

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19700451
 研究課題名 (和文) 温熱刺激による骨格筋肥大の分子機構解明と高齢者筋力トレーニングへの応用
 研究課題名 (英文) Molecular aspects for heat stress-associated muscle hypertrophy

研究代表者
 大野 善隆 (OHNO YOSHITAKA)
 豊橋創造大学・保健医療学部・助教
 研究者番号：80440808

研究成果の概要 (和文)：温熱刺激による骨格筋肥大の促進、筋萎縮の軽減および萎縮からの回復促進が確認されているが、そのメカニズムは明らかでない。本研究では実験動物ならびに培養骨格筋細胞を対象として、温熱負荷による骨格筋の応答を検討した。その結果、温熱刺激によって引き起こされる骨格筋肥大には、転写因子の一つである NF- κ B の活性抑制が寄与していることが示唆された。骨格筋に温熱刺激を負荷することで筋が肥大し、筋力低下の予防や筋力増強効果が期待できると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Molecular mechanism for muscle hypertrophy in response to heat stress is still unclear. In the present study, the molecular responses of skeletal muscles to heat stress were investigated in experimental animals and cultured skeletal muscle cells. Results demonstrated that nuclear factor- κ B signaling would be, in part, involved in heat-stress-associated skeletal muscle hypertrophy *in vivo* and *in vitro*. Therefore, it is strongly suggested that the application of heat stress to skeletal muscle might be a useful tool for an increase in muscle mass and force generation in elderly people.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学

1. 研究開始当初の背景

安全かつ効率的な筋力トレーニング方法として、温熱刺激を活用した温熱負荷トレ

ニングが提案されている。これまで、あらかじめ筋組織（細胞）に対して温熱刺激を与えてからトレーニングすると筋肥大が促進し、

逆に負荷除去に伴う筋萎縮を軽減することが明らかになっている。さらに、廃用性筋萎縮からの回復も温熱刺激により促進されること、また、温熱刺激のみで筋肥大が引き起こされることも明らかになっている。したがって、これらのことから筋肥大に有効な温熱刺激を与えることは、筋力低下の予防や筋力増強につながると考えられるが、温熱刺激による骨格筋肥大を引き起こす分子機構は明らかでない。

筋肥大は骨格筋を構成する個々の筋細胞の肥大と筋細胞数の増加によるが、この現象には筋衛星細胞の活性化が関与していると考えられている。筋衛星細胞とは筋細胞の基底膜と形質膜の間に存在する単核細胞で、普段は静止状態にある多分化能を持つ骨格筋組織幹細胞である。機械的伸展などの刺激により筋衛星細胞は活性化し、増殖、筋芽細胞への分化、筋細胞への融合や新たな筋細胞の形成により筋肥大が生じると考えられているが、その活性化機構は明らかとなっていない。

転写因子の1つである nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化は、骨格筋の萎縮に作用することが報告されており、骨格筋量の調整に関与していることが示唆される。また、NF- κ B の活性化により、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF α) などのサイトカインが発現する。しかしながら、NF- κ B の活性が筋衛星細胞の活性化ならびに温熱刺激による骨格筋の肥大に関与しているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 温熱刺激による NF- κ B の活性およびその活性に関与するサイトカインの発現、(2) 温熱刺激による骨格筋肥大におけるサイトカインの関与を明らかにし、ヒトへの応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、動物実験ならびに培養細胞実験の2つの実験系により構成された。本研究は、豊橋創造大学が定める動物実験規定に基づき、豊橋創造大学生命倫理委員会の審査・承認を経て実施された。

(1) 動物実験

① 実験動物

実験には、生後7週齢のWistar系雄性ラット30匹を用い、対照群 (Con群、n=15)、温熱刺激群 (HS群、n=15) の2群に分類した。全ての動物を、気温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル12時間の環境下で飼育した。なお、餌および水は自由摂取とした。

② 温熱刺激

HS群のラットは、 42°C に維持された恒温槽の中に1時間無麻酔で放置し、温熱刺激を負荷した。

③ サンプルの採取

温熱刺激を基準に1、3および7日目に、両後肢のヒラメ筋を摘出した。筋組織の摘出後即座に結合組織を除去し、筋湿重量を測定した。筋湿重量測定後、左後肢は液体窒素を用いて凍結した。右後肢の筋組織はOCT compoundで包埋し、液体窒素により冷却したイソペンタンを用いて急速凍結し、 -80°C で保存した。

④ 測定項目

左後肢の凍結筋組織を2分割し、一方を2N NaOHを加えた isolation buffer (CellLytic TM-MT、Sigma) を用いて完全に溶解し、protein assay kit (Bio-Rad、Sigma) を用いて筋タンパク量を算出した。

もう一方は $1\text{mM Na}_3\text{VO}_4$ 、 1mM PMSF 、 $1\mu\text{g/ml leupeptin}$ を加えた isolation buffer を用いて溶解し、protein assay kit を用いて筋タンパク濃度を測定した。ウェスタンブロッティング法を用いて heat shock protein 72 (HSP72)、NF- κ B p65、Phospho-NF- κ B p65、Inhibitor κ B α (I κ B α)、 β -actin の含有量を測定し、ELISA法を用いて TNF α の含有量を測定した。

右後肢の凍結筋組織を厚さ $8\mu\text{m}$ に薄切し、連続凍結切片を作成した。免疫組織化学染色を施し、Pax7陽性核を検出した。全筋核数当たりの Pax7陽性核数の割合を算出した。Pax7は筋衛星細胞の核に特異的に発現するタンパクであり、基底膜下の Pax7陽性核が筋衛星細胞と判定できる。

(2) 培養細胞実験

① 培養細胞

実験には、マウス骨格筋由来筋芽細胞 C2C12 を用いた。培養にはタイプ I コラーゲンがコーティングされた培養プレート (直径 35mm) を用い、C2C12 を増殖培地にて3日間培養しサブコンフルエント状態にまで増殖させた。その後、分化培地に交換して培養することで筋管細胞に分化させた後、実験を行った。

温熱刺激群、NF- κ B 阻害剤投与群、阻害剤投与+温熱刺激群、ならびに無処置の対照群の4条件を設定した。

② 温熱刺激ならびに NF- κ B 阻害剤投与

C2C12 を 41°C の環境温に60分間曝露することで温熱刺激を負荷した。本研究で用いた温熱刺激条件により、培地の温度は温熱刺激開始後およそ45分後に 41°C に到達し、その後維持される。

NF- κ B 阻害剤は、BAY11-7082 (1.25 μ M) を用いた。

③ サンプルの採取

温熱刺激ならびに NF- κ B 阻害剤投与を基準として、0、12、24、および 48 時間後に細胞を採取し、 -80°C で保存した。

④ 測定項目

採取したサンプルを Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) と Phosphatase Inhibitor Cocktail (Calbiochem) を加えた isolation buffer (CellLytic TM-M, Sigma) を用いて溶解し、protein assay kit を用いて可溶性筋タンパク濃度を測定した。

ウェスタンブロッティング法を用いて HSP72、NF- κ B p65、Phospho-NF- κ B p65、I κ B α の含有量を測定した。

(3) 統計処理

すべての測定値は、平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。

各実験における平均値の比較を、一元配置分散分析 (one-factor ANOVA) を用いて行った。one-factor ANOVA にて有意差を認めた場合は、多重比較検定に Tukey-Kramer 法を適用し、各群間の有意差を判定した。

すべての検定において、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 動物実験

① 体重、筋湿重量および筋タンパク量

両群間の体重に有意な差は認められなかった (図 1)。温熱刺激 7 日後、ヒラメ筋の筋湿重量 (図 2) ならびに筋タンパク量 (図 3) は、HS 群が Con 群に比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$)。温熱刺激によって骨格筋の肥大が引き起こされた。

② 筋衛星細胞

両群のヒラメ筋組織に Pax7 陽性核が観察された。Pax7 陽性核は、温熱刺激 3 日後、HS 群が Con 群に比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$)。温熱刺激による筋衛星細胞の一過性の活性化が認められた。

③ HSP72、NF- κ B、I κ B α 、TNF α

温熱刺激 1 日後、HS 群の HSP72 は Con 群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。NF- κ B 活性は、温熱刺激によって有意に減少した ($p < 0.05$)。一方、I κ B α の含有量は、温熱刺激により有意に増加した ($p < 0.05$)。温熱刺激による NF- κ B 活性の抑制が認められた。また、TNF α は、温熱刺激 3 日後、HS 群が Con 群と比べて有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

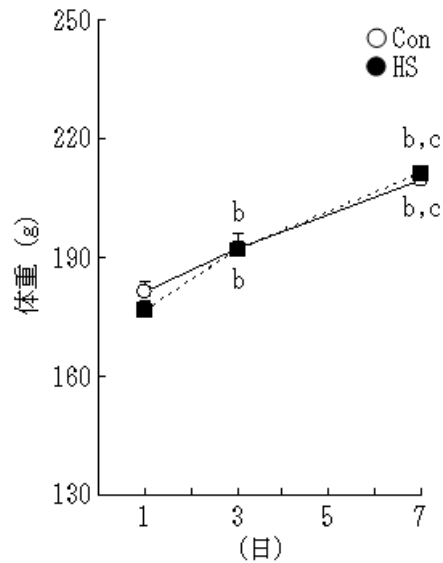


図 1 Effects of heat stress on the body weight

Con: control group, HS: heat-stressed group. Values are means \pm SEM. $n = 5$ per group each day. b and c: $p < 0.05$ vs. Day 1 and 3 in each group, respectively.

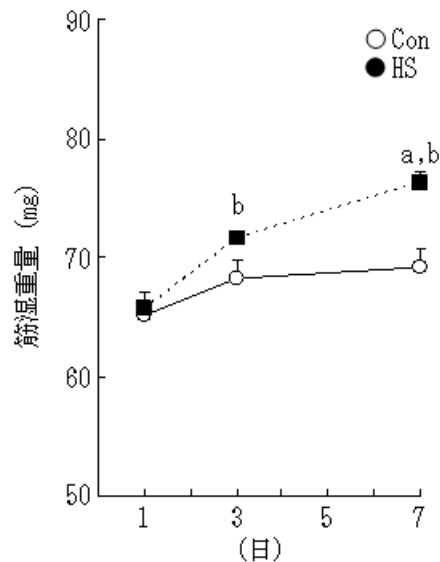


図 2 Effects of heat stress on the absolute muscle wet weight of soleus muscle.

a and b: $p < 0.05$ vs. the age-matched control, Day 1 in each group, respectively.

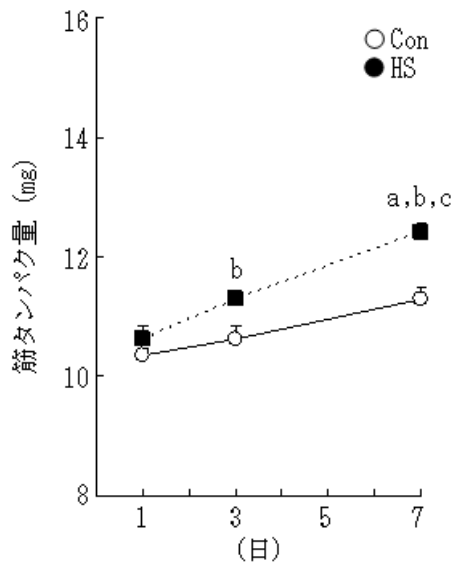


図3 Effects of heat stress on the total muscle protein content of soleus muscle. a, b and c: $p < 0.05$ vs. the age-matched control, Day 1 and 3 in each group, respectively.

(2) 培養細胞実験

① 筋タンパク量

温熱刺激ならびにNF- κ B阻害剤投与48時間後、対照群と比較し、温熱刺激群では筋タンパク量の有意な増加が認められた

($p < 0.05$)。阻害剤投与群、阻害剤投与+温熱刺激群の筋タンパク量も、対照群に比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

② HSP72、NF- κ B、I κ B α 、TNF α

HSP72の発現量は、温熱刺激群ならびに阻害剤投与+温熱刺激群において有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。NF- κ B活性は、温熱刺激、NF- κ B阻害剤によって有意に減少した ($p < 0.05$)。また、I κ B α の含有量は、温熱刺激、阻害剤により有意に増加した

($p < 0.05$)。温熱刺激によるNF- κ B活性の抑制が認められた。

本研究の検討により、温熱刺激によって引き起こされる骨格筋肥大には、NF- κ Bの活性抑制が寄与していることが示唆された。

温熱刺激による骨格筋肥大の分子機構の解明により、中高齢者向けの安全かつ効率的な筋力トレーニング方法の早期開発が可能となり、様々な生活習慣病の予防が可能となることで国民医療費の抑制に大きく貢献できると考えている。また、老化の抑制、高齢者の健康維持はもちろん、筋萎縮を招来する様々な臨床症状に対するカウンターメジャーやリハビリテーションなど臨床医学への

寄与が大きだけでなくスポーツ医学の分野でも貴重な知見となる。生命科学の研究においても、筋肥大に対する新たな知見をもたらすことになり、今後の科学研究の発展に大きく寄与するものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Y. Ohno, S. Yamada, T. Sugiura, Y Ohira, T. Yoshioka, K. Goto, A possible role of NF- κ B and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats、General Physiology and Biophysics、査読有、Vol. 29、2010、印刷中
- ② 後藤勝正、大野善隆、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、筋損傷の回復を遅延・促進させる要因の再検討、青森県スポーツ医学研究会誌、査読有、Vol.18、2009、37 - 42

[学会発表] (計10件)

- ① 大野善隆、山田純生、後藤勝正、温熱刺激によるNF- κ Bシグナルの阻害と骨格筋増量、第45回日本理学療法学会、2010年5月27日、岐阜都ホテル
- ② 大野善隆、山田純生、後藤勝正、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、温熱負荷は高齢マウスの骨格筋肥大を引き起こす、第64回日本体力医学会大会、2009年9月20日、朱鷺メッセ
- ③ Ohno, Y., Goto, K., Yamada, S., Sugiura, T., Ohira, Y., Yoshioka, T., SOME ASPECTS OF NF-KAPPAB-RELATED SIGNALS IN HEAT STRESS-ASSOCIATED MUSCLE HYPERTROPHY IN RATS、第36回国際生理学会世界大会、2009年7月29日、国立京都国際会館
- ④ 大野善隆、山田純生、後藤勝正、成熟期マウスの骨格筋に対する温熱刺激の効果、第44回日本理学療法学会、2009年5月29日、東京国際フォーラム
- ⑤ 大野善隆、後藤勝正、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、無重量環境における損傷骨格筋の再生とミオスタチン機能阻害の影響、第54回日本宇宙航空環境医学会大会、2008年11月14日、東京慈恵会医科大学1号館
- ⑥ 大野善隆、山田純生、後藤勝正、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、温熱ストレスによる骨格筋の肥大-成熟期マウスを用いた検討-、第63回日本体力医学会

大会、2008年9月19日、別府ビーコン
プラザ

- ⑦ 大野善隆、後藤勝正、熱ストレスによる骨格筋細胞の肥大と炎症関連シグナルの関与、第13回理学療法医学的基礎研究会学術集会、2008年5月17日、福岡市民会館小ホール
- ⑧ 大野善隆、後藤勝正、熱刺激による骨格筋肥大におけるサイトカインシグナルに関する基礎的研究、第43回日本理学療法学術大会、2008年5月15日、福岡サンパレスホテル・ホール、福岡国際会議場・福岡国際センター
- ⑨ 大野善隆、後藤勝正、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、温熱ストレスによるNF- κ Bの応答と骨格筋の肥大、第53回日本宇宙航空環境医学会大会、2007年11月10日、愛知医科大学たちばなホール
- ⑩ 大野善隆、後藤勝正、温熱刺激による骨格筋の肥大機構とリハビリテーションへの応用に関する基礎的研究、第42回日本理学療法学術大会、2007年5月24日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 善隆 (OHNO YOSHITAKA)
豊橋創造大学・保健医療学部・助教
研究者番号：80440808

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：