

論文の内容の要旨

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

田村 優樹

背景

1. 社会・臨床的課題

ミトコンドリアは、エネルギー産生や細胞内の恒常性維持に貢献する細胞小器官である。特にヒト生体最大の器官である「骨格筋」のミトコンドリアの量は、持久的運動能力や骨格筋の健全度を決定する要因となる。骨格筋ミトコンドリアは、持久的トレーニングによって増加することが明らかにされていることから、アスリートのみならず一般人でも積極的な運動習慣をもつことが励行されている。しかし、アスリートであれば、コンディショニングの観点から常に十分な強度・量のトレーニングを実施できるわけではない。また、多忙な現代人や神経損傷患者は、十分なトレーニングを実施することができないといった社会的・臨床的課題がある。そこで、①トレーニングによるミトコンドリア適応を増強する方法や、②トレーニングに代わってミトコンドリア量・機能を維持する方法の探索・開発が望まれている。

2. 骨格筋ミトコンドリアの量をも高める新規方法の候補

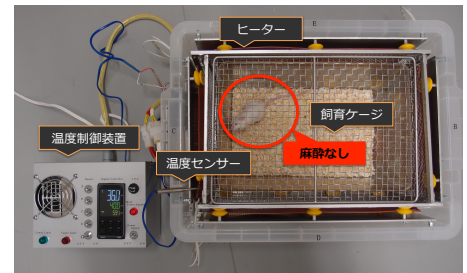
上述の課題を解決する方法として、本研究では、温熱刺激の可能性に着目した。温熱刺激に着目した根拠は、「マウス骨格筋由来の培養細胞（C2C12）に温熱刺激を与えると、ミトコンドリア生合成に貢献する細胞内情報伝達経路のひとつである AMPK が活性化し、ミトコンドリアが増加する」と報告されており、生体の骨格筋においても同等な適応が得られる可能性が示唆されることである。

3. 本論文の目的

本博士論文では、より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に向けて、「生体の骨格筋ミトコンドリア量や機能を維持・向上させる新規方法として、温熱刺激が有効であるか否かを明らかにすること」が目的である。上述の目的を達成するために、3つの研究課題を設定した。

研究①：体温調節機能を阻害しない温熱刺激方法の開発

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破綻（視床下部の温度感受性ニューロンの発火頻度の低下）させることが指摘されている。本研究では臨床への橋渡し研究としての側面を重要視し、麻酔処置を必要としない温熱刺激方法の考案・開発に取り組んだ。本研究では、マウスを暑熱環境へ暴露することを温熱刺激方法として採用した。

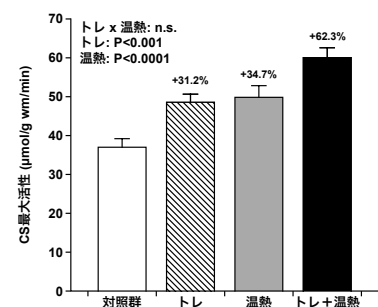


研究①ではまず、右図に示す温熱刺激装置を考案・開発した。続いて、予備実験の結果を基に温熱刺激プロトコール（暑熱環境への曝露: 40°C, 30 min /day）を設定し、その妥当性を検証した。その結果、①本研究の温熱刺激プロトコールは、十分に生理学的応答（直腸温の上昇）・生化学的適応（骨格筋のHSP72の発現量増加）を誘導すること、②熱中症の病態（42.0°Cを越える直腸温，血中乳酸濃度の上昇）を示さないこと、③暑熱環境への曝露は、マウスの自発活動量に影響を与えないことを示した。これらの結果は、本研究で採用した温熱刺激方法の妥当性を保証するものである。

研究②：温熱刺激を活用したトレーニングの開発を目指して

1. 温熱刺激が、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に与える影響

本検討課題では効果的なトレーニング方法の開発を目指して、「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させるか否か」を検証した。6週齢のICRマウスに、持続的トレーニング（トレッドミル走行: 25 m/min, 30 min/day, 3 wks）を行わせ、骨格筋（足底筋・ヒラメ筋）を摘出した。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タンパク質(OXPHOS)の発現レベルの増加、骨格筋の最大酸化能力の指標



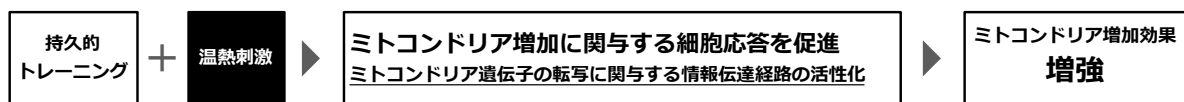
のひとつであるミトコンドリア酵素活性（CS 最大活性：右図）の増加が認められた（持続的トレーニングの正の主効果）。一方で、温熱刺激（暑熱環境への曝露: 40°C, 30 min/day, 3 wks）によっても持続的トレーニングと同等な適応が得られた（温熱刺激の正の主効果）。また、運動後に温熱刺激を与えても、両介入の効果は相殺されなかった（持続的トレーニングと温熱刺激の交互作用がない）。これらの結果は、「温熱刺激は、持続的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの適応を相加的に増強した」と解

積される。

2. 温熱刺激が、骨格筋ミトコンドリアの適応を増強したメカニズム

本検討課題では、温熱刺激によるミトコンドリア増加効果に関わる分子メカニズムの解明に挑んだ。ミトコンドリア生合成を誘導する重要な細胞応答に、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（AMPK や p38 MAPK、mTORC1）の活性化がある。培養細胞やラットの摘出筋を対象とした先行研究では、温熱刺激が AMPK を活性化することが示されており、同等な生理応答が得られるものと考えられた。しかし仮説に反して、温熱刺激は生体の骨格筋において AMPK の活性をむしろ低下させることが示された。一方で、温熱刺激は、p38 MAPK および mTORC1 を活性化することが明らかとなった。

3. 研究②のまとめ



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および最大酸化能力の向上は、運動後の温熱刺激によって相加的に増強させる。その分子機序として、温熱刺激による p38 MAPK および mTORC1 の活性化が関与した可能性が示唆された。

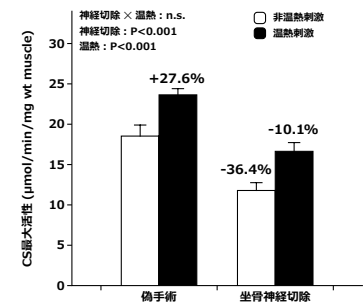
研究③：温熱刺激を活用したリハビリテーションの開発を目指して

外傷性の神経損傷や糖尿病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、骨格筋の脱神経支配を誘導し、骨格筋の著しい萎縮と機能不全を引き起こす。なお、脱神経支配による骨格筋萎縮に対する治療法は未だ確立されていない。脱神経支配による骨格筋萎縮・機能不全は、ミトコンドリア量の減少および機能不全が主たる原因となることが近年示されている。つまり、ミトコンドリア量・機能を保持することが骨格筋萎縮の有力な治療標的となると考えられる。本研究ではこれまでに、「温熱刺激がミトコンドリアを増加させること」を明らかにしている（研究②）。この知見は、「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に対する治療法として、温熱刺激が有効である可能性」を示唆する。

1. 温熱刺激が、坐骨神経切除に伴うミトコンドリア減少・骨格筋萎縮に与える影響

本検討課題では効果的なリハビリテーション方法の開発を目指して、仮説「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」を検証した。8 週齢の ICR マウスを対象に、左後肢の坐骨神経を外科的に切除することで下腿骨格筋の脱神経支配を誘導した。なお、右後肢は偽手術を施した。10 日間の坐骨神経切除により、骨格筋ミトコンドリア量の指標（OXPHOS 発現量）や最大酸化能力の指標（CS 最大活性：右図）、骨格筋重量が著しく低下

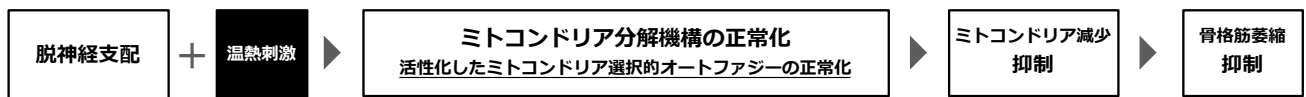
した（坐骨神経切除の負の主効果）。一方で、10日間の坐骨神経切除期間中に温熱刺激（暑熱環境への曝露: 40°C, 30 min/day, 7 days/10 days）を与えると、脱神経支配によるミトコンドリア量・最大酸化能力の指標や骨格筋重量の低下が抑制された（温熱刺激の正の主効果）。



2. 坐骨神経切除に伴うミトコンドリア減少を温熱刺激が抑制したメカニズム

本検討課題では続いて、温熱刺激が、坐骨神経切除による骨格筋ミトコンドリアの減少を抑制したメカニズムの解明に挑んだ。本研究では当初、これまでの成果を受けて「によるミトコンドリア生合成の低下を温熱刺激が抑制する」と仮説を設定していたが、仮説を支持する結果は得られなかった。ところで、坐骨神経の切除によって機能不全に陥った骨格筋のミトコンドリアは、オートファジーの機構を利用して分解される（ミトコンドリア選択的オートファジー）ことも近年明らかにされている。そこで、「温熱刺激は、坐骨神経の切除によるミトコンドリア選択的オートファジーの活性化を抑制するか否か」を検証した。その結果、坐骨神経切除の切除によるミトコンドリア選択的オートファジーの活性化（Mitochondrial LC3-II）は、温熱刺激によって抑制されることが明らかとなった。さらに、ミトコンドリア選択的オートファジーを制御する上流因子の発現レベルを検討した。その結果、①分解すべきミトコンドリアを標識する課程を制御するタンパク質（Parkin, Ub-conjugated, p62/SQSTM1）および、②標識されたミトコンドリアを実際に分解する機構に関わるタンパク質（ATG5, ATG16L）の発現が温熱刺激によって抑制されることも明らかとなった。

3. 研究③のまとめ



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は、温熱刺激によって抑制された。その分子機序として、温熱刺激によるミトコンドリア選択的オートファジーの正常化が関与した可能性が示唆された。

まとめ

①単独の温熱刺激、②運動後の温熱刺激、③脱神経支配に陥った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や最大酸化能力を正に制御することが示された。ただし、そのメカニズムは、生体内環境に高く依存する可能性が示唆された。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ます。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た。