, injury and time, and their interaction (StatView). The Fisher's Least Significant Difference post hoc test was used to locate the differences between means when the observed F ratio was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

### **(3) RESULTS**

#### **1) NO Content**

Baseline NO levels were approximately one third of sham-operated or injured tissue values (Fig. 1). And 0 h values were significantly higher than baseline ( $p < 0.05$ ). Sham-operated muscles had decreased NO content at 12, 24, and 48 h after surgery, as compared to 0 h (Fig. 1;  $p < 0.05$ , for all three time points). Stretch injured muscles showed decreased NO content at 24 h, as compared to 0 h injured muscles (Fig. 1;  $p < 0.05$ ). At 48 h, sham-operated muscle continued to have lower NO than at 0 h, whereas stretch-injured muscles recovered NO to resting levels and showed a 146% higher NO content compared to sham-operated muscles (Fig. 1;  $p < 0.05$ ).

#### **2) iNOS Content**

Figure 2A shows the immunoreactive levels of iNOS protein in sham-operated and injured muscles. Figure 2B shows densitometric quantification of iNOS protein. iNOS protein expression in injured muscles was not different from sham-operated muscles, at 0, 12, and 24 h post injury. However, iNOS protein in injured muscles at 4 and 48 h was significantly higher than their sham-operated counterparts ( $P < 0.05$ ).



Stretch injured muscles showed increased iNOS protein expression at 4 and 48 h, as compared to 0 h injured muscles (Fig. 2B;  $p<0.05$ ).

### **3) iNOS Activity**

Similar to iNOS protein content, iNOS enzyme activity was higher at both 4h ( $p<0.05$ ) and 48h ( $p<0.01$ ) in injured vs. sham-operated muscles (Fig. 3). The time course of iNOS enzyme activity in injured muscles displayed two peaks, with higher levels at 4 and 48 h after injury, as compared with 0 h ( $p<0.05$ ) (Fig. 3). At 24 h, injured and sham-operated muscles had decreased iNOS activity, as compared to 0 h ( $p<0.05$ ) (Fig. 3). iNOS activity was fully inhibited by the addition of L-NAME.

#### **(4) DISCUSSION**

The major finding in the current study was that stretch-injured muscles showed an increase in NO levels 48 h after injury compared to sham-operated tissues. During the initial 24 h after injury, similar changes in NO levels were found in sham-operated muscles and injured muscles. No significant increase in NO levels was observed in sham-operated muscles 48 h after surgery, whereas a significant increase in NO levels was noted in injured muscles 48 h after injury. This finding may be of significance for muscle healing for several reasons. First, adequate levels of intracellular NO may be an important prerequisite for muscle healing after injury as it has been postulated that NO plays a central role in satellite cell activation and muscle regeneration (Moncada et al.,1991; Nguyen et al.,2003). Consistent with this role, various NO donors have been shown to stimulate myoblast proliferation in vitro (Ulibarri et al.,1999). Second, NO may provide some control on the extent of muscle inflammation and repair through its influence on leukocyte infiltration. In addition to influencing myofiber regeneration, NO has been shown to affect collagen synthesis, as NO generators can have both proliferative and inhibitory effects on the mitotic activity of fibroblasts (Evans et al.,1996). Finally, NO is a well-known vasodilative agent and conceivably increases blood flow to recovering myocytes following stretch injury (Thompson et al.,1996).

Taken together, NO or intermediate(s) may exert multiple biological effects to facilitate healing of stretch-injured skeletal muscle in our model.

During the initial 24 h post-injury, NO levels were higher compared with baseline levels, in both sham-operated and stretch-injured muscles. However, as noted in Figs. 2 and 3, the source of increased NO during the initial 4 h after injury or operation was different between injured muscles and sham-operated muscle, respectively. Although iNOS protein was not present in sham-operated muscles, injured muscles showed enhanced expression of iNOS protein at 4 h and 48 h, resulting in enhanced activity of iNOS, which in turn, increased NO production and recovered NO levels. Thus, enhanced expression of iNOS protein appears to be the main mechanism. The observed iNOS-dependent increases in NO levels at 4 h and 48 h after injury may be specific phenomenon in stretch-injured muscles. On the other hand, in sham-operated muscles, there was no increase in NO after the initial reduction. The initial sham procedure involving two skin incisions in sham-operated leg, therefore, may impose a systemic stress response to the affected region. Alternatively, the higher initial NO levels compared with the baseline animals may also have resulted from a general systemic blood-borne response from the surgery and injury to the opposite leg. Sustained elevation in blood NO levels have been noted for up to 48 hours following abdominal

surgery in a rat model (Shijo et al.,1998). However, iNOS enzyme activity for this injurious cascade is not known.

The mechanism by which higher levels of iNOS protein were observed in injured compared to sham-operated muscles at 4 and 48 hour post injury in our model remains unclear at present. One possibility is that the enhanced expression of iNOS was caused by infiltration and activation of neutrophils, which are known to release inflammatory cytokines (Tsukahara et al.,1998). Consistent with this hypothesis, our previous study showed an increase in MPO activity, a biochemical marker for neutrophil presence, in injured muscles at both 4 and 48 h following injury (Brickson et al.,2001). Neutrophils undergo the respiratory burst to generate reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules to activate nuclear factor (NF-kappaB) and in turn, iNOS activation (Pan et al.,2000).

Using a similar injury protocol, we previously reported an increase in the rate of oxidant production at 24 h in both sham-operated and stretch-injured muscles (Brickson et al.,2001). This increase paralleled an increase in xanthine oxidase activity, suggesting that  $O_2^{\bullet-}$  could be the underlying oxidant species. Therefore, it is possible that in the injured muscle, the decline in NO levels during the initial 24 h post-injury may reflect increased NO consumption within muscle cells due to increased oxidant generation.

Indeed, it is well known that NO can function as both a pro-oxidant (Nguyen et al.,2003; Wink et al.,2001) and an antioxidant (Tidball, 1995; Nguyen et al.,2003) molecule depending on the physiological condition as well as the time following various forms of muscle damage. One interesting possibility is that the decreased total NO species (including nitrate and nitrite) observed in the first 24 hours in the current study was due to a depletion of endogenous NO serving as a  $O_2^{\bullet-}$  scavenger before de novo synthesis took place during the later phase of the post-injury time course. Further studies are needed to test this hypothesis.

Our results should be interpreted in light of the literature and previous studies on NO and muscle trauma. Rubinstein et al. have shown that iNOS protein and mRNA are upregulated in response to injury using a rat muscle crush model (Rubinstein et al.,1998). Their main finding was that iNOS mRNA was increased to its greatest extent at 6 hours after injury and remained elevated to a lesser extent through 72 hours post-injury. iNOS protein content was increased gradually beginning at 24 hours and reaching a maximum at 72 hours. These results are similar to some extent with our findings of increased iNOS protein content at 48 hours. Our finding that increased iNOS protein and activity at 4 hours post injury is in contrast with Rubinstein et al. and may be related to differences in injury models and species. Others have shown a less

sustained increase in iNOS mRNA and iNOS protein following endotoxin administration (Nguyen et al.,2003).

In conclusion, acute stretch injury to skeletal muscle can trigger a distinct time course for tissue NO levels along with parallel changes in iNOS protein and iNOS enzyme activity. NO production early following injury may be slower than its consumption resulting in decreased tissue NO levels. However, by 48 h following injury NO levels are elevated in stretch-injured skeletal muscle. The significance of the increased levels at 48 h is a topic of ongoing study.

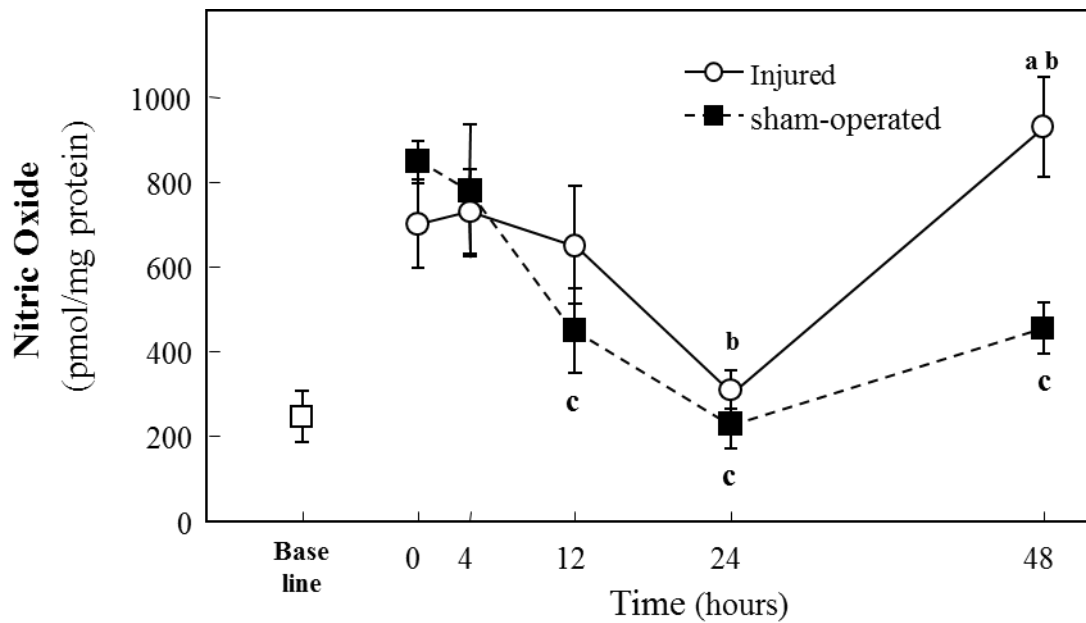


Fig 1. Changes in NO content at 0, 4, 12, 24, and 48 hours after a single stretch injury or sham-operation in rabbit TA. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM for six animals at each time point. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , injured vs. sham-operated. <sup>b</sup> $p < 0.05$ , time effect in injured leg: 24 and 48 h vs. 0 h. <sup>c</sup> $p < 0.05$ , time effect in sham-operated leg: 12, 24 and 48 h vs. 0 h.

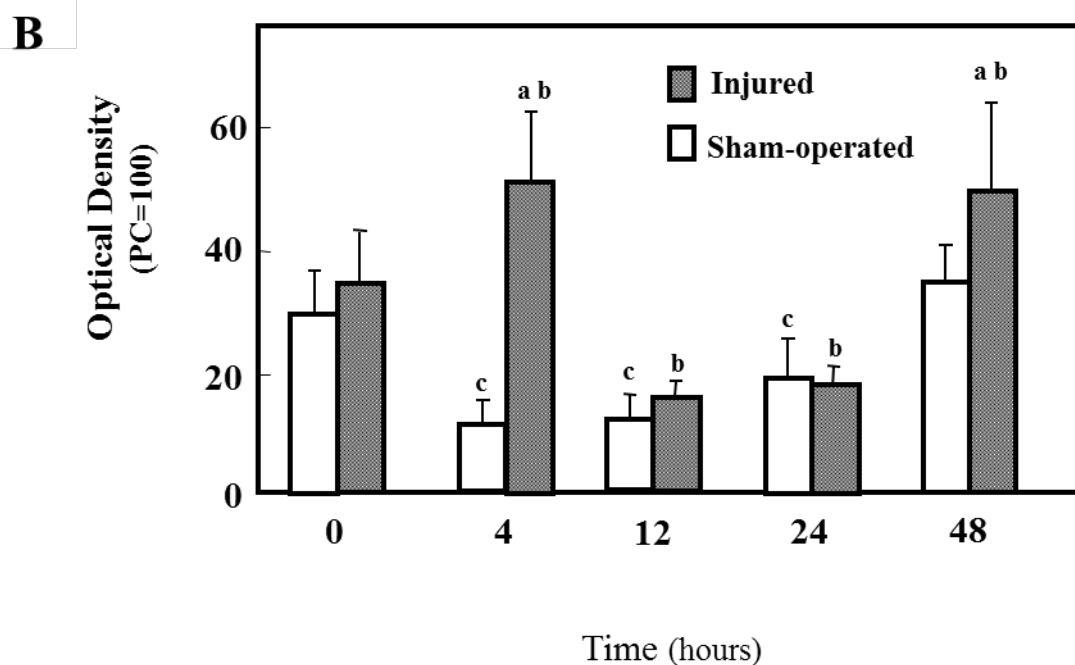
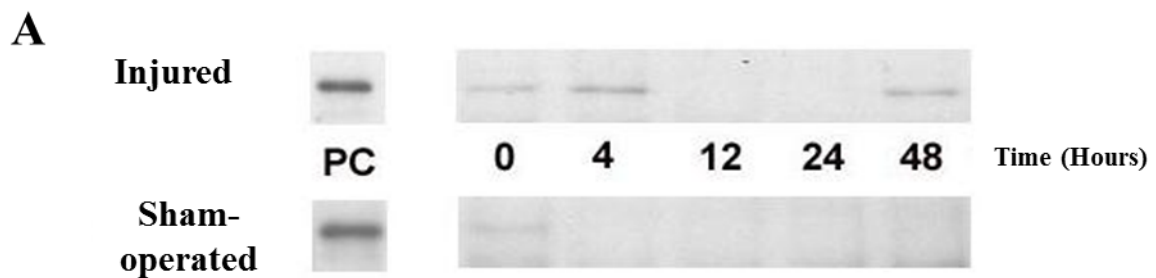


Fig. 2. Changes in iNOS protein expression at 0, 4, 12, 24, and 48 hours after a single stretch injury or sham operation in rabbit TA. (A) A typical western blotting analysis of the muscles obtained from rabbits at 0, 4, 12, 24, and 48 h after the single stretch injury and sham-operated muscles. Macrophage lysate was used as positive control (PC). (B) Relative abundance of iNOS protein normalized to PC levels in rabbit TA muscle at various time points after injury using for six animals muscle samples. <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , injured vs. sham-operated. <sup>b</sup>  $p < 0.05$ , time effect in injured leg: 4, 12, 24, and 48 h vs. 0 h. <sup>c</sup>  $p < 0.05$ , time effect in sham-operated leg: 12, 24 and 48 h vs. 0 h.



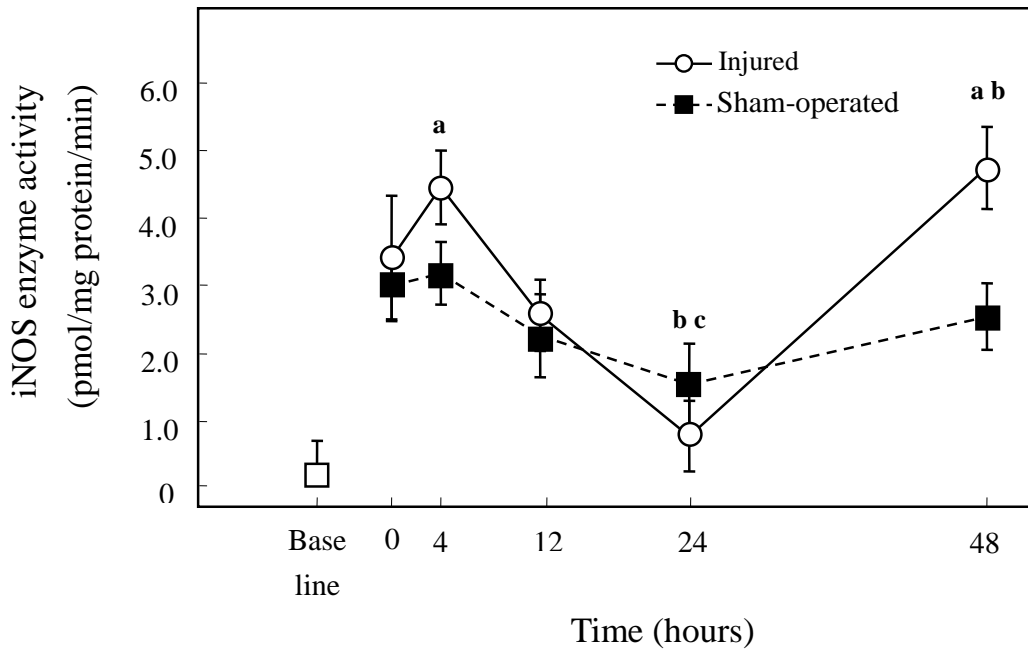


Fig. 3. Changes in iNOS activity at 0, 4, 12, 24, and 48 hours after a single stretch injury and sham-operated in rabbit TA. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM for six animals at each time point. <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , injured vs. sham-operated. <sup>b</sup>  $p < 0.05$ , time effect in injured, 24 and 48 h vs. 0 h., <sup>c</sup>  $p < 0.05$ , time effect in sham-operated, 24 h vs. 0 h.

### 第3章 外力負荷時の NO 生成と筋損傷治癒

(論文IV)

#### **Role of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in rat skeletal muscle**

##### 要約

電気刺激とモーター駆動によりメカニカルな骨格筋損傷を引き起こした下肢前脛骨筋を用い、骨格筋損傷後の治癒に及ぼす NO の役割について検討した。ラットは単に損傷を起こさせたコントロール群と、NOS 合成阻害剤(L-NAME)を投与させた L-NAME 群に分け、各群とも下肢前脛骨筋にメカニカルな損傷を起こさせた後、7 日間の治癒過程における損傷治癒動態を観察した。損傷後の筋組織画像では、損傷の頻度をあらかず白血球の浸潤は損傷後より増加し 3 日後をピークに減退、7 日後には大きく減少した。NO 生成量も損傷 3 日後に大きく上昇しその上昇は 7 日後まで続く傾向を示した。しかしながら、損傷 1 日後の NO 生成量は一時的に減少していることがわかった。損傷による NO 生成は誘導型 NO 合成酵素(iNOS)に起因するところが強く、通常の NO 生成量の数倍にも及ぶことも同時に示唆された。骨格筋細胞の損傷をあら

わす指標とされる  $\beta$ -glucuronidase はコントロール群では損傷 3 日後をピークに減少するものの、L-NAME 群では損傷 7 日後まで上昇し続けた。組織画像による組織ダメージを見ると、損傷 7 日後のコントロール群は L-NAME 群に比べ組織の改善が進んでいることが観察された。またコントロール群において、骨格筋細胞の分解を示す m-calpain 活性および遺伝子発現が損傷 1 日目に増加し、その後は減衰した。またタンパク合成酵素である Myogenin mRNA は損傷 3 日に上昇した。m-calpain は NO により抑制されることが知られており、損傷 1 日後の NO 生成の抑制は、損傷筋分解の促進に関連することが示唆された。以上の結果により、NO は伸張性の骨格筋損傷による筋の治癒過程において、組織の破壊および構築の両者に関連していることが示唆された。

## (1) INTRODUCTION

Unaccustomed exercise involving eccentric contractions (ECC) induces skeletal muscle damage including decreased muscle strength, muscle edema, and loss of function. The sequence of events during skeletal muscle regeneration has been well characterized by remodeling of the extracellular and intracellular protein networks, which is maintained by a concerted regulation of the balance between protein synthesis and degradation.

It is well known that nitric oxide (NO) plays an important role in regulating blood flow and glucose metabolism (Kingwell,2000) as well as the cellular redox state of skeletal muscle (Jackson,2005). NO may also influence expression of antioxidant enzymes as well as cellular inflammation in exercised skeletal muscles (Huang et al.,2009). NO is produced *in vivo* through the conversion of L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthase (NOS). Skeletal muscle normally expresses the nNOS and eNOS isoforms of NOS. iNOS is also expressed in skeletal muscle in inflammatory conditions, and activation of iNOS can elicit NO in quantities sufficient to stimulate the inflammatory process (Alderton et al.,2001; Soneja et al.,2005; Sakurai et al.,2005; Sriwijitkamol et al.,2006; Filippin et al.,2011<sup>1</sup>; Filippin et al.,2011<sup>2</sup>). Because NO has both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties, several possible roles for NO

in skeletal muscle damage have been postulated. NO produced endogenously by skeletal muscle and other cell types has the potential to inhibit calpain activity and cytoskeletal proteolysis (Koh et al.,2000). The possibility that NO plays a role in skeletal myogenesis is suggested by observations that it participates in satellite cell activation (Anderson,2000; Tatsumi et al.,2002). Moreover, iNOS is a muscle-injury inducer both *in vitro* and *in vivo* that triggers the loss of MyoD mRNA (Di Marco et al.,2005). Thus, the precise role of NO in skeletal muscle damage and repair is not completely known.

Calpain proteins are a family of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated non-lysosomal proteases that have been reported to cleave muscle proteins. Three calpain family members are well characterized in skeletal muscle.  $\mu$ -calpain and m-calpain are ubiquitously expressed and exhibit *in vitro* sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  in the micro-molar and milli-molar range, whereas n-calpain exhibits sensitivity in the more physiologically feasible nano-molar  $\text{Ca}^{2+}$ -range and is expressed predominantly, but not exclusively in skeletal muscle (König et al.,2003). NO modulates the mechanical behavior of skeletal muscle cells through a decrease in calpain-mediated cytoskeletal proteolysis (Zhang et al.,2004). Thus, NO inhibition of calpain may provide a potential therapeutic approach to protect from skeletal muscle injury (Koh et al., 2000).

In adult skeletal muscle, myogenic differentiation factor D (MyoD) and myogenin are both expressed at relatively low levels (Li et al.,1993; Costa et al.,2007). However, in response to injury, expression of MyoD is related to activation and proliferation of satellite cells, whereas myogenin reflects terminal myoblast differentiation (Tajbakhsh,2009). Several studies have aimed to study the expression of MyoD or myogenin in skeletal muscle, but to the best of our knowledge, no study has shown their presence in damaged skeletal muscle specifically after sessions of ECC (Kadi et al.,2004).

In this study, we observed the repair process for seven days after mechanically damaging the tibial anterior (TA) muscles of rats treated with NO synthesis inhibitors (L-NAME). The purpose of the present investigation was to examine the role of NO in skeletal muscle regeneration following ECC. Specifically, we were interested in the time course for regeneration and the potential role for factors such as calpain and their effects on NO and muscle regeneration.

## **(2) METHODS**

### **1) Animal Care**

Forty-eight male Wistar rats (body wt 250 to 350 g) were housed individually and fed food and water ad libitum in a temperature-controlled room on a 12:12 hour light-dark cycle. All experiments on animals were performed following approval by the Tokyo University of Agriculture Research Animals and Resource Center Review Committee.

### **2) Experimental protocol**

Following 1 wk of acclimation in the laboratory, animals were randomly divided into two groups: one group (n=24) received N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME; nitric oxide synthase inhibitor, 35 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> ) in drinking water starting 3 days before ECC and continuing until the end of the experiment. A second (n=24) control group received tap drinking water during the experiment.

### **3) Eccentric contraction injury induction**

The eccentric exercise was performed according to a condition of Kano *et al* [20]. Briefly, during eccentric exercise and all surgical procedures, the rats were anesthetized

with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (70 mg kg<sup>-1</sup> i.p.) and supplemental doses of anesthesia were administered, as needed. The right tibialis anterior (TA) muscle was stimulated electrically via a surface electrode (10 V stimulation, 100 Hz frequency, 700 msec stimulation period i.e., 70 pulses). We confirmed that maximum muscle tension was achieved by electrical stimulation of a surface electrode (100 Hz, < 10 V). In the resting condition before ECC, the right foot was attached to the clamp unit and the plate was connected to the electromotor system (Model RU-72, NEC medical systems). The right ankle joint was maintained at 50 degrees as the initial angle and during electro-stimulation of the TA muscle, the electromotor was rotated at an angular velocity of 260 degrees s<sup>-1</sup> to 180 degrees of the ankle joint to lengthen the dorsiflexor muscle group. The muscle tension generated during ECC was monitored using a strain gauge that was incorporated into the plate fixing the foot. The strain gauge was calibrated using precision calibration weights that spanned the expected range of strains. The right TA muscle was subjected to 40 repeated ECCs. The TA muscle undergoing ECC treatment was isolated at 0,1,3 and 7 days. Animals were divided into two groups for each of the 4 time points: (1) ECC/-L-NAME, no L-NAME infusion (n=6 on each day); (2) ECC /+L-NAME (n=6 on each day). An



unexercised contralateral limb with and without L-NAME infusion served as a respective control muscle at each time point.

#### **4) Histological evaluation for muscle damage**

After the ECC protocols, the TA muscles of both legs were carefully dissected and the mid-belly region cut transversely to the long axis of the muscle. The tissue blocks were rapidly frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. Transverse 10  $\mu\text{m}$  cross sections were made with a cryostat (Leica, CM1510) at  $-20^{\circ}\text{C}$  and stained with hematoxylin-eosin (HE) to examine the histological features of muscle damage. To avoid sampling bias, each section was sub-sampled at three different regions (anterior, central, posterior) and each of these fields were analyzed in all muscles. Muscle fiber damage was determined by a point-counting method using a  $24 \times 33$  mounted grid (i.e., 792 points total; one square =  $30 \times 30 \mu\text{m}$ ) on microscopic fields. Damaged fibers were defined as those with infiltration of inflammatory cells, pale staining of the cytoplasm, swollen appearance. Muscle damage was expressed as a percentage of counted grid squares.

#### **5) $\beta$ -glucuronidase activity assay**

$\beta$ -glucuronidase activity was assayed in essence according to Koskinen *et al* [21]. Briefly, 450  $\mu$ l 0.1 M acetate buffer, pH 4.2, was added to 50  $\mu$ l supernatant from muscle homogenate and incubated 5 min at 37°C. 250  $\mu$ l substrate (5 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide, Sigma) was added and incubated 18 h at 37°C. After overnight incubation 1.5 ml 0.1 M glycine buffer (ice cold), pH 10, was added. The tubes were centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C. The absorbances were measured at the wavelength 420 nm. The results were calculated per soluble protein and incubation time. Protein concentration was measured using a commercial kit (Bio-Rad).

## **6) NO Content**

Samples were homogenized at 0 - 4°C in ice-cold 0.1 M  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  (pH 7.4) buffer (wt:vol of 1:10) with a motor-driven Potter-Elvehjem teflon glass homogenizer. Quantification of NO content was performed spectrophotometrically [22]. A range of standard solutions (concentration: 0-30  $\mu$ M NO) was prepared using  $KNO_3$  as a standard. Because the Griess reagent measures only nitrite, and biological systems contain both nitrite and nitrate, addition of 0.01 U nitrate reductase (Sigma, St. Louis, MO) was added to each well, followed by addition of NADH (0.02 mM). Samples were read at 540 nm using a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and

the results were expressed as pmol/mg protein. Pilot assays established inter/intraassay variability of less than 3% (data not shown).

## **7) Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) Analysis**

Total RNA was prepared from the skeletal muscles using ISOGEN (NIPPON GENE, Tokyo, Japan). First-strand complementary DNA was obtained by incubating total RNA samples (2 µg) with reverse transcriptase (Superscript II, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) in the reaction mixture (18 µL). The reverse transcription product (1µL) was subjected to polymerase chain reaction (PCR) using Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ). Twenty to thirty cycles of amplification were carried out using the following conditions for each cycle: denaturing at 94°C for 1 minute, annealing at 72°C for 2 minutes, and extension at 72°C for 3 minutes. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels containing ethidium bromide. The intensity of the bands was estimated by scanning with a Light-Capture Scanner (ATTO, Tokyo, Japan), and the optical density of each band was analyzed with the CS Analyzer (ATTO). The primers used are described as follows:

Myo D forward: 5' –CTACAGCGGCGACTCAGACG- 3'

Myo D reverse: 5'-AGGATGTAGGCCGGGGTT- 3'

Myogenin forward: 5' –ACTACCCACCGTCCATTCAC- 3'

Myogenin reverse: 5'-TCTCTGTCACTCACGGGGCT- 3'

GAPDH forward: 5'-CCAAAAGGGTCATCATCTCC - 3'

GAPDH reverse: 5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTCAC- 3'

## **8) Solution calpain assay**

Calpain activity was measured as described (Graham-Siegenthaler et al.,1994). Briefly, 0.25 unit m-calpain was solubilized in 0.4 ml 50 mM Tris · HCl, pH 7.4, containing 1 mM DTT, 5 mM CaCl<sub>2</sub> or EDTA, and 0.5% -casein. Samples were preincubated with varying concentrations of calpain inhibitor I for 15 min on ice. All samples were then incubated at room temperature for 30 min, and proteolysis was stopped by addition of 0.3 ml 10% trichloroacetic acid. Samples were placed on ice for 15 min, centrifuged for 15 min at 12,000 g, and the A280 of the supernatant was measured. Calpain activity was defined as the Ca<sup>2+</sup>-dependent increase in A280.

## **9) Data and statistical methods**

All values are represented as means ± SE. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and post-hoc Scheffe test using the Prism (Version 4.0). Statistical

significance was accepted at  $p < 0.05$ .

### **(3) RESULTS**

#### **1) Muscle Histology**

In the control and 0 day muscles, myofibers demonstrated no visible evidence of muscle inflammation. In contrast, typical histological lesions appeared in the ECC muscle fiber around 1 to 3 days (Fig.1). Area percentage of inflammation and regeneration muscle fibers was determined by microscopic fields (Table 1). On 1 day after ECC, some myofibers were swollen (ECC/-L-NAME: 5.2 +/- 2.2%, ECC/+L-NAME: 6.1 +/- 1.5% of total fiber area). On 3 day, myofiber disruption was evident and the extent of damaged fiber area was significantly increased (ECC/-L-NAME: 43.1 +/- 8.5% of total fiber area, ECC/+L-NAME: 35.7 +/- 7.4% of total fiber area,  $p < 0.01$  vs. Day 0). Muscle regeneration was observed at 7 days following ECC, characterized by small diameter fibers with multiple central nuclei (ECC/-L-NAME: 6.5 +/- 2.3% of total fiber area). Animals infused with L-NAME had significant difference in regeneration at Day 7 (ECC/+L-NAME: 3.7 +/- 1.4% of total fiber area,  $p < 0.05$  vs. ECC/-L-NAME).

#### **2) $\beta$ -glucuronidase activity**

$\beta$ -glucuronidase activity was measured to provide us with an indirect assessment of muscle damage (Fig.2).  $\beta$ -glucuronidase activity was elevated 3 days after ECC in all groups, the increase was more pronounced in ECC/-L-NAME muscles than ECC/+L-NAME ( $p < 0.05$ ). ECC/-L-NAME muscles showed increased  $\beta$ -glucuronidase activity at 3 days after ECC, as compared to 0, 1 and 7 day ( $p < 0.05$ ). However, in ECC/+L-NAME muscles,  $\beta$ -glucuronidase activity increased continuously for 7days.

### **3) NO Content**

ECC/-L-NAME muscles showed decreased NO content at 1day, as compared to 0,3 and 7 days muscles ( $p < 0.05$ ) (Fig.3). Baseline NO levels, in ECC/+L-NAME treated animals were approximately 25% of those of in ECC/-L-NAME group For all time points, ECC/-L-NAME values were significantly higher than ECC/+L-NAME ( $p < 0.05$ ).

### **4) Calpain activity**

In ECC/+L-NAME muscles, calpain activity had no change with control muscles (Table 2). One day after ECC, Calpain activity was significantly increased in

ECC/-L-NAME compared with control muscles. but activity returned to the level of control muscles at 3 and 7 days.

### **5) Myogenin gene expression**

Following ECC, myogenin mRNA levels in ECC/-L-NAME muscles significantly increased approximately 4-fold after 3 and 7 days compared with the control condition (Fig.4). In ECC/+L-NAME muscles, myogenin mRNA levels were increased only on Day 7. Furthermore, L-NAME treatment resulted in a significant decrease in myogenin expression on Day 0 and Day 3 ( $P < 0.05$ ).

### **6) MyoD gene expression**

In ECC/-L-NAME muscles, MyoD mRNA expression increased at Day 1 ( $p < 0.05$ ) and peaked at Day 7 (~2.8-fold,  $P < 0.01$ ) (Fig.5). With ECC/+L-NAME treatment MyoD mRNA level was higher on Day 3, but significantly lower on Day 7 compared to that in ECC/-L-NAME ( $P < 0.05$ ).



#### **(4) DISCUSSION**

NO production is known to increase dramatically in injured skeletal muscle (Moncada et al.,1991; Moncada et al.,1993; Kobzik et al.,1995; Anderson,2000). In addition, previous studies have shown that a decrease in NO accompanies inflammation and recovery after muscle injury (Tidball,1995; Filippin et al.,2011<sup>1</sup>; Filippin et al.,2011<sup>2</sup>). However, there are many uncertainties regarding the role that NO plays in recovery after muscle injury. In this study, we examined the relationship between muscle NO levels resulting from altered NO synthesis and regeneration markers after eccentric contraction injury using a rat TA eccentric muscle injury model. The major finding in the current study was that NO dynamics have important implications in the regulation of various factors during skeletal muscle regeneration following damaging eccentric muscle contractions.

In our previous study, we reported that intramuscular NO concentration after injury exhibited a bimodal response (Sakurai et al.,2005). In the current study, we reproduced this NO bimodality by showing a decreased NO concentration a day after ECC injury followed by an increase on Day 3. On the other hand, the higher initial NO levels on Day 0 compared with the control muscles may also have resulted from a general

systemic blood-borne response from the injury as well as the surgery. The histological changes shown in Fig. 1, where muscle fiber damage caused by ECC on Day 1 through Day 3 began to recover by Day 7 in animals with normal NO, but recovery was delayed in the NO-deprived animals suggests to us that adequate NO exerts a crucial effect on muscle recovery after ECC-induced injury. Several studies have indicated that iNOS-derived NO is an important homeostatic regulator of leukocyte recruitment in the inflamed microcirculation, suggesting that one of its functions may be to act as an anti-inflammatory agent during inflammation (Hickey et al.,1997).

Muscle injury was indirectly assessed by measuring  $\beta$ -glucuronidase activity. This marker is a reliable indicator of necrosis caused by exercise-induced muscle injury (Salminen,1985; Komulainen et al.,1998; Komulainen et al.,1999). In the ECC/-L-NAME group, ECC-triggered high  $\beta$ -glucuronidase activity declined on Day 7 in the presence of NO, whereas in ECC/+L-NAME rats it continued to increase and almost doubled the level seen in ECC/-L-NAME rats. Hence, it may be that NO affected the balance between necrosis and apoptosis. This finding is in accordance with previous studies on the development of apoptosis due to ECC (Enns et al.,2008; Sudo et al.,2009).

The mRNA levels of MyoD which are the activity and the proliferation marker of a satellite cell, and myogenin which is the marker of myotube production, were both affected by the presence of NO. The expression of MyoD contributes to satellite cell proliferation (Tidball et al.,2007). When satellite cell proliferation enters the differentiation arrest step, the expression of myogenin is induced, and satellite cells differentiate into myotube cells. This stimulates maturation of myotube cells to become muscle fibers (Sassoon et al.,1989). In this study, since myotube cells were found in large numbers in the tissue 3 days following ECC and the administration of L-NAME, it can be assumed that satellite cell proliferation and differentiation occurred. Under normal conditions, control of muscle cell differentiation that occurs after ECC injury is considered to be a cause of the significant increases in the expression of MyoD a day following injury and in the expression of myogenin 3 days after injury. An increase in NO suppresses MyoD (Di Marco et al., 2005). Our results also showed that as endogenous NO increased on Day 3, MyoD was suppressed. These findings suggest that NO contributes to the time difference between the expression of MyoD and myogenin. Ulibarri *et al.* (1999) demonstrated that myoblast proliferation is stimulated by sodium nitroprusside (SNP) and S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP), but the addition of high concentrations of NO donor agents suppressed this stimulation. It was assumed

that since SNP is a calcium channel blocker, it had an effect on the expression of satellite cell proliferation markers according to the difference in calcium/calmodulin regulation. Myogenin and MyoD also contribute to regeneration in muscle fiber (Grounds et al.,1992). Myogenin plays an important role in the reconstruction of damaged neuromuscular connections (Sakuma et al.,1999) and the differentiation of terminal myoblasts (Tatsumi et al.,2002). There is a possibility that skeletal muscle damage accompanies regeneration since this accounts for the fact that the expression of myogenin increased significantly from 3 days after injury.

Calpain plays an important role in the breakdown of proteins in skeletal muscle, inflammation, and induction during regeneration (Koh et al.,2000). NO inhibits calpain activity. In addition, it has been reported that calpain reduces the expression of myogenic regulatory factors (MRFs), including myogenin (Kook et al.,2008). The present study found further evidence to support these previous findings. The increase in calpain concentration a day after injury accelerates the disassembly of broken down muscle protein, and that it is synchronized with satellite cell proliferation, as indicated by the expression of MyoD.

In summary, the results of the present study demonstrated the important role of NO in recovery after muscle injury. It was suggested that NO activation after injury, exerts an

effect on the expression of MRFs that occur during recovery and that it makes a significant contribution to the reconstruction of tissue. Furthermore, there is a possibility that NO plays an important role in regulating both the destruction and construction of tissue during recovery after skeletal muscle injury. Further research is required since NO dynamics has important implications in the regulation of various factors during skeletal muscle regeneration.

Table 1: Area percentage of inflammation and regeneration muscle fibers.

		Control	1 day	3 day	7 day
Inflammation fibers area (%)	ECC/-L-NAME	0.0 ± 0.0	5.2 ± 2.3	43.1 ± 8.5**	0.0 ± 0.0
	ECC/+L-NAME	0.0 ± 0.0	6.1 ± 1.5	35.7 ± 7.4**	0.0 ± 0.0
Regeneration fibers area (%)	ECC/-L-NAME	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 2.3*
	ECC/+L-NAME	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.7 ± 1.4

Control: contralateral (left) no-ECC muscle. Values represent mean ± SEM, \*p<0.05; significantly different from ECC/+L-NAME. \*\*p < 0.01; significant difference from control.

Table 2: Calpain Activity.

	Control	0 day	1 day	3 day	7 day
ECC/-L-NAME	13.4 ± 1.8	12.8 ± 1.9	26.3 ± 3.7*	12.2 ± 4.4	14.2 ± 2.5
ECC/+L-NAME	12.8 ± 1.6	15.3 ± 3.2	16.6 ± 2.8	15.3 ± 3.5	17.9 ± 4.6

Control:contralateral (left) no-ECC muscle . Valued represent mean ± SEM for five animals at each time point, \*p<0.05; significantly different from control values.

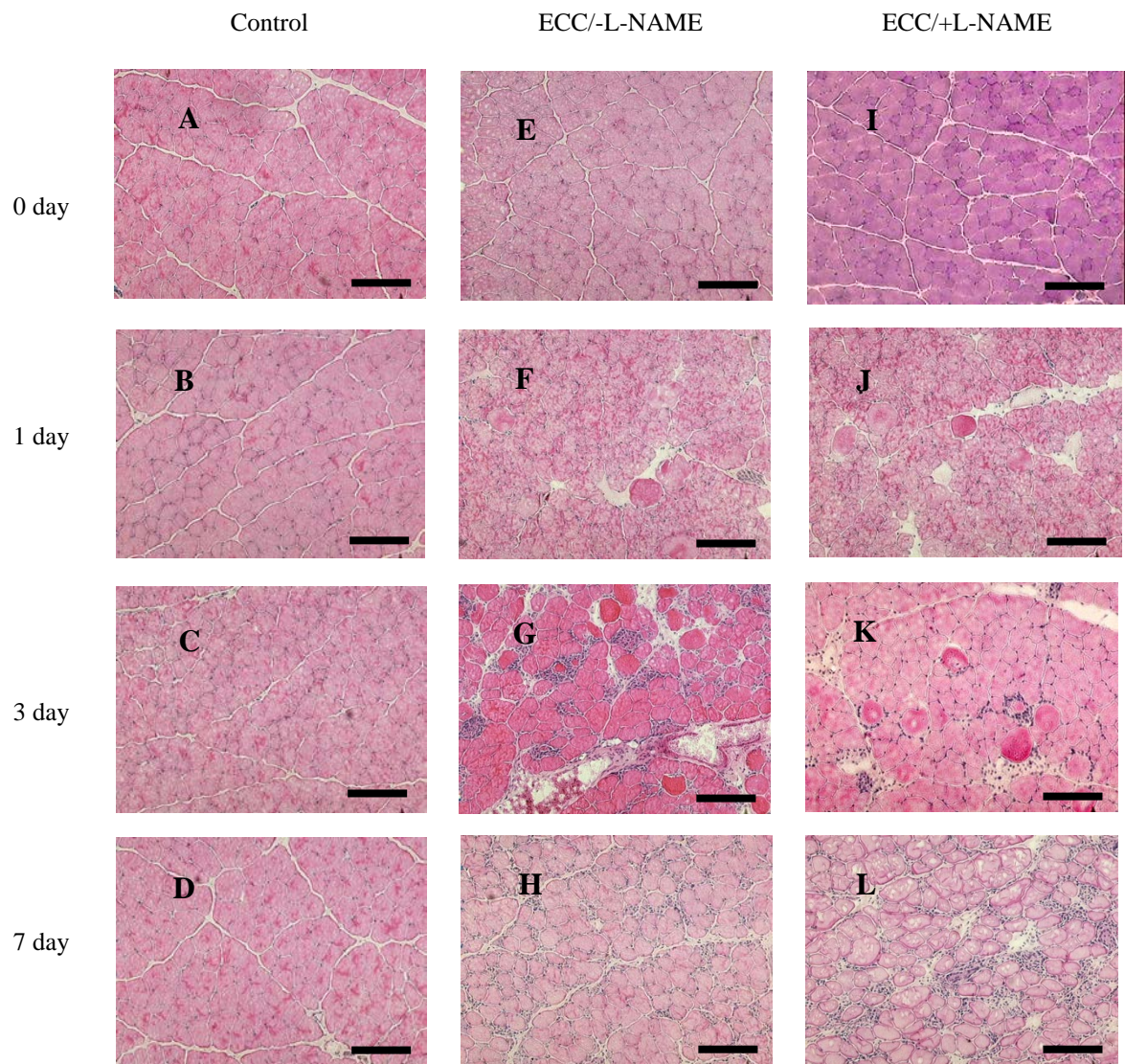


Fig. 1 Histological analysis of muscle sections by hematoxylin–eosin staining. Representative effects of ECC in tibialis anterior (TA) muscles at 0 day (E,I), 1 day (F,J), 3 days (G,K) and 7days (H,L). Effects of ECC without L-NAME (E,F,G,H). Effects of ECC with L-NAME (I,J,K,L). Serial transverse sections from control (contralateral (left) no-ECC /-L-NAME muscle) (A,B,C,D). Bar=100  $\mu$ m.



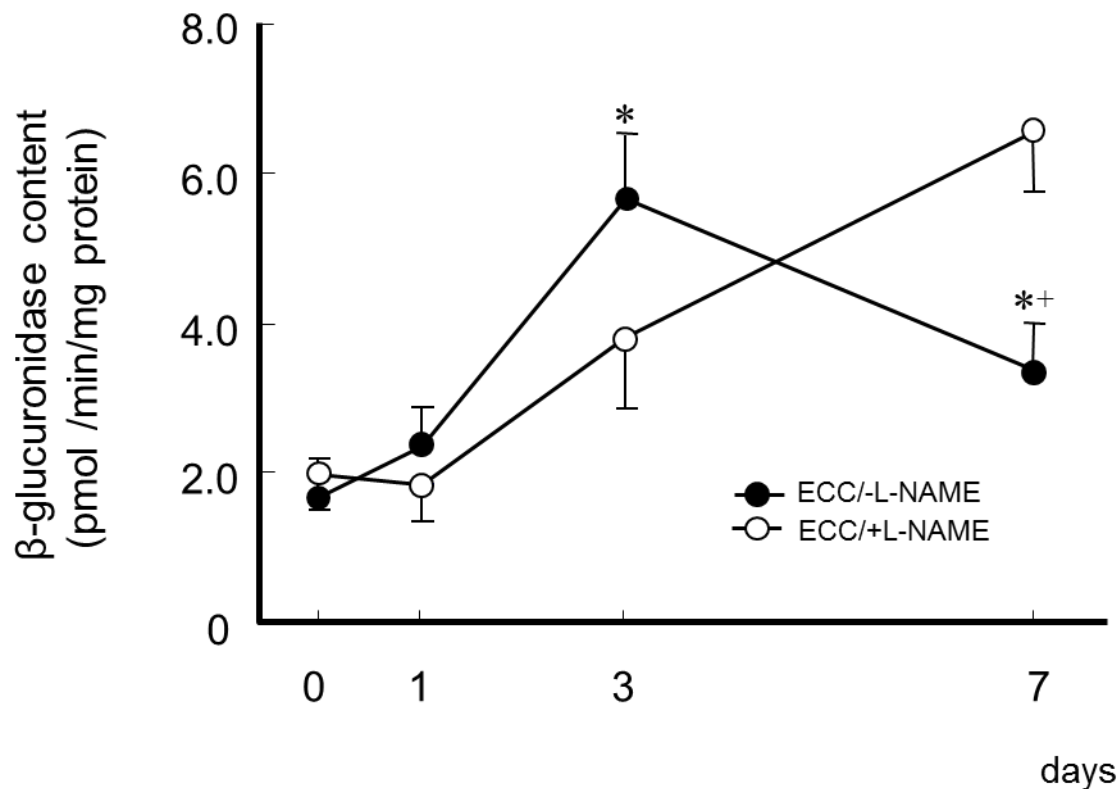


Fig. 2 Time course for  $\beta$ -glucuronidase content at 0, 1, 3, and 7 days following ECC in rat TA muscle. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM for five animals at each time point. \*Significantly different from ECC/+L-NAME. +Significantly different from three day from ECC/-L-NAME treatment.

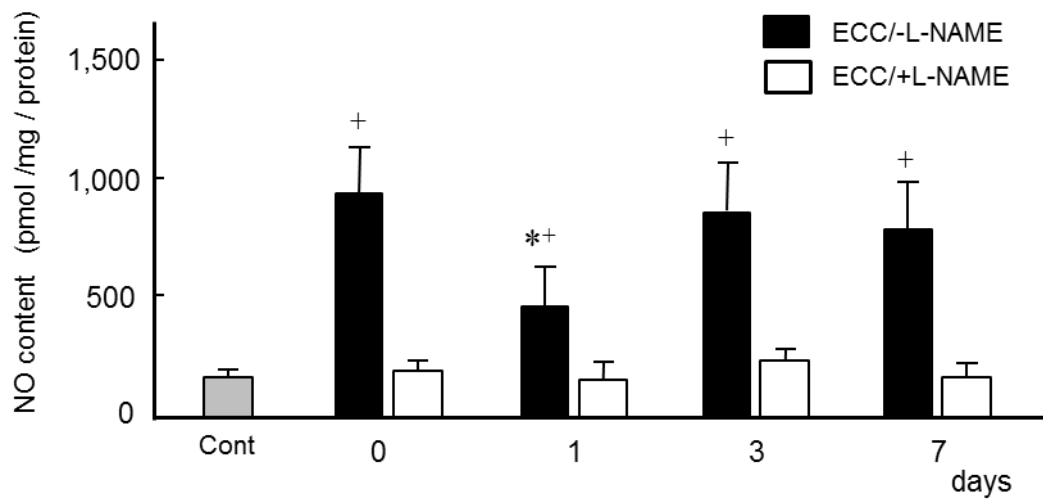


Fig. 3 Time course for NO content at 0, 1, 3, and 7days following ECC in rat TA muscle. NO data are presented as the mean  $\pm$  SEM for five animals at each time point. Cont: contralateral (left) no-ECC/-L-NAME muscle. \*Significantly different from 0 day. + Significantly different from ECC/+L-NAME.

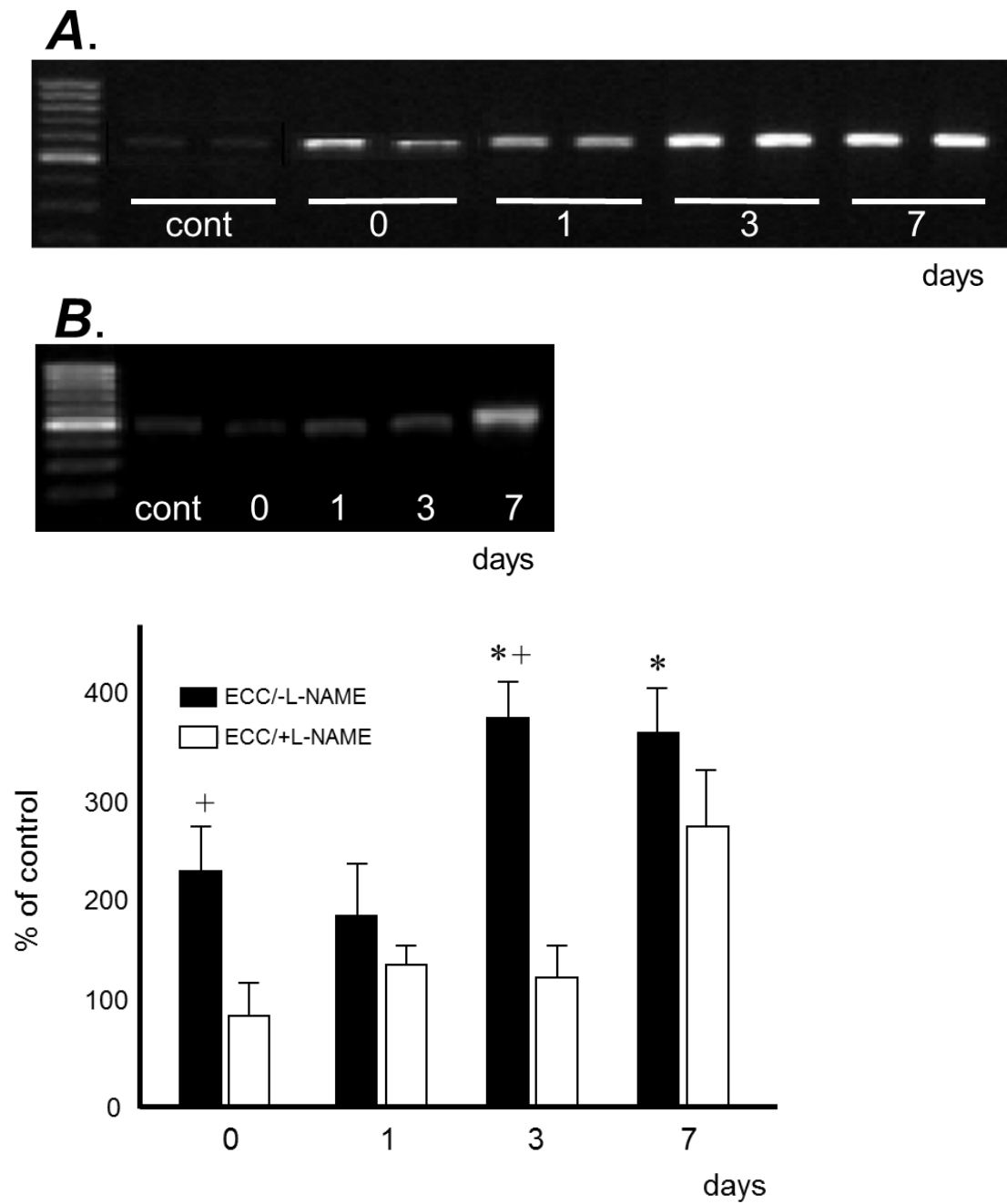


Fig. 4 Myogenin mRNA expression. Samples were taken from rat immediately after ECC treatment muscles at times indicated. A; ECC, B; ECC/+L-NAME, cont: contralateral (left) no-ECC/-L-NAME muscle. Values represent mean  $\pm$  SEM for five animals at each time point, expressed as relative expression levels normalized by dividing by the GAPDH level. \*Significantly different from 0 day. +Significantly different from ECC/+L-NAME.

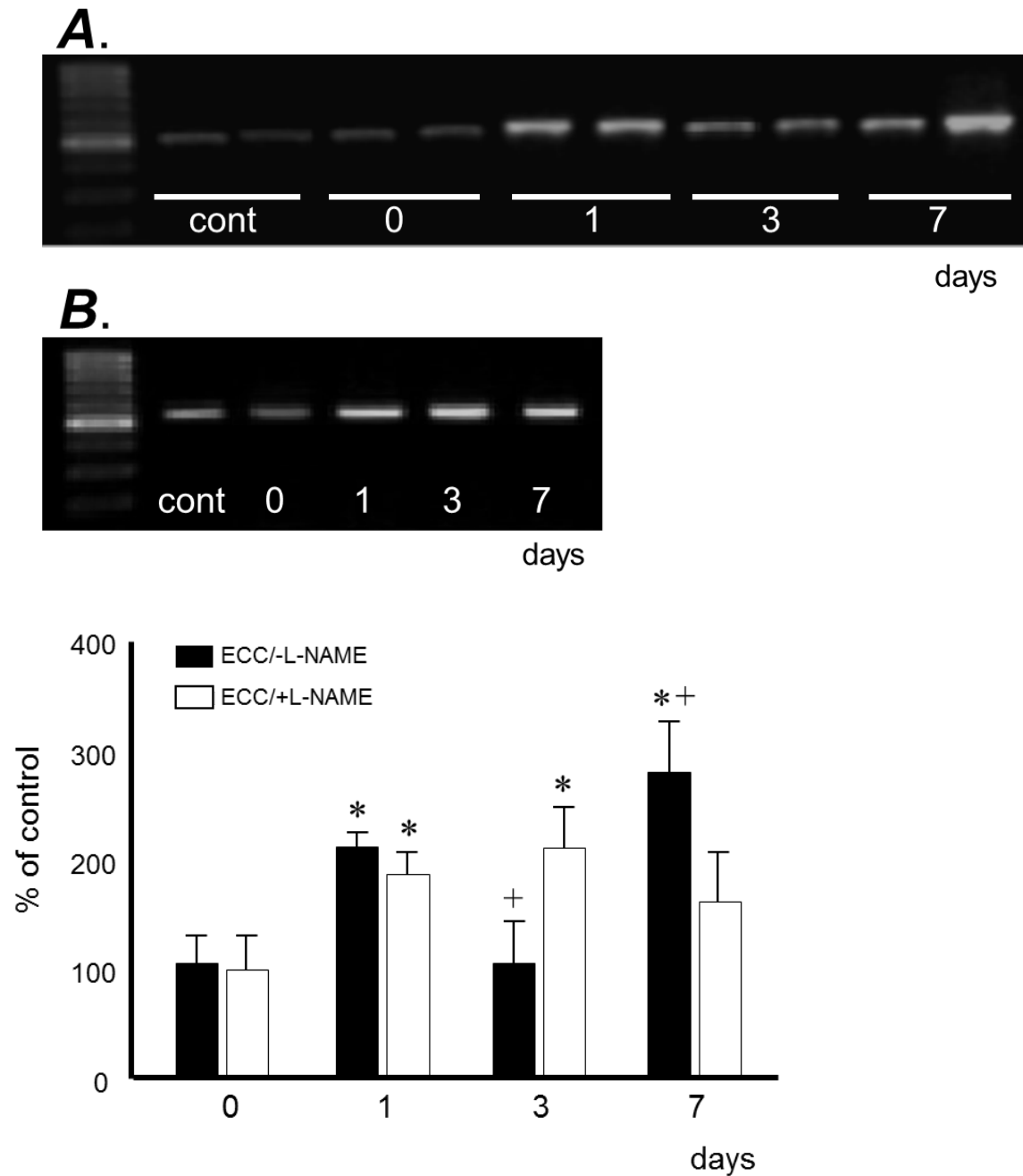


Fig. 5 MyoD mRNA expression. Samples were taken from rat immediately after ECC treatment leg at times indicated. A; ECC, B; ECC/+L-NAME, cont: contralateral (left) no-ECC/-L-NAME muscle. Values represent mean  $\pm$  SEM for five animals at each time point, expressed as relative expression levels normalized by dividing by the GAPDH level. \*Significantly different from 0 day. + Significantly different from ECC/+L-NAME.

## 第4章 外力負荷時の NO 生成と遅発性筋痛

(論文 V)

### 遅発性筋痛発生および治癒時における発痛物質と一酸化窒素との関連

#### (1) 緒言

身体運動より骨格筋損傷や筋肉痛が引き起こされることは古くから認識されており、現在に至るまで多くの研究が報告されている。1970年代からはじまった動物を対象にした骨格筋損傷モデルの作成により、筋が伸ばされながら力を発揮する伸張性筋活動は筋の微細損傷を引き起こしやすいことがわかってきた(Lieber RL, 1992)。しかしそのメカニズムは完全には解明されておらず、ヒトの身体運動の結果どの程度の骨格筋損傷が生じるかについての知見や、損傷の治癒・回復過程における細胞構造の再構築に関する知見も未だ乏しい。遅発性筋痛に関しては、損傷説(Hough T., 1902)と温度上昇説(Armstrong et al., 1984)が有力とされているが、現在のところ、損傷・炎症が遅発性筋痛のトリガーとなるという損傷説が支持されている(Cleak MJ et al., 1992)が詳細な解明には至っていない。骨格筋損傷や炎症反応を反映すると考えられるクレ

アチンフォスフォキナーゼ (CPK) や白血球浸潤等の間接的指標と遅発性筋痛との間には、「経時的な変化」や「損傷度と痛みの大きさの関係」においても一致を見ない (Nosaka K et al., 1996). また, 筋ジストロフィーなどの筋疾患においては骨格筋損傷に伴う組織炎症時にも痛みは発生しないという報告もある (Henriksson et al., 1988). このことから, 遅発性筋痛の原因が骨格筋損傷そのものであることには疑問が残る.

内因性発痛物質であるブラジキニン(BK)は, 組織が傷害を受けると活性化された血漿カリクレインの働きでキニノーゲンから産生され, マクロファージや線維芽細胞に作用することによって, 炎症メディエーターを介して, 機械刺激, 熱刺激および他の化学物質に対する侵害受容器の感受性を亢進させる. 同じく内因性発痛物質であるセロトニン(5-HT)は, 消化管, 血小板, 中枢神経系に存在し炎症時において疼痛を増強することが知られている. 5-HT には数多くの受容体が存在するが, その一つである 2A 受容体は痛覚制御に関連していることが報告されている (Abbott et al., 1996). 一方, 発痛増強物質であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は, アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)により合成される. PGE<sub>2</sub> には R1~R4 の 4 つの受容体が存在し, R2 は痛覚過敏に関係する受容体である. PGE<sub>2</sub> がその受容体である PGE<sub>2</sub>R2 に結合し作用すると, 侵害受容器の細胞内の cyclic AMP と Ca<sup>2+</sup>の濃度が上昇し, 熱反応が増強され痛覚刺激を引き起こす (Guan et al., 2002). PGE<sub>2</sub> の合成関連酵素である COX には COX-1 と COX-2 の存在が知られている. COX-1 は生体内の大部分に恒常的に存在

しており、COX-2 は炎症性刺激によりマクロファージなどから合成され、iNOS との関連も大きい(Okusawa et al.,1988; O' Banion et al., 1993). COX-2 と iNOS はいずれも炎症の抑制において重要な役割を担う酵素であるが、マクロファージ中で iNOS が生成した NO が COX-2 と反応し、その結果 COX-2 が活性化することが報告されている (Kim et al., 2005). 著者は骨格筋損傷後数日遅れて組織内に増加する NO が、その治癒・炎症反応の制御においても関与している可能性を示した(Sakurai T et al., 2005). フリーラジカルと遅発性筋痛の関連を示唆する報告(Close GL et al., 2005)もあることから、損傷の治癒をコントロールする NO を含む活性酸素種が、一方で筋痛の発生に関与していることも考えられる. しかし現在のところ遅発性筋痛と骨格筋損傷治癒との関連は国内外を問わず不明である.

そこで、本研究では、ECC 運動による骨格筋損傷発生および治癒過程において骨格筋組織内で発生する発痛関連物質を観察し、発痛関連物質と NO との関連を観察し、遅発性筋痛のメカニズムを解明する事を目的とした.

## (2) 方法

### 1) 実験動物

実験動物として12週齢のWistar系雄性ラット(体重:235±17g, n=40)を用いた。すべてのラットは、室温22±2℃、湿度55±10%で12時間の明暗サイクルに管理されている飼育室において1つのケージに3~4匹ずつ飼育した。餌と水は、それぞれ自由摂取させた。すべての実験プロトコルは、電気通信大学動物実験委員会規定ならびに東京農業大学動物倫理委員会規定に従った。

### 2) 骨格筋損傷モデル作成

ラットは、ペントバルビタナールナトリウム(70mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下にて、小動物運動負荷装置に固定した(Fig.1)。電気刺激装置を使用し、右下肢前脛部皮膚上から表面電極を用いて電気刺激(パルス幅:4.0 msec, 頻度:100 Hz, 刺激時間:0.7sec, 電圧:10 V)により右脚TA筋を最大強縮させ、刺激開始から0.2秒後に足関節を120deg伸展させるECC収縮を3秒毎に負荷し、1~100回の収縮をそれぞれ施した。対照は、収縮を負荷させない左脚とし、除毛後に運動装置に設置して擬似的な処理を行った。骨格筋損傷作成後1, 3, 7, 14日後に前脛骨筋を摘出した。ECCにより損傷した右下肢前脛骨筋を損傷群、逆下肢前脛骨筋を非損傷群、別個体の右下肢前脛骨筋をコントロール群として各4匹ずつ用いた(Fig.1)。



### 3) 骨格筋標本の抽出

ラットは損傷作成直後に、ペントバルビタール(0.5 mg/kg 腹腔内投与)にて深麻酔後、右後肢の膝関節下部の皮膚を切開し、ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋および長指伸筋を摘出した。筋サンプルは摘出直後、重量を測定し液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速冷凍した後、-80℃にて保存した。尚、mRNA 測定のための筋サンプルはRNAlater 溶液(Qiagen, Hilden, Germany)中に保存した。筋サンプルは、十分に冷やしたホモジネイトバッファー(0.1 M  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  buffer (pH 7.4; wt:vol 1:10))内でモーター駆動のポッター・グラス・ホモジナイザーにて均質化し、 $PGE_2$  濃度およびNO含有量の測定に用いた。

### 4) 組織化学染色

すべての骨格筋凍結サンプルは、クリオスタット(CM1510:LEICA)によって-20℃下で10 $\mu$ mの横断薄切標本としてシリコンコーティングスライドガラスに接着した。骨格筋損傷の評価のために、組織切片はヘマトキシリン-エオジン重染色を施し、組織学的な影響を光学顕微鏡(BX-10, Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

### 5) NO含有量測定

Nitric Oxide Fluorometric Assay kit (Cayman) を用いて、グリース法による蛍光定量分析で測定した。

#### 6) PGE<sub>2</sub> 濃度測定

PGE<sub>2</sub> ELISA Assay Kit (R&D systems) を用いて、その分析方法に従って測定した。

#### 7) 発痛関連物質の RT-PCR 解析

RNAlater 溶液中に保存した筋サンプルより、ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) により総リボ核酸を抽出し、Oligo dT プライマー逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により遺伝子の解析を行った。PCR の条件は、Taq polymerase 活性化のため 94°C で 7 分間温めたのちに、94°C で 1 分、55°C で 2 分、72°C で 3 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。使用したプライマーはそれぞれ以下に示すとおりであり、インターナルコントロールとして GAPDH を用いた。RT-PCR のイメージ解析には、NIH イメージプログラム (Ver.1.62) を使用し定量化した。

COX-2 5'-TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG-3'

5'-GTTTGGAACAGTCGCTCGTACTC-3'

5-HT 2A 5'-GGCTCATTGGCTTTCTCATC-3'

5'-TGCGCTTTGCTTCAGCATTG-3'

PGE<sub>2</sub>R2 5'-CCATCTATGGGGTCTCCTTG-3'

5'-AATCTAAGAGCTCGGAGGTC-3'

BKB2R 5'-TGTTACCAACATGCTGCTG-3'

5'-AGATAGAGGTCCTCAGAGTC-3'

## 8) 統計処理

すべてのデータは平均±標準誤差で表した。統計分析には Prism (Version 4.0)を使用し、群間比較には二元配置の分散分析を行った。有意差検定には post-hoc Scheffe test を用い、有意水準は 5%未満 (P<0.05)とした。

### **(3) 実験結果**

#### **1) HE 染色による観察**

骨格筋組織画像は、コントロール筋と比較して損傷群では損傷後 1, 3, 7 日目に明確な変化がみられた。特に 3 日目に細胞外液の細胞内への浸潤により細胞が膨張するなどの激しい変化が観察されたが、この変化は 14 日後には完全に消失した (Fig.2).

#### **2) NO 含有量**

骨格筋損傷に伴い筋中には NO が生成されるが、その NO レベルは損傷 1 日後に比べ、3 日後、7 日後に有意に高まる傾向がみられ、14 日後には非損傷筋レベルまで回復した (Fig. 3).

#### **3) PGE<sub>2</sub> 濃度**

非損傷群は損傷群に比べ、穏やかに増加している一方で、損傷群の 1 日後と 3 日後では、非損傷群と有意な差がみられた。特に、損傷 3 日後は PGE<sub>2</sub> 濃度が最も高く、損傷後 7 日後から 14 日後にかけて減少した (Fig. 4).

#### **4) 発痛関連物質遺伝子発現**

BKB<sub>2</sub>Rを除くCOX-2, PGE<sub>2</sub>R2, 5-HT2Aは損傷3日後に遺伝子発現がピークに達している。また, NO濃度も損傷3日後にピークを示している。エキセントリック運動における骨格筋損傷において, NOと多くの発痛関連物質は損傷後3日後に発現のピークを示すことが観察された(Fig. 5)。

#### (4) 考察

伸張性収縮運動によって引き起こされる骨格筋損傷時には、iNOS によって NO が生成される。同様に骨格筋損傷時の炎症によって PGE<sub>2</sub>が増加する。PGE<sub>2</sub>は、アラキドン酸から COX により合成されることが知られ、その分画である COX-2 は炎症性刺激によりマクロファージなどから合成されることから iNOS との関連も大きいことが知られている(Okusawa et al.,1988; O'Banion et al., 1993)。COX-2 と iNOS はいずれも炎症の抑制を担う酵素であり、骨格筋損傷による PGE<sub>2</sub>の変化は NO の生成により活性化された COX-2 を通じて影響を受けていることが考えられる。

PGE<sub>2</sub> 受容体の一つである R2 は、痛覚過敏に関係する受容体である。PGE<sub>2</sub> がその受容体である PGE<sub>2</sub>R2 に結合し作用すると、痛覚刺激を引き起こすことが報告されている (Guan et al., 2002)。また、5-HT 受容体の一つである 2A 受容体は、痛覚制御に関連している(Abbott et al., 1996)。本研究では、これら痛覚に関連する受容体の動向を継時的に観察し NO との関連を検討した。

その結果、骨格筋損傷 3 日後に NO タンパクの骨格筋内発現がピークを迎えるが、PGE<sub>2</sub>R2、5-HT2A も NO と同様に 3 日後にピークを迎えることが示唆された。NO は血管内皮における 5-HT2A の生成量を調節し、血管収縮を調節する (Iwabayashi et al., 2012)。この血流調節は痛覚過敏性の調節因子となることが考えられる。また、COX2

および PGE<sub>2</sub> とその受容体である PGE<sub>2</sub>R2 が同期した上昇を示したことは、NO が痛覚過敏へのトリガーとなっていることは十分に考えられる。

しかし、PGE<sub>2</sub> および NO は損傷時に多量に生成され炎症を引き起こすが、PGE<sub>2</sub> が iNOS 発現を増強し炎症や血管拡張を更に増強する方向に作用するという報告もある (Koide et al., 1993). このように、NO は骨格筋損傷後の筋細胞内における発痛関連物質のクロストークに重要な役割を果たしているが、その詳細は未だ解明されていないところが多い。今後も遅発性筋痛に対する NO が関与するメカニズムを、生理学的・分子生物学的にとらえた詳細な研究が必要と考えられる。

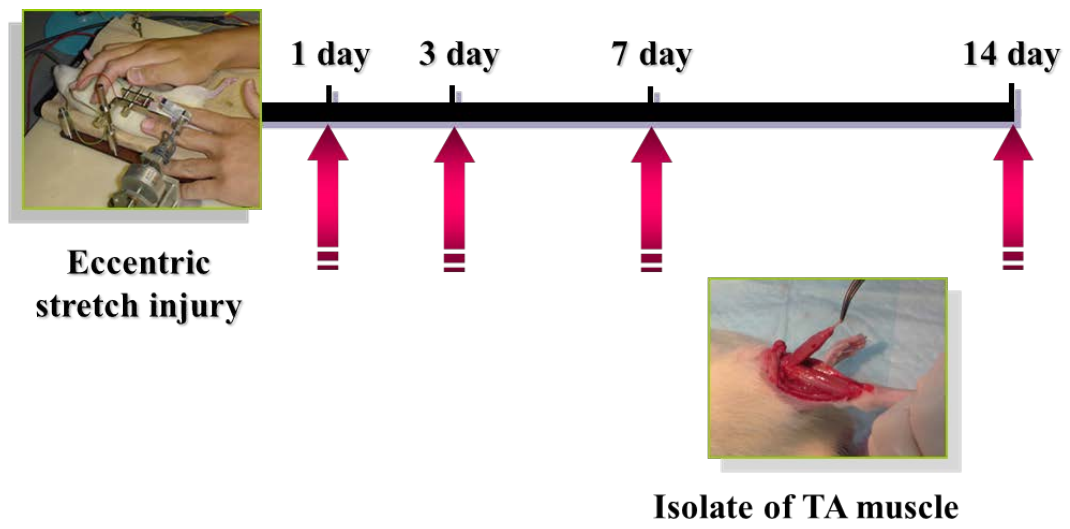


Fig 1. Experimental design



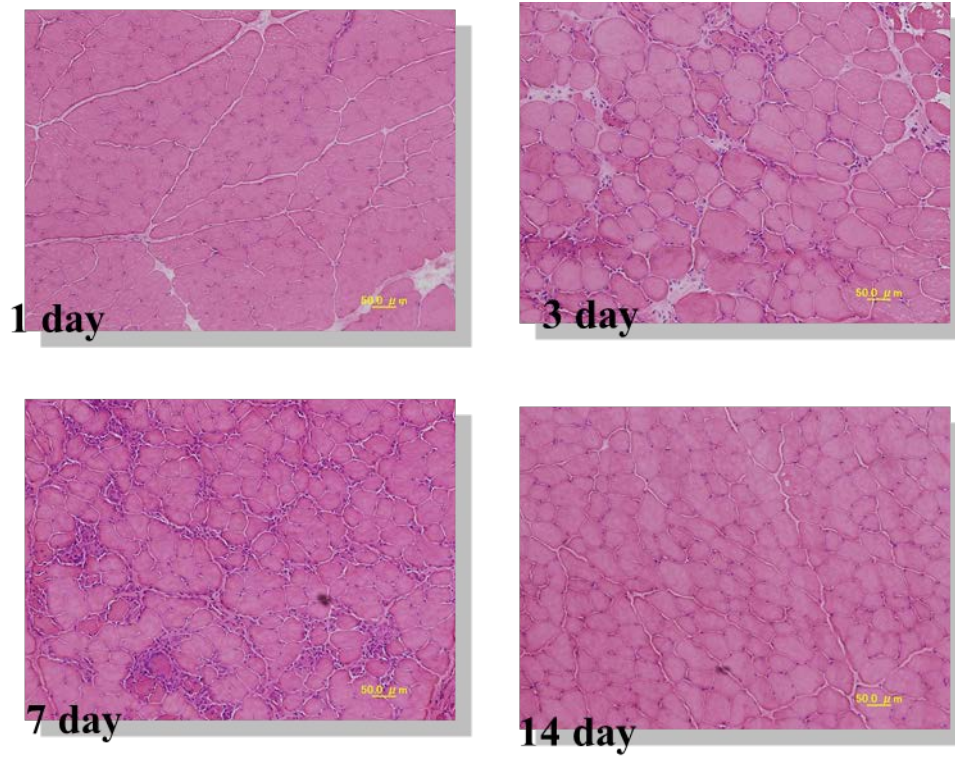


Fig 2. Representative effects of ECC in TA muscle at 1,3,7 and 14 days

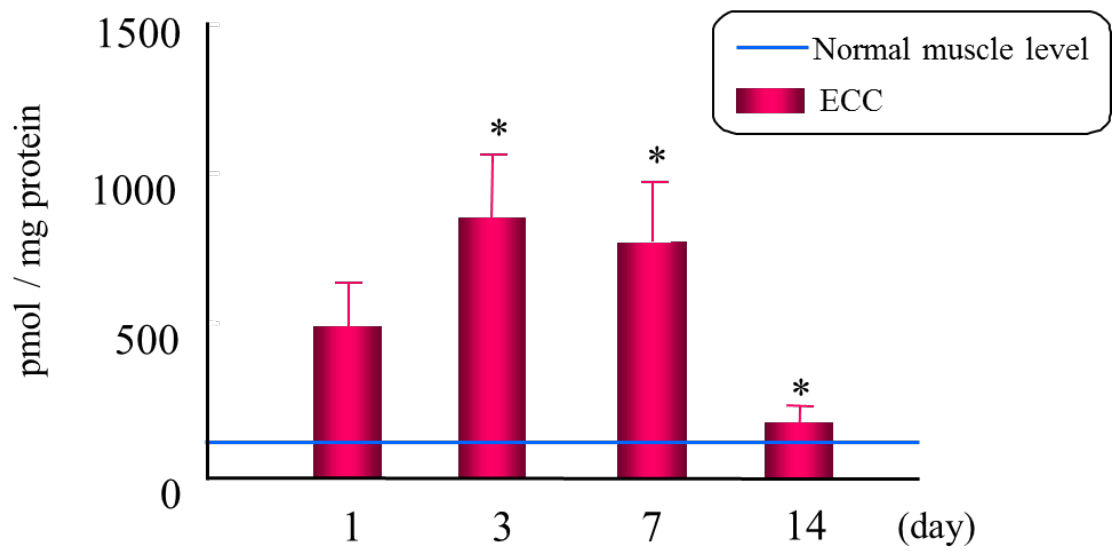


Fig 3. Time course for NO content at 1, 3, 7 and 14 days following ECC in rat TA muscle. NO data are presented as the mean  $\pm$  SEM for seven animals at each time point. \*Significantly different from 1 day.

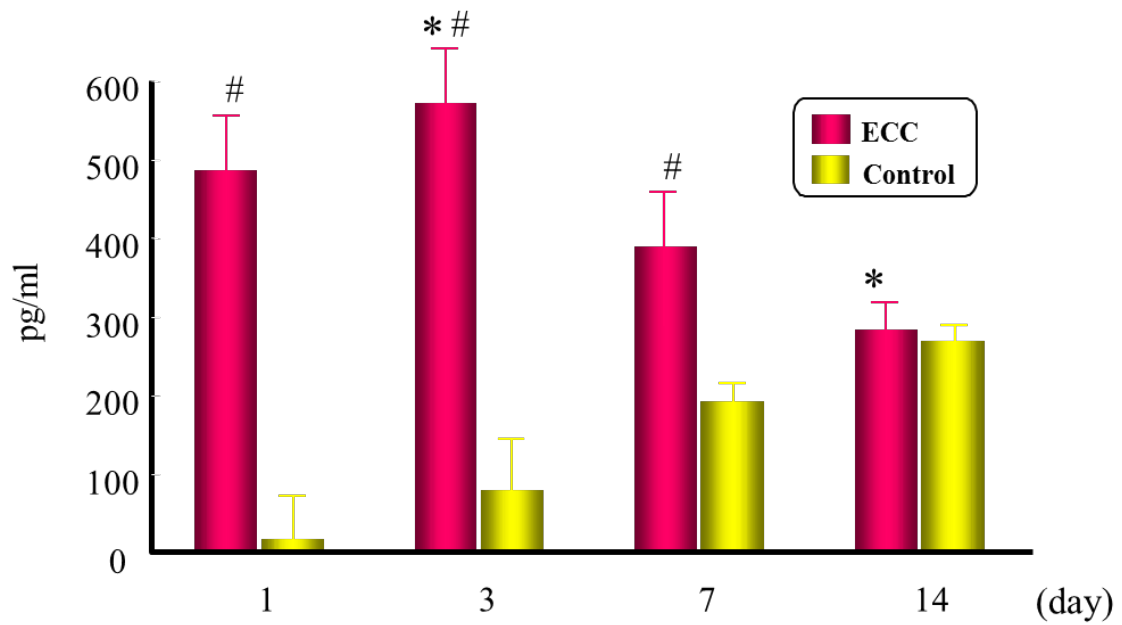


Fig. 4. Time course for prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations (PGE<sub>2</sub>) at 1, 3, 7 and 14 days following ECC in rat TA muscle. Control: contralateral no-ECC muscle. \* Significantly different from 1 day. # p < 0.05 vs. control

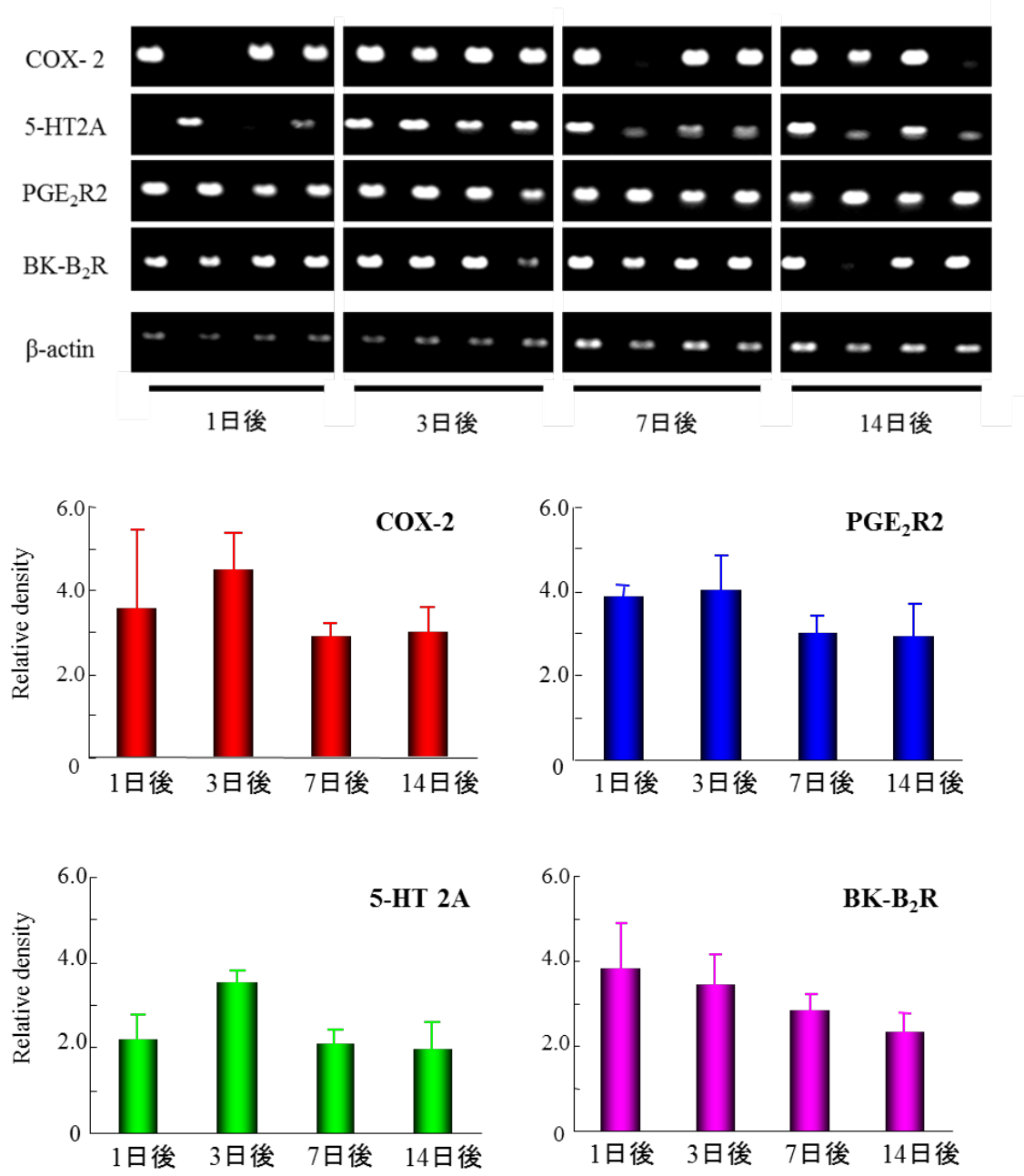


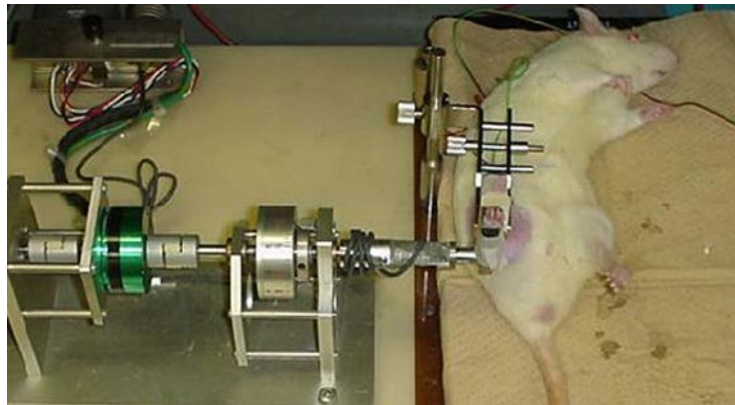
Fig 5. Western blot analysis of COX-2, PGE<sub>2</sub>R2, 5-HT 2A and BK-B<sub>2</sub>R protein expression at 1, 3, 7 and 14 days following ECC in rat TA muscle.

## 第7章 まとめ

筋活動時においては、伸張性収縮の繰り返しにより骨格筋損傷が生じるが、その詳細なメカニズムや治癒・回復過程に関する知見は未だ乏しい。近年、NOと組織の炎症との関連性が報告されている(Anderson et al., 2000; Kobzik et al.,1995; Moncada et al.,1991; Moncada et al.,1993)。その役割は酸化ストレスを増大させる一方で、その殺菌力により炎症を縮小するという善悪両面の作用を持つことが知られている(Alderton et al.,2001; Soneja et al.,2005; Sakurai et al.,2005; Sriwijitkamol et al.,2006; Filippin et al.,2011<sup>1</sup>; Filippin et al.,2011<sup>2</sup>)。骨格筋損傷の炎症と治癒にNOが関与していることが考えられるが、その詳細は不明である。そこで本研究では動物モデルを用い、筋活動に伴い筋組織中におけるNOの発生と、損傷・治癒との関連を明らかにすることを目的とし、5つの研究を遂行した。

研究1では、一過性の高強度走運動刺激によるNO生成について検証を行った。実際の骨格筋活動におけるNO生成の動態を調べるために、短時間の急性高強度ランニングを負荷したラットの下肢骨格筋におけるNO生成動態を観察した。iNOSタンパク質は、低強度走行ではいずれの組織についても観測されなかったが、高強度の走行後に腓腹筋(Gas: gastrocnemius)と前脛骨筋(TA: tibialis anterior)の両方で

iNOS タンパク質発現が増加した。高強度走行後の iNOS mRNA 発現は Gas と TA でみられるものの EDL (extensor digitorum longus) においては観察されなかった。また、高強度走行後の下肢骨格筋における iNOS mRNA 発現は、筋腱接合部、筋腹の順に発現し近位部には観察されなかった。これらの結果は、NO の合成酵素である iNOS の mRNA 発現は高強度走行後にみられるが、筋線維タイプや筋中部位によりその発現は異なることが考えられた。各筋は筋線維組成が異なることより、酸素消費量と NO 生成の関連や骨格筋内の NO 生成分布に関連があることが示唆された。

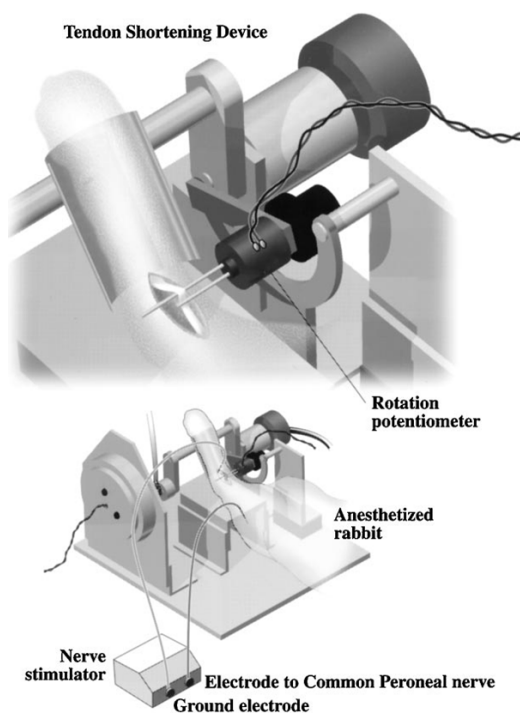


研究 2 では、普段の筋活動とは異なる過重力負荷によるメカニカルストレスである過重力時における骨格筋の NO 生成の動態について検討した。短時間の過重力負荷時における下肢骨格筋内にはメカニカルな損傷モデルと同レベルの NO 生成やインター

ロイキン等の損傷様物質が発生するが、組織学的な損傷を確認することはできなかった。対照的に、骨格筋損傷の指標となる $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $TNF\alpha$ 、iNOS 遺伝子発現およびNO生成は、過重力負荷によりGas, TA およびEDLでは増大を示したが、ヒラメ筋ではその変化はみられなかった。しかし、IL-6 はすべての筋において変化はみられず、過重力負荷は独特なメカニカルストレスである可能性が示唆された。さらに、短期間の過重力負荷後に抗重力筋であるヒラメ筋に変化がなかったことは、短時間の過重力負荷による骨格筋内 NO 生成は 1G 環境下の骨格筋損傷とは異なることが示唆された。



研究 3 では, ラビットの脚部骨格筋にメカニカルな伸張性筋損傷モデルを作成し NO 生成動態を検証した. 損傷筋における NO 生成は, 損傷直後より 4 時間後まで有意に上昇し, その後 24 時間まで低下するが, 48 時間後に再び有意な上昇を示した. また, 損傷筋では 4 時間及び 48 時間後に iNOS タンパク発現がみられ, iNOS 活性も 4 時間及び 48 時間後に二峰性の有意な上昇を示した. この活性上昇は非損傷筋に比べ有意に大きいものであり, 観察期間全般においても損傷筋と非損傷筋の間には有意な差が示された. 以上の結果より, 伸張性筋損傷後に引き起こされる NO 生成は, 筋肉細胞の中に存在する iNOS によって発生することが示唆されたが, 損傷後 24 時間以降に増加する NO 生成の役割は明確にされるには至らなかった.





研究4では、骨格筋損傷治癒とNO生成との関連について検証を行った。メカニカルな骨格筋損傷モデル作成後、タンパク分解を促進するプロテアーゼであり、NOにより抑制を受けるCalpainは、NOが低下する損傷後1日後に上昇した。骨格筋損傷部位の再生に働く酵素であるMyo-DおよびMyogeninは、骨格筋内NO生成と同様に損傷後3日以降に上昇した。また、薬理的に骨格筋損傷部位のNO生成をブロックすることで、治癒が遅れることも明らかになり、損傷後のNO生成がトリガーとなり骨格筋の治癒・回復が促進されることが示唆された。

研究5では、骨格筋損傷治癒と遅発性筋痛の関連について検証を行った。メカニカルな骨格筋損傷モデル作成後、骨格筋内における発痛物質やその受容体の変化を調べた。骨格筋損傷治癒時における発痛関連タンパクや遺伝子の発現は、NO生成がピークとなる損傷3日以降に上昇することが明らかになった。NOが発痛物質や情報伝達における受容体の発現調節を行うことにより、遅発性筋痛の発生に関与している可能性が示唆された。

骨格筋の伸張性収縮を伴う運動時には骨格筋に損傷が引き起こされる。これまでも、筋損傷と筋力の低下、関節可動域の減少、筋組織における微細構造の変化そ

して血中への酵素逸脱などの関係について数多くの報告がなされている。筋損傷時は、筋収縮時の機械的な衝撃による損傷に続き、損傷部位における炎症反応が誘発されることが知られている。本研究において、骨格筋内 NO 生成は損傷時に増加した後に一時的に低下することが示された。しかし、数日のタイムラグを置いて損傷筋内に顕在化する炎症反応時に、過剰に活性化された好中球やマクロファージに iNOS が誘導され、再び NO 生成が亢進されることも明らかになった。損傷直後の NO 生成亢進は、高強度走運動や過重力負荷など様々なメカニカルストレスに曝された骨格筋内においても同様に観察され、それに続く炎症・回復過程に影響を及ぼしていることが示唆された。また、筋組織の炎症・治癒との関連を明らかにするために作成したメカニカル損傷モデルの実験から、NO は様々な治癒・発痛関連物質のトリガーとして働いていることが示唆された。NO は各臓器や器官において「両刃の剣」とされ、抗酸化酵素の活性を減弱させ酸化ストレスを増大させる一方で、その殺菌力により炎症を縮小し細胞死を抑制するという善悪両面の作用を持つことが知られている。骨格筋損傷の炎症と治癒にはこの「両刃」が関与しているが、本研究において、損傷後の NO 生成は治癒への貢献が顕著であることが示された。本研究における知見は、NO が損傷した骨格筋線維に対して特徴的でユニークな生理学的作用を及ぼすことを示すものであり、運動をはじめとする様々なストレスに対する骨格筋の高い可塑性を支える一要因になることを説明するための一助となるものと考えられる。

## 引用文献

- Abbott F.V, Hong Y, Blier P. (1996): Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*, 35:99-110.
- Akimoto T., Ushida T., Miyaki S., Akaogi H., Tsuchiya K., Yan Z., Williams R.S., Tateishi T., (2005): Mechanical stretch inhibits myoblast-to-adipocyte differentiation through Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329:381-385.
- Alderton W.K, Cooper C.E, Knowles R.G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.*, 357: 593-615.
- Allen, D.L., Yasui, W., Tanaka, T., Ohira, Y., Nagaoka, S., Sekiguchi, C., Hinds, W.E., Roy, R.R. and Edgerton, V.R. (1996): Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.*, 81, 145-151.
- Alonso, M., Collado, P.S. and Gonzalez-Gallego, J. (2006): Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J. Pineal Res.*, 41, 8-14.
- Anderson J.E. (2000): A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol. Biol. Cell.*, 11: 1859-1874.
- Armstrong RB., (1984): Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 16:529-538.
- Beck, K.F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U.K., Mühl, H. and Pfeilschifter, J. (1999): Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.*, 202:645-653.

- Best T.M., Fiebig R., Corr D.T., Brickson S., Ji L.L. (1999): Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J. Appl. Physiol.*, 87:74-82.
- Best T.M, Corr D, Brickson S and Ji L.L. (1999): Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J. Appl. Physiol.*, 87: 74-82.
- Best T.M, Loitz-Ramage B, Corr D.T. and Vanderby R. (1998): Hyperbaric oxygen in the treatment of acute muscle stretch injuries. Results in an animal model. *Am. J. Sports Med.*, 26:367-72.
- Best T.M., McCabe R.P, Corr D.T. and Vanderby R. (1998): Evaluation of a new method to create a standardized muscle stretch injury. *Med. Sci. Sports Sci.*, 30:200–205.
- Bozzo C., Stevens L., Bouet V., Montel V., Picquet F., Falempi, M., Lacour M. and Mounier Y. (2004): Hypergravity from conception to adult stage: effects on contractile properties and skeletal muscle phenotype. *J. Exp. Biol.*, 207:2793-2802.
- Brickson S., Hollander J., Corr D.T., Ji L.L. and Best T.M. (2001): Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33:2010-2015.
- Brunelli S. and Rovere-Querini P. (2008): The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol. Res.*, 58: 117–121.
- Buono R., Vantaggiato C., Pisa V., Azzoni E., Bassi M. T., Brunelli S., Sciorati C. and Clementi E. (2012): Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP. *Stem. Cells*, 30: 197–209.

- Caiozzo, V.J., Haddad, F., Baker, M.J. and Baldwin, K.M. (1996): Influence of mechanical loading on myosin heavy-chain protein and mRNA isoform expression. *J. Appl. Physiol.*, 80:1503-1512.
- Caiozzo V.J., Haddad F., Baker M.J., Herrick R.E., Prietto N. and Baldwin K.M. (1996): Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 81:123-132.
- Chi M.M., Manchester J.K. and Lowry O.H. (1998): Effect of centrifugation at 2G for 14 days on metabolic enzymes of the tibialis anterior and soleus muscles. *Aviat. Space. Environ. Med.*, 69:A9-11.
- Cleak M.J, Eston R.G. (1992): Delayed onset muscle soreness: mechanisms and management. *J. Sports Sci.*, 10:325-341
- Close G.L, Ashton T, McArdle A, Maclaren D.P. (2005): The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 142:257-266
- Colasanti M. and Suzuki H. (2000): The dual personality of NO. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:249-252.
- Corona B.T, Ingalls C.P. (2013): Immediate force loss after eccentric contractions is increased with L-NAME administration, a nitric oxide synthase inhibitor. *Muscle Nerve.*, 47:271-273.
- Costa A, Dalloul H, Hegyesi H, Apor P, Csende Z, Racz L, Vaczi M and Tihanyi J. (2007): Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 101: 427-436.
- Crow J.P, Ischiropoulos H. (1996): Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.*, 269:185-194.

- De Palma, C., and E. Clementi. (2012): Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. *Mol. Neurobiol.*, 46: 682–692.
- Di Marco S., Mazroui R., Dallaire P., Chittur S., Tenenbaum S.A., Radzioch D., Marette A. and Gallouzi I.E., (2005) NF-kappa B-mediated MyoD decay during muscle wasting requires nitric oxide synthase mRNA stabilization, HuR protein, and nitric oxide release. *Mol. Cell. Biol.* 25: 6533-6545
- Elrod J.W., Calvert J.W., Gundewar S., Bryan N.S., Lefer D.J.(2008): Nitric oxide promotes distant organ protection: evidence for an endocrine role of nitric oxide. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A.*, 105:11430-11435.
- Enns D.L., Tiidus P.M. (2008):Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J. Appl. Physiol.*, 104: 347-353.
- Evans D.M. and Ralston S.H.(1996): Nitric oxide and bone. *J. Bone. Min. Res.*, 11: 300-305.
- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., (2002): Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.*, 16: 1335-1347.
- Fielding, R. A., Manfredi T. J., Ding W., Fiatarone M. A., Evans W. J. and Cannon J. G.(1993): Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1beta accumulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 265: R166–R172.
- Filippin L.I., Cuevas M.J., Lima E, Marroni N.P., Gonzalez-Gallego J, Xavier R.M. (2011): The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm. Res.*, 60: 347-356.
- Filippin, L. I., Moreira A. J., Marroni N. P. and Xavier R. M. (2009): Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*, 21: 157–163.

- Filippin, L. I., Cuevas M. J., Lima E., Marroni N. P., Gonzalez-Gallego J. and Xavier. R. M. (2011): Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide*, 24: 43–49.
- Frandsen U., Lopez-Figueroa M. and Hellsten Y.(1996): Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227: 88-93.
- Furchgott R.F. and Zawadzki J.V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373-376.
- Gomez-Cabrera M.C., Borrás C., Pallardo, F.V., Sastre, J., Ji, L.L. and Viña, J. (2005): Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.*, 567,113-120.
- Goto K., Okuyama R., Honda M., Uchida H., Akema T., Ohira Y. and Yoshioka T. (2003): Profiles of connectin (titin) in atrophied soleus muscle induced by unloading of rats. *J. Appl. Physiol.*, 94, 897-902.
- 後藤勝正, 大平充宣 (2007): 宇宙環境暴露および老化による骨格筋の萎縮, *宇宙航空環境医学*, 44: 49-58.
- Graham-Siegenthaler K, Gauthier S, Davies P.L and Elce J.S. (1994) Active recombinant rat calpain II. Bacterially produced large and small subunits associate both in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, 269: 30457-30460
- Green DJ, O'Driscoll G, Blanksby B.A. and Taylor R.R. (1996): Control of skeletal muscle blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium-derived nitric oxide. *Sports Med.*, 21: 119-146.

- Grounds M.D., Garrett K.L., Lai M.C., Wright W.E. and Beilharz M.W. (1992): Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res.*, 267: 99-104.
- Guan Y., Stillman B.A., Zhang Y., Schneider A., Saito O., Davis L.S., Redha R., Breyer R.M. and Breyer M.D. (2002): Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP2 receptor. *BMC Pharmacol.*, 2:14.
- Hawke T.J., Garry D.J. (2001): Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*, 91:534-551.
- Heinrich P.C., Castell J.V. and Andus T. (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.*, 265:621-636.
- Henriksson K.G.(1988): Muscle pain in neuromuscular disorders and primary fibromyalgia. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57:348-352.
- Hickey M.J., Sharkey K.A., Sihota E.G., Reinhardt P.H., Macmicking J.D., Nathan C., Kubes P. (1997): Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.*, 11: 955-964.
- Hirai T., Visneski M.D., Kearns K.J., Zelis R. and Musch T.I. (1994): Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. *J. Appl. Physiol.*, 77: 1288-1293.
- Hough T. (1902): Ergographic studies in muscular soreness. *J. Physiology*, 7:76-92.
- Huang C.C., Lin T.J., Lu Y.F., Chen C.C., Huang C.Y. and Lin W.T. (2009): Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. *Chin. J. Physiol.*, 52: 306-315.
- Iwabayashi M., Taniyama Y., Sanada F., Azuma J., Iekushi K., Kusunoki H., Chatterjee A., Okayama K., Rakugi H. and Morishita R. (2012): Role of serotonin in



- angiogenesis: induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT1B/Akt/eNOS pathway in diabetic mice. *Atherosclerosis*, 220:337-342.
- Jackson M.J. (2005): Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360: 2285-2291.
- Joshi M.S., Ponthier J.L. and Lancaster J.R. Jr. (1999): Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 1357-1366.
- Kadi F., Johansson F., Johansson R., Sjöström M. and Henriksson J. (2004): Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochem. Cell Biol.*, 121: 329-334.
- Kano Y., Sampei K. and Matsudo H. (2004): Time course of capillary structure changes in rat skeletal muscle following strenuous eccentric exercise. *Acta. Physiol. Scand.*, 180: 291-299.
- Kawamura T., Yoshida K., Sugawara A., Nagasaka M., Mori N., Takeuchi K. and Kohzuki M. (2002): Impact of exercise and angiotensin converting enzyme inhibition on tumor necrosis factor-alpha and leptin in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, 25:919-926.
- Kim S.F., Huri D.A. and Snyder S.H. (2005): Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*, 310:1966-1970.
- King C.E., Melnyshyn M.J., Mewburn J.D., Curtis S.E., Winn M.J., Cain S.M. and Chapler C.K. (1994): Canine hindlimb blood flow and O<sub>2</sub> uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. *J. Appl. Physiol.*, 76: 1166-1171.
- Kingwell B.A. (2000): Nitric oxide as a metabolic regulator during exercise: effects of training in health and disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27: 239-250.

- Kita S., Iwasaki K., Onishi R., Fujisawa M., Kim H., Shibata S. and Ito M.(2003): Bone metabolism and formation of mice bred in a 2 G environment. *Adv. Space. Res.*, 32:1453-1457.
- Kita S., Shibata S., Kim H., Otsubo A., Ito M. and Iwasaki K. (2006): Dose-dependent effects of hypergravity on body mass in mature rats. *Aviat. Space. Environ. Med.*, 77:842-845.
- Kobzik L., Reid M.B., Bredt D.S. and Stamler J.S. (1994): Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, 372: 546-548.
- Kobzik L., Stringer B., Balligand J.L., Reid M.B. and Stamler J.S. (1995): Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211: 375-381.
- Koh T.J. and Tidball J.G. (2000): Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 279: C806-812.
- Koide M., Kawahara Y., Nakayama I., Tsuda T. and Yokoyama M. (1993): Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*, 268:24959-24966.
- Komulainen J., Koskinen S.O., Kalliokoski R., Takala T.E. and Vihko V. (1999): Gender differences in skeletal muscle fibre damage after eccentrically biased downhill running in rats. *Acta. Physiol. Scand.*, 165: 57-63.
- Komulainen J., Takala T.E., Kuipers H. and Hesselink M.K.(1998): The disruption of myofibre structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions. *Pflugers. Arch.*, 436: 735-741.

- König N., Raynaud F., Feane H., Durand M., Mestre-Francès N., Rossel M., Ouali A. and Benyamin Y. (2003): Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and *Microcebus* brain. *J. Chem. Neuroanat.*, 25: 129-136.
- Kook S.H., Choi K.C., Son Y.O., Lee K.Y., Hwang I.H., Lee H.J., Chung W.T., Lee C.B., Park J.S. and Lee J.C. (2008): Involvement of p38 MAPK-mediated signaling in the calpeptin-mediated suppression of myogenic differentiation and fusion in C2C12 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 310: 85-92.
- Koskinen H., Järvisalo J., Huuskonen M.S., Koivula T., Mutanen P. and Pitkänen E. (1983): Serum lysosomal enzyme activities in silicosis and asbestosis. *Eur. J. Respir. Dis.*, 64: 182-188.
- Koskinen, S.O., Wang, W., Ahtikoski, A.M., Kjaer, M., Han, X.Y., Komulainen, J., Kovanen, V. and Takala, T.E. (2001): Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280,R1292-1300.
- Langberg, H., Olesen, J.L., Gemmer, C. and Kjaer, M. (2002): Substantial elevation of interleukin-6 concentration in peritendinous tissue, in contrast to muscle, following prolonged exercise in humans. *J. Physiol.*, 542,985-990.
- Li H., Capetanaki Y. (1993): Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic. Acids. Res.*, 21: 335-343.
- Lieber R.L. (1992) :Skeletal muscle-Structure and Function. William & Willkins, Boltimore, pp.260-265
- Moncada S. and Higgs A. (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329: 2002-2012.

- Moncada S. and Higgs A. (1991): Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21: 361-374.
- Moncada S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142.
- Moncada S. and Higgs E.A. (1995): Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.*, 13:1319-1330.
- Morgan D.L., Proske U. (2004): Popping sarcomere hypothesis explains stretch-induced muscle damage. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31:541-545.
- Nathan C. and Xie Q.W. (1994): Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78:915-918.
- Nathan C. (1997): Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.*, 100: 2417-2423.
- Nguyen H.X. and Tidball J.G.(2003): Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *J. Physiol.*, 550: 347-356.
- Nguyen H. X., Lusic A. J. and Tidball J. G. (2005): Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J. Physiol.*, 565: 403–413.
- Nims R.W., Cook J.C., Krishna M.C., Christodoulou D., Poore C.M., Miles A.M., Grisham M.B. and Wink D.A. (1996): Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Meth. Enzymol.*, 268: 93-105.

- Nisoli E., Clementi E., Carruba M. O. and Moncada S. (2007): Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ. Res.*, 100: 795–806.
- Nosaka K. and Clarkson P.M. (1996): Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of elbow flexors. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 28:953-961.
- Nosaka K., Newton M. and Sacco P.(2002): Responses of human elbow flexor muscles to electrically stimulated forced lengthening exercise. *Acta.Physiol.Scand.*, 174:137-145.
- O'Banion M.K., Winn V.D. and Young D.A. (1992): cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89:4888-4892.
- Ohira Y., Yoshinaga T., Nomura T., Kawano F., Ishihara A., Nonaka I., Roy R.R. and Edgerton V.R.(2002): Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv. Space. Res.*, 30,777-781.
- Ohira Y., Yoshinaga T., Ohara M., Nonaka I., Yoshioka T., Yamashita-Goto K., Shenkman B.S., Kozlovskaya I.B., Roy R.R. and Edgerton V.R. (1999): Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *J.Appl. Physiol.*, 87: 1776-1785.
- Okusawa S., Gelfand J.A., Ikejima T., Connolly R.J. and Dinarello C.A. (1988): Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest.*, 81:1162-1172.
- Ostrowski K., Rohde T., Zacho M., Asp S. and Pedersen B.K.(1998):Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J. Physiol.*, 508:949-953.

- Pan M.H., Lin-Shiau S.Y. and Lin J.K.(2000): Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 60: 1665-1676.
- Pareek T.K., Keller J., Kesavapany S., Pant H.C., Iadarola M.J., Brady R.O. and Kulkarni A.B.(2006): Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103:791-796.
- Peake J., Nosaka K., Suzuki K. (2005): Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc. Immunol. Rev.*, 11:64-85.
- Pecaut M.J., Miller G.M., Nelson G.A. and Gridley D.S.(2004):Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: hematological and lymphocyte function analyses. *J. Appl. Physiol.*, 97:29-38.
- Pedersen B.K. (2011): Muscles and their myokines. *J. Exp. Biol.*, 214:337-346.
- Picquet F., Bouet V., Cochon L., Lacour M. and Falempin,M.(2005): Changes in rat soleus muscle phenotype consecutive to a growth in hypergravity followed by normogravity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289,R217-224.
- Radak Z., Naito H., Taylor A.W. and Goto S. (2012): Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? *Nitric Oxide*, 26:89-94.
- Rådegran G. and Saltin B. (1999): Nitric oxide in the regulation of vasomotor tone in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 276:H1951-1960.
- Reid M.B. (2001): Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33:371-376.
- Reid M.B.(1998): Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta. Physiol. Scand.*, 162: 401-409.

- Rigamonti E., Touvier T., Clementi E., Manfredi A.A., Brunelli S., Rovere-Querini P.(2013): Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *J. Immunol.*, 190:1767-1777.
- Riley D.A., Ellis S., Slocum G.R., Sedlak F.R., Bain J.L., Krippendorf B.B., Lehman C.T., Macias M.Y., Thompson J.L., Vijayan K. and De Bruin J.A. (1996):In-flight and postflight changes in skeletal muscles of SLS-1 and SLS-2 spaceflown rats. *J. Appl. Physiol.*, 81:133-144.
- Rosendal L., Sjøgaard K., Kjaer M., Sjøgaard G., Langberg H. and Kristiansen J. (2005): Increase in interstitial interleukin-6 of human skeletal muscle with repetitive low-force exercise. *J. Appl. Physiol.*, 98:477-481.
- Rubinstein I., Abassi Z., Coleman R., Milman F., Winaver J. and Better O.S. (1998): Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J. Clin. Invest.*, 101: 1325-1333.
- Sakuma K., Watanabe K., Sano M., Uramoto I., Sakamoto K. and Totsuka T.(1999) :The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1428: 284-292.
- Sakurai T., Hollander J., Brickson S.L., Ohno H., Ji L.L., Izawa T. and Best T.M. (2005) :Changes in nitric oxide and inducible nitric oxide synthase following stretch-induced injury to the tibialis anterior muscle of rabbit. *Jpn. J. Physiol.*, 55: 101-107.
- Sakurai T., Kano Y., Ohno H., Ji L.L., Best T.M. and Izawa T.(2004): Effect of nitric oxide in recovery from structural damage in skeletal muscle. *FASEB J.*, 18: A359-359.

- 桜井智野風, 檜村修生, 喜多清, 柴田茂貴, 青木健, 下井岳, 伊藤雅夫, 岩崎賢一  
(2010): 短時間の過重力負荷が骨格筋に及ぼす影響, 宇宙航空環境医学, 47:  
3-9.
- Sakurai T., Kashimura O, Kano Y, Ohno H, Ji L.L., Izawa T. and Best T.M.(2013):Role  
of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in  
rat skeletal muscle. *J.Physiol.Sci.*, in press.
- Salminen A. (1985): Lysosomal changes in skeletal muscles during the repair of  
exercise injuries in muscle fibers. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, 539: 1–31.
- Salminen A. and Kihlstrom M.(1987): Protective effect of indomethacin against  
exercise-induced injuries in mouse skeletal muscle fibers. *Int. J. Sports Med.*,  
8:46-49.
- Sassoon D., Lyons G., Wright W.E., Lin V., Lassar A., Weintraub H. and Buckingham M.  
(1989): Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1  
during mouse embryogenesis. *Nature*, 341: 303-307.
- Schrage W.G., Dietz N.M., Eisenach J.H. and Joyner M.J.(2005): Agonist-dependent  
variability of contributions of nitric oxide and prostaglandins in human skeletal  
muscle. *J. Appl. Physiol.*, 98:1251-1257.
- Schrage W.G., Joyner M.J. and Dinenna F.A. (2004): Local inhibition of nitric oxide  
and prostaglandins independently reduces forearm exercise hyperaemia in humans.  
*J. Physiol.*, 557: 599-611.
- Shen W., Zhang X., Zhao G., Wolin M.S., Sessa W. and Hintze T.H.(1995): Nitric oxide  
production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation  
during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 27:1125-1134.



- Shibata S., Kita S., Kim H., Ito M. and Iwasaki K.(2004): Morphometric changes in vagal nerves of fourth generation mice passage-bred in a 2-G environment. *Aviat. Space. Environ. Med.*, 75:387-390.
- Shijo H., Iwabucki K., Hosoda S., Watanabe H., Nagaoka I. and Sakakibara N.(1998): Evaluation of neutrophil functions after experimental abdominal surgical trauma. *Inflamm. Res.*, 47: 67-74.
- Silvagno F., Xia H. and Bredt D. S. (1996): Neuronal nitric-oxide synthase- $\mu$ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 271: 11204–11208.
- Smith L,L., (1991): Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23:542-551
- Soneja A., Drews M., Malinski T. (2005): Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol. Rep.*, 57: 108-119.
- Sriwijitkamol A., Christ-Roberts C., Berria R., Eagan P., Pratipanawatr T., DeFronzo R.A., Mandarino L.J. and Musi N. (2006): Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training. *Diabetes*, 55 :760-767.
- Stamler J. S., and Meissner G. (2001): Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, 81: 209–237.
- Stowe R.P., Yetman D.L., Storm W.F., Sams C.F. and Pierson D.L.(2008): Neuroendocrine and immune responses to 16-day bed rest with realistic launch and landing G profiles. *Aviat. Space. Environ. Med.*, 79:117-22.

- Sudo M. and Kana Y. (2009): Myofibers apoptosis occur in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats. *J. Physiol. Sci.*, 59: 405-412.
- Tajbakhsh S. (2009): Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.*, 266: 372-389.
- Tatsumi R., Hattori A., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Allen R.E. (2002): Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol. Biol. Cell.*, 13: 2909-2918.
- Tatsumi R. (2010): Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim. Sci. J.*, 81:11-20.
- Thompson M., Becker L., Bryant D., Williams G., Levin D., Margraf L. and Giroir B.P.(1996):Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 81:2415-2420.
- Tidball J.G. (1995) :Inflammatory response to acute muscle stretch injury. *Med. Sci. Sports Exer.*, 27: 1022-1032.
- Tidball J.G., Lavergne E., Lau K.S., Spencer M.J., Stull J.T. and Wehling M.(1998): Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 275: C260-C266.
- Tidball J.G. and Wehling-Henricks M. (2007): Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J. Physiol.*, 578: 327-336.

- Tidball, J. G. and Villalta S. A. (2010): Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 298: R1173–1187.
- Torres S.H., De Sanctis J.B., de L. Briceno M., Hernández N. and Finol H.J.(2004): Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J. Endocrinol.*, 181,419-427.
- Tsukahara Y., Mirosaki T., Horita Y., Torisu M. and Tanaka M.(1998): Expression of inducible nitric oxide synthase in circulating neutrophils of the systemic inflammatory response syndrome and septic patients. *World J. Surg.*, 22: 771-777.
- Ulibarri J.A., Mozdziak P.E., Schultz E., Cook C. and Best T.M. (1999): Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpencillamine, stimulate myoblast proliferation in vitro. *In Vitro. Cell Dev. Biol. Anim.*, 35: 215-218.
- Wang X.D., Kawano F., Matsuoka Y., Fukunaga K., Terada M., Sudoh M., Ishihara A. and Ohira Y. (2006): Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 290:C981-989.
- Widrick J.J., Knuth S.T., Norenberg K.M., Romatowski J.G., Bain J.L., Riley D.A., Karhanek M., Trappe S.W., Trappe T.A., Costill D.L. and Fitts R.H. (1999):Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J. Physiol.*, 516:915-930.
- Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G., Pluta R.M., Hewett S.J., Colton C., Vitek M., Feelisch M. and Grisham M.B. (2001): Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid. Redox. Signal.*, 3: 201-213.
- Xie Q. and Nathan C. (1994): The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leukocyte Biol.*, 56: 576-582.

- Yang Y., Baker M., Graf S., Larson J. and Caiozzo V.J. (2007): Hypergravity resistance exercise: the use of artificial gravity as potential countermeasure to microgravity. *J. Appl. Physiol.*, 103:1879-1887.
- Zammit P.S., Partridge T.A., Yablonka-Reuveni Z. (2006): The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem.Cytochem.*, 54:1177-1191.
- Zhang J.S., Kraus W.E. and Truskey G.A. (2004): Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287: C292-299.

## 謝辞

大学教員となり 20 年余りの歳月を過ごした後のあまりに遅い学位取得だったにもかかわらず、丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました国際食料情報学部健康科学研究室 榎村修生教授に心からお礼申し上げます。論文作成に当たりご指導ご鞭撻を賜りました応用生物科学部 栄養科学科 臨床栄養学研究室 田中越郎教授に心より御礼申し上げます。学生時代より公私ともにお世話になり、研究者としての目標でもある早稲田大学 川上泰雄教授に深く感謝いたします。

未熟な研究者だった私を長い間叱咤激励していただいた同志社大学 井澤鉄也教授、杏林大学 大野秀樹教授に深く感謝いたします。アメリカ留学の際に骨格筋損傷という研究分野に導いていただいた The Ohio State University の Dr. Thomas M Best, The University of Minnesota の Dr. Li Li Ji に感謝いたします。東京都立大学教員時代の身体運動科学の先生方、卒業生からの助言や励まし、そして心からの支援に本当に感謝いたします。また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

本研究は実験動物の犠牲の上に成り立っています。研究の遂行に際して動物の使用数を必要最低限に抑え、可能な限り苦痛を与えることがないように細心の注意を払ってきましたが、改めて本研究のために犠牲となった動物達の冥福をお祈りいたします。

最後になりますが、駆け出しの研究者の時期からいつも心の支えになってくれた父、母に心から感謝します。そして、四十路を過ぎてからの学位取得に際し、どのような状況においても応援してくれた素晴らしい妻と子供たちに心から感謝します。

2013 年 7 月 櫻井 智野風