

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700541

研究課題名(和文) 温熱刺激は関節リウマチに伴う筋機能の低下を改善するか？

研究課題名(英文) Effect of heat stress on contractile properties of skeletal muscle from adjuvant-induced arthritis rat

研究代表者

山田 崇史 (Yamada, Takashi)

札幌医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号：50583176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)患者では、関節の障害に加え、著しい筋力低下により活動能力が低下する。本研究では、アジュバント関節炎(AIA)ラットを用い、RAに伴う筋力低下のメカニズムについて検討した。AIAラットの長趾伸筋では、TNF- α 誘導性のパーオキシナイトライト生成による酸化ストレスにより、収縮機能が低下することが示唆された。さらに本研究では、これらの知見と、熱ショックタンパク質(Hsp)72の抗酸化作用を考慮し、熱刺激がAIAラットの長趾伸筋における収縮機能に及ぼす影響を検討した。その結果、熱刺激は、Hsp72発現量を著しく増加させるが、収縮機能を改善しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Patients with rheumatoid arthritis (RA) have significant muscle weakness, which has a major impact on disability in conjunction with disease activity. In the present study, we investigated the underlying mechanisms of contractile dysfunctions in skeletal muscle from adjuvant-induced arthritis (AIA) rats, which is a widely used animal model for RA. The results show intrinsic contractile dysfunction in extensor digitorum longus (EDL) muscles of AIA rats, which can be explained by the oxidative stress due to TNF-induced peroxynitrite overproduction. Moreover, take these findings and the antioxidative role of heat shock protein (Hsp) 72 into account, we investigated the effects of heat stress on the contractile properties and redox states of AIA EDL muscles. Our results show that heat stress markedly increases Hsp72 expression, but fails to ameliorate contractile dysfunctions and redox modifications in AIA EDL muscles.

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：関節リウマチ 筋力低下 炎症性サイトカイン パーオキシナイトライト 熱刺激 熱ショックタンパク質

1. 研究開始当初の背景

ロコモティブシンドローム(ロコモ)は、運動器の脆弱化を示す概念であり、加齢に伴う運動器疾患がその要因となる。平成 22 年度の国民生活基礎調査によると、ロコモを背景とする介護保険適用者は全体の約 2 割を占めており、脳血管障害と並んで生活自立度を低下させる重大な要因となっている。その中でも主因を占める関節リウマチ (RA) 等の関節疾患では、関節障害に加え、筋力が著しく低下するために介護や支援の必要性が増大する。今後、更なる高齢化が見込まれる本邦において、国民が健康長寿を享受するために、また、高齢者医療・介護費の削減を実現するために、関節疾患に対する効果的な筋力低下防止プログラムの確立は喫緊の課題である。

RA に伴う筋力の低下は、筋萎縮よりもむしろ単位断面積当たりの張力の低下に起因する (Helliwell et al., *Ann. Rheum. Dis.* 1994) . Muscle weakness (筋弱化) と呼ばれるこのような変化は、廃用性の筋力低下では顕著には認められないことから、RA では関節障害による活動量の減少以外にも筋機能を低下させる要因があると考えられる。申請者らは、RA モデルマウスにおいて、筋収縮機能の低下が、筋原線維タンパク質の酸化的修飾の増加を伴うことを明らかにした (Yamada et al., *Arthritis & Rheumatism* 2009) . また、特筆すべきことに、RA 患者から採取した筋サンプルにおいても、類似した変化が認められている。これらの知見は、RA に伴う筋力の低下に、酸化ストレスによる筋タンパク質の退行性変化が関与することを示唆している。さらに申請者らは、RA モデルマウスの骨格筋において、神経型の一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の発現量が顕著に増加することや、ミオシンおよびトロポニン I が一酸化窒素 (NO) 派生物による修飾を受けることを明らかにした。これらの変化は、収縮機能を低下させる要因となることが示されており (Nogueira et al., *Biochem. J.* 2009) , 活性酸素種の中でも NO 派生物が関節炎に伴う筋機能低下に関与する可能性が示唆される。

これまで温熱療法は、関節炎に伴う疼痛を緩和する目的で主に用いられてきた。興味深いことに、この 10 年余の間に、温熱刺激が不活動 (Selesby et al., *Am. J. Physiol.* 2005) や関節炎 (中野ら, *理学療法学*, 2004) に伴う筋量の低下を軽減することが、実験動物を対象とした研究において報告されており、そのメカニズムとして、熱ショックタンパク質の役割が注目されている。ただし残念なことに、これらの報告では、筋収縮機能の測定は実施されておらず、RA に伴う筋力低下の本態である筋弱化に対し、温熱刺激が効果を及ぼすかどうかについては明らかにされていない。先行研究において、熱ショックタンパク質は、抗酸化物質として作用するとともに、酸化的

修飾により生じたタンパク質の構造変化を修復する分子シャペロンとしての働きを有すると考えられている。前述の通り、申請者らの先行研究において、RA に伴う筋弱化が筋タンパク質の酸化的修飾により誘引されることが示唆されることから、温熱刺激が、筋の量的な低下を防止するだけでなく、酸化ストレスに対抗することで筋弱化を防ぎ、筋力低下の軽減に寄与するものと推察される。

2. 研究の目的

本研究では、RA に伴う筋機能低下の要因について、一酸化窒素の役割に着目して検討するとともに、対抗手段としての温熱刺激の効果とその作用機序について明らかにすることを目的とし、以下の 2 つの研究課題に取り組む。

【課題 1】平成 24 年度実施

アジュバント関節炎 (AIA) ラットの筋機能低下における一酸化窒素 (NO) 派生物の役割

【課題 2】平成 25 年度実施

温熱刺激が AIA ラットの骨格筋における収縮機能及び酸化還元動態に及ぼす影響

3. 研究の方法

本研究課題は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け実施した。

【課題 1】

(1) 対象

実験には Lew/SsN ラットを用い、イソフルランの吸入麻酔下 (以下、麻酔下) にて、膝関節腔に完全フロイントアジュバント (2 mg/0.2 ml) を注射することで、AIA モデルを作成した。関節炎の程度は、膝関節の腫脹で評価し、関節炎惹起後 21 日目に長趾伸筋を採取した。

(2) 収縮機能

全筋を対象に、単収縮及び強収縮刺激を負荷し、張力-頻度曲線を作成した。また、筋重量、筋長および密度から筋横断面積を算出し、単位断面積当たりの張力を求めた。

(3) 酵素活性

筋を溶液内でホモジナイズし、分光光度計を用いタンパク濃度を測定した。その後、ミオシン ATPase (mATP) 活性及び筋小胞体の Ca²⁺-ATPase (SERCA) 活性を測定した。

(4) ミオシン重鎖及びアクチンの発現量

抽出した筋原線維タンパク質を用い、SDS-PAGE により、ミオシン重鎖 (MyHC) 及びアクチンの量、また、MyHC アイソフォームの分布を測定した。

(5) 細胞内 Ca²⁺制御タンパク質の発現量

ウェスタンブロッティング法を用い、リアノジンレセプター (RyR1)、ジヒドロピリジ

ンレセプター (DHPR), SERCA の発現量を測定した。

(6) 酸化修飾

ウェスタンブロッティング法を用い、NO 派生物による修飾の指標である 3-ニトロチロシン、マロンジアルデヒドの量を測定した。

(7) 酸化還元調節タンパク質及び炎症性メディエーターの発現量

ウェスタンブロッティング法を用い、NADPH オキシダーゼ (NOX) 2, 神経型及び内皮型一酸化窒素合成酵素 (nNOS, eNOS), Mn-スーパーオキシドディスムターゼ (SOD2), 腫瘍壊死因子 (TNF- α), High mobility group box (HMGB) 1 の発現量を測定した。

【課題 2】

(1) 対象

実験には Lew/SsN ラットを用い、それらを対照 (CNT) 群と AIA 群に分けた。さらに、これらの群を、熱刺激を加える群と加えない群に分けた。関節炎惹起後 21 日目に長趾伸筋を採取した。

(2) 温熱刺激

麻酔下にて、実験動物の後肢に 42 °C の温水浴を 30 分間、2 日に 1 回ずつ負荷した。温熱刺激は、関節炎惹起 24 時間前から開始し、関節炎惹起後 20 日目まで負荷した。

(3) 収縮機能

【課題 1】に準じた。

(4) 熱ショックタンパク質

ウェスタンブロッティング法を用い、熱ショックタンパク質 (Hsp) 72, Hsp25, B-crystallin の量を測定した。

(5) 酸化修飾及び炎症性メディエーターの発現量

ウェスタンブロッティング法を用い、NO 派生物による修飾の指標である 3-ニトロチロシンと、TNF- α の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 【課題 1】の成果

AIA 群の膝関節幅は、CNT 群に比べ、20% 程度増加し、関節炎の惹起が確認された。AIA 群では、筋重量の減少とともに、100 及び 120 Hz の固有張力の低下が認められ、これらは、TNF- α , HMGB1, NOX2, nNOS, 酸化ストレスの指標である 3-ニトロチロシンおよびマロンジアルデヒドの含有量の増加を伴っていた。また、AIA 群では、mATPase 活性及び SERCA 活性の低下が観察された (*平成 24 年度の報告書では、これらの酵素活性値に変化は認められないと記載したが、その後、個体数を増やすことで統計学的な差異

が検出された)。一方、MyHC の発現量及びアイソフォームの分布や、アクチンの発現量に変化は認められなかった。これらの知見から、AIA ラットの長趾伸筋では、パーオキシナイトライドの生成量が增大することが強く示唆された。パーオキシナイトライドは、ミオシン頭部に存在する高反応性スルフィドリル基を酸化することで、mATPase 活性の低下を引き起こすことが示されている。したがって、AIA ラットの長趾伸筋で認められる固有張力の低下には、パーオキシナイトライドによる mATPase 活性の低下が関与する可能性が示唆された。

(2) 【課題 2】の成果

本研究では、【課題 1】で得られた成果と、Hsp の有する抗酸化能力に着目し、AIA ラットの筋機能低下を、熱刺激応答経路の活性化が防止すると仮説し検討を行った。しかしながら、我々の考えに反し、熱刺激により、骨格筋における Hsp72 発現量は顕著に増加したにもかかわらず、AIA に伴う筋機能低下に改善は認められなかった。また、AIA ラットの骨格筋では、パーオキシナイトライドによるタンパク修飾の指標である 3-ニトロチロシンや炎症性メディエーターである TNF- α の増加が認められたが、熱刺激はこれらの増加を抑制しなかった。したがって、熱刺激応答経路の活性化による Hsp72 発現量の増加は、AIA ラットにおいて、炎症 酸化ストレス系を介した筋機能低下を防止しないことが示された。

(3) 総括及び今後の展望

先行研究において我々は、RA モデルであるコラーゲン誘導性関節炎マウスの骨格筋において、筋張力の著しい低下が、NO 派生物によるタンパク質の翻訳後修飾を伴うことを示した。平成 24 年度に実施した研究では、別の RA モデルである AIA ラットの骨格筋においても、類似した変化を捉えることに成功した。したがって、これらの知見から、RA に伴う筋力低下には、NO 派生物による酸化ストレスが関与することが示唆された。

平成 25 年度の研究では、これらの知見と、Hsp の抗酸化物質としての役割に着目し、AIA ラットの筋機能低下を、熱刺激応答経路の活性化が防止すると仮説し検討を行った。しかしながら、我々の仮説に反し、熱刺激により、骨格筋における Hsp72 発現量は顕著に増加したにもかかわらず、AIA に伴う筋機能低下に改善は認められなかった。したがって、熱刺激応答経路の活性化による Hsp72 発現量の増加は、AIA ラットにおいて、炎症 酸化ストレス系を介した筋機能低下を防止しないことが示唆された。ただし、本研究で用いた熱刺激条件の結果のみから、関節炎に伴う筋力低下の対策としての熱刺激効果の可能性を、完全に否定することはできない。今後、温度、時間、頻度等、種々の条件を変

化させた際の影響について、さらに詳細に検討する必要がある。一方、本研究の結果は、RAに伴う筋機能低下とNO派生物によるタンパク質機能障害との関連性を、改めて示唆するものであることから、今後、抗酸化剤の投与等、薬理的なレスキュー実験を行い、その結果をより効果的なりハビリテーションの開発に繋げたい。

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3件)

阿部真佐美, 李宰植, 土山舞実, 山田崇史: 熱刺激が脱神経後のラット骨格筋における収縮機能に及ぼす影響. *日本基礎理学療法学雑誌*. 17: 53-62, 2013 (http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ch1thrypy/2013/s01701/001&name=0053-0062j&UserID=163.130.14.49&base=jamas_pdf) (査読有)

Yamada, T., Ivarsson, N., Herrnández, A., Fahlström, A., Cheng, A.J., Bruton, J.D., Ulfhake, B., Westerblad, H. Impaired mitochondrial respiration and decreased fatigue resistance followed by severe muscle weakness in skeletal muscle of mtDNA mutator mice. *J. Physiol.* 590: 6187-6197, 2012 (DOI: 10.1113/jphysiol.2012.240077) (査読有)

和田正信, 山田崇史, 松永智: 低頻度疲労の特徴とメカニズム - 骨格筋における変化 -. *体力科学* 61: 297-306, 2012 (DOI: 10.7600/jspfsm.61.297) (査読有)

[学会発表](計10件)

山田崇史: カヘキシア誘因性筋弱化的メカニズムとその対策 2014年3月8-9日. 第2回骨格筋生物学研究会. 札幌市.

李宰植, 阿部真佐美, 土山舞実, 山田崇史: 熱刺激負荷時間及び回数の違いが骨格筋の熱ショックタンパク質の発現量に及ぼす影響. 2013年10月27日. 第3回日本基礎理学療法学会学術大会. 名古屋市.

阿部真佐美, 李宰植, 土山舞実, 山田崇史: 熱刺激応答経路の活性化は脱神経に伴う筋機能低下を抑制するか?. 2013年10月27日. 第3回日本基礎理学療法学会学術大会. 名古屋市.

山田崇史, 土山舞実, 阿部真佐美, 李宰植, 館林大介, 近添早知子, 廣田健斗: アジュバント関節炎ラットの長趾伸筋における収縮機能及び酸化還元動態の変化. 2013年9月21-23日. 第68回日本体力医学会大会. 東京都.

倉谷麻衣, 神崎圭太, 山田崇史, 松永智, 和田正信: 高血糖状態における酸化ストレスが心筋筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の機能に及ぼす影響. 2012年9月14-16日. 第

67回日本体力医学会大会. 岐阜市. 神崎圭太, 倉谷麻衣, 山田崇史, 松永智, 和田正信: カルパインの阻害が伸張性収縮による骨格筋の機能の変化に及ぼす影響. 2012年9月14-16日. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜市.

松永智, 神崎圭太, 倉谷麻衣, 松永須美子, 山田崇史, 和田正信: 繰り返される伸張性収縮間の安静時間の有無が Na^{+} - K^{+} -ATPase 活性に及ぼす影響. 2012年9月14-16日. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜市.

山田崇史, 倉谷麻衣, 神崎圭太, 三島隆章, 松永智, 和田正信: 関節リウマチに伴う筋力低下における窒素化ストレスの役割. 2012年9月14-16日. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜市.

Lanner, J.T., Andersson, D., Yamada, T., Zong, M., Lundberg, I.E. and Westerblad, H.: Cardiac Ca^{2+} and free radical disturbances in mice with arthritis. Gordon Research Conferences (Muscle: Excitation/Contraction Coupling). Les Diablerets, Switzerland. June 3-8, 2012

Yamada, T., Ivarsson, N., Grundtman, C., Zhang, S.J., Erlandsson-Harris, H., Lundberg, I.E., Bruton, J.D. and Westerblad, H.: Involvement of crosstalk between nitrosative stress and altered Ca^{2+} handling properties in arthritis-induced skeletal muscle dysfunction. Gordon Research Conferences (Muscle: Excitation/Contraction Coupling). Les Diablerets, Switzerland. June 3-8, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 崇史 (YAMADA TAKASHI)
札幌医科大学・保健医療学部・講師
研究者番号: 50583176