

博士論文

**温熱刺激による
骨格筋ミトコンドリアの量的制御**

**Quantitative regulation of skeletal muscle mitochondria
by heat stress treatment**

平成 27 年度

東京大学大学院 総合文化研究科

広域科学専攻 生命環境科学系 身体運動科学

31-137709

田村 優樹

目次

開示事項（倫理審査・利益相反・研究費助成）	4
略語一覧	5
序論	8
第1章：先行研究のまとめ	13
ミトコンドリアの基礎的理解	14
ミトコンドリアの構造	14
ミトコンドリアの骨格筋細胞内の局在	17
ミトコンドリアの役割	18
骨格筋のミトコンドリアの量を維持・増加させることの意義	22
ミトコンドリアの量的制御に関わる分子メカニズム	24
温熱刺激の基礎的理解	38
温熱刺激による生理的適応	38
第1章のまとめ	43
第2章：温熱刺激プロトコールの開発	44
緒言	45
検討課題1：温熱刺激装置の考案・制作、妥当性検証	47

温熱刺激装置の考案・制作	47
温熱刺激装置の温度制御の精度を評価	50
検討課題 2：温熱刺激方法の妥当性検証	53
検証項目	53
方法	55
結果	59
考察	63
第 2 章のまとめ	65
第 3 章：温熱刺激は持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応を増強するか？	66
緒言	67
方法	69
結果	76
考察	96
第 3 章のまとめ	106
第 4 章：交感神経による骨格筋ミトコンドリアの減少を温熱刺激が抑制するか？	107
緒言	108
方法	111
結果	121
考察	154
第 4 章のまとめ	166

第5章：統括論議	167
本研究で得られた知見のまとめ	168
本研究の学術的位置づけ - 温熱刺激の研究として	170
本研究の学術的位置づけ - ミトコンドリアの研究として	171
将来の展望：ミトコンドリアの量的制御から質的制御へ	174
スポーツ現場および臨床現場への応用・意義	177
結語	181
引用文献	182
謝辞	203

開示事項

動物実験に関する倫理審査

本研究のすべての実験は、東京大学教養学部・大学院総合文化研究科の実験動物委員会の承認を得てから遂行された。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反事項はない。

研究費助成

本博士論文の第4章に関する研究は、独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費助成事業 科学研究費補助金（特別研究員奨励費：26・9688）を受けて行われた。

略語一覽

4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

ACC: acetyl CoA carboxylase

ADP: adenosine diphosphate

AMP: adenosine monophosphate

AMPK: 5'-AMP-activated protein kinase

ATF: activating transcription factor

ATG: autophagy-related gene

ATP: adenosine triphosphate

ATP5A: ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit

BiP: binding immunoglobulin protein

BSA: bovine serum albumin

CaMK II: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

CHOP: C/EBP homologous protein

COX: cytochrome c oxidase

CS: citrate synthase

DNA: deoxyribonucleic acid

Drp1: dynamin-related protein 1

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ERR α : estrogen-related receptor alpha

FAT/CD36: fatty acid translocase cluster of differentiation 36

Fis1: mitochondrial fission 1

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GLUT: glucose transporter

GRP: glucose-regulated protein

HSF1: heat shock factor 1

HSP: heat shock protein

ICR: institute for cancer research

IRE-1 α : inositol-requiring enzyme 1 alpha

KAT: kynurenine aminotransferase

LC3: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEF: myocyte enhancer factor

Mfn: mitofusin

MOTS-c: mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c

mTORC1: mammalian (mechanistic) target of rapamycin complex 1

Mul1: mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide

NDUFB8: NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B8

NRF: nuclear respiratory factor

Opa1: optic atrophy 1

PCr: phosphocreatine

PDH: pyruvate dehydrogenase

PDK: pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase

PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PID: proportional-integral-derivative

PINK1: PTEN-induced putative kinase 1

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

PVDF: poly vinylidene difluoride

RNA: ribonucleic acid

ROS: reactive oxygen species

SDS: sodium dodecyl sulfate

SIRT1: sirtuin 1

SQSTM: sequestosome

TCA: tricarboxylic acid cycle

TFAM: mitochondrial transcription factor A

TIM: translocase of inner mitochondrial membranes

TOM: translocase of outer mitochondrial membranes

TRAP1: tumor necrosis factor receptor-associated protein 1

TTBS: tris buffered saline with tween 20

Ub: Ubiquitin

UCP: uncoupling protein

ULK1: Unc51-like kinase 1

UPR^{mt}: mitochondrial unfolded protein response

VDAC: voltage-dependent anion channel

YY1: Yin Yan 1

序論



ミトコンドリアは、エネルギー産生を担う細胞小器官である。糖や乳酸、脂肪酸といったエネルギー源は、ミトコンドリアで酸化され、生命活動に必要な ATP に変換される。近年では、ミトコンドリアは、アポトーシス（不良細胞の自殺）を誘導するほか、細胞内のイオン濃度の調節に関与することなど、新たな役割も明らかにされつつある。このような特徴から、ミトコンドリアは、生命活動の要と記述されることが多い。特に、ヒト生体の中で約 40% を占める最大の器官「骨格筋」のミトコンドリアは、運動能力や健康に深く関与している。

骨格筋のミトコンドリアの量 (mitochondrial volume) は、骨格筋の活動に応じて高い可塑性を示すことが知られている。1967 年に Holloszy により、持久的トレーニングは、骨格筋のミトコンドリアの量を増加させることが初めて明らかにされた (82)。現在までに多くの知見が蓄積され、骨格筋のミトコンドリアの量を増加させる最も効果的な手段は、運動・トレーニングであることに疑う余地はない。骨格筋のミトコンドリアの量の増加は、主に最大下運動時の運動持続時間の延長に貢献すると考えられている (83)。一方で、骨格筋のミトコンドリアの量は、身体活動量の低下や骨格筋の不活動によって減少することも古くから明らかとなっている (225)。近年では、ミトコンドリアの量の減少が、骨格筋萎縮といった骨格筋機能不全の原因となることが明らかにされつつある (23, 30, 168)。骨格筋は、運動器としての機能だけではなく、代謝器官・内分泌器官として、全身の恒常性維持に深く関与する (51)。このような生理的背景から、アスリートのみならず、一般人においても骨格筋のミトコンドリアの量を維持・増加させることが求められる。

上述の通り、骨格筋ミトコンドリアを増加させる手段として、持久的トレーニングが最も効果的である。しかし、6 週間の持久的トレーニングによって増加した骨格筋のミトコンドリアの量は、3 週間のトレーニング休止によってトレーニング前の水準に戻ることが示されている (224)。つまり、骨格筋のミトコンドリア量を高い水準で維持するためには、継続的に運動を実施する必要がある。競技スポーツ現場においては、障害予防やテーパリングといったコンディショニングの観点から、常に高強度・高運動量のトレーニングを実施できるわけではない (148)。一方、一般人においても

多忙による時間的制約から十分な運動時間を確保することは困難である (70,214)。さらに、高齢者や患者といった低体力者や、脊髄損傷といった神経損傷患者は、運動に参加することが不可能であるケースも少なくない。上述の通り、身体活動の低下に伴う骨格筋の不活動は、ミトコンドリア量の減少やそれに伴う骨格筋萎縮の原因となる。実際に、骨格筋不活動を余儀なくされた脊髄損傷患者においては、骨格筋萎縮が病因となる糖尿病や慢性炎症性疾患、骨代謝異常症が臨床上の大きな問題として捉えられている (19,171)。したがって、①効果的・効率的に骨格筋のミトコンドリア量を増加させるトレーニング方法や、②持久的トレーニングの代替として、ミトコンドリア量の維持が期待できるリハビリテーション方法の開発が社会・臨床から強く望まれている。上述の問題を解決する手段として、本研究では「温熱刺激」の可能性に着目した。

我々日本人は、温泉やサウナを好み、身体を温めることが健康に良いと古くから考えてきた。また、医療現場においても、温熱療法がリハビリテーションの分野で広く利用されている。このように温熱刺激は、様々な形で現在利用されているが、これらの効果は経験的に確かめられたものが多く、必ずしも科学的根拠が明らかではない。これまでの温熱刺激に関する研究は、温熱刺激が骨格筋タンパク質合成に与える影響について広く検討されてきた歴史がある。一方で温熱刺激は、2型糖尿病患者の高血糖状態を改善するといった報告や (85)、加齢あるいは高脂肪食による脂肪の蓄積やインスリン抵抗性を改善することが動物実験で明らかにされている (75,76)。これらの先行研究は、温熱刺激がエネルギー代謝にも様々な影響を及ぼす可能性を示唆するが、詳細については不明な点が多く残されている。最近では、培養細胞に温熱刺激を与えると、ミトコンドリアの量が増加することが明らかにされている (125)。生体においても温熱刺激が骨格筋のミトコンドリアを増加させるか否かは、これまでに検討された例はない。しかし、この報告は、温熱刺激を応用することで、効果的なトレーニング方法やリハビリテーション方法が開発できる可能性を示唆する。また、温熱刺激は、古典的な治療法であり、基礎研究で温熱刺激の有効性が確かめられた場合、速やかに臨床への橋渡しが行える可能性が高い。この点も本研究で温熱刺激に着目した理由のひとつである。

本論文の目的

本博士論文では、温熱刺激を活用したトレーニング方法やリハビリテーション方法の開発を目指して、生体の骨格筋ミトコンドリア量を維持・向上させる新規手段として温熱刺激が有効であるか否かを明らかにすることが主目的である。この目的を達成するために、下記の5つの検討課題を設定した。

本論文の構成

第1章

ミトコンドリア量を制御する機構および温熱刺激による骨格筋適応について、これまでに得られている研究分野の知見を整理し概説した。

第2章

先行研究では、温熱刺激中の麻酔処置は、マウスの正常な体温調節機能を阻害することが問題点として指摘されている。そこで本研究では、麻酔処置を必要としない温熱刺激方法の考案・開発に取り組み、その妥当性の検証を行った。

第3章

効果的なトレーニング方法の開発を目指すといった観点から、「運動後の温熱刺激は、持続的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応を相加的あるいは相乗的に増強するか否か」を明らかにした。さらに、分子メカニズムの解明を目指して、温熱刺激がミトコンドリア生合成機構に与える影響を評価した。

第4章

効果的なリハビリテーション方法の開発を目指すといった観点から、「骨格筋の脱神経支配によるミトコンドリアの減少を温熱刺激が抑制するか否か」を明らかにした。また、分子メカニズムの解明を目指して、脱神経支配骨格筋に対する温熱刺激が、ミトコンドリア生合成および分解機構に与える影響を評価した。

第5章

本研究で得られた知見をまとめ、学術的および臨床的位置づけや将来的展望を中心に論議した。

本論文の関連論文

本博士論文は、下記の生理学専門誌に掲載された原著論文を基に、改訂・加筆したものである。

1. **Yuki Tamura**, Yutaka Matsunaga, Hiroyuki Masuda, Yumiko Takahashi, Yuki Takahashi, Shin Terada, Daisuke Hoshino, Hideo Hatta.
Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle
American Journal of Physiology: Regulatory Integrative Comparative Physiology 307: R931–R943, 2014.
2. **Yuki Tamura**, Yu Kitaoka, Yutaka Matsunaga, Daisuke Hoshino, Hideo Hatta.
Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle
The Journal of Physiology 593: 2707-2720, 2015.

第1章

先行研究のまとめ



ミトコンドリアの基礎的理解

ミトコンドリア（単数：Mitochondrion, 複数：Mitochondria）は、多くの真核細胞に存在する細胞小器官である。ミトコンドリアという名称は、ギリシア語の「mitos ; 糸」と「chondrion ; 粒」に由来する。ミトコンドリアは、核 DNA とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) を保持する点が、他の細胞小器官と決定的に異なる点である (153)。mtDNA には、37 個の遺伝子（呼吸鎖複合体のサブユニットが 13 個、tRNA が 22 個、rRNA が 2 個）がコードされている (10)。ミトコンドリアは、エネルギー産生を担うことが中心的な役割として考えられてきたが、近年では細胞内の情報伝達や、細胞内の恒常性維持などにも重要な働きを担うことが明らかとされつつある。ここでは、①ミトコンドリアの構造、②ミトコンドリアの役割について概説する。

ミトコンドリアの構造

外膜

ミトコンドリアは、外膜や膜間腔、内膜、マトリックスから構成される。ミトコンドリアの外膜は、タンパク質とリン脂質によって構成されている (図 1-1)。外膜には Porin / VDAC と呼ばれる膜貫通タンパク質が局在しており、分子量 5000 以下のタンパク質は拡散によってミトコンドリア内へ取り込まれる (6)。より大きな分子量のタンパク質は後述の選択的タンパク質輸送機構によってミトコンドリア内へ輸送される。ミトコンドリアの外膜には、ミトコンドリアのタンパク質輸送、ミトコンドリアの形態変化（融合・分裂）に関わるタンパク質などが局在している。ミトコンドリア外膜は、小胞体と構造的に密接しており、小胞体によるカルシウム濃度制御や脂肪酸輸送を協働的に制御することが示唆されている。

膜間腔

膜間腔とは、ミトコンドリアの外膜と内膜との間の空間を指す。上述の通り、ミトコンドリアの

外膜はグルコースやイオンといった低分子を透過する。一方で、内膜は透過性が低いため、膜間腔の環境は細胞質と同等であると考えられている (6)。一方で、高分子量のタンパク質は、選択的にミトコンドリア内へ輸送されるためその限りではない。また、膜間腔には、シトクロム C と呼ばれる可溶性ヘムタンパク質が局在することも特徴である。シトクロム C は、電子伝達系の構成要素でありエネルギー産生において重要な役割を果たす。また、シトクロム C が、細胞質へ放出されると、アポトーシス (タイプ1 プログラム細胞死) が誘導される (46)。

内膜

外膜と同様にタンパク質とリン脂質で構成され、膜重量の 70-80%を占めると考えられている。ミトコンドリアの内膜は、外膜とは対照的に、膜の透過性が低くイオンを通さない。これは、ミトコンドリア内膜に局在する **Cardiolipin** と呼ばれるリン脂質による (6)。ミトコンドリアの内膜には、ATP 産生に関わる呼吸鎖複合体、膜間腔からミトコンドリア・マトリックスへの双方向のタンパク質輸送体、ミトコンドリア形態 (融合・分裂) に関わるタンパク質などが局在する。ミトコンドリア内膜は、ひだ状に内側に入り込んだ構造をとる (134)。この構造は、クリステと記述される。このクリステ構造によって内膜の表面積が増大することから、ATP 合成能力の上昇といった利点があると考えられている。

マトリックス

ミトコンドリア・マトリックスは、ミトコンドリアの内膜に囲まれた部分を指す。マトリックス部分には、高濃度な水溶性タンパク質が存在し、ミトコンドリア全タンパク質の 60-70%に相当すると考えられている (6)。マトリックスは、TCA 回路や β 酸化に関わる酵素や、mtDNA、ミトコンドリア局在型リボソームや tRNA、転写因子が存在する。

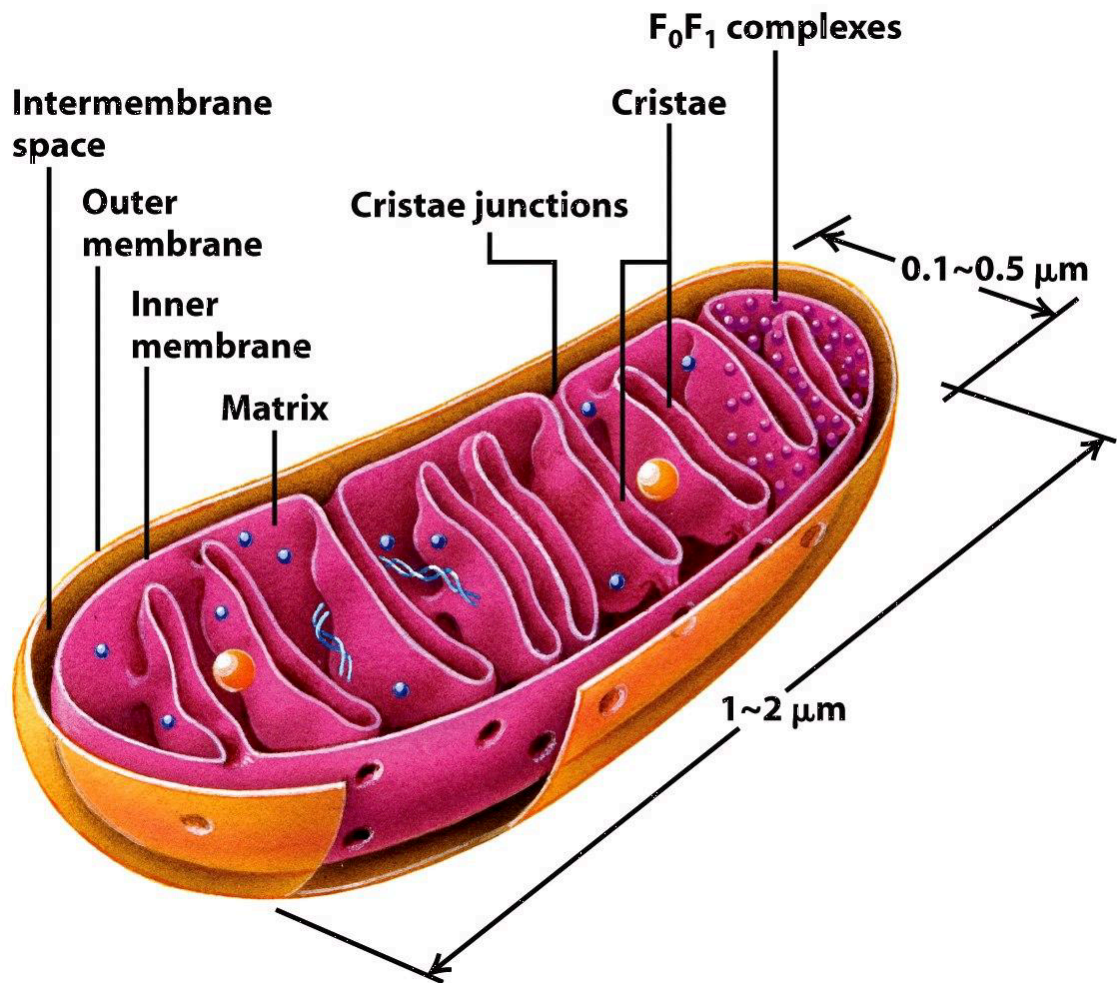


図 1-1. ミトコンドリアの構造

Outer membrane: 外膜, Intermembrane space: 膜間腔, Inner membrane: 内膜, Criste: クリステ, Matrix: マトリックス
画像出典元: *Molecular Cell Biology, Sixth Edition, 2008.*

ミトコンドリアの骨格筋細胞内の局在

骨格筋のミトコンドリアは、2つの異なる局在が特徴的である。骨格筋のミトコンドリアは、筋鞘下 (SS) ミトコンドリアと筋原線維間 (IMF) ミトコンドリアに大別される (図 1-2) (86)。骨格筋ミトコンドリアのうち、筋鞘下ミトコンドリアは約 20%を占め、筋原線維間ミトコンドリアは約 80%を占める (86)。筋鞘下ミトコンドリアおよび筋原線維間ミトコンドリアは機能面での違いが示されている。筋原線維間ミトコンドリアは、筋鞘下ミトコンドリアと比較して、呼吸鎖複合体を構成するタンパク質の発現量が多く、実際に呼吸能力が高い (54, 178)。このような特徴から、筋原線維間ミトコンドリアは、骨格筋収縮に必要な ATP 供給に特化していると考えられている (182)。一方の筋鞘下ミトコンドリアは、筋細胞膜の機能、細胞内の情報伝達を維持するための ATP 供給に特化していると考えられている (84, 182)。ところで、運動トレーニングや骨格筋の不活動によるミトコンドリア量の増減は、筋原線維間ミトコンドリアと比較して、筋鞘下ミトコンドリアのほうが、高い応答性を示すことが明らかとなっている (2, 21, 111)。なお、本研究では、筋鞘下ミトコンドリアと筋原線維間ミトコンドリアを生化学的分析において区別することは困難であるため、骨格筋内のすべてのミトコンドリアを対象に分析を行った。

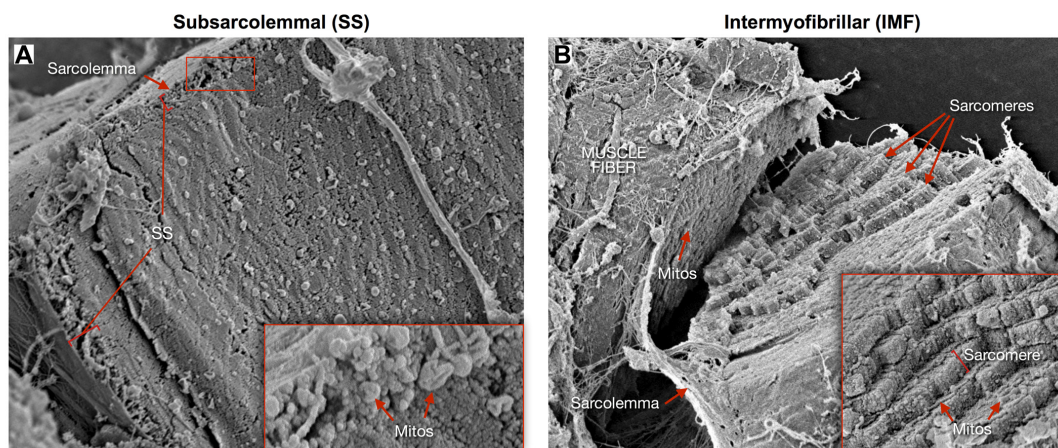


図 1-2. 筋鞘下 (SS) ミトコンドリア (左) と筋原線維間 (IMF) ミトコンドリア (右)

Sarcolemma: 筋鞘, SS: 筋鞘下, Mitos: ミトコンドリア, Musclefiber: 筋線維

写真出典元: Picard et al., *J Appl Physiol*, 2013.

ミトコンドリアの役割

ミトコンドリアは、様々な生理機能を有する細胞小器官であり、生命活動の要と記述される。ここでは、ミトコンドリアの代表的な役割である、①エネルギー産生、②アポトーシス、③細胞内の Ca^{2+} 濃度の調節、④内分泌機能について概説する。

エネルギー産生

ミトコンドリアの最大の役割は、エネルギー産生である。TCA 回路および呼吸鎖複合体の電子伝達系（酸化的リン酸化）により生命活動に必要なエネルギーを得る。それぞれのエネルギー産生機構について以下に概略を示す。

TCA サイクル (図 1-3)

解糖系により生成された代謝産物ピルビン酸は、ミトコンドリアの酵素であるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) によってアセチル CoA に変換される。一方で、脂肪酸は、 β 酸化によりアセチル CoA に変換される。このように、アセチル CoA は、異なるエネルギー源のハブであり、TCA 回路の基質として利用される。TCA 回路により、1 分子のアセチル CoA から 3 分子の NADH および 1 分子の FADH_2 が最終的に生成される。なお、これら一連の反応は、ミトコンドリアのマトリックスで行われる。なお、TCA サイクルは、1937 年に生化学者 Krebs により発見された (110)。この成果により、Krebs は 1951 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。

酸化的リン酸化 (図 1-4)

TCA 回路で生成された NADH と FADH_2 は、ミトコンドリア内膜に局在する呼吸鎖複合体 I または複合体 II へ電子を伝達する。NADH または FADH_2 から電子を受け取った複合体 I・II は、ユビキノンへ電子を伝達する。その後、複合体 III、シトクロム C、複合体 IV の順に電子が伝達され

る。最終的に酸素に電子が伝達され水が生成される。なお、複合体を電子が経由する際に H^+ がミトコンドリア・マトリックスからミトコンドリア膜間腔に放出される（複合体 II を除く）。膜間腔に放出された H^+ はプロトン勾配を利用して、ATP 合成酵素を経由し再びマトリックス内に取り込まれる。その際に ATP 合成酵素の駆動力により ADP と P_i から ATP が合成される。なお、酸化的リン酸化の速度は、細胞内の ADP 濃度によって制御される。酸化的リン酸化によるエネルギー産生機構は、1930 に Engelhardt により発見された (52)。

熱産生

ミトコンドリアは、エネルギーだけではなく熱を産生する細胞小器官として知られている。上述の通り、ミトコンドリアの内膜に H^+ の濃度勾配を形成し、最終的に ATP が合成される。通常、 H^+ 濃度勾配と ATP 合成は密に共役している。しかし、 H^+ の電気化学的差として蓄積した余剰なエネルギーを短絡的に解消する機構も備えている。膜間腔に蓄積した H^+ は、脱共役タンパク質 (UCP) と呼ばれるミトコンドリア内膜貫通型のタンパク質によってミトコンドリア・マトリックスに戻される (183)。 H^+ 濃度勾配として蓄積したエネルギーは、最終的に熱に変換され放出される。UCP は、5つのアイソフォームが同定されており、骨格筋には UCP2 や UCP3 が発現している (197)。なお、UCP は、寒冷刺激や食事によるノルアドレナリン分泌に応答して活性化する (183)。

アポトーシス (タイプ I プログラム細胞死)

アポトーシスとは、生体を健全な状態に保持するために引き起こされる、いわゆる細胞の自殺である。癌化した細胞や異常な細胞は、アポトーシスによって取り除かれている。アポトーシスは、上流の Caspase (initiator caspase) が下流の Caspase (effector caspase) を切断 (=活性化) することで階層的に制御されている (27, 34)。ミトコンドリアは、アポトーシスの司令塔としての役割をもつ。DNA の損傷や、細胞内・ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度の上昇に応答して、ミトコンドリアの

膜間腔から細胞質へシトクロム C が放出される (46)。細胞質に漏出したシトクロム C に応答して、Caspase9、Caspase3 が順番に切断 (=活性化) されアポトーシスが誘導される。このようにミトコンドリアは、不良細胞を除去することで細胞の恒常性維持に積極的に関与している (74)。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節

細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化は、様々な細胞応答・適応を惹起するシグナルである。細胞内の Ca^{2+} の濃度は、細胞内最大の Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体によって制御されている (106)。しかし、ミトコンドリアも、一時的に Ca^{2+} を貯蔵することが可能であり、細胞内の Ca^{2+} 濃度を変化させる。ミトコンドリアは、小胞体と比較して迅速に Ca^{2+} を取り込み、放出することができることから、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化の緩衝剤としての役割をもつ (43)。近年では、ミトコンドリア-小胞体間の Ca^{2+} 濃度調節連携の破綻が骨格筋萎縮の原因となる可能性も示唆されている (55, 234)。

内分泌小器官としてのミトコンドリア

ミトコンドリアが内分泌機能を有していることが明らかにされつつある。mtDNA の 12S rRNA 領域にコードされている新規ペプチド MOTS-c が同定された (117)。MOTS-c は、ミトコンドリア分泌型のホルモン様物質 (Mitokine) で、AMPK の活性化および PGC-1 α の増加に貢献する (117)。なお、MOTS-c は、特に骨格筋で作用し、高脂肪食による糖代謝異常を抑制することが報告されている。さらに、MOTS-c は、長寿に関わるとされる SIRT1 の活性・発現量を正に制御することも報告されている (117)。また、MOTS-c 遺伝子には、一塩基多型が存在し、日本人はスペイン人と比較して 14 番目のアミノ酸 (1382-1384) がリジン (AAA) からグリシン (CAA) に置換されている (61)。この遺伝子多型が日本人の長寿と関連する可能性も示唆されている (61)。これらの MOTS-c に関わる知見は、老齢学分野における学説「ミトコンドリアが寿命を制御する」を発展させる可能性があり、今後更なる理解が期待されている。

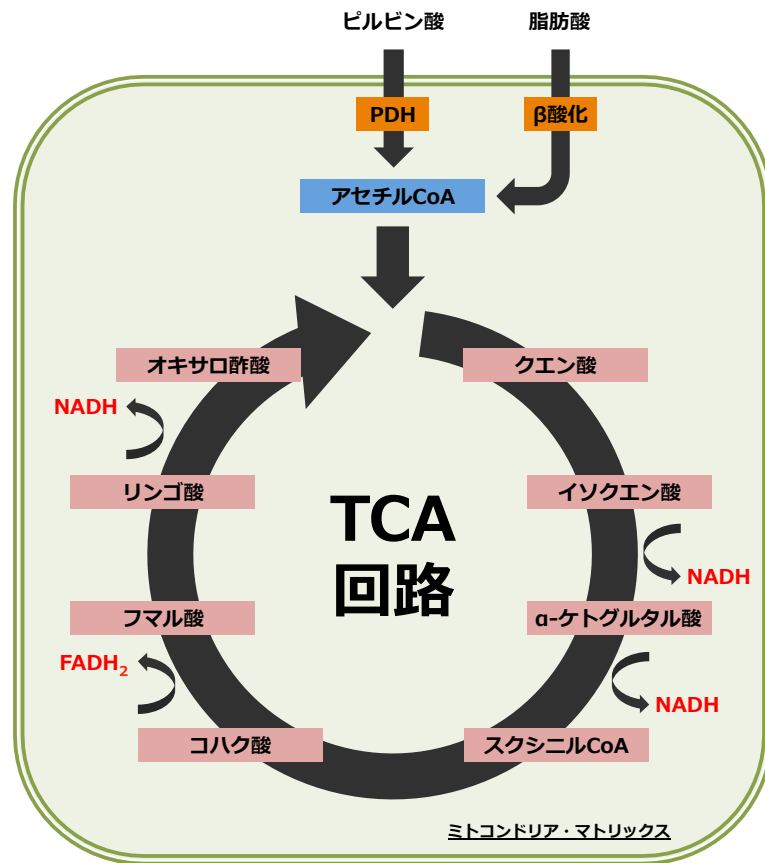


図 1-3. ミトコンドリア TCA 回路の概略図

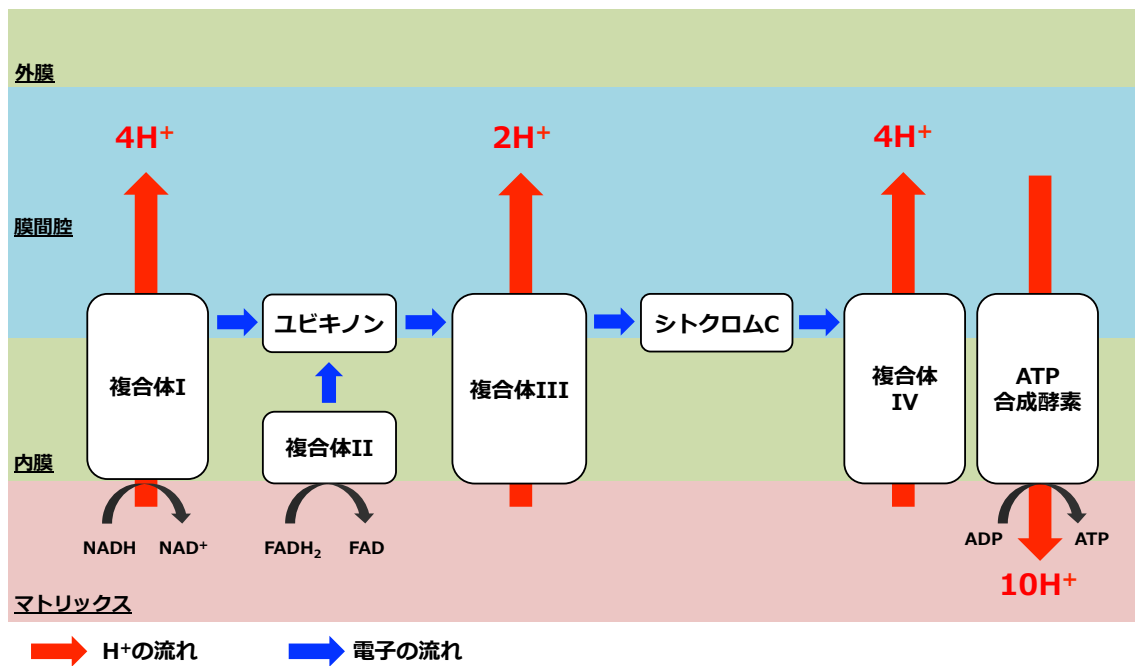


図 1-4. ミトコンドリア電子伝達系の概略図

骨格筋のミトコンドリア量を維持・増加させることの意義

持久的運動能力向上への貢献

持久的運動能力は、大きく2つの因子により規定される。最大酸素摂取量と骨格筋のミトコンドリア量・最大酸化能力である(18)。最大酸素摂取量は、心肺機能や酸素の運搬能力により決定される(18)。心肺機能や酸素運搬能力の向上により、骨格筋が利用できる酸素の最大容量が増加する。つまり、最大酸素摂取量の増加は、最大運動能力の向上に貢献する。なお、骨格筋のミトコンドリア量の増加は、最大酸素摂取量の上昇にはほとんど貢献しないと考えられている(83)。骨格筋のミトコンドリア量の増加は、むしろ最大下運動時の運動持続時間の延長に貢献すると Holloszy と Coyle は主張している(83)。骨格筋収縮により、ATP や PCr が利用されると、細胞内の ADP や AMP、Pi 濃度が上昇する。ATP の需要量は、運動強度により決定される。ADP の濃度の上昇に応答して、ミトコンドリアの電子伝達系による ATP 合成が促進される。つまり、ATP や ADP、AMP、Pi の濃度は、運動強度およびミトコンドリア量で決定される。一方で、細胞内の AMP や ADP、Pi 濃度の上昇は、骨格筋のグリコーゲン分解を促進し、ATP は骨格筋のグリコーゲン分解を抑制することが知られている。つまり、ミトコンドリア量の増加は、相対的な運動強度を低下させ、運動中の最も重要なエネルギー源であるグリコーゲンの節約に貢献する。このような機序によって骨格筋のミトコンドリア量の増加が、運動持続時間の延長に貢献する。この主張を支持するように、骨格筋のミトコンドリア量と持久的運動能力、骨格筋のミトコンドリア量と運動後の骨格筋・肝臓のグリコーゲン残量は、高い相関関係にあることが示されている(57)。

骨格筋・全身の健康への貢献

骨格筋のミトコンドリア量の維持は、骨格筋の健全度維持にとって重要な働きを担うことが明らかにされつつある。例えば、ミトコンドリア量の減少は、骨格筋萎縮の原因となることが示されている(23, 30, 168)。具体的には、①骨格筋不活動によって骨格筋萎縮が誘導されるよりも前に、ミト

ミトコンドリアの量が減少し、酸化能力が低下すること (137)、②ミトコンドリア分解を制御するタンパク質 (Parkin や Muf1) を骨格筋で欠損させることで、坐骨神経切除によるミトコンドリア減少および骨格筋萎縮が抑制されること (62, 129)、③ ミトコンドリア生合成のマスター遺伝子である PGC-1 α (後述) を骨格筋で過剰発現させることで、後肢懸垂や坐骨神経切除による骨格筋萎縮が抑制されることが挙げられる (31, 189)。骨格筋の萎縮は、日常生活動作に支障をきたし、特に転倒や骨折のリスク上昇、自立性の低下など様々な臨床・社会問題に繋がる (186, 145)。

一方で、ヒト生体最大の代謝器官としての骨格筋の働きにも注目する必要がある。骨格筋は、循環中のグルコースの約 80%を代謝する最大のグルコース処理器官である (45)。したがって、骨格筋の機能不全や骨格筋量の減少は、糖尿病のリスクを高めると考えられる。実際に疫学調査においても、骨格筋量とインスリン抵抗性の指標の間に負の相関関係が認められている (201)。また、ストレス性の抑うつ物質であるキヌレニンが、骨格筋のキヌレニンアミノ基転移酵素 (KAT) で分解されることも近年明らかにされている (3)。つまり、骨格筋量を高く保持することは、潜在的に健全なメンタルヘルスの維持にも貢献すると期待される。

さらに近年では、内分泌器官としての骨格筋の働きが注目の的となっている。骨格筋からホルモン様の低分子ペプチド (マイオカイン) が分泌されることが明らかにされている。例えば、Irisin や Meteorin-like などのマイオカインは、エネルギー貯蔵型の白色脂肪組織に作用し、エネルギー利用型の性格を付与する (browning ; ベージュ化) (25, 174)。脂肪組織のベージュ化は、エネルギー消費を増大させることから、肥満・糖尿病の新規治療標的として期待されている。

上述のように、骨格筋は、単なる運動器としてだけではなく、代謝器官・内分泌器官として全身の恒常性維持に貢献する。骨格筋による健康増進効果の恩恵を最大限に受けるためには、単位骨格筋あたりの機能向上に加えて、骨格筋量を高く保つことが必要である。したがって、骨格筋のミトコンドリアの量を維持することは、骨格筋量・機能の維持といった観点から高い臨床的意義がある。

ミトコンドリアの量的制御に関わる分子メカニズム

ミトコンドリアの量は、ミトコンドリア生合成およびミトコンドリア分解とのバランスで決定される。ここでは、ミトコンドリア量の制御機構について概説する。

ミトコンドリア生合成

研究分野において、ミトコンドリア量の増加は、一般に「ミトコンドリア生合成 (mitochondrial biogenesis)」と記述される。ここでは、ミトコンドリア生合成の過程を、①ミトコンドリア関連遺伝子の転写制御、②ミトコンドリア関連遺伝子の翻訳・タンパク質合成機構、③翻訳後修飾・プロセッシング段階の3つに分けて概説する。

ミトコンドリア関連遺伝子の転写制御

ミトコンドリアは、独自のDNAを保持している。しかし、ミトコンドリアのDNAには、電子伝達系に関わる13個のDNAがコードされているのみである。一方で、核DNAには、ミトコンドリア酵素や転写因子といったより多くの遺伝子がコードされている。したがって、ミトコンドリアの生合成のためには、核とミトコンドリアの協同的な転写制御が重要となる。

PGC-1 α は、褐色脂肪における熱産生関連遺伝子の発現を調節するタンパク質として同定された(169)。このPGC-1 α は、DNAに直接結合する転写因子としての働きを持たず、ミトコンドリア関連遺伝子の転写因子(例: NRF1/NRF2, ERR α , PPARs)と結合し転写を促進する転写補助因子として機能することが特徴である。近年では、PGC-1 α は選択的スプライシングを受け、複数のアイソフォームが存在することが報告されている(136)。本研究で取り扱うPGC-1 α は、ミトコンドリア生合成に関与するPGC-1 α 1 (Full-length; 797 amino acids)を指す。これまでに、骨格筋のミトコンドリアの転写制御においても、転写共役因子であるPGC-1 α が重要な働きを担うことが明らかにさ

れてきた。例えば、①PGC-1 α を欠損したマウスは、野生型マウスと比較して、骨格筋ミトコンドリアの量が少ないこと (119)、②骨格筋の PGC-1 α を過剰発現するとミトコンドリアの量が増加することが明らかにされている (124)。さらに、持久的運動によって PGC-1 α が活性化・増加することも示されている (164, 211)。これらの報告により、持久的運動・トレーニングによるミトコンドリア適応において、PGC-1 α が重要な役割を担っていることが伺える。運動などによって PGC-1 α が活性化すると、細胞質から核内へ移行し、ミトコンドリア関連遺伝子の転写因子と協働してミトコンドリア遺伝子の転写を促進する (187)。さらに、活性化した PGC-1 α は核だけではなく、ミトコンドリアへも移行することが明らかにされている (187)。ミトコンドリアに移行した PGC-1 α は、mtDNA にコードされている遺伝子の転写因子である TFAM と結合・協働し、転写を促進する (72, 199)。したがって、たとえミトコンドリアのタンパク質が、核 DNA および mtDNA の両方にコードされていたとしても、PGC-1 α の活性化により偏りなくミトコンドリアの遺伝子の転写が促進されるものと考えられる。

PGC-1 α によるミトコンドリア関連遺伝子の転写促進は、PGC-1 α の発現量だけではなく、リン酸化修飾やタンパク質の安定性、細胞内局在などの翻訳後の修飾によっても調節される (237)。ここでは、PGC-1 α の発現量・活性調節に関わる細胞内情報伝達経路である AMPK, p38 MAPK, mTORC1 について概説する (図 1-5, 図 1-6)。

AMPK は、ヘテロ三量体 (α 、 β 、 γ サブユニットから構成) のタンパク質キナーゼである。AMPK のサブユニットには、複数のアイソフォームが同定されている ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$)。骨格筋収縮時は、細胞内に蓄積した ADP や AMP は、AMPK の γ サブユニットに結合し、AMPK の立体構造を変化させる。続いて、AMPK の α サブユニットが露出・Thr172 がリン酸化 (=活性化) される (233)。また、グリコーゲンの貯蔵量は、AMPK の負の制御因子である可能性が示唆されて

いる。その根拠となる報告として、①AMPK の β サブユニットには、グリコーゲン結合部位が存在することや (165)、②グリコーゲン・ローディングは、AICAR (AMPK の活性化剤) や骨格筋収縮による AMPK の活性化を減弱させることが挙げられる (48, 227)。したがって、AMP や ADP の上昇やグリコーゲンの低下によって活性化する特徴から、AMPK は低エネルギー状態を感知するセンサーとして記述されることが多い。AMPK は、PGC-1 α をリン酸化 (Thr177・Ser538) させることで活性化させる (94)。AMPK を薬理的に活性化させると、PGC-1 α の活性化や発現量増加を伴って、ミトコンドリア量が増加することが報告されている (59, 203, 210)。さらに、近年では、核内やミトコンドリア内へ PGC-1 α が移行するためには、AMPK の活性化が必要である可能性も示唆されている (199)。

PGC-1 α の活性や発現は、細胞内ストレスのセンサーとしての役割をもつ p38 MAPK によっても制御される。p38 MAPK は、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) に属し、細胞の分化、炎症応答など様々な細胞プログラムを制御する。p38 MAPK は、4つのアイソフォームが発見されている ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) (175)。p38 MAPK は、他の MAPK と同様に、浸透圧変動ストレス、力学的ストレス、酸化ストレスの上昇に応答してリン酸化 (=活性化) することが知られている (95)。ところで、骨格筋収縮に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇も PGC-1 α の増加やミトコンドリア増加に関与することが示されている (230)。しかし、この Ca^{2+} 蓄積による PGC-1 α の増加効果は、細胞内の Ca^{2+} のセンサーである CaMK II および p38 MAPK の活性化を介することが示されている (229)。これらの知見は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、p38 MAPK を間接的に活性化させることを示している。活性化した p38 MAPK は、転写因子である ATF2 および MEF2 をリン酸化し、活性化する (238)。ATF2 および MEF2 は、PGC-1 α の転写因子として、PGC-1 α の発現量を正に制御する。ところで、タンパク質の半減期が 2-3 時間であることから、PGC-1 α は比較的不安定・短寿命なタンパク質であると考えられている (184)。しかし、p38 MAPK によって PGC-1 α がリン酸化 (Thr262・Ser265・

Thr298)されると、PGC-1 α のタンパク質の安定性が向上する(4, 169)。つまり、p38 MAPKはPGC-1 α の発現量増加を誘導すると同時に、PGC-1 α のタンパク質の安定性を向上させることでもミトコンドリア生合成に貢献すると考えられる。実際に、骨格筋でp38 MAPKを薬理的・遺伝子工学的に不活性化した場合、PGC-1 α の活性および発現量が減弱することが示されている(5)。

mTORは、細胞内・外の情報伝達を統合するタンパク質キナーゼである。mTORは、主に細胞代謝や細胞増殖、細胞生存に関与する。mTORの名称は、mTORの阻害薬(Rapamycin)の標的分子として、発見されたことに由来する(Mammalian target of rapamycin)。しかし近年では、mTORの多彩な生理機能の発見を受けて、Mechanistic target of rapamycinと記述されることもある。mTORは、2つの複合体(mTORC1・mTORC2)を構成することが知られている(113)。ここでは、骨格筋における生理機能がより検討されているmTORC1について概説する。mTORC1は、mTORを含めて5つのタンパク質から構成される複合体である(113)。mTORC1の活性化は、①インスリンや成長因子、成長ホルモンによりPI3K/PDK1/Aktを介して活性化される経路(22, 88)、②必須アミノ酸のひとつであるロイシンによりSestrin2を介して活性化される経路(228)、③力学的負荷によりERK1/2を介して活性化される経路(141)により誘導される。このような特徴から、mTORC1は、レジスタンス運動・トレーニングによるタンパク質合成活性化・骨格筋肥大に中心的な役割を果たすと考えられている(14, 158)。

一方で、近年では、mTORC1がミトコンドリア機能・量にも影響を与えることが示されている。例えば、mTORC1を薬理的に阻害すると、ミトコンドリアの機能不全(膜電位の破綻、酸素消費量の低下、ATP産生能力の低下)が誘導されることが明らかにされている(193)。さらに、mTORC1の複合体構成要素のひとつであるRaptorを骨格筋で欠損させると(≒mTORC1の機能不全)、ミトコンドリア関連遺伝子のmRNAの発現レベルが低下することが報告されている(44)。一方で、遺伝子工学的にmTORC1を活性化させると、PGC-1 α のmRNA・タンパク質発現量が増加し、ミトコ

ンドリアの量が増加する (44, 109)。また、mTORC1 を活性化させる因子であるインスリンを連続的に循環させることで、骨格筋で PGC-1 α の遺伝子発現量が増加することが報告されている (17)。したがって、これらの研究は、mTORC1 がミトコンドリアの量を転写レベルで制御していることを示すものである。mTORC1 によるミトコンドリア遺伝子の転写制御の分子メカニズムとして、mTORC1 は、転写因子 YY-1 および PGC-1 α と協働してミトコンドリア関連遺伝子の発現量を制御することが示されている (44)。

上述のように、PGC-1 α は、骨格筋のミトコンドリア生合成に重要な働きを担うことから、PGC-1 α の活性や発現の調節機能について様々な検討が重ねられてきた。しかし、PGC-1 α を骨格筋で欠損させても、持続的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加が完全に消失するわけではない (119)。したがって、持続的トレーニングによるミトコンドリア生合成を検討する際には、PGC-1 α 以外の経路についても注意を払う必要がある。

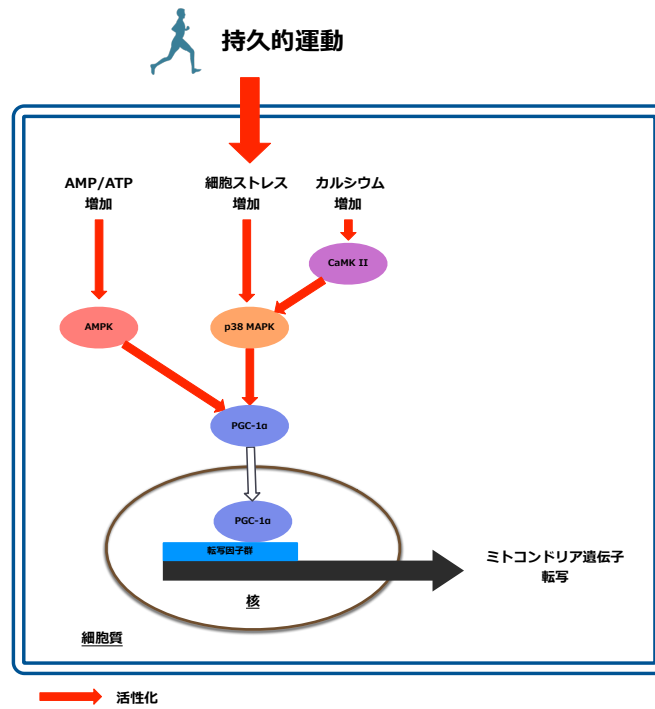


図 1-5. 持久的運動によって促進されるミトコンドリア遺伝子の転写に関わる細胞内情報伝達経路

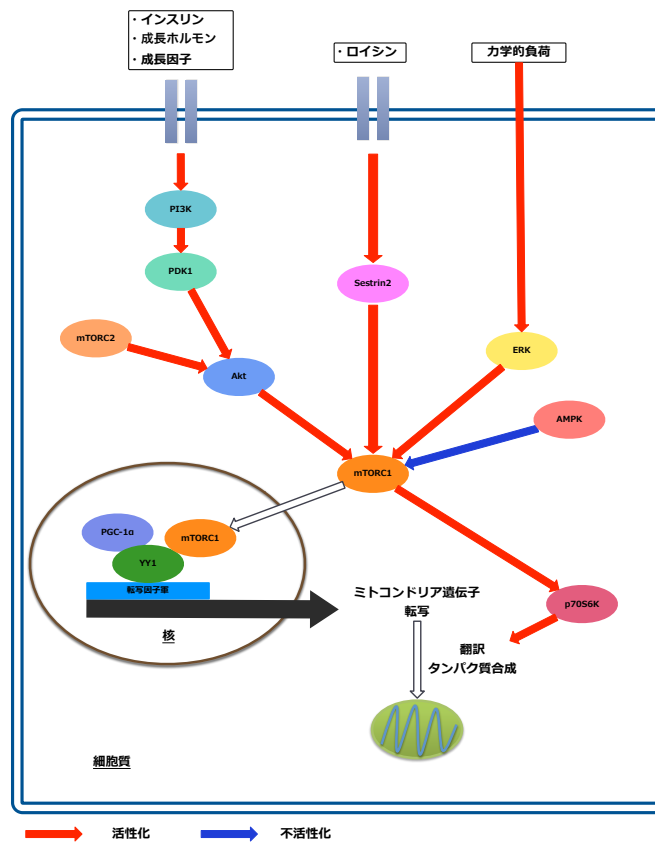


図 1-6. mTORC1 によるミトコンドリア生成の制御

ミトコンドリア関連遺伝子の翻訳・タンパク質合成

転写されたミトコンドリア関連遺伝子は、機能的なタンパク質に成熟してはじめて生理機能を獲得する。しかし、ミトコンドリア関連遺伝子の転写制御過程の知見と比較して、ミトコンドリア関連遺伝子の翻訳・タンパク質合成過程は十分ではない (126)。骨格筋におけるタンパク質合成の中核は上述の mTORC1 である。活性化した mTORC1 は、mTORC1 の下流分子であり翻訳を制御する 4E-BP1 および p70S6K をリン酸化する。脱リン酸化状態の 4E-BP1 は mRNA と結合することで翻訳を抑制している。しかし、mTORC1 によりリン酸化されると mRNA との結合が解かれ翻訳が開始される。一方で p70S6K は、mTORC1 によりリン酸化されると、リボソーム群をリン酸化 (Thr308, ≡活性化) し、翻訳が促進される。

上述の通り、ミトコンドリア関連遺伝子の翻訳・タンパク質合成は、これまでに十分な知見が得られておらず、決定的な制御因子は同定されていない。先行研究では、ミトコンドリア合成におけるタンパク質合成過程は、mTORC1-4E-BP1 のリン酸化の協調によって制御されることが示唆されている (145)。また、mTORC1 を活性化させる因子であるインスリンを連続的に循環させることで、ミトコンドリアのタンパク質合成が増強されることが示されている (202)。この報告は、ミトコンドリアのタンパク質合成に mTORC1 の経路が重要な働きを担う可能性を示唆する。一方で、mTORC1 の阻害薬は、持久的運動・トレーニングによる骨格筋・筋原線維分画のタンパク質合成を減弱させるが、骨格筋・ミトコンドリア分画のタンパク質合成は、減弱しないとの報告もある (163)。これらの先行研究は、ミトコンドリアのタンパク質合成過程は、生理条件によって異なるメカニズム (例: ミトコンドリア関連遺伝子の翻訳・タンパク質合成における mTORC1 の貢献度の変化) が関与する可能性があり、今後より詳細なメカニズムの解明が待たれている。

翻訳・合成されたミトコンドリア関連タンパク質の修飾・プロセッシング

核の DNA にコードされているミトコンドリア関連タンパク質は、N 末端にシグナルペプチドが付加され、折りたたまれていないミトコンドリアタンパク質前駆体として細胞質で合成される。そこで、合成されたタンパク質は、正しくミトコンドリアへ輸送され、正しい立体構造が形成される必要がある。合成されたタンパク質前駆体は、HSP72 などの分子シャペロン結合することで、細胞質からミトコンドリア膜上に輸送される (84)。HSP による輸送は、ミトコンドリアへタンパク質前駆体が輸送される前に、凝集することを防ぐ意義があるとされる。ミトコンドリア外膜の膜透過機構 TOM40 複合体を構成する Tom20 によってタンパク質前駆体のシグナルペプチドが認識・結合される (84)。続いて、分子シャペロンとタンパク質前駆体の結合が解かれ、タンパク質がミトコンドリア膜間腔に輸送される。ミトコンドリア外膜を通過したタンパク質前駆体は、ミトコンドリア内膜の膜透過機構 TIM22・TIM23 複合体によって認識され、ミトコンドリア・マトリックスに取り込まれる。ミトコンドリアに輸送されたタンパク質前駆体のシグナルペプチドは、マトリックスにおいて、切断される。そして、ミトコンドリアに局在する分子シャペロンによって、タンパク質の高次構造が形成される。電気刺激による骨格筋収縮によって、Tom20 や HSP などタンパク質の翻訳後プロセッシングに関わる分子が増加し、実際にミトコンドリアタンパク質の輸送能力が向上することが示されている (205)。一方で、坐骨神経切除による骨格筋の不活動は、Tom20、Tim23、HSP を減少させ、ミトコンドリアへのタンパク質輸送能力を低下させることが報告されている (198)。つまり、トレーニングや骨格筋不活動によるタンパク質輸送能力の適応は、ミトコンドリア量の変化と高い整合性がある。

ミトコンドリア分解

ミトコンドリアの量は、ミトコンドリア生合成とミトコンドリア分解とのバランスで決定される。近年、ミトコンドリアの分解機構に関して、国際学術集会においてもシンポジウムが数多く開

催されるなど、骨格筋研究者の関心が高まっている。ミトコンドリア分解機構は、発展途上の研究分野であり、ミトコンドリア生合成に関する知見と比較して十分な理解が得られているとは言い難い。データベース (PubMed) に貯蔵されている出版論文数においてもミトコンドリア生合成とミトコンドリア分解は隔たりがある (図 1-7)。

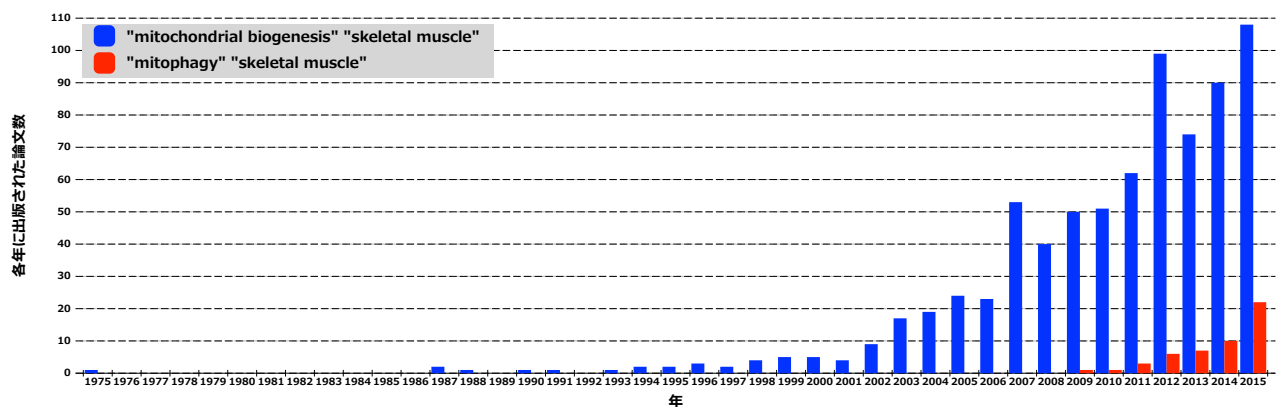


図 1-7. データベース (PubMed) から見るミトコンドリア生合成とミトコンドリア分解の出版論文数の年次推移
骨格筋のミトコンドリア生合成 ("mitochondrial biogenesis" "skeletal muscle") と骨格筋のミトコンドリア分解 ("mitophagy" "skeletal muscle") を PubMed で検索し、該当した論文の年次推移を示した。データは 2015 年 11 月 28 日時点のもの。

ここでは、ミトコンドリア分解機構が果たす生理的役割とミトコンドリア分解機構の分子機序について概説する (図 1-8, 図 1-9)。また、本研究では、マイトファジーの中でも最も精力的に研究されている Parkin 依存性マイトファジーについて取り扱う。

1. ミトコンドリアを分解する意義

ミトコンドリアの分解は、不良ミトコンドリアの除去および細胞分化といった生物学的過程に重要な役割を果たす。mtDNA 変異の蓄積、膜電位の低下といったミトコンドリアの機能不全は、多量の活性酸素種 (ROS) の生成源となる (168)。過剰に産生された ROS は、細胞の酸化ストレスを蓄積させ、細胞毒性を誘導する (167)。そこで、機能不全に陥ったミトコンドリアを選択的に認識・分解し、細胞内の恒常性を保持するための応答が誘導される。機能不全に陥ったミトコンドリア

アは、オートファジーの経路を利用して分解される。実際に、骨格筋の不活動によってミトコンドリア機能不全が誘導されるが、同時にマイトファジーが活性化されることが示されており (217)、生理学的整合性がある。

ところで、骨格筋の培養細胞において、薬理的にマイトファジーを阻害した場合、筋芽細胞から筋管細胞への分化が抑制されることが示されている (100)。これらの結果は、単にミトコンドリアの品質管理のみならず、ミトコンドリアの分解機構が生物学的に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

ミトコンドリア分解の分子機序：分解すべきミトコンドリアに目印を付ける過程

ミトコンドリアを分解する過程は、①分解すべきミトコンドリアを認識すること、②オートファジーの経路を利用して実際に分解することに大別される。

膜電位の低下や、過剰な酸化ストレスの蓄積といった機能不全に陥ったミトコンドリアは、主に PINK1/Parkin の媒介によって認識される (91, 218)。健全なミトコンドリアでは、ミトコンドリアの外膜に局在する PINK1 は、ミトコンドリア内部に輸送され、定常的に分解される。しかし、機能不全に陥ったミトコンドリアにおいては、PINK1 のミトコンドリア内部への輸送が阻害され、外膜に留まる。PINK1 は続いて、ミトコンドリアの E3 ユビキチンリガーゼである Parkin を細胞質からミトコンドリア外膜へ移行させる。Parkin は、主にミトコンドリアの外膜タンパク質に分解シグナルであるポリユビキチン鎖を結合させる。続いて、ミトコンドリアのタンパク質に結合したポリユビキチン鎖を P62/SQSTM1 が結合・認識する。P62/SQSTM1 はオートファジーの分解の場であるオートファゴソームのタンパク質 LC3 との結合サイトも有しているアダプタータンパク質である。まとめると、機能不全に陥ったミトコンドリアは、「PINK1/Parkin-ユビキチン化-P62/SQSTM1」の一連の反応によって正常で分解する必要がないミトコンドリアと区別される。

ミトコンドリア分解の分子機序：目印をつけたミトコンドリアを分解する過程

分解標的として認識されたミトコンドリアは、オートファジーの経路によって分解される。オートファジーは、様々な生物種・細胞腫で保存されている主要なタンパク質分解経路のひとつである (142)。オートファジーは、飢餓時のアミノ酸供給および不良タンパク質や長命タンパク質の除去に貢献する。他のタンパク質分解系と比較して、より多くのアミノ酸を得ることができることが特徴である。元来、オートファジーは、ユビキチン-プロテアソーム系の対照として、非選択的なタンパク質分解機構とされてきた。しかし現在では、上述のオートファジー（ミトコンドリア選択的）や、ペキソファジー（ペルオキシソーム選択的：単膜の細胞小器官）、ゼノファジー（細菌選択的）、リポファジー（脂肪滴選択的）などの選択的オートファジーが発見されている。オートファゴソームと呼ばれる二重膜によって細胞内のタンパク質が包括され、最終的にリソソームと結合し、リソソーム内のタンパク質分解酵素によって分解される。オートファジーは、30種類を超えるオートファジー関連遺伝子（ATG）によって調節される (142)。オートファジーの誘導は主に、①オートファジー惹起過程、②オートファゴソーム形成過程、③オートファゴソーム伸長過程に分類される (142)。

①オートファゴソーム形成を制御する最上流は、ULK1 である。ULK1 は、ATG13 および FIP200 と複合体を形成することでオートファジーを正に制御する。ULK1 は、AMPK によってリン酸化 (Ser555) されることで活性化する (135)。一方で、mTORC1 によってリン酸化 (Ser757) されることで不活性化する (35)。活性化した ULK1 複合体は、小胞体に結合し、オートファゴソーム形成を誘導する情報を発信する。

②オートファゴソームの形成開始段階は、クラス III PI3K 複合体によって制御される。クラス III PI3K 複合体は、Beclin 1 および、ATG14L、VPS34、VPS15 によって構成される。クラス III PI3K 複合体の活性化されると、オートファゴソームの膜成分であるホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PtdIns3P) が生成され、オートファゴソーム形成が開始される (142)。

③オートファゴソームの伸長は、LC3-II および ATG5-ATG12-ATG16L 複合体が制御する。LC3 は、ATG8 の哺乳類ホモログであり、オートファゴソーム膜結合タンパク質である。LC3 は、Pro-LC3 として合成され、即座に C 末端 22 残基が切断され LC3-I となる。ATG5-ATG12-ATG16L 複合体により、LC3-I の C 末端にホスファチジルエタノールアミン (PE) が結合され、オートファゴソーム膜に局在化する。なお、オートファジー関連タンパク質の中でも特に LC3-II は、オートファゴソームに局在し、オートファゴソーム膜との結合が安定であることから、オートファゴソーム量のマーカータンパク質として広く利用されている (143)。

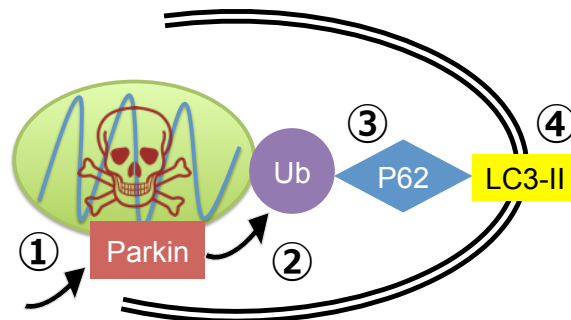


図 1-8. Parkin 依存性ミトコンドリア選択的オートファジー（マイトファジー）の概念図

- ① 細胞質から分解すべきミトコンドリアに Parkin (Mitochondrial E3 Ubiquitin ligase) が移動する。
 - ② Parkin は、多くのミトコンドリア外膜タンパク質にユビキチン (Ub) を結合させる。
 - ③ ユビキチンが結合したミトコンドリアを p62/SQSTM1 が認識する。
 - ④ ユビキチンおよび p62 が結合したミトコンドリアは、LC3-II と呼ばれるマーカータンパク質を含む二重膜構造の小胞（オートファゴソーム）によって覆われ最終的にリソソームによって分解される。
- なお、本研究では、ミトコンドリアを包括したオートファゴソームをマイトファゴソームとして表記する。

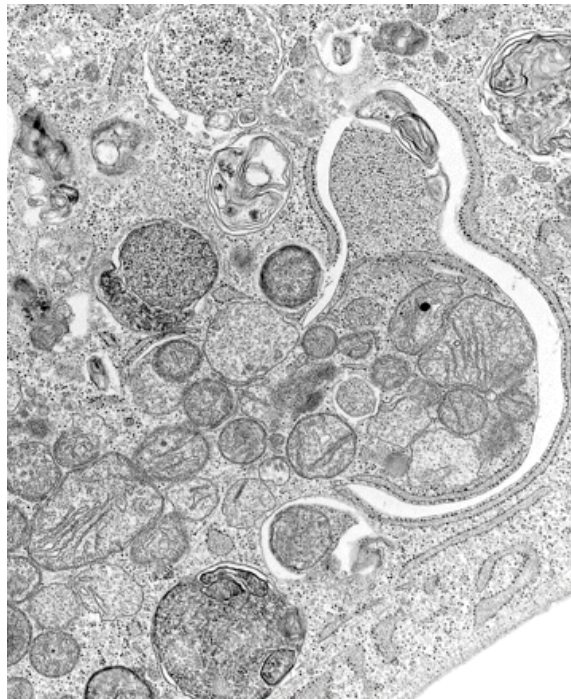


図 1-9. マイトファジーが誘導された胎仔線維芽細胞の電子顕微鏡像

薬剤により膜電位が低下したミトコンドリアが、二重膜の隔離膜（オートファゴソーム）によって囲まれる様子
写真出典元：Yoshii *et al.*, *J Biol Chem*, 2011.

ミトコンドリア分解に伴うミトコンドリア形態の変化

ミトコンドリアは、非常に流動的・動的な細胞小器官であり、融合・分裂を細胞内環境に応じて変化させる。ミトコンドリアの融合は、Mfn1/Mfn2（外膜融合）および Opa1（内膜融合）によって制御され、ミトコンドリア分裂は、Drp1 および Fis1 により制御されている (130, 223)。ミトコンドリアの品質は、マイトファジーとミトコンドリアの形態変化により管理される。例えば、Opa1 による内膜融合は、ミトコンドリアの膜電位に依存することが明らかとなっている (92)。膜電位が低下したミトコンドリアは、一時的にミトコンドリア融合サイクルから離れ、分裂する。その後、正常値まで膜電位が回復すれば、再び融合し、ミトコンドリアネットワークの形成に復帰する。一方で、膜電位の回復に至らなかったミトコンドリアは、再び融合されることはなく、マイトファジーによる分解の対象となる。ミトコンドリア分裂因子である Drp1 を欠損した細胞では、ミトコンドリアが融合・網状化することでマイトファジーの効率が著しく低下し、本来であれば分解されるはずのミトコンドリアが細胞内に蓄積することが報告されている (71, 173)。つまり、ミトコンドリアを分解する際に、融合し網状化した状態よりも、ミトコンドリアが分裂し断片化した状態のほうが、効率的・効果的にオートファゴソームで包むことができると解釈される。このように、ミトコンドリアの品質を維持するために、ミトコンドリアは自身の形態を分裂させ、分解に備えていると考えられる。

温熱刺激の基礎的理解

温熱刺激の歴史は古い。例えば、古代ギリシアでは、ヒポクラテスが太陽を利用した温熱療法を行った記録がある (29)。また古代ローマでは、運動器疾患に対する治療法として、サウナや砂浴が用いられたらしい。我が国においても、江戸時代には、健康のために身体を温めることが励行されていた記録がある。このように、治療効果や健康増進効果を期待して、温熱刺激は古くから広く利用されている。現代社会においても、温熱刺激は、日本の入浴やフィンランドのサウナ浴といった日常生活習慣として定着している。さらに医療現場においても、特に整形外科の分野で物理療法の一種として日常的に利用されている。しかし、温熱刺激が生体に与える影響は、十分な理解に至っていない。ここでは、温熱刺激が生体に与える影響について、①マクロ生理学の観点から、②細胞・分子生理学の観点からこれまでに明らかにされている知見を整理し、概説する。

温熱刺激による生理的適応

マクロ生理学の観点から

骨格筋や靭帯、腱などの運動器の損傷に対する治療法として温熱刺激が有効であると考えられている (68, 194, 231)。その根拠として、第一に組織血流量の増大が挙げられている (195, 232)。これは、血流量上昇に伴い、損傷骨格筋の再建に必要な酸素や栄養素の運搬が促進されるとの考えに基づく (68)。また、骨格筋の温度上昇に伴い、骨格筋の粘性抵抗が低下し、関節可動域の改善が期待されることも臨床現場で利用されている理由である (152)。上述の効果は、理学療法士やアスレティックトレーナーの養成テキストなどにも一般的に記載されている内容である。しかしながら、上述の理論が、温熱刺激による治療効果や健康増進効果を本当に説明できるか否か、因果関係は明らかではない。

細胞・分子生理学の観点から

マクロ生理学の知見に加えて、近年では、温熱刺激による細胞・分子レベルでの生理的応答・適応についても知見が蓄積されつつある。ここでは、温熱刺激が骨格筋に与える影響についてこれまで得られている知見を整理し、概説する。

熱ショックタンパク質 (Heat shock proteins; HSP)

温熱刺激による細胞応答の代表例として、熱ショックタンパク質 (HSP) の発現量上昇が第一に挙げられる。HSP は 1962 年に偶然発見されたタンパク質である。ショウジョウバエを通常の飼育環境の 25 °C から 35 °C へ曝露した際に (恒温槽の設定温度の誤りによる)、唾液腺染色体で DNA から RNA への転写が活性化することが明らかとなった (177)。これは、熱ショックによって特異的な遺伝子発現が誘導されることを示している。その後、1974 年に熱ショックによって発現が誘導されるタンパク質群が同定された (212)。このような発見の経緯から HSP と命名されているが、熱ストレスだけではなく、様々なストレス (紫外線、寒冷刺激、重金属曝露、浸透圧変動など) によっても発現が誘導されることが後に明らかにされている (194)。このような特徴から、HSP は、ストレスタンパク質と記述されることもある。HSP は、分子量や局在、生理機能によっていくつかのファミリーに分類される。HSP の中でも特に骨格筋では HSP 72 (細胞質局在) の研究が盛んである。その理由として、①HSP72 は、細胞保護やタンパク質の恒常性維持に特に貢献すると考えられていること、②基底状態の骨格筋では、HSP72 がほとんど発現していないが、運動や温熱刺激によって顕著に発現が誘導されることである。HSP は、分子シャペロンとして、細胞内の恒常性維持に貢献すると考えられている。具体的には、損傷したタンパク質の修復・分解や、細胞内のタンパク質輸送などである (194)。なお、これらの HSP は、バクテリアからヒトに至るまで保存されており、HSP による細胞内の恒常性維持が生物にとって重要なものであることが示唆される。

熱ショックタンパク質の発現誘導機構

上述の通り、HSP は、温熱刺激をはじめ、様々な細胞ストレスに応答して発現が誘導される(194)。この一連の発現誘導過程は、一般に熱ショック応答と記述される。細胞ストレスが増加すると、HSP の転写因子である HSF1 が単量体から三量体を形成し、細胞質から核内へ移行する。HSF1 は、DNA プロモーター領域の熱ショックエレメントと呼ばれる配列に結合し、ターゲット遺伝子の転写を促進する(151)。熱ショックエレメントとは、特定の塩基配列(TTC 配列の繰り返し)を指し、多くの HSP 遺伝子のプロモーター領域に存在する。近年の研究では、細胞ストレスに応答して HSF1 が HSP 遺伝子の転写を促進する上流の細胞内情報伝達経路についても精力的に研究されてきた。例えば、①細胞のエネルギー状態のセンサーである AMPK の不活性化(220)や、②タンパク質合成の中核と考えられている mTORC1 の活性化(39)、③細胞ストレスのセンサーとしての役割を担う p38 MAPK の活性化(16)が、HSP72 遺伝子の転写に貢献することが示されている。これらの細胞内情報伝達経路は、ミトコンドリアの生合成にも関与することから、細胞のストレス応答とエネルギー代謝・ミトコンドリアの量的制御が密接な関係にあることが示唆される。

温熱刺激による骨格筋の応答・適応

これまでに、温熱刺激が骨格筋に与える影響は、主に骨格筋損傷・再建、骨格筋のタンパク質合成に与える影響について主に検討されてきた。

事前に(12-48時間前)あるいは、損傷後に温熱刺激を与えることによって、骨格筋損傷による骨格筋重量の低下および骨格筋線維の横断面積の低下が抑制されること(79,107,213)、さらに再建骨格筋の特徴である中心核陽性の骨格筋線維が増加することが示されている(79)。また、これらの分子機序として、①ネクロシスの抑制に貢献するクレアチンリン酸の増加(65)、②骨格筋の新生・成熟に関わるタンパク質(MyoD, Myogenin)や、骨格筋再建に貢献するタンパク質の陽性細胞(Pax7⁺MyoD⁺)が増加すること(79,107,213)、③HSP の増加による細胞保護作用が示されている(213)。これ

らの報告により、損傷骨格筋の再建を促進する方法として温熱刺激が有効であるといった主張が、細胞・分子レベルで支持される。

一方で、温熱刺激は、骨格筋量の調節にも好ましい影響を与えることが示されている。日常的な温熱刺激は、骨格筋肥大を誘導することが報告されている (159, 216)。先行研究では、レジスタンス運動による mTORC1 経路の活性化は、運動中の温熱刺激によって一層亢進されることが示されている (98)。つまり、これらの一連の研究は、温熱刺激は骨格筋のタンパク質合成を促進することを示す。また、事前にあるいは骨格筋不活動中（ギプス固定、後肢懸垂）に温熱刺激を与えることで、骨格筋萎縮が抑制されたことが報告されている (150, 196)。これらの研究は、温熱刺激は、廃用性筋萎縮の抑制にも有効であることを示す。一方で、温熱刺激による骨格筋萎縮抑制効果に関わる分子機序は十分な解明に至っていない。当初は、温熱刺激によって増加した HSP72 が、①合成されたタンパク質の翻訳後のプロセッシング過程を改善することや、②細胞内の恒常性維持に貢献することが、メカニズムとして考えられてきた。しかし、HSP72 の増加を伴わない程度の温熱刺激でも、骨格筋萎縮の抑制効果が生じることから、HSP72 以外の経路も関与した可能性が主張されている (151)。したがって、骨格筋量を調節するメカニズムを解明することが、温熱刺激の研究分野において今後重要な課題のひとつになると考えられる。

温熱刺激がエネルギー代謝に与える影響

上述の通り、これまでに温熱刺激に関する研究は骨格筋の再建・肥大・萎縮抑制といった骨格筋の形態に関わる経路について精力的に検討されてきた。しかし、骨格筋をはじめとしたエネルギー代謝機構については、十分な理解が得られていない。ここでは、これまでに明らかとなっている知見について概説する。温熱刺激がエネルギー代謝に与える影響は、温熱刺激による糖代謝異常症の改善といった観点から検討されてきた。2型糖尿病患者を3週間にわたり日常的に温浴させると、インスリン抵抗性が改善すると報告されている (85)。さらに、高脂肪食を与えた実験動物において、

インスリン抵抗性を惹起する細胞内情報伝達経路（JNK 経路）が、温熱刺激によって正常化することが示されている (75)。この温熱刺激の効果は、HSP72 の阻害薬によって消失することが示されており、温熱刺激による糖代謝異常症の改善効果は、HSP72 に依存すると結論づけられている。また、2型糖尿病患者は、骨格筋の HSP72 の発現量が低下し、インスリン抵抗性と負の相関関係にあることも示されている (40)。このような背景から、HSP72 量の増加は糖代謝異常症の治療標的となることが期待されている。現在は HSP72 を標的とした糖尿病治療薬(BGP-15)も開発され、現在臨床試験が実施されている (Phase 2C) (80)。一方で、ラットの摘出筋を対象に、一過性の温熱刺激（HSP72 の増加を伴わない）を与えることで、骨格筋のグルコースの取り込み速度が上昇することが示されている (108)。この報告は、温熱刺激による糖代謝異常症の改善効果は HSP72 以外の経路によっても説明されることを意味する。このように、糖代謝異常症に対する温熱刺激の治療効果は、複合的なメカニズムによると考えられる。

一方で、酸化系エネルギー代謝の中核であるミトコンドリアに対しても、温熱刺激が影響を与えることが近年示されている。マウス骨格筋由来の培養細胞に温熱刺激を与えるとミトコンドリア合成に貢献する細胞内情報伝達経路 AMPK-PGC-1 α が活性化し、ミトコンドリアが増加することが報告されている (125)。しかし、生体においても温熱刺激がミトコンドリアを増加させるか否かについては、明らかではない。この点を先行研究の限界点として留意する必要がある。

第1章のまとめ

第1章の前半では、ミトコンドリアの基礎的理解や、ミトコンドリアの量的制御機構についてこれまでに得られている知見について整理し概説した。ミトコンドリア量を増加させることは、アスリーの持久的運動能力の向上に貢献する。また、一般人においても骨格筋のミトコンドリア量を維持することは、骨格筋の健全度や全身の健康を保持する上で重要な役割を果たす。ミトコンドリアの量的制御機構に関して、ミトコンドリア生合成に関わる PGC-1 α についてこれまでに精力的に研究されてきた。しかしながら、ミトコンドリアの分解に関する研究は発展途上であり、これまでに十分な理解は得られていない。

第1章の後半では、温熱刺激に関するこれまでに明らかにされた知見を整理し概説した。温熱刺激は、日常生活や臨床現場において、広く用いられているが、必ずしも科学的根拠は明らかではない。近年では、温熱刺激が骨格筋に与える影響が細胞・分子レベルで明らかにされつつあるが、エネルギー代謝機構の理解は十分ではない。特に、温熱刺激によるミトコンドリアの適応については、骨格筋の培養細胞を対象とした研究が存在するのみである。そこで、温熱刺激による生体の骨格筋ミトコンドリアの量的変化を明らかにすることができれば、温熱刺激のより深い理解に貢献できると考えられる。

第2章

温熱刺激プロトコールの開発



緒言

体温調節機能を破綻させない温熱刺激方法開発の必要性

先行研究では、様々な方法を用いて実験動物に温熱刺激が与えられてきた。具体的には、マウスやラットの後肢を温水に浸す方法やブランケットで包む方法、暑熱環境へ曝露する方法である。先行研究における温熱刺激方法の代表例を以下の表に示す（表 2-1）。

表 2-1. 先行研究で使用されている温熱刺激方法の代表例

著者	実験動物	方法	直腸温 (°C)	麻酔
Locke et al. (128)	SD ラット	温熱パッド	42	ペントバルビタールナトリウム (35 mg/kg ip)
Chen et al. (37)	SD ラット	温熱パッド	42-42.5	ケタミン (80 mg/kg ip) and キシラジン (10 mg/kg ip)
Gupte et al. (75)	Wistar ラット	暑熱環境への曝露	41-41.5	ペントバルビタールナトリウム (5 mg/100g ip)
Gupte et al. (76)	Fische ラット	温熱ブランケット	41-41.5	ペントバルビタールナトリウム (5 mg/100g ip)
Oishi et al. (160)	Wistar ラット	暑熱環境への曝露	42	カルバミン酸エチル(20%, 500 µl/100 g body wt)
Joyeux et al. (96)	Wistar ラット	暑熱環境への曝露	42	ペントバルビタールナトリウム(25 mg/kg ip)
Frier et al. (60)	SD ラット	温熱パッド	42	イソフルラン (2-5% with 1 L O ₂ /min)
Kojima et al. (107)	Wistar ラット	暑熱環境への曝露	-	記載なし
Goto et al. (73)	Wistar ラット	暑熱環境への曝露	41-42	麻酔なし
Oishi et al. (161)	Wistar ラット	暑熱環境への曝露 (後肢のみ)	-42	ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg ip)
Lee et al. (118)	ICR マウス	暑熱環境への曝露 (後肢のみ)	41	ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg ip)

温熱刺激中の麻酔処置は、実験動物の正常な体温調節機能を阻害することが先行研究で指摘されている。例えば、麻酔処置によって、体温調節機能を担っている視床下部の温度感受性ニューロンの発火頻度が低下すること (53) や、麻酔処置自体による体温の低下が問題点として指摘されてい

る (121)。さらに、マウスやラットは汗腺がほとんど存在しないため、暑熱環境へ曝露した際には、唾液を身体へ散布することで放熱を行うことが知られている (120)。しかし、麻酔下での温熱刺激では当然ながら、これらの暑熱環境に対する行動は発現しない。また、温熱刺激は、Interleukin-6 といったエネルギー代謝を変動させる可能性があるサイトカインを分泌することが明らかにされているが (120, 122)、これらのサイトカインは、麻酔処置自体によっても分泌されてしまうことも問題点である。温熱刺激がエネルギー代謝に与える影響を検討することや、臨床への橋渡し研究としての側面を重要視している本研究では、麻酔処置を使用した温熱刺激方法は好ましくないと考えられる。したがって、麻酔処置を必要としない温熱刺激方法を考案・開発する必要がある。

第2章では、麻酔処置を必要としない温熱刺激方法として暑熱環境への曝露による全身性の温熱刺激方法を採用した。本章では、温熱刺激装置の考案・開発と温熱刺激方法についての妥当性の検証を行った。

第2章の目的

1. 温熱刺激装置を考案・開発し、妥当性の検証を行う

1. 温熱刺激装置の考案・開発
2. 温熱刺激方法の温度制御制度の確認

2. 暑熱環境への曝露による温熱刺激方法の妥当性を検証する

1. 温熱刺激は、生体に十分に伝わっているか？
2. 熱中症を呈さないか？
3. マウスの活動量を増加させないか？

検討課題 1 : 温熱刺激方法の考案・開発、妥当性の検証

温熱刺激装置の考案・製作

本章ではまず、温熱刺激方法を考案し開発した。温熱刺激装置本体は、汎用のアクリル製のケースの壁面および底面にラバーヒーター（MRHSF, Misumi-Vona, Tokyo, Japan）を取り付けることで制作した。ヒータの最大出力は 540 W である。本装置の側面・底面のヒータを過熱することで、装置内の環境温度を上昇させる仕様である。本研究の温熱刺激モデルは、マウスの飼育ケージをそのまま装置内に入れることで、暑熱環境への曝露による全身性の温熱刺激である。

温度は、温度制御装置（温度制御装置本体：E5EC-CX2ASM-000, Omron, Kyoto, Japan; サイクル・コントロール・ユニット：G32A-EA AC100-240, Omron; パワー・ソリッド・ステート：G3PA-220B-VD DC5-24, Omron）を使用し、PID 制御（ステップ応答法と限界感度法の組み合わせにより PID 定数を設定; P:14.6 °C, I: 701 sec, D: 119 sec) により制御している。温度管理は 0.1 °C 単位で行った。なお、本研究で用いる温熱刺激装置では、湿度の管理は行なっていない。温熱刺激装置の製作過程・完成品、電気回路図、温度制御装置の外形図を示す（図 2-1～図 2-4）。



図 2-1. 温度制御装置の制作過程

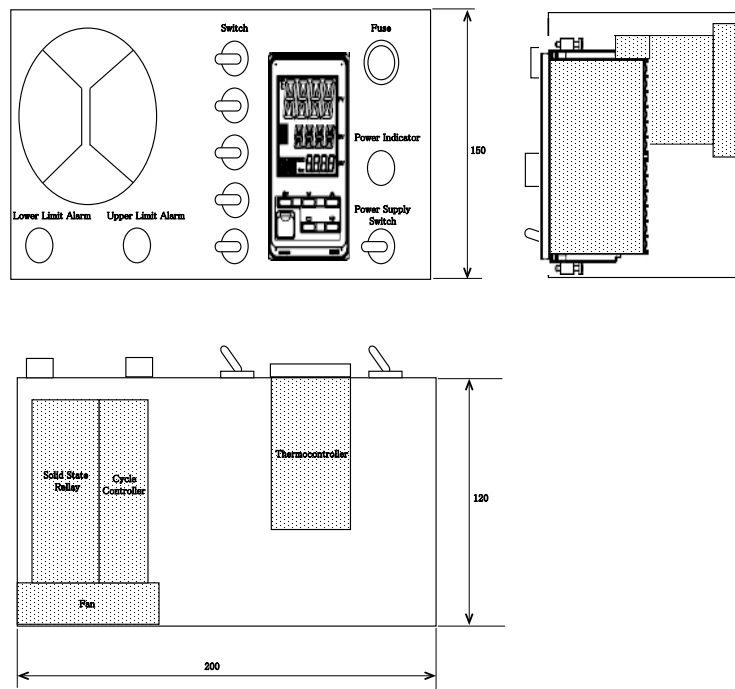


図 2-2. 温度制御装置の外形図

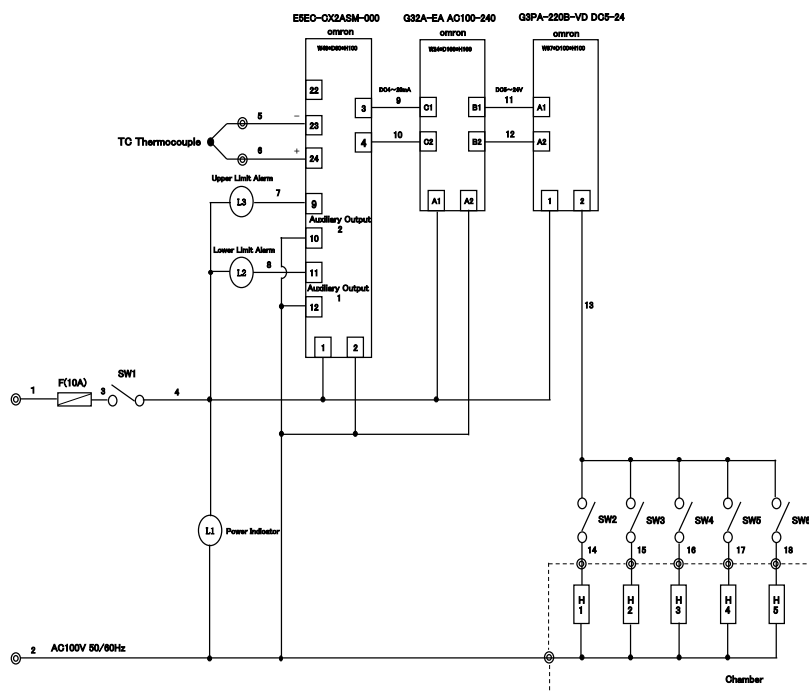


図 2-3. 温度制御装置の電気回路図

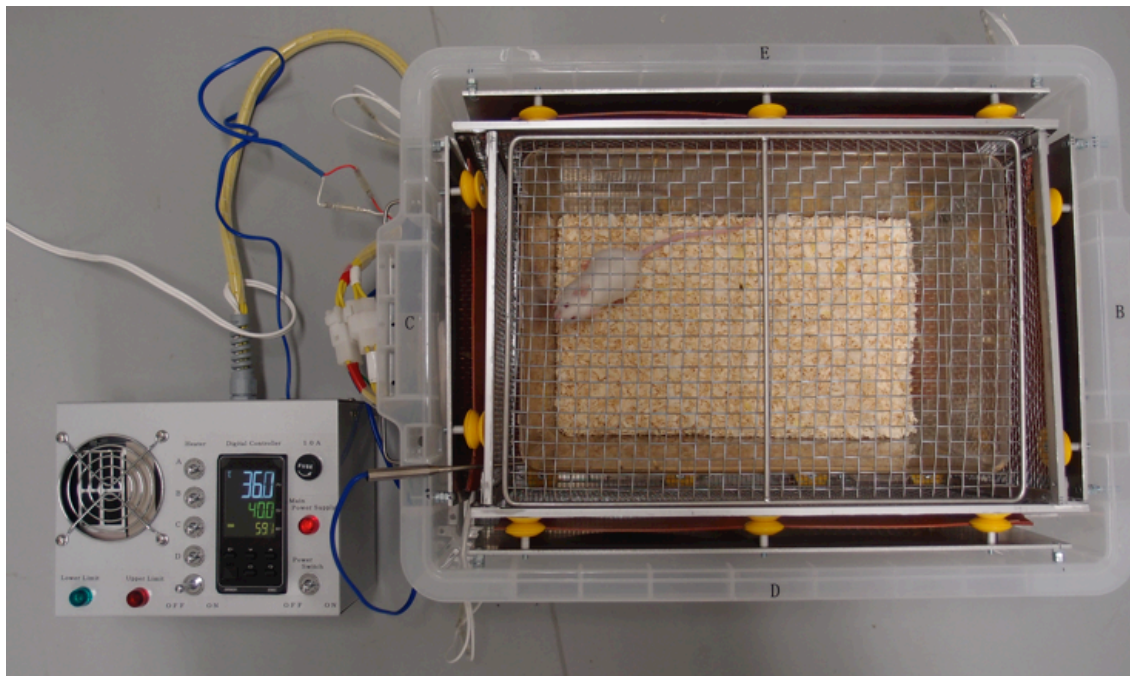


図 2-4. 温熱刺激装置

温熱刺激装置の温度制御の精度を評価

本検討課題では、温熱刺激装置の妥当性を検証するために、温熱刺激装置の温度制御精度について検討を行った。

方法

温度を 40 °C に設定し、60 分間の温熱刺激装置内の温度を測定した。測定箇所は、温熱刺激内の左側（ケージの長尺 左 1/3）・中央（ケージの長尺 1/2）・右側（ケージの長尺 右 1/3）とし、装置外の温度も同時に測定した。いずれの測定箇所もマウスの飼育ケージの底面から 2 cm の高さで測定した。温度センサーは、TC 熱電対（E52-CA20AY D=3.2 4M, Omron）を使用し、データ・ロガー（GL200-UM-801, Graphtec, Kanagawa, Japan）に接続し記録した。温度の測定および記録は 0.1 °C 単位で、サンプリング・レートは 1 Hz とした。

結果

40 °C に設定した温熱刺激装置内の 60 分間の平均温度±標準偏差（最低-最高）は、中央部：40.3±0.5（38.9-41.3）°C、左部：39.8±0.6（38.0-40.8）°C、右部：40.4±0.5（38.9-41.3）°C であった。また、温熱刺激装置外の温度は、21.7±0.2 °C（21.5-22.2）であった。60 分間の温度の経時変化および装置内中央部の温度分布のグラフを示す（図 2-5, 図 2-6）。

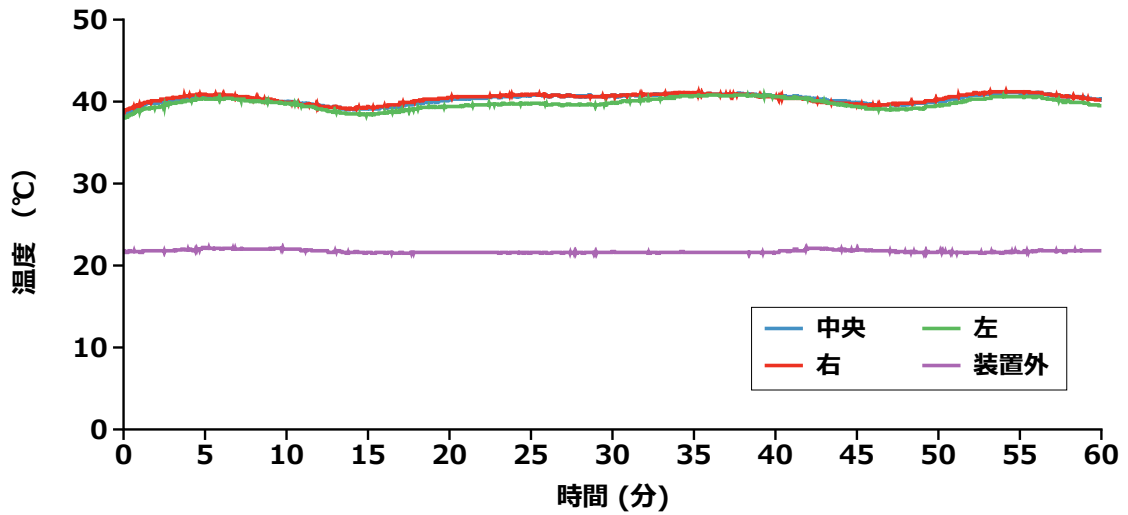


図 2-5. 40°Cに設定した温熱刺激装置内の 60 分間の温度変化

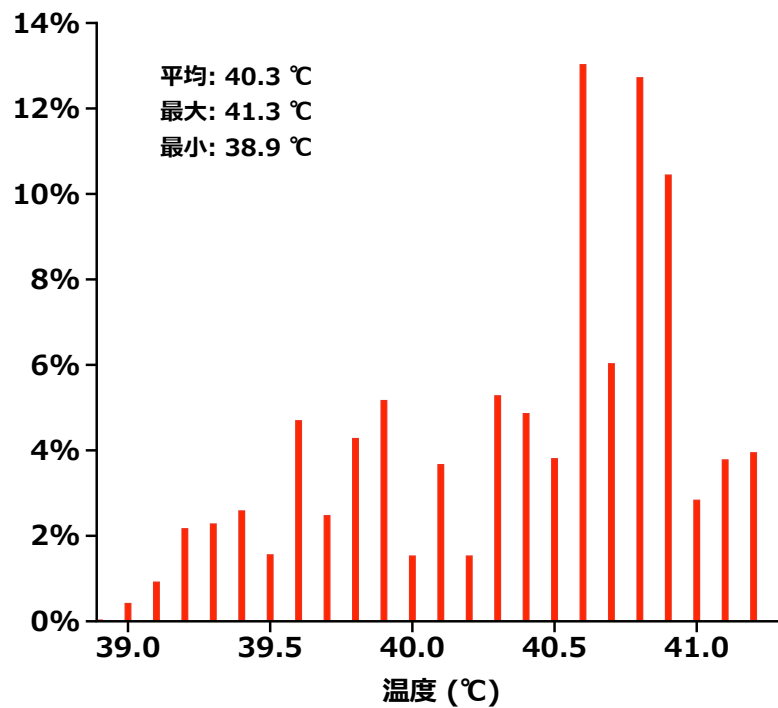


図 2-6. 40°Cに設定した温熱刺激装置内の 60 分間の温度分布 (装置内中央)

まとめ

本検討課題で開発した温熱刺激装置の温度制御精度を評価した。温熱刺激装置内の温度を 40 °C に設定し、装置内の温度を装置内左部・中央部・右部で測定したところ、いずれの測定箇所においても 60 分間ほぼ 40 °C を保つことが確認できた。これらの結果は、本研究の温熱刺激装置の妥当性を保証するものである。

検討課題2：温熱刺激方法の妥当性検証

本研究で採用した暑熱環境への曝露による全身性の温熱刺激方法の妥当性を検証するために、本検討課題では、①温熱刺激が十分に伝わるか？、②熱中症を呈さないか？、③マウスの活動量に影響を与えないか？について検討を行った。

検証項目

温熱刺激が十分に伝わるか？

温熱刺激に関する先行研究では、温熱刺激に対する生理的応答が得られたか否かの生理学的指標として、直腸温の測定が用いられている。暑熱環境への曝露による温熱刺激では、直腸温の到達目標を 40-42 °C の範囲に設定しているものが多い。

一方で、温熱刺激に対する生理的応答が得られたか否かの生化学的指標として、HSP の発現量の評価が用いられている (151)。HSP は、炎症や低酸素、熱といった細胞ストレスによって発現が誘導され、細胞の保護や修復に貢献すると考えられている (193)。特に分子量が 72kD の HSP は、熱ストレス後、速やかに (~48 時間) 発現量が増加することが明らかとなっている (160)。したがって、HSP72 のタンパク質量は、温熱刺激が伝わったか否かについての指標として有用であると考えられる。

本検討課題では、温熱刺激に対する生理的応答が得られたか否かを検証するために、先行研究に準じて、直腸温と HSP72 のタンパク質量を評価した。

熱中症を呈さないか？

本検討課題では、温熱刺激を日常的に行うことを考慮して、本研究の温熱刺激によって熱中症を呈さないか？についても検証を行う。ただし、先行研究においては、熱中症の定義は明確ではないため、熱中症の先行研究に準じて検証を行う。具体的には、熱中症を取り扱った先行研究では、42

°C を越える直腸温を目標として、マウスを暑熱環境へ曝露していることや (120, 122)、直腸温が 41 ~42 °C に至る条件では血中乳酸濃度が高値を示すことが示されている (239)。

本研究の温熱刺激によって、熱中症を呈さないか？について検討を行うために、直腸温が 42 °C を超えないか？血中乳酸濃度が上昇しないか？について検討を行った。

3. 温熱刺激によって、マウスの活動量が増大しないか？

本研究では、上述の麻酔処置による問題を避けるために、麻酔処置を使用しない温熱刺激方法を採用している。麻酔処置を使用しないことで、「温熱刺激中にマウスの自発活動量が増加してしまうのではないか？」といった重大な懸念が生じる。マウスの自発活動量の増加（≒運動・トレーニング）は、骨格筋のミトコンドリアを増加させる刺激となる。つまり、温熱刺激によってミトコンドリアが増加したとしても、本当に温熱刺激によってミトコンドリアが増加したのか？運動の効果が発現した結果ミトコンドリアが増加したのか？については区別することができない。

そこで、本検討課題では、本研究で採用した温熱刺激方法は、マウスの自発活動量に影響するか否かについて検討を行った。

方法

実験動物

本実験では、雄性の8週齢 ICR マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を実験動物として用いた。マウスを非温熱刺激群または温熱刺激群に無作為に分けた。実験①として、温熱刺激による直腸温の測定および血中乳酸濃度の測定、骨格筋の HSP72 の測定を行った。実験②として、温熱刺激が自発活動量に与える影響を評価した。マウスは、23 °C の環境温度で飼育し、飼料 (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) および水は自由摂取とした。マウスの飼育室は 12 時間の明暗サイクルとし、すべての実験は、暗期 (マウスの活動期) に行った。

実験デザイン

実験①：温熱刺激が直腸温および血中乳酸濃度、骨格筋 HSP72 発現に与える影響

マウスを①対照群 (対照; n=6)、②温熱刺激直後群 (0h; n=7)、③温熱刺激 1 時間後群 (1h; n=7)、④温熱刺激 3 時間後群 (3h; n=7)、⑤温熱刺激 6 時間後群 (6h; n=7)、⑥温熱刺激 12 時間後群 (12h; n=7) に無作為に分けた。温熱刺激群のマウスは、40 °C の暑熱環境に 30 分間曝露した。なお、水を浴びる行動が予備実験で観察されたため、曝露中は、餌および水を摂取させていない。対照群は、温熱刺激直後群と同タイミングで測定・頸椎脱臼により安楽死させ骨格筋を摘出した。実験デザインの概略を以下の図で示す (図 2-7)。

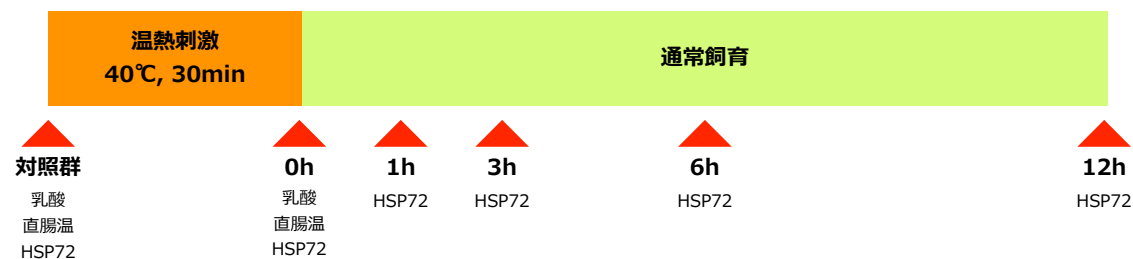


図 2-7. 直腸温・血中乳酸濃度・HSP72 のタンパク質量を評価するための実験

実験②：温熱刺激がマウスの自発活動量に与える影響

マウスを非温熱刺激群 (n=4) または温熱刺激群 (n=4) に無作為に分類した。温熱刺激群のマウスは、40 °C の暑熱環境に 60 分間（本研究で実際に採用したプロトコルの 2 倍）曝露した。非温熱刺激群のマウスは、温熱刺激用のチャンバーを 23 °C の通常飼育環境温度に設定し 60 分間曝露した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図 2-8）。

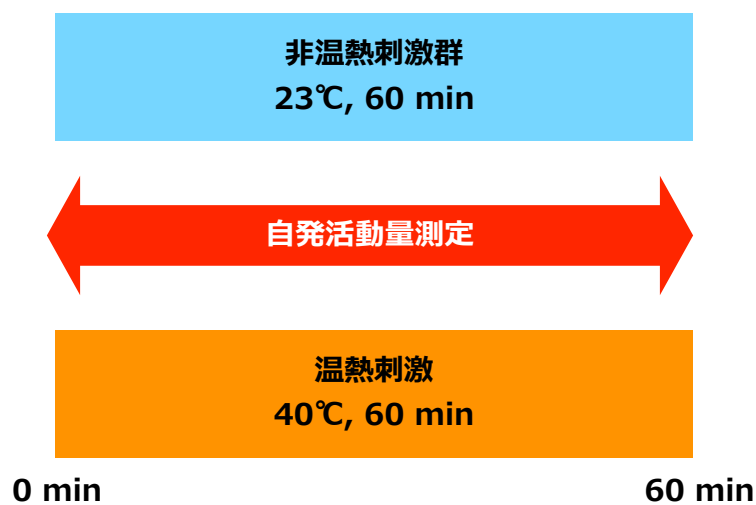


図 2-8. 自発活動量評価のための実験

測定方法

直腸温の測定

TC 熱電対 (E52-CA20AY D=3.2 4M, Omron, JAPAN) を温度センサーとして用いて、直腸温を測定した。温熱刺激を与えた直後にイソフルランを用いて、マウスに麻酔を施した。温度センサーを肛門から約 1.5 cm 挿入した。リアルタイムで温度確認し、温度が安定したと判断してから 10 秒間の平均温度を直腸温として記録した。なお、マウスに麻酔を施してから直腸温測定終了までの所要時間は、概ね 30 秒以内である。

血中乳酸濃度の測定

血中乳酸濃度は、ポータブル式の血中乳酸濃度測定器 (Lactate Pro, Arkray, Japan) を用いて尾部の血管より採血し、測定した。

HSP72 のタンパク質量の測定

ウエスタンブロットのためのサンプル調製

腓腹筋を分析対象とした。プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤を含んだ Lysis buffer (pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM Sodium Beta-glycerol Phosphate, 5 mM Sodium Pyrophosphate, 2 mM DTT, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM Na Orthovanadate, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride) で、ホモジナイザーを用いて組織を粉砕した。その後氷上で 30 分間インキュベート、1500xG で遠心分離し、その上清をサンプル溶液とした。サンプル溶液中のタンパク質の濃度を、Bradford 法を用いて測定し、サンプルに含まれるタンパク質濃度が 1 µg/µl となるように Buffer 2 (10 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol, 1 mM EDTA, pH 7.4) で希釈した。サンプル溶液 100 µl に対して、16% SDS 溶液を 30 µl 加え、100 °C で 10 分間加熱しウエスタンブロット用のサンプル溶液とした。

ウエスタンブロット

ウエスタンブロット法を用いて、HSP72 のタンパク質量を測定した。ミニプロティアン (Bio Rad, USA) を組み立て、そこに 10% SDS-polyacrylamide gel を用い、サンプル 10 µl を電気泳動によってタンパク質を分子量ごとに分離した。次に、ゲルから PVDF メンブレン (Hybond-P, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) にタンパク質を転写し、BSA/TTBS (3% BSA, 20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% Tween 20) で 1 時間ブロッキングを行った。HSP72 の 1 次抗体は Enzo

Life Science 社製 (ADI-SPA-810-D; 1:3000) のものを用い、4 °C で一晚インキュベーションした。1 次抗体反応後、TTBS (20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% Tween 20) で 10 分間 × 3 回洗浄した。2 次抗体は Goat Anti-mouse IgG (H+L) (American Qualex, CA, USA) を用いて 1 時間インキュベーションした。2 次抗体反応後、TTBS (20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% Tween 20) で 10 分間 × 3 回洗浄した。その後、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA)により化学発光させスキャナー (Chemi Doc, Bio Rad, CA, USA) で撮影し、バンドを視覚化した。タンパク質の定量は Quantity One (Ver. 4.5.2, Windows, Bio Rad) を用いた。

活動量の測定

マウスの背中中央部に追跡用のマーキングをおこない、温熱刺激装置の上方からビデオカメラ (HDR-SR11, 30 fps, SONY, Tokyo, Japan) で撮影した。その後、動作分析ソフト (Kinovea, Ver. 0.8.15, Windows) を用いてマウスの背中のマーカの移動距離を算出し、マウスの活動量とした。なお、マウスの活動量は 15 分毎に示した。

統計処理

すべてのデータは、平均値 ± 標準誤差で示した。直腸温、血中乳酸濃度は、対応なしの T 検定で、非温熱刺激群 (対照群) と温熱刺激群で比較した。HSP72 のタンパク質量は、Dunnet 法を用いて、対照群と比較した。活動量は、二元配置分散分析 (温熱刺激 × 時間) を行った。すべての統計処理は JMP (Version 9.0.1, Macintosh, SAS Institutes, NC, USA) を使用した。

結果

温熱刺激が十分に伝わるか？

本研究の温熱刺激が十分に生体に伝わっているか否かを検証するために、温熱刺激が直腸温および骨格筋の HSP72 タンパク質量へ与える影響を検討した。

直腸温（実験①）（図 2-9）

温熱刺激群の直腸温は、非温熱刺激群と比較して有意に高い値を示した。

HSP72 のタンパク質量（実験①）（図 2-9）

腓腹筋の HSP72 のタンパク質量は、対照群と比較して、温熱刺激 3、6、12 時間後群で有意に高い値を示した。

温熱刺激が熱中症を呈さないか？

本研究の温熱刺激で熱中症を呈さないか否かを検証するために、温熱刺激が血中乳酸濃度に与える影響を検討した。

血中乳酸濃度（実験①）（図 2-10）

温熱刺激群の血中乳酸濃度は、非温熱刺激群と比較して統計的に有意な変化を認めなかった。

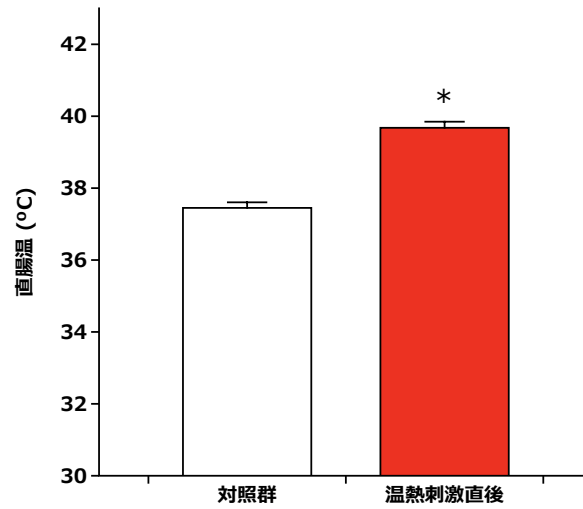
温熱刺激によって活動量は増加しないか？

麻酔を処置しない温熱刺激がマウスの自発活動量に与える影響を検討した。

マウスの自発活動量 (実験①) (図 2-11)

マウス背部に添付したマーカの平面移動距離をマウスの活動量とした。曝露時間による主効果が認められた。一方で、温熱刺激による統計的に有意な主効果は認められなかった。

直腸温



HSP72

温熱刺激後の経過時間

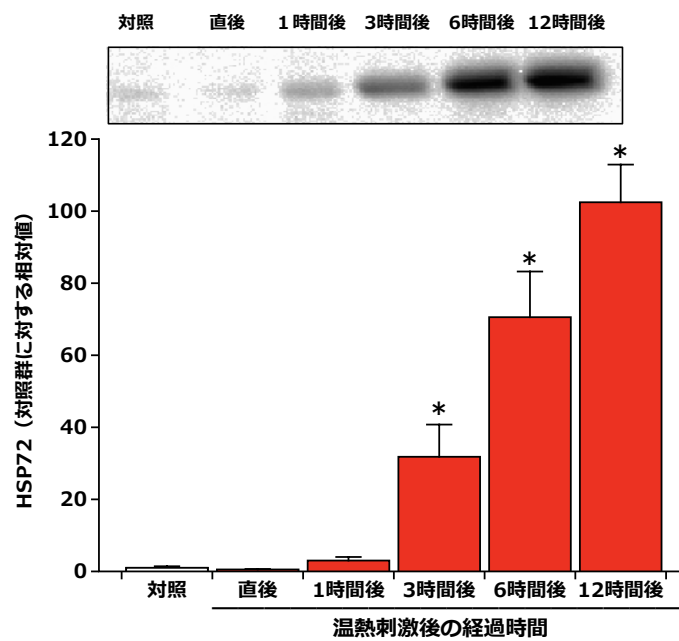


図 2-9. 温熱刺激は、直腸温を上昇させ、HSP72 のタンパク質量を増加させる

データは、平均的±標準誤差で示している。対応なしの T 検定または Dunnett 法により統計処理を行った。*P<0.05 vs 対照群

血中乳酸濃度

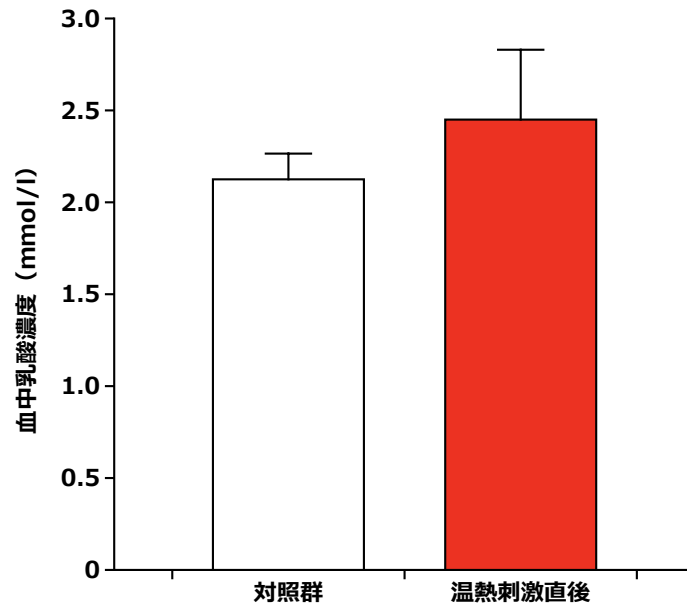


図 2-10. 温熱刺激は、血中乳酸濃度を上昇させない

データは、平均的±標準誤差で示している。対応なしのT検定を行った。

自発活動量

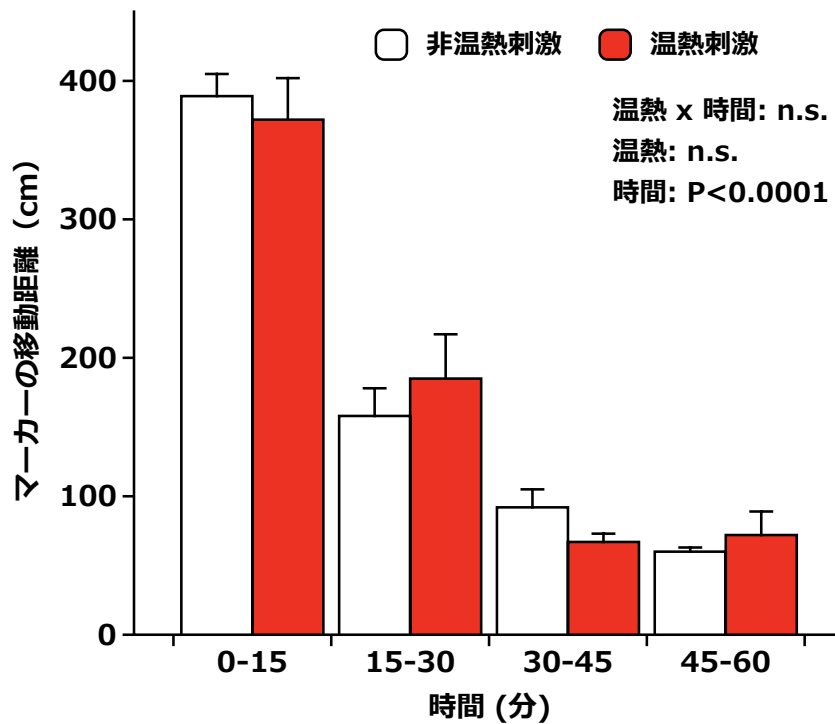


図 2-11. 温熱刺激は、自発活動量を増加させない

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析を行った。

考察

実験プロトコール

本研究では、被験対象として ICR マウスを用いた。ICR マウスを選択した理由は、マウスの中でも比較的大型で十分な量の骨格筋を摘出できること、所属研究室内外の先行研究で運動・トレーニングによるミトコンドリア適応のデータが蓄積されており、様々な比較検討ができることである。

温熱刺激は、暑熱環境への曝露による全身性の温熱刺激を採用した。本研究では、ICR マウスを暑熱環境へ曝露した Lee らの方法（麻酔下で、40 °C の暑熱環境に 60 分間曝露）を参考にした (118)。

温熱刺激が十分に伝わるか？

本研究では、温熱刺激に対する生理的応答が得られたか否かの指標として直腸温、生化学的指標として腓腹筋の HSP72 タンパク質量を検討した。暑熱環境への曝露によって、直腸温が平均で 39.6 °C にまで上昇した (図 2-9)。先行研究では、直腸温の上昇目標を 40~42 °C に設定しているものが多く、本研究においても同水準に直腸温が上昇したと解釈される。さらに、骨格筋として腓腹筋における HSP72 のタンパク質量を検討した。腓腹筋の HSP72 タンパク質量は、温熱刺激後 3 時間後から 12 時間後にわたって統計的に有意な増加を認めた (図 2-9)。

これらの結果は、本研究の温熱刺激によって、生体（特に、本研究の主な分析対象である骨格筋）に温熱刺激が十分に伝わっていることを保証するものである。

熱中症を呈さないか？

本実験では、今後の実験において日常的にマウスを暑熱環境へ曝露することを考慮して、マウスが熱中症を呈さないかを検証した。なお、熱中症の定義は明確ではないため、熱中症の指標は、本実験では熱中症に関する先行研究に準じ設定した。熱中症に関する先行研究では、直腸温が概ね 42.0 °C 以上となるように温熱刺激を与えている (120, 122)。本実験では、暑熱環境への曝露によっ

て、有意な直腸温の上昇を認めたが、39.4～40.2 °C の範囲にあり、42.0 °C を超える例はなかった。また、血中乳酸濃度の上昇も熱中症の指標として先行研究で用いられているが (239)、本実験では暑熱環境への曝露によって血中乳酸濃度が上昇することもなかった (図 2-10)。これらの結果は、温熱刺激によってマウスが熱中症を呈さないことを示すものである。

温熱刺激によって活動量は増加しないか？

本研究では、上述の麻酔処置による問題を避けるために、麻酔処置を使用しない温熱刺激方法を採用している。麻酔処置を使用しないことで、「温熱刺激中にマウスの自発活動量が増加してしまうのではないか？」といった重大な懸念が生じる。そこで、本研究では、温熱刺激がマウスの自発活動量に与える影響を評価した。

その結果、曝露時間の主効果が認められ、いずれの条件でも曝露前半の活動量が曝露後半の活動量よりも高いことが示された (図 2-11)。これは、いずれの群も通常の飼育ケージから曝露用のケージにマウスを移動させたために生じた探索行動の影響であると考えられる。一方で、温熱刺激の主効果は認められなかった (図 2-11)。この結果は、本研究の温熱刺激によって活動量は影響を受けないことを意味する。なお、本検討課題では、暑熱環境への曝露時間を実際のプロトコルの2倍に相当する60分間まで延長して検討しているが、温熱刺激による活動量への影響は見受けられない。したがって、今後の研究において、温熱刺激によるミトコンドリア増加効果が認められたとしても、自発活動量の増加 (≒運動・トレーニング) の効果によるものではないことが保証される。

第2章のまとめ

温熱刺激に関する先行研究の多くは、実験動物を麻酔下で温熱刺激を与えている。一方、近年では、温熱刺激中の麻酔処置は体温調節機能を阻害すると指摘がされており、エネルギー代謝にも影響を与える可能性が指摘されている。そこで本研究では、温熱刺激方法として、麻酔処置を必要としない暑熱環境への曝露を採用し、プロトコルの開発を行った。

第2章の前半では、マウスを暑熱環境へ曝露するための温熱刺激装置の考案・制作を行った。そして、温熱刺激装置の温度制御の精度を検討し、妥当性を確認した。

続いて第2章の後半では、本研究の温熱刺激方法の妥当性を検証した。本研究の暑熱環境への曝露による温熱刺激によって、①先行研究と同様の温熱刺激に対する生理的応答・適応が得られたこと、②熱中症を呈さないこと、③マウスの活動量に影響を与えないことを確認できた。

本章により、本研究で用いる温熱刺激装置および暑熱環境への曝露による温熱刺激方法の妥当性が示された。

第3章

温熱刺激は持久的トレーニングによる 骨格筋ミトコンドリアの適応を 増強するか？



緒言

競技スポーツの高度化に伴い、科学的根拠に基づく効果的なトレーニング方法の需要は日々高まっている。その理由は、効果的・効率的なトレーニング方法は、オーバーユースによる傷害の予防や、トレーニング時間の再配分などトレーニング全体の最適化に貢献すると期待されるからである。

本研究では、競技力に関わる要因として骨格筋ミトコンドリアの量に着目した。骨格筋ミトコンドリアの増加は、運動時のエネルギー源として、脂質の利用割合を高め、糖質利用を節約することで、最大下運動時における運動持続時間の延長に貢献する (83)。マラソンや自転車競技などの多くの持久的競技の実態は、最大下運動の継続であり、骨格筋のミトコンドリアを増加させる意義は大きい。一般に、骨格筋ミトコンドリアの量を増加させるためには、長時間・高運動量のトレーニングが必要であると考えられており、効果的・効率的なトレーニング方法の開発は高い需要がある。近年では、高強度の間欠的運動を行うことで、短時間・低運動量であっても長時間・高運動量と同等なミトコンドリア増加効果が得られることが明らかにされるなど、精力的に研究されている (28, 67, 211)。

本研究では、温熱刺激による介入が、持久的トレーニングによるミトコンドリアの増加効果を増強させる可能性に着目した。その学術的根拠は、「マウス骨格筋由来の培養細胞に温熱刺激を与えると、ミトコンドリア遺伝子の転写を促進する AMPK の活性化を伴って、ミトコンドリアが増加すること」が明らかにされていることである (125)。しかし、培養細胞で認められた温熱刺激によるミトコンドリア生合成の誘導が生体の骨格筋でも生じるか否かは明らかではない。この点を先行研究の限界として留意する必要がある。

本研究の目的

本研究では、持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加適応は、温熱刺激によって

相加的または相乗的に増強されるか否かを明らかにすることを目的とした。なお、温熱刺激を与えるタイミングは、運動後とした。その理由は、運動のパフォーマンス自体に影響を与えないため、運動後の介入が、運動前や運動中よりも適当なタイミングであると考えたからである。本研究の目的を達成するために、以下の検討課題を検証する。

1. 温熱刺激は、生体においても、骨格筋のミトコンドリアを増加させるか否かを明らかにする。
2. (温熱刺激が生体の骨格筋ミトコンドリアを増加させるのであれば) 運動後の温熱刺激は、持久的トレーニングによるミトコンドリア増加適応を相加的あるいは相乗的に増強させるか否かを明らかにする。
3. (温熱刺激が生体の骨格筋ミトコンドリアを増加させるのであれば) 分子メカニズムの解明のために、ミトコンドリア増加に貢献する細胞内情報伝達経路のうち、どの経路が温熱刺激によって活性化するのかを明らかにする。

方法

実験動物

6週齢の雄性ICRマウス(CLEA Japan)を被験対象とした。マウスは、23°C、12時間の明暗サイクルの環境で、1ケージあたり3-4匹で飼育した(ケージサイズ16.5 x 9.5 x 10.0 cm)。飼育期間中は、通常の飼料(MF, Oriental Yeast)および水を自由に摂取させた。2日間の実験環境への順化後、1日の休息日を設けて、3週間のトレーニング期間の開始とした。本研究で行った複数の実験(直腸温測定のための一過性実験、ミトコンドリア適応を評価するための3週間のトレーニング実験、温熱刺激による細胞内情報伝達経路の応答を評価するための一過性実験)は全て独立したものである。

実験デザイン

実験①：直腸温・体重測定のための一過性実験

一過性の温熱刺激が直腸温に与える影響を評価するための実験を行った。マウスを対照群(対照; n=6)、持久的運動群(運動; n=6)、温熱刺激群(温熱; n=6)、持久的運動後に温熱刺激を与えた群(運動+温熱; n=6)に分けた。それぞれ運動または温熱刺激が終了した直後に、イソフルランで麻酔を行い(導入:4%, 維持:3%, 流入速度:0.5 ml/min)、直腸温および体重の測定、尾静脈から採血を行った。さらに、介入終了6時間後に体重を再度測定した。なお、持久的運動および温熱刺激、直腸温測定、採血の方法は後述する。実験デザインの概略を以下の図で示す(図3-1)。



図3-1. 実験①：直腸温・体重測定のための一過性実験

実験②：ミトコンドリア適応を評価するための3週間のトレーニング実験

3週間の持久的トレーニング・温熱刺激が骨格筋のミトコンドリアに与える影響を評価するための実験を行った。マウスを対照群（対照; n=6）、持久的トレーニング群（トレ; n=6）、温熱刺激群（温熱; n=6）、持久的運動後に温熱刺激を与えた群（トレ+温熱; n=7）に分けた。トレーニング期間中は、週5回の頻度で持久的運動や温熱刺激による介入を行った。持久的トレーニング+温熱刺激群のマウスには、持久的運動終了後、5秒以内に温熱刺激を開始した。最終のトレーニングセッション終了40時間後の安静時に頸椎脱臼によりマウスを屠殺し、骨格筋として、速筋線維優位である足底筋および遅筋線維優位であるヒラメ筋を摘出した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図3-2）。

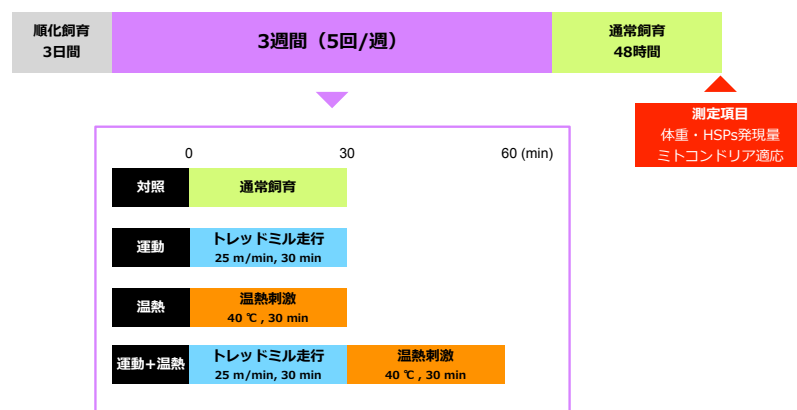


図3-2. 実験②：ミトコンドリア適応を評価するための3週間のトレーニング実験

実験③：温熱刺激による細胞内情報伝達経路の応答を評価するための一過性実験

温熱刺激がミトコンドリア増加に貢献する細胞内情報伝達経路に与える影響を評価するための実験を行った。マウスを対照群（対照; n=6）、持久的運動群（運動; n=7）、温熱刺激群（温熱; n=7）、持久的運動後に温熱刺激を与えた群（運動+温熱; n=7）に分けた。それぞれ運動または温熱刺激が終了した直後に頸椎脱臼によってマウスを屠殺し、骨格筋として足底筋とヒラメ筋を摘出した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図3-3）。

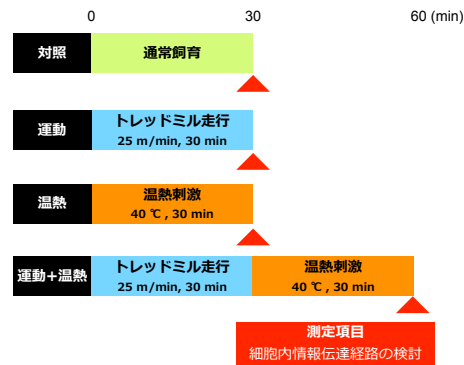


図 3-3. 実験③：温熱刺激による細胞内情報伝達経路の応答を評価するための一過性実験

持久的運動・トレーニング

持久的運動として、マウスにトレッドミル走行を行わせた。速度は 25 m/min で、時間は 30 分間、傾斜は 0° である。実験②の長期的なトレーニング実験では、上記と同等の条件で、週 5 回、3 週間の介入を行った。

温熱刺激

第 2 章で開発した温熱刺激装置を用いて、40 °C の暑熱環境へ 1 日 30 分間曝露する全身性の温熱刺激を本研究では採用した。非温熱刺激群のマウスは、温熱刺激用のチャンバーを 23 °C の通常飼育環境温度に設定し 30 分間曝露した。なお、水を浴びる行動が予備実験で観察されたため、曝露中は、餌および水を摂取させていない。実験②の長期的なトレーニング実験では、上記と同等の条件で、週 5 回、3 週間の介入を行った。

直腸温の測定

TC 熱電対 (E52-CA20AY D=3.2 4M, Omron) を温度センサーとして用いて、直腸温を測定した。温熱刺激を与えた直後にイソフルランを用いて、マウスに麻酔を施した (導入 : 4%, 維持 : 3%, 流入速度 : 0.5 ml/min)。温度センサーを肛門から約 1.5 cm 挿入した。リアルタイムで温度確認し、温

度が安定したと判断してから 10 秒間の平均温度を直腸温として記録した。なお、マウスに麻酔を施してから直腸温測定終了までの所要時間は、概ね 30 秒以内である。

血漿コルチコステロン濃度の測定

実験①において、運動または温熱刺激直後に、ヘパリン処理済みのヘマトクリット毛細管 (22-362-566, Thermo Fisher Scientific) を用いて、尾静脈から採血を行い、遠心分離 (10,000 rpm, 5min) を行うことでヘマトクリット成分と血漿成分に分けた。なお、本研究の持久的運動および温熱刺激は、ヘマトクリット値に影響を与えなかったことを確認している。血漿サンプルは、コルチコステロン濃度の分析まで -80 °C で保管した。血漿のコルチコステロン濃度は、市販の ELISA キット (Assaymax Corticosterone ELISA Kit, Assaypro, MO, USA) を用いて測定した。

ウエスタンブロット法によるタンパク質の発現量測定

ウエスタンブロットのためのサンプル調製

足底筋、ヒラメ筋を分析対象とした。プロテアーゼとホスファターゼの阻害剤を含んだ Lysis buffer (pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM Sodium Beta-glycerol Phosphate, 5 mM Sodium Pyrophosphate, 2 mM DTT, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10-15 µg/ml Leupeptin, 1 mM Na Orthovanadate, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride) で、ホモジナイザーを用いて組織を粉砕した。その後氷上で 30 分間インキュベート、1500xG で遠心分離し、その上清をサンプル溶液とした。サンプル溶液中のタンパク質の濃度を、Bradford 法を用いて測定し、サンプルに含まれるタンパク質濃度が 1 µg/µl となるように Buffer2 (10mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol, 1mM EDTA, pH 7.4) で希釈した。サンプル溶液 100 µl に対して、16%SDS 溶液を 30 µl 加え、100 °C で 10 分間加熱しウエスタンブロット用のサンプル溶液とした。

ウエスタンブロット

ウエスタンブロット法を用いて、タンパク質量を測定した。ミニプロテイン (Bio Rad) を組み立て、そこに 7.5-12% SDS-polyacrylamide gel を用い、サンプル 10 μ l を電気泳動によってタンパク質を分子量ごとに分離した。次に、ゲルから PVDF メンブレン (Hybond-P, Ge Healthcare Japan) にタンパク質を転写し、BSA/TTBS (3% BSA, 20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% Tween 20) で 1 時間ブロッキングを行った。その後 4 $^{\circ}$ C で 1 次抗体を一晩インキュベーションした。使用した 1 次抗体は、表 3-1 に記す。1 次抗体反応後、TTBS (20mM Tris Base, 137mM NaCl, 0.1mM HCl, 0.1% Tween 20) で 10 分間 \times 3 回洗浄した。2 次抗体は Goat Anti-mouse IgG (H+L) (American Qualex) または Goat Anti-rabbit IgG (H+L) (American Qualex) を用いて 1 時間インキュベーションした。2 次抗体反応後、TTBS (20mM Tris Base, 137mM NaCl, 0.1mM HCl, 0.1% Tween 20) で 10 分間 \times 3 回洗浄した。その後、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) により化学発光させスキャナー (Chemi Doc, Bio Rad) で撮影し、バンドを視覚化した。タンパク質の定量は Quantity One (Ver. 4.5.2, Windows, Bio Rad) を用いて行った。

クエン酸合成酵素 (CS) 最大活性の測定

サンプル調製

足底筋またはヒラメ筋を、Homogenate Buffer (100 mM KH_2PO_4 , 0.05% BSA, pH 7.3) でホモジナイズし (10 mg/ml)、サンプル溶液とした。

CS 最大活性の測定

CS の最大活性は、Srere の方法を用いて分析を行った (200)。37 $^{\circ}$ C に温めた試薬 (サンプル溶液 : 10 μ l、1 mM DTNB : 15 μ l、100 mM Tris-HCl pH 7.3 : 290 μ l、0.3 mM Acetyl CoA : 20 μ l) をキュベット内で混合した。その後、10 mM Oxaloacetate : 15 μ l を加えて、412 nm の吸光度の変化を 3 分

間測定した。

統計処理

すべてのデータは、平均値±標準誤差で示した。持久的運動（持久的トレーニング）および温熱刺激の二元配置分散分析を行った。交互作用が認められた場合は、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。統計的な有意水準は $P<0.05$ とし、 $P<0.10$ は、傾向として取り扱った。すべての統計処理は、JMP (Version 9.0.1, Macintosh, SAS Institute) を用いた。なお、本研究で用いた統計解析結果の解釈例は以下のとおりである。①本研究では持久的トレーニングと温熱刺激の両方の主効果が認められた場合 = 温熱刺激が持久的トレーニングによるミトコンドリアの適応を「相加的」に増強した。;②持久的トレーニングと温熱刺激の間に負の交互作用が認められた場合 = 持久的トレーニングと温熱刺激によるミトコンドリアの適応は、「相殺される」;③持久的トレーニングと温熱刺激の間に正の交互作用が認められた場合 = 温熱刺激が、持久的トレーニングによるミトコンドリアの適応を「相乗的に」増強した。

表 3-1. 一次抗体リスト

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
HSP60	Enzo Life Science	ADI-SPA-806	1:3000
HSP72	Enzo Life Science	ADI-SPA-810-D	1:3000
NDUFB8	Abcam	ab110413	1:1500
ATP5A			
COX IV	Abcam	ab14744	1:5000
P-AMPK T172	Cell Signaling Technology	2513	1:1000
AMPK	Cell Signaling Technology	2532	1:1000
P-ACC T79	Cell Signaling Technology	3661	1:1000
ACC	Cell Signaling Technology	3662	1:1000
P-p38 MAPK Th170/Ty182	Cell Signaling Technology	9211	1:1500
p38 MAPK	Cell Signaling Technology	9212	1:1500
P-CaMK II T286	Cell Signaling Technology	3361	1:1000
CaMK II	BD Bioscience	611292	1:1000
P-Akt S473	Cell Signaling Technology	9271	1:3000
P-Akt T308	Cell Signaling Technology	9275	1:3000
Akt	Cell Signaling Technology	9272	1:3000
P-p70S6K T389	Cell Signaling Technology	9205	1:1000
p70S6K	Cell Signaling Technology	9202	1:1000

結果

実験モデルのプロフィールおよび妥当性の検証

本研究では、実験モデルの妥当性を検証するために、①一過性の持久的運動後に温熱刺激を与えた後の直腸温および体重の変化、②長期的な温熱刺激が HSP60 および HSP72 のタンパク質量に与える影響を検討した。また、基礎的なデータとして、長期的な温熱刺激による形態変化（体重・脂肪組織重量・骨格筋重量）を検討した。

直腸温（実験①）（図 3-4）

持久的運動と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、持久的運動群または単独の温熱刺激群の直腸温は、対照群と比較して有意に高い値を示した。持久的運動後に温熱刺激を与えた群の直腸温は、その他の 3 群と比較して有意に高い値を示した。

運動または温熱刺激直後または 6 時間後の体重（実験①）（図 3-5）

持久的運動または温熱刺激直後において、持久的運動と温熱刺激の間に交互作用、持久的運動の主効果は認められなかった。一方、運動または温熱刺激直後において、温熱刺激による負の主効果が認められた。

運動または温熱刺激 6 時間後においては、持久的運動と温熱刺激の交互作用および、運動または温熱刺激の主効果は認められなかった。

HSP60 および HSP72 のタンパク質量（実験②）（図 3-6）

足底筋およびヒラメ筋の HSP60 と HSP72 のタンパク質量において、持久的運動と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、足底筋およびヒラメ筋の HSP60 と HSP72 のタンパク質量において、温熱刺激の正の主効果が認められた。

長期的な温熱刺激によるマウスの形態変化（実験②）（図 3-7）

体重において、持久的トレーニングと温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、体重において持久的トレーニングの負の主効果の傾向、温熱刺激による負の主効果が認められた。

精巣上体脂肪組織重量において、持久的トレーニングと温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、精巣上体脂肪重量において、持久的トレーニングおよび温熱刺激による負の主効果が認められた。

足底筋およびヒラメ筋の重量は、持久的トレーニングおよび温熱刺激によって高い値を示したものの、統計的な有意な交互作用や主効果を認めるには至らなかった。

直腸温

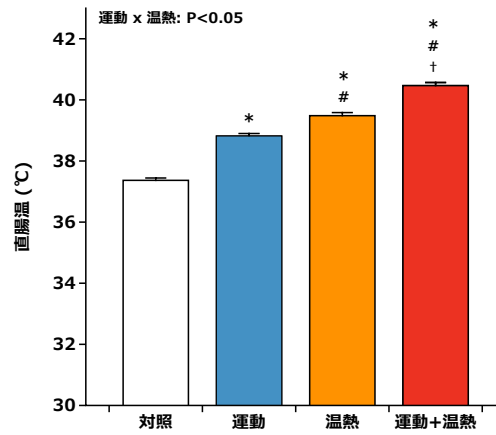
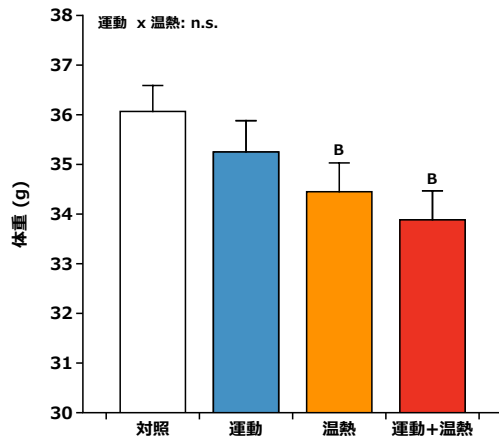


図 3-4. 一過性の持久的運動・温熱刺激後による直腸温の上昇

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。*P<0.05 vs 対照群, #P<0.05 vs 持久的運動群, †P<0.05 vs 温熱刺激群

体重 (直後)



体重 (6時間後)

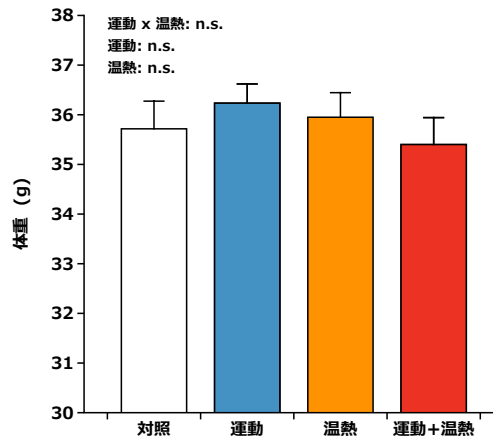
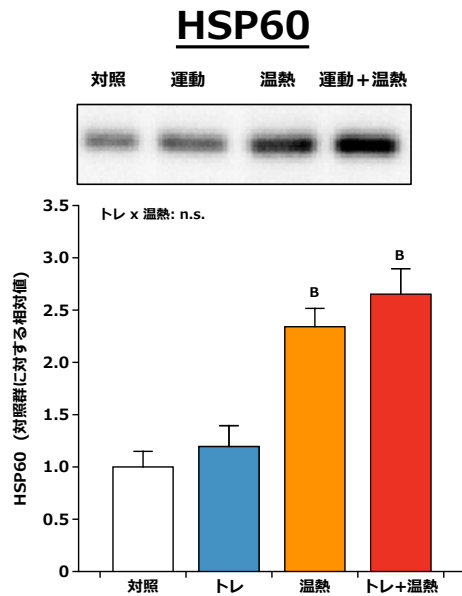


図 3-5. 一過性の温熱刺激後による体重の減少

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。B: P<0.05 温熱刺激の主効果。

足底筋



ヒラメ筋

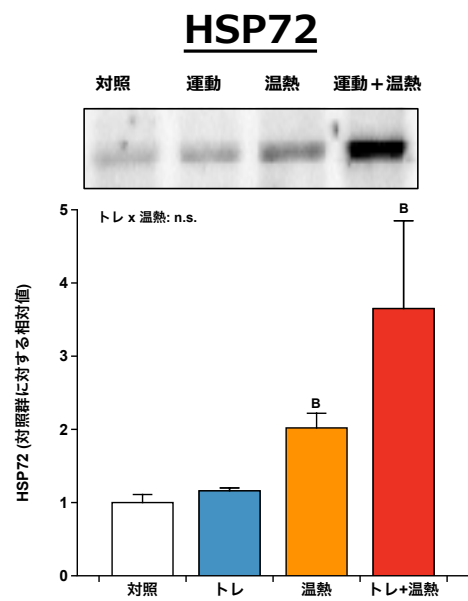
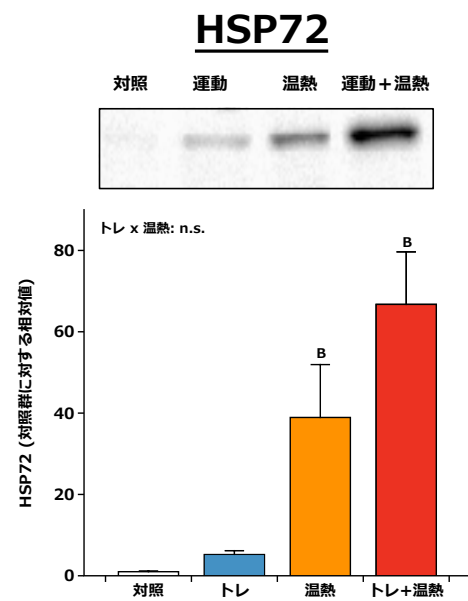
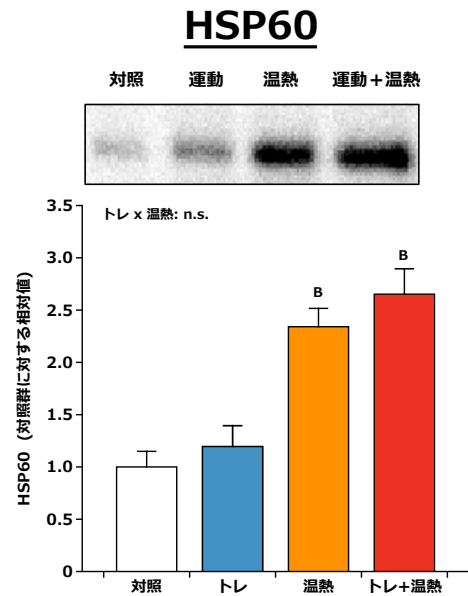


図3-6. 3週間の温熱刺激によって骨格筋のHSP60・HSP72のタンパク質量が増加した

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。B: P<0.05 温熱刺激の主効果。

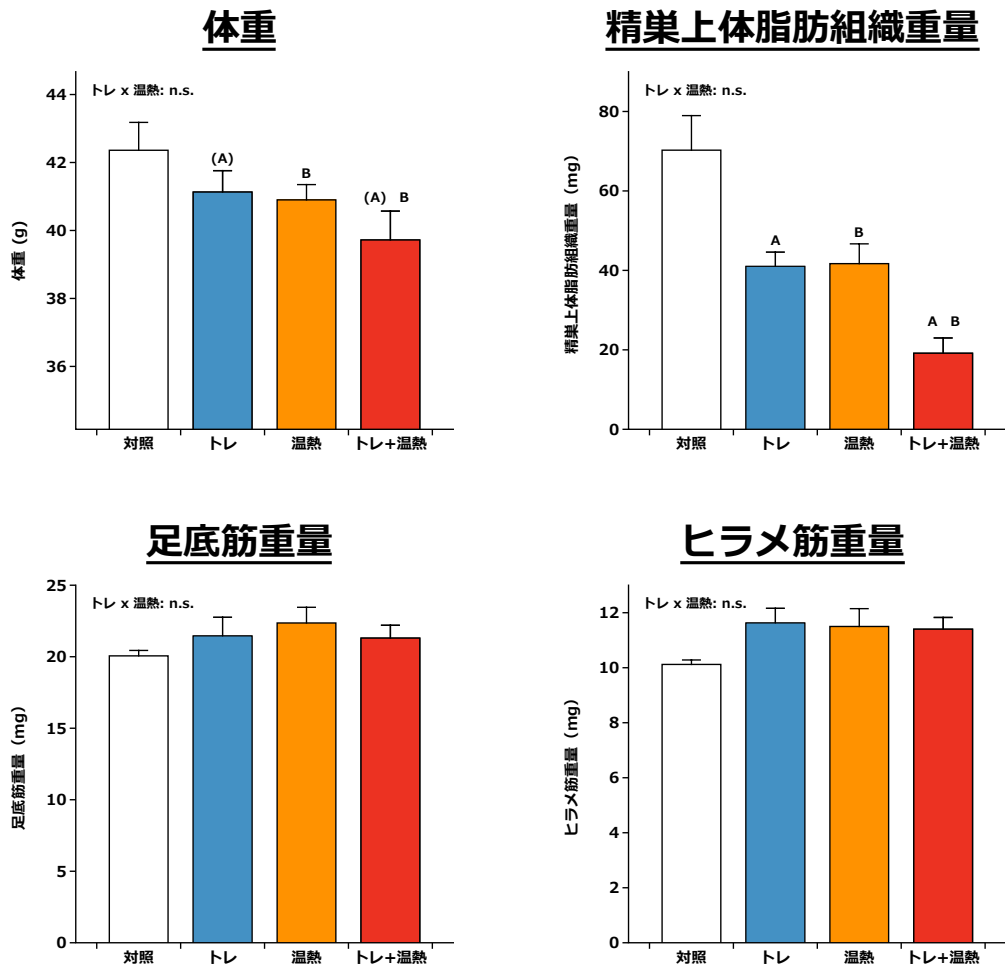


図 3-7. 3 週間の温熱刺激は、精巣上体の脂肪組織重量を減少させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。A : $P < 0.05$ 持続的トレーニングの主効果
 B : $P < 0.05$ 温熱刺激の主効果。(A) : $P < 0.10$ 持続的トレーニングの主効果の傾向

温熱刺激による長期的な骨格筋ミトコンドリアの適応

3週間の温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応を検証するために、先行研究に準じて①ミトコンドリア量の指標のひとつであるトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する酵素（NDUFB8, COX IV, ATP5A）のタンパク質量⁽¹⁸⁴⁾、②骨格筋の最大酸化能力の指標のひとつであるミトコンドリアのクエン酸合成酵素（CS）の最大活性⁽¹¹⁴⁾を検討した。

NDUFB8 タンパク質量（実験②）（図 3-8）

足底筋およびヒラメ筋の NDUFB8 のタンパク質量において、持久的トレーニングと温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、いずれの骨格筋においても持久的トレーニングと温熱刺激の正の主効果が認められた。

COX IV タンパク質量（実験②）（図 3-8）

足底筋およびヒラメ筋の COX IV のタンパク質量において、持久的トレーニングと温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。足底筋において、持久的トレーニングと温熱刺激の正の主効果が認められた。一方で、ヒラメ筋においては、持久的トレーニングの正の主効果が認められ、温熱刺激の正の主効果の傾向があった。

ATP5A タンパク質量（実験②）（図 3-8）

足底筋およびヒラメ筋の ATP5A のタンパク質量において、持久的トレーニングと温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、いずれの骨格筋においても、持久的トレーニングと温熱刺激の正の主効果が認められた。

CS 最大活性 (実験②) (図 3-9)

足底筋およびヒラメ筋の CS 最大活性において、持久的トレーニングと温熱刺激の間に相互作用は認められなかった。一方で、いずれの骨格筋においても、持久的トレーニングと温熱刺激の正の主効果が認められた。

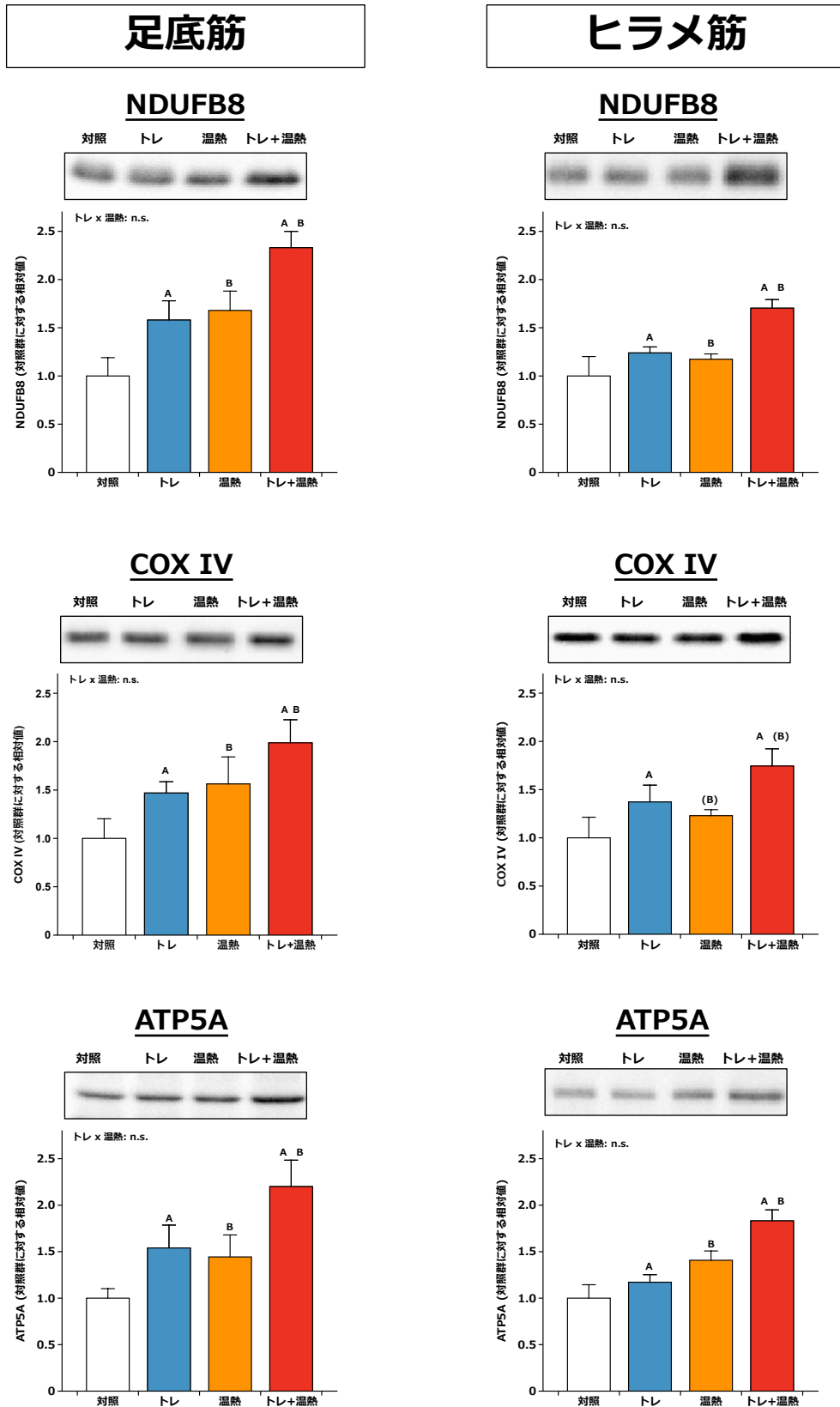
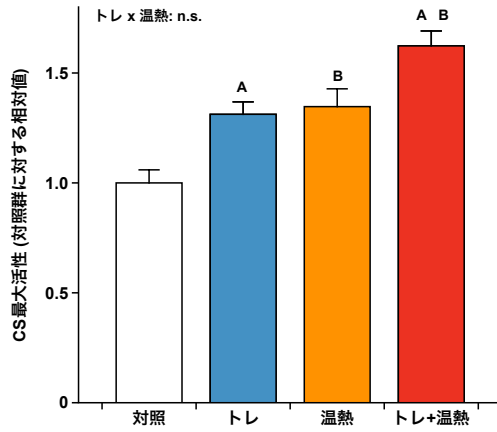


図 3-8. 温熱刺激は、持久的トレーニングによるミトコンドリアの呼吸鎖を構成するタンパク質の増加を相対的に増強する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。A : P<0.05 持久的トレーニングの主効果, B : P<0.05 温熱刺激の主効果。(B) : P<0.10 温熱刺激の主効果の傾向。

足底筋

足底筋 CS最大活性



ヒラメ筋

ヒラメ筋 CS最大活性

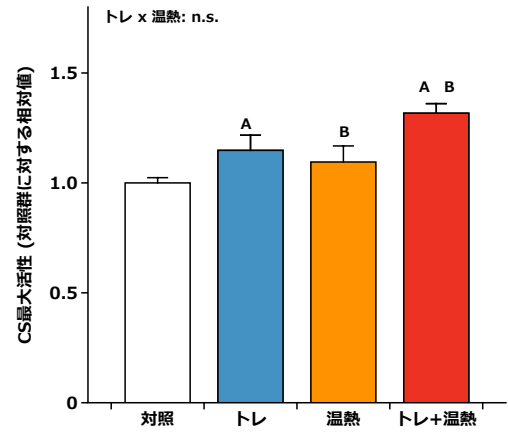


図 3-9. 温熱刺激は、持久的トレーニングによるミトコンドリア酵素活性の上昇を相加的に増強する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。A : $P < 0.05$ 持久的トレーニングの主効果, B : $P < 0.05$ 温熱刺激の主効果。

一過性の温熱刺激がミトコンドリア生合成を誘導する細胞内情報伝達経路に与える影響

温熱刺激によるミトコンドリア適応の分子メカニズムを解明するために、一過性の温熱刺激が、ミトコンドリア生合成を促進する細胞内情報伝達経路（持久的運動で活性化する経路：AMPK・p38 MAPK）および、それらを調節する因子に与える影響を検討した。

AMPK（実験③）（図 3-10）

本研究では、AMPK の活性化状態を評価するために、AMPK の総発現量に対するリン酸化（活性化型）AMPK の割合を検討した。また、AMPK によってリン酸化される下流標的である ACC のリン酸化状態を検討した。ACC のリン酸化状態は、AMPK の活性と高い相関関係にあることが示されている (38)。足底筋の AMPK のリン酸化状態および ACC のリン酸化状態において、持久的運動と温熱刺激の交互作用は認められなかった。一方で、足底筋の AMPK のリン酸化状態において、持久的運動の正の主効果、温熱刺激の負の主効果が認められた。また、足底筋の ACC のリン酸化状態において、温熱刺激の負の主効果の傾向がみられた。ヒラメ筋の AMPK のリン酸化状態において、持久的運動と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、持久的運動群が、対照群と比較して高値を示す傾向がみられた。また、温熱刺激群および持久的運動後に温熱刺激を与えた群は、対照群と持久的運動群と比較して有意に低い値を示した。ヒラメ筋の ACC のリン酸化状態において、持久的運動と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。また、持久的運動の主効果は認められなかったが、温熱刺激による負の主効果が認められた。

p38 MAPK（実験③）（図 3-11）

本研究では、p38 MAPK の活性化状態を評価するために、p38 MAPK の総発現量に対するリン酸化（活性化型）p38 MAPK の割合を検討した。足底筋の p38 MAPK のリン酸化状態において、持久的運動および温熱刺激の間に正の交互作用が認められた。多重比較の結果、持久的運動後に温

熱刺激を与えた群の p38 MAPK のリン酸化状態は、その他の 3 群と比較して有意に高い値を示した。ヒラメ筋の p38 MAPK のリン酸化状態において、持久的運動と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、ヒラメ筋の p38 MAPK のリン酸化状態において、持久的運動による正の主効果の傾向がみられ、温熱刺激による正の主効果が認められた。

CaMK II (実験③) (図 3-12)

p38 MAPK の活性化状態を高めた候補として、CaMK II が活性化した可能性に着目した。CaMK II の総発現量に対するリン酸化（活性化型）CaMK II の割合を検討した。足底筋およびヒラメ筋の CaMK II のリン酸化状態において、持久的運動と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。また、いずれの骨格筋においても、持久的運動または温熱刺激の主効果は認められなかった。

血漿コルチコステロン濃度 (実験①) (図 3-13)

p38 MAPK の活性化状態を促進した候補として、循環中のコルチコステロン濃度に着目した。血漿コルチコステロン濃度において、持久的運動と温熱刺激の正の交互作用が認められた。多重比較の結果、持久的運動後に温熱刺激を与えた群は、他の 3 群と比較して、有意に血漿コルチコステロン濃度が高い値を示した。

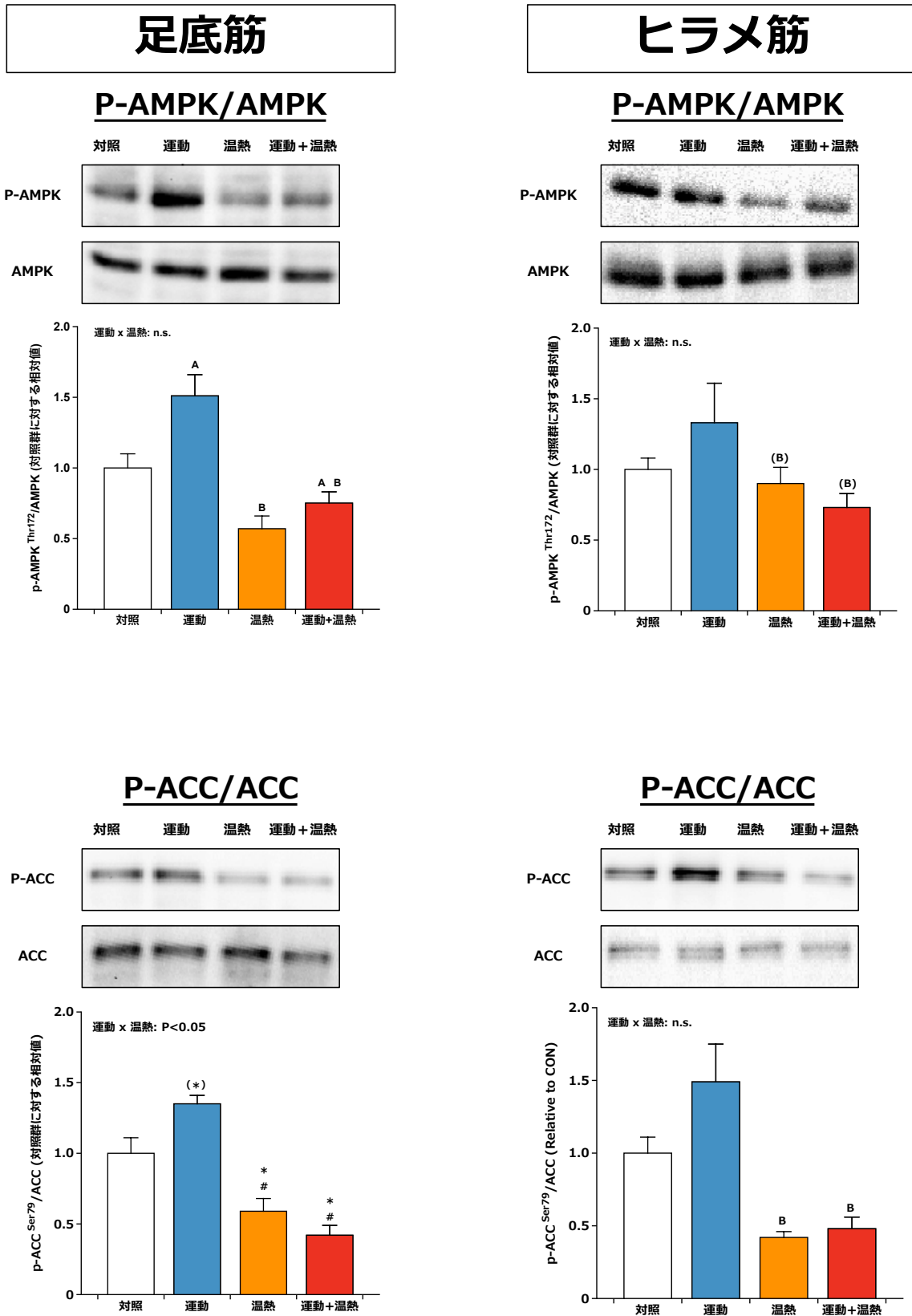


図 3-10. 一過性の温熱刺激は、AMPK を不活性型に移行させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。A : $P < 0.05$ 持久的トレーニングの主効果, B : $P < 0.05$ 温熱刺激の主効果, (B) : $P < 0.10$ 温熱刺激の主効果。* $P < 0.05$ vs 対照群, (*) $P < 0.10$ vs 対照群, # $P < 0.05$ vs 持久的運動群

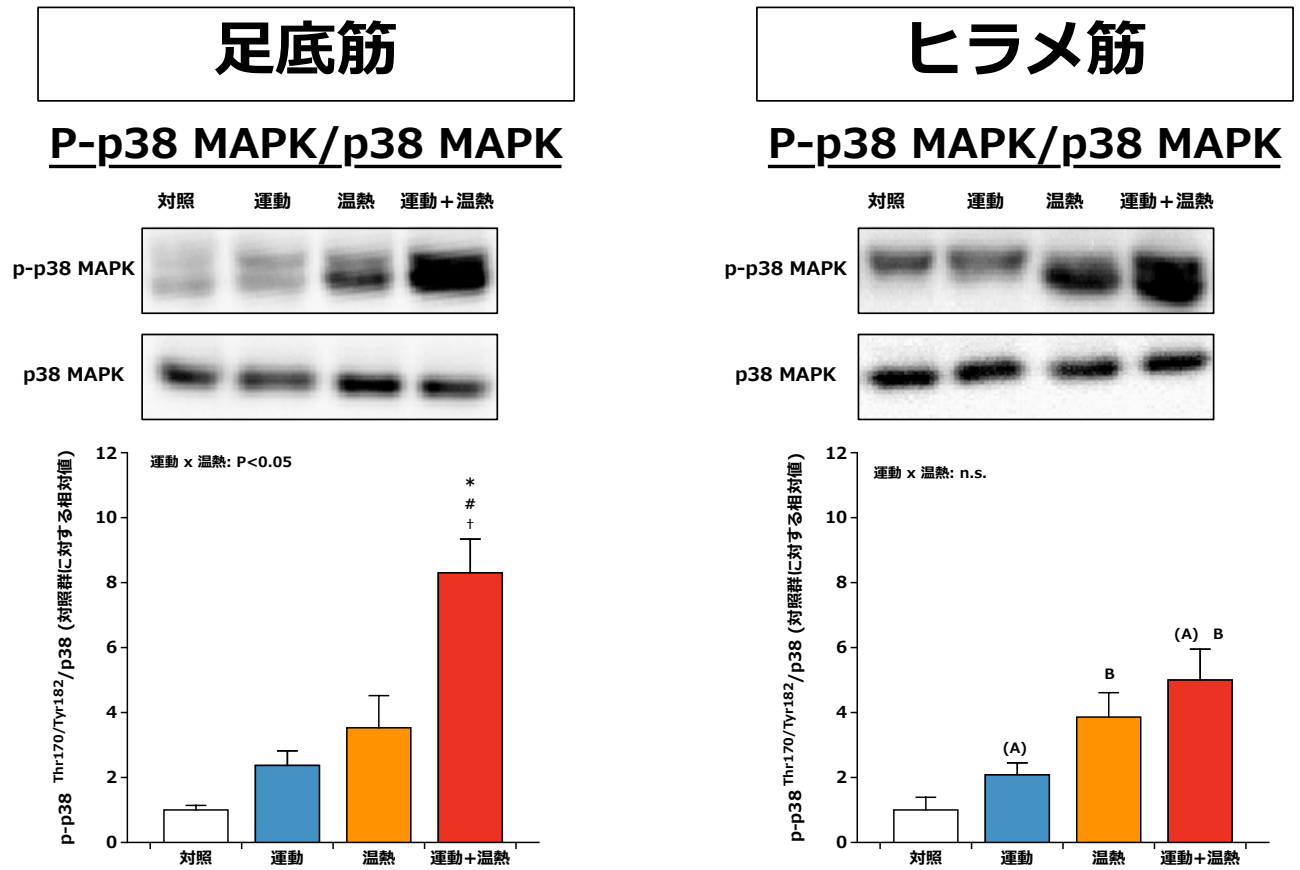


図 3-11. 一過性の温熱刺激は、p38 MAPK を活性化型に移行させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。A : P<0.05 持久的トレーニングの主効果, (A) : P<0.10 持久的トレーニングの主効果, B : P<0.05 温熱刺激の主効果。*P<0.05 vs 対照群, #P<0.05 vs 持久的運動群, †P<0.05 vs 温熱刺激群

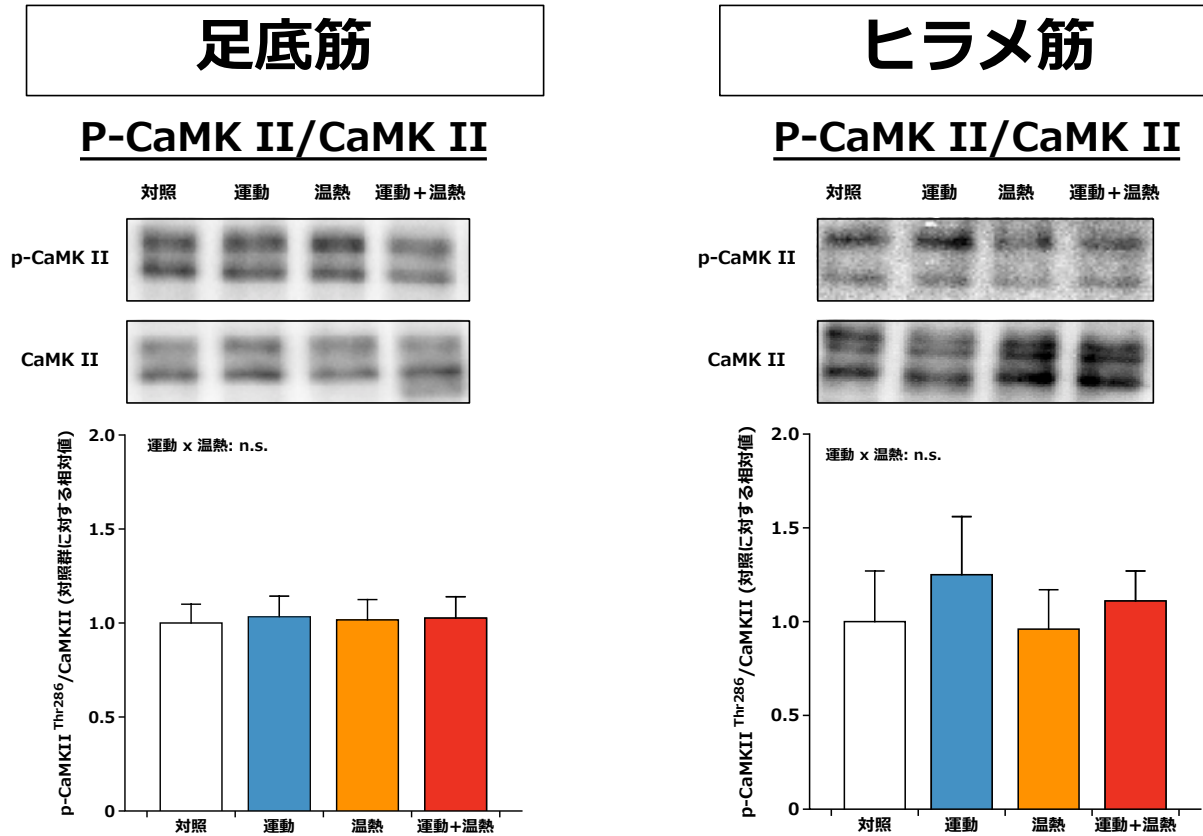


図 3-12. 一過性の温熱刺激は、CaMK II の活性化状態に影響を与えない
データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。

血漿コルチコステロン濃度

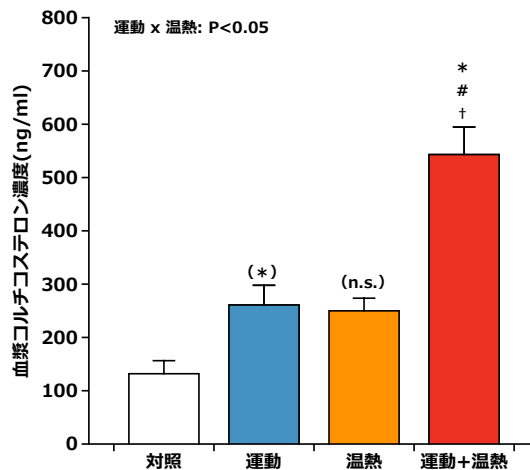


図 3-13. 運動後の温熱刺激は、血漿コルチコステロン濃度を相乗的に上昇させる
データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。*P<0.05 vs 対照群, (*)P<0.10 vs 対照群, #P<0.05 vs 持久的運動群, †P<0.05 vs 温熱刺激群, n.s. 有意差なし

一過性の温熱刺激がミトコンドリア生合成を誘導する細胞内情報伝達経路に与える影響

続いて、温熱刺激がミトコンドリア遺伝子の転写および翻訳の促進に関わる mTORC1 の経路に与える影響を評価した。mTORC1 の活性の指標として、mTORC1 によってリン酸化される下流標的 p70S6K (93, 192) を検討した。また、mTORC1 を活性化させる上流因子である Akt のリン酸化状態（≒活性化状態）を評価した。

p70S6K (実験③) (図 3-14)

足底筋およびヒラメ筋の p70S6K のリン酸化状態において、持久的運動と温熱刺激の交互作用は認められなかった。また、持久的運動による主効果は認められなかったが、温熱刺激による正の主効果が認められた。

Akt (実験③) (図 3-15)

足底筋およびヒラメ筋の Akt のリン酸化状態 (Ser473・Thr308) において、持久的運動と温熱刺激の交互作用は認められなかった。また、持久的運動による主効果は認められなかったが、温熱刺激による正の主効果が認められた。

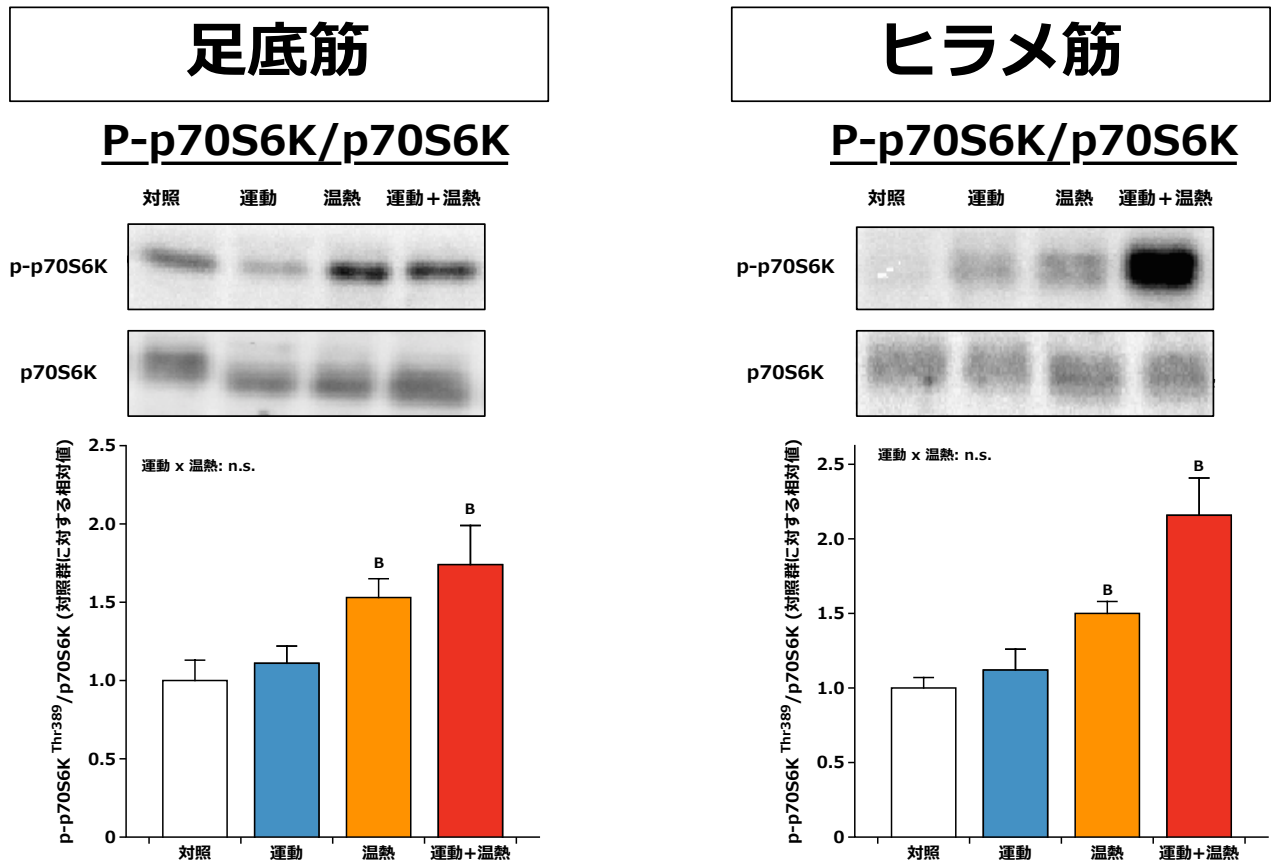


図 3-14. 一過性の温熱刺激は、mTORC1 を活性化させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。B : P<0.05 温熱刺激の主効果。

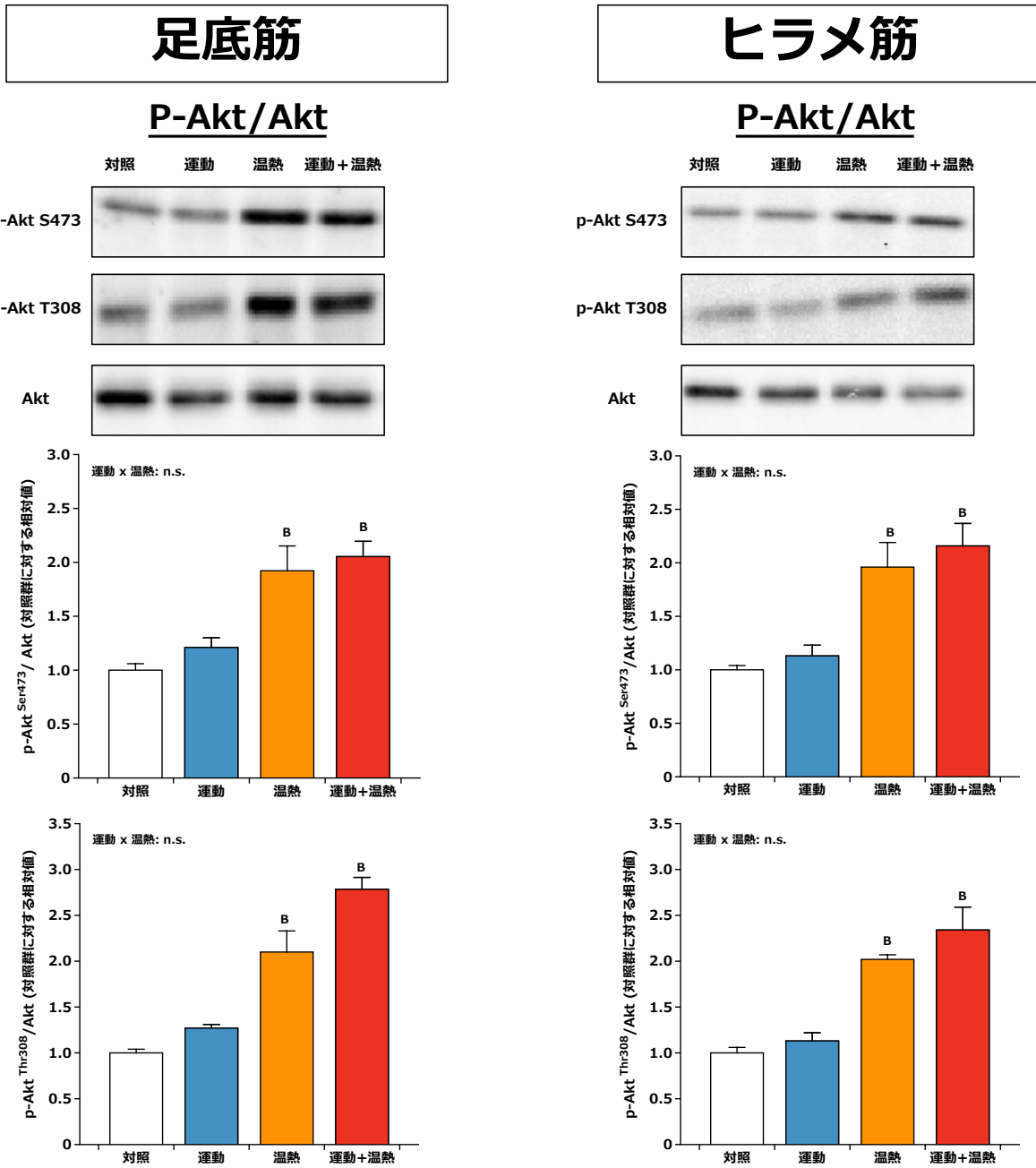


図 3-15. 一過性の温熱刺激は、mTORC1 を活性化させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。B : P < 0.05 温熱刺激の主効果。

相関関係の分析

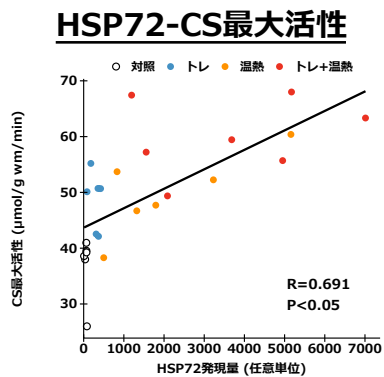
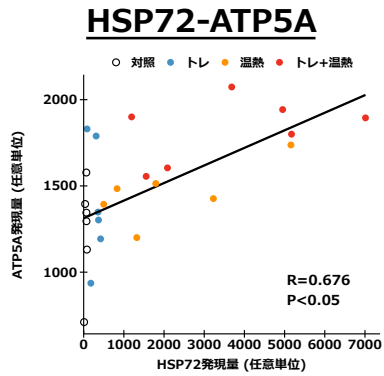
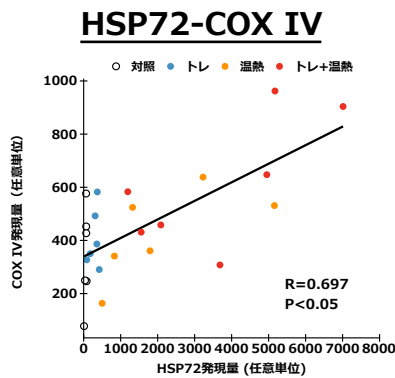
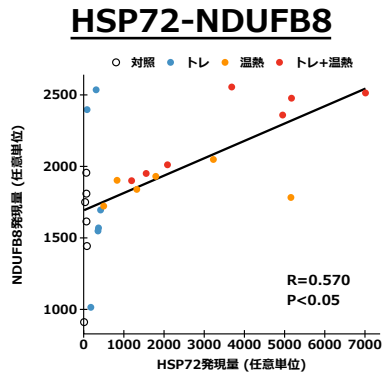
長期的な実験における HSP72 発現量とミトコンドリア量・最大酸化能力の指標 (実験②) (図 3-16)

足底筋では、HSP72 の発現量とミトコンドリアの適応 (NDUFB8・COX IV・ATP5A の発現量および CS 最大活性) の間に有意な正の相関関係が認められた。しかし、ヒラメ筋においては、有意な相関関係を認めなかった。

一過性実験における p38 AMPK のリン酸化状態および Akt のリン酸化状態 (実験③) (図 3-17)

足底筋およびヒラメ筋において、一過性実験における p38 MAPK のリン酸化状態および Akt (Ser473・Thr 308) のリン酸化状態の間に有意な正の相関関係が認められた。

足底筋



ヒラメ筋

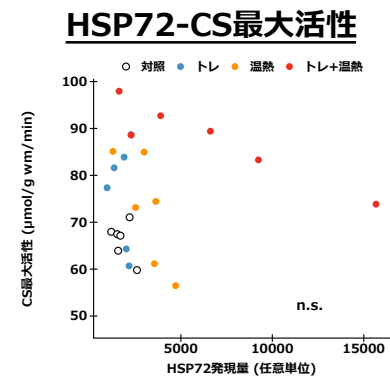
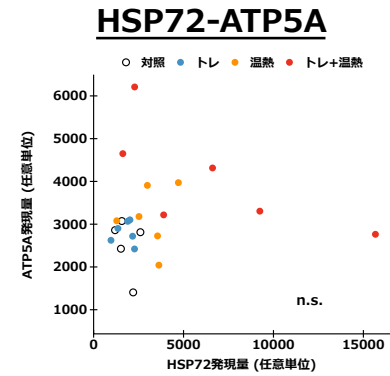
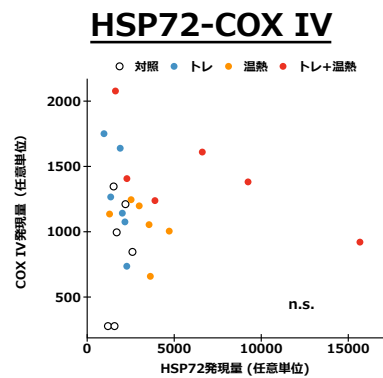
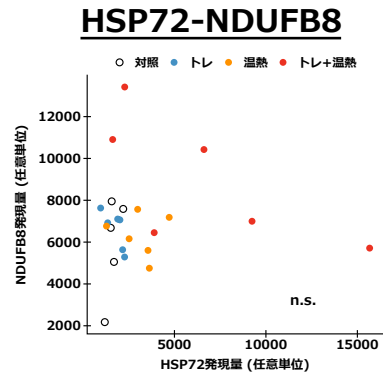
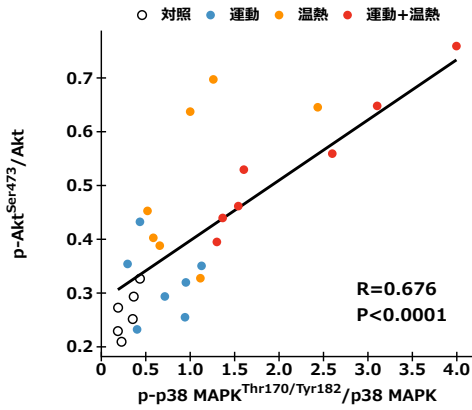


図 3-16. 足底筋では、HSP72 とミトコンドリア適応は、正の相関関係にある

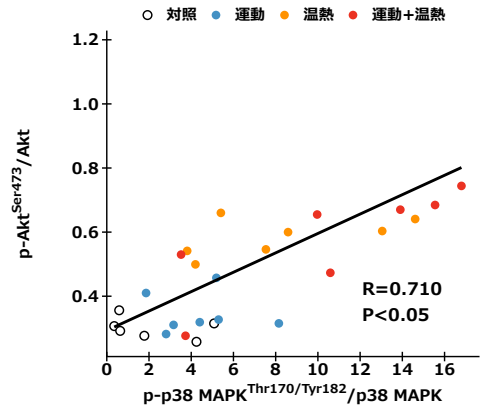
足底筋

P-Akt(S473) — P-p38 MAPK

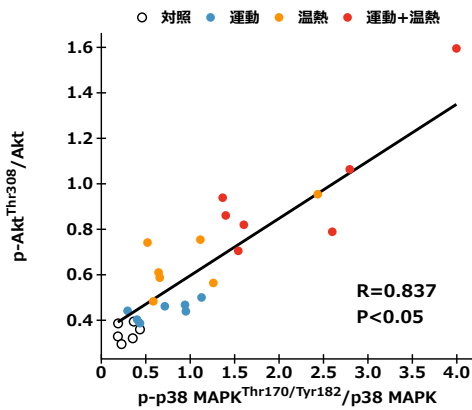


ヒラメ筋

P-Akt (S473) — P-p38 MAPK



P-Akt (T308) — P-p38 MAPK



P-Akt (T308) — P-p38 MAPK

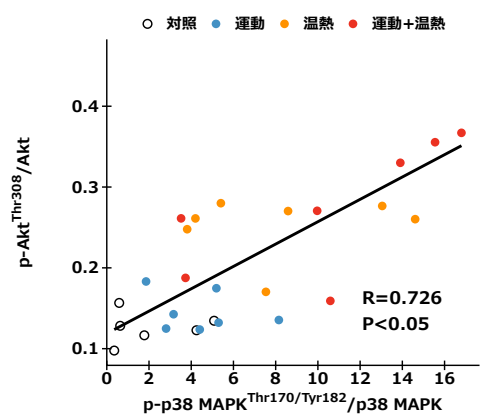


図 3-17. 一過性の温熱刺激による p38 MAPK のリン酸化状態と Akt のリン酸化状態には、正の相関関係が認められた

考察

実験モデルのプロフィールおよび妥当性の検証

本研究で採用した持久的運動・トレーニングは、トレッドミル走行 (25 m/min, 30 min) である。予備的検証において、本研究で用いた ICR マウスの乳酸作業性閾値は、20.8 m/min であった。また先行研究では、ICR マウスを 25 m/min で走行させた場合、90 分程度で疲労困憊に至ることが示されている(205)。したがって、本研究で採用した持久的運動・トレーニング (25 m/min, 30 min) は、低～中強度・容量であったと考えられる。本研究でこの持久的運動・トレーニング方法を採用した理由は、①運動後の温熱刺激によるミトコンドリア適応の促進効果を、より観察できる余地を残すため、②スポーツ現場において、十分なトレーニングを実施できない場面での応用を想定したためである。

本研究では、持久的運動直後に温熱刺激を与える実験モデルである。したがって、運動後に温熱刺激を与えることについて一層の妥当性の検証や生理応答について把握する必要があると考えられた。単独の一過性温熱刺激によって、直腸温が第2章と同水準まで上昇した (図 3-4)。さらに、持久的運動後に温熱刺激を与えることで、さらなる直腸温の上昇が認められた。しかし、上昇した直腸温は、平均で 40.5 °C であり、第2章で熱中症を定義とした 42.0 °C を越える例もなく、生理的範囲内であると考えられる。また、温熱刺激によって脱水と考えられる体重減少が認められたが (図 3-5)、一過的なものであり、温熱刺激後 6 時間後には、対照群と同水準にまで回復した (図 3-5)。したがって、温熱刺激を運動直後に与えたとしても熱中症の病態は示さないと解釈される。また、本研究においても、骨格筋へ温熱刺激が伝わっているか否かについての生化学的指標として、HSP のタンパク質量を検討した。その結果、3 週間のトレーニング期間における日常的な温熱刺激によって足底筋およびヒラメ筋における HSP60 (ミトコンドリア局在型) と HSP72 (細胞質局在型) の発現量の増加が認められた (温熱刺激の正の主効果) (図 3-6)。つまり、本研究の温熱刺激は、熱中症の病態を示すことはなく、かつ十分に骨格筋に温熱刺激が伝わっていることを示し、本研究モデル

の妥当性が保証される。

温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応

本研究ではまず、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応として、ミトコンドリア量について検討した。先行研究に準じて (184)、ミトコンドリア量の指標のひとつとしてミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成するタンパク質 (NDUFB8, COX IV, ATP5A) の量を評価した。その結果、持久的トレーニングだけではなく、温熱刺激による正の主効果が認められた (図 3-8)。この結果は、温熱刺激によって骨格筋ミトコンドリアの量が増加した可能性を示唆する。さらに、運動後の温熱刺激と持久的トレーニングの間に負の交互作用は認められなかった (図 3-8)。この結果は、運動後に温熱刺激を与えても両介入によるミトコンドリア量の増加効果は相殺されないことを示す。本研究では、続いて骨格筋の最大酸化能力の指標のひとつ (114) として、ミトコンドリアのクエン酸合成酵素 (CS) の最大活性を評価した。その結果、ミトコンドリア量の適応と同様に、持久的トレーニングだけではなく、温熱刺激によっても CS 最大活性が上昇すること (持久的トレーニングおよび温熱刺激による正の主効果) (図 3-9)、運動後に温熱刺激を与えても両介入による CS 最大活性の上昇効果が相殺されないことが明らかとなった (持久的トレーニングと温熱刺激の間に負の交互作用は認められない) (図 3-9)。これらの結果は、温熱刺激によってミトコンドリア量の増加や骨格筋の最大酸化能力の上昇といったミトコンドリアの適応が得られた可能性を示す。さらに、運動後の温熱刺激は、持久的トレーニングによるミトコンドリアの適応が相加的に増強されることが明らかとなった。これらの結果は、本研究の仮説を支持するものである。

生体の骨格筋ミトコンドリアの量が、温熱刺激によって増加することを示した報告は、本研究が初めてである。ところで、温熱刺激によるミトコンドリアの適応は、定性的には足底筋およびヒラメ筋に違いは認められなかった。しかし温熱刺激によるミトコンドリアの適応の程度は、ヒラメ筋と比較して足底筋で大きかった。足底筋とヒラメ筋は、骨格筋線維組成 (32, 66) や運動単位の動員

様式 (127)、血流配分 (115) が異なる。したがって、これらの性質の違いが、温熱刺激によるミトコンドリアの適応の程度の違いを生じさせた可能性がある。先行研究では、高脂肪食によって骨格筋のミトコンドリア量が増加することが示されている (78)。しかし、高脂肪食によるミトコンドリア量の増加効果は、温熱刺激によって消失することが報告されている (ただし、通常食摂取マウスへの温熱刺激介入効果は、未検討である) (75)。したがって、温熱刺激による相加的なミトコンドリア量の増加効果は普遍的なものではなく、生体内環境に高く依存する可能性が示唆される。

温熱刺激によって増加したミトコンドリアが機能的であるか否か、また、温熱刺激によって増加したミトコンドリアの性質については検討に至っておらず、本研究の限界点のひとつである。したがって、①温熱刺激によるミトコンドリアの増加が、実際に持久的パフォーマンスの向上 (例：ミトコンドリア増加に伴う持久的運動中のグリコーゲン利用割合の低下) に貢献するか否かについて、②温熱刺激によって増加したミトコンドリアの性質について検討を重ねる必要がある。

温熱刺激がミトコンドリア増加に貢献する細胞内情報伝達経路に与える影響

持久的運動によって活性化する経路に着目して

本研究では、温熱刺激がミトコンドリアを増加させた分子メカニズムの解明を目指して、一過性の温熱刺激が、ミトコンドリアの増加に貢献する細胞内情報伝達経路に与える影響について明らかにすることを目的として検討を行った。

持久的運動中のエネルギー需要の増大や骨格筋のグリコーゲンの減少によって、AMP や ADP が細胞内に蓄積する (=エネルギー状態の低下)。AMP の増加に応じて、AMPK と呼ばれるエネルギー状態のセンサーとしての役割を担う分子がリン酸化 (≒活性化) する (233)。一方で、骨格筋収縮に伴う力学的ストレスや酸化ストレス、浸透圧の変動は、細胞のストレスを惹起する。このような細胞ストレスによって p38 MAPK と呼ばれる細胞ストレスのセンサーとしての役割をもつ分子がリン酸化 (≒活性化) する (95)。よって本研究では、「持久的運動による AMPK および p38 MAPK

の活性化を、温熱刺激が相加的または相乗的に促進したのではないかと仮説を設定し検証を行った。

持久的運動によって、AMPK のリン酸化状態（≒AMPK の活性化状態）および AMPK の下流標的分子である ACC のリン酸化状態（AMPK 活性の指標）が、足底筋およびヒラメ筋で上昇または上昇する傾向がみられた（図 3-10）。これらの結果は、先行研究と同様に、持久的運動によって AMPK が活性化する傾向にあると解釈される。本研究の持久的運動で、AMPK の顕著な活性化が認められなかった理由として、運動強度設定が考えられる。先行研究では、運動による AMPK の活性化は、運動強度に高く依存することが示されている (50)。骨格筋の培養細胞を対象とした先行研究では、温熱刺激によるミトコンドリア生合成は、AMPK の活性化が関与することが示されている (125)。また、ラットの摘出筋に温熱刺激を与えると AMPK が活性化することも報告されている (108)。そこで本研究では当初、生体においても温熱刺激による骨格筋のミトコンドリア量の増加は、AMPK の活性化が関与するであろうと予測していた。しかし、予測に反して温熱刺激は、足底筋およびヒラメ筋のリン酸化 AMPK および ACC を低下させることが示された（図 3-10）。これらのデータは、温熱刺激は、AMPK を不活性化させたと解釈される（図 3-10）。骨格筋に限らず、温熱刺激が生体の AMPK 活性に与える影響を検討した研究は本研究が初めてである。したがって、本研究で得られた結果を他の報告と直接的に比較することはできない。しかし、ヒト肝臓がん由来の培養細胞（HepG2）を対象とした研究では、温熱刺激が AMPK を不活性化させると報告されている (220)。興味深いことに、その報告では、温熱刺激による AMPK の不活性化の原因は、エネルギー状態の変化ではなく、細胞膜由来のリン脂質セラミドの増加であると結論づけられている (220)。したがって、本研究で認められた温熱刺激による AMPK の不活性化は、①*in vivo* と *in vitro* の差異というよりも、温熱刺激条件（温度・時間など）の差異に依存する可能性が高いこと、②ホルモンといった液性因子に依存した可能性は低いこと、③エネルギー状態の変化を反映していない可能性もあることが示唆される。温熱刺激による AMPK の応答をより深く理解するためには、幅広い温熱刺

激条件での検討が必要であろうと考えられる。

運動後の温熱刺激は、運動による p38 MAPK のリン酸化状態（≡p38 MAPK の活性化状態）の上昇を足底筋では相乗的に、ヒラメ筋では相加的に増強させることが明らかとなった（図 3-11）。この結果は、温熱刺激は、p38 MAPK を活性化させたと解釈される。

ところで、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇は、CaMK II を介して p38 MAPK を活性化させることが知られている (228)。そこで、p38 MAPK の活性化を誘導した上流因子を検討するために、CaMK II のリン酸化状態（≡活性化状態）を評価した。CaMK II のリン酸化状態は、持久的運動および温熱刺激によって変化を認めなかった（図 3-12）。先行研究によると、CaMK II は高強度運動時に顕著な活性化が誘導されることや (50)、中強度運動であれば運動開始 10 分といった運動初期に活性化することが知られている (179)。本実験で採用した持久的運動は、中程度の強度で、運動時間は 30 分間であったため、本実験の持久的運動プロトコールでは、CaMK II の活性化が十分に誘導されない、または CaMK II が活性化していたとしても活性化を検出できなかった可能性がある。同様に、温熱刺激も CaMK II のリン酸化状態に影響を与えなかった（図 3-12）。この結果は、運動後あるいは単独の全身性温熱刺激は、細胞内の Ca^{2+} 動態に影響しない可能性を示唆し、温熱刺激による p38 MAPK の活性化は Ca^{2+} -CaMK II の以外の経路が関与した可能性を示唆するものである。

ところで、p38MAPK は、ホルモンやサイトカインなどの液性因子によっても活性化されることが知られている (169)。温熱刺激は、直接的な筋温上昇だけではなく、液性因子の応答を誘導する (120)。そこで本研究では続いて、温熱刺激による p38 MAPK 活性化を誘導した他の上流因子の候補として液性因子に着目した。液性因子の中でも副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンは、p38 MAPK を活性化させることが示されており (123)、本研究の分析対象とした。本研究では、血漿中のコルチコステロン濃度が、運動後の温熱刺激で相乗的に上昇することが明らかとなった（図 3-13）。したがって、運動後の温熱刺激による p38 MAPK の相乗的・相加的な活性化は、循環中のコルチ

コステロン濃度の上昇が貢献した可能性が示唆される。この知見は、温熱刺激による p38 MAPK 活性化メカニズムを今後より詳細に探るためには、骨格筋の組織レベルだけではなく、液性因子の影響など全身レベルに至るまで幅広く検討する必要性を示唆するものである。

タンパク質合成の中核「mTORC1」の経路に着目して

本研究では、ミトコンドリア増加に貢献しうる経路として mTORC1 にも着目した。mTORC1 は、ミトコンドリア増加を転写・翻訳の両レベルで調節することから (44, 146)、近年注目を集めている経路の一つである。先行研究では、①温熱刺激が骨格筋のタンパク質合成を高め骨格筋を肥大させること (159, 216)、②mTORC1 の活性は、AMPK が負に制御していることが示されている (188, 101)。さらに、本研究において、温熱刺激による AMPK の不活性化が認められている。これらの知見は、温熱刺激が mTORC1 の経路を活性化させる可能性を示唆する。そこで本研究では続いて、温熱刺激によるミトコンドリア増加に関わるメカニズムの解明を目指して、「温熱刺激によって mTORC1 が活性化するか否か」について検討した。その結果、足底筋およびヒラメ筋において mTORC1 の下流標的分子であり、mTORC1 活性の指標である p70S6K のリン酸化状態が、温熱刺激によって上昇することが明らかとなった (図 3-14)。さらに、温熱刺激による mTORC1 の活性化機序を深く理解するために、mTORC1 を活性化させる上流分子である Akt について検討を行った。その結果、温熱刺激によって、Akt のリン酸化状態 (Ser473 と Thr308 のリン酸化) が温熱刺激によって上昇した (図 3-15)。温熱刺激による mTORC1 の活性化は、mTORC1 活性を正に制御する Akt の活性化と mTORC1 活性を負に制御する AMPK の不活性化の両方で説明される。温熱刺激による AMPK の不活性化の潜在的な分子機序は上述のとおりである。ここでは、温熱刺激による Akt の活性化に関わる潜在的な分子機序について論議する。

糖代謝やタンパク質代謝などの様々な細胞のプロセスを制御している Akt は、リン酸化されることで活性化する。Akt はリン酸化のサイトとして Thr308 と Ser473 がある。Akt を最大に活性

化させるためには Thr308 と Ser473 の両方のリン酸化が必要であると考えられている (7)。インスリンや成長因子、成長ホルモンは、PI3K/PDK1 の経路を介して、Akt の Thr308 をリン酸化することが知られているが (7,8)、Akt の Ser473 は、PI3K/mTORC2 の経路によってリン酸化されることが明らかにされているもの (191)、十分な理解には至っていない。先行研究でも、温熱刺激によって Akt の活性化が誘導されることが明らかとなっている (157,236)。しかし、温熱刺激が Akt を活性化させる詳細なメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。実験動物を対象とした先行研究では、温熱刺激による Akt の Ser473 のリン酸化は、温度依存的に起こることが明らかにされている (236)。また、培養細胞を対象とした先行研究では、細胞へのストレスによって活性化する p38 MAPK を薬理的または遺伝子工学的に阻害すると、温熱刺激による Akt の Ser473 のリン酸化が抑制されることが明らかにされている (16)。なお、本研究では、p38 MAPK のリン酸化状態と Akt の Ser473 のリン酸化状態との間に高い正の相関関係が認められた (図 3-17)。これらの結果は、骨格筋の温度上昇に伴うストレスの増大が、p38 MAPK の活性化を介して Akt の Ser473 のリン酸化を誘導した可能性を示唆する。一方、温熱刺激による Akt の Thr308 リン酸化が、温度依存的に生じるか否か、p38 MAPK の阻害によって抑制されるか否かは明らかではない。しかし本実験では、Akt の Thr308 のリン酸化状態と p38 MAPK のリン酸化状態との間にも高い正の相関関係が認められた (図 3-17)。この結果は、Akt の Thr308 のリン酸化も骨格筋の温度上昇に伴うストレスの増大によって誘導された可能性を示唆するものである。ただし、本実験では、実験動物を対象に、全身性の温熱刺激を採用しているため、全身の循環を介した影響も考慮しなければならない。本実験では、インスリンや成長因子、成長ホルモンの濃度を検討していないため、インスリンや成長因子、成長ホルモンの分泌が PI3K/PDK1 を介して Akt の Thr308 のリン酸化を誘導した可能性も排除できない。実際に、実験動物を暑熱環境へ曝露すると、成長ホルモンの分泌が増加することも報告されている (42,56)。したがって、温熱刺激によって Akt/mTORC1 経路が活性化したより詳細なメカニズムを明らかにするためには、インスリンや成長因子、成長ホルモンの分泌とい

った循環を介した影響にも注意を払う必要があると考えられる。

ミトコンドリア生合成のマスター遺伝子「PGC-1 α 」に着目して

上述の通り、温熱刺激は p38MAPK と mTORC1 の経路を活性化させることが明らかとなった。p38 MAPK および mTORC1 の活性化は、PGC-1 α を活性化させることが知られている (4, 169)。しかし、PGC-1 α の活性化や発現量上昇が、温熱刺激によって実際に誘導されるか否かは、本研究では検討に至っておらず、今後検討を行うべき課題の一つである。今回、温熱刺激による PGC-1 α の適応を評価できなかったことは、以下の 2 つの背景による。①先行研究では、運動による PGC-1 α の活性化・発現量増加は、運動直後ではなく、運動終了数時間後に観察されることが示されている（運動様式・強度・時間に依存する）(15, 187)。②本研究の一過性の実験では、温熱刺激直後のミトコンドリア生合成に関与する因子の応答を明らかにすることを主目的として検討を行った。PGC-1 α の活性化を評価するためには、運動や温熱刺激後からの経時変化を検討することで解決できると考えられる。ところで、他の研究グループのデータによると、温熱刺激 3 時間後に PGC-1 α が骨格筋の核内へ移行（≒活性化）することや、ミトコンドリア関連遺伝子の mRNA 量が増加することが明らかにされている (103)。本研究と対象とした動物種（C57BL/6J）や温熱刺激方法（40 °C の暑熱環境に 60 分間曝露）は異なるが、本研究の温熱刺激によっても PGC-1 α の活性化や転写レベルでのミトコンドリア量の増加応答が誘導された可能性は高いと考えられる。

Heat Shock Protein に着目して

核の DNA にコードされているミトコンドリアのタンパク質や転写因子は、細胞質で翻訳され、タンパク質前駆体として合成される。前駆タンパク質は、HSP60 や HSP72 によってミトコンドリアへ輸送され、タンパク質の立体構造が構築される。したがって、温熱刺激による HSP60 や HSP72 の増加は、翻訳後レベルにおいてミトコンドリア生合成を促進した可能性がある。特に、

ミトコンドリアの生合成に HSP72 が果たす役割が近年注目されている。著者らの報告 (208) と同時期に、骨格筋特異的に HSP72 を過剰発現させることによって、PGC-1 α の発現量の変化を伴わずに、ミトコンドリア量が増加することが報告されている (81)。本研究においては、足底筋の HSP72 の発現量とミトコンドリアの適応の間に高い正の相関関係を認めている (図 3-16)。一方でヒラメ筋においては、このような正の相関関係を認められなかった。したがって、本研究においても、HSP72 がミトコンドリア量の増加に貢献したとしても、その貢献度は骨格筋の種によって異なるかもしれない。温熱刺激がミトコンドリアを増加させたと考えられるメカニズムの概念図を図 3-18 に示す。

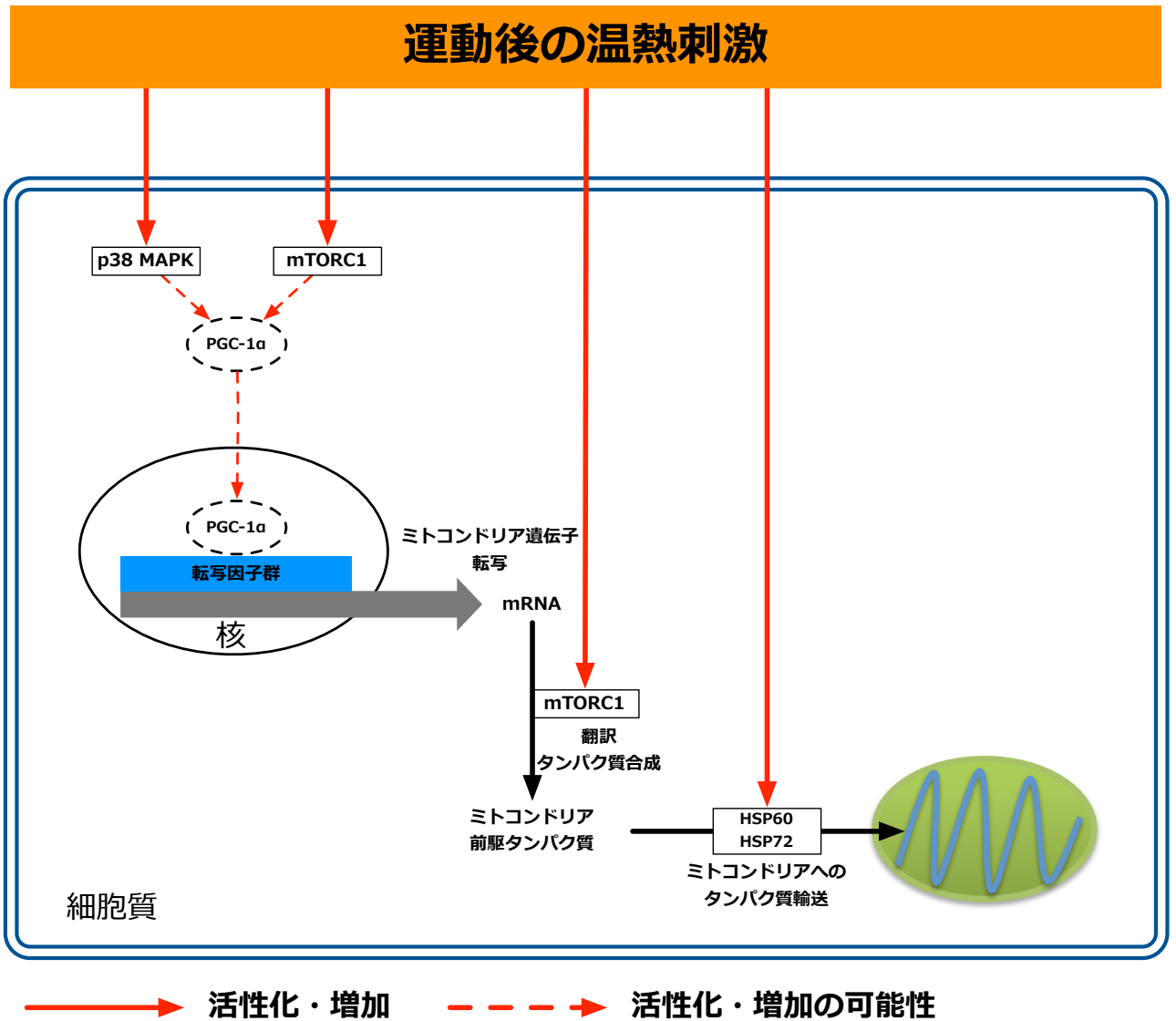


図 3-18. 運動後の温熱刺激がミトコンドリア生成を促進した想定されるメカニズム

第3章のまとめ

第3章の前半では、温熱刺激を応用した効果的なトレーニング方法の可能性を検証するために、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応を検討した。その結果、温熱刺激は、生体の骨格筋（足底筋・ヒラメ筋）のミトコンドリア量の指標のひとつであるミトコンドリア呼吸鎖（NDUFB8, COX IV, ATP5A）のタンパク質量を増加させ、骨格筋の最大酸化能力の指標のひとつであるミトコンドリアの酵素活性（CS最大活性）を上昇させることが明らかとなった。さらに、運動後の温熱刺激は、持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応を相加的に増強することが明らかとなった。

第3章の後半では、温熱刺激がミトコンドリアの適応を誘導した分子メカニズムの解明を目指して、一過性の温熱刺激（単独・運動後）が、ミトコンドリア増加に関わる細胞内情報伝達経路に与える影響を検討した。その結果、①ミトコンドリア遺伝子の転写を促進する p38 MAPK の活性化（p38 MAPK のリン酸化状態の上昇）、②ミトコンドリア遺伝子の転写・翻訳を促進する mTORC1 の活性化（p70S6K のリン酸化状態の上昇）が認められた。

第4章

除神経による骨格筋のミトコンドリア量の減少を

温熱刺激が抑制するか？



緒言

骨格筋量や機能は、神経支配によって保たれている。しかし、脊髄損傷といった外傷性の神経損傷や、糖尿病性神経障害、筋萎縮性側索硬化症などの運動神経の疾患は、骨格筋の脱神経支配を引き起こす。骨格筋の脱神経支配は、骨格筋萎縮や筋力低下や疼痛、さらには、骨代謝異常の原因となる(24)。骨格筋は、運動器としてだけでなく、代謝・内分泌器官として全身の健康に深く関与することが知られており(51)、脱神経支配に伴う骨格筋萎縮や機能不全を防ぐことは、神経損傷患者の生活の質を維持する上で有用である。しかし、脱神経支配による骨格筋萎縮への効果的な治療法は、未だ確立していない(209)。病理・病態の解明や治療法の開発を目指して、動物実験を中心に脱神経支配による骨格筋機能不全に関わる分子・細胞機序の理解に取り組まれてきた。

脱神経支配は、骨格筋萎縮だけではなく、ミトコンドリア毒性(例：ミトコンドリアによる過剰な活性酸素種の生成、ミトコンドリア量の減少、酸化能力の低下、細胞内 Ca^{2+} 濃度の異常)も誘導する(62, 129, 156, 225)。近年では、ミトコンドリアの毒性は、骨格筋萎縮に代表される骨格筋の機能不全の原因となることが明らかにされつつある。その根拠として、①骨格筋の不活動によって骨格筋萎縮が誘導されるよりも前に、ミトコンドリアが減少し最大酸化能力が低下すること(138)、②ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤を与えることで、骨格筋萎縮が抑制されること(139)、③ミトコンドリア分解を制御するタンパク質(Parkin や Muf1)を骨格筋で欠損させることで、坐骨神経切除によるミトコンドリア減少および骨格筋萎縮が抑制されること(62)、④ミトコンドリア生合成のマスター遺伝子である PGC-1 α を骨格筋で過剰発現させることで、後肢懸垂や坐骨神経切除による骨格筋萎縮が抑制されることが挙げられる(31, 189)。上述のミトコンドリア毒性により骨格筋萎縮に関わる転写因子群(FoxOs や Nrf1)が活性化・増加することや、骨格筋萎縮に関わるタンパク質の発現が促進される。これらの研究は、脱神経支配による骨格筋萎縮に対してミトコンドリア量を保持することが新たな治療方法となる可能性を強く示唆するものである。

第3章では、温熱刺激が、骨格筋ミトコンドリア遺伝子の転写を促進する細胞内情報伝達経路を

活性化させ、実際にミトコンドリア量が増加することを明らかにした。さらに、Naito らは、「後肢懸垂」によって誘導された骨格筋萎縮は、温熱刺激によって軽減することを明らかにしている (150)。これらの研究は、温熱刺激が、脱神経支配による骨格筋ミトコンドリア減少および骨格筋萎縮を抑制する可能性を示唆するものである。

上述のように、脱神経支配による骨格筋ミトコンドリア減少および骨格筋萎縮を抑制する手段として温熱刺激は有力な候補である。ただし、これまでに2つの重要な問題が未解決であり、仮説の域を脱しない。第一の問題は、温熱刺激が、本当に「脱神経支配」によるミトコンドリア減少および骨格筋萎縮も抑制するか否かは不明であることである。その背景として、①脱神経支配による骨格筋萎縮は、後肢懸垂などの他の骨格筋萎縮モデルと比較して、独特な細胞応答を示すことや (87, 209)、②ギプス固定で誘導された骨格筋萎縮を抑制する薬剤が、脱神経支配による骨格筋萎縮には治療効果を示さないことが挙げられる (132)。第二の問題は、脱神経支配を含め、不活動状態の骨格筋ミトコンドリアに温熱刺激が与える影響は、これまでに一切検討された例がないことである。

本研究の目的

本研究では、温熱刺激を利用した効果的なりハビリテーション方法の開発を目指して、以下の検討課題を設定し、検証を行った。なお、本研究では、実験的に骨格筋の脱神経支配を誘導する方法として、坐骨神経を切除する方法を採用した。本研究では以降、和文誌で一般的に記述されている「除神経」と表記する。

1. 温熱刺激は、除神経による骨格筋萎縮を抑制するか否かを明らかにする。
2. 温熱刺激は、除神経による骨格筋ミトコンドリアの減少を抑制するか否かを明らかにする。

3. (温熱刺激が、脱神経支配による骨格筋ミトコンドリアの減少を抑制するのであれば) 分子メカニズムの解明のために、ミトコンドリアの量的制御に関わるミトコンドリア生合成機構およびミトコンドリア分解機構に、温熱刺激が与える影響を明らかにする。

方法

実験動物

8週齢の雄性ICRマウス（CLEA Japan）を被験対象とした。マウスは23℃、12時間の明暗サイクルの環境で、個別に飼育した（ケージサイズ：16.5 cm×9.5 cm×10.0 cm）。飼育期間中は、通常の飼料および水を自由に摂取させた。マウスを非温熱刺激群または温熱刺激群に無作為に分けた。全てのマウスに片脚の坐骨神経切除手術を施した（後述）。本研究で行った複数の実験は全て独立したものである（後述）。本研究では、腓腹筋を中心に生化学分析を行った（足底筋およびヒラメ筋は、骨格筋重量測定とCS最大活性の測定のみ）。その理由は、生化学分析（ウエスタンブロット実験・ミトコンドリア単離実験）で多くの骨格筋重量が必要であるからである。

実験デザイン

実験①：除神経および温熱刺激によるミトコンドリアおよび骨格筋重量の適応を検討

除神経および日常的な温熱刺激によるミトコンドリア量および骨格筋重量に与える影響を検討するための実験を行った。マウスを非温熱刺激群または温熱刺激群に無作為に分けた。全てのマウスに片脚の坐骨神経切除手術を施した。除神経手術3日後から9日後（計7回）にかけて温熱刺激による介入を行った。除神経手術10日後かつ最終の温熱刺激から24時間後にイソフルラン（導入：4%，維持：3%，流入速度：0.5 ml/min）により麻酔処置を行った後、腓腹筋を摘出した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図4-1）。

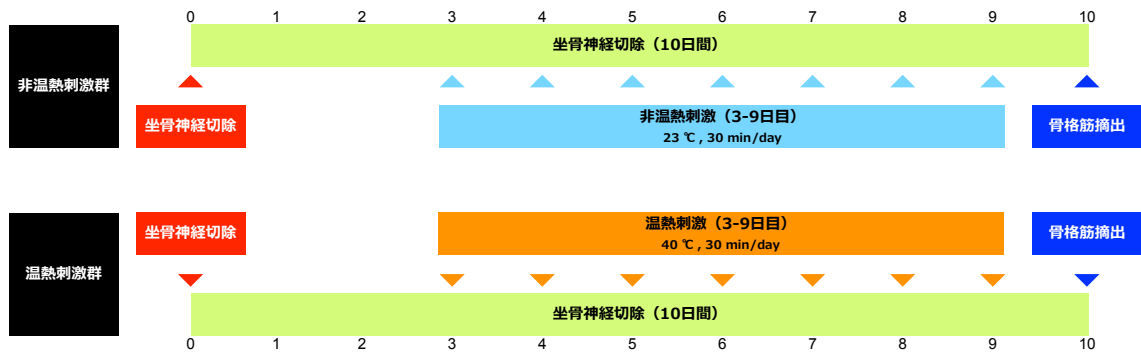


図 4-1. 実験①：ミトコンドリア量および骨格筋重量の適応を検討するための実験

実験②：除神経および温熱刺激によるミトファジーの適応を検討

除神経および日常的な温熱刺激が、ミトファジーに与える影響を検討するための実験を行った。マウスを非温熱刺激群または温熱刺激群に無作為に分けた。全てのマウスに片脚の坐骨神経切除手術を施した。除神経手術3日後から9日後（計7回）にかけて温熱刺激による介入を行った。除神経手術10日後かつ最終の温熱刺激から24時間後にイソフルラン（導入：4%，維持：3%，流入速度：0.5 ml/min）により麻酔処置を行った後、腓腹筋を摘出した。摘出した新鮮な腓腹筋から、下記の方法を用いてミトコンドリア分画を単離した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図 4-2）。



図 4-2. 実験②：ミトファジー関連タンパク質を検討するための実験

実験③：除神経および温熱刺激が、ミトファジー誘導量に与える影響を検討

除神経および温熱刺激が、ミトファジー誘導量に与える影響を評価するための実験を行った。

マウスを非温熱刺激群または、温熱刺激群、非温熱刺激+コルヒチン投与群、温熱刺激+コルヒチン投与群に無作為に分けた。全てのマウスに片脚の坐骨神経切除手術を施した。実験②と同様な実験を行い、組織摘出の24時間前に、コルヒチン投与群には、コルヒチンを腹腔内投与した（後述）。コルヒチン投与24時間後にイソフルラン（導入：4%，維持：3%，流入速度：0.5 ml/min）により麻酔処置を行った後、腓腹筋を摘出した。腓腹筋を摘出後、後述の方法を用いて腓腹筋からミトコンドリア分画を単離した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図4-3）。

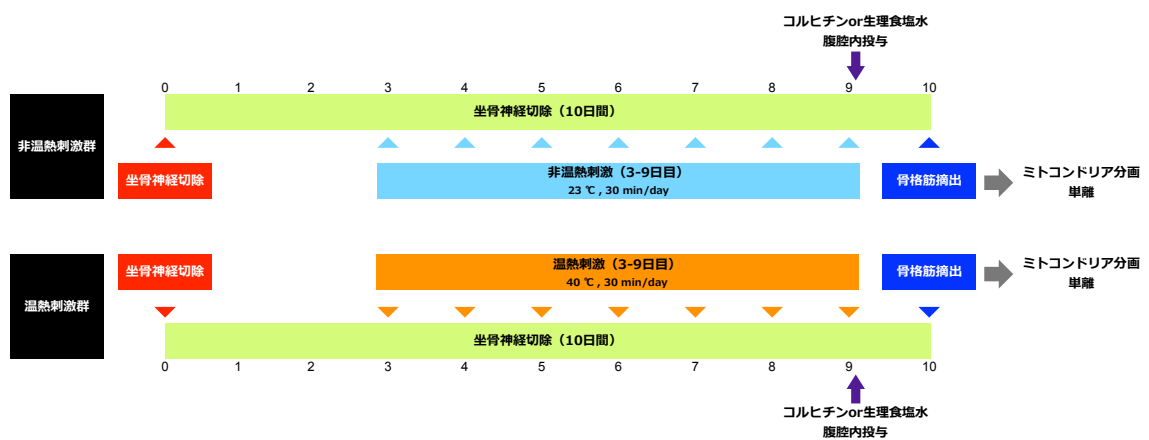


図4-3. 実験③：マイトファジー流動を評価するための実験

実験④：除神経および温熱刺激が、オートファジー誘導量に与える影響を検討

除神経および温熱刺激が、オートファジー誘導量に与える影響を評価するための実験を行った。マウスを非温熱刺激群または、温熱刺激群、非温熱刺激+コルヒチン投与群、温熱刺激+コルヒチン投与群に無作為に分けた。全てのマウスに片脚の坐骨神経切除手術を施した。実験②と同様な実験を行い、組織摘出の24時間前に、コルヒチン投与群には、コルヒチンを腹腔内投与した（後述）。コルヒチン投与24時間後にイソフルラン（導入：4%，維持：3%，流入速度：0.5 ml/min）により麻酔処置を行った後、腓腹筋を摘出した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図4-4）。

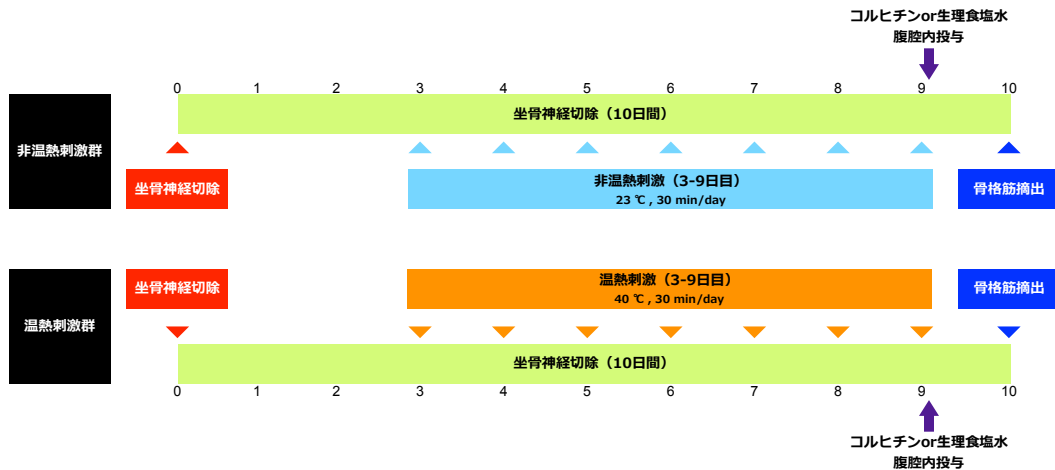


図 4-4. 実験④：オートファジー流動を評価するための実験

実験⑤：一過性の温熱刺激が、除神経骨格筋へ与える影響の評価

温熱刺激による一過性細胞応答の繰り返しが除神経骨格筋へ影響を与えた可能性を検討するための実験を行った。マウスを非温熱刺激群または、温熱刺激群に無作為に分けた。全てのマウスに片脚の坐骨神経切除手術を施した。手術後 10 日間、ケージ内で通常飼育条件とし、最後に一過性の温熱刺激または非温熱刺激を与えた。30 分間の温熱刺激の介入直後にインフルラン（導入：4%，維持：3%，流入速度：0.5 ml/min）により麻酔処置を行った後、腓腹筋を摘出した。実験デザインの概略を以下の図で示す（図 4-5）。



図 4-5. 実験⑤：一過性の温熱刺激が、除神経骨格筋へ与える影響を評価するための実験

実験的な骨格筋脱神経支配の誘導

本研究では、実験的に骨格筋の脱神経支配 (Denervation) を誘導する方法として、マウスの坐骨神経を外科的に切除する方法を選択した。この方法は、先行研究において、脱神経支配モデルおよび骨格筋萎縮モデルとして広く採用されている。麻酔下のマウスの左後肢を切開し (5 mm)、坐骨神経から腓骨神経、脛骨神経に分岐する点から、0.7-0.8 mm の範囲に渡って坐骨神経を切除した。なお、右後肢は偽手術肢として、切開後坐骨神経を切除せずに縫合した。

温熱刺激方法

本研究では、第2章・第3章と同等な方法で温熱刺激を与えた (方式: 暑熱環境への曝露、温度: 40 °C、時間: 30 分/日)。10 日間の除神経期間のうち、7 回 (3~9 日目) の介入を行った。マウスを単匹用の飼育ケージから温熱刺激または非温熱刺激用のケージ (16.5×9.5×10.0 cm ; 3-4 匹) に移した。非温熱刺激群のマウスには、23 °C の通常飼育環境温度に設定した温熱刺激装置内に曝露した。曝露中は、餌および水の摂取を制限した。

直腸温の測定

直腸温は、TC 熱電対 (E52-CA20AY D=3.2 4M, Omron) を温度センサーとして測定した。マウスを保定した後、温度センサーを肛門から約 1.5 cm 挿入した。リアルタイムで温度確認し、温度が安定したと判断してから 10 秒間の平均温度を直腸温として記録した。なお、マウスを保定開始から測定終了までの所要時間は、概ね 30 秒以内である。

ウエスタンブロット方によるタンパク質の発現量測定

ウエスタンブロットのためのサンプル調製

凍結粉碎し、均一になった腓腹筋分析対象とした。プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤

を含んだ Lysis buffer (pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM Sodium Beta-glycerol Phosphate, 5 mM Sodium Pyrophosphate, 2 mM DTT, 10 µg/ml Pepstatin A、10 µg/ml Aprotinin、10 µg/ml Leupeptin、1 mM Na Orthovanadate、1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride)で、ホモジナイザーを用いて組織を粉砕した。その後氷上で 30 分間インキュベート、1500xG で遠心分離し、その上清をサンプル溶液とした。サンプル溶液中のタンパク質の濃度を、Bradford 法を用いて測定し、サンプルに含まれるタンパク質濃度が 1 µg/µl となるように Buffer2 (10mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol, 1mM EDTA, pH 7.4) で希釈した。サンプル溶液 100 µl に対して、16%SDS 溶液を 30 µl 加え、100 °C で 10 分間加熱しウエスタンブロット用のサンプル溶液とした。

ウエスタンブロット

ウエスタンブロット法を用いて、タンパク質の発現量を測定した。ミニプロテイン (Bio Rad) を組み立て、そこに 7.5-12% SDS-polyacrylamide gel を用い、サンプル 10 µl を電気泳動によってタンパク質を分子量ごとに分離した。次に、ゲルから PVDF メンブレン (Hybond-P, Ge Healthcare Japan) にタンパク質を転写し、BSA/TTBS (3% BSA, 20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 mM HCl, 0.1% Tween 20) で 1 時間ブロッキングを行った。その後 4 °C で 1 次抗体を一晩インキュベーションした。使用した 1 次抗体は、表 4-1, 表 4-2. に記す。1 次抗体反応後、TTBS (20mM Tris Base, 137mM NaCl, 0.1mM HCl, 0.1% Tween 20) で 10 分間×3 回洗浄した。2 次抗体は Goat Anti-mouse IgG (H+L) (American Qualex) または Goat Anti-rabbit IgG (H+L) (American Qualex) を用いて 1 時間インキュベーションした。2 次抗体反応後、TTBS (20mM Tris Base, 137mM NaCl, 0.1mM HCl, 0.1% Tween 20) で 10 分間×3 回洗浄した。その後、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)により化学発光させスキャナー (Chemi Doc, Bio Rad) で撮影し、バンドを視覚化した。タンパク質の定量は Quantity One (Ver. 4.5.2, Windows, Bio Rad) を用いて行った。

CS 最大活性の測定

サンプル調製

凍結粉砕し均一になった腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋を、の Homogenate Buffer (100 mM KH_2PO_4 , BSA, pH 7.3) でホモジナイズ (10 mg/1 ml) し、サンプル溶液とした。

CS 最大活性の測定

CS の最大活性は、Srere (1969) の方法を用いて分析を行った。37°C に温めた試薬 (サンプル溶液 : 10 μl 、1 mM DTNB : 15 μl 、100 mM Tris-HCl pH 7.3 : 290 μl 、0.3 mM Acetyl CoA : 20 μl) をキュベット内で混合した。その後、10 mM Oxaloacetate : 15 μl を加えて、412 nm の吸光度の変化を 3 分間測定した。

オートファジーおよびミトファジーの誘導量の評価

先行研究に準じて (97, 137)、オートファジーおよびミトファジーが、どの程度誘導されたか (autophagic/mitophagic flux) を評価するために、コルヒチンを用いて、オートファゴソームの最終的な分解を遮断した。マウスに生理食塩水またはコルヒチン (0.4 mg/kg/day) を最終の温熱刺激直後に腹腔内投与した。この処理により、除神経 9 日目から 10 日目の間にどの程度オートファジーまたはミトファジーが誘導されたかを評価することができる。

ミトコンドリア分画の単離

ミトファジーを評価するために、ミトコンドリアを単離した。ミトコンドリア分画 (Mitochondria-enriched/associated fraction) を Safdar らの方法に従い腓腹筋から単離した (187)。腓腹筋をミトコンドリア単離用のバッファー (67 mM sucrose, 50 mM Tris, 50 mM KCl, 10 mM EDTA and 0.2% (w/v) fatty acid-free bovine serum albumin, pH 7.4) 内でホモジナイザーを用いて破碎した。

懸濁溶液を 700xG, 15 min, 4 °C で遠心分離を行い、上清を回収した。さらに上清を 12000xG, 20 min, 4 °C で遠心分離、上清を破棄し、ミトコンドリア・ペレットを回収した。回収したミトコンドリア・ペレットは、ウエスタンブロット用のバッファーに再懸濁し、Bradford 法を用いてタンパク質量を定量し、ウエスタンブロット用にサンプルを調製した。なお、ミトコンドリア分画が正しく抽出されていることの妥当性は、細胞質のマーカー (GAPDH) がウエスタンブロットで検出されないこと、ミトコンドリアのマーカー (COX IV) が腓腹筋の全細胞分画よりも高いレベルでウエスタンブロットによって検出されたことで確認した (図 4-6)。

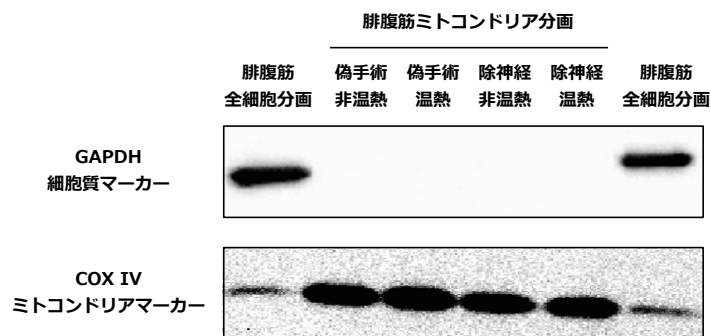


図 4-6. ミトコンドリア単離実験の妥当性検証

ミトコンドリア分画のサンプルは、各グループ (n=6-8) のサンプルをプールしたものである。腓腹筋全細胞分画のサンプルは、同一動物実験条件内で採取したものである。

統計処理

すべてのデータは、平均値±標準誤差で示した。必要に応じて、対応なしの T 検定、二元配置分散分析、三元配置分散分析を行った。交互作用が認められた場合は、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とし、 $P < 0.10$ は傾向として取り扱った。すべての統計処理は、JMP (Version 9.0.1, Macintosh, SAS Institute) を用いて行った。

表 4-1. 一次抗体リスト (1/2)

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
HSP60	Enzo Life Science	ADI-SPA-806	1:3000
HSP72	Enzo Life Science	ADI-SPA-810-D	1:3000
NDUFB8	Abcam	ab110413	1:1500
ATP5A	Abcam	ab14744	1:5000
COX IV	Abcam	ab48506	1:1000
4-HNE	Millipore	516557	1:1500
PGC-1 α	Abcam	ab33780	1:5000
GLUT4	Abcam	ab137320	1:1000
FAT/CD36	Abcam	ab77924	1:3000
Parkin	Cell Signaling Technology	3933	1:1000
Ubiquitin	Medical & Biological Laboratory	PM045	1:1000
p62/SQSTM1	Medical & Biological Laboratory	M152-3	1:2000
LC3	Cell Signaling Technology	2513	1:1000
P-AMPK T172	Cell Signaling Technology	2532	1:1000
AMPK	Cell Signaling Technology	3661	1:1000
P-ACC T79	Cell Signaling Technology	3662	1:1000
ACC	Cell Signaling Technology	2513	1:1000
P-Akt S473	Cell Signaling Technology	2532	1:1000
Akt	Cell Signaling Technology	2532	1:1000
P-p70S6K T389	Cell Signaling Technology	3661	1:1000
p70S6K	Cell Signaling Technology	3662	1:1000
P-ULK1 S555	Cell Signaling Technology	5869	1:1000
P-ULK1 S757	Cell Signaling Technology	6888	1:1000
ULK1	Cell Signaling Technology	8054	1:1000
ATG13	Medical & Biological Laboratory	M183-3MS	1:1000
Beclin 1	Medical & Biological Laboratory	PD017MS	1:1000
ATG14L	Medical & Biological Laboratory	PD026MS	1:1000
ATG5	Medical & Biological Laboratory	M153-3MS	1:1000
ATG16L	Medical & Biological Laboratory	M150-3MS	1:1000
IRE-1 α	Cell Signaling Technology	3177	1:1000

表 4-2. 一次抗体リスト (2/2)

標的タンパク質	メーカー	型番	希釈
CHOP	Cell Signaling Technology	3294	1:1000
BiP/GRP78	Cell Signaling Technology	2895	1:1000
Cleaved caspase 12	Cell Signaling Technology	2202	1:1000
Mfn2	Abcam	ab124773	1:1000
Opa1	BD Bioscience	612606	1:1000
Fis1	Abcam	ab96764	1:1000
Drp1	Abcam	ab56788	1:1000

結果

実験モデルのプロフィールおよび妥当性検証

除神経を行ったマウスの骨格筋に対しても、温熱刺激が十分に伝わったか否かを検証するために、10日間の除神経期間のうち、7回の温熱刺激による介入が腓腹筋のHSP60およびHSP72発現量に与える影響を検討した。また、本研究で分析対象としたオートファジーや骨格筋の形態に潜在的に影響を与える因子を評価するために、体重および総摂取エネルギー量を検討した。

HSP60のタンパク質量（実験①）（図4-7）

腓腹筋のHSP60のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の負の主効果、温熱刺激の正の主効果が認められた。

HSP72のタンパク質発現量（実験①）（図4-7）

腓腹筋のHSP72のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。また、除神経の主効果は認められなかったが、温熱刺激の正の主効果が認められた。

体重（実験①）（図4-8）

温熱刺激による有意な変化は認められなかった。

総摂取エネルギー量（実験①）（図4-8）

温熱刺激による有意な変化は認められなかった。

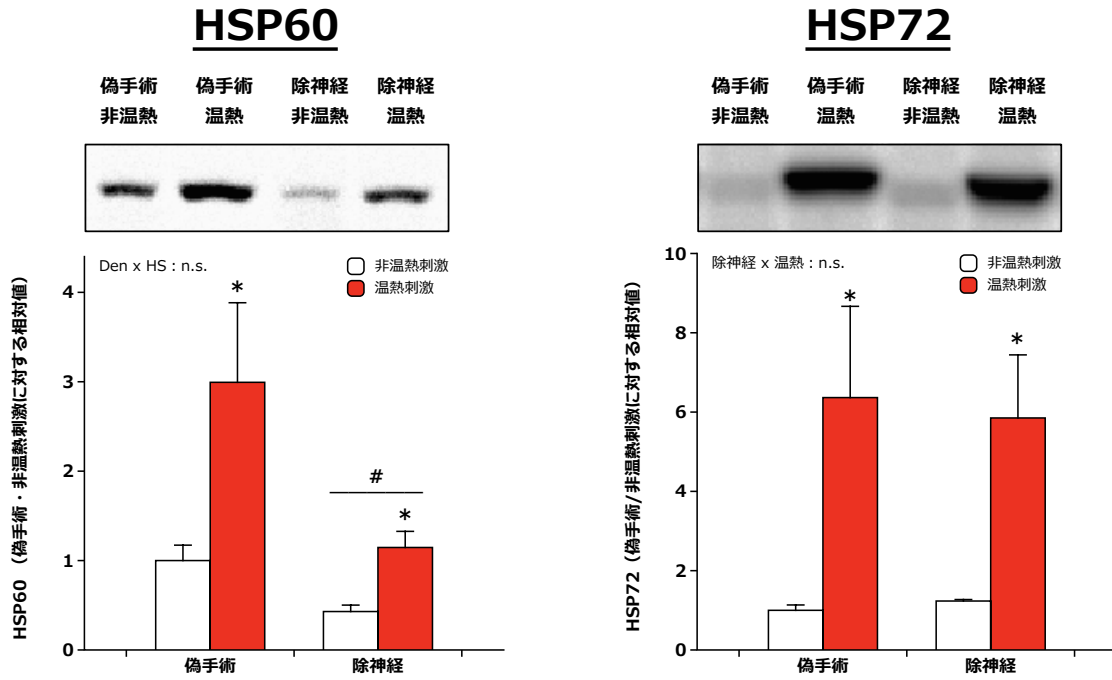


図 4-7. 温熱刺激は、HSP60 および HSP72 のタンパク質量を増加させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05 除神経の主効果, * 温熱刺激の主効果

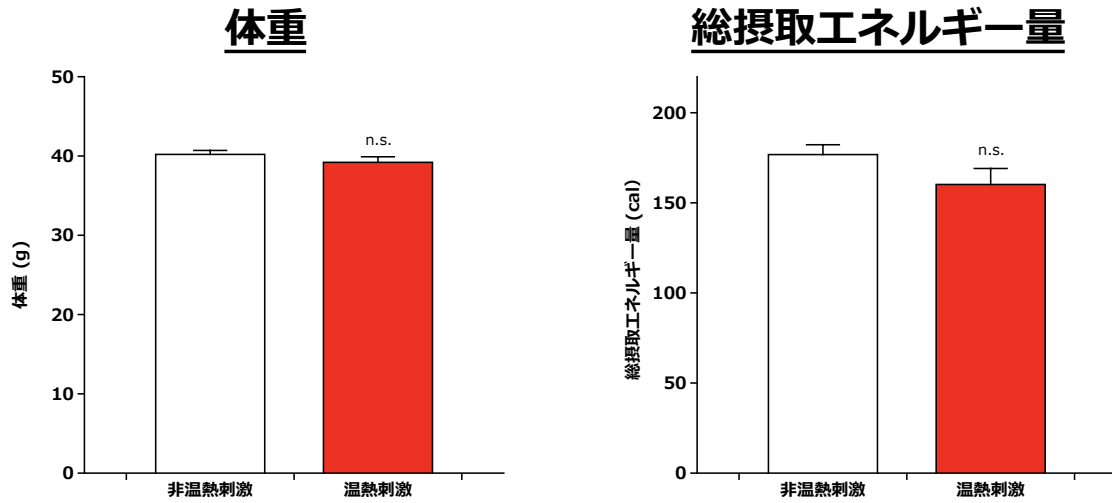


図 4-8. 温熱刺激は、体重や総摂取エネルギー量に影響を与えない

データは、平均的±標準誤差で示している。n.s. 有意差なし

骨格筋重量

温熱刺激が、除神経による骨格筋萎縮を抑制するか否かを検討するために、腓腹筋および、足底筋、ヒラメ筋の湿重量を評価した。

腓腹筋湿重量（実験①）（図 4-9）

腓腹筋の湿重量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

足底筋湿重量（実験①）（図 4-9）

足底筋の湿重量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

ヒラメ筋湿重量（実験①）（図 4-9）

ヒラメ筋の湿重量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

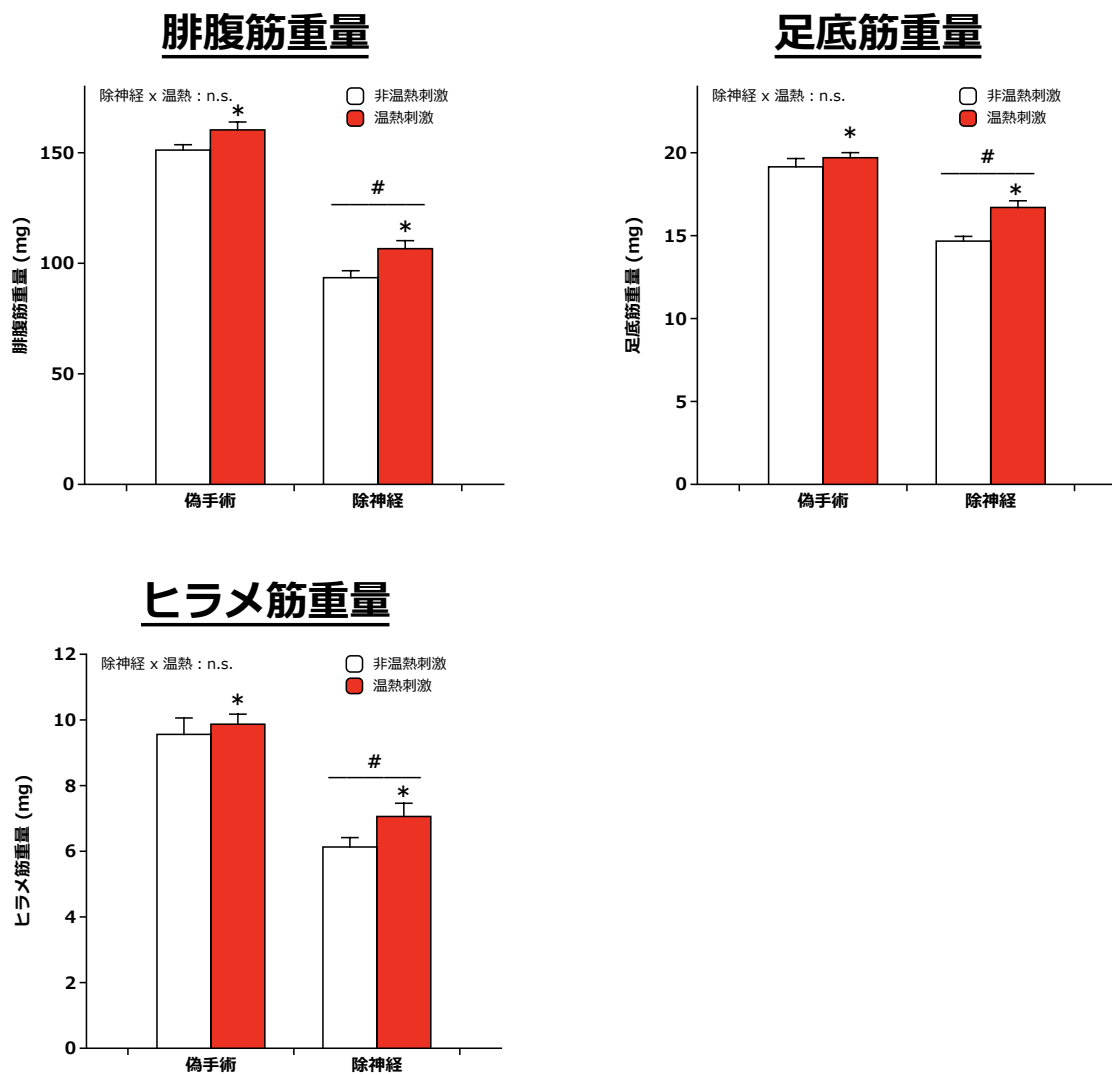


図 4-9. 温熱刺激は、除神経による骨格筋萎縮を抑制する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。、# $P < 0.05$ 除神経の主効果, *温熱刺激の主効果

温熱刺激が除神経による骨格筋ミトコンドリアの減少に与える影響

温熱刺激が除神経による骨格筋ミトコンドリアの適応を検証するために、①ミトコンドリア量の指標のひとつとしてミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する酵素（NDUFB8, COX IV, ATP5A）のタンパク質量、②骨格筋の最大酸化能力の指標のひとつとなるミトコンドリアのクエン酸合成酵素（CS）の最大活性、③ミトコンドリアの毒性・健全度の指標として、ミトコンドリア分画および全細胞分画における 4-HNE 結合タンパク質量（酸化ストレスマーカー）を検討した。

NDUFB8 タンパク質量（実験①）（図 4-10）

腓腹筋の NDUFB8 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

COX IV タンパク質量（実験①）（図 4-10）

腓腹筋の COX IV のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

UQCRC2 タンパク質量（実験①）（図 4-10）

腓腹筋の UQCRC2 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

ATP5A タンパク質発現量（実験①）（図 4-10）

腓腹筋の ATP5A のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

CS 最大活性 (実験①) (図 4-11)

腓腹筋および足底筋、ヒラメ筋の CS 最大活性において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による負の主効果、温熱刺激による正の主効果が認められた。

4-HNE 結合タンパク質量 (実験①・実験②) (図 4-12)

腓腹筋・全細胞分画の 4-HNE 結合タンパク質量 (25-150kD を定量範囲とした) において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果、温熱刺激の負の主効果が認められた。腓腹筋・ミトコンドリア分画の 4-HNE 結合タンパク質量 (25-150kD を定量範囲とした) において、除神経と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激条件が、他の 3 条件と比較して有意に高い値を示した。

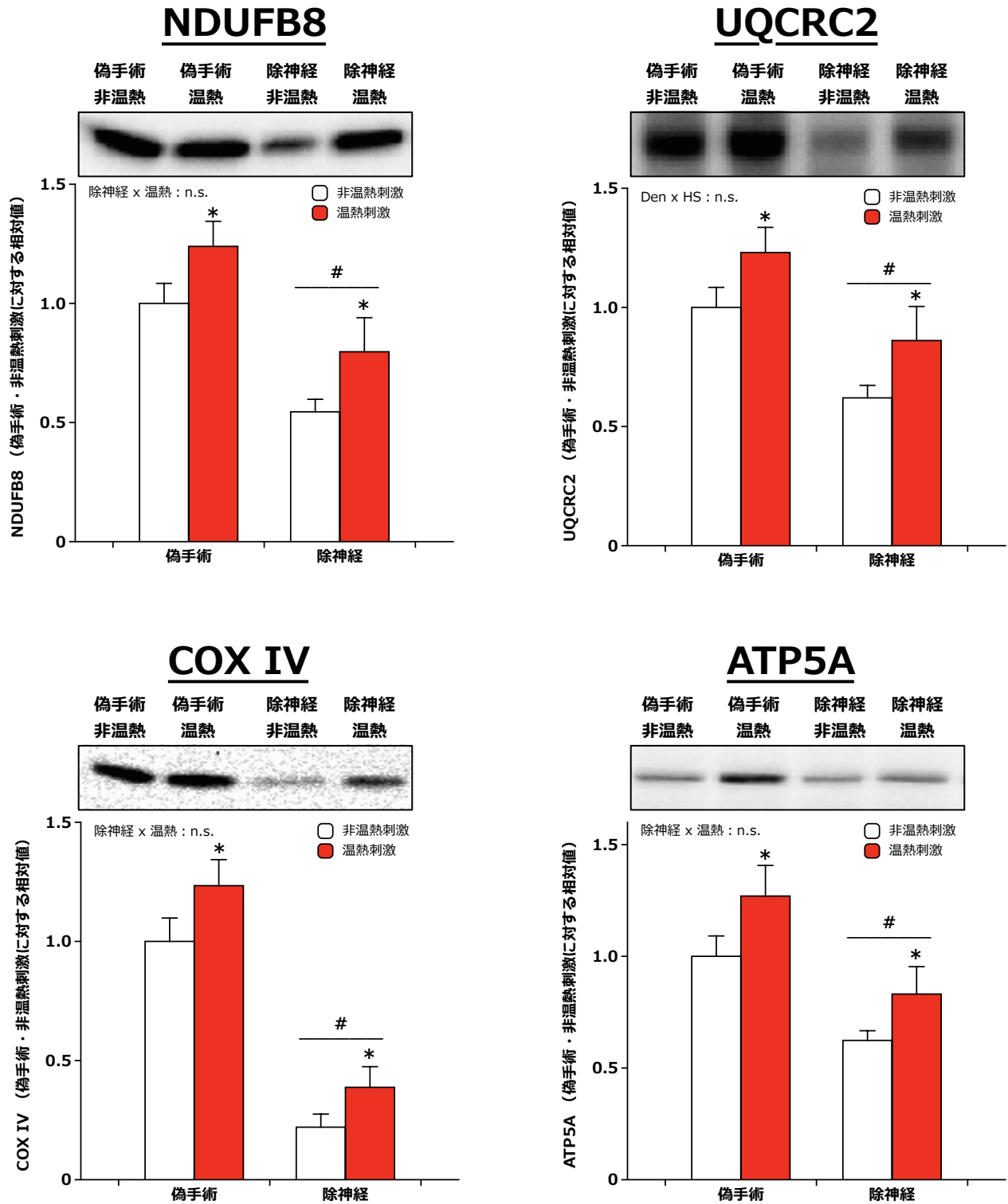


図 4-10. 温熱刺激は、除神経による骨格筋ミトコンドリアの減少を抑制する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#, #P<0.05 除神経の主効果, * 温熱刺激の主効果

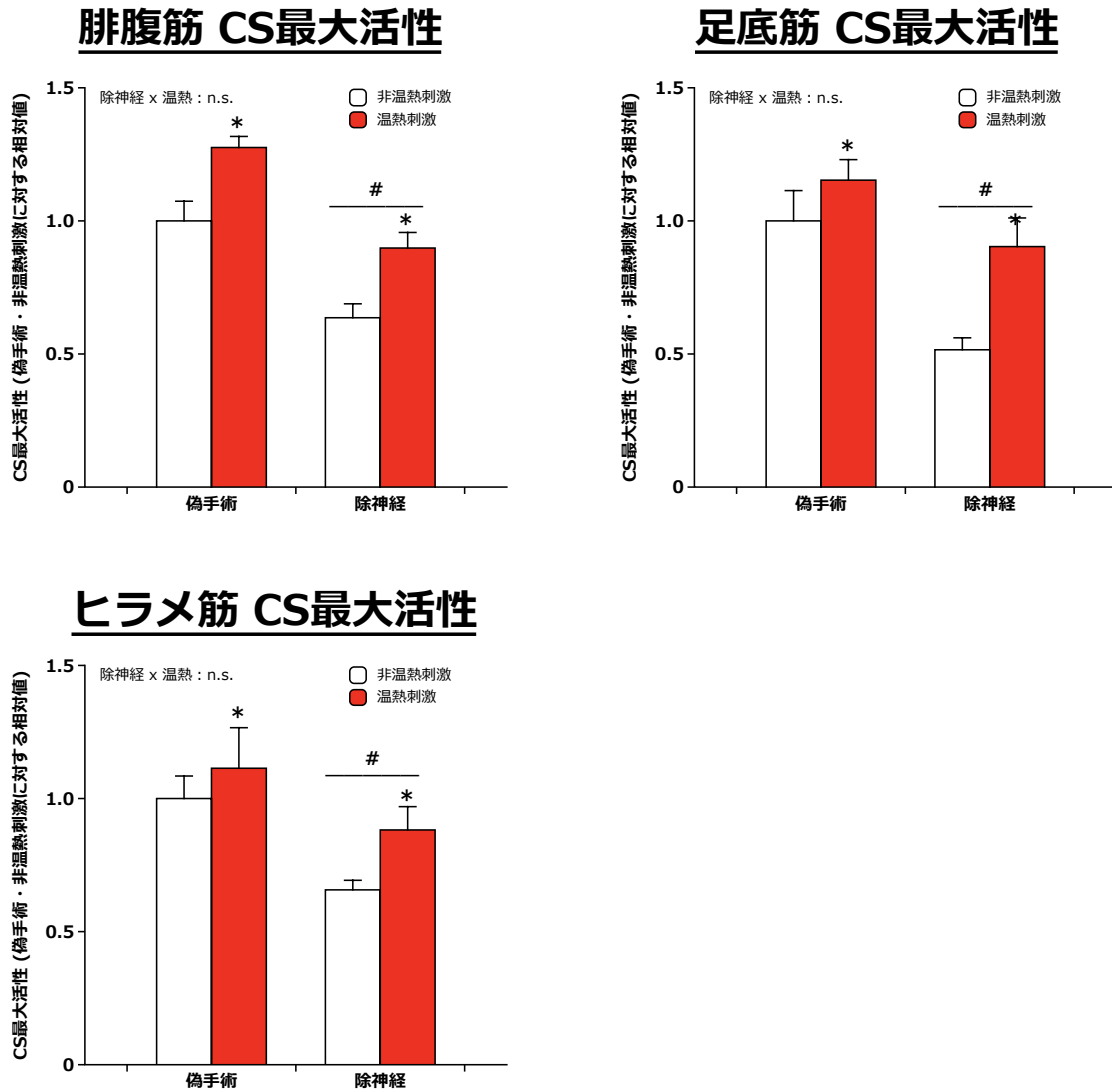
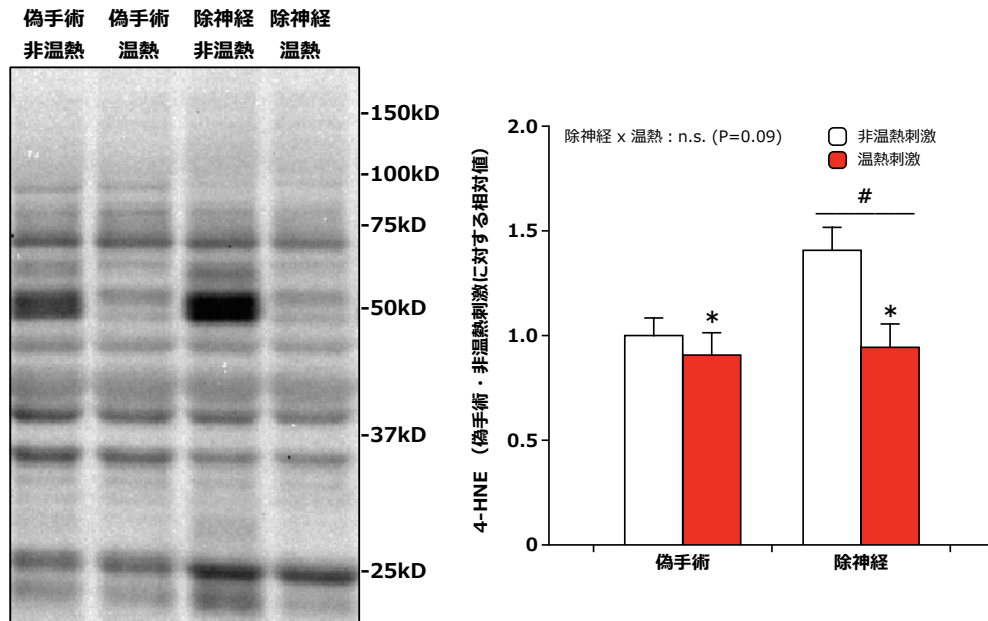


図 4-11. 温熱刺激は、除神経による骨格筋の最大酸化能力の低下を抑制する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。# $P < 0.05$ 除神経の主効果, *温熱刺激の主効果

4-HNE結合タンパク質



4-HNE結合ミトコンドリアタンパク質

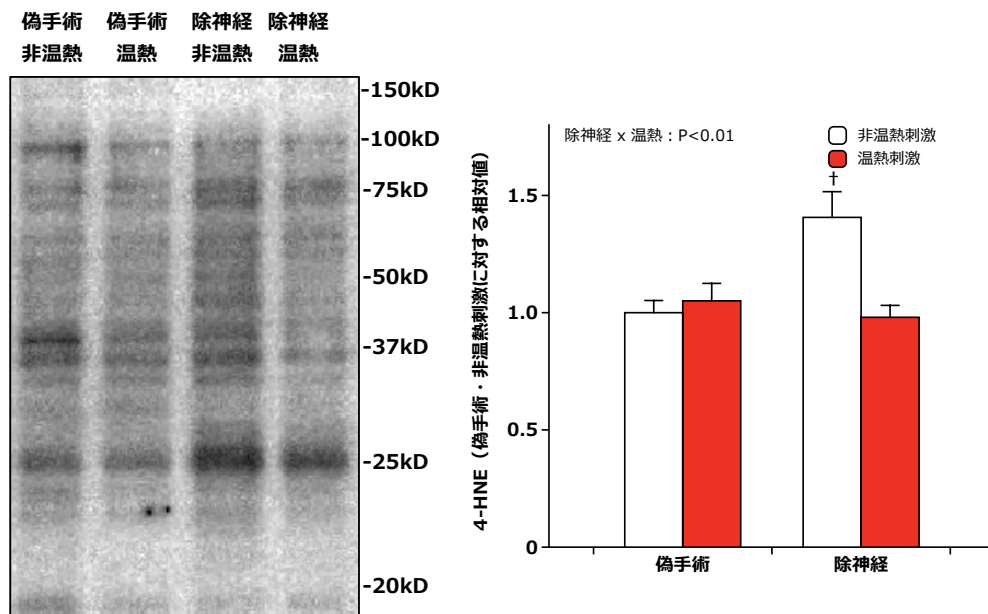


図 4-12. 温熱刺激は、除神経による酸化ストレスの蓄積を軽減する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。†, #P<0.05 除神経の主効果, *温熱刺激の主効果, †P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激。なお、25-150kDを定量範囲とした。

ミトコンドリア生合成に関与する経路

温熱刺激が、ミトコンドリア減少を抑制したメカニズムの解明に向けて、①ミトコンドリア生合成を制御するマスター遺伝子である PGC-1 α のタンパク質量、②PGC-1 α が発現量を制御する下流標的であるグルコース輸送担体 (GLUT4) および脂肪酸輸送担体 (FAT/CD36) のタンパク質量、③ PGC-1 α のタンパク質の安定性に関わる修飾因子であるリン酸化型 (=活性化型) p38 MAPK および p38 MAPK の総タンパク質量を検討した。また、一過性の温熱刺激が除神経骨格筋のリン酸化型 p38 MAPK の発現量に与える影響を評価した。なお、リン酸化型のタンパク質量を検討する際には、除神経によって総タンパク質量が変動していることから、それぞれ個別にデータを示す。

PGC-1 α のタンパク質発現量 (実験①) (図 4-13)

腓腹筋の PGC-1 α のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の負の主効果が認められたが、温熱刺激の主効果は認められなかった。

GLUT4 のタンパク質量 (実験①) (図 4-14)

腓腹筋の GLUT4 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の負の主効果が認められたが、温熱刺激の主効果は認められなかった。

FAT/CD36 のタンパク質量 (実験①) (図 4-14)

腓腹筋の FAT/CD36 の発現量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の負の主効果が認められたが、温熱刺激の主効果は認められなかった。

リン酸化 (活性化型) および p38 MAPK の総タンパク質量 (実験①) (図 4-15)

腓腹筋のリン酸化 p38 MAPK および p38 MAPK の総タンパク質量において、除神経と温熱刺激

の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の負の主効果が認められたが、温熱刺激の主効果は認められなかった。

一過性の温熱刺激がリン酸化（活性化型）p38 MAPK 発現量に与える影響（実験⑤）（図 4-16）

腓腹筋のリン酸化 p38 MAPK タンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、偽手術・温熱刺激条件は、他の 3 条件と比較して有意に高い値を示した。

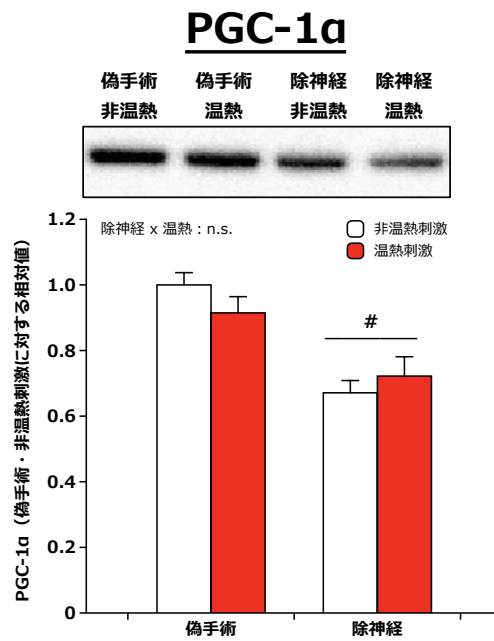


図 4-13. 温熱刺激は、除神経による PGC-1αの減少を抑制しなかった

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。、#P<0.05 除神経の主効果。

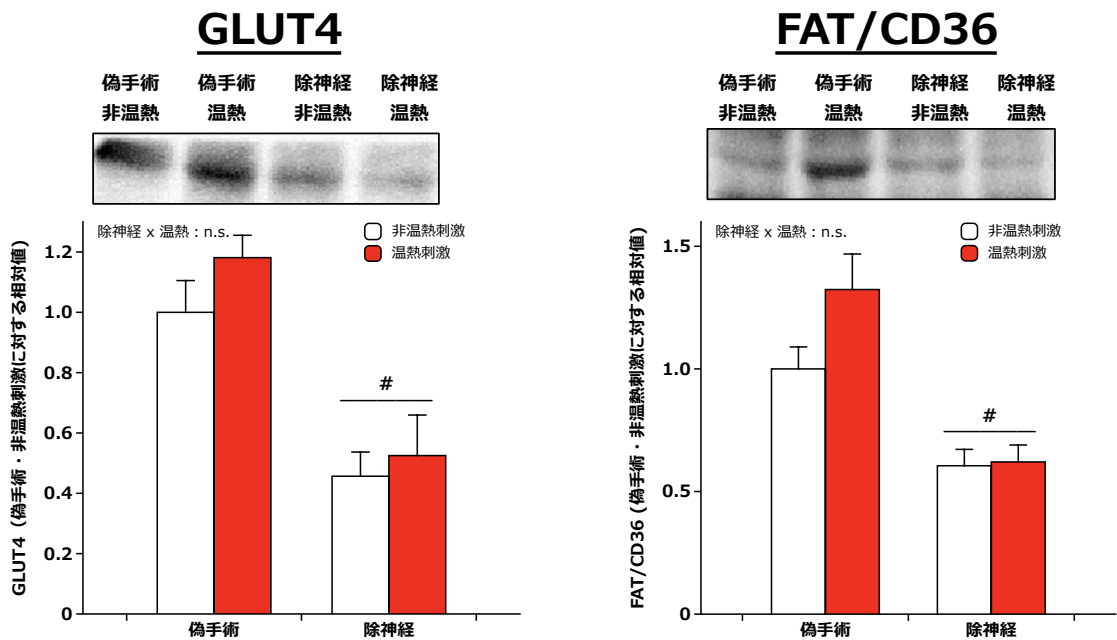


図 4-14. 温熱刺激は、除神経による GLUT4 および FAT/CD36 の減少を抑制しなかった

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。、#P<0.05 除神経の主効果。

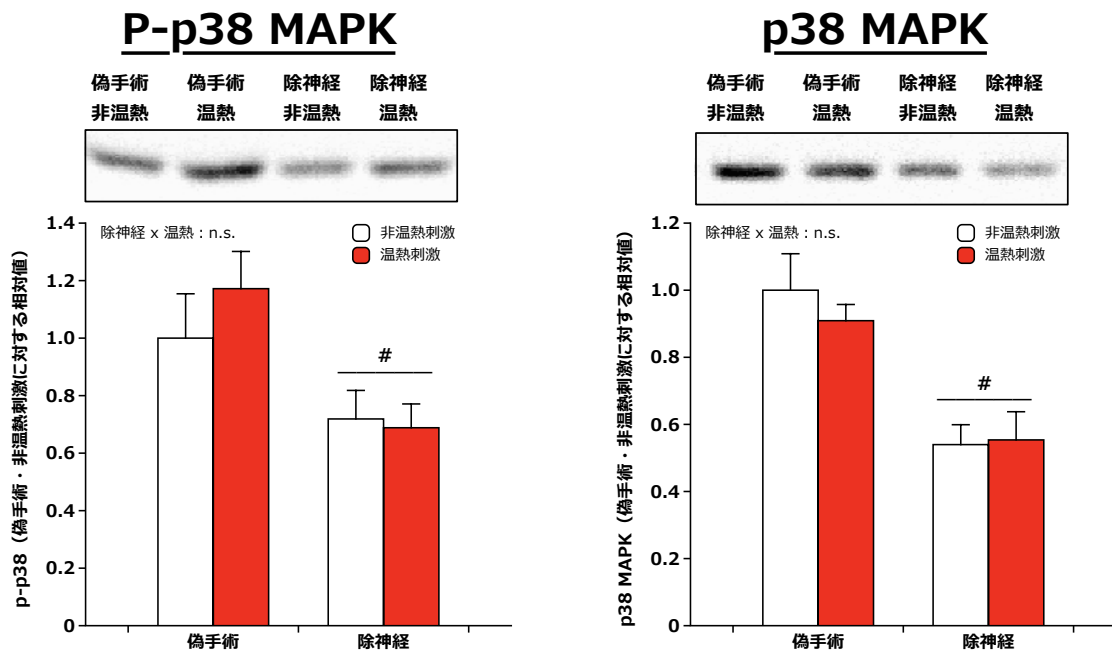


図 4-15. 除神経は、リン酸化型 p38 MAPK および総 p38 MAPK を減少させる

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。# $P < 0.05$, 除神経の主効果。

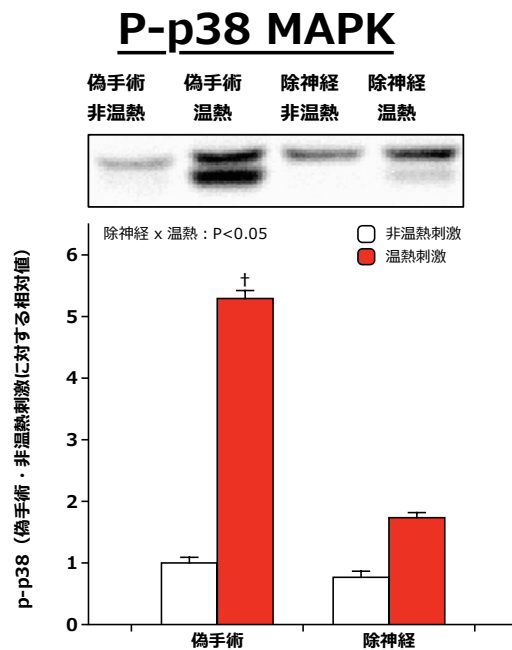


図 4-16. 除神経骨格筋では、一過性温熱刺激による p38 MAPK のリン酸化応答が减弱する

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。+ $P < 0.05$ vs 他の3条件

マイトファジー関連タンパク質

温熱刺激が、ミトコンドリア減少を抑制したメカニズムの解明に向けて、オートファジー依存性のミトコンドリア分解機構（マイトファジー）を制御するタンパク質（Parkin, Ub 結合タンパク質, p62/SQSTM1, LC3-II）の量を腓腹筋ミトコンドリア分画（実験期間終了後の存在するミトコンドリアの性質を示す）で検討した。

ミトコンドリア分画における Parkin のタンパク質量（実験②）（図 4-17）

腓腹筋ミトコンドリア分画の Parkin のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に相互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激条件は、他の3条件と比較して、有意に高い値を示した。

ミトコンドリア分画における Ub 結合のタンパク質量（実験②）（図 4-17）

腓腹筋ミトコンドリア分画の Ub 結合タンパク質量（25-150kD を定量範囲とした）において、除神経と温熱刺激の間に相互作用が認められなかった。また、除神経による統計的に有意な主効果は認められなかったが、温熱刺激による負の主効果が認められた。

ミトコンドリア分画における p62/SQSTM1 のタンパク質量（実験②）（図 4-18）

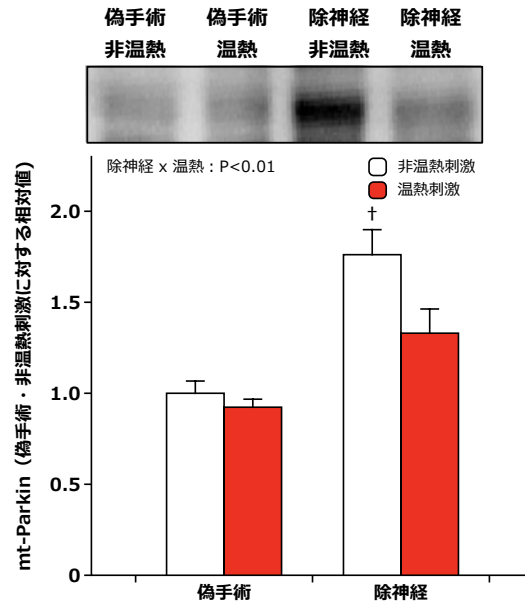
腓腹筋ミトコンドリア分画の p62/SQSTM1 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に相互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激条件は、他の3条件と比較して、有意に高い値を示した。

ミトコンドリア分画における LC3-II のタンパク質量（実験②）（図 4-18）

腓腹筋ミトコンドリア分画の LC3-II のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作

用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激条件は、他の3条件と比較して、有意に高い値を示した。

mtParkin



Ub結合ミトコンドリアタンパク質

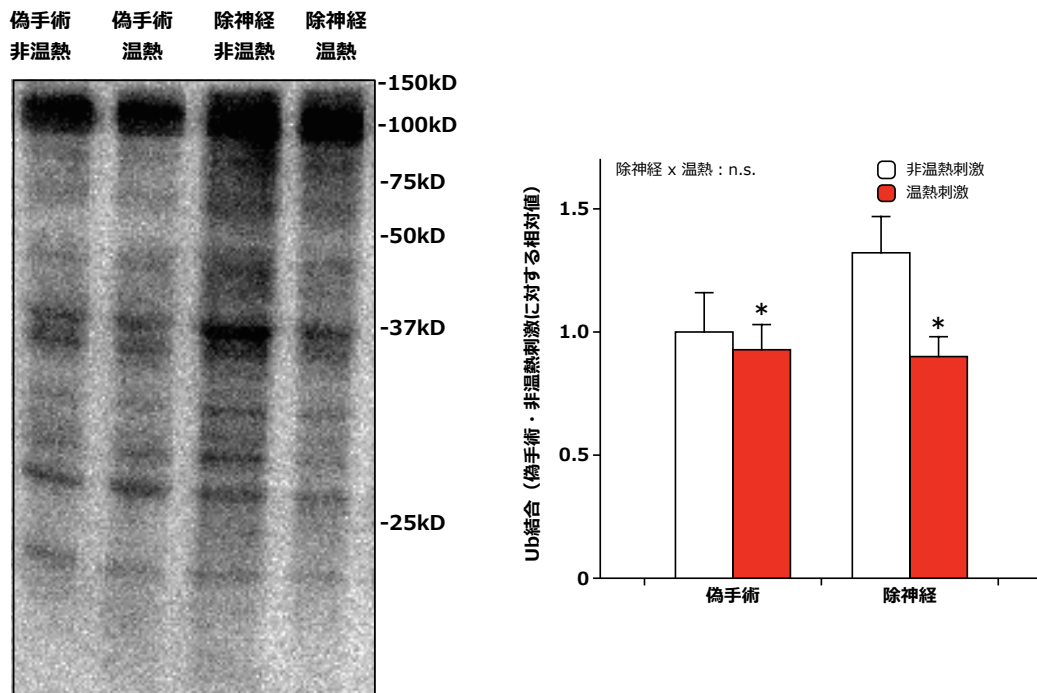


図 4-17. 温熱刺激は、除神経骨格筋（ミトコンドリア分画）の Parkin および Ub 結合タンパク質の増加を抑制した。データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。、#P<0.05 除神経の主効果。*P<0.05 温熱刺激の主効果，+P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激。Ub 結合タンパク質は、25-150kD を定量範囲とした。

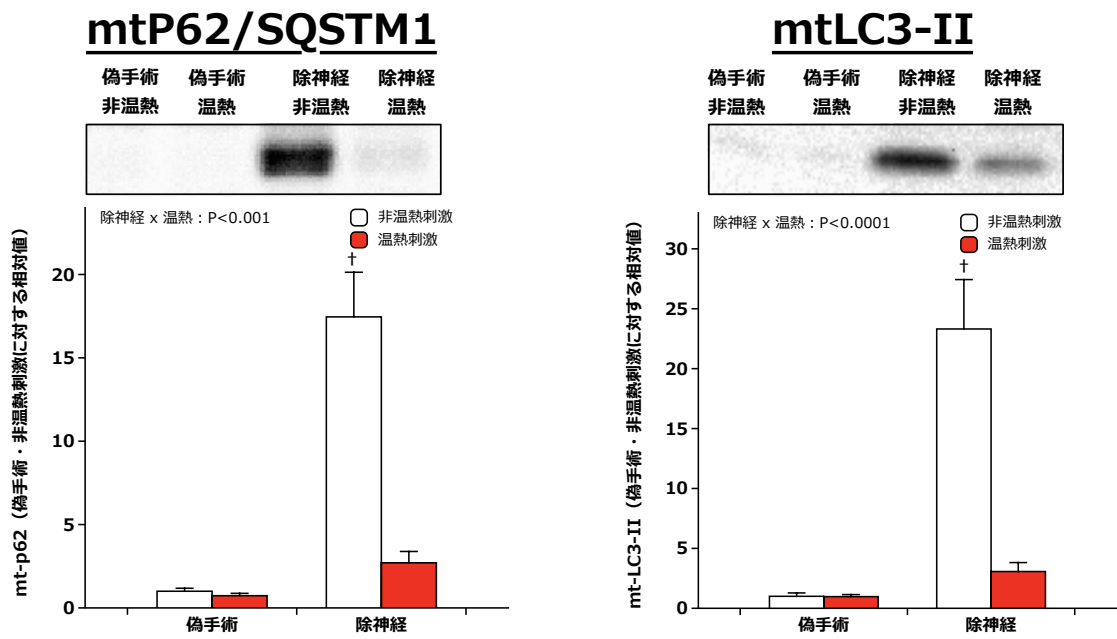


図 4-18. 温熱刺激は、除神経骨格筋（ミトコンドリア分画）の P62/SQSTM1 および LC3-II の増加を抑制した。データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。+, $P < 0.05$ vs 偽手術・非温熱刺激。

マイトファジー誘導量

ミトコンドリア分画における LC3-II の発現レベルは、ミトコンドリアを包括しているオートファゴソーム（マイトファゴソーム）の量と高い相関関係を示すことから、「どの程度マイトファゴソームが存在しているか？」の指標として広く利用されている。温熱刺激が、除神経によるマイトファジー関連タンパク質の発現量増加を抑制した結果を受けて、温熱刺激によるミトコンドリア LC3-II の減少（マイトファゴソームの減少）が、「マイトファジーの誘導過程が抑制されたことを反映しているのか？」「マイトファゴソーム形成後の最終的な分解過程が促進されたことを反映しているのか？」については、結論付けることができない。そこで本研究では、この問題を解決するために、マイトファゴソームの最終的な分解を阻害する薬剤であるコルヒチンを用いた追試を行った。

コルヒチン非処理または処理条件下において、温熱刺激が除神経骨格筋における LC3-II のタンパク質量に与える影響（実験③）（図 4-19）

腓腹筋ミトコンドリア分画の LC3-II のタンパク質量において、除神経と温熱刺激、コルヒチン間に二次の交互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激・コルヒチン処理条件のミトコンドリア分画における LC3-II のタンパク質量は、他の 7 条件と比較して有意に高い値を示した。

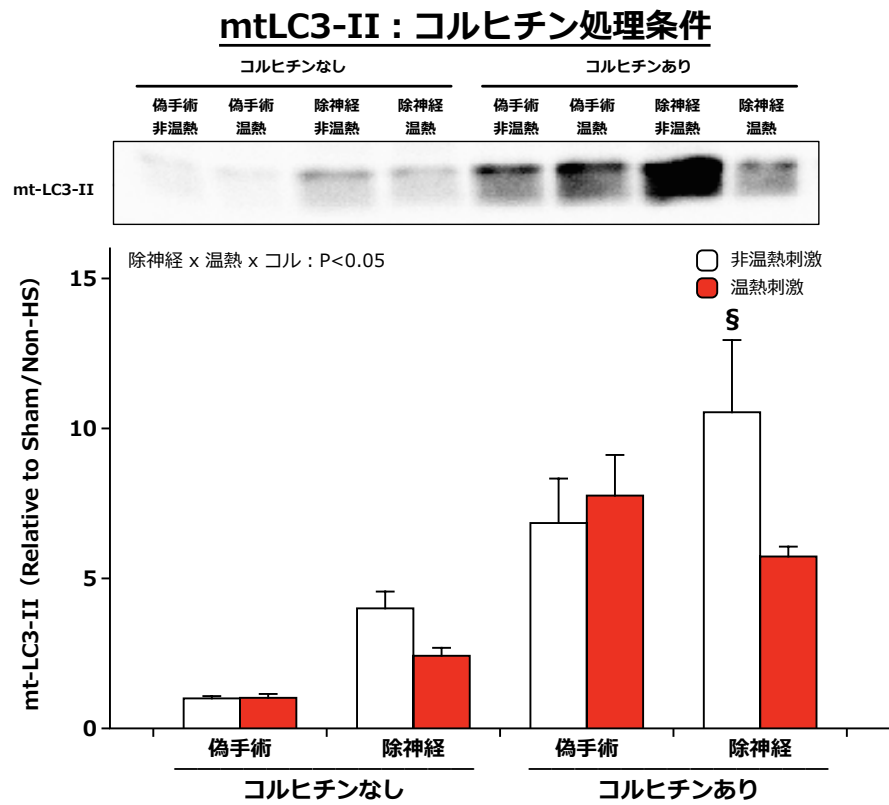


図 4-19. 温熱刺激は、除神経によるマイトファジーの誘導の活性化を抑制した

データは、平均的±標準誤差で示している。三元配置分散分析により統計処理を行った。\$P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激・コルヒチン, vs 除神経・温熱刺激・コルヒチン

オートファゴソーム量の指標およびオートファジー誘導量の指標

マイトファジーは、オートファジーに高く依存したミトコンドリア分解機構である。そこで、温熱刺激が除神経によるマイトファジー活性化を抑制した分子メカニズムをより深く理解するために、①オートファゴソーム量の指標として全細胞分画における LC3-II タンパク質量および、②オートファジー誘導量の指標としてコルヒチン処理条件下において、除神経および温熱刺激が LC3-II のタンパク質量に与える影響を検討した。

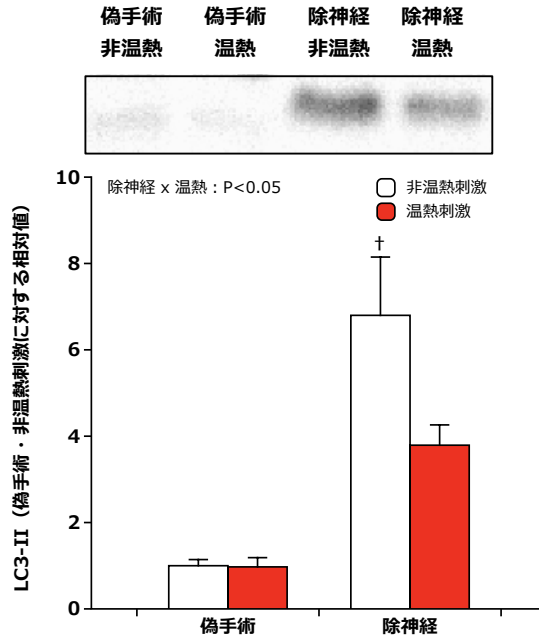
全細胞分画における LC3-II のタンパク質量（実験①）（図 4-20）

腓腹筋の LC3-II のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の相互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激条件は、他の 3 条件と比較して、有意に高い値を示した。

コルヒチン非処理または処理条件下において、温熱刺激が除神経骨格筋における LC3-II のタンパク質量に与える影響（実験④）（図 4-20）

腓腹筋の LC3-II のタンパク質量において、除神経と温熱刺激、コルヒチンの間に二次の相互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激・コルヒチン処理条件の全細胞分画における LC3-II のタンパク質量は、他の 7 条件と比較して有意に高い値を示した。

LC3-II



LC3-II : コルヒチン処理条件

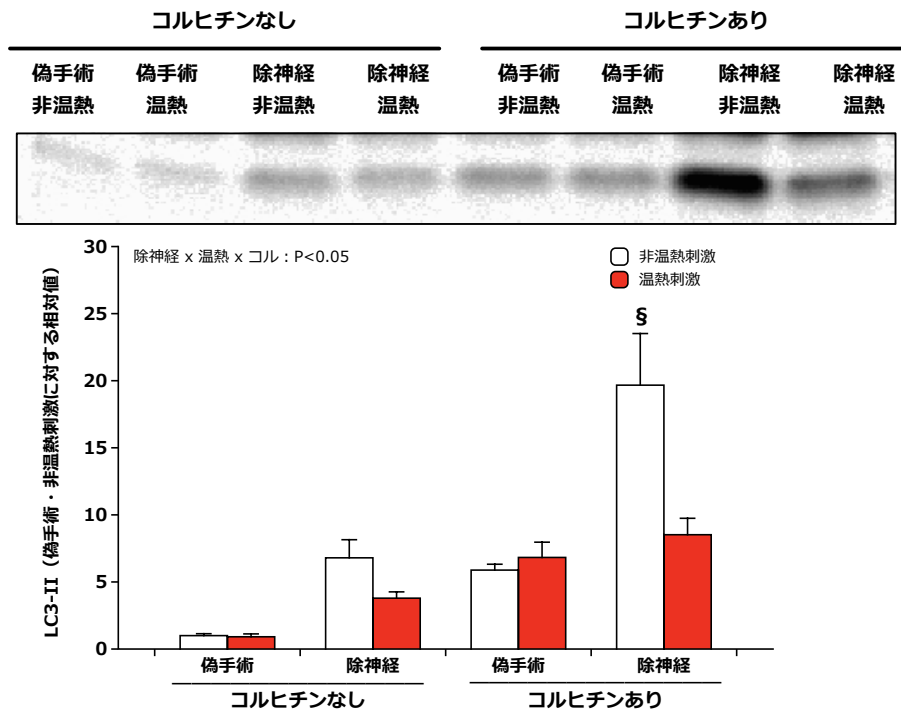


図 4-20. 温熱刺激は、除神経によるオートファジー誘導の活性化を抑制した。

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析または三元配置分散分析により統計処理を行った。† P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激, §P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激・コルヒチン, vs 除神経・温熱刺激・コルヒチン

オートファジー誘導制御段階

温熱刺激が除神経によるオートファジー誘導を抑制した分子メカニズムの解明を目指して、除神経および温熱刺激がオートファジー誘導の制御段階に与える影響を検討した。なお、オートファジー誘導を制御する段階の評価指標として、先行研究にならって、①オートファジーの初期誘導段階を制御するタンパク質 (I. 促進：リン酸化型 AMPK タンパク質量・AMPK のタンパク質量、AMPK 活性の指標となる AMPK の下流標的のリン酸化型 ACC タンパク質量・ACC の総タンパク質量、Ser555 のリン酸化型 ULK1 のタンパク質量および ULK1 の総タンパク質量、ATG13 の発現量、II. 抑制：mTORC1 活性の指標となるリン酸化型 p70S6K のタンパク質量・p70S6K の総タンパク質量、Ser757 のリン酸化型 ULK1 のタンパク質量、ATG13 のタンパク質量)、②オートファゴソームの形成段階を制御するタンパク質 (Beclin 1 のタンパク質量、ATG14L のタンパク質量)、③オートファゴソームの伸長段階を制御するタンパク質量 (ATG5 の発現量、ATG16L の発現量) を評価した。なお、リン酸化型のタンパク質発現量を検討する際には、除神経によって総発現量が変動していることから、それぞれ個別にデータを示す。また、第3章と同じ測定項目 (AMPK、ACC、Akt、p70S6K のリン酸化型、総タンパク質) があるが、測定条件が異なる (第3章：一過性の温熱刺激直後、第4章：最終の温熱刺激から24時間後) ことに留意されたい。

リン酸化型 AMPK および AMPK の総タンパク質量、リン酸化型 ACC および ACC の総タンパク質量 (実験①) (図 4-21)

AMPK は、オートファジーの惹起を促進する。腓腹筋のリン酸化型 AMPK および AMPK の総タンパク質量、リン酸化型 ACC のタンパク質量、ACC の総タンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、これらの測定項目において、除神経による正の主効果が認められた。一方で、温熱刺激による影響は認められなかった。ACC の総タンパク質量において、除神経または温熱刺激の主効果は、認められなかった。

リン酸化型 p70S6K および p70S6K の総タンパク質量、リン酸化型 Akt および Akt の総タンパク質量(実験①) (図 4-22)

mTORC1 は、オートファジーの惹起を抑制する。腓腹筋のリン酸化型 p70S6K のタンパク質量および p70S6K の総タンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激の主効果は認められなかった。

mTORC1 を制御する上流因子である腓腹筋のリン酸化型 Akt にタンパク質量および Akt の総タンパク質量においても、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった

Ser555・Ser757 リン酸化型 ULK1 のタンパク質量および ULK1 の総タンパク質量 (実験①) (図 4-23)

腓腹筋の Ser555 リン酸化型 ULK1 のタンパク質量 (オートファジー活性化に貢献) および Ser757 リン酸化型 ULK1 のタンパク質量 (オートファジー不活性化に貢献)、ULK1 の総タンパク質量 (オートファジー活性化に貢献) において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による正の主効果が認められたが、温熱刺激の主効果は認められなかった。

ATG13 のタンパク質量 (実験①) (図 4-23)

腓腹筋の ATG13 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

Beclin 1 のタンパク質量 (実験①) (図 4-24)

腓腹筋の Beclin1 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

ATG14L のタンパク質量 (実験①) (図 4-24)

腓腹筋の ATG14L のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

ATG5 のタンパク質量 (実験①) (図 4-25)

腓腹筋の ATG5 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経による正の主効果と温熱刺激による負の主効果が認められた。

ATG16L のタンパク質量 (実験①) (図 4-25)

ATG16L のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、除神経・非温熱刺激条件は、他の 3 条件と比較して有意に高い値を示した。

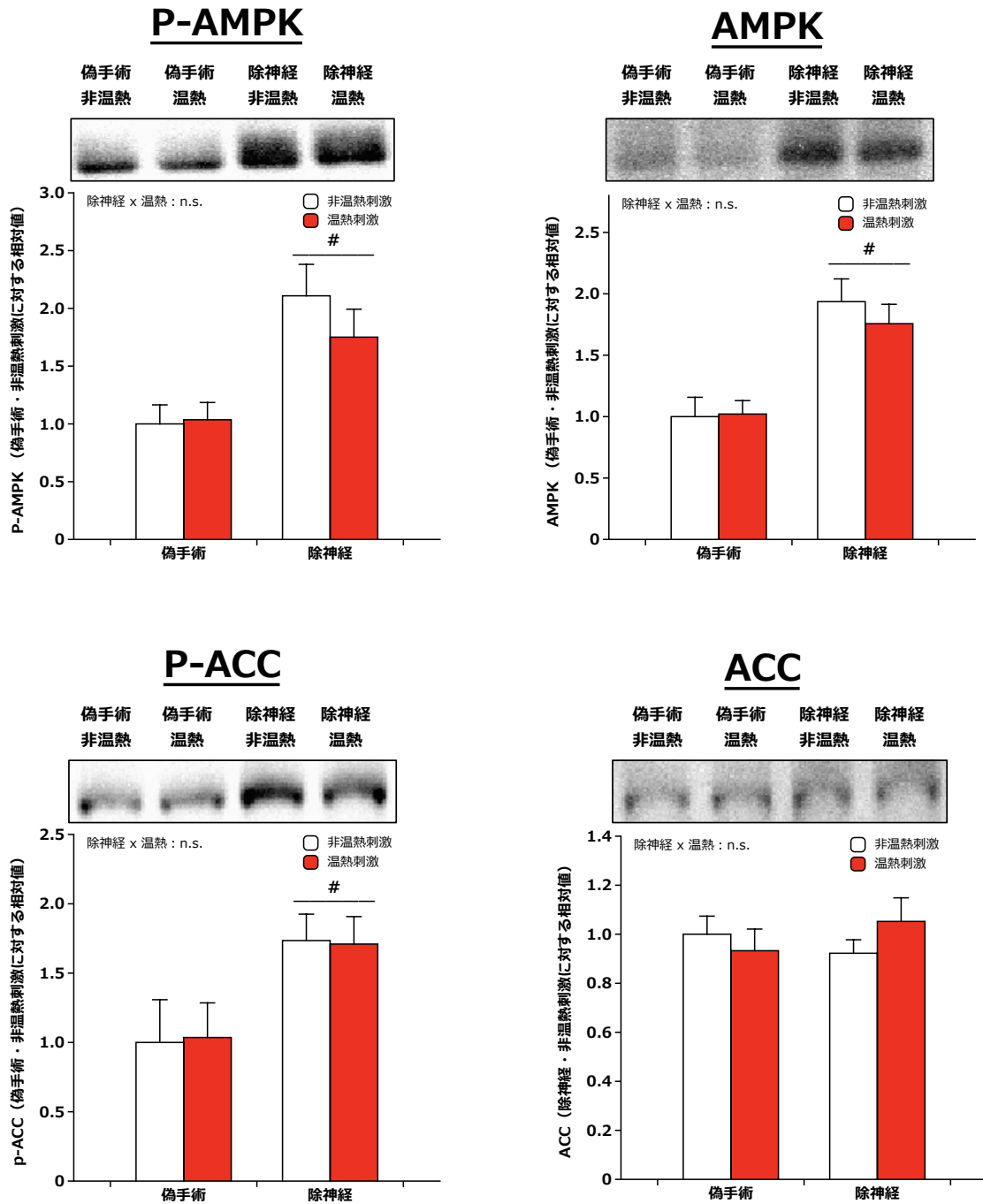


図 4-21. 温熱刺激は、除神経によるオートファジーの惹起促進経路を抑制しない
 データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05, 除神経の主効果。

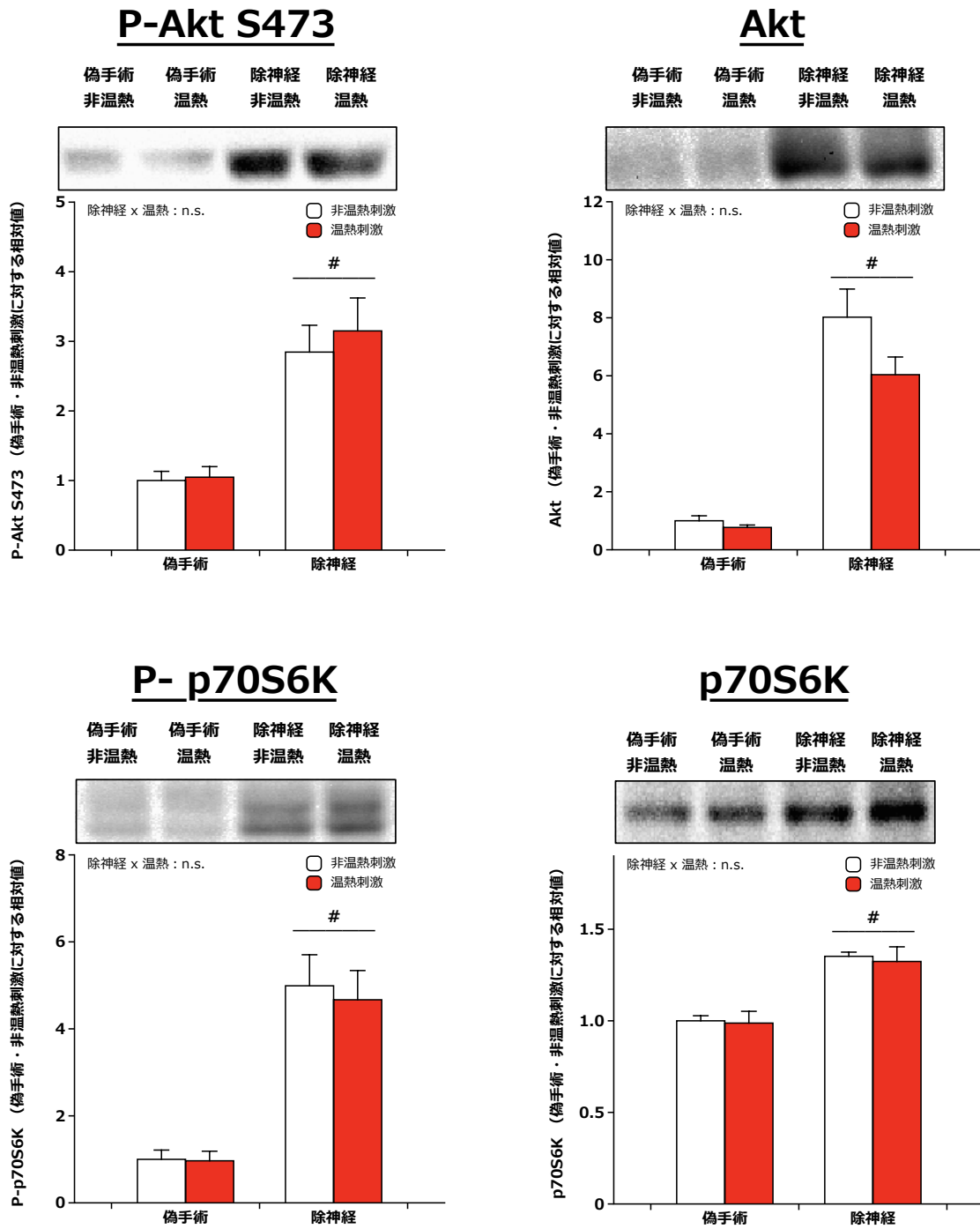


図 4-22. 温熱刺激は、除神経によるオートファジーの惹起抑制経路に影響を与えない

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05, 除神経の主効果。

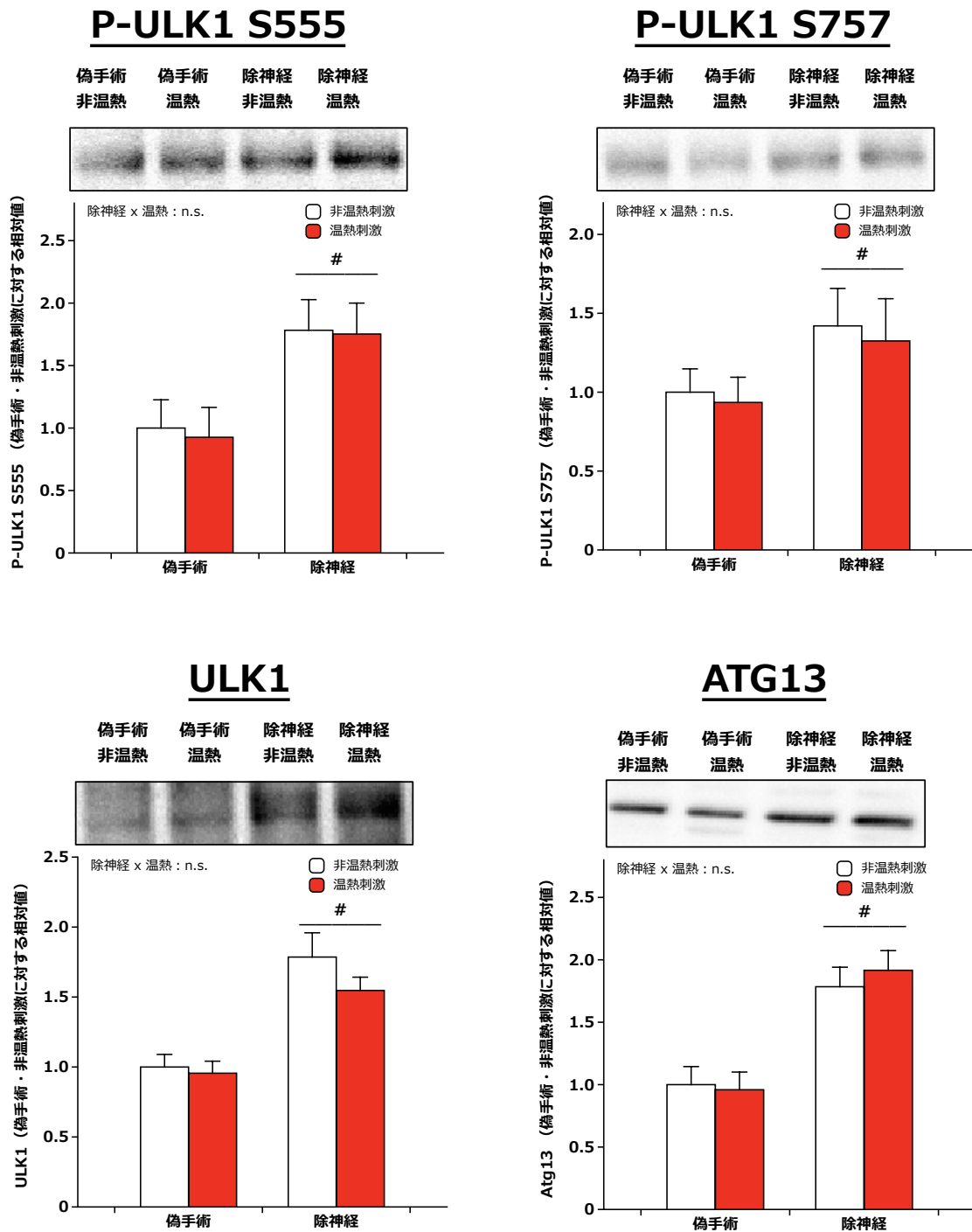


図 4-23. 温熱刺激は、除神経によるオートファジーの惹起制御タンパク質を抑制しない
 データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05, 除神経の主効果。

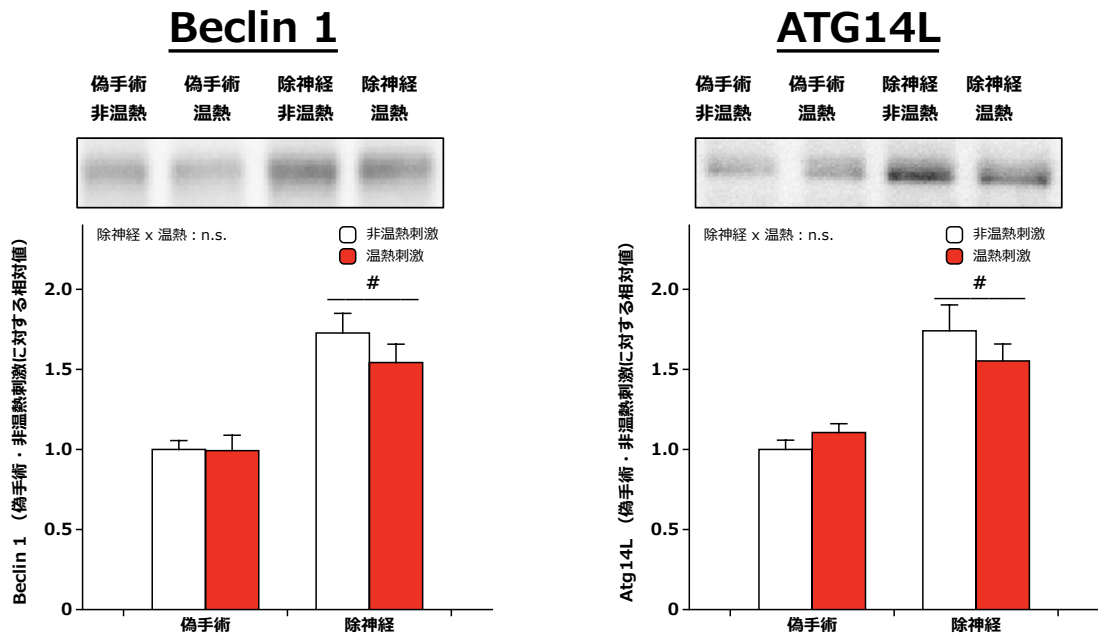


図 4-24. 温熱刺激は、除神経によるオートファゴソムの形成段階の活性化を抑制しない
データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05, 除神経の主効果。

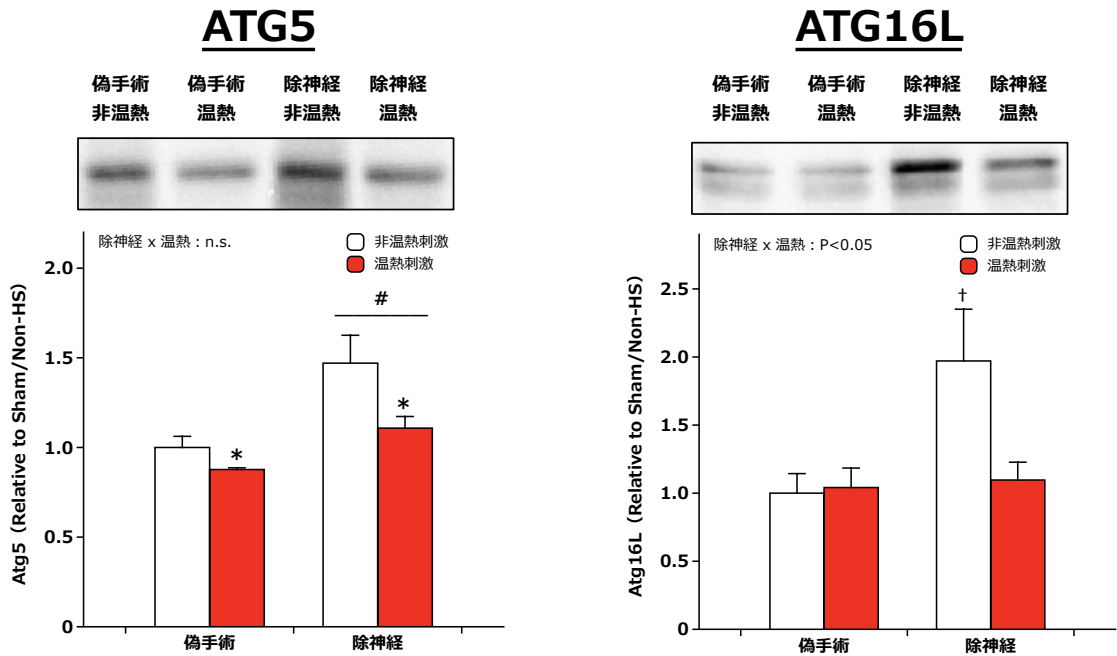


図 4-25. 温熱刺激は、除神経によるオートファゴソムの伸長段階の活性化を抑制する
データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05, 除神経の主効果。*P<0.05 温熱刺激の主効果, †P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激。

小胞体ストレス応答

温熱刺激が、オートファゴソームの伸長に貢献するタンパク質の発現上昇を抑制した分子メカニズムの候補として本研究では小胞体ストレス応答が正常化した可能性に着目した。小胞体ストレス応答の指標となるタンパク質 (IRE1 α , CHOP, BiP/GRP78, 切断型 Caspase-12) の発現量を検討した。

IRE1 α のタンパク質量 (実験①) (図 4-26)

腓腹筋の IRE1 α のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

CHOP のタンパク質量 (実験①) (図 4-26)

腓腹筋の CHOP のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

BiP/GRP78 のタンパク質量 (実験①) (図 4-26)

腓腹筋の BiP/GRP78 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

切断型 Caspase-12 のタンパク質量 (実験①) (図 4-26)

腓腹筋の切断型 (=活性化型) Caspase-12 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

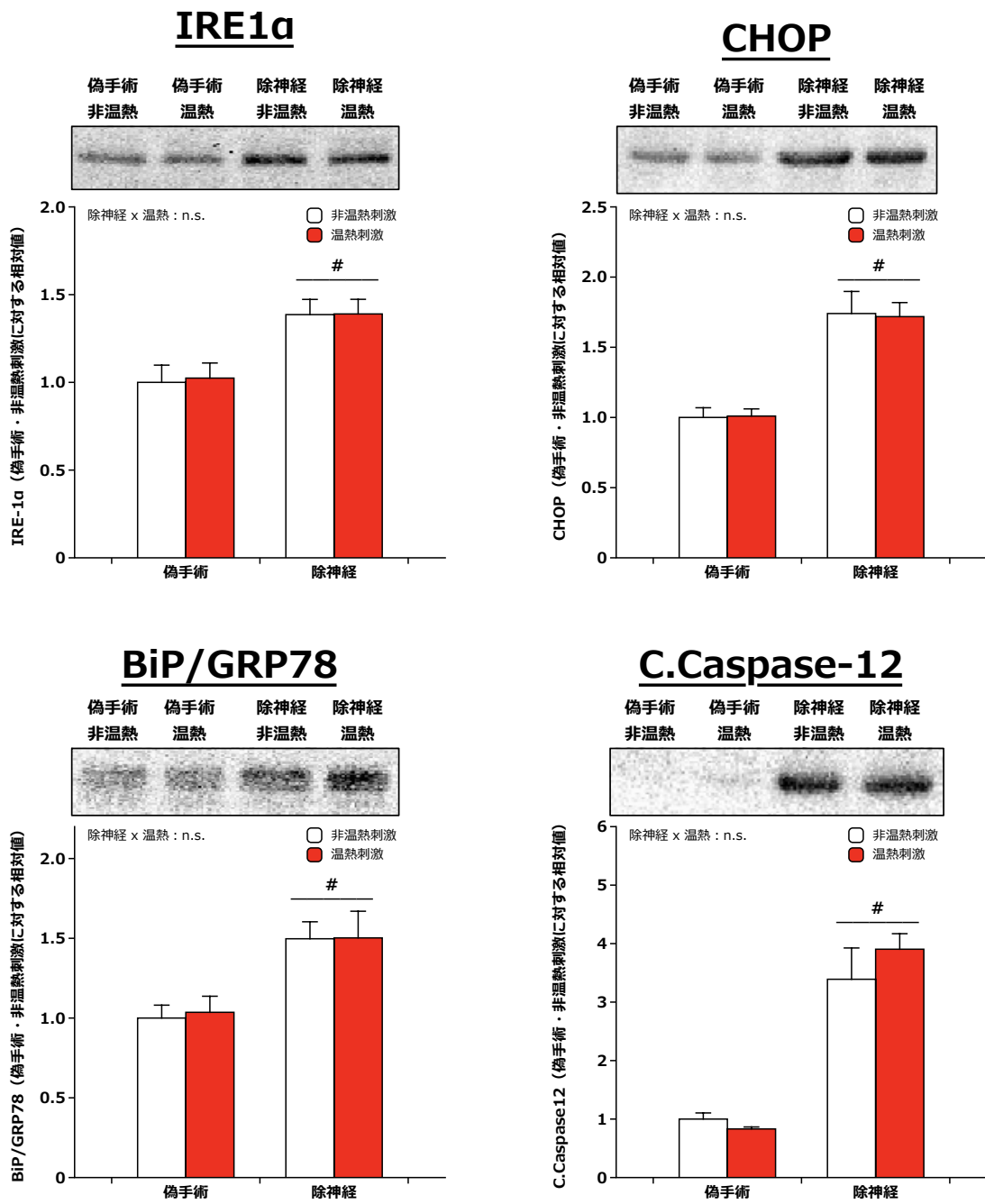


図 4-26. 温熱刺激は、除神経による小胞体ストレス応答を抑制しない

データは、平均的±標準誤差で示している。二元配置分散分析により統計処理を行った。#P<0.05, 除神経の主効果。

ミトコンドリア・ダイナミクス

先行研究では、マイトファジーの誘導状態とミトコンドリアの分裂状態は高い相関性をもつことが示されている。本研究では続いて、温熱刺激によるマイトファジー適応をより深く理解するために、ミトコンドリアの融合（Mfn2 および Opa1）およびミトコンドリアの分裂（Fis1 および Drp1）を制御するタンパク質の発現量に温熱刺激が与える影響を検討した。

Mfn2 のタンパク質量（実験①）（図 4-27）

腓腹筋の Mfn2 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、偽手術・温熱刺激条件が他の条件と比較して有意に高い値を示した。また、除神経・非温熱刺激条件および除神経・温熱刺激条件は、他の 2 条件（偽手術）と比較して、有意に低い値を示した。

Opa1 のタンパク質量（実験①）（図 4-27）

腓腹筋の Opa1 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用が認められた。多重比較の結果、偽手術・温熱刺激条件が偽手術・非温熱刺激条件と比較して高い値を示す傾向がみられた。また、除神経・非温熱刺激条件は、偽手術・非温熱刺激条件と比較して、低い値を示す傾向にあった。除神経・温熱刺激条件は、偽手術・非温熱刺激条件と比較して、有意に低い値を示した。

Fis1 のタンパク質量（実験①）（図 4-27）

腓腹筋の Fis1 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。一方で、除神経の正の主効果が認められたが、温熱刺激による影響は認められなかった。

Drp1 のタンパク質量 (実験①) (図 4-27)

腓腹筋の Drp1 のタンパク質量において、除神経と温熱刺激の間に交互作用は認められなかった。

また、除神経または温熱刺激の主効果も認められなかった。

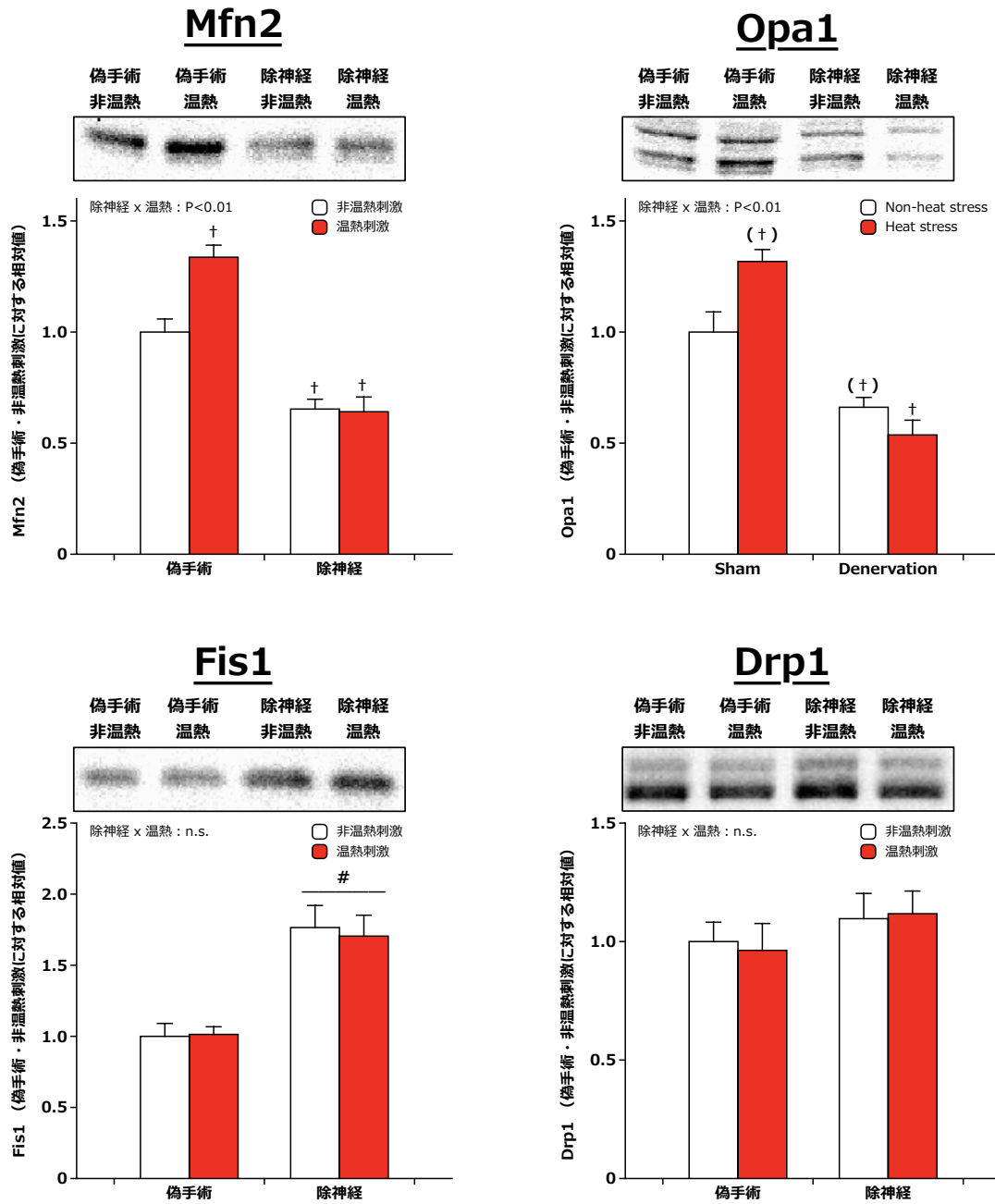


図 4-27. 温熱刺激は、除神経によるミトコンドリア分裂を抑制しない

データは、平均的±標準誤差で示している。三元配置分散分析により統計処理を行った。† P<0.05 vs 偽手術・非温熱刺激, #P<0.05, 除神経の主効果。 (+)P<0.10 vs 偽手術・非温熱刺激

考察

実験モデルのプロフィールおよび妥当性検証

本研究では、骨格筋の脱神経支配モデルとして、片側の坐骨神経を外科的に切除し、もう一方の肢には偽手術を施す方法を採用した。この方法は広く採用されている実験モデルである。ただし、除神経は、他の骨格筋萎縮モデル（例：後肢懸垂やギプス固定モデル）と比べて、独特な細胞応答を示すことが知られている。一般に、骨格筋萎縮条件では、mTORC1の不活性化によるタンパク質合成の低下とタンパク質分解の亢進が観察される。しかし、除神経による骨格筋萎縮モデルでは、むしろmTORC1が活性化し、タンパク質合成が高まることが明らかにされている(87, 132, 209)。また、ミオスタチンの阻害薬は、ギプス固定による骨格筋萎縮を抑制するが、除神経による骨格筋萎縮を抑制しないことが明らかとなっている(132)。したがって、本研究で得られた知見を解釈や一般化するにあたって、このような実験モデルの特徴には十分に注意を払う必要があると考えられる。

片側の坐骨神経切除により骨格筋萎縮を誘導した場合に、偽手術肢の代償的な骨格筋適応が生じる可能性が懸念された。つまり、坐骨神経切除による骨格筋ミトコンドリアの減少や骨格筋萎縮の程度を過大に評価してしまう恐れがある。そこで本研究では、予備的検証として、通常飼育条件マウス（偽手術も不実施）と片脚除神経モデルマウスの骨格筋重量およびCS最大活性を比較した（通常飼育マウスの骨格筋 vs 10日間の偽手術骨格筋）。その結果、いずれの測定項目においても群間に差は認められなかった。これらの結果は、本研究で採用した片脚坐骨神経切除モデルは、偽手術肢に代償的な適応を引き起こさないことを示す。また、手術の影響により、摂餌量および体重の低下などに変化は認められていないことを予備的な実験で確かめている。したがって、本研究で採用した「片脚の坐骨神経切除」は、実験モデルとして妥当であると考えられる。なお、本研究では、実験期間を10日間に設定した。この理由は、①先行研究において、10日間の除神経は十分に骨格筋ミトコンドリアの減少および骨格筋萎縮を誘導すること(26, 105)、②除神経によるミトコンドリア減

少および骨格筋萎縮に関わる応答・適応が、十分に誘導されているであるタイミングであることである (26, 62)。

本研究は、除神経によるミトコンドリア減少を温熱刺激が抑制するか否かを明らかにすることが目的であった。したがって、ミトコンドリアが減少する前の温熱刺激 (pre-conditioning) が、ミトコンドリア量の増加に貢献した可能性を排除することが望ましいと考えられた。先行研究では、除神経手術 3 日目からミトコンドリアの減少が確認されることが示されている。そこで本研究では、10 日間の除神経期間のうち、除神経手術の 3 日後から温熱刺激による介入を行うことが適当であると考えた。温熱刺激によって発現が誘導される HSP72 と HSP60 のタンパク質量が腓腹筋において増加が認められた (図 4-7)。これらの結果は、生化学的観点から、本研究の温熱刺激が、十分に骨格筋へ伝わっていることを示すものである。また、本研究で評価を行う骨格筋重量や、ミトコンドリア量、オートファジーは、エネルギー摂取量の減少や体重の変化によって影響される可能性がある。しかし、本研究の温熱刺激は、マウスの体重と実験期間中の総エネルギー摂取量に影響を与えなかった (図 4-8)。先行研究通り、10 日間の除神経は、腓腹筋および足底筋、ヒラメ筋の重量を約 40%減少させた (図 4-9)。一方で、温熱刺激は、下腿骨格筋の萎縮を約 15%軽減させることが示された (図 4-9)。この結果は、脱神経支配による骨格筋萎縮は、他の骨格筋萎縮モデルと細胞応答が異なっていたとしても、温熱刺激による骨格筋抑制効果が認められると解釈される。なお、除神経による骨格筋萎縮が温熱刺激によって抑制されることは、著者らの報告後 (207) に、他の研究グループによっても再現されている (240)。これらの結果は、温熱刺激が、除神経骨格筋のミトコンドリアに与える影響を続いて評価することが適当な実験条件であることを示す。

ミトコンドリアの適応

ミトコンドリアの適応として、第一にミトコンドリア量の指標のひとつであるミトコンドリア酵素のタンパク質量 (NDUFB8, UQCRC2, COX IV, ATP5A) を検討した。その結果、除神経は、ミト

ミトコンドリア量を減少させるが、温熱刺激によってその減少は軽減される可能性が示された(図4-10)。

さらに本研究では続いて、骨格筋の最大酸化能力の指標のひとつであるミトコンドリアの最大酵素活性(CS)を評価した。その結果、ミトコンドリア量の指標と同様に、温熱刺激は、除神経による腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋の最大酵素活性の低下を抑制する可能性が明らかとなった(図4-11)。

機能不全に陥ったミトコンドリアは、過剰に活性酸素種を産生し、ミトコンドリアや細胞に酸化ストレスを蓄積させることが知られている(139,149)。さらに、酸化ストレスの蓄積は、さらなるミトコンドリア毒性・機能不全の原因ともなり、悪循環を形成することが明らかとなっている(220)。したがって、酸化ストレスの蓄積は、ミトコンドリアの健全度・毒性の効果的な指標のひとつとして考えられている(33,222)。除神経は、全細胞分画およびミトコンドリア分画(実験期間終了後に存在するミトコンドリアの性質を示す)における4-HNE結合タンパク質(酸化ストレスの指標の一つ)を増加させた(図4-12)。一方で、温熱刺激は、除神経による4-HNE結合タンパク質の蓄積を軽減することが明らかとなった(図4-12)。これらの結果は、除神経によるミトコンドリアの健全度の低下を温熱刺激が改善したと解釈される。

まとめると、温熱刺激は、除神経によるミトコンドリア減少や最大酸化能力の低下を抑制する可能性が示された。これらの結果は、本研究の仮説を支持するものである。さらに、温熱刺激によって減少が抑制されたミトコンドリアの性質は、不健康な表現形を示さなかった。

ミトコンドリア生合成に関与する経路

続いて、温熱刺激が除神経によるミトコンドリア減少を抑制したメカニズムの解明に取り組んだ。除神経は、ミトコンドリア生合成を制御するマスター遺伝子であるPGC-1 α を減少させることが明らかにされている(26)。除神経によるPGC-1 α の減少を薬理的または遺伝子工学的に抑制すると、ミトコンドリア減少や骨格筋萎縮が抑制されるとも報告されている(26,189)。そこで本研究では、仮説「温熱刺激が除神経によるPGC-1 α の減少を抑制した」を設定し、仮説の正当性を検証した。

その結果、先行研究通り、PGC-1 α は除神経によって減少することが認められた(図4-13)。しかしながら、仮説に反して温熱刺激は除神経によるPGC-1 α の減少を抑制しなかった(図4-13)。これまでに、除神経によってPGC-1 α の発現量が減少する分子メカニズムは同定されていない。本研究では、リン酸化(活性化型)p38 MAPKおよびp38 MAPKの総発現量が除神経によって減少することを認めている(図4-15)。先行研究において、p38 MAPKによるPGC-1 α のリン酸化は、PGC-1 α のタンパク質の安定性に重要な働きを担うことが示されている(4,169)。したがって、除神経によってp38 MAPK由来の情報伝達が減弱したことがPGC-1 α のタンパク質発現量が減少したメカニズムを説明する一因であると考えられる。一方で、一般にPGC-1 α の活性・発現量を正に制御する上流分子であると考えられているAMPKおよびmTORC1は、除神経により活性化を認めている(図4-21, 図4-22)。つまり、除神経骨格筋においては、AMPKおよびmTORC1の活性化状態とPGC-1 α の発現量は整合しない。したがって、除神経骨格筋においては、AMPKおよびmTORC1は、PGC-1 α の活性や発現に関与しない可能性や、関与していたとしても貢献度が低いと考えられる。

第3章では、温熱刺激は、一過的なp38 MAPKの活性化を繰り返すことで、PGC-1 α の活性化を介してミトコンドリア増加が誘導された可能性が示された。そこで、10日間の除神経期間を設けたあと、一過性の温熱刺激がリン酸化型(≒活性化型)p38 MAPKに与える実験を行った。その結果、偽手術肢では第3章と同様に、温熱刺激によりリン酸化p38 MAPKの上昇が認められた(図4-16)。一方で、除神経肢では、温熱刺激を与えても偽手術肢ほどリン酸化p38 MAPKの上昇を認めなかった(図4-16)。この結果も、除神経による総p38 MAPKの発現量低下を反映しているものと考えられる。このように、温熱刺激による一過性の細胞応答の観点からも、除神経骨格筋ではPGC-1 α の活性化に関わる初期応答が十分に誘導されない可能性が高いことが伺える。

上述のPGC-1 α および関連する上流因子の結果の妥当性・正当性をより検証するために、ミトコンドリア以外でPGC-1 α が制御するタンパク質の発現量を評価する必要があると考えた。そこで、

PGC-1 α によって調節されていることが知られているグルコース輸送担体 (GLUT4) および脂肪酸輸送担体 (FAT/CD36) のタンパク質量の分析を行った (20)。その結果、除神経は、PGC-1 α と同様に GLUT4 や FAT/CD36 を減少させたが、温熱刺激による効果は認められなかった (図 4-14)。これらの一連の結果は、温熱刺激が除神経によるミトコンドリア減少を抑制したメカニズムとして PGC-1 α 以外の経路が関与した可能性を示唆する。

ところで、偽手術肢の腓腹筋において、温熱刺激による PGC-1 α の増加は認められなかった。本研究において、偽手術肢において PGC-1 α の増加が認められなかったとしても、以下の理由から第3章での主張と矛盾するものではないと考えられる。第一に、温熱刺激による PGC-1 α の活性化は、一過性であることが著者や他の研究グループの結果から示唆されていることが挙げられる。また、PGC-1 α のタンパク質の半減期は、2-3 時間と比較的短く、最終の温熱刺激から 24 時間経過した本実験条件では、増加していたとしても、その増加を検出できた可能性は低かったと考えられる。

ミトコンドリア分解に関与する経路

ミトコンドリアの量は、ミトコンドリア生合成だけではなくミトコンドリア分解とのバランスで決定される。ミトコンドリアの品質を保持するために、機能不全に陥ったミトコンドリアは、ミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) によって分解される。マイトファジーの中でも特に Parkin 依存性のマイトファジーが最も活発に研究されている。Parkin 依存性のマイトファジーのステップを下に記す (図 4-28)。

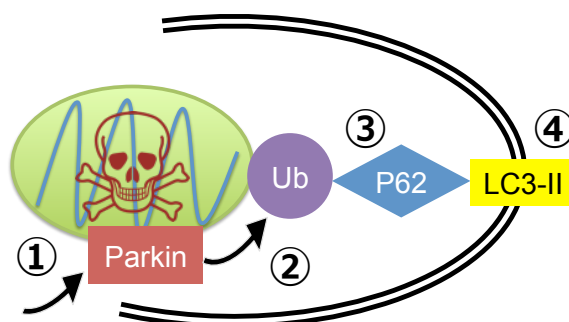


図 4-28. Parkin 依存性ミトコンドリア選択的オートファジー（マイトファジー）

- ① 細胞質から分解すべきミトコンドリアに Parkin (Mitochondrial E3 Ubiquitin ligase) が移動する。
- ② Parkin は、多くのミトコンドリア外膜タンパク質にユビキチン (Ub) を結合させる。
- ③ ユビキチンが結合したミトコンドリアを p62/SQSTM1 が認識する。
- ④ ユビキチンおよび p62 が結合したミトコンドリアは、LC3-II と呼ばれるマーカータンパク質を含む二重膜構造の小胞（オートファゴソーム）によって覆われ最終的にリソソームによって分解される。

近年の研究では、脱神経支配は骨格筋のマイトファジーを持続的に活性化させることが示されている (156, 215)。これらの先行研究は、除神経によるマイトファジーの活性化を温熱刺激が抑制した可能性を示唆する。本研究では続いて、この可能性の正当性について検証を行うために、10 日間の除神経期間後に骨格筋に存在するミトコンドリアの性質を評価した（除神経 10 日後に腓腹筋からミトコンドリア分画を抽出し、マイトファジー関連タンパク質の量を評価）。その結果、除神経は、腓腹筋ミトコンドリア分画における Parkin や Ub 結合タンパク質、p62/SQSTM1、LC3-II のタンパク質量の増加がした (図 4-17, 図 4-18)。これらの結果は、先行研究通り、除神経によって分解すべきミトコンドリアに目印を付ける過程および、実際の分解される場であるマイトファゴソームが増加していることを意味する。一方で、除神経期間中の温熱刺激は、除神経によるこれらのマイトファジー関連タンパク質の発現量増加を抑制した (図 4-17, 図 4-18)。これらの結果は、温熱刺激が除神経による分解すべきミトコンドリアに目印をつける過程および、マイトファゴソームの存在を偽手術肢の水準まで減少させたと解釈される。

ミトコンドリア分画における LC3-II のタンパク質量は、ミトコンドリアを包括しているオートファゴソーム（マイトファゴソーム）の量と高い相関関係を示すことから、「どの程度マイトファゴ

ソームが存在しているか？」について検討することができる (143)。一方で、マイトファジーを含めオートファジーは非常にダイナミックなタンパク分解機構である。したがって、温熱刺激によるミトコンドリア LC3-II の減少 (マイトファゴソームの減少) が、「マイトファジーの誘導過程が抑制されたことを反映しているのか?」「マイトファゴソーム形成後の最終的な分解過程が促進されたことを反映しているのか?」については、結論付けることができない。そこで本研究では、この問題を解決するために、マイトファゴソームの最終的な分解を阻害する薬剤であるコルヒチンを用いた追試を行った (97, 144)。その結果、コルヒチンの有無に関わらず、除神経によるミトコンドリア分画の LC3-II の増加は、温熱刺激によって抑制されることが明らかとなった (図 4-19)。この結果は、温熱刺激によるマイトファゴソーム量の減少は、マイトファゴソームの分解が促進された結果ではなく、マイトファゴソーム形成が抑制された結果であると結論付けられる。もしマイトファゴソームの最終的な分解促進によって、マイトファゴソームの量が減少したのであれば、コルヒチンによってマイトファゴソームの分解を阻害した場合、温熱刺激の効果は消失すると考えられるからである。

温熱刺激によるオートファジーの抑制

マイトファジーは、オートファジーに高く依存したミトコンドリア分解機構である。そこで、温熱刺激が除神経によるマイトファジー活性化を抑制した分子メカニズムをより深く理解するために、オートファジーの制御機構についても検討を行った。コルヒチンを用いた検討により、温熱刺激は、除神経によるオートファジーの誘導も抑制することが示された (図 4-20)。オートファジーは、30 を越えるオートファジー関連遺伝子によって制御されている (142)。なお、オートファジーの誘導は、①オートファジーの初期誘導過程、②オートファゴソームの形成過程、③オートファゴソームの伸長過程の 3 つの段階に分けられる。本研究では、様々なオートファジー関連タンパク質の発現が除神経によって上昇したことを認めている (図 4-21, 図 4-23~図 4-25)。除神経によるオー

トファジー関連タンパク質の増加のうち、オートファジーの誘導過程（抑制的に制御する分子も含めて）やオートファゴソームの形成過程は、温熱刺激による影響を受けなかった。一方で、興味深いことに、温熱刺激は、オートファゴソームの伸長に貢献する ATG5 および ATG16L のタンパク質量の増加のみを偽手術肢の水準へ回復させた（図 4-25）。オートファジー誘導刺激下で ATG5、ATG16L の発現上昇を siRNA や shRNA で阻害すると、十分にオートファジーが誘導されないことが様々な細胞種で認められている (77, 154, 219)。したがって、温熱刺激が、除神経によるオートファジーの活性化を抑制した分子機序は、ATG5、ATG12、ATG16L の発現上昇抑制によって説明されると考えられる。なぜ、温熱刺激がオートファゴソームの伸長に貢献するタンパク質のみ発現上昇を抑制したのか？については、本研究ではメカニズムの同定に至っていない。ATG5 や ATG16L は、ATF4 や ATF6 と呼ばれる転写因子によって、発現が誘導される (13)。これら ATF4 や ATF6 は、異常タンパク質の小胞体蓄積に対するストレス応答（小胞体ストレス応答）として発現が増加する (13)。小胞体は、翻訳されたタンパク質のプロセッシングの場であり、糖鎖修飾や折りたたみなどが行われる。小胞体のタンパク質プロセッシング能力を上回る過剰なタンパク質が小胞体に流入した場合や、小胞体の機能不全により、小胞体に不良タンパク質が蓄積する (47)。小胞体内の不良タンパク質の蓄積は、細胞毒性を示し、この状況を小胞体ストレスと一般に記述される。先行研究では、脱神経支配は、骨格筋の小胞体ストレス応答を誘導することが報告されている (155)。そこで、「温熱刺激による ATG5 や ATG16L の発現量増加の抑制は、小胞体ストレス応答の軽減を介しているのではないか」と仮説を設定した。検証の結果、先行研究通り、除神経によって骨格筋の小胞体ストレスが誘導されたものの、温熱刺激は、小胞体ストレス応答を軽減しなかった（図 4-26）。したがって、温熱刺激による ATG5、ATG16L の発現量増加の抑制、さらに、オートファジー誘導活性化の抑制は、小胞体ストレス応答以外の経路を介している可能性が示唆される。この可能性の妥当性、正当性をより確かめるために、ATG5 や ATG16L の発現調節機構を転写・翻訳・翻訳後修飾レベルに分類し、より詳細に検討することが今後の課題の一つとなる。

ミトコンドリア・ダイナミクス

ミトコンドリアは、細胞の状態に応じて分裂や融合を繰り返す極めて動的な小器官である。ミトコンドリアの品質は、マイトファジーのみならず、このミトコンドリア動態変化と協働して維持される。先行研究では、マイトファジーの誘導のために、ミトコンドリアの分裂が伴う事が示されている (172)。これは、巨大なミトコンドリアは、物理的にオートファゴソームが囲うことができないためと考えられている。また、近年では、ミトコンドリア分裂の促進自体が、骨格筋萎縮の原因となることも明らかにされている (37, 181)。温熱刺激によるミトコンドリアの品質管理機構の適応を深く理解するために、除神経および温熱刺激が、ミトコンドリア形態の制御タンパク質に与える影響を検討した。その結果、除神経は、ミトコンドリア融合を促進するタンパク質 (Opa1 および Mfn2) を減少させ、ミトコンドリア分裂を促進するタンパク質 (Fis1) を増加させた (図 4-27)。これらの結果は、除神経は、ミトコンドリアを分裂の表現形に移行させる可能性を示唆する。なお、この結果は、除神経がマイトファジーを活性化させていることから生理的に整合性がある。

温熱刺激は、偽手術肢の腓腹筋において、Mfn2 を増加させ、Opa1 を増加させる傾向にあった (図 4-27)。これらの結果は、偽手術肢においては、温熱刺激がミトコンドリアの融合が促進される可能性を示唆する。一方、除神経肢では、ミトコンドリア融合および分裂を制御するタンパク質は温熱刺激による影響を受けなかった (図 4-27)。つまり、温熱刺激は、除神経によるマイトファジーの活性化を抑制したにも関わらず、ミトコンドリア分裂に貢献すると考えられるタンパク質の適応は維持されたままであった (図 4-27)。先行研究では、マイトファジーの活性とミトコンドリア分裂の状態は、一致することが主張されている。しかしながら本研究では、必ずしも一致しない可能性が示された。本研究では、なぜ温熱刺激の介入によって、マイトファジーの活性化のみ抑制されたのか？その理由については特定に至っておらず、今後検討する余地がある。本研究では、ミトコンドリアの融合・分裂を制御するタンパク質の発現量のみの検討にとどまっている。今後、走

査型電子顕微鏡を活用し実際のミトコンドリア形態を評価できれば、本研究で得られた知見の妥当性・正当性をより多角的に検証することができると考えられる。

温熱刺激によってミトコンドリアの分解が抑制される意義

マイトファジーの第一の意義は、不良ミトコンドリアの除去である。本研究では、除神経によるマイトファジーの活性化は、温熱刺激によって偽手術肢の水準まで減少することが明らかとなった（図4-17～図4-19）。また、ミトコンドリア毒性の原因であり結果でもある酸化ストレスが除神経によって蓄積したが、温熱刺激によって軽減した（図4-12）。この結果は、温熱刺激は、マイトファジーの機構を直接抑制したのではなく、ミトコンドリアの健全度を維持し、ミトコンドリアを分解させる必要性を軽減させたことを反映していると考えられる。この考えは、下記の3つの知見によっても支持される。①骨格筋のマイトファジー関連遺伝子を欠損させると、除神経による酸化ストレスの蓄積は増大する（不良ミトコンドリアが分解できず、よりミトコンドリア毒性が増強されるため）（62, 129）。②もし、温熱刺激が直接マイトファジーの機構を抑制したのであれば、除神経による酸化ストレスの蓄積は、温熱刺激によって増大すると考えられるが、実際は減少した（図4-12）。③偽手術肢においては、マイトファジーの活性やマイトファジー関連タンパク質の発現量に温熱刺激による影響は認められなかった（図4-17～図4-19）。では、どのようにして除神経骨格筋のミトコンドリア機能不全・毒性を温熱刺激が改善したのか？想定されるメカニズムを次章で将来的な展望も含めて論議する。

本研究の限界点と関連研究分野への示唆

上述の通り、本研究では実験期間を10日間に設定した。この理由は、①先行研究において、10日間の除神経は、十分に骨格筋ミトコンドリアの減少および骨格筋萎縮を誘導すること（26, 105）、②除神経によるミトコンドリア減少および骨格筋萎縮に関わる応答・適応が、十分に誘導されてい

るタイミングであることである (26, 62)。しかし、温熱刺激が除神経骨格筋に好ましい影響を与えたメカニズムや生理的意義をより深く理解するためには、より早期（例：3日後や5日後など）の時点においても、温熱刺激による適応を評価する必要がある。また本研究では、除神経によるミトコンドリア減少や骨格筋萎縮が進行している際に、温熱刺激による介入を行っていることにも留意する必要がある。既に進行したミトコンドリア減少や骨格筋萎縮に対しても温熱刺激による介入が有効であるか否かについては本研究では解明に至っていない。今後、この問題を明らかにすることができれば、より臨床的意義の高い基礎的知見を提供できると考えられる。

本研究では、「除神経および温熱刺激によるミトコンドリアの量的制御」が主たる研究対象であったため、骨格筋量の制御機構については、十分な検討に至っていない。本研究では、温熱刺激が除神経によるミトコンドリア減少を抑制したメカニズムを検討する上でオートファジーの経路も評価した。オートファジーの過剰な活性化は、骨格筋萎縮を誘導することが知られている。本研究では、温熱刺激は、オートファゴソームの伸長に關与するタンパク質の発現量を正常化させ、オートファジーの誘導を抑制することが明らかとなった。したがって、温熱刺激が除神経による骨格筋萎縮を抑制した潜在的なメカニズムとして、オートファジーの正常化が挙げられる。先行研究では、Parkin 依存性マイトファジーの活性化や、ミトコンドリア減少に伴う骨格筋萎縮は、転写因子 NFE2L1/Nrf1 (nuclear factor, erythroid 2 like 1; ≠ nuclear respiratory factor 1) の活性化（細胞質から核への移行）が關与することが示されている (62)。NFE2L1/Nrf1 は、タンパク質分解を担うプロテアソーム・サブユニットの発現を誘導する転写因子である。本研究では、除神経による Parkin 依存性マイトファジーおよびミトコンドリアの減少を温熱刺激が抑制した。しかし、温熱刺激が除神経による NFE2L1/Nrf1 の活性化やプロテアソームの発現量増加を抑制するか否かは未解明であり、今後検討する余地がある。温熱刺激が、骨格筋萎縮を抑制することを示した報告は複数あるが、これまでに決定的なメカニズムは同定されていない。本研究で得られた知見および、本研究により示唆される展望は、温熱刺激による骨格筋萎縮の抑制効果について、メカニズムをより詳細に解明

するための手がかりを提供する。

第4章のまとめ

第4章の前半では、骨格筋の脱神経支配に対するリハビリテーション方法の開発を目指すといった観点から、温熱刺激の有効性の検証を行った。その結果、実験的な脱神経支配（坐骨神経切除，除神経）による骨格筋ミトコンドリアの減少（NDUFB8, UQCRC2, COX IV, ATP5A のタンパク質量）および骨格筋萎縮が、温熱刺激によって抑制される可能性を示した。

第4章の後半では、温熱刺激が除神経による骨格筋ミトコンドリアの減少やミトコンドリア酵素活性の低下を抑制したメカニズムの解明を目指して検討を行った。その結果、除神経によるミトコンドリアの分解機構（ミトコンドリア選択的オートファジー）の活性化が、温熱刺激により偽手術肢の水準まで低下することが明らかとなった（ミトコンドリア分画における LC3-II）。さらに、①分解すべきミトコンドリアに目印を付ける過程に関わるタンパク質（ミトコンドリア分画における Parkin, Ub 結合タンパク質, p62/SQSTM1）および、②分解すべきミトコンドリアを実際に分解する過程に関わるタンパク質（ATG5, ATG16L）が、温熱刺激により偽手術肢の水準まで減少することも明らかとなった。

第 5 章

統括論議



本研究で得られた知見のまとめ

本研究の主目的は、効果的なトレーニング方法やリハビリテーション方法の開発を目指して、生体の骨格筋ミトコンドリアを維持・増加させる手段として温熱刺激が有効であるか否かを明らかにすることであった。以下に本研究で得られた知見をまとめる。

第1章

第1章では、ミトコンドリアの量的制御に関わる機構や温熱刺激による骨格筋の適応についてこれまでに明らかにされた知見や課題をまとめ、概説した。

第2章

温熱刺激に関する先行研究の多くは、実験動物を麻酔下で温熱刺激を与えている。一方、近年では、温熱刺激中の麻酔処置は体温調節機能を阻害すると指摘がされており、エネルギー代謝にも影響を与える可能性が指摘されている。そこで本研究では、温熱刺激方法として、麻酔処置を必要としない暑熱環境への曝露を採用し、プロトコールの開発を行った。

第2章の前半では、マウスを暑熱環境へ曝露するための温熱刺激装置の考案・制作を行った。そして、温熱刺激装置の温度制御の精度を検討し、妥当性を確認した。

続いて第2章の後半では、本研究の温熱刺激方法の妥当性を検証した。本研究の暑熱環境への曝露による温熱刺激によって、①先行研究と同様の温熱刺激に対する生理的応答・適応が得られたこと、②熱中症を呈さないこと、③マウスの活動量に影響を与えないことを確認した。

第3章

第3章の前半では、温熱刺激を応用した効果的なトレーニング方法の可能性を検証するために、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応を検討した。その結果、温熱刺激は、生体の骨格筋（足底筋・ヒラメ筋）のミトコンドリア量の指標のひとつであるミトコンドリア呼吸鎖（NDUFB8, COX IV, ATP5A）のタンパク質量を増加させ、骨格筋の最大酸化能力の指標のひとつであるミトコンドリアの酵素活性（CS最大活性）を上昇させることが明らかとなった。さらに、運動後の温熱刺激は、持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応を相加的に増強することが明らかとなった。

第3章の後半では、温熱刺激がミトコンドリアの適応を誘導した分子メカニズムの解明を目指して、一過性の温熱刺激（単独・運動後）が、ミトコンドリア増加に関わる細胞内情報伝達経路に与える影響を検討した。その結果、①ミトコンドリア遺伝子の転写を促進する p38 MAPK の活性化（p38 MAPK のリン酸化状態の上昇）、②ミトコンドリア遺伝子の転写・翻訳を促進する mTORC1 の活性化（p70S6K のリン酸化状態の上昇）が認められた。

第4章

第4章の前半では、骨格筋の脱神経支配に対するリハビリテーション方法の開発を目指すといった観点から、温熱刺激の有効性の検証を行った。その結果、実験的な脱神経支配（坐骨神経切除、除神経）による骨格筋ミトコンドリアの減少（NDUFB8, UQCRC2, COX IV, ATP5A のタンパク質量）および骨格筋萎縮が、温熱刺激によって抑制される可能性を示した。

第4章の後半では、温熱刺激が除神経による骨格筋ミトコンドリアの減少やミトコンドリア酵素活性の低下を抑制したメカニズムの解明を目指して検討を行った。その結果、除神経によるミトコンドリアの分解機構（ミトコンドリア選択的オートファジー）の活性化が、温熱刺激により偽手術肢の水準まで低下することが明らかとなった（ミトコンドリア分画における LC3-II）。さらに、①分解すべきミトコンドリアに目印を付ける過程に関わるタンパク質（ミトコンドリア分画における Parkin,

Ub 結合タンパク質, p62/SQSTM1) および、②分解すべきミトコンドリアを実際に分解する過程に関わるタンパク質 (ATG5, ATG16L) が、温熱刺激により偽手術肢の水準まで減少することも明らかとなった。

本研究の学術的位置づけ — 温熱刺激の研究として

温熱刺激に関する研究は、骨格筋の廃用性萎縮を抑制することや、損傷した骨格筋の再建を促進することを中心に解明され、これまでに発展してきた。しかし、温熱刺激がエネルギー代謝、特にミトコンドリアへ与える影響はほとんど理解されていなかった。ここでは、本研究で得られた知見が、温熱刺激の研究分野において、どのような立場にあるかを①培養細胞の知見を生体へ発展、②温熱刺激による骨格筋の適応の観点から論議する。

培養細胞の知見を生体へ発展

本研究では、培養細胞を対象とした先行研究から着想を得て、生体の骨格筋においても温熱刺激がミトコンドリアに影響を与えるか否かを検討した。本研究は、①単独の温熱刺激、②運動後の温熱刺激、③除神経骨格筋への温熱刺激が、生体の骨格筋ミトコンドリアの量を正に制御することや、ミトコンドリアの品質を改善させる可能性を明らかにした。本研究は、培養細胞で得られた知見が生体の骨格筋でも再現されることを単に確認しただけではない。その理由は、運動・トレーニングや除神経骨格筋によるミトコンドリアの量的変化に温熱刺激が与える影響は、培養細胞では検証することはできないからである。生体を対象とした温熱刺激プロトコルを確立し、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの適応を検討した本研究は、培養細胞を対象とした研究から得られた基礎的知見を臨床へ橋渡しするための発展的・実践的な基礎研究として位置づけられる。

温熱刺激による骨格筋適応

本研究で得られた知見は、骨格筋のエネルギー代謝のみならず、温熱刺激による他の骨格筋適応にも多くの示唆を与えるものである。そのように期待される理由として、骨格筋萎縮や損傷骨格筋の再建不良の原因として、骨格筋ミトコンドリアの量的および質的な恒常性の破綻が有力な候補として挙げられているからである。実際に、本研究の第4章においては、温熱刺激が、除神経によるミトコンドリア減少および骨格筋萎縮を平行して抑制した（図4-9, 図4-10）。温熱刺激が、骨格筋萎縮を抑制することを示した報告は複数あるが、①メカニズムは未だに同定されていないこと、②ミトコンドリアへの影響を検討した例はこれまでに存在しなかったことが課題であった。骨格筋萎縮モデルの違いを留意する必要があるが、本研究で得られた知見は、温熱刺激による骨格筋萎縮の抑制効果に関わるメカニズムの一部として、ミトコンドリア量の維持が貢献した可能性を示唆する。同様に、温熱刺激による骨格筋再建の促進も、ミトコンドリアの恒常性維持で説明できる可能性がある。したがって、今後、温熱刺激が損傷・再建骨格筋のミトコンドリア量的・質的恒常性に与える可能性を検証する意義は高いと考えられる。本研究で、温熱刺激による生体の骨格筋ミトコンドリアの適応やその制御機構の応答・適応を検討したことで、これまでに温熱刺激の研究で得られている知見が統合される可能性や、これまでに不十分であった温熱刺激による骨格筋適応に関するメカニズムの理解が促進される可能性が期待される。

本研究の学術的位置づけ — ミトコンドリア研究として

温熱刺激は、生体の骨格筋ミトコンドリアの量を正に制御することが本研究で示された。ただし、そのメカニズムは、生理条件によって異なる可能性が示唆される。ここでは、ミトコンドリア量の増加を、ミトコンドリア生合成の促進およびミトコンドリア分解の抑制のふたつの要素に分類し、温熱刺激による適応を論議する。

温熱刺激によるミトコンドリアの生合成の促進

温熱刺激によるミトコンドリア生合成は、生体内環境に強く依存する可能性がある

温熱刺激は、ミトコンドリア生合成に関わる細胞応答 (p38 MAPK・mTORC1) を誘導し (図 3-11, 図 3-14)、実際にミトコンドリアを増加させることが第 3 章で明らかとなった (図 3-8)。さらに、運動後に温熱刺激を与えることで、持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応が相加的に増強されることも明らかとなった。これらの結果は、通常飼育条件や運動・トレーニングとの併用条件であれば、温熱刺激によるミトコンドリア生合成が促進されると解釈される。

しかしながら、温熱刺激によるミトコンドリア生合成の促進は、必ずしも認められるとは限らない。本研究の第 4 章では、第 3 章の結果を受けて、除神経による PGC-1 α の減少の抑制を介して、ミトコンドリアの減少が軽減されるであろうと予想していた。しかし、除神経骨格筋においては、温熱刺激によってミトコンドリア減少が抑制されたものの (図 4-10)、PGC-1 α の減少を抑制しなかった (図 4-13)。また、温熱刺激による一過性の細胞応答の観点からも、除神経骨格筋では PGC-1 α の活性化に関わる初期応答 (p38 MAPK の活性化) が十分に誘導されない可能性も示唆された。他の研究グループによって、高脂肪食摂取による骨格筋のミトコンドリア量の増加効果は、温熱刺激によって消失することが報告されている (75)。これらの知見は、温熱刺激によるミトコンドリア生合成の促進効果が得られるか否かは、生体内環境に高く依存する可能性を示唆する。

温熱刺激によるミトコンドリア生合成メカニズムは、運動・トレーニングと同じか？

運動・トレーニングによる PGC-1 α の活性化やミトコンドリア増加を制御する上流因子として AMPK の活性化が挙げられる。本研究では、培養細胞や摘出筋を対象とした先行研究から、温熱刺激によるミトコンドリア増加は、AMPK の活性化で説明されるであろうと想定していた。しかし予想に反して、本研究では、温熱刺激は AMPK をむしろ不活性化させることが示された (図 3-10)。ところで、電気刺激を用いて骨格筋を収縮させることで、除神経による PGC-1 α やミトコンドリ

アの減少が抑制されることが先行研究で明らかにされている (1, 162, 231)。しかし、温熱刺激は、除神経によるミトコンドリアの減少を抑制したが、PGC-1 α の減少を抑制しなかった (図 4-13)。これらの知見により、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリア生合成の誘導は、運動・トレーニングと異なるメカニズムを介している可能性が示唆される。

一方で、p38 MAPK の活性化や HSP72 の増加もミトコンドリアを増加させる上流因子である。持久的運動・トレーニングおよび温熱刺激は、いずれも p38 MAPK を活性化させ、HSP72 を増加させる。しかし、温熱刺激によるこれらの生理的応答・適応は、持久的運動・トレーニングと比較して顕著であった (図 3-6, 図 3-11)。したがって、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリア生合成の誘導は、運動・トレーニングと共通の経路が関与していたとしても、その貢献度が異なる可能性が示唆される。

温熱刺激によってミトコンドリアを増加させる生理学的意義

温熱刺激によりミトコンドリア生合成が誘導される生理的意義は必ずしも明らかではない。細胞ストレスを取り扱った先行研究では、ストレスによりタンパク質の変性などが誘導されると変性タンパク質の修復や不可逆的な変性タンパク質は分解される。この際に、多くの ATP が必要であり、ミトコンドリアを増加させる必要があるとの主張がある (222)。一方で、ストレスによるミトコンドリア生合成は、ステロイド合成能を保持し、細胞内の恒常性を維持する意義があるとの主張もある (63)。また、細胞のストレス応答として典型的な HSP72 の発現誘導とミトコンドリアの関連遺伝子の転写を誘導する細胞内情報伝達経路 (mTORC1 および p38 MAPK) は部分的に共通している (16, 39)。さらに近年では、HSPs の転写因子である HSF1 が PGC-1 α の転写を促進することも明らかにされた (131)。したがって、温熱刺激による HSP の発現誘導と同調して、ミトコンドリアが増加することは、生理的・分子生物学的に整合性があると考えられる。今後、温熱刺激によってミトコンドリアが増加するより詳細なメカニズムやミトコンドリアの性質を解明できれば、生理学的意

義の理解も深まると期待される。

温熱刺激によるミトコンドリアの分解の抑制

温熱刺激が、ミトコンドリアの分解機構（マイトファジー）に与える影響は、第4章で検討した。マイトファジーの第一の意義は、不良ミトコンドリアの除去である。その結果、除神経によるマイトファジーの活性化は、温熱刺激によって偽手術肢の水準に低下することが明らかとなった（図4-17～図4-19）。また、ミトコンドリア毒性の原因であり結果でもある酸化ストレスが除神経によって蓄積したが、温熱刺激によって低下した（図4-12）。この結果は、温熱刺激は、マイトファジーの機構を直接抑制したのではなく、ミトコンドリアの健全度を維持し、ミトコンドリアを分解させる必要性を軽減させたことを反映していると考えられる。この考えは、下記の3つの知見により支持される。①骨格筋のマイトファジー関連遺伝子を欠損させると、除神経による酸化ストレスの蓄積は増大する（不良ミトコンドリアが分解できず、よりミトコンドリア毒性が増強されるため）(62, 129)。②もし、温熱刺激が直接マイトファジーの機構を抑制したのであれば、除神経による酸化ストレスの蓄積は、温熱刺激によって増大すると考えられるが、実際は改善した（図4-12）。③偽手術肢においては、マイトファジーの活性やマイトファジー関連タンパク質の発現量に温熱刺激による影響は認められなかった（図4-17～図4-19）。したがって、第3章では、単独または運動後の温熱刺激は、ミトコンドリア量を増加させたが、そのメカニズムとして、ミトコンドリア分解の抑制が関与した可能性が低いと考えられる。では、どのようにして除神経骨格筋のミトコンドリア機能不全・毒性を温熱刺激が改善したのか？想定されるメカニズムや将来的な展望を次に論議する。

将来の展望：ミトコンドリアの量的制御から質的制御へ

本研究は、ミトコンドリアの量的制御を対象に温熱刺激の効果を検証してきた。近年、研究分野

において、ミトコンドリアの量的制御と同様に質的制御（性質・形態、機能などの制御）も細胞内の恒常性維持に重要な働きをもつことが示唆されるようになってきた。上述のとおり、温熱刺激は、ミトコンドリアの機能不全の改善や質的制御にも貢献する可能性が高い。ここでは、将来的な展望として温熱刺激によるミトコンドリアの質的制御の可能性を、①ミトコンドリア・ダイナミクス、②ミトコンドリアストレス応答の観点から論じる。

ミトコンドリア・ダイナミクス

ミトコンドリアは、ダイナミックな細胞小器官であり、細胞内環境に応じて融合・分裂を繰り返す。近年では、このミトコンドリアの形態変化がミトコンドリアの質を積極的に維持し、ミトコンドリアの機能を変化させる機構であることが示されつつある (49)。骨格筋のミトコンドリアにおいては、分裂よりも融合の表現形を示す方が、細胞内環境維持または運動の遂行に有利である可能性が示唆されている (69)。その根拠として、①ミトコンドリアの融合に関わる遺伝子を欠損した骨格筋では、mtDNA に突然変異が蓄積し、骨格筋が萎縮すること (37)、②除神経/加齢/疾病状態の骨格筋では、ミトコンドリア分裂が優位であること (140, 226)、③持久的トレーニング後の骨格筋は、ミトコンドリア融合が優位であることである (102)。

ミトコンドリアの量的変化に関する研究と比較して、ミトコンドリアの形態変化に関する研究は、発展途上である。しかし、近年では、ミトコンドリア形態変化は、病的変化のみならず骨格筋の生理的適応にも関連することが精力的に研究されている。例えば、レジスタンストレーニングは、骨格筋ミトコンドリア量に顕著な変化を及ぼさないと考えられてきた (185)。しかし、ミトコンドリアの機能（呼吸能力）は、レジスタンストレーニングによって向上することが示されている (166)。これらの報告は、ミトコンドリアの品質・機能がレジスタンストレーニングによって向上したと解釈される。この主張を裏付けるように、Kitaoka らは、レジスタンストレーニングによってミトコンドリアの融合を制御するタンパク質群が増加することを近年報告している (104)。したがって、

ミトコンドリアの適応や生理機能を正しく理解するためには、ミトコンドリアの量的制御の観点に加えてミトコンドリアの形態変化にも注意を払うことが将来的に重要視されると考えられる。

第4章では、偽手術肢の骨格筋において温熱刺激がミトコンドリアの融合に関連するタンパク質を増加させることが示されている（図 4-27）。つまり、温熱刺激は、ミトコンドリアの量だけではなく、質も高める可能性がある。温熱刺激によってミトコンドリアの融合が促進されるのであれば、運動・トレーニングによる生理的適応の促進や加齢や疾患の予防・治療に貢献できるかもしれない。ただし、除神経骨格筋においては、ミトコンドリア融合・分裂を制御するタンパク質は、温熱刺激によって影響されなかったことに留意する必要がある（図 4-27）。偽手術肢と除神経肢の間で異なる適応が観察された理由のひとつとして、ミトコンドリア融合に関与するタンパク質は、PGC-1 α によって発現量が制御されていることが挙げられる。したがって、温熱刺激がミトコンドリアの融合を促進する可能性は、骨格筋の生理条件（特に PGC-1 α の発現量・活性）に強く依存する可能性が高いと考えられる。したがって、温熱刺激によってミトコンドリアの形態変化が誘導される否かは、今後様々な生理条件で個別に検証する必要があると考えられる。

Mitochondrial unfolded protein response: UPR^{mt}

機能不全に陥ったミトコンドリアは、本研究で着目したマイトファジーによって小器官レベルで分解され、細胞内の恒常性が保持される。一方で、機能不全に陥ったミトコンドリアは、ミトコンドリア局在型プロテアーゼおよびミトコンドリア局在型シャペロン (mtHSPs) によって分子レベルで分解・修復されることも明らかとなっている (58, 172)。ミトコンドリア局在型のプロテアーゼや mtHSP は、核 DNA にコードされている。機能不全に陥ったミトコンドリアは、核へ逆行シグナルを伝達し、ミトコンドリア局在型のプロテアーゼや mtHSP の発現を誘導する。この一連の機構は、mitochondrial unfolded protein responses (UPR^{mt}) と記述され、近年注目されているミトコンドリアの品質管理機構のひとつである。先行研究において、ミトコンドリアの機能不全や付随す

る酸化ストレスの蓄積の原因として、タンパク質の輸送不全や折りたたみ不全などのタンパク質の翻訳後のプロセッシングが健全に遂行されていないことが挙げられている (168)。ミトコンドリアにおけるタンパク質恒常性の破綻は、小胞体などの他の細胞小器官の機能不全も招き、骨格筋のみならず脳や肝臓などの病理変化の原因となることが近年示されている (12, 11, 64)。したがって、プロテアーゼや mtHSPs を適切に増加させ、不良タンパク質の修復することや除去することは、ミトコンドリアに加えて細胞全体の恒常性を保つ手段として有効であると期待される。実際に、培養細胞を対象とした研究では、mtHSP である HSP10 や HSP60、TRAP1 (mtHSP90) は、酸化ストレスの抑制に貢献することが示されている (9, 99, 190)。

上述の通り、第4章において、除神経によってミトファジーが抑制された背景には、ミトコンドリア品質の改善があると考えられる。しかしながら、温熱刺激の「何」がミトコンドリアの品質管理に貢献したのかについて、本研究では解明に至っていない。しかし、候補として mtHSPs が貢献した可能性は高いと筆者は考えている。その根拠は、本研究や著者の関連研究において、温熱刺激は mtHSPs を増加させる十分な手法であることが示されているからである (図 3-6, 図 4-7)。mtHSPs とミトコンドリアの品質・量の関係について今後検討を重ねることで、生体の骨格筋本研究で残された課題を解決できると考えられる。

スポーツ現場および臨床現場への応用・意義

本研究は、実験動物を対象とした検討であり、ヒトへの応用に向けて、被験対象の生物学的な違いを理解することや今後更なる研究の発展が必要である。マウスはヒトと共通した体温調節機能を大部分で有していることから、体温調節の研究において頻繁に用いられる実験動物である。一方でマウスは、体重あたりの体表面積がヒトと比較して 10 倍以上大きいといった形態学的な違いがある。すなわち、マウスを暑熱環境へ曝露した際には、ヒトと比較してより容易に温熱刺激が生体に伝わりと考えられる。また、マウスは汗腺がほとんど存在せず、唾液を身体に散布する行動により、

体温調節を行なっていることも特徴である。スポーツ現場や臨床への橋渡しを目指す際には、上述のヒトとマウスの温熱刺激に対する生理応答の違いについて形態的、解剖生理的な違いから把握しておくことが重要であると考えられる。

ヒトを対象とした温熱刺激方法としては、温浴やマイクロ波が挙げられる。先行研究では、45 °Cの温水に1時間下肢を入浴させることによって筋温が35.9 °Cから39.5 °Cに上昇したという報告がある(147)。また、マイクロ波を利用すると、加温開始から20分で筋温が41 °Cに達し、HSP72の発現量が増加すると報告されている(89)。このように、ヒトの骨格筋を対象に温熱刺激を与えることは、方法的に難しいものではない。ヒトを対象とした温熱刺激の研究は少数ではあるが、最近では、マイクロ波による温熱刺激は、レジスタンス運動によるAkt/mTORC1/p70S6Kの経路の活性化を一層亢進することが明らかとなっており(98)、実験動物を対象とした先行研究が、ヒトを対象としても有効であることが明らかとなりつつある。したがって、実験動物を対象とした本研究の成果が、ヒトにおいても同様な成果が得られる可能性は十分に考えられる。

スポーツ医科学の指導書やスポーツ指導の現場では、スポーツ外傷直後や運動後は、炎症の軽減や疲労回復、トレーニングの効果を高めるためにアイシングを行うように指導され、今や常識として考えられている。しかし、アイシングの効果も、経験的に確かめられたものが多く、必ずしも科学的根拠が明らかではない。運動後のアイシングや寒冷曝露は、AMPKとp38 MAPKの活性化を介してミトコンドリアの増加適応を促進するとの報告がある(90)。つまり、温熱刺激と同等な効果が得られると考えられるが、そのメカニズムは温熱刺激とアイシングでは異なるかもしれない。一方で、最近では、スポーツ現場の常識に反して、骨格筋損傷後のアイシングは、かえって筋の治癒を遅延させることや(204)、レジスタンス運動後のアイシングは、骨格筋肥大シグナル応答および最終的な骨格筋肥大効果を消失させることが明らかにされている(180)。したがって、統合的な視点からみれば、運動後の物理療法は、アイシングよりも温熱刺激のほうが好ましいと考えられる。ただし、スポーツ現場での応用の際には、温熱刺激による負の効果が生じる潜在的な可能性も十分

考慮する必要がある。また、本研究の限界点のひとつとして、温熱刺激が運動パフォーマンスに与える影響の評価を行っていないことが挙げられる。そこで、よりスポーツ場面を想定した研究や、温熱刺激の影響を骨格筋以外の観点からも多角的に評価する研究が発展すれば、温熱刺激の適切な介入局面が提案できると考えられる。

本研究は、アスリートのみならず、運動が必要であるにも関わらず実施が困難な神経損傷患者を想定したリハビリテーションとしても、温熱刺激の有効性を検証した。臨床においては、脊髄損傷患者などの神経損傷患者の骨格筋萎縮やそれに伴う代謝異常症が重大な臨床的課題として認識されている (123, 116)。また、神経科学の分野においては、損傷した神経の再建や運動の再習得を目指した理学・運動療法が盛んに研究・実践されている。骨格筋量が多いことは、運動の再習得を目指す上で有利になると考えられる。したがって、神経損傷患者において骨格筋量や機能を高く保つことの臨床的意義は重大である。臨床現場においては、神経損傷患者の骨格筋萎縮を抑制する方法として、電気刺激による骨格筋収縮がリハビリテーションの一貫として行われることがある。しかし、痛みを伴うなど、代替法の開発が望まれている。本研究では、除神経骨格筋に対して温熱刺激を与えると、ミトコンドリア量が保持され、骨格筋萎縮が抑制されることが明らかとなり、新たなアプローチとしての応用が期待される。ただし、本研究では、除神経によるミトコンドリア減少や骨格筋萎縮が進行している際に、温熱刺激による介入を行っていることに留意する必要がある。既に進行したミトコンドリア減少や骨格筋萎縮に対しても温熱刺激による介入が有効であるか否かについては今後検証し、慎重に適応範囲を見定める必要がある。

日本人は、古くから身体を温めることが健康の保持・増進によいと考え日常生活に取り入れてきた。さらに、整形外科の分野では、温熱療法として普及している。しかし、温熱刺激の効果を裏付ける科学的根拠は十分ではないことが現状である。本研究では、骨格筋ミトコンドリアを対象に、温熱刺激による適応を検討してきた。本研究は、日本人の伝統的な生活習慣や経験に基づかれている物理療法に細胞・分子生理学の観点から新たな科学的根拠を付与するものである。さらに、本研

究により、温熱療法の適応症拡大が期待され、古典的な治療法が新たな治療法に生まれ変わる可能性が拓かれる。

結語

本研究の主目的は、効果的なトレーニング方法やリハビリテーション方法の開発を目指して、生体の骨格筋ミトコンドリアを維持・増加させる手段として温熱刺激が有効であるか否かを明らかにすることであった。

運動後の温熱刺激は、持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応を相加的に増強することが明らかになった。このメカニズムとして、温熱刺激によるミトコンドリア生合成の促進が貢献した可能性が示唆された。

日常的な温熱刺激は、実験的な脱神経支配による骨格筋ミトコンドリアの減少および骨格筋萎縮を抑制する可能性が示された。このメカニズムとして、温熱刺激による骨格筋ミトコンドリアの分解の抑制が貢献した可能性が示唆された。

古典的治療法である温熱刺激は、日本人の日常生活や医療現場に広く普及している。しかし、温熱刺激による生体適応に関する科学的根拠は十分ではない。本研究は、温熱刺激を応用した効果的なトレーニング方法・リハビリテーション方法の開発に向けた基礎的な科学的根拠を提供する。

引用文献



1. **Adams CM, Suneja M, Dudley-Javoroski S, Shields RK.** Altered mRNA expression after long-term soleus electrical stimulation training in humans with paralysis. *Muscle Nerve* 43: 65–75, 2011.
2. **Adhihetty PJ, Ljubcic V, Hood DA.** Effect of chronic contractile activity on SS and IMF mitochondrial apoptotic susceptibility in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E748–E755, 2007.
3. **Agudelo LZ, Femenía T, Orhan F, Porsmyr-Palmertz M, Goiny M, Martinez-Redondo V, Correia JC, Izadi M, Bhat M, Schuppe-Koistinen I, Pettersson AT, Ferreira DMS, Krook A, Barrès R, Zierath JR, Erhardt S, Lindskog M, Ruas JL.** Skeletal muscle PGC-1 α 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* 159: 33–45, 2014.
4. **Akimoto T, Li P, Yan Z.** Functional interaction of regulatory factors with the Pgc-1alpha promoter in response to exercise by in vivo imaging. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C288–C292, 2008.
5. **Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z.** Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280: 19587–19593, 2005.
6. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, Garland Science, New York, USA, 2014.
7. **Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541–6551, 1996.
8. **Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7: 261–269, 1997.
9. **Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR.** TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1823: 767–773, 2012.
10. **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465, 1981.
11. **Ansari N, Khodaghali F.** Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanism aspect. *Curr Neuropharmacol* 11: 414–429, 2013.
12. **Arnould T, Michel S, Renard P.** Mitochondria retrograde signaling and the UPR^{mt}: Where are we in mammals? *Int J Mol Sci* 16: 18224–18251, 2015.

13. **B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A.** The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41: 7683–7699, 2013.
14. **Baar K, Esser K.** Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol* 276: C120–C127, 1999.
15. **Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO.** Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16: 1879–1886, 2002.
16. **Banerjee Mustafi S, Chakraborty PK, Dey RS, Raha S.** Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt. *Cell Stress Chaperones* 14: 579–589, 2009.
17. **Barazzoni R, Short KR, Asmann Y, Coenen-Schimke JM, Robinson MM, Sreekumaran Nair K.** Insulin fails to enhance mTOR phosphorylation, mitochondrial protein synthesis, and ATP production in human skeletal muscle without amino acid replacement. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E1117–E1125, 2012.
18. **Bassett DR, Howley ET.** Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc* 32: 70–84, 2000.
19. **Bauman WA, Spungen AM.** Carbohydrate and lipid metabolism in chronic spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 24: 266–277, 2001.
20. **Benton CR, Nickerson JG, Lally J, Han XX, Holloway GP, Glatz JFC, Luiken JJFP, Graham TE, Heikkila JJ, Bonen A.** Modest PGC-1 α overexpression in muscle in vivo is sufficient to increase insulin sensitivity and palmitate oxidation in subsarcolemmal, not intermyofibrillar, mitochondria. *J Biol Chem* 283: 4228–4240, 2008.
21. **Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR.** Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Appl Physiol* 85: 1279–1284, 1998.
22. **Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3: 1014–1019, 2001.
23. **Bonaldo P, Sandri M.** Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6: 25–39, 2013.
24. **Bongers KS, Fox DK, Ebert SM, Kunkel SD, Dyle MC, Bullard SA, Dierdorff JM, Adams CM.** Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E907–E915, 2013.

25. **Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM.** A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481: 463–468, 2012.
26. **Brault JJ, Jespersen JG, Goldberg AL.** Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α or 1 β overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem* 285: 19460–19471, 2010.
27. **Brenner D, Mak TW.** Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21: 871–877, 2009.
28. **Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, MacDonald MJ, McGee SL, Gibala MJ.** Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol* 586: 151–160, 2007.
29. **Calderhead RG.** Light-emitting diode phototherapy in dermatological practice, *In: Lasers in Dermatology and Medicine* ed. Keyvan N: 165-231, London, United Kingdom 2011.
30. **Calvani R, Joseph A-M, Adhihetty PJ, Miccheli A, Bossola M, Leeuwenburgh C, Bernabei R, Marzetti E.** Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem* 394: 393–414, 2013.
31. **Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA.** PGC1- α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J Physiol* 592: 4575–4589, 2014.
32. **Carlson CL, Winder WW.** Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol* 86: 669–674, 1999.
33. **Chaiswing L, Cole MP, Ittarat W, Szweda LI, St Clair DK, Oberley TD.** Manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase modify early oxidative events in acute adriamycin-induced mitochondrial toxicity. *Mol. Cancer Ther* 4: 1056–1064, 2005.
34. **Chalah A, Khosravi-Far R.** The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* 615: 25–45, 2008.
35. **Chan EY.** mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Sci Signal* 2: pe51, 2009.
36. **Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC.** Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141: 280–289, 2010.
37. **Chen Y, Currie RW.** Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced SP-1 and AP-1 and stimulates Oct-1 DNA-binding activity in heart. *Inflamm Res* 54: 338–343, 2005.

38. **Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, Kemp BE, McConnell GK.** Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes* 52: 2205–2212, 2003.
39. **Chou S-D, Prince T, Gong J, Calderwood SK.** mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PLoS ONE* 7: e39679, 2012.
40. **Chung J, Nguyen A-K, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MHS, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestril R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA.** HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1739–1744, 2008.
41. **Coyle EF, Martin WH, Sinacore DR, Joyner MJ, Hagberg JM, Holloszy JO.** Time course of loss of adaptations after stopping prolonged intense endurance training. *J Appl Physiol* 57: 1857–1864, 1984.
42. **Cross MC, Radomski MW, VanHelder WP, Rhind SG, Shephard RJ.** Endurance exercise with and without a thermal clamp: effects on leukocytes and leukocyte subsets. *J Appl Physiol* 81: 822–829, 1996.
43. **Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G.** Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* 174: 915–921, 2006.
44. **Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P.** mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450: 736–740, 2007.
45. **DeFronzo RA, Ferrannini E, Sato Y, Felig P, Wahren J.** Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest* 68: 1468–1474, 1981.
46. **Dejean LM, Martinez-Caballero S, Kinnally KW.** Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death Differ* 13: 1387–1395, 2006.
47. **Deldicque L.** Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia? *Front Physiol* 4, 2013.
48. **Derave W, Ai H, Ihlemann J, Witters LA, Kristiansen S, Richter EA, Ploug T.** Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes* 49: 1281–1287, 2000.
49. **Drake JC, Wilson RJ, Yan Z.** Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *FASEB J* 30: 13–22, 2016.
50. **Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, McCaffrey N, Moyna NM, Zierath JR, O’Gorman DJ.** Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA

- abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol* 588: 1779–1790, 2010.
51. **Egan B, Zierath JR.** Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 17: 162–184, 2013.
52. **Engelhardt W.** Ortho- and pyrophosphate in aerobic and anaerobic metabolism of erythrocytes. *Biochem Z* 227: 16–38, 1930.
53. **Farber NE, Schmidt JE, Kampine JP, Schmeling WT.** Halothane modulates thermosensitive hypothalamic neurons in rat brain slices. *Anesthesiol* 83: 1241–1253, 1995.
54. **Ferreira R, Vitorino R, Alves RMP, Appell HJ, Powers SK, Duarte JA, Amado F.** Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics* 10: 3142–3154, 2010.
55. **Ferreiro E, Baldeiras I, Ferreira IL, Costa RO, Rego AC, Pereira CF, Oliveira CR.** Mitochondrial- and endoplasmic reticulum-associated oxidative stress in Alzheimer's disease: from pathogenesis to biomarkers. *Int J Cell Biol* 2012: 735206, 2012.
56. **Fisker S, Jørgensen JO, Christiansen JS.** Variability in growth hormone stimulation tests. *Growth Horm. IGF Res* 8 Suppl A: 31–35, 1998.
57. **Fitts RH, Booth FW, Winder WW, Holloszy JO.** Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am J Physiol* 228: 1029–1033, 1975.
58. **Friedman JR, Nunnari J.** Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335–343, 2014.
59. **Frier B, Hancock C, Little J.** Reductions in RIP140 are not Required for Exercise and AICAR Mediated Increases in Skeletal Muscle Mitochondrial Content. *J Appl Physiol* 111: 688–695, 2011.
60. **Frier BC, Locke M.** Heat stress inhibits skeletal muscle hypertrophy. *Cell Stress Chaperones* 12: 132–141, 2007.
61. **Fuku N, Pareja-Galeano H, Zempo H, Alis R, Arai Y, Lucia A, Hirose N.** The mitochondrial-derived peptide MOTS-c: a player in exceptional longevity? *Aging Cell* 14: 921–923, 2015.
62. **Furuya N, Ikeda S-I, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JAO, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T.** PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* 10: 50–60, 2014.

63. **Gak IA, Radovic SM, Dukic AR, Janjic MM, Stojkov-Mimic NJ, Kostic TS, Andric SA.** Stress triggers mitochondrial biogenesis to preserve steroidogenesis in Leydig cells. *Biochim Biophys Acta* 1853: 2217–2227, 2015.
64. **Gariani K, Menzies KJ, Ryu D, Wegner CJ, Wang X, Ropelle ER, Moullan N, Zhang H, Perino A, Lemos V, Kim B, Park Y-K, Piersigilli A, Pham TX, Yang Y, Siah Ku C, Koo SI, Fomitchova A, Cantó C, Schoonjans K, Sauve AA, Lee J-Y, Auwerx J.** Eliciting the mitochondrial unfolded protein response via NAD(+) repletion reverses fatty liver disease. *Hepatology* (September 24, 2015). doi: 10.1002/hep.28245.
65. **Garramone RR, Winters RM, Das DK, Deckers PJ.** Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. *Plast Reconstr Surg* 93: 1242–1247, 1994.
66. **Gavin TP, Westerkamp LM, Zwetsloot KA.** Soleus, plantaris and gastrocnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice. *Acta Physiol* 188: 113–121, 2006.
67. **Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA.** Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol* 575: 901–911, 2006.
68. **Giombini A, Giovannini V, Di Cesare A, Pacetti P, Ichinoseki-Sekine N, Shiraishi M, Naito H, Maffulli N.** Hyperthermia induced by microwave diathermy in the management of muscle and tendon injuries. *Br Med Bull* 83: 379–396, 2007.
69. **Glancy B, Hartnell LM, Malide D, Yu Z-X, Combs CA, Connelly PS, Subramaniam S, Balaban RS.** Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature* 523: 617–620, 2015.
70. **Godin G.** Theories of reasoned action and planned behavior: usefulness for exercise promotion. *Med Sci Sports Exerc* 26: 1391–1394, 1994.
71. **Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L.** During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13: 589–598, 2011.
72. **Gordon JW, Rungi AA, Inagaki H, Hood DA.** Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 389–396, 2001.
73. **Goto K, Honda M, Kobayashi T, Uehara K, Kojima A, Akema T, Sugiura T, Yamada S, Ohira Y, Yoshioka T.** Heat stress facilitates the recovery of atrophied soleus muscle in rat. *Jpn J Physiol* 54: 285–293, 2004.
74. **Green DR, Kroemer G.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626–629, 2004.

75. **Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC.** Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 58: 567–578, 2008.
76. **Gupte AA, Bomhoff GL, Touchberry CD, Geiger PC.** Acute heat treatment improves insulin-stimulated glucose uptake in aged skeletal muscle. *J Appl Physiol* 110: 451–457, 2011.
77. **Han H-E, Kim T-K, Son H-J, Park WJ, Han P-L.** Activation of autophagy pathway suppresses the expression of iNOS, IL6 and cell death of LPS-stimulated microglia cells. *Biomol Ther* 21: 21–28, 2013.
78. **Hancock CR, Han D-H, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO.** High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7815–7820, 2008.
79. **Hatade T, Takeuchi K, Fujita N, Arakawa T, Miki A.** Effect of heat stress soon after muscle injury on the expression of MyoD and myogenin during regeneration process. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 14: 325–333, 2014.
80. **Henstridge DC, Bruce CR, Drew BG, Tory K, Kolonics A, Estevez E, Chung J, Watson N, Gardner T, Lee-Young RS, Connor T, Watt MJ, Carpenter K, Hargreaves M, McGee SL, Hevener AL, Febbraio MA.** Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes* 63: 1881–1894, 2014.
81. **Henstridge DC, Whitham M, Febbraio MA.** Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. *Mol Metab* 3: 781–793, 2014.
82. **Holloszy JO.** Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 242: 2278–2282, 1967.
83. **Holloszy JO, Coyle EF.** Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56: 831–838, 1984.
84. **Hood DA.** Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1137–1157, 2001.
85. **Hooper PL.** Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341: 924–925, 1999.
86. **Hoppeler H.** Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7: 187–204, 1986.
87. **Hornberger TA, Hunter RB, Kandarian SC, Esser KA.** Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C179–C187, 2001.

88. **Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE, Fedele MJ, Fiorotto ML, Chin ER, Esser KA.** Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J* 380: 795-804, 2004.
89. **Ichinoseki-Sekine N, Naito H, Saga N, Ogura Y, Shiraishi M, Giombini A, Giovannini V, Katamoto S.** Effects of microwave hyperthermia at two different frequencies (434 and 2450 MHz) on human muscle temperature. *J Sports Sci Med* 7: 191-193, 2008.
90. **Ihsan M, Markworth JF, Watson G, Choo HC, Govus A, Pham T, Hickey A, Cameron-Smith D, Abbiss CR.** Regular postexercise cooling enhances mitochondrial biogenesis through AMPK and p38 MAPK in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309: R286-R294, 2015.
91. **Iqbal S, Hood DA.** Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 306: C1176-C1183, 2014.
92. **Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K.** Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25: 2966-2977, 2006.
93. **Jacinto E, Hall MN.** Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 117-126, 2003.
94. **Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM.** AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12017-12022, 2007.
95. **Johnson GL, Lapadat R.** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912, 2002.
96. **Joyeux M, Faure P, Godin-Ribuot D, Halimi S, Patel A, Yellon DM, Demenge P, Ribuot C.** Heat stress fails to protect myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats against infarction. *Cardiovasc Res* 43: 939-946, 1999.
97. **Ju J-S, Varadhachary AS, Miller SE, Wehl CC.** Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. *Autophagy* 6: 929-935, 2010.
98. **Kakigi R, Naito H, Ogura Y, Kobayashi H, Saga N, Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Katamoto S.** Heat stress enhances mTOR signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol Sci* 61: 131-140, 2011.
99. **Kayani AC, Close GL, Dillmann WH, Mestril R, Jackson MJ, McArdle A.** Overexpression of HSP10 in skeletal muscle of transgenic mice prevents the age-related fall in maximum tetanic force generation and muscle Cross-Sectional Area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R268-R276, 2010.

100. **Kim B, Kim JS, Yoon Y, Santiago MC, Brown MD, Park JY.** Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial division impairs myogenic differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305: R927–R938, 2013.
101. **Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L.** AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13: 132–141, 2011.
102. **Kirkwood SP, Packer L, Brooks GA.** Effects of endurance training on a mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 255: 80–88, 1987.
103. **Kitaoka Y, Nilsson MI, Hettinga BP, Marquez OS, Suri R, Tarnopolsky MA.** Whole body heat stress increases muscle PGC-1alpha expression in C57BL/6J mice. In: *ACSM Integrative Physiology of Exercise*. ACSM Integrative Physiology of Exercise. Sep 20, Miami Beach, FL, USA, 2014.
104. **Kitaoka Y, Ogasawara R, Tamura Y, Fujita S, Hatta H.** Effect of electrical stimulation-induced resistance exercise on mitochondrial fission and fusion proteins in rat skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 40: 1137–1142, 2015.
105. **Kitaoka Y, Takahashi Y, Machida M, Takeda K, Takemasa T, Hatta H.** Effect of AMPK activation on monocarboxylate transporter (MCT)1 and MCT4 in denervated muscle. *J Physiol Sci* 64: 59–64, 2014.
106. **Koch GL.** The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays* 12: 527–531, 1990.
107. **Kojima A, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Fujiya H, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Aoki H, Yoshioka T.** Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J Orthop Sci* 12: 74–82, 2007.
108. **Koshinaka K, Kawamoto E, Abe N, Toshinai K, Nakazato M, Kawanaka K.** Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro. *J Physiol Sci* 63: 409–418, 2013.
109. **Koyanagi M, Asahara S-I, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fuchita M, Mikami T, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto M, Koike M, Uchiyama Y, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y.** Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. *PLoS ONE* 6: e23238, 2011.
110. **Krebs HA, Johnson WA.** The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4: 148–156, 1937.
111. **Krieger DA, Tate CA, McMillin-Wood J, Booth FW.** Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol* 48: 23–28, 1980.
112. **Lai Y-J, Lin C-L, Chang Y-J, Lin M-C, Lee S-T, Sung F-C, Lee W-Y, Kao C-H.** Spinal cord injury increases the risk of type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Spine J* 14: 1957–1964, 2014.

113. **Laplante M, Sabatini DM.** mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122: 3589–3594, 2009.
114. **Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, Hey-Mogensen M.** Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol* 590: 3349–3360, 2012.
115. **Laughlin MH, Armstrong RB.** Rat muscle blood flows as a function of time during prolonged slow treadmill exercise. *Am J Physiol* 244: H814–H824, 1983.
116. **Lavela SL, Weaver FM, Goldstein B, Chen K, Miskevics S, Rajan S, Gater DR.** Diabetes mellitus in individuals with spinal cord injury or disorder. *J Spinal Cord Med* 29: 387–395, 2006.
117. **Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim S-J, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R, Cohen P.** The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 21: 443–454, 2015.
118. **Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin MT.** Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol* 100: 2073–2082, 2006.
119. **Leick L, Wojtaszewski JFP, Johansen ST, Küllerich K, Comes G, Hellsten Y, Hidalgo J, Pilegaard H.** PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E463–E474, 2008.
120. **Leon LR, Blaha MD, DuBose DA.** Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery. *J Appl Physiol* 100: 1400–1409, 2006.
121. **Leon LR, DuBose DA, Mason CW.** Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R197–R204, 2005.
122. **Leon LR, Gordon CJ, Helwig BG, Rufolo DM, Blaha MD.** Thermoregulatory, behavioral, and metabolic responses to heatstroke in a conscious mouse model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R241–R248, 2010.
123. **Li X, Qiu J, Wang J, Zhong Y, Zhu J, Chen Y.** Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells. *FEBS Lett* 492: 210–214, 2001.
124. **Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM.** Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797–801, 2002.

125. **Liu CT, Brooks GA.** Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes. *J Appl Physiol* 112: 354–361, 2012.
126. **Ljubicic V, Joseph A-M, Saleem A, Uguccioni G, Collu-Marchese M, Lai RYJ, Nguyen LM-D, Hood DA.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta* 1800: 223–234, 2010.
127. **Llewellyn ME, Thompson KR, Deisseroth K, Delp SL.** Orderly recruitment of motor units under optical control in vivo. *Nat Med* 16: 1161–1165, 2010.
128. **Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD.** Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 268: C1387–C1394, 1995.
129. **Lokireddy S, Wijesoma IW, Teng S, Bonala S, Gluckman PD, McFarlane C, Sharma M, Kambadur R.** The ubiquitin ligase Mub1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab* 16: 613–624, 2012.
130. **Longo D, Archer S.** Mitochondrial dynamics — Mitochondrial fission and fusion in human diseases —. *N Eng J Med* 369: 2236–2251, 2013
131. **Ma X, Xu L, Alberobello AT, Gavrilova O, Bagattin A, Skarulis M, Liu J, Finkel T, Mueller E.** Celastrol protects against obesity and metabolic dysfunction through activation of a HSF1-PGC1 α transcriptional axis. *Cell Metab* 22: 695–708, 2015.
132. **MacDonald EM, Andres-Mateos E, Mejias R, Simmers JL, Mi R, Park J-S, Ying S, Hoke A, Lee S-J, Cohn RD.** Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition. *Dis Model Mech* 7: 471–481, 2014.
133. **Machida M, Takeda K, Yokono H, Ikemune S, Taniguchi Y, Kiyosawa H, Takemasa T.** Reduction of ribosome biogenesis with activation of the mTOR pathway in denervated atrophic muscle. *J Cell Physiol* 227: 1569–1576, 2012.
134. **Mannella CA.** Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763: 542–548, 2006.
135. **Mao K, Klionsky DJ.** AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1. *Circ Res* 108: 787–788, 2011.
136. **Martinez-Redondo V, Pettersson AT, Ruas JL.** The hitchhiker's guide to PGC-1 α isoform structure and biological functions. *Diabetologia* 58: 1969–1977, 2015.
137. **Masiero E, Sandri M.** Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy* 6: 307–309, 2014.

138. **Max SR**. Disuse atrophy of skeletal muscle: loss of functional activity of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 1394–1398, 1972.
139. **Min K, Smuder AJ, Kwon O-S, Kavazis AN, Szeto HH, Powers SK**. Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol* 111: 1459–1466, 2011.
140. **Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC**. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 19: 630–641, 2014.
141. **Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ, Esser KA**. Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol* 589: 1831–1846, 2011.
142. **Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y**. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 107–132, 2011.
143. **Mizushima N, Yoshimori T**. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542–545, 2007.
144. **Mofarrahi M, Guo Y, Haspel JA, Choi AMK, Davis EC, Gousspillou G, Hepple RT, Godin R, BURELLE Y, Hussain SNA**. Autophagic flux and oxidative capacity of skeletal muscles during acute starvation. *Autophagy* 9: 1604–1620, 2013.
145. **Moreland JD, Richardson JA, Goldsmith CH, Clase CM**. Muscle weakness and falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc* 52: 1121–1129, 2004.
146. **Morita M, Gravel S-P, Chénard V, Sikström K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I, Sonenberg N**. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* 18: 698–711, 2013.
147. **Morton J, MacLaren D, Cable N, Campbell I, Evans L, Bongers T, Griffiths R, Kayani A, McArdle A, Drust B**. Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. *Acta Physiol* 190: 319–327, 2007.
148. **Mujika I, Padilla S**. Scientific bases for precompetition tapering strategies. *Med Sci Sports Exerc* 35: 1182–1187, 2003.
149. **Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, Van Remmen H**. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1159–R1168, 2007.

150. **Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, Aoki J.** Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol* 88: 359–363, 2000.
151. **Naito H, Yoshihara T, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Tsuzuki T.** Heat stress-induced changes in skeletal muscle: Heat shock proteins and cell signaling transduction. *J Phys Fit Sports Med* 1: 125–131, 2012.
152. **Nakano J, Yamabayashi C, Scott A, Reid WD.** The effect of heat applied with stretch to increase range of motion: a systematic review. *Phys Ther Sport* 13: 180–188, 2012.
153. **Nass MM, Nass S.** Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 19: 593–611, 1963.
154. **Nowag H, Guhl B, Thriene K, Romao S, Ziegler U.** Macroautophagy proteins assist epstein barr virus production and get incorporated into the virus particles. *EBioMedicine* 1: 116–125, 2014.
155. **O'Leary MF, Vainshtein A, Iqbal S, Ostojic O, Hood DA.** Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C422–C430, 2013.
156. **O'Leary MFN, Vainshtein A, Carter HN, Zhang Y, Hood DA.** Denervation-induced mitochondrial dysfunction and autophagy in skeletal muscle of apoptosis-deficient animals. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C447–C454, 2012.
157. **Oehler-Jänne C, Bueren von AO, Vuong V, Hollenstein A, Grotzer MA, Pruschy M.** Temperature sensitivity of phospho-Ser(473)-PKB/AKT. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 399–404, 2008.
158. **Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A, Pende M.** Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7: 286–294, 2005.
159. **Ohno Y, Yamada S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K.** A possible role of NF-kappaB and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats. *Gen Physiol Biophys* 29: 234–242, 2010.
160. **Oishi Y, Taniguchi K, Matsumoto H, Ishihara A, Ohira Y, Roy RR.** Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *J Appl Physiol* 92: 1097–1103, 2002.
161. **Oishi Y, Taniguchi K, Matsumoto H, Ishihara A, Ohira Y, Roy RR.** Differential responses of HSPs to heat stress in slow and fast regions of rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 28: 587–594, 2003.
162. **Petrie MA, Suneja M, Faidley E, Shields RK.** A minimal dose of electrically induced muscle activity regulates distinct gene signaling pathways in humans with spinal cord injury. *PLoS ONE* 9: e115791, 2014.

163. **Philp A, Schenk S, Pérez-Schindler J, Hamilton DL, Breen L, Laverone E, Jeromson S, Phillips SM, Baar K.** Rapamycin does not prevent increases in myofibrillar or mitochondrial protein synthesis following endurance exercise. *J Physiol* 593: 4275–4284, 2015.
164. **Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD.** Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546: 851–858, 2003.
165. **Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D.** AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 13: 867–871, 2003.
166. **Porter C, Reidy PT, Bhattarai N, Sidossis LS, Rasmussen BB.** Resistance exercise training alters mitochondrial function in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 47: 1922–1931, 2015.
167. **Powers SK, Kavazis AN, McClung JM.** Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* 102: 2389–2397, 2007.
168. **Powers SK, Wiggs MP, Duarte JA, Zergeroglu AM, Demirel HA.** Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E31–E39, 2012.
169. **Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM.** Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Mol Cell* 8: 971–982, 2001.
170. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM.** A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829–839, 1998.
171. **Qin W, Bauman WA, Cardozo C.** Bone and muscle loss after spinal cord injury: organ interactions. *Ann NY Acad Sci* 1211: 66–84, 2010.
172. **Rainbolt TK, Saunders JM, Wiseman RL.** Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends Endocrinol Metab* 25: 528–537, 2014.
173. **Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J.** Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 10190–10195, 2011.
174. **Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC, Camera DM, Lachey J, Gygi S, Seehra J, Hawley JA, Spiegelman BM.** Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 157: 1279–1291, 2014.
175. **Risco A, Cuenda A.** New Insights into the p38 γ and p38 δ MAPK Pathways. *J Signal Transduct* 2012: 520289, 2012.

176. **Risson V, Mazelin L, Roceri M, Sanchez H, Moncollin V, Corneloup C, Richard-Bulteau H, Vignaud A, Baas D, Defour A, Freyssenet D, Tanti J-F, Le-Marchand-Brustel Y, Ferrier B, Conjard-Duplany A, Romanino K, Bauché S, Hantai D, Mueller M, Kozma SC, Thomas G, Rüegg MA, Ferry A, Pende M, Bigard X, Koulmann N, Schaeffer L, Gangloff Y-G.** Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J Cell Biol* 187: 859–874, 2009.
177. **Ritossa F.** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cell Mol Life Sci* 18: 571–573, 1962.
178. **Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C.** Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H868–H872, 2005.
179. **Rose AJ, Kiens B, Richter EA.** Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol*. 574: 889–903, 2006.
180. **Roberts LA, Raastad T, Markworth JF, Figueiredo VC, Egner IM, Shield A, Cameron-Smith D, Coombes JS, Peake JM.** Post-exercise cold water immersion attenuates acute anabolic signalling and long-term adaptations in muscle to strength training. *J Physiol* 593: 4285–4301, 2015.
181. **Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Del Piccolo P, Foretz M, Scorrano L, Rudolf R, Sandri M.** Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*. 29: 1774–1785, 2010.
182. **Romanello V, Sandri M.** Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation. *Curr Hypertens Rep* 12: 433–439, 2010.
183. **Rousset S, Alves-Guerra M-C, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier A-M, Bouillaud F, Ricquier D.** The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1: S130–S135, 2004.
184. **Rowe GC, Patten IS, Zsengeller ZK, El-Khoury R, Okutsu M, Bampoh S, Koulisis N, Farrell C, Hirshman MF, Yan Z, Goodyear LJ, Rustin P, Arany Z.** Disconnecting mitochondrial content from respiratory chain capacity in PGC-1-deficient skeletal muscle. *Cell Rep* 3: 1449–1456, 2013.
185. **Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, Greene NP, Wu J, Estall JL, Irving BA, Lanza IR, Rasbach KA, Okutsu M, Nair KS, Yan Z, Leinwand LA, Spiegelman BM.** A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 151: 1319–1331, 2012.
186. **Rubenstein LZ, Josephson KR.** The epidemiology of falls and syncope. *Clin. Geriatr Med* 18: 141–158, 2002.

187. **Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA.** Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 286: 10605–10617, 2011.
188. **Sanchez AM, Candau RB, Csibi A, Raibon A, Bernardi H.** The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C475–C485, 2012.
189. **Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM.** PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103: 16260–16265, 2006.
190. **Sarangi U, Singh MK, Abhijnya KVV, Reddy LPA, Prasad BS, Pitke VV, Paithankar K, Sreedhar AS.** Hsp60 chaperonin acts as barrier to pharmacologically induced oxidative stress mediated apoptosis in tumor cells with differential stress response. *Drug Target Insights* 7: 35–51, 2013.
191. **Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM.** Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17: 596–603, 2005.
192. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Sci Signal* 307: 1098–1101, 2005.
193. **Schieke SM.** The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 281: 27643–27652, 2006.
194. **Schlesinger M.** Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265: 12111–12114, 1990.
195. **Sekins KM, Lehmann JF, Esselman P, Dundore D, Emery AF, deLateur BJ, Nelp WB.** Local muscle blood flow and temperature responses to 915MHz diathermy as simultaneously measured and numerically predicted. *Arch Phys Med Rehabil* 65: 1–7, 1984.
196. **Selsby JT.** Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R134–R139, 2005.
197. **Semenkovich CF, Li B, Nolte LA, Ju J-S, Ho Han D, Coleman T, Holloszy JO.** Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nat Med* 6: 1115–1120, 2000.
198. **Singh K, Hood DA.** Effect of denervation-induced muscle disuse on mitochondrial protein import. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C138–C145, 2011.
199. **Smith BK, Mukai K, Lally JS, Maher AC, Gurd BJ, Heigenhauser GJF, Spriet LL, Holloway GP.** AMPK is required for exercise-induced PGC-1 translocation to subsarcolemmal mitochondria in skeletal muscle. *J Physiol* 591: 1551–1561, 2013.

200. **Srere PA**. Citrate Synthase. In: *Methods in enzymology* ed. Arun KS: 3-5, Elsevier, Amsterdam, 1967.
201. **Srikanthan P, Karlamangla AS**. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 2898–2903, 2011.
202. **Stump CS, Short KR, Bigelow ML, Schimke JM, Nair KS**. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 7996–8001, 2003.
203. **Suwa M, Nakano H, Kumagai S**. Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol* 95: 960–968, 2003.
204. **Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A**. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol* 110: 382–388, 2011.
205. **Takahashi M, Chesley A, Freyssenet D, Hood DA**. Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system. *Am J Physiol* 274: C1380–C1387, 1998.
206. **Takahashi Y, Matsunaga Y, Tamura Y, Urushibata E, Terada S, Hatta H**. Post-exercise taurine administration enhances glycogen repletion in tibialis anterior muscle. *J Phys Fit Sports Med* 3: 531–537, 2014.
207. **Tamura Y, Kitaoka Y, Matsunaga Y, Hoshino D, Hatta H**. Daily heat stress treatment rescues denervation-activated mitochondrial clearance and atrophy in skeletal muscle. *J Physiol* 593: 2707-2720, 2015.
208. **Tamura Y, Matsunaga Y, Masuda H, Takahashi Y, Takahashi Y, Terada S, Hoshino D, Hatta H**. Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R931–R943, 2014.
209. **Tang H, Inoki K, Lee M, Wright E, Khuong A, Khuong A, Sugiarto S, Garner M, Paik J, Depinho RA, Goldman D, Guan K-L, Shrager JB**. mTORC1 promotes denervation-induced muscle atrophy through a mechanism involving the activation of FoxO and E3 ubiquitin ligases. *Sci Signal* 7: ra18, 2014.
210. **Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I**. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 350-354., 2002.
211. **Terada S, Tabata I**. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E208–E216, 2004.
212. **Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM**. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389–398, 1974.

213. **Touchberry CD, Gupte AA, Bomhoff GL, Graham ZA, Geiger PC, Gallagher PM.** Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *Cell Stress Chaperones* 17: 693-705, 2012
214. **Trost SG, Owen N, Bauman AE, Sallis JF, Brown W.** Correlates of adults' participation in physical activity: review and update. *Med Sci Sports Exerc* 34: 1996–2001, 2002.
215. **Tryon L, Vainshtein A, Memme J, Crilly M, DA Hood.** Recent advances in mitochondrial turnover during chronic muscle disuse. *Integr Med Res* 3: 161-171, 2014.
216. **Uehara K, Goto K, Kobayashi T, Kojima A, Akema T, Sugiura T, Yamada S, Ohira Y, Yoshioka T, Aoki H.** Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn J Physiol* 54: 263–271, 2004.
217. **Vainshtein A, Desjardins EM, Armani A, Sandri M, Hood DA.** PGC-1 α modulates denervation-induced mitophagy in skeletal muscle. *Skelet Muscle* 5: 9, 2015.
218. **Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RLA, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrané J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S.** PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 378–383, 2010.
219. **Wang P, Zhang J, Zhang L, Zhu Z, Fan J, Chen L, Zhuang L, Luo J, Chen H, Liu L, Chen Z, Meng Z.** MicroRNA 23b regulates autophagy associated with radioresistance of pancreatic cancer cells. *Gastroenterol* 145: 1133–1143.e12, 2013.
220. **Wang T, Yu Q, Chen J, Deng B, Qian L, Le Y.** PP2A mediated AMPK inhibition promotes HSP70 expression in heat shock response. *PLoS ONE*, e13096, 2010.
221. **Wei Y, Clark SE, Thyfault JP, Uptergrove GME, Li W, Whaley-Connell AT, Ferrario CM, Sowers JR, Ibdah JA.** Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction contributes to angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease in transgenic Ren2 rats. *Am J Pathol* 174: 1329–1337, 2009.
222. **Wenz T.** Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 α under cellular stress. *Mitochondrion* 13: 134–142, 2013.
223. **Westermann B.** Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872–884, 2010.
224. **Wibom R, Hultman E, Johansson M, Matherei K, Constantin-Teodosiu D, Schantz PG.** Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73: 2004–2010, 1992.
225. **Wicks KL, Hood DA.** Mitochondrial adaptations in denervated muscle: relationship to muscle performance. *Am J Physiol* 260: C841–C850, 1991.

226. **Wiggs MP**. Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? *Front Physiol* 10:3389, 2015.
227. **Wojtaszewski JFP, Jorgensen SB, Hellsten Y, Hardie DG, Richter EA**. Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICAR)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* 51: 284–292, 2002.
228. **Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, Sabatini DM**. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* (October 8, 2015). doi: 10.1126/science.aab2674.
229. **Wright DC, Geiger PC, Han D-H, Jones TE, Holloszy JO**. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 282: 18793–18799, 2007.
230. **Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS**. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296: 349–352, 2002.
231. **Wu Y, Collier L, Qin W, Creasey G, Bauman WA, Jarvis J, Cardozo C**. Electrical stimulation modulates Wnt signaling and regulates genes for the motor endplate and calcium binding in muscle of rats with spinal cord transection. *BMC Neurosci* 14: 81, 2013.
232. **Wyper DJ, McNiven DR**. The effect of microwave therapy upon muscle blood flow in man. *Br J Sports Med* 10: 19–21, 1976.
233. **Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ**. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449: 496–500, 2007.
234. **Yi M, Weaver D, Eisner V, Várnai P, Hunyady L, Ma J, Csordás G, Hajnóczky G**. Switch from ER-mitochondrial to SR-mitochondrial calcium coupling during muscle differentiation. *Cell Calcium* 52: 355–365, 2012.
235. **Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N**. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 286: 19630–19640, 2011.
236. **Yoshihara T, Naito H, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Ogura Y, Sugiura T, Katamoto S**. Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. *Acta Physiol* 207: 416–426, 2013.
237. **Zhang Y, Ugucconi G, Ljubcic V, Irrcher I, Iqbal S, Singh K, Ding S, Hood DA**. Multiple signaling pathways regulate contractile activity-mediated PGC-1 α gene expression and activity in skeletal muscle cells. *Physiol Rep* e12008, 2014.
238. **Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J**. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* 19: 21–30, 1999.

-
239. Zurovski Y, Eckstein L, Horowitz M. Heat stress and thermal dehydration: lactacidemia and plasma volume regulation. *J Appl Physiol* 71: 2434–2439, 1991.
240. 大平 宇, 寺田 昌, 須藤 正, 草刈 洋, 福田 紀, 南沢 亨. 温熱刺激が骨格筋量に及ぼす影響. In: 日本生理学会東京談話会. 2015年9月26日, 東京, 日本.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京大学大学院身体運動科学研究室の八田秀雄教授には、終始暖かいご指導やご助言を頂きました。心より御礼を申し上げます。八田研究室の星野太佑助教、北岡祐助教には、実験手法や実験データの解釈など様々なご指導ご助言を頂きました。東京大学大学院身体運動科学研究室の寺田新准教授には、実験プロトコールの設定やデータの解釈にあたり有意義なご助言を頂きました。

下記の方には研究手法のご指導ご助言だけではなく、研究室内の良い雰囲気をつくっていただき、公私にわたって幅広くサポートして頂きました。八田研究室の関係者、特に柿木克之博士、加藤麻衣さん、増田紘之さん、高橋祐美子博士、塙達也さん、遠藤友香里さん、高橋勇貴さん、皆川秀洋さん、高嶋聡さん、夏目悠矢さん、竹井尚也さん。寺田研究室の関係者、松岡智子さん、野中雄大さん、稲井真さん、西村脩平さん、浦島章吾さん。心より御礼を申し上げます。

東京大学大学院身体運動科学研究室の同期生、特に同じ八田研究室の松永裕さんには、本研究を遂行するにあたり、有意義な議論の機会を与えてくれただけではなく、精神的な大きな支えとなりました。このように本研究は、多くの人々の支えがあり、遂行することができました。心より感謝致します。

最後に、大学院進学を理解し暖かく応援してくれた両親、大串家の皆様、妻のひとみに深く感謝致します。

平成 28 年 2 月

田村 優樹