

平成 29 年度学位申請論文

リーチ把握動作の繰り返しによる握力低下の
メカニズムに関する実験的研究

名古屋大学大学院医学系研究科
リハビリテーション療法学専攻

(指 導：鈴木 重行 教授)

藤原 光宏

目次

要旨	4-5
本文	
緒言	6-7
方法	8-11
1. 実験動物	
2. 自発的なリーチ把握動作を繰り返す課題	
3. 前肢の握力測定	
4. 逃避反応閾値測定	
5. 筋採取	
6. 浅指屈筋の形態学的分析	
7. RNA 分離	
8. Real-time quantitative reverse transcription PCR 法	
9. タンパク質分離	
10. Western blot 法	
11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法	
12. 統計解析	
結果	11-13
1. 課題の実施状況	
2. 体重と握力の推移	
3. 前腕屈筋群の逃避反応閾値	
4. 浅指屈筋の形態学的変化	
5. 浅指屈筋における NGF、GDNF および TNF- α の発現	
6. 浅指屈筋におけるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系に関連するタンパク質の発現	
考察	13-16
1. 課題の継続に伴う握力の変化	
2. リーチ把握動作の繰り返しによって惹起される前腕屈筋群の機械的痛覚過敏	
3. 握力低下を引き起こす要因	
4. 浅指屈筋の萎縮に関連する分子の変化	
5. 前腕屈筋群の痛覚過敏と浅指屈筋における NGF、GDNF、TNF- α との関係	
6. 今後の展望	
結論	16
謝辞	17
図表	18-28

Table. 1 課題の実施状況

- Fig. 1 自発的なリーチ把握動作
- Fig. 2 前腕屈筋群の逃避反応閾値（機械的痛覚閾値）の測定
- Fig. 3 握力の推移
- Fig. 4 前腕屈筋群の逃避反応閾値の推移
- Fig. 5 課題 3 週および 6 週の浅指屈筋の形態
- Fig. 6 浅指屈筋における神経栄養因子の発現
- Fig. 7 課題 6 週における浅指屈筋の tumor necrosis factor (TNF) - α タンパク質の発現
- Fig. 8 浅指屈筋の E3 ユビキチンリガーゼと autophagy-related (Atg) 遺伝子の発現
- Fig. 9 課題 6 週における浅指屈筋の muscle RING finger 1 (MuRF1)、Beclin1、autophagy-related (Atg) 5-Atg12 複合体タンパク質の発現
- Supplemental data 課題 6 週における浅指屈筋の insulin-like growth factor1 (IGF1)、Akt1、regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) mRNA の発現

参考文献 29-33

2017年度 博士学位論文 要旨

リーチ把握動作の繰り返しによる握力低下のメカニズムに関する実験的研究
名古屋大学大学院 医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻 理学療法学分野
学生番号：581303059 氏名：藤原光宏 指導教員：鈴木重行

【背景】作業関連性筋骨格系障害 (work-related musculoskeletal disorders; 以下 WMSD) は、仕事によって引き起こされた可能性のある筋骨格系障害である。WMSD の主要なリスク要因には、高頻度に繰り返す作業が挙げられる。ヒトを対象とした先行研究では、高頻度の軽作業に従事することが、握力低下や筋痛を引き起こすことを報告している。一方で、動物を対象とした先行研究では、軽作業を模したリーチ把握動作をラットに繰り返し行わせると、握力が低下するという報告が散見される。しかしながら、リーチ把握動作の繰り返しによる握力低下のメカニズムは明らかではない。

【目的】リーチ把握動作の繰り返しによる筋痛、骨格筋萎縮の発生および、これらと握力低下との関連性について明らかにすることを目的とした。

【方法】実験は 10 週齢 SD 系雌性ラットを用い、課題を行わない Control 群 ($n = 19$) と課題を行う Task 群 ($n = 22$) に分けた。課題はペレットへの前肢リーチ把握動作を 4 回/分、2 時間/日、3 日/週、3 または 6 週間継続した。ラットは行動学的解析として、握力と前腕屈筋群の逃避反応閾値を毎週測定した。実験終了後、ラットから浅指屈筋を摘出し、相対筋重量、筋線維横断面積を測定した。さらに、浅指屈筋内の nerve growth factor (以下 NGF)、glial cell line-derived neurotrophic factor (以下 GDNF)、tumor necrosis factor (以下 TNF) α 、muscle-specific ligases, muscle RING finger 1 (以下 MuRF1)、atrophy F-box/Atrogin-1 (以下 Atrogin-1)、Beclin1、autophagy-related (以下 Atg) 5、microtubule-associated protein 1 light chain 3 (以下 LC3) の mRNA またはタンパク質を解析した。

【結果】Task 群の握力と逃避反応閾値は、課題前と比較して、それぞれ課題 2 週、3 週から有意に低下した ($P < 0.05$)。さらに Task 群の浅指屈筋の相対筋重量および筋線維横断面積は、Control 群と比較して課題 6 週で有意に減少した (それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。浅指屈筋内の NGF、GDNF、TNF- α mRNA およびタンパク質は Control 群と Task 群の間に差はなかった。一方で、課題 6 週に Task 群の MuRF1 タンパク質は、Control 群と比較して増加傾向にあった ($P = 0.065$)。さらに、Task 群の Beclin1 および Atg5-Atg12 複合体タンパク質は、Control 群と比較して有意に高値であった (ともに $P < 0.05$)。

【結論】本研究は、過剰な反復運動への長期間の曝露が、握力低下、筋痛および骨格筋萎縮を引き起こすことを示した。さらに、リーチ把握動作の繰り返しへの曝露は、ユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系を介して、筋タンパク質分解を亢進させ、これによって骨格筋量を減少させる可能性を示した。

A research on mechanism of loss of grip strength in rats
following exposure to excessive repetitive reaching and grasping tasks
リーチ把握動作の繰り返しによる握力低下のメカニズムに関する実験的研究

FUJIWARA Mitsuhiro

Matriculation No.: 581303059

Nagoya University Graduate School of Medicine

Program in Physical and Occupational Therapy

Academic advisor: SUZUKI Shigeyuki

Purpose: Work-related musculoskeletal disorders (WMSD) are caused by the overuse of muscles in the workplace. Performing repetitive tasks is a primary risk factor for the development of WMSD. Many workers in highly repetitive jobs exhibit muscle pain and decline in handgrip strength, yet the mechanisms underlying these dysfunctions are poorly understood. We investigated that long-term exposure to excessive repetitive motion would cause muscle pain and skeletal muscle atrophy and, furthermore, the relationship between loss of grip strength and muscle pain, and between loss of grip strength and skeletal muscle atrophy.

Methods: Forty one female Sprague-Dawley rats aged 10 weeks were used for this study. Rats were divided randomly into food-restricted control (Control, $n = 19$) or task (Task, $n = 22$) groups. Control and Task groups were trained for an initial 2 weeks to learn a voluntary repetition reaching and grasping tasks. Afterward only Task group performed the task for 2 h/day, 3 days/week, for 3 or 6 weeks. We investigated behavioral (i.e., grip strength and muscle pain), histological (i.e., measurements of relative muscle weight and muscle fiber cross-sectional area) and molecular biological and biochemical (i.e., mRNA expression relevant to muscle pain, ubiquitin-proteasomes, and autophagy-lysosomes) analyses.

Results: In the Task Group, grip strength and forearm flexor withdrawal threshold declined significantly from week 2 to week 6, compared with these values at week 0 ($P < 0.05$). Relative muscle weight and muscle fiber cross-sectional area of flexor digitorum superficialis (FDS) muscles decreased significantly in the Task group, compared with the Control group, at 6 weeks ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). Nerve growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor α expression in FDS muscles was not significantly different in Control and Task groups at 3 and 6 weeks. At 6 weeks, the Task group had elevated MuRF1 protein levels ($P = 0.065$) and significant overexpression of the autophagy-related (Atg) proteins, Beclin1 and Atg5–Atg12, compared with in the Control group (both $P < 0.05$).

Conclusion: These data suggested that long-term exposure to excessive repetitive motion causes loss of grip strength, muscle pain and skeletal muscle atrophy. Furthermore, this exposure may enhance protein degradation through both the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems, thereby decreasing skeletal muscle mass.

【緒言】

作業関連性筋骨格系障害(work-related musculoskeletal disorders; 以下 WMSD)は仕事によって引き起こされた可能性のある筋骨格系の障害と定義され、WMSD は反復作業、力仕事、ぎこちない姿勢や固定された姿勢に伴う身体的ストレスにより惹起される。30 秒に 1 回以上の高頻度の作業に従事する者は、低頻度の作業に従事する者に比べて 2.8 倍受傷するリスクが高く、さらに高頻度の作業に従事する女性の 23%は前腕や手の筋に疼痛を有すると報告されている[1]。加えて、WMSD のために上肢の治療を求める女性は握力の低下を示し、これらの症状は自覚的な身体活動の程度に関連していた[2]。

ラットを対象とした先行研究では、自発的なリーチ把握動作を繰り返す課題を継続することによって引き起こされる WMSD の病態が調査されている[3, 4]。この課題を繰り返すラットでは、課題によって握力が低下することがいくつかの先行研究で報告されている[5-9]。Barbe ら[5]は、リーチ把握動作を繰り返すことにより、ラットの前腕屈筋群に tumor necrosis factor (以下 TNF) α 、interleukin (以下 IL) 1α 、IL-18 が増加したことを示した。さらに、この課題によって脊髄後角では substance P とその受容器である neurokinin-1 が増加したことが示され[10]、前腕屈筋とその腱内では fibrogenic-related proteins が増加したことも報告されている[7-9]。また、TNF- α や IL-1 α 、IL-18 などの炎症性サイトカインや Substance P は炎症性疼痛のメディエーターであることが知られている。そのため、リーチ把握動作の繰り返しが筋痛を惹起させることが予測される。近年では、Xin ら[11]は、前述した WMSD モデルラットを対象に von Frey hair test による皮膚の疼痛を評価した。しかし、Nasu ら[12]は、骨格筋の機械的痛覚閾値を評価するには先端径が少なくとも 2.6 mm 以上のプローブを用いて圧迫刺激を加える必要があることを示唆している。このように、様々な先行研究[5-9]によって、リーチ把握動作の繰り返しによる握力低下の要因が挙げられているが、筋痛の有無やその影響については確認されていない。

他の動物モデルでは、リーチ把握動作とは異なる運動負荷の方法によって筋痛が生じることを示しており、ラットの後肢筋に伸張性収縮を繰り返し与えると、その骨格筋は機械的痛覚閾値の低下すなわち遅発性筋痛 (delayed-onset muscle soreness; 以下 DOMS) が生じることが報告されている[13, 14]。伸張性収縮を含む骨格筋への運動負荷は、骨格筋内の神経成長因子 (nerve growth factor; 以下 NGF)、グリア細胞系由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor; 以下 GDNF) および TNF- α の発現を誘導し、その結果、骨格筋での機械的痛覚閾値を低下させることが報告されている[13, 15, 16]。虚血や神経損傷によって骨格筋で産生された NGF は、侵害受容器を感作させる作用を持つ[18]。NGF と同様に、GDNF は特定のニューロンの増殖および維持にも関与する。ラットを用いた先行研究では、NGF または GDNF を骨格筋に注入すると、機械的閾値が低下させることが示されている[16, 19]。以上より、我々は、ラットにリーチ把握動作を繰り返すことが、前腕屈筋内の NGF、GDNF および TNF- α を増加させ、さらに機械的痛覚閾値の低下を惹起させることを仮説として挙げた。

いくつかの先行研究で、疼痛の発生によって、筋力が低下することが示されている[20-22]。一方で、骨格筋の収縮力は筋量または筋線維横断面積と強い相関関係を持つことが知られている[23-25]。したがって、ラットにリーチ把握動作を繰り返すことで生じる握力低下は筋痛だけでなく、骨格筋萎縮を原因とすることが推察される。しかし、この WMSD

モデルラットでは、骨格筋の筋量や筋線維横断面積を調査した先行研究はない。

骨格筋のサイズは、筋タンパク質の合成と分解のダイナミックな相互作用によって決定される。筋タンパク質分解にはユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系という二つの主要経路が関与している。一つ目のユビキチン・プロテアソーム系は可溶性および筋原線維のタンパク質を分解する[26]。タンパク質の基質への特異的なタグ付けの役割は、ユビキチンリガーゼが持つ。筋特異的なユビキチンリガーゼである **muscle-specific ligases, muscle RING finger 1** (以下 **MuRF1**) と **atrophy F-box/Atrogin-1** (以下 **Atrogin-1**) は、骨格筋のタンパク質分解時に増加する[27]。**MuRF1** および **Atrogin-1** は、標的となるタンパク質のユビキチン化およびその後の **26S** プロテアソームによる分解のために基質に選択的に結合すると考えられている。すなわち、骨格筋萎縮を誘発する刺激後の **MuRF1** および **Atrogin-1** の増加は、筋タンパク質分解が亢進したことを示唆させる[28]。オートファジーの過程は、タンパク質およびオルガネラを含む細胞質の一部の周りに二重膜が形成されるオートファゴソーム形成から始まる。オートファゴソーム形成は、オートファジー関連 (**autophagy-related**; 以下 **Atg**) 遺伝子によってコードされるタンパク質の制御下にある。その **Atg** タンパク質の中で、2つのユビキチン様タンパク質結合反応系があり、一つ目の **Atg5-Atg12** 複合体は、オートファゴソーム膜形成に関与するために **Atg16** と相互作用する。二つ目の **microtubule-associated protein 1 light chain 3** (以下 **LC3**) として哺乳動物においても知られている **Atg8** のホモログが挙げられる。**LC3** はリン脂質と結合した場合、**LC3II** となり、分解および膜融合における基質の選択に関与する[29]。オートファジーの過程制御に関与するタンパク質の中で、**Atg6** の哺乳動物ホモログである **Beclin1** は隔離開始の中核とされる[30, 31]。マウスを対象とした先行研究では、長期間のランニング運動は、足底筋において **MuRF1** タンパク質の増加とプロテアソームの活性化を誘発させ[32]、**Beclin1** や **LC3II** といった **Atg** タンパク質の増加すなわち恒常的オートファジーを増加させた[33]と報告されている。したがって、長期間の運動の継続は、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の2つを介して筋タンパク質の分解を亢進させると考えられる。しかしながら、リーチ把握動作を繰り返す **WMSD** モデルラットでは、筋タンパク質の分解に関与する分子の変化を調査した報告はない。

そこで、本研究の目的は、リーチ把握動作を繰り返す **WMSD** モデルラットにおいて、筋痛および骨格筋量に着目し、これらと握力低下との関連性を明らかにすることとした。加えて、リーチ把握動作の繰り返しによる筋痛の原因となる分子の変化ならびに骨格筋におけるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系に関連する分子の変化を明らかにすることを目的とした。

Barbe ら[5]や **Clark** ら[6]は、ラットにリーチ把握動作を繰り返す課題 (**high repetition negligible force**) を与えることで、ヒトと同様の機能障害が生じることを示しており、必ずしも高強度運動でなくても、**WMSD** となることが考えられたため、本研究ではリーチ把握動作という低強度運動を繰り返す課題を選択した。したがって、本研究は、過剰な反復運動への長期暴露が、握力低下、筋痛および骨格筋萎縮を引き起こし、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系による筋タンパク質分解の亢進に伴って骨格筋萎縮が生じるという仮説を調査した。

【方法】

1. 実験動物

本研究で用いたすべての動物の処置は、名古屋大学が定める動物実験指針に準じて実施した。実験動物は、10週齢の Sprague-Dawley 系雌性ラットを 41 匹用いた。ラットは SLC 社（浜松、日本）から購入し、気温（25℃）および照明時間（8：00-20：00）の条件下で飼育した。ラットは課題を実施しない Control 群（n = 19）と課題を実施する Task 群（n = 22）の 2 群に無作為に振り分けた。Control 群と Task 群ともに 5 週もしくは 8 週間の給餌量調整を行った。給餌量調整は無処置で飼育した同週齢のラットの体重と比較して、80%以上の体重を保持するように実施した[3, 4, 6]。Control 群、Task 群のラットは、両群ともに、初めに 2 週間の課題への順応期間を設け、その後 Task 群のみ 3 週間（以下課題 3 週）もしくは、6 週間（以下課題 6 週）の課題を行った。

加えて、行動学的解析が、筋組織へ影響を与えてしまうことを考慮して、課題 6 週に用いた Control 群と Task 群のラットは実施された行動学的解析の種類によって、その後の筋組織の解析を区別した。この理由は、筋痛を測定するために、骨格筋に機械的刺激を加えることが、骨格筋のサイズに影響を及ぼすという懸念があったためである。先行研究では、伸張による骨格筋への機械的刺激が骨格筋萎縮を抑制したことを報告している[34, 35]。したがって、本研究では、筋痛を測定したラットの骨格筋は組織学的解析（相対筋重量、筋線維横断面積）に用いなかった。なお、課題 3 週に用いた Control 群と Task 群のラットは行動学的解析を実施していないため、その後の筋組織は組織学的解析（相対筋重量、筋線維横断面積）、分子生物学的（筋痛およびユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系に関連する mRNA）を実施した。課題 6 週のラットのうち、握力を測定したものは、組織学的解析（相対筋重量、筋線維横断面積）、分子生物学的および生化学的解析（ユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系に関連する mRNA とタンパク質）を実施した。一方、課題 6 週のラットのうち、筋痛を測定したものは、組織学的解析には用いらず、分子生物学的および生化学的解析（筋痛に関連する mRNA とタンパク質）を実施した。

2. 自発的なリーチ把握動作を繰り返す課題

ラットは Metz ら[36]の方法を参考に自作した試験箱に入れた。試験箱の前壁中央に 1.3 cm 幅のスリットがあり、ラットがその先に設置された棚に配給されるペレットに前肢をリーチして獲得できるように設定した。課題中は、15 秒ごとにペレット（45mg、BioServ 社、Frenchtown, NJ, USA）を試験箱に設置された棚に配給し、ラットが自発的にペレットへのリーチ把握動作を繰り返すように誘発した（Fig. 1）。観察者はペレットが配給されるたびに、アラーム音を鳴らした[3, 4]。さらに、棚に配給されるペレットは左右どちらか一方の前肢でのみ掴むようにするため、配給位置を調整した。Control 群と Task 群のラットは、最初の 2 週間に自発的なリーチ把握動作の課題を順応するトレーニング期間を設けた。トレーニング期間終了後、Task 群のラットのみが、2 時間/日、3 日/週、3 週間または 6 週間を継続して課題を行った。観察者はラットのリーチ回数とペレット獲得数、課題の参加時間を計測した。これらの課題時の指標は、ラットの身体負荷の指標として使用した。

3. 前肢の握力測定

検者は、ラットを尾部で持ち上げ、プッシュプルゲージ(アイコーエンジニアリング社、大阪、日本)に取り付けられたバーを掴むように誘導した。その後、ラットを尾部でゆっくりと後方に引っ張り、ラットがバーを離す直前に得られた張力を握力と定義し、測定した。測定は5回連続して行い、5回の測定のうち最大値を採用した。

4. 逃避反応閾値測定

ラットの浅指屈筋を含む前腕屈筋群にプローブを押し付け、機械的圧迫を漸増させ、ラットが前腕を屈曲し、逃避反応が得られた圧力値を逃避反応閾値として測定した。この方法は、Nakano ら[37]の方法を参考にラットの頭および体幹部分を布で包み、ラットを自作のハンモックに吊るした (Fig. 2)。これらの条件下で、ラットは前肢を自由に動かせる状態であることを確認した。逃避反応閾値は、プローブ(先端直径 5mm)を備えた Pressure Application Measurement device (Ugo Basile 社、Comerio、Italy) で測定した。Nasu ら[12]は、プローブの先端直径が 2.5 mm 以上で骨格筋の機械的侵害受容閾値の測定が可能であることを示唆している。測定は1分間隔で5回行い、5回の平均値を逃避反応閾値として採用した。

5. 筋採取

Control 群の課題3週 (n = 6) および6週 (n = 11)、Task 群の課題3週 (n = 6) および6週 (n = 11)、合計34匹のラットから浅指屈筋を採取した。課題の即時効果ではなく、課題の長期継続による慢性効果を調査するため、筋採取は、最後の課題が終了してから24から36時間後に実施した。筋採取の方法は、ペントバルビタールナトリウム (Nembutol; 120mg/kg) をラットの腹腔に投与し、深麻酔下で浅指屈筋を採取した。採取した浅指屈筋は、筋腹中央部分で切断し、近位部分を組織学的分析に、遠位部分を分子生物学的および生化学的分析に用いた。筋試料は急速凍結し、分析するまで-80°Cで保存した。我々は筋腹中央部分から切断し、筋線維が最も厚くなった部位で切片を作成し、筋線維横断面積を計測した[38, 39]。

6. 浅指屈筋の形態学的分析

形態学的分析は Control 群の課題3週 (n = 6) および6週 (n = 6)、Task 群の課題3週 (n = 6) および6週 (n = 6)、合計24個の筋試料で行った。これらの筋試料を optimal cutting temperature compound (Sakura Fintek 社、Torrance、CA、USA) に埋め、クライオスタット (CM1510S、Leica 社、Wetzlar、Germany) を用いて8 μm厚の横断切片を作製した。これらの凍結切片は、ヘマトキシリンエオシン (H&E) 染色を施した後に、光学顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE 社、大阪、日本) で撮影し画像を得た。筋線維横断面積は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health 社、Bethesda、MD、USA) を用いて、切片画像から測定した。1試料あたり、少なくとも200本の筋線維を測定し、これらの平均値を採用した。

7. RNA 分離

筋試料は Trizol Reagent (Invitrogen 社、Carlsbad、CA、USA) 中で粉砕した。室温で 5 分間インキュベートした後、15,000 g で 4 °C、10 分間遠心分離した。上清をチューブに移し、上清の 1/5 容量のクロロホルムを加え、混合した。混合物を室温で 5 分間インキュベートした後、15,000 g で 4 °C、10 分間遠心分離した。混合物の水層を別のチューブに移し、0.8 倍容量のイソプロパノールを加え、混合した。これを室温で 10 分間インキュベートした後、15,000 g で 4 °C、10 分間遠心分離した。得られた RNA を 70%エタノールで洗浄し、15,000 g で 4 °C、10 分間遠心分離した。洗浄した RNA を RNase inhibitor (最終濃度 2 µg/µl) を含む 20 µl の RNase-free water に溶解し、さらに ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡社、大阪、日本) を用いて DNase 処理および逆転写を行った。

8. Real-time quantitative reverse transcription PCR 法

遺伝子発現の定量は、Real-time quantitative reverse transcription PCR (以下 qRT-PCR) 法によって分析した。qRT-PCR は 2 µl の cDNA、10 µl の TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies 社、Carlsbad、CA、USA) および 1 µl のプライマーを混合して反応させた。PCR 反応の分析は、StepOnePlus Real-Time PCR システム (Applied Biosystems 社、Foster City、CA、USA) を用いて $\Delta\Delta C_t$ 法で定量化した。プライマーは NGF (Ngf, Rn01533872_m1)、GDNF (Gdnf, Rn00569510_m1)、MuRF1 (Trim63, Rn00590197_m1)、Atrogin-1 (Fbxo32, Rn00591730_m1)、Beclin1 (Becn1, Rn00586976_m1)、Atg5 (Atg5, Rn01767063_m1)、LC3 (Anxa3, Rn00563181_m1) および β -actin (Actb, Rn00667869_m1) を使用し、すべてのプライマーは TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies 社) から入手した。 β -Actin は、各試料の結果を標準化するための内在性コントロールとして使用した。

9. タンパク質分離

凍結した筋試料は 10% protease inhibitor cocktail を加えた RIPA buffer (1 mg タンパク質/10 ml RIPA) 中で粉砕した後、溶解された組織を 14,000 g で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。得られた総タンパク質は、BCA-200 protein assay kit (Pierce 社、Rockford、IL、USA) を用いて定量した。

10. Western blot 法

総タンパク質含量を測定した後、タンパク質抽出液を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) 用の RIPA buffer で 2 µg/µl の濃度に調整した。溶解物は 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8)、2% SDS、20% sucrose、0.06% bromophenol blue および 100mM DTT を含む等容量の EzApply (アトー社、東京、日本) と混合し、95 °C で 5 分間加熱した。調整した試料は、15–30 µl の容量で precast polyacrylamide gel (10%–18%、Bio-Rad 社、Hercules、CA、USA) の各レーンに分注し、200 V の定電圧で 30–45 分間電気泳動した。

次に、Trans-Blot Turbo (Bio-Rad 社) を用いて、1.3 A の定電流で 5 または 7 分間エ

レクトロブロッティングし、タンパク質バンドを 0.2 μm polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad 社) に転写した。転写後、SNAP i.d. 2.0 吸引式免疫反応システム (Merck Millipore 社、Billerica, MA, USA) を用いてウェスタンブロッティングを行った。PVDF 膜は、0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-T) を含む Tris-buffered saline 中に希釈した 0.5% (w/v) 脱脂粉乳または 1% (w/v) ウシ血清アルブミン、または PVDF Blocking Reagent (Can Get Signal、東洋紡社) でブロッキングした。その後 NGF (sc-548、Santa Cruz Biotechnology 社、Santa Cruz, CA, USA)、GDNF (sc-328、Santa Cruz Biotechnology 社)、MuRF1 (ab77577、Abcam 社、Cambridge, MA, USA)、Beclin1 (PD017、MBL 社、名古屋、日本)、Atg5-Atg12 複合体 (PM050、MBL 社) の 1 次抗体にそれぞれ 4 °C で一晩インキュベートした。次に PVDF 膜を洗浄し、それぞれ適切な 2 次抗体とともにインキュベートし、再度洗浄した。染色されたバンドは ECL Prime Western Blotting Detection System (RPN2232、GE ヘルスケア・ジャパン社、東京、日本) を使用して可視化し、Light Capture II (アトー社) で画像として保存した。測定後、stripping buffer (Restore Plus、Pierce 社、Rockford, IL, USA) を用いて PVDF 膜から抗体を除去した後に、Coomassie Brilliant Blue (以下 CBB) で染色し、すべてのレーンで同等量のタンパク質がロードされていることを確認した[40]。濃度測定分析は、画像分析ソフトウェア CS analyzer 3.0 (アトー社) を用いて行い、各バンドの CBB 染色の光学密度で標準化した。

11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

課題 6 週 (n = 5) の Control 群および Task 群 (n = 5) のタンパク質抽出液は、TNF- α ELISA キット (Ray Biotech 社、Norcross, GA, USA) を使用して TNF- α を定量した。TNF- α の最小分析感度は 25 pg/ml であった。データは総タンパク質 1 μg に対する TNF- α として標準化した。

12. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差として示した。体重、握力および機械的逃避反応閾値の比較は、two-way repeated analysis of variance (以下 ANOVA) 後に、Holm-Sidak multiple comparison test を実施した。その他の比較は、Control 群と Task 群それぞれの同週齢のデータに対して Student's t-test を実施した。有意水準は 5%とし、 $P < 0.05$ を有意差あり、 $0.05 \leq P < 0.1$ を傾向ありとして示した。統計解析は、統計ソフトウェア SigmaStat 4.0 (Systat Software Inc.社、San Jose, CA, USA) を用いた。

【結果】

1. 課題の実施状況

Task 群のラットは、課題 1 週におよそ 4,000 回のリーチ動作を行い、2 週以降は各週およそ 2,000 回のリーチ動作を行った (Table. 1)。その結果、課題実施期間中の総リーチ回数は 14,000 回以上に及んだ。課題 1 週は、ラットがペレットの供給がないときであってもリーチ把握動作を行い、2 週以降からラットはペレットが供給されたときのみリーチ

動作を試みた。そのため課題 1 週は、課題 2 週以降と比較して、リーチ回数が多かった。さらに、ラットは毎週およそ 1,100 個のペレットを獲得し、その結果、ペレット獲得数は課題実施期間を総じておよそ 6,600 個に達した。課題の参加時間は、毎週およそ 5.6 時間であり、6 週間の課題実施期間を総じておよそ 34 時間であった。

2. 体重と握力の推移

Control 群と Task 群の体重は、課題前（以下課題 0 週）（それぞれ 204.7 ± 2.7 、 $215.3 \pm 2.4\text{g}$ ）から課題 6 週（それぞれ 231.7 ± 6.1 、 $237.5 \pm 3.0\text{g}$ ）まで徐々に増加した。また、Control 群と Task 群の体重に有意な差は認めなかった。Control 群の握力は、実験期間を通して、課題 0 週と比較して変化しなかった（Fig. 3）。Task 群の握力は、課題 0 週と比較して課題 2 週から 6 週で有意に低下し（ $P < 0.05$ ）、課題 6 週には Control 群と比較して有意に低値であった（ $P < 0.01$ ）。Task 群の握力は、課題 3 週まで急激に低下し、3 週から 5 週まで課題 0 週と比較しておよそ 25%の低下を認め、6 週にはおよそ 32.4%低下し最低値となった。

3. 前腕屈筋群の逃避反応閾値

前腕屈筋群の逃避反応閾値は、機械的痛覚過敏の指標として測定した。Control 群の逃避反応閾値は、課題 0 週と比較して変化しなかった（Fig. 4）。Task 群の逃避反応閾値は、課題 0 週と比較して課題 3 週から 6 週で有意に低下し（ $P < 0.05$ ）、課題 2 週から 6 週まで Control 群と比較して有意に低値であった（ $P < 0.05$ ）。Task 群の逃避反応閾値は、課題 2 週から 6 週まで徐々に低下し、6 週には課題 0 週と比較しておよそ 11.0%の低下を認め、最低値となった。

4. 浅指屈筋の形態学的変化

浅指屈筋の相対筋重量（筋湿重量を体重で除した値）と筋線維横断面積は、課題 3 週では両群間に差は認めなかった（Fig. 5A, B）。一方、課題 6 週では、浅指屈筋の相対筋重量、筋線維横断面積ともに Task 群は、Control 群と比較して有意に低値であった（それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ）。

5. 浅指屈筋における NGF、GDNF および TNF- α の発現

神経栄養因子である NGF および GDNF ならびに炎症性サイトカインの TNF- α は、骨格筋の機械的痛覚過敏に関与することが知られている [16, 19, 41, 42]。課題 3 週と 6 週ともに、NGF、GDNF mRNA は、Control 群と Task 群に差は認められなかった（Fig. 6 A, B）。課題 6 週の NGF、GDNF タンパク質は、mRNA 発現と同様に 2 群間に差を認めなかった（Fig. 6C）。加えて、課題 6 週の TNF- α タンパク質は、2 群間に差を認めなかった（Fig. 7）。

6. 浅指屈筋におけるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系に関連するタンパク質の発現

MuRF1 および Atrogin-1 は、萎縮を誘導する条件下で転写され、増加する筋特異的 E3

ユビキチンリガーゼであり、ユビキチン・プロテアソーム経路の一部として同定された。Beclin1は、プレオートファゴソーム構造体に局在する Atg5-Atg12 結合や LC3 結合といった Atg タンパク質の蓄積を調整している。これらの分子は、オートファジー小胞およびオートファゴソームの形成を誘発することに必須であると考えられている。課題 3 週において、E3 ユビキチンリガーゼおよび Atg 遺伝子の発現は、Control 群と Task 群の間に差は認められなかった (Fig. 8A)。課題 6 週において Task 群は、Control 群と比較して、MuRF1 および Beclin1 mRNA が有意に高値となった ($P < 0.05$) (Fig. 8B)。また、Task 群の Atg5 mRNA は Control 群と比較して増加傾向を示した ($P = 0.071$)。これらの qRT-PCR の結果より、我々は課題 6 週の時点で、2 群間において mRNA 発現に差を示す分子のみタンパク質レベルで解析した。

Western Blot 法による解析の結果、Task 群は課題 6 週で Control 群と比較して MuRF1 タンパク質が増加傾向を示した ($P = 0.065$) (Fig. 9)。また、Task 群は課題 6 週で Control 群と比較して、Atg タンパク質の Beclin1、Atg5-Atg12 複合体が有意に増加した (ともに $P < 0.05$)。

【考察】

1. 課題の継続に伴う握力の変化

先行研究では、リーチ把握動作を 15 秒に 1 回以上の高頻度で繰り返す課題を 2 時間/日、3 日/週実施することで、課題 6 週からラットの前肢握力が低下することが報告されている [5, 43]。しかしながら、これらの研究に、課題 3 週での変化を調査したものはなかった。したがって、本研究は、以前に上記の先行研究で行われた課題の方法を参考にして、課題 2 週および 3 週の時点を含めて、毎週の握力の変化をより詳細に調査した。その結果、本研究は、リーチ把握動作を繰り返す課題を継続することで生じる握力低下が、先行研究で報告された課題 6 週よりも早い課題 2 週の時点で観察されることを示した。

2. リーチ把握動作の繰り返しによって惹起される前腕屈筋群の機械的痛覚過敏

本研究では、課題 2 週からの握力低下に加えて、前腕屈筋群の機械的痛覚過敏が引き起こされることが観察された。ヒトを対象とした研究では、反復性の高い作業をしている女性労働者の 23% が前腕と手の筋痛をもつと報告している [1]。一方、ラットを対象とした研究では、高頻度 (少なくとも 15 秒に 1 回) でハンドルを引っ張る (最大随意筋力の $60 \pm 5\%$) 課題を 6 週間継続した結果、von-Frey hair 試験による手掌の逃避反応閾値が低下したと報告されている [44]。その他の高頻度の動作を繰り返す課題を用いた動物実験では、皮膚痛は本研究の課題よりも高強度の動作を採用していた [45]。本研究の結果では、Task 群における前腕屈筋群の逃避反応閾値は、課題 0 週と比較して、課題 3 週から 6 週まで有意に減少し、Control 群と比較して課題 2 週から 6 週まで有意に低値であった。以上の結果から、リーチ把握動作を繰り返す課題が、前腕の筋痛を伴う筋骨格系障害を引き起こすと示唆された。

3. 握力低下を引き起こす要因

Beyreuther ら[46]は、TNF- α をラットの筋内に投与した結果、筋痛を引き起こし、さらに握力を低下させることを確認しており、握力低下と筋痛の関連を報告している。また、TNF- α を筋内に投与された条件下であっても、鎮痛作用を有する lacosamide または gabapentin を筋内に投与することで、ラットの握力は改善することが示された。したがって、筋痛は握力を低下させる要因であることが推察される。本研究では、Task 群の握力および前腕屈筋群の逃避反応閾値の低下は、課題 2 週から 6 週に生じた。これらの結果は、リーチ把握動作を繰り返す課題による握力低下の要因の 1 つに筋痛が挙げられることを推察させた。しかし、本研究では、Task 群で生じた筋痛を抑制した際の握力を検索していないため、筋痛が握力低下の要因と決定するには至らず、研究の課題となった。

本研究では、Task 群の握力は課題 6 週の時点が最も低い値を示した。Task 群は、Control 群と比較して、課題 3 週の時点では浅指屈筋の形態学的変化は観察されなかった。一方、課題 6 週では、Task 群の浅指屈筋の相対筋重量および筋線維横断面積は、有意な減少を示した。他の先行研究では、筋力と筋量または横断面積との間に強い相関があることが示されている[23–25]。したがって、課題 6 週での Task 群の握力低下は、筋痛に加え、骨格筋萎縮が要因であることが示唆された。

その他の要因を挙げると、リーチ把握動作の繰り返しによって、細胞外マトリックスタンパク質および筋の線維化に関連する分子が変化することが、他の研究で示されている。Abdelmagid ら[7]は、課題を 9 週間行ったラットの骨格筋において collagen type I の増加を報告した。さらに、Frara ら[47]は、課題を 3 週または 6 週行ったラットの骨格筋においてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases; 以下 MMPs) が増加したことを示した。Cabrera ら[48]は、骨格筋における collagen type I の増加は、線維化を起因とした骨格筋の収縮能低下を引き起こすことを報告している。以上より、リーチ把握動作の繰り返すことで、筋の線維化が生じ、骨格筋の収縮能を低下させる可能性が窺われる。本研究では、筋の線維化や収縮能については検索しておらず、本モデルラットの病態を捉える上での研究課題となった。

4. 浅指屈筋の萎縮に関連する分子の変化

骨格筋のサイズは、筋タンパク質合成と分解のバランスに依存する。長期的に低周波の電気刺激 (10 Hz、10 h/日) をラットの長趾伸筋に与えると、4 週後に筋重量が減少したことが報告されている[49]。Katzeff らは、ラットに 4 週間の自発的なホイール走行を実施させた結果、速筋線維を多く含む腓腹筋において筋タンパク質合成速度を低下させたことを報告している[50]。一方で、遅筋線維を多く含むヒラメ筋においては筋タンパク質合成速度の低下はみられなかった。Cunha らは、マウスにトレッドミル走行を 1 回実施させることで 26S プロテアソームが活性化され、走行直後において足底筋の筋タンパク質分解が亢進することを報告している[32]。一方で、走行 48 時間後には、この 26S プロテアソームの活性化みられなかった。さらに、この先行研究では、8 週間のトレッドミル走行によって、足底筋における 26S プロテアソームの活性化が走行後 48 時間まで持続することが示されている。したがって、速筋において、低強度の筋収縮を繰り返すことを長期的に持続することは、筋タンパク質合成を減少させ、筋タンパク質分解を増加させることによっ

て、骨格筋萎縮を引き起こすことが推察される。本研究で用いたラットの浅指屈筋は、速筋線維の割合が大きいことが知られている[51]。すなわち、長期間のリーチ把握動作、すなわち低強度の筋収縮の繰り返しは、浅指屈筋において筋タンパク質合成の低下および分解の増加を起因とする骨格筋萎縮を生じさせると予想される。

mammalian target of rapamycin complex 1 (以下 mTORC1) シグナル伝達経路は、筋タンパク質合成を亢進させ、骨格筋を肥大させる。このシグナル伝達経路は、まずは insulin-like growth factor1 (以下 IGF1) がその受容体に結合すると、phosphatidylinositol3-kinase (以下 PI3K) を活性化させる。さらに、活性化した PI3K は Akt1/protein kinase B (以下 PKB) の活性化を引き起こす。Akt1/PKB 経路によって mTORC1 の活性化が誘導されることで、筋タンパク質合成が亢進する。regulated in development and DNA damage responses 1 (以下 REDD1) は、mTORC1 シグナル伝達経路を抑制することが知られており[52]、すなわち REDD1 の増加は筋タンパク質合成を抑制因子とされる。本研究では、IGF1、Akt1、REDD1 mRNA を検索した結果、課題 6 週において Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった (Supplemental data)。この結果からは、リーチ把握動作の繰り返しによって、筋タンパク質合成が変化した様子を窺い知ることはできなかった。しかしながら、本研究で検索した mRNA のみでは、mTORC1 シグナル伝達経路および筋タンパク質合成の変化を捉えることはできず、今後の研究の課題となった。

一方で、2 つの主要な筋タンパク質分解経路であるユビキチン・プロテアソームおよびオートファジー・リソソーム系が活性化されることで、筋量の減少すなわち萎縮に寄与することが知られている。ユビキチン・プロテアソーム系では、E3 ユビキチンリガーゼの MuRF1 は骨格筋量を負の関係に調節する。マウスにトレッドミル走行を 8 週間継続させると、足底筋において MuRF1 タンパク質の発現増加および 26S プロテアソーム活性を亢進させた[32]。いくつかの先行研究では、過剰なオートファジーの活性化は筋萎縮を惹起させることが報告されている[53–56]。マウスに自発的なホイール走行を 4 週間実施させると、足底筋における Beclin1 および LC3II タンパク質の発現が増加したことが示されている[33]。我々の結果では、リーチ把握動作の繰り返しを 6 週間継続することで、MuRF1、Beclin1 および Atg5–Atg12 複合体タンパク質の発現が増加した。この結果は、浅指屈筋におけるユビキチン・プロテアソームおよびオートファジー・リソソーム系の活性化を推察させた。さらに、課題 6 週での Task 群における mRNA およびタンパク質レベルでの MuRF1、Beclin1、Atg5 の発現増加は、浅指屈筋の萎縮が観察された時期と一致した。以上より、ユビキチン・プロテアソームおよびオートファジー・リソソーム系の活性化が、Task 群の浅指屈筋の萎縮に寄与したと考えられる。

5. 前腕屈筋群の痛覚過敏と浅指屈筋における NGF、GDNF、TNF- α との関係

NGF、GDNF または TNF- α の骨格筋への注入は、機械的痛覚過敏を生じさせる[16, 19, 41, 42]。さらに、伸張性収縮を繰り返すことで作成される DOMS モデルラットは、長趾伸筋における NGF、GDNF の増加が、機械的痛覚過敏を引き起こすことを示した[15, 16]。強制水泳運動によって作成される DOMS モデルラットは、ヒラメ筋における TNF- α の増加を示し、機械的痛覚過敏を惹起させた[11]。以上の先行研究を参考に、本研究では、浅

指屈筋の NGF、GDNF、TNF- α 含量を測定し、機械的痛覚過敏のメカニズムを調査した。Barbe らは、リーチ把握動作を繰り返す課題によって、課題 8 週に前腕屈筋において TNF- α が増加したことを示したが、6 週では TNF- α は増加しなかったと報告している[5, 43]。我々の結果では、Task 群の NGF、GDNF、TNF- α mRNA およびタンパク質は、機械的痛覚過敏が生じた課題 3 週または 6 週で増加はみられなかった。課題 8 週より前に、浅指屈筋の TNF- α タンパク質が変化しなかったという結果は、Barbe ら[5, 43]の先行研究と一致するものであった。したがって、課題 3 週から 6 週まで機械的痛覚過敏は、NGF、GDNF および TNF- α に起因しないと考えられる。この見解は、本研究よりも高強度の運動を繰り返す課題を用いた WMSD モデルラットにおいて、炎症の発生と疼痛の発生時期が異なることを報告した Xin ら[11]の見解と一致した。一方で、Elliott ら[10]はリーチ把握動作を繰り返す課題が、課題 6 週で Substance P とその受容体である neurokinin-1 が脊髄後角において増加させることを示した。侵害刺激は、後根神経節の末端からの Substance P 放出を誘発し、次に Substance P は neurokinin-1 に結合し、脊髄後角神経細胞の感作を引き起こす。したがって、リーチ把握動作を繰り返す課題が中枢性感作を誘発し、筋痛に寄与した可能性が考えられる。以上より、本研究で用いた WMSD モデルラットに生じる筋痛のメカニズムを解明するためには、骨格筋のみではなく、中枢神経系の変化についても、検索する必要がある。

6. 今後の展望

本研究では、ラットがリーチ把握動作を繰り返す課題（15 秒に 1 回、2 時間/日、3 日/週）を継続することで、握力低下、筋痛といった WMSD に類似する機能障害を引き起こすことを示した。握力低下のメカニズムについて、筋痛や骨格筋萎縮がその要因として挙げられる可能性を示したが、握力低下と筋痛の直接的な因果関係を示すには至らなかった。さらに、本研究に用いたリーチ把握動作の頻度を変更することでの機能障害の変化や、機能障害発生後に課題を休止することでの機能障害の変化について調査することが、WMSD の予防方法や治療方法のエビデンス確立に寄与すると考える。

【結論】

本研究は、過剰な反復運動への長期間の曝露が、握力低下、筋痛および骨格筋萎縮を引き起こすことを示した。これらの結果は、先行研究と比較して短い期間で握力低下を惹起し、握力低下に筋痛および骨格筋萎縮が関与する可能性を示した。さらに、リーチ把握動作の繰り返しへの曝露は、ユビキチン・プロテアソームおよびオートファジー・リソソーム系による筋タンパク質分解を亢進し、これによって骨格筋量を減少させる可能性を示した。

【謝辞】

本論文の作成にあたり、ご指導ならびにご助言を賜りました名古屋大学大学院医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻 教授 鈴木重行先生、同専攻 教授 杉浦英志先生、同専攻 教授 亀高諭先生に深く感謝申し上げます。本研究を実施する上で、ご協力いただきました日本福祉大学健康科学部 准教授 岩田全広先生、名古屋大学医学部附属病院リハビリテーション部 井上貴行氏、愛知医科大学附属病院 リハビリテーション部 林和寛氏、名古屋第一赤十字病院 リハビリテーション科 藍澤洋介氏、名古屋市立大学附属病院 リハビリテーション部 吉戸菜摘氏に深く感謝申し上げます。

Table. 1 課題の実施状況

	課題1週	2週	3週	4週	5週	6週
リーチの 累計回数(回)	4019.0 ± 533.5	6682.2 ± 775.5	8909.0 ± 974.9	10904.2 ± 1161.1	12853.5 ± 1313.7	14758.3 ± 1459.7
ペレットの 累計獲得数(個)	1047.7 ± 60.3	2117.8 ± 88.1	3267.0 ± 116.8	4355.0 ± 176.1	5457.5 ± 235.4	6579.2 ± 292.8
課題の参加時間 (時間)	5.6 ± 0.3	11.2 ± 0.5	17.0 ± 0.7	22.6 ± 1.0	28.2 ± 1.2	33.9 ± 1.3

平均値±標準誤差

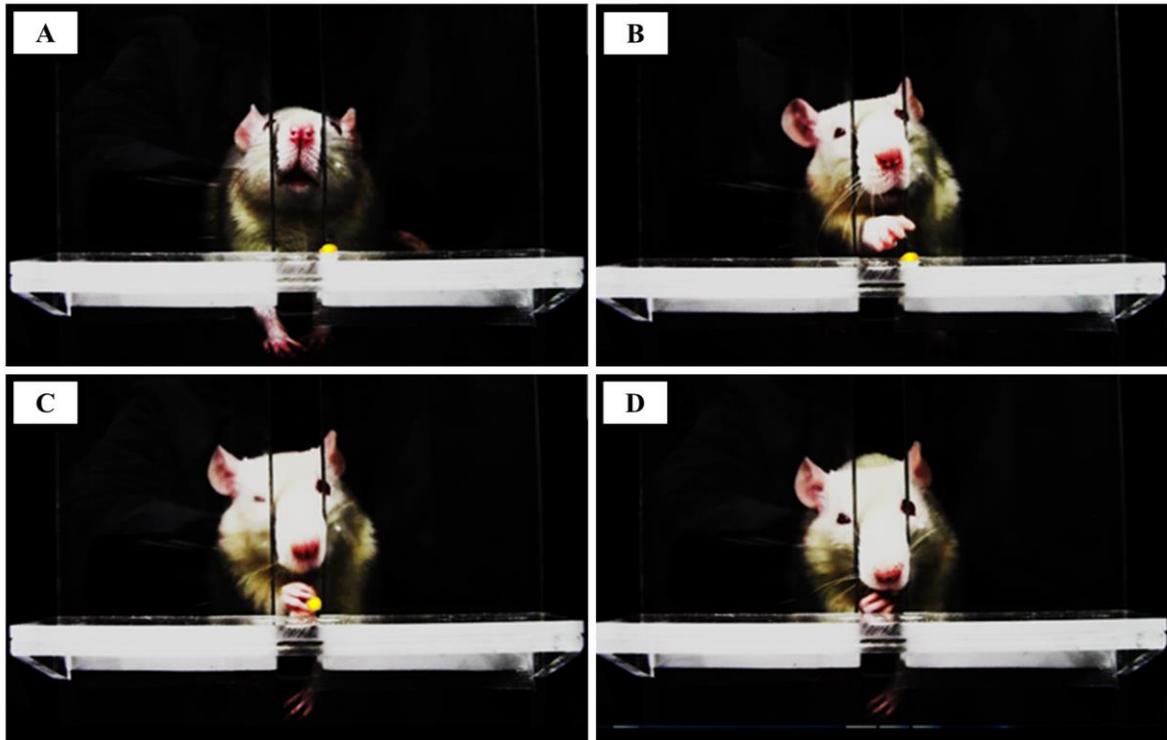


Fig. 1 自発的なリーチ把握動作

課題中は、ラットは写真に示された動作を 15 秒に 1 回の頻度で繰り返す (A-D)。(A) ラットの入った試験箱に設置された棚にペレットを配給する。(B、C) ラットは棚に配給されたペレットに手を伸ばし、掴み取る。(D) ラットは掴んだペレットを摂食する。



Fig. 2 前腕屈筋群の逃避反応閾値（機械的痛覚閾値）の測定

2つの図は、前腕屈筋群の逃避反応閾値（機械的痛覚閾値）の測定の手順を示す。（左図）検者は、ラットの頭部および胸部を布で覆い、自作したハンモックに吊り下げる。このラットの姿勢は、前腕が自由に動く状態とした。（右図）検者は、矢印の方向にラットの前腕屈筋群へプローブを押し付ける。

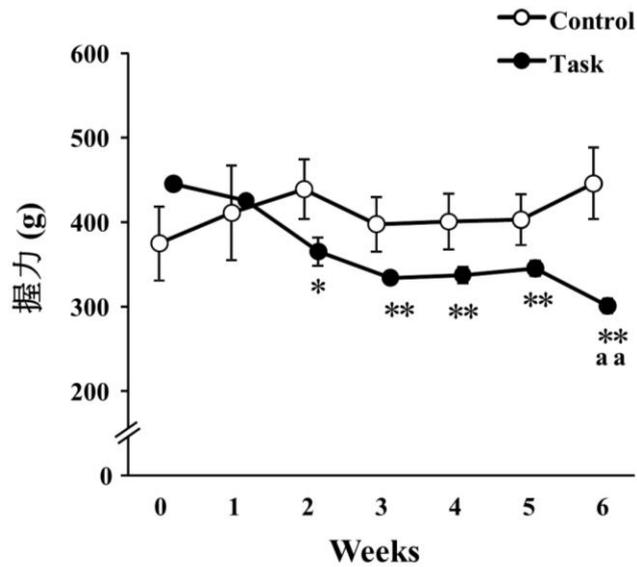


Fig. 3 握力の推移

縦軸は握力 (g) を示し、横軸は時間経過 (Weeks) を示す。

Control 群の握力は、課題 0 週から 6 週まで変化を認めなかった。Task 群の握力は、課題 0 週と比較して課題 2 週から 6 週に有意に低下し、また Control 群と比較して課題 6 週に有意に低値となった。(各群 n = 6)

平均値±標準誤差

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 課題 0 週

aa $P < 0.01$ vs. 同週齢の Control 群

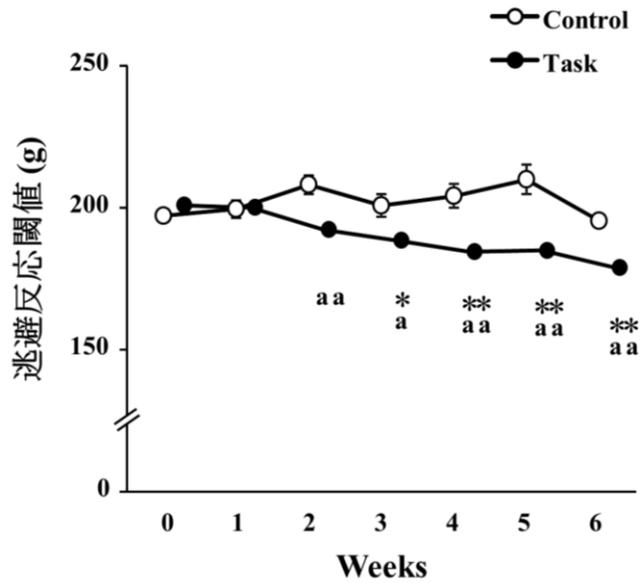


Fig. 4 前腕屈筋群の逃避反応閾値の推移

縦軸は逃避反応閾値 (g) を示し、横軸は時間経過 (Weeks) を示す。

Control 群の逃避反応閾値は、課題 0 週から 6 週まで変化を認めなかった。Task 群の逃避反応閾値は、課題 0 週と比較して課題 3 週から 6 週に有意に低下し、また Control 群と比較して課題 2 週から 6 週に有意に低値となった。(Control 群 n = 7、Task 群 n = 10)

平均値±標準誤差

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 課題 0 週

^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$ vs. 同週齢の Control 群

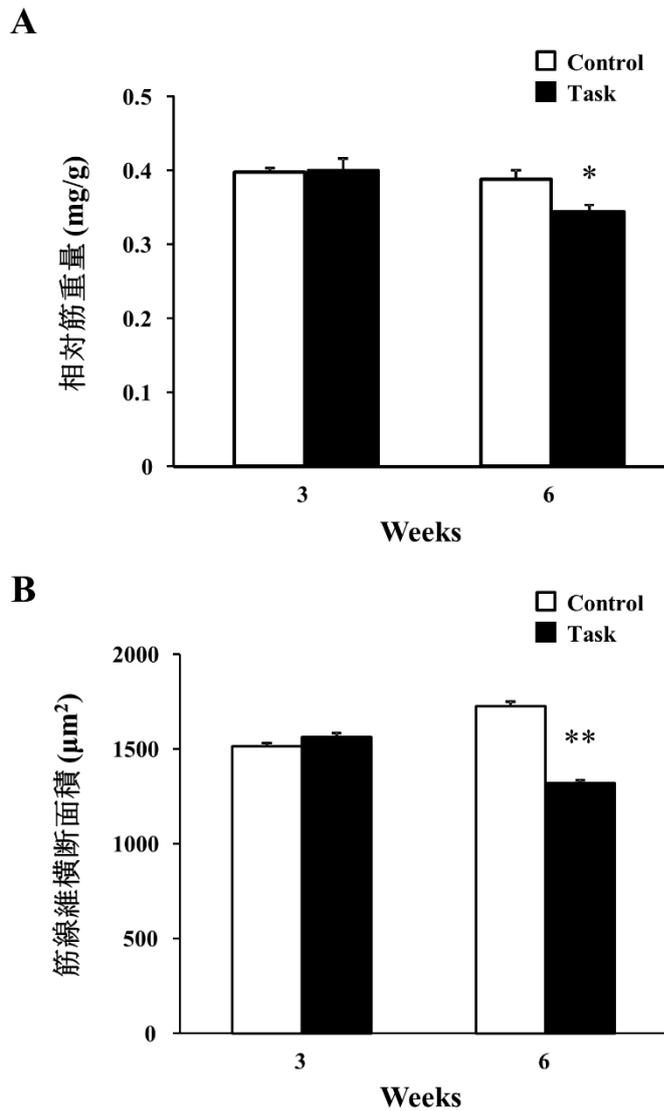


Fig. 5 課題 3 週および 6 週の浅指屈筋の形態

(A) 縦軸は相対筋重量 (g) を示す。課題 3 週の相対筋重量は、Control 群と Task 群の間で差を認めなかった。一方、課題 6 週では、Task 群の相対筋重量は Control 群と比較して、有意に低値であった。(B) 縦軸は筋線維横断面積 (μm²) を示す。課題 3 週の筋線維横断面積は、Control 群と Task 群の間で差を認めなかった。一方、課題 6 週では、Task 群の筋線維横断面積は Control 群と比較して、有意に低値であった。(各群 n = 6)

平均値±標準誤差

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 同週齢の Control 群

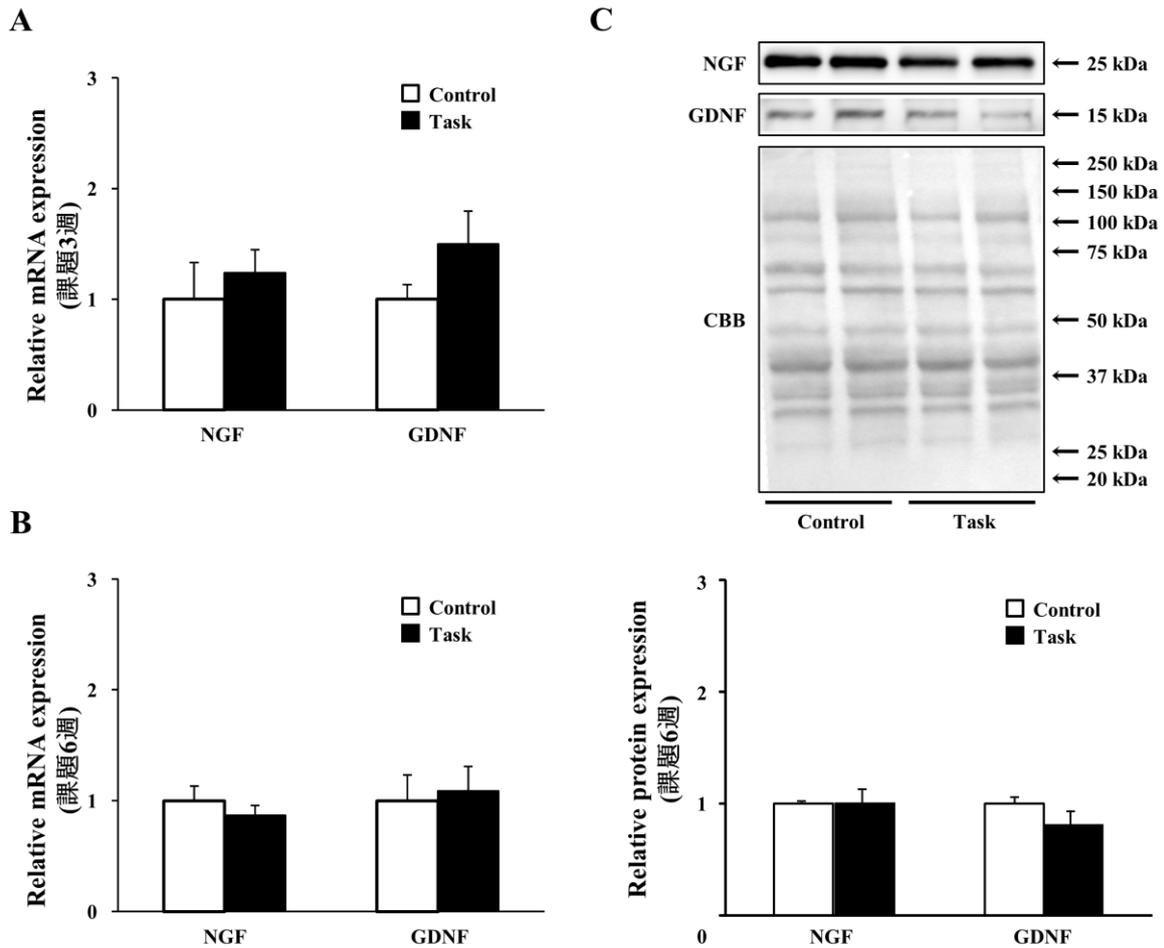


Fig. 6 浅指屈筋における神経栄養因子の発現

(A) 課題 3 週での nerve growth factor (以下 NGF) と glial cell line-derived neurotrophic factor (以下 GDNF) mRNA の発現を示す。課題 3 週の NGF、GDNF mRNA は、Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった (各群 n = 6)。(B) 課題 6 週での NGF と GDNF mRNA の発現を示す。課題 6 週の NGF、GDNF mRNA は、Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった (各群 n = 5)。(C) 課題 6 週での NGF と GDNF タンパク質の発現を示す。上図は、NGF、GDNF タンパク質、Coomassie brilliant blue (以下 CBB) のプロットを示し、下図はプロットを定量的に解析したデータを示す。課題 6 週の NGF、GDNF タンパク質は、Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった (各群 n = 5)。データは、Control 群を 1 に設定した相対値とした。

平均値±標準誤差

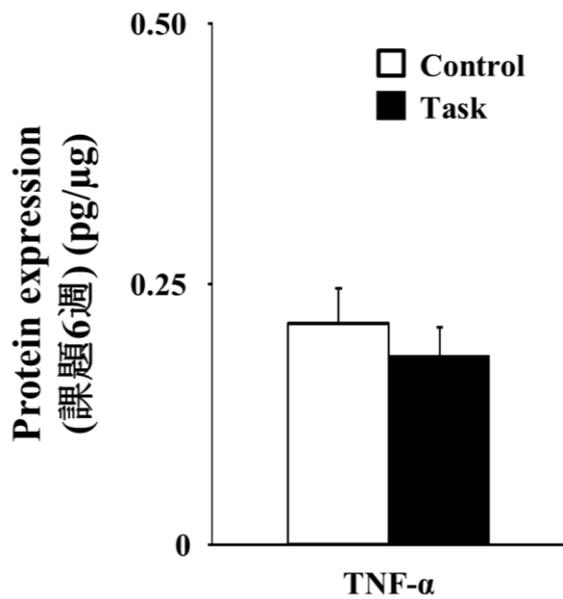


Fig. 7 課題 6 週における浅指屈筋の tumor necrosis factor (TNF) - α タンパク質の発現

課題 6 週での tumor necrosis factor (以下 TNF) - α タンパク質含量 (pg / μ g) を示す。課題 6 週の TNF- α タンパク質は、Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった(各群 n = 5)。

平均値 \pm 標準誤差

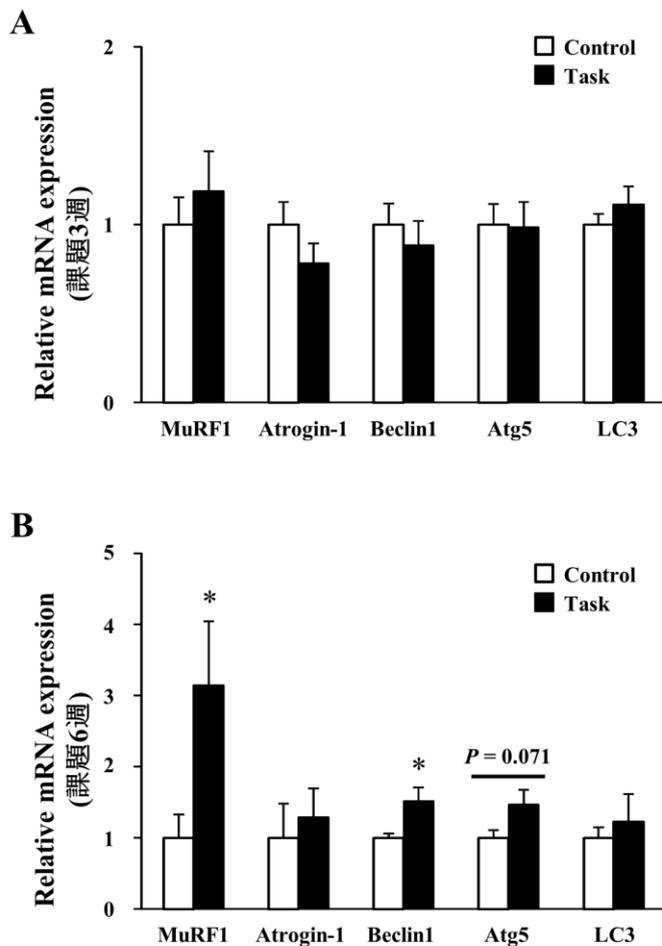


Fig. 8 浅指屈筋の E3 ユビキチンリガーゼと autophagy-related (Atg) 遺伝子の発現

(A) 課題 3 週の mRNA の発現を示す。課題 3 週での E3 ユビキチンリガーゼと autophagy-related (以下 Atg) 遺伝子は、Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった (各群 n = 6)。(B) 課題 6 週の mRNA の発現を示す。課題 6 週において Task 群の muscle RING finger 1 (以下 MuRF1)、Beclin1 mRNA は、Control 群と比較して、有意に高値であった。また、Task 群の Atg5 mRNA は、Control 群と比較して、増加傾向を認めた。課題 6 週においても、muscle atrophy F-box/Atrogin-1 (以下 Atrogin-1)、microtubule-associated protein 1 light chain 3 (以下 LC3) mRNA は、Control 群と Task 群の間に有意な差は認めなかった (各群 n = 6)。

データは、同週齢の Control 群を 1 に設定した相対値とした。

平均値±標準誤差

* $P < 0.05$ vs. 同週齢の Control 群

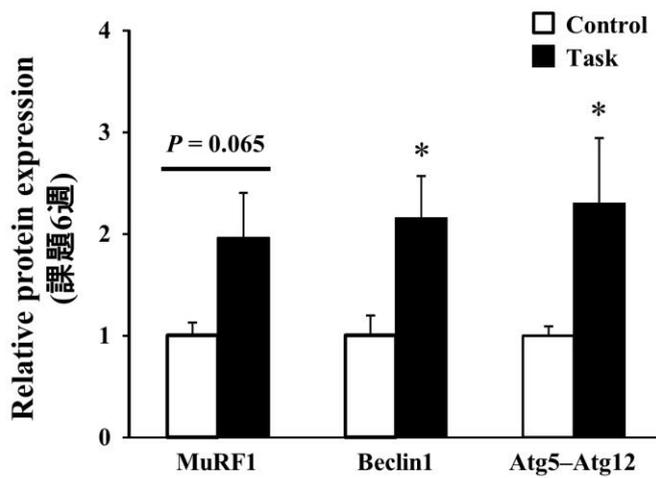
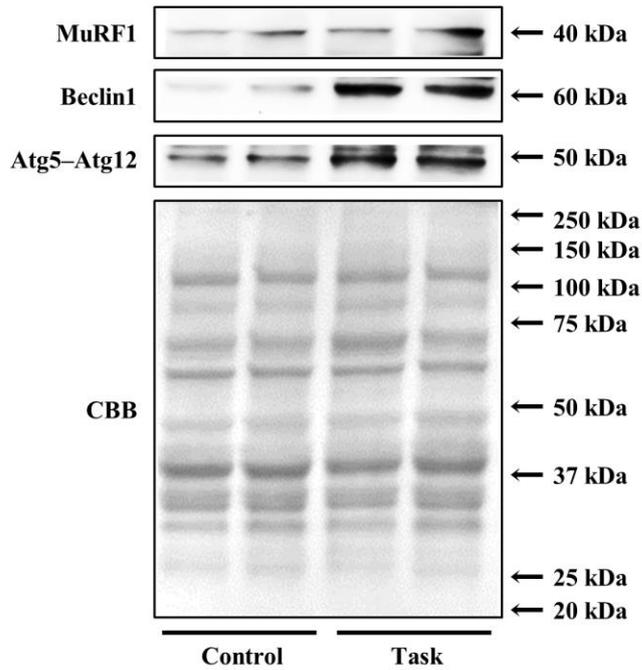


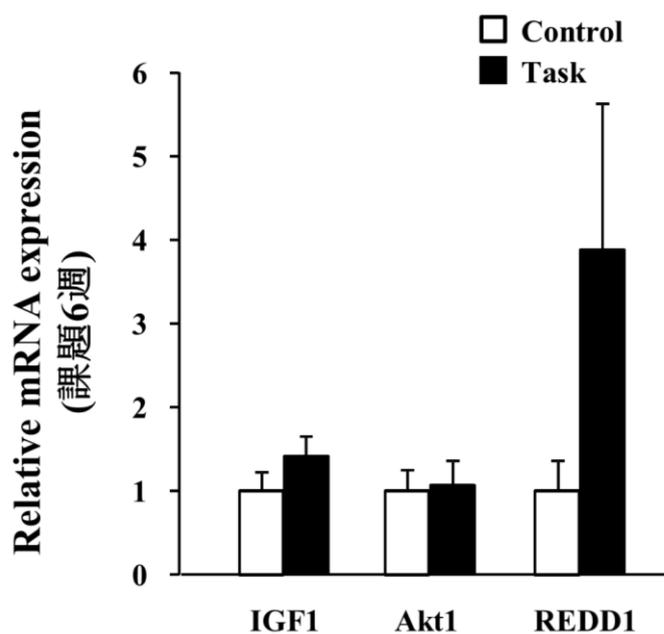
Fig. 9 課題 6 週における浅指屈筋の muscle RING finger 1 (MuRF1)、Beclin1、autophagy-related (Atg) 5-Atg12 複合体タンパク質の発現

課題 6 週での muscle RING finger 1 (以下 MuRF1)、Beclin1、autophagy-related (以下 Atg) 5-Atg12 複合体タンパク質の発現を示す。上図は、MuRF1、Beclin1、Atg5-Atg12 複合体タンパク質、Coomassie brilliant blue (以下 CBB) のプロットを示し、下図はプロットを定量的に解析したデータを示す。課題 6 週での Task 群の MuRF1 タンパク質は、Control 群と比較して、増加傾向を認めた。さらに、Task 群の Beclin1、Atg-Atg12 複合体タンパク質は、Control 群と比較して有意に高値となった (各群 n = 6)。

データは、Control 群を 1 に設定した相対値とした。

平均値±標準誤差

* $P < 0.05$ vs. 同週齢の Control 群



Supplemental data 課題 6 週における浅指屈筋の insulin-like growth factor1 (IGF1)、Akt1、regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) mRNA の発現

課題 6 週の mRNA の発現を示す。課題 6 週において insulin-like growth factor1 (以下 IGF1)、Akt1、regulated in development and DNA damage responses 1 (以下 REDD1) mRNA は、Control 群と Task 群の間に差は認めなかった。(各群 n = 6)。

データは、同週齢の Control 群を 1 に設定した相対値とした。

平均値±標準誤差

【参考文献】

- 1 Ranney D, Wells R and Moore A (1995) Upper limb musculoskeletal disorders in highly repetitive industries: precise anatomical physical findings. *Ergonomics* 38, 1408–23.
- 2 Alperovitch-Najenson D, Carmeli E, Coleman R and Ring H. (2004) Handgrip strength as a diagnostic tool in work-related upper extremity musculoskeletal disorders in women. *Sci World J* 4, 111–7.
- 3 Barbe MF, Barr AE, Gorzelany I, Amin M, Gaughan JP and Safadi FF (2003) Chronic repetitive reaching and grasping results in decreased motor performance and widespread tissue responses in a rat model of MSD, *J Orthop Res* 21, 167–76.
- 4 Clark BD, BarrAE, Safadi FF, Beitman L, Al-Shatti T, Amin M, Gaughan JP and Barbe MF (2003) Median nerve trauma in a rat model of work-related musculoskeletal disorder. *J Neurotrauma* 20, 681–95.
- 5 Barbe MF, Elliott MB, Abdelmagid SM, Amin M, Popoff SN, Safadi FF and Barr AE (2008) Serum and tissue cytokines and chemokines increase with repetitive upper extremity tasks, *J Orthop Res* 26, 1320-6.
- 6 Clark BD, Al-Shatti TA, Barr AE, Amin M and Barbe MF (2004) Performance of a high-repetition, high-force task induces carpal tunnel syndrome in rats, *J Orthop Sports Phys Ther* 34, 244–53.
- 7 Abdelmagid SM, Barr AE, Rico M, Amin M, Litvin J, Popoff SN, Safadi FF and Barbe MF (2012) Performance of repetitive tasks induces decreased grip strength and increased fibrogenic proteins in skeletal muscle: role of force and inflammation. *PLoS One* 7:e38359. doi:10.1371/journal.pone.0038359. Epub 2012 May 31.
- 8 Gao HGL, Fisher PW, Lambi AG, Wade CK, Barr-Gillespie AE, Popoff SN and Barbe MF (2013) Increased serum and musculotendinous fibrogenic proteins following persistent low-grade inflammation in a rat model of long-term upper extremity overuse. *PLoS One* 8:e71875. Published online 2013 Aug 28. doi:10.1371/journal.pone.0071875.
- 9 Fedorczyk JM, Barr AE, Rani S, Gao H, Amin M, Amin S, Litvin J, and Barbe MF (2010) Exposure dependent increases in IL-1 beta, substance P, CTGF and tendinosis in flexor digitorum tendons with upper extremity repetitive strain injury. *J Orthoped Res* 28, 298–301.
- 10 Elliott MB, Barr, A. E. and Barbe, M. F. (2009) Spinal substance P and neurokinin-1 increase with high repetition reaching. *Neurosci Letters* 454, 33–7.
- 11 Xin DL, Hadrévi J, Elliott ME, Amin M, Harris MY, Barr-Gillespie AE and Barbe MF. (2017) Effectiveness of conservative interventions for sickness and pain behaviors induced by a high repetition high force upper extremity task. *BMC Neurosci.* 18, 36. doi:10.1186/s12868-017-0354-3.
- 12 Nasu T, Taguchi T and Mizumura K (2010) Persistent deep mechanical

- hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain* 14, 236–44. doi:10.1016/j.ejpain.2009.05.009. Epub 2009 Jun 26.
- 13 Borghi SM, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Cardoso RDR, Martins-Pinge MC, Tatakihara RI, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Casagrande R and Verri WA (2014) Role of TNF-alpha/TNFR1 in intense acute swimming-induced delayed onset muscle soreness in mice. *Physiol Behav* 128, 277–287.
 - 14 Taguchi T, Matsuda T, Tamura R, Sato J and Mizumura K (2005) Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioural pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats. *J Physiol* 564, 259–68.
 - 15 Murase S, Terazawa E, Hirate K, Yamanaka H, Kanda H, Noguchi K, Ota H, Queme F, Taguchi T and Mizumura K (2013) Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats. *J Physiol* 591, 3035–48.
 - 16 Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, Kozaki Y, Katanosaka K, Taguchi T, Urai H and Mizumura K (2010) Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). *J Neurosci* 30, 3752–61.
 - 17 Turrini P, Gaetano C, Antonelli A, Capogrossi MC and Aloe L (2002) Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia. *Neurosci Letters* 323, 109–12.
 - 18 Amano T, Yamakuni T, Okabe N, Sakimura K and Takahashi Y (1991) Production of nerve growth factor in rat skeletal muscle. *Neurosci Letters* 132, 5–7.
 - 19 Murase S, Kato K, Taguchi T and Mizumura K (2014) Glial cell line-derived neurotrophic factor sensitized the mechanical response of muscular thin-fibre afferents in rats. *Eur J Pain* 18, 629–38.
 - 20 Henriksen M, Rosager S, Aaboe J, Graven-Nielsen T and Bliddal H (2011) Experimental knee pain reduces muscle strength. *J Pain* 12, 460–7.
 - 21 Park J and Hopkins JT (2013) Induced anterior knee pain immediately reduces involuntary and voluntary quadriceps activation. *Clin J Sports Med* 23, 19–24.
 - 22 Son SJ, Kim H, Seeley MK, Feland JB and Hopkins JT (2016) Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on quadriceps function in individuals with experimental knee pain. *Scand J Med Sci Sports* 26, 1080–90.
 - 23 Bamman MM, Newcomer BR, Larson-Meyer DE, Weinsier RL and Hunter GR (2000) Evaluation of the strength-size relationship in vivo using various muscle size indices. *Med Sci Sports Exerc* 32, 1307–13.
 - 24 Blazeovich AJ, Coleman DR, Horne S and Cannavan D (2009) Anatomical predictors of maximum isometric and concentric knee extensor moment. *Eur J Appl Physiol* 105, 869–78.
 - 25 Fukunaga T, Miyatani M, Tachi M, Kouzaki M, Kawakami Y and Kanehisa H

- (2001) Muscle volume is a major determinant of joint torque in humans. *Acta Physiolog Scand* 172, 249–55.
- 26 Solomon V and Goldberg AL (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271, 26690–7.
- 27 Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD and Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–8.
- 28 Bodine SC and Baehr LM (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Amer J Physiol Endo Metab* 307, E469–84.
- 29 Nakatogawa H, Ichimura Y and Ohsumi Y (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165–78.
- 30 Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T and Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20, 5971–81.
- 31 Tassa A, Roux MP, Attaix D and Bechet DM (2003) Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes, *Biochem J* 376, 577–86.
- 32 Cunha TF, Moreira JB, Paixao NA, Campos JC, Monteiro AW, Bacurau AV, Bueno CR Jr, Ferreira JC and Brum PC (2012) Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *J Appl Physiol* 112, 1839–46.
- 33 Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL and Yan Z (2013) Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 27, 4184–93.
- 34 Kimura S, Inaoka PT and Yamazaki T (2012) Influence of passive stretching on inhibition of disuse atrophy and hemodynamics of rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc* 15, 9–14.
- 35 Agata N, Sasai N, Inoue-Miyazu M, Kawakami K, Hayakawa K, Kobayashi K and Sokabe M (2009) Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats. *Musc Nerve* 39, 456–62.
- 36 Metz GA and Whishaw IQ (2000) Skilled reaching an action pattern: stability in rat (*Rattus norvegicus*) grasping movements as a function of changing food pellet size. *Behav Brain Res* 116, 111–22.
- 37 Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, Sakamoto J, Yoshimura T, Origuchi T and Okita M (2012) Changes in hind paw epidermal thickness, peripheral nerve distribution and mechanical sensitivity after immobilization in rats. *Physiol Res* 61, 643–7.
- 38 Miyazaki M, Noguchi M and Takemasa T (2008) Intermittent reloading

- attenuates muscle atrophy through modulating Akt/mTOR pathway. *Med Sci Sports Exerc* 40, 848–55.
- 39 Ishihara A, Kawano F, Ishioka N, Oishi H, Higashibata A, Shimazu T and Ohira Y (2004) Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rats. *Neurosci Res* 48, 119–27.
- 40 Welinder C and Ekblad L (2011) Coomassie staining as loading control in western blot analysis. *J Proteome Res* 10, 1416–9.
- 41 Hoheisel U, Unger T and Mense S (2005) Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. *Pain* 114, 168–76.
- 42 Svensson P, Cairns BE, Wang K and Arendt-Nielsen L (2003) Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 104, 241–7.
- 43 Coq JO, Barr AE, Strata F, Russier M, Kietrys DM, Merzenich MM, Byl NN and Barbe MF (2009) Peripheral and central changes combine to induce motor behavioral deficits in a moderate repetition task. *Exp Neurol* 220, 234–45.
- 44 Elliott MB, Barr AE, Clark BD, Amin M, Amin S and Barbe MF (2009) High force reaching task induces widespread inflammation, increased spinal cord neurochemicals and neuropathic pain. *Neurosci* 158, 922–31.
- 45 Fisher PW, Zhao Y, Rico MC, Massicotte VS, Wade CK, Litvin J, Bove GM, Popoff SN and Barbe MF (2015) Increased CCN2, substance P and tissue fibrosis are associated with sensorimotor declines in a rat model of repetitive overuse injury. *J Cell Commun Signaling* 9, 37–54.
- 46 Beyreuther BK, Geis C, Stohr T and Sommer C (2007) Antihyperalgesic efficacy of lacosamide in a rat model for muscle pain induced by TNF. *Neuropharm* 52, 1312–7.
- 47 Frara N, Abdelmagid SM, Tytell M, Amin M, Popoff SN, Safadi FF and Barbe MF. (2016) Growth and repair factors, osteoactivin, matrix metalloproteinase and heat shock protein 72, increase with resolution of inflammation in musculotendinous tissues in a rat model of repetitive grasping. *BMC Musculoskelet Disord* 17, 34. doi:10.1186/s12891-016-0892-3.
- 48 Cabrera D, Gutiérrez J, Cabello-Verrugio C, Morales MG, Mezzano S, Fadic R, Casar JC, Hancke JL, Brandan E (2014) Andrographolide attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice and increases efficiency of cell therapy by reducing fibrosis. *Skelet Muscle* 4, 6. doi:10.1186/2044-5040-4-6. eCollection 2014. PMID: 24655808
- 49 Delp MD and Pette D (1994) Morphological changes during fiber type transitions in low-frequency-stimulated rat fast-twitch muscle. *Cell Tiss Res* 277, 363–71.
- 50 Katzeff HL, Ojamaa KM and Klein I (1995) The effects of long-term aerobic

- exercise and energy restriction on protein synthesis. *Metab: Clin Exp* 44, 188–92.
- 51 Delp MD and Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 80, 261–70.
- 52 Dennis PR, Coleman CS, Berg A, Jefferson LS and Kimball SR (2014) REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling. *Sci Signal* 7, doi:10.1126/scisignal.2005103. PMID: 25056877
- 53 Jannig PR, Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Bacurau AV, Monteiro AW, Dourado PM, Wisloff U and Brum PC (2014) Autophagy signaling in skeletal muscle of infarcted rats. *PloS One* 9, e85820.
- 54 Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S and Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6, 458–71.
- 55 Penna F, Costamagna D, Pin F, Camperi A, Fanzani A, Chiarpotto EM, Cavallini G, Bonelli G, Baccino FM and Costelli P (2013) Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *Am J Pathol* 182, 1367–78.
- 56 Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH and Goldberg AL (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 6, 472–83.