

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16565

研究課題名(和文) 温熱負荷による骨格筋適応メカニズムの解明とサルコペニア予防への応用

研究課題名(英文) Mechanisms underlying heat stress-induced skeletal muscle adaptation in prevention of sarcopenia

研究代表者

柿木 亮 (Kakigi, Ryo)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・非常勤助教

研究者番号：70614931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、温熱負荷による筋適応現象のメカニズムを明らかにすること、温熱負荷がサルコペニアの予防策として有効であるか否かを明らかにすることであった。本研究の結果から、温熱負荷による筋タンパク質合成を促進する経路は、筋の温度上昇だけでなくアミノ酸の取り込みによるmTOR活性化経路が重要である可能性が明らかとなった。また、温熱負荷は単独ではなく栄養(ロイシン)と組み合わせることによってサルコペニアを予防できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、温熱負荷による筋肥大において筋タンパク質合成を調節するmTORシグナル伝達経路の重要性をより強調し、温熱負荷による筋適応現象メカニズムの理解に貢献するものである。また、温熱負荷は栄養と組み合わせることによってサルコペニアを予防できる可能性を示すことができたことから、今後栄養やトレーニングとの組み合わせによってさらなる応用方法の検証が行われ、より効果的なサルコペニア予防方法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the mechanisms underlying heat stress induced-skeletal muscle adaptation, and to determine whether heat stress prevents sarcopenia. It is well known that Akt/mTOR signaling pathway involved in protein synthesis. In this study, heat stress activates mTOR signaling without Akt activation, suggesting that another factor (i.e. intracellular amino acids) is needed to activate mTOR signaling by heat stress in skeletal muscle. In addition, our data demonstrate that the combination of heat stress and leucine supplementation protected against sarcopenia.

研究分野：運動生理学

キーワード：温熱負荷 骨格筋 筋タンパク質合成 細胞内シグナル伝達 サルコペニア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う骨格筋の質的量的低下(サルコペニア)は、身体活動量および生活の質(QOL)の減退を導くことから、いかにその程度を減弱させるかは現在の体力医学研究における課題の一つとなっている。それ故、特に超高齢化社会の先進国である本邦では、高齢者に対して安全で、効率的な運動・トレーニングプログラムの開発が急務であると言える。

これまで申請者は、痛みを伴わない温熱負荷について着目し、新たなトレーニングプログラムの開発に繋げるための基盤的研究を行ってきた。温熱負荷とは、筋温を2~3℃上昇させることにより熱ストレスを筋に与えることであり、動物実験において筋の肥大促進効果が確認されている。この肥大効果のメカニズムはよく分かっていなかったが、申請者らは筋タンパク質合成を調節する細胞内シグナル伝達経路のAkt/mTOR系の活性化が筋肥大に重要であること(Bodine et al., Nat Cell Biol, 2001)に注目し、温熱負荷がラットやヒト骨格筋のAkt/mTOR系を活性化させることを初めて明らかにした(Kakigi et al., J Physiol Sci, 2011; Yoshihara et al., Acta Physiol, 2014)。しかしながら、温熱負荷が如何にしてAkt/mTOR系を活性化し、筋タンパク質合成を増加させるのかについて詳細なメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、温熱負荷がAkt/mTOR系の活性化をもたらすメカニズムを、インスリン感受性やアミノ酸取り込みに着目して明らかにするとともに、サルコペニア対策として温熱負荷の筋肥大効果をプロテインの摂取によって増強することが可能であることを明らかにすることを目的とする。そこで、本研究では、(1)温熱負荷による筋肥大のメカニズムの解明に関する研究、(2)サルコペニア対策としての温熱負荷とプロテイン摂取の有効性に関する研究、を実施することとした。

3. 研究の方法

(1) 温熱負荷による筋肥大のメカニズムの解明に関する研究

マウスを用いた検討

本研究で用いた温熱負荷は、41℃に設定したチャンバーの中にマウスを60分間滞在させることで負荷する方法であった。まず、温熱負荷がマウス骨格筋Akt/mTORの活性化の経時変化を明らかにするために、C57BL/6雄性(8週齢)マウスを用いて、温熱負荷後(0、0.5、1、3、6および24時間)にヒラメ筋および足底筋を摘出し、ウェスタンブロット法を用いて分析した。次に、温熱負荷中の栄養状態がマウス骨格筋Akt/mTORの活性化に与える影響を明らかにするために、一晚絶食したマウスと絶食しなかったマウスに対して温熱負荷を与え、温熱負荷後(1、3および6時間)にヒラメ筋を摘出し、ウェスタンブロット法を用いて分析した。最後に、温熱負荷によるAkt/mTOR経路を活性化させる経路を明らかにするために、mTORの阻害剤であるラパマイシンをマウスの腹腔内に投与し、温熱負荷後(1、6および24時間)にヒラメ筋を摘出し、ウェスタンブロット法にて細胞内シグナル伝達の活性化を分析した。

マウス培養細胞を用いた検討

温熱負荷によるAkt/mTORシグナルの活性化経路を明らかにするために、マウス筋芽細胞株のC2C12細胞を用いて、熱ストレスがC2C12細胞の筋管細胞への分化・融合および筋タンパク質合成に関連する細胞内シグナル伝達の活性化に及ぼす影響を検討した。C2C12細胞を増殖培地で2日間培養した後、分化培地に交換し、37℃あるいは39℃の条件でさらに培養した。分化開始1、2、3および5日後に、細胞に対してミオシン重鎖の免疫染色を行い、筋管細胞への分化・融合を評価した。また、分化5日後の筋管細胞に対して39℃で60分間インキュベートした後、異なるタイムポイントで細胞を回収し、ウェスタンブロット法を用いて細胞内シグナル伝達の活性化分析した。

(2) サルコペニア対策としての温熱負荷とプロテイン摂取の有効性に関する研究

プロテインに含まれるアミノ酸の中で、最もタンパク質合成を促進するものとしてロイシンがある。そのため、本研究では、温熱負荷とロイシン摂取の組み合わせが高齢マウスの骨格筋量および筋機能に及ぼす影響を検討した。C57BL/6雄性マウス(21ヶ月齢)をコントロール群(OC, n=9)、温熱負荷群(OH, n=7)、ロイシン摂取群(OL, n=7)、温熱負荷+ロイシン摂取群(OLH, n=9)に分類して、3ヶ月間飼育した。また、14週齢の若齢マウスのコントロール群(YC, n=6)も3ヶ月通常食で飼育した。温熱負荷は、41℃に設定したチャンバーの中に温熱負荷群のマウスを40分間滞在させることで負荷し、週2回の頻度で期間中に合計24回実施した。ロイシンは、水に溶解(114mM)し、ロイシン摂取群のマウスに自由に摂取させた。介入3ヶ月後に、マウスの下肢から骨格筋(ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、長趾伸筋、腓腹筋、大腿四頭筋)を摘出し、重量を測定した。長趾伸筋は、摘出後すぐに酸素化したKrebs溶液中で張力を測定した。大腿四頭筋は、さらなる生化学的分析に用いた。

4. 研究成果

(1) 温熱負荷による筋肥大のメカニズムの解明に関する研究

マウスを用いた検討

41 で 60 分間の温熱負荷は、温熱負荷後 1 時間でマウス骨格筋の mTOR の活性化を有意に増加させたが、Akt に与える影響はなかった。また、mTOR の活性化は足底筋に比べてヒラメ筋において顕著であった。次に、温熱負荷前の絶食の有無（栄養状態）によって mTOR の活性化が温熱負荷 6 時間後まで持続することが明らかとなった。したがって、栄養状態（血中アミノ酸濃度など）を良好にした状態で温熱負荷を行うことが筋タンパク質合成をより促進するために必要であることが明らかとなった。最後に、温熱負荷 1 時間後において、温熱負荷により骨格筋細胞内の mTOR シグナル伝達経路の活性化が阻害剤（ラパマイシン）を用いると抑制されることが明らかとなった。mTOR は、栄養や筋収縮などの刺激が細胞内に伝達された時の収束点として機能し、タンパク質合成を調節している。したがって、本研究を通して、温熱負荷による筋タンパク質合成や筋肥大効果の一端はインスリンによる Akt 活性化経路の関与は低く、アミノ酸の細胞内取り込みによる mTOR シグナル伝達の活性化を介している可能性が高いと考えられる。

マウス培養細胞を用いた検討

分化開始 2 日後において 39 条件で Differentiation index および Fusion index が 37 条件に比べて有意に高値となった。また、筋管細胞の直径を計測したところ、39 条件で筋の成長が促進される傾向が観察された。しかし、ウェスタンブロット法を用いて細胞内シグナル伝達の活性化を検討したところ、熱ストレスは mTOR、p70S6K および 4E-BP1 リン酸化の有意な増加をもたらさなかった。したがって、筋分化や筋形成には別のメカニズムが働いている可能性が考えられる。また別の実験で、分化 5 日後の筋管細胞に対して 39 で 60 分間インキュベートした後、異なるタイムポイントで細胞を回収し、ウェスタンブロット法を用いて分析したところ、熱ストレスにより mTOR、p70S6K、4E-BP1 リン酸化の増加は観察されなかった。一方、mTOR シグナルの上流の Akt リン酸化は 37 条件よりも有意に低値を示した。これまで我々はマウス骨格筋を用いて、温熱負荷が Akt や mTOR シグナルの活性化をもたらすことを明らかにしてきた。本研究では、急性および慢性的な熱ストレスが筋管細胞の筋タンパク質合成関連シグナル伝達の活性化に影響を及ぼさなかったことから、温熱負荷による筋タンパク質合成の促進には筋の温度上昇だけでなく同時にインスリンやアミノ酸などの存在が重要である可能性を示唆している。

(2) サルコペニア対策としての温熱負荷とプロテイン摂取の有効性に関する研究

ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、前脛骨筋および大腿四頭筋の筋重量は、若齢マウスの YC 群に比べて高齢マウスの OC 群で有意な低下が見られ、サルコペニアが進行していることが確認できた（図 1）。また、高齢マウスの OC 群の筋重量に比べて OLH 群の筋重量が有意に高値を示したが、温熱負荷単独では影響がなかった。本研究の結果から、温熱負荷に筋のタンパク同化作用を促進するロイシン摂取を併用することで高齢期のマウスの筋量減少（サルコペニア）に対抗できることが明らかとなった。さらに、大腿四頭筋を対象に、タンパク質合成・分解のマーカーを分子生物学的手法により評価した。その結果、温熱負荷やロイシン摂取によって、筋細胞内のタンパク質合成を調節する mTOR シグナル伝達の活性化に差は見られなかった。しかしながら、必須アミノ酸の一つであるロイシンを細胞内に取り込む輸送体である LAT1 のタンパク質発現量が加齢によって増加していた一方で、温熱負荷とロイシン摂取を組み合わせた場合に高齢マウスの OC 群と比較すると有意に減少していた。筋タンパク質分解のマーカーであるユビキチン化タンパク質は加齢によって増加していたが、温熱負荷とロイシン摂取を組み合わせただけの場合にのみ減少した。これらの結果から、加齢により筋タンパク質分解が亢進するが、その代償としてタンパク質合成が増加し、それに必要な材料を積極的に筋細胞内に取り込ませるために LAT1 の発現量が増加していることが示唆された。また、温熱負荷とロイシンの組み合わせは、筋タンパク質合成よりもむしろ、加齢によって亢進する筋タンパク質分解を抑制することによって、サルコペニアの抑制に働いている可能性が示された。

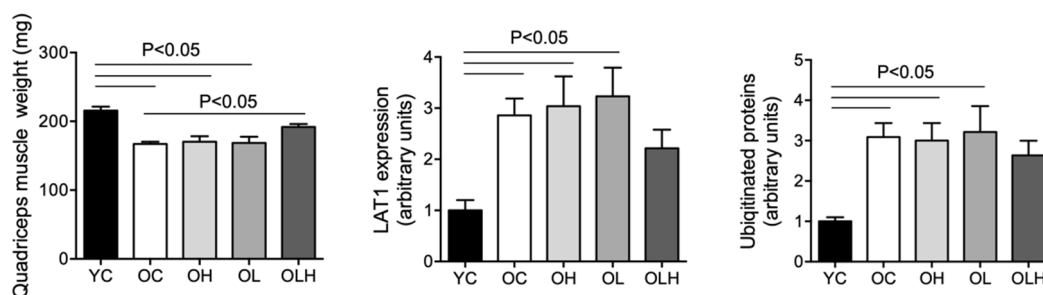


図 1. 大腿四頭筋重量、LAT1 発現量およびユビキチン化タンパク質量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuzuki Takamasa, Yoshihara Toshinori, Ichinoseki-Sekine Noriko, Kakigi Ryo, Takamine Yuri, Kobayashi Hiroyuki, Naito Hisashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Body temperature elevation during exercise is essential for activating the Akt signaling pathway in the skeletal muscle of type 2 diabetic rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0205456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0205456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara Toshinori, Sugiura Takao, Miyaji Nobuyuki, Yamamoto Yuki, Shibaguchi Tsubasa, Kakigi Ryo, Naito Hisashi, Goto Katsumasa, Ohmori Daijiro, Yoshioka Toshitada	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of a combination of astaxanthin supplementation, heat stress, and intermittent reloading on satellite cells during disuse muscle atrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Zhejiang University-SCIENCE B	6. 最初と最後の頁 844 ~ 852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1631/jzus.B1800076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara T, Kobayashi H, Kakigi R, Sugiura T, Naito H.	4. 巻 218(3)
2. 論文標題 Heat stress-induced phosphorylation of FoxO3a signaling in rat skeletal muscle.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Physiol (Oxf).	6. 最初と最後の頁 178-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.12735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kakigi R, Goto A, Yoshihara T, Tsuzuki T, Naito H
2. 発表標題 Effects of heat stress treatment and leucine supplementation on age-related muscle loss in mice
3. 学会等名 Experimental Biology 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kakigi R, Yoshihara T, Goto A, Naito H
2. 発表標題 Acute heat stress under fed state stimulates muscle protein synthesis in mouse soleus muscle
3. 学会等名 2018 ACSM conference on integrative physiology of exercise (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤亜由美, 柿木亮, 吉原利典, 松本綾子, 都築孝允, 古市真也, 月岡恵惟, 内藤久士
2. 発表標題 温熱刺激はサルコペニア肥満の新規治療法となり得るか?
3. 学会等名 第26回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿木亮, 後藤亜由美, 吉原利典, 都築孝允, 内藤久士
2. 発表標題 温熱刺激とロイシン摂取の組み合わせが高齢マウスの筋量および筋機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kakigi R, Nakamura K, Eshima H, Yoshihara T, Naito H
2. 発表標題 Effects of a bout of downhill running on skeletal muscle function and Ca ²⁺ handling in mouse extensor digitorum longus muscle
3. 学会等名 The 3rd congress, International Academy of Sportology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----