

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750347

研究課題名(和文) 温熱刺激に対する骨格筋の応答と筋萎縮抑制効果の検討

研究課題名(英文) Effects of heat stimulus on skeletal muscle properties.

研究代表者

大平 宇志(Ohira, Takashi)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・研究開発員

研究者番号：40633532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：右側には坐骨神経切除手術、左側には偽手術を施したラットに温熱刺激を行い、ヒラメ筋の形態および細胞内シグナルに生じる変化について検討した。温熱刺激は湯浴により行い、手術の1日後から1日おきに麻酔をしたラットの後肢を42℃のお湯に30分間浸けた。手術の14日後に両脚より採取したヒラメ筋の形態解析の結果、間欠的温熱刺激による筋肥大促進および筋萎縮軽減効果を確認した。筋内のタンパク質の合成および分解に関わる細胞内シグナルについての解析結果からも、ヒラメ筋の形態に対する温熱刺激の効果は神経支配の有無にかかわらず得られるが、温熱刺激に伴う細胞内シグナルの変化は神経支配の有無により異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effects of heat stress on the morphological properties and intracellular signaling of innervated and denervated soleus muscles were investigated. Heat stress was applied to rats by immersing their hindlimbs in a warm water bath (42℃, 30 minutes/day, every other day following unilateral denervation) under anesthesia. Fourteen days after surgery, the soleus muscles were sampled bilaterally. Repeated heat stress application promoted growth-related hypertrophy in sham-operated muscles and attenuated atrophy in denervated muscles. Our results also indicated that the beneficial effects of heat stress on the morphological properties of muscles were induced regardless of innervation. However, the responses of intracellular signalings to the heat stress was distinct between the innervated and denervated muscles.

研究分野：神経・筋生理学

キーワード：温熱刺激 筋肥大 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動器としてだけでなく、全身のエネルギー代謝を調節するうえでも非常に重要な組織であるため、その量および特性を適正に保つことは生体の Quality of life を高く維持することにもつながる。現在、廃用や加齢にともなう筋量の低下に対する有効な予防策としては運動処方が高く受け入れられている。しかし、実際には健康上の理由から運動処方の実施が困難な患者や高齢者の方等も存在することから、より簡便に筋量低下を予防できる処方を確立することは重要である。

そこで、研究代表者は、運動の際に骨格筋が受容する刺激を、生体外から与えることにより骨格筋を刺激し、筋量および筋特性を制御する手法に着目した。運動に伴い骨格筋は様々な刺激を統合して受容するが、電気刺激や振動刺激単独であっても骨格筋の量および収縮特性に好影響が及ぼされることは先行研究により報告がある。また、最近では骨格筋内の温度を 38~42 まで上昇させることにより、筋内でのタンパク質合成が高められる結果、筋肥大がもたらされることも報告されている。

“熱”は生体外からでも簡便にかつ安全に与えられるとともに、我々が実際に使用する際の精神的抵抗も低く抑えられると考えられることから、実用化に向けて非常に有望な刺激源であると言える。しかし、温熱刺激がもたらす筋への効果やその分子メカニズムについては不明な点も多い。したがって、本研究では、以下の通り温熱刺激が骨格筋に及ぼす影響について検討した。

2. 研究の目的

温熱刺激が神経切除に起因する筋萎縮も抑制し得るか否かを確認する。また、温熱刺激による筋肥大促進および筋萎縮抑制効果の分子メカニズムを探るべく、温熱刺激が骨格筋内のタンパク質合成および分解等にかかわる細胞内シグナル伝達機構にもたらす変化を明らかにする。

3. 研究の方法

ラットのヒラメ筋を対象として、温熱刺激(42 の温浴、30 分間)が筋の形態および細胞内シグナル伝達機構に及ぼす影響について検討した。温熱刺激(Heat)群へは、イソフルランの吸入麻酔下で上記の温熱刺激を行い、刺激中はラットの身体が湯と直接接触しないようにビニール袋を穿かせた状態で後肢を湯に浸けた。また、麻酔の影響も考慮し、30 分間のイソフルランの吸入麻酔のみを施したコントロール(Cont)群も用意し、両群を比較することにより温熱刺激の効果を観察した。

(1) 実験 1

ラットのヒラメ筋内に温度センサーを埋

入し、30 分間の温熱刺激またはイソフルランの吸入麻酔に伴う筋温の経時的変化を観察した。

(2) 実験 2

右後肢には坐骨神経切除手術を、左後肢にはその偽手術を施したラットを用いて、手術後 1 日~14 日の間に 2 日に 1 回の頻度で温熱刺激を施し、間欠的な温熱刺激によるヒラメ筋の肥大促進および萎縮抑制効果について検討した。

(3) 実験 3

実験 2 と同様に右後肢には坐骨神経切除手術を、左後肢にはその偽手術を施したラットを用いて、手術後 1 日目または 14 日目のヒラメ筋において 1 回の温熱刺激がタンパク質合成や糖代謝を促進させるのに重要な Akt-mTOR カスケードに及ぼす影響を観察した。

4. 研究成果

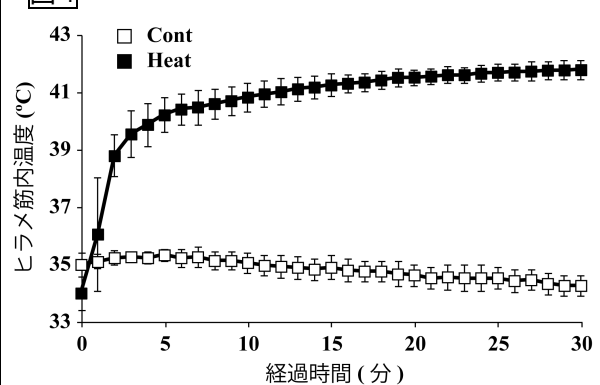
(1) 実験 1

30 分間の温熱刺激(Heat 群)またはイソフルランの吸入麻酔のみ(Cont 群)に伴うラットのヒラメ筋内温度(Mean ± SD)の経時的変化を図 1 に示す。

Heat 群では、温熱刺激開始とともにヒラメ筋内温度は急激に上昇した。その後、10 分経過した以降も筋温は緩やかに上昇し、最終的に 34 ± 0.6 が 41.8 ± 0.3 まで上昇した。一方、Cont 群では 30 分間の処置中に緩やかな筋温の低下が観察された。

本実験で確認されたヒラメ筋内温度の変化は、先行研究により報告されている結果とも一致していたことから、我々の温熱刺激手法は妥当であると判断し、その筋の形態に対する効果を検証するため、実験 2 を実施した。

図 1



(2) 実験 2

温熱刺激の筋形態への効果

右後肢には坐骨神経切除手術を、左後肢にはその偽手術を施したラットを用いて、手術後 1 日~14 日の間に 2 日に 1 回の頻度で温熱刺激を施した。結果、Heat 群および Cont 群のどちらの個体でも偽手術脚のヒラメ筋の

湿重量は増加するとともに、神経切除脚のヒラメ筋の湿重量は低下した。しかし、この時 Heat 群の体重あたりのヒラメ筋湿重量は偽手術脚で 5%、神経切除脚で 12%、Cont 群に比べて高値を示した。また、筋線維横断面の解析結果(組織像、図 2、ヒストグラム、図 3)からも、偽手術脚および神経切除脚の両方において Heat 群のヒラメ筋には太い筋線維が多く存在していることが明らかになった。これらの結果は、間欠的に温熱刺激を負荷することにより、ヒラメ筋の成長に伴う筋肥大は促進され、神経切除に伴う筋萎縮は軽減されることを示している。

図 2

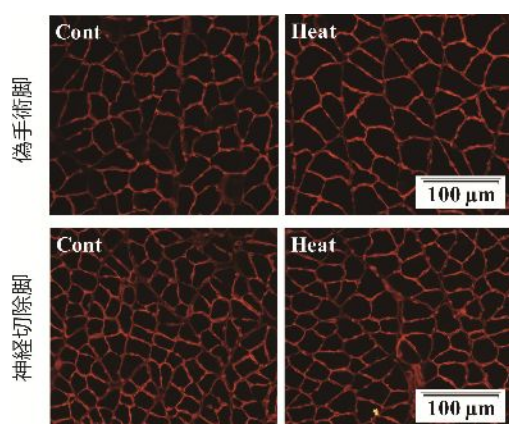
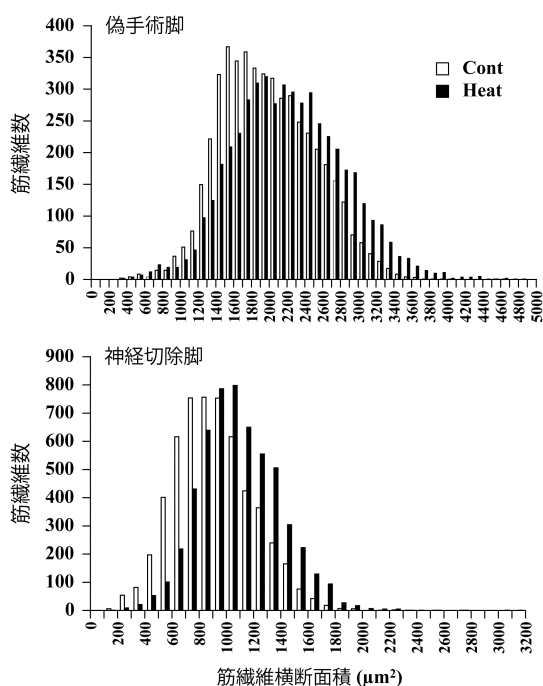


図 3



温熱刺激のタンパク質分解に関する細胞内シグナル伝達経路への効果

神経切除後 14 日が経過したヒラメ筋では、ユビキチン化されたタンパク質が顕著に増加しており、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の分解が亢進していることが確認された。しかし、神経切除後、間欠

的に温熱刺激を行うことにより、タンパク質のユビキチン化を担うユビキチンリガーゼのうち、Atrogin-1 の遺伝子発現の上昇が抑えられ、ユビキチン化タンパク質の増加もわずかに抑制されることがわかった。また、間欠的温熱刺激により神経切除筋における細胞の保護機能を有する 70-kDa heat shock protein (HSP70) や peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 (PGC-1) の減少が抑制されることも確認できた。これらのタンパク質は先行研究によりタンパク質分解の抑制にも寄与することが報告されていることから、上記の Heat 群で確認されたユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解の部分的な抑制にも関与している可能性は十分に考えられる。

一方、偽手術後 14 日が経過したヒラメ筋では、タンパク質分解系の活性はもともと低く保たれており、今回間欠的温熱刺激による影響は確認されなかった。

温熱刺激のタンパク質合成に関する細胞内シグナル伝達経路への効果

タンパク質の合成を正に制御する Akt-mTOR カスケードを構成するタンパク質のうち、中心的な役割を担う Akt についてリン酸化の程度(総タンパク質量あたりのリン酸化タンパク質)を評価することにより、温熱刺激によるタンパク質合成促進効果について検討した。結果、偽手術脚および神経切除脚の両方において温熱刺激による Akt の活性化は確認できず、本実験では温熱刺激とタンパク質合成の関係を明らかにすることはできなかった。

しかし、温熱刺激が Akt-mTOR カスケードを活性化することは先行研究により報告されていた。研究代表者はこの矛盾が生じた原因として、実験 2 では最後に温熱刺激を行ってから 24 時間が経過した骨格筋を解析対象としていたためである可能性を考慮し、温熱刺激終了直後のヒラメ筋で影響を確認する実験 3 を実施した。

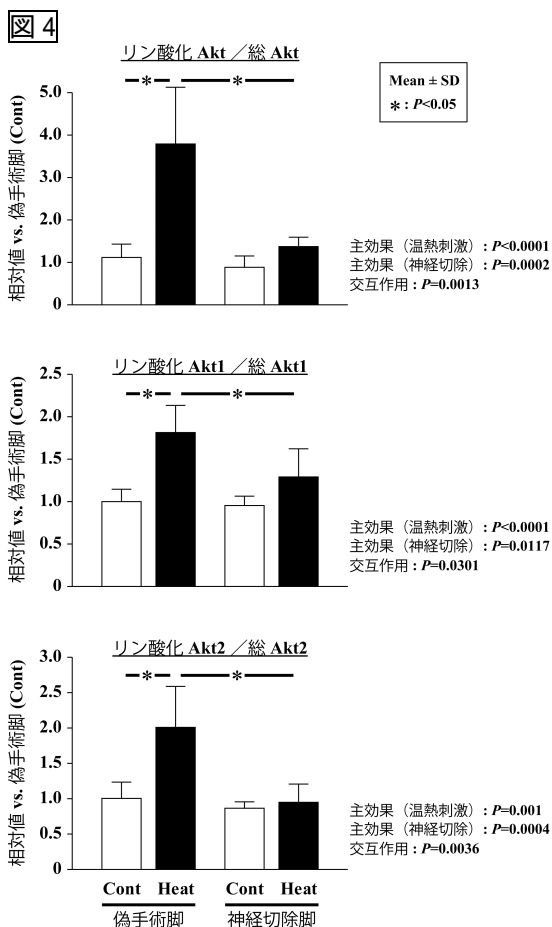
(3) 実験 3

温熱刺激が手術 1 日後のヒラメ筋における Akt-mTOR カスケードに及ぼす影響

温熱刺激直後に偽手術脚より摘出したヒラメ筋について、実験 2 と同様に Akt のリン酸化の程度(総タンパク質量あたりのリン酸化タンパク質)を評価した結果、温熱刺激により顕著にリン酸化 Akt が増加していることが確認できた(図 4)。また、Akt は 3 つのアイソフォームに分けられ、骨格筋内には Akt1 と Akt2 が発現し、それぞれ異なる機能にも関与していることが知られている。今回の実験では、温熱刺激直後には Akt1 および Akt2 の両方が活性化されることが明らかになった。

一方、神経切除脚より摘出したヒラメ筋で

は、上記の温熱刺激による Akt の活性化は有意に抑制された (図 4)。



温熱刺激が手術 14 日後のヒラメ筋における Akt-mTOR カスケードに及ぼす影響

温熱刺激に対して、手術の 1 日後のヒラメ筋で確認された応答 (上記) と同様の応答が手術後 14 日が経過したヒラメ筋においても確認された。温熱刺激によって偽手術脚のヒラメ筋において顕著に Akt (Akt1 および Akt2 の両方) のリン酸化が促された。しかし、この現象は神経切除筋では抑制された。

神経切除後 14 日が経過したヒラメ筋では、Akt の活性化にかかわる Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) の受容体である Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) の発現量は低下し、IRS-1 から Akt へのシグナル伝達を負に制御する Phosphatase and tensin homolog Deleted from chromosome 10 (PTEN) の発現量は増加していた。これらの結果から、神経切除後 14 日が経過したヒラメ筋は IGF-1 が関与する Akt の活性化が起りづらい状況にあると推察される。

しかし、神経切除後 1 日目のヒラメ筋では IRS-1 および PTEN の発現量は偽手術脚のヒラメ筋と顕著な差はなかったにもかかわらず、Akt のリン酸化が抑制された。したがって、温熱刺激による Akt の活性化には IGF-1 が関与する経路とは別の経路が関わっている可能性が示唆された。

(4) まとめ

間欠的に温熱刺激を行うことにより、神経支配が正常なヒラメ筋の肥大は促進され、神経支配が断られたヒラメ筋の萎縮は軽減されることを確認した。しかし、これらの効果は同一の分子メカニズムを介してもたらされたのではなく、神経支配が正常なヒラメ筋では温熱刺激の最中または直後から Akt-mTOR カスケードが活性化され、タンパク質の合成が亢進されることにより筋肥大が促された可能性が高い。一方、神経支配が断られたヒラメ筋では、温熱刺激により細胞の保護機能を有するタンパク質が減少するのが抑えられるとともに、タンパク質分解機構の活性化が軽減されることにより筋萎縮が軽減されたと考えられる。

坐骨神経切除脚のヒラメ筋では、温熱刺激による Akt-mTOR カスケードの活性化が顕著に抑制されたことから、温熱刺激は神経系を介して骨格筋の Akt-mTOR カスケードを活性化し、タンパク質合成を亢進させることが明らかとなった。したがって、神経支配が正常 (または軽微に傷害された程度) である骨格筋の萎縮モデルを用いた実験ではより大きな筋萎縮抑制効果が確認できる可能性が高いと考える。

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 0 件)

(学会発表)(計 6 件)

大平宇志, 神山慶人, 金子祐樹. 「宇宙飛行に伴う骨格筋の特性変化とその予防策の検討」. 第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会・日本宇宙生物科学会第 30 回大会 合同大会. 愛知医科大学 (愛知県、長久手市). 2016 年 10 月 15 日.

T. Ohira, M. Sudoh, Y. Kusakari, S. Minamisawa.

Effects of heat stimulus on skeletal muscle properties.

The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan.

Sapporo Convention Center (Sapporo, Hokkaido).

March 22, 2016.

大平宇志, 寺田昌弘, 須藤正道, 草刈洋一郎, 南沢享.

長期宇宙滞在に伴う宇宙飛行士の骨格筋機能低下に対する予防策として温熱刺激の有効性の検討.

平成 27 年度 筋生理の集い.

東京慈恵会医科大学 (東京都、港区). 2015 年 12 月 19 日.

大平宇志, 寺田昌弘, 須藤正道, 草刈洋一郎, 福田紀男, 南沢享.

温熱刺激に対するラットヒラメ筋の応

答.

第 132 回成医会総会.

東京慈恵会医科大学 (東京都、港区)

2015 年 10 月 8 日.

大平宇志, 寺田昌弘, 須藤正道, 草刈
洋一郎, 福田紀男, 南沢享.

温熱刺激が骨格筋量に及ぼす影響.

第 246 回生理学東京談話会.

東邦大学 (東京都、大田区).

2015 年 9 月 26 日.

Ohira T.

Responses of skeletal muscle to heat
stress.

The 11th World Congress of the
International Society for Adaptive
Medicine.

Yonago Convention Center (Yonago,
Tottori).

May 30, 2015.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大平 宇志 (OHIRA, Takashi)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機
構・有人宇宙技術部門・研究開発員

研究者番号 : 40633532