

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 14 日現在

機関番号：33930

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350641

研究課題名(和文) 物理的刺激による骨格筋可塑性発現機構の解明とロコモティブシンドローム治療への応用

研究課題名(英文) Molecular aspects of skeletal muscle plasticity in response to extracellular stimuli -Therapeutic applications for locomotive syndrome-

研究代表者

大野 善隆(OHNO, Yoshitaka)

豊橋創造大学・保健医療学部・講師

研究者番号：80440808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、機械的刺激や温熱刺激などの物理的刺激による骨格筋応答および熱ショックタンパク質(HSPs)発現の変化を検討した。その結果、物理的刺激は骨格筋量の増大を引き起こすと共に、筋衛星細胞数の増加、HSPs発現の誘導やAkt/p70 S6 kinaseの活性化を引き起こすことが確認された。しかしながら、これらの変化は熱ショック転写因子1(HSF1)の欠損により減弱・抑制された。したがって、物理的刺激による骨格筋量の変化を調節する因子として、骨格筋におけるHSPs発現の誘導などのHSF1依存性のストレス応答の存在が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effects of extracellular stimuli, such as mechanical loading and heat stress, on the plasticity of skeletal muscle. Absence of heat shock transcription factor 1 (HSF1) gene partially attenuated the overloading-associated skeletal muscle hypertrophy in mice. Heat stress-associated increase in muscle mass and muscle satellite cells was also suppressed by HSF1-deficiency. Furthermore, HSF1-deficiency depressed heat stress-associated activation of Akt/p70 S6 kinase pathway. In addition, upregulation of heat shock proteins (HSPs) in skeletal muscle was attenuated by the absence of HSF1. These observations suggested that HSF1-mediated stress response, including the upregulation of HSPs, may play a key role in skeletal muscle hypertrophy induced by mechanical overloading and heat stress.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：細胞・組織 ストレス 筋肥大 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会に突入した我が国において、健康寿命の延伸は重要な課題である。その中でも、ヒトの活動を左右する運動器の問題であるロコモティブシンドロームへの対策、特に骨格筋機能の維持向上は主要ターゲットである。

(2) 骨格筋は可塑性に富んだ器官であり、細胞外刺激に適應して構造的・機能的に変化する。種々の物理的刺激によって骨格筋量と機能の維持向上がもたらされる際に、熱ショックタンパク質(Heat shock proteins: HSPs)の発現も増加することが報告されている。HSPsは分子シャペロンとして機能し、タンパク質の合成や修復を促進すると考えられている。骨格筋の量的・機能的適應にHSPsが関与している可能性が指摘されているものの不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類骨格筋においてHSPs発現を制御している熱ショック転写因子1(heat shock transcription factor 1: HSF1)の機能に着目し、HSF1欠損(HSF1-knock out: HSF1-KO)マウスを用いて、物理的刺激による骨格筋応答およびHSPs発現の変化を追究する。そして、機械的刺激、温熱刺激など物理的刺激による骨格筋の量的かつ機能的応答におけるHSPsの役割を解明する。

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。本研究における動物実験は、所属機関における動物実験に関する規程に従い、所属機関の遺伝子組換え動物実験安全委員会ならびに動物実験委員会による審査・承認を経て実施された。

(1) 動物実験では、HSF1-KO雄性マウスおよびwild-type(WT)雄性マウス(ICR)を用い、ヒラメ筋を対象筋とした。全てのマウスは気温約23℃、明暗サイクル12時間の環境下で飼育された。なお、実験期間中マウスは自由に餌および水を摂取できるようにした。

機械的刺激の増加

マウスの右後肢を対照群、左後肢を機械的刺激群として設定した。左後肢において、ヒラメ筋の協働筋である腓腹筋腱を切除し、ヒラメ筋に対する機械的刺激を増加させた。

温熱刺激の負荷

マウスを41℃の暑熱環境で60分間飼育することで、温熱刺激を負荷した。温熱刺激を負荷しないマウスを対照群とした。

各刺激負荷前後にマウスの体重を測定した後、マウス後肢よりヒラメ筋を摘出した。筋周囲の結合組織を除去した後、筋重量を測

定し、液体窒素を用いて急速凍結して保存した。体重あたりの筋重量を算出し、骨格筋量の変化を評価した。

(2) 培養細胞実験では、マウス筋芽細胞C2C12を用いた。タイプコラーゲンがコーティングされた培養プレートを用い、C2C12を増殖培地にて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、温熱刺激(41℃、60分間)を負荷した。温熱刺激負荷前後に細胞を回収した。

(3) 摘出したヒラメ筋組織ならびに採取したC2C12筋細胞はprotease inhibitorとphosphatase inhibitorを含むタンパク質抽出液を用いてホモジネートし、Bradford法によりタンパク質量を測定した。さらに、得られた試料を用いて、ウェスタンブロット法により、HSP25およびHSP70ファミリー(HSC70、HSP72、HSP110)のタンパク質レベルの発現量を測定した。また、タンパク質合成に関する細胞内シグナル伝達因子であるAkt(phosphorylated Akt、total Akt)とp70S6kinase(phosphorylated p70S6K、total p70S6K)の発現量を測定した。内在性コントロールにはglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を用いた。Aktとp70S6Kについては、全タンパク質(total Akt、total p70S6K)に対するリン酸化タンパク質(phosphorylated Akt、phosphorylated p70S6K)の割合から相対的リン酸化レベルを算出し、評価した。

(4) ヒラメ筋組織の一部より全RNAを抽出・精製し、cDNAに逆転写した。リアルタイムRT-PCR法により、HSPsのmRNA発現量を測定した。内在性コントロールにはGAPDHを用い、このGAPDHのmRNA発現量に対するHSPsの相対的発現量を算出し、評価した。

(5) Pax7を指標にヒラメ筋組織における筋衛星細胞の挙動を評価した。凍結筋組織を薄切し、凍結切片を作成した。免疫組織学的手法により、Pax7陽性核を検出した。Pax7は筋衛星細胞の核に特異的に発現するタンパク質であり、基底膜下のPax7陽性核が筋衛星細胞と判定できる。

4. 研究成果

(1) 協働筋腱切除によるヒラメ筋への機械的刺激の増加は、WTマウスのヒラメ筋重量および筋タンパク質量を増加させた。さらに、機械的刺激の増加によって生じるWTマウスの筋量増加率は、HSF1-KOマウスにおける筋量の増加率よりも大きかった。また、機械的刺激の増加によるPax7陽性核数(筋衛星細胞数)の増加はHSF1欠損により抑制された。

(2) 温熱刺激をマウスに負荷することで、

WT マウスのヒラメ筋における筋重量および筋タンパク質量は増加した。しかし、HSF1-KO マウスに対する温熱刺激は、筋重量に有意な変化をもたらさなかった。温熱刺激後の WT マウスにおける Pax7 陽性核数は増加したが、HSF1-KO マウスでは変化を認めなかった。また、温熱刺激による Akt と p70S6K のリン酸化は HSF1 欠損により抑制された。さらに、温熱刺激は WT マウスのヒラメ筋における HSP25、HSP72 および HSP110 の発現を増加させた。HSF1-KO マウスでは、温熱刺激により HSP25 発現量は増加したが、HSP70 ファミリーの発現量の増加をもたらさなかった。WT および HSF1-KO マウス共に、温熱刺激はヒラメ筋における HSC70 の発現量に影響を与えなかった。

(3) 温熱刺激により筋管細胞のタンパク質量は増加した。また、Akt、p70S6K のリン酸化レベルの増加も認められた。さらに、この筋量増加は HSPs (HSP25、HSP72 および HSP110) 発現量の増加を伴うものであった。しかし、培養細胞中の HSC70 の発現量に温熱刺激の影響は認められなかった。

本研究の検討により、物理的刺激は骨格筋量の増大を引き起こすと共に、筋衛星細胞数の増加、HSPs 発現の誘導や Akt/p70S6K の活性化を引き起こすことが確認された。しかしながら、これらの変化は HSF1 の欠損により減弱・抑制された。したがって、物理的刺激による骨格筋量の変化を修飾する因子として、骨格筋における HSF1 あるいは HSPs 発現の誘導などの HSF1 依存性のストレス応答の存在が考えられた。物理的刺激による骨格筋量変化の分子機構が明らかになることで、効果的な物理療法ならびに運動療法の確立につながり、運動器リハビリテーション分野の発展に貢献できると考えている。

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8件)

Ohno Y, Egawa T, Yokoyama S, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses heat stress-associated increase in slow soleus muscle mass of mice, *Acta Physiologica*, 査読有、215、2015、191-203
DOI:10.1111/apha.12600.

Egawa T, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Ikuta A, Suzuki M, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Hayashi T, Goto K, Involvement of AMPK in regulating

slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 査読有、309、2015、E651-E662
DOI:10.1152/ajpendo.00165.2015.

Ohno Y, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Loading-associated expression of TRIM72 and caveolin-3 in antigravitational soleus muscle in mice, *Physiological Reports*, 査読有、2、2014、e12259
DOI:10.14814/phy2.12259

大野善隆, 温熱刺激による骨格筋肥大と生理学的意義、*物理療法科学*, 査読無、21、2014、14-16

Egawa T, Ohno Y, Goto A, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Yokoyama S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through the HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 査読有、306、2014、E344-E354
DOI:10.1152/ajpendo.00495.2013

Ohno Y, Fujiya H, Goto A, Nakamura A, Nishiura Y, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Microcurrent electrical nerve stimulation facilitates regrowth of mouse soleus muscle, *International Journal of Medical Sciences*, 査読有、10、2013、1286-1294
DOI:10.7150/ijms.5985

Nishizawa S, Koya T, Ohno Y, Goto A, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Beppu M, Goto K, Regeneration of injured skeletal muscle in heat shock transcription factor 1-null mice, *Physiological Reports*, 査読有、1、2013、e00071
DOI:10.1002/phy2.71

Koya T, Nishizawa S, Ohno Y, Goto A, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Beppu M, Goto K, Heat shock transcription factor 1-deficiency attenuates overloading-associated hypertrophy of mouse soleus muscle, *PLoS One*, 査読有、8、2013、e77788

〔学会発表〕(計 12 件)

大野善隆, 後藤勝正、筋衛星細胞の増殖が不活動を伴う筋損傷回復遅延に及ぼす影響、第 2 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 20 回学術大会合同学会、2015 年 11 月 14 日-15 日、神奈川県立保健福祉大学(神奈川県・横須賀市)

大野善隆, 後藤勝正、温熱刺激による骨格筋増量と HSP110 の応答、第 23 回日本物理療法学会学術大会、2015 年 10 月 24 日-25 日、神戸学院大学有瀬キャンパス(兵庫県・神戸市)

大野善隆, 杉浦崇夫, 大平充宣, 吉岡利忠, 後藤勝正、乳酸が培養骨格筋細胞の分化に及ぼす影響、第 70 回日本体力医学会大会、2015 年 9 月 18 日-20 日、和歌山県民文化会館, ホテルアパローム紀の国(和歌山県・和歌山市)

大野善隆, 後藤勝正、熱ショック転写因子 1 の欠損は温熱刺激による骨格筋肥大を抑制する、第 50 回日本理学療法学会学術大会、2015 年 6 月 5 日-7 日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

Ohno Y., Matsuba Y., Hashimoto N., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Goto K., Suppression of myostatin facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in mice under unloading condition、The 11th WORLD CONGRESS of the International Society for ADAPTIVE MEDICINE、2015 年 5 月 27 日-30 日、米子コンベンションセンター(鳥取県・米子市)

大野善隆, 後藤勝正、骨格筋の量的変化と細胞膜構築タンパク質の発現、第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会合同学会、2014 年 11 月 15 日-16 日、名古屋学院大学名古屋キャンパス白鳥学舎(愛知県・名古屋市)

大野善隆, 後藤勝正、微弱電流刺激による骨格筋量増大におけるタンパク質合成機構に関する基礎的研究、第 22 回日本物理療法学会学術大会、2014 年 10 月 25 日-26 日、信州大学医学部附属病院外来棟 4 階(長野県・松本市)

大野善隆, 杉浦崇夫, 大平充宣, 吉岡利忠, 後藤勝正、筋活動量の変化に伴う骨格筋細胞膜タンパク質の応答、第 69 回

日本体力医学会大会、2014 年 9 月 19 日-21 日、長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市)

大野善隆, 後藤勝正、物理的刺激による骨格筋量変化とストレス応答、第 49 回日本理学療法学会学術大会、2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大野善隆, 後藤勝正、骨格筋の量的増加に作用する微弱電流刺激とその至適条件、第 48 回日本理学療法学会学術大会、2013 年 5 月 24 日-26 日、名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)

Y. Ohno, T. Egawa, A. Ikuta, A. Goto, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, K. Goto、Mechanical loading-associated changes of membrane protein expression in mouse skeletal muscle、The 34th Annual International Gravitational Physiology Meeting、2013 年 6 月 23 日-28 日、穂の国とよはし芸術劇場プラット(愛知県・豊橋市)

大野善隆、温熱刺激による骨格筋肥大と生理学的意義、第 21 回日本物理療法学会学術大会、2013 年 10 月 19 日-20 日、神奈川県立保健福祉大学(神奈川県・横須賀市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sozo.ac.jp/professor/goto_katsumasa/index.html

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・講師

研究者番号: 80440808