

博士論文

収縮誘発性損傷後における運動に対する骨格筋の応答

Responses of skeletal muscle to exercise after contraction-induced injury

平成 28 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

31-147710

高木 領

目次

開示事項（倫理審査・利益相反）	4
第1章 背景	
1.1. 緒言	5
1.2. 先行研究	
1.2.1. 運動と筋損傷	7
1.2.2. 筋損傷の予防と筋損傷後の介入	13
1.2.3. 繰り返し効果	14
1.2.4. レジスタンス運動に対する同化応答	16
第2章 研究目的及び研究課題	18
第3章 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答	
3.1. 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減（実験1）	21
3.1.1. 背景と目的	21
3.1.2. 方法	24
3.1.3. 結果	27
3.1.4. 考察	32
3.2. 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答に関連する因子（実験2）	34
3.2.1. 背景と目的	34
3.2.2. 方法	36
3.2.3. 結果	38
3.2.4. 考察	44
3.3. 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズム（実験3）	46

3.3.1. 背景と目的	46
3.3.2. 方法	50
3.3.3. 結果	53
3.3.4. 考察	62
3.4. 第3章のまとめ	66
第4章 一度損傷した骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答 (実験4)	68
4.1. 背景と目的	68
4.2. 方法	70
4.3. 結果	73
4.4. 考察	80
4.5. 第4章のまとめ	83
第5章 総合論議	84
第6章 総括	90
謝辞	92
引用文献	93
関連論文	105

開示事項

倫理審査

本研究のすべての実験は、動物を対象にしたものであり、共同研究者の所属する日本体育大学の実験動物委員会の承認（承認番号 014-A03）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。

第1章 背景

1.1. 緒言

骨格筋は収縮能を有し、力発揮により様々な動作を可能にする。しかし、過度な収縮や力発揮は時に筋自身の損傷を引き起こす場合がある。例えば、慣れない運動やスポーツ場面における激しい運動時には、肉離れを代表とする筋損傷が生じうる危険性がある。また、加齢に伴い再生能が低下した骨格筋では、下り坂や階段降段など日常生活動作レベルの運動においても筋損傷が生じることがある (Brooks ら 1996)。他にも、筋ジストロフィーに代表される筋疾患では、加齢に伴う筋の弱化と同じく筋損傷が生じやすく (Head ら 1992, Petrof ら 1993)、疾患の予後を悪化させることが危惧されている。筋損傷はスポーツにおけるパフォーマンスを低下させるのみならず生活動作をも制限することで、高齢者や筋疾患患者では特に生活の質 (Quality of Life) を低下させる危険性がある。また、筋損傷による運動量の低下は全身の筋力や持久力を低下させる危険性がある。このように骨格筋の損傷はスポーツや介護、医療現場など非常に身近かつ幅広い分野において重要な問題として捉えられる。

筋損傷に関する研究はこれまで数多くなされているが、筋損傷を予防するプレコンディショニングや損傷からの回復を促す介入手段は十分に確立されていない。筋損傷後の代表的な応急処置である RICE 処置：安静 (Rest)、冷却 (Icing)、圧迫 (Compression)、挙上 (Elevation) も、急性炎症への効果は報告されているものの、筋損傷後の再生過程には及ぼす影響は十分に分かっていない。近年では、筋損傷後の患部冷却が再生過程を妨げ、線維化という機能障害を残す危険性も報告されている (Takagi ら 2011)。このように、筋損傷の予防としてのプレコンディショニングや損傷後の回復を促すような適切な療法を確立するためには、基礎的な筋損傷のメカニズムや損傷した骨格筋の特性を理解することが優先されるべき重要な課題であると考えられる。

骨格筋の運動による損傷メカニズムや損傷した骨格筋の特性に関わる生理学的応答として、「繰り返し効果」がある (Byrnes ら 1985, Clarkson ら 1992, Nosaka ら 2001)。これは、運動による損傷は1回目と比較して引き続く数日から数か月以内の2回目において軽減するという一度損傷した筋の適応である。繰り返し効果には神経・筋細胞・結合組織のそれぞれにおける適応が関連しているものと考え

られているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない (McHugh ら 1999)。引き続き損傷への応答低減に貢献する一度損傷した筋の運動に対する応答特性が明らかになれば、筋損傷を予防するプレコンディショニングに応用することができる可能性がある。

また上記の損傷に対する骨格筋の適応から、一度損傷した筋は激しい運動による損傷を軽減させるのみならず、筋肥大・筋力向上などを目的としたレジスタンス運動に対する同化応答にも影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、一度損傷した筋のレジスタンス運動に対する応答は明らかになっておらず、現場においても根拠に基づく運動介入はなされていない。一度損傷した筋の運動に対する応答特性が明らかになればこれまでの運動処方が改善され、より適切な運動介入が可能になることが期待される。

本研究では、運動による筋損傷動物モデルを確立し、一度損傷した骨格筋の引き続き損傷に対する応答低減メカニズムを明らかにすることで、一度損傷した筋の様々な運動に対する応答特性における重要な知見を得ることを目的とした。骨格筋の損傷に対する生理的な適応メカニズムを明らかにすることは、骨格筋の基礎的な理解を深め、筋損傷後の適切な運動療法を確立する上で重要な知見となるであろう。

1.2. 先行研究

1.2.1. 運動と筋損傷

運動は骨格筋の様々な収縮様式が複雑に組み合わせられて成り立つ。収縮様式は、筋長もしくは関節角度が一定の等尺性収縮、一定の張力発揮のもとに筋長もしくは関節角度が変化する等張性収縮などに分けられる。さらに、等張性収縮や、一定の速度で筋長が変化する等速性収縮は筋長が短縮もしくは関節角度が縮まる短縮性収縮と筋長が伸張もしくは関節角度が広がる伸張性収縮に分けられる。この中で、特に伸張性収縮を伴う運動、例えば下り坂走行時や降段時の大腿四頭筋の活動などは筋損傷を惹起しやすいことが知られている。以後、本文内で述べる筋損傷は断りのない場合、基本的には伸張性収縮による損傷を示すこととする。

筋損傷は、遅発性筋痛や関節可動域の制限、腫脹などを引き起こすと同時に、筋線維や結合組織の損傷を招く (Clarkson ら 1992, Safran ら 1989, Warren ら 1999)。比較的軽度な筋線維の損傷では、図 1-1 に示すように損傷部位は筋線維全体に生じるわけではなく部分的であり、Z 帯を中心に微細構造の乱れが生じる (Lieber ら 1999)。一方、激しい伸張性運動は、図 1-2 に示すように筋線維の構造の乱れのみでなく、細胞の壊死を引き起こす場合がある (Kano ら 2008, Song ら 2004)。

筋損傷においてカルシウムイオンは重要な因子と考えられる (図 1-3)。Duncan (1978) による初期の研究では、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によりミトコンドリアの腫脹、筋タンパク質の喪失、筋線維の変性が引き起こされることが示された。また、Yeung ら (2005) によると、等尺性収縮では収縮後安静時の細胞内カルシウムイオン上昇を認めなかったが、伸張性収縮では収縮後 20 分から 30 分において安静時カルシウムイオン濃度の上昇を認めている。伸張活性化チャンネルを阻害するストレプトマイシンやガドリニウムイオン、GsMTx4 によって収縮後の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は妨げられるため (Hamill ら 1996, Suchyna ら 2000)、収縮に伴う細胞内カルシウムイオン濃度上昇において、細胞外から細胞内へのカルシウムイオン流入が重要な因子であると考えられる。

伸張性収縮による筋損傷後には筋力低下を認める。筋損傷後早期における筋力低下の原因として、興奮収縮連関の障害が大きな影響を及ぼしているものと考えられている (Warren ら 1993)。これは、

伸張性収縮後の張力低下が、筋小胞体からのカルシウム放出を直接引き起こすカフェイン投与した場合には認められなかったことから結論付けられた。さらに、単離筋線維において伸張性収縮後の強縮時細胞内カルシウムイオン濃度が低下していることが明らかとなった (Balnave ら 1995)。興奮収縮連関に影響を与える因子としてカルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパインの活性化が挙げられる (Ono ら 2004)。また Verburg ら (2005) は、特に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が比較的緩やかである場合、興奮収縮連関の障害において、カルパイン-3 が重要な役割を果たすことを報告している。他にも、収縮後の活性酸素の増加による筋線維のカルシウムイオン感受性の低下が筋力低下を引き起こす一因であることが報告されている (Moonpanar ら 2005)。

一方、図 1-4 に示すように、損傷後後期における筋力低下の原因としては、損傷による収縮タンパク質などの分解が大きな比重を占めている (Warren ら 2002)。伸張性収縮によるタンパク分解においても、カルパイン活性は深く関わる (Belcastro ら 1998)。カルパインインヒビターである leupeptin が筋損傷を抑制することもこれを支持する報告である (Badalamente ら 2000)。またカルパイン-1,2 を抑制するカルパスタチンを過剰発現させた mdx マウスにおいても、細胞膜の損傷には影響がないものの、筋損傷を示す組織学的所見が軽減されることが確認されている (Spencer ら 2002)。

細胞の壊死には、細胞膜の透過性亢進が大きく関わる。筋ジストロフィーにおいては、ジストロフィン欠損による膜の脆弱さにより膜の透過性亢進は顕著である (Petrof ら 1993)。カルシウムイオン濃度の上昇による膜の透過性亢進において、ミトコンドリアによる活性酸素産生の増加 (Brookes ら 2004) がリン脂質の過酸化反応を引き起こすことが一因として挙げられる (Mason ら 1997, Child ら 1998)。さらにカルシウム依存性のホスホリパーゼ A2 を抑制することで細胞内カルシウムイオン濃度上昇による膜の透過性亢進は軽減するため (Duncan ら 1987, Howl ら 1990)、リン脂質分解酵素の活性も影響していることが考えられる。このように膜の透過性亢進は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって引き起こされる二次的な損傷として捉えられている (Duncan ら 1987, Howl ら 1990, Gissel ら 2003)。膜の透過性亢進は更なる細胞外からのイオン流入を誘発し、悪循環を引き起こし、最終的に細胞の壊死をもたらすと考えられている (Allen ら 2005)。

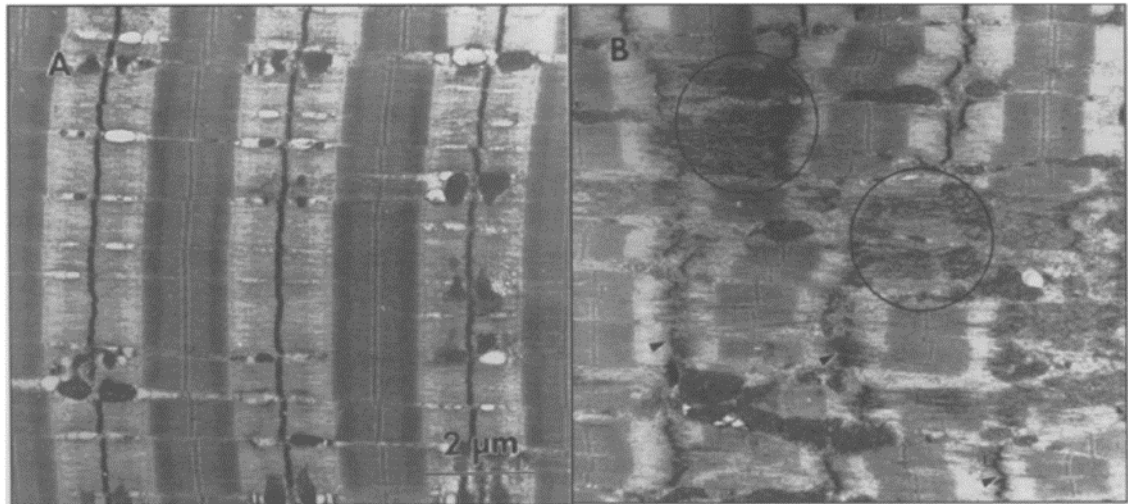


図 1-1. ウサギ前脛骨筋の縦断電子顕微鏡写真

A : 等尺性収縮後の写真、B : 伸張性収縮後の写真

A は正常な縞模様を示し、Z 線も筋原線維の長軸（写真の左右）方向に対し垂直（写真の上下）方向に位置する。B は部分的に構造の破綻を示し（○で囲まれた部位）、Z 線が波打っている様子や A 帯への浸潤が認められる。

引用元 : Lieber ら, *J Sci Med Sport* 1999

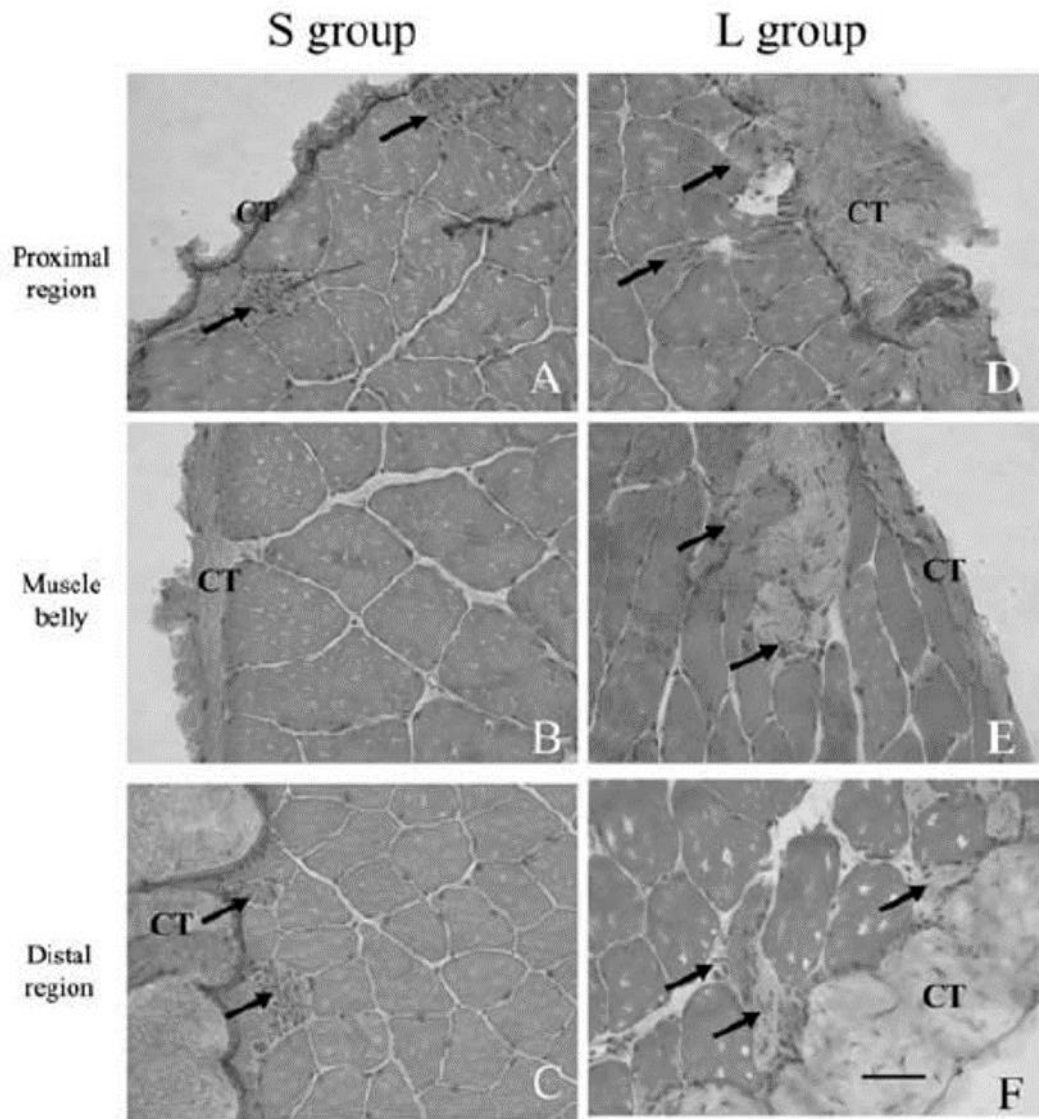


図 1-2. ラット腓腹筋の伸張性運動 3 日後における組織学的観察（ヘマトキシリン-エオシン染色）

A, D : 近位部、B, E : 筋腹部、C, F : 遠位部、S group : 筋長の変化範囲の狭い伸張性運動、L group : 筋長の変化範囲の広い伸張性運動

矢印は異常な染色性の薄い異常な筋線維や多数の核の集積を認める筋線維を示す。

CT : connective tissue (結合組織)、Bar = 100 μ m.

引用元 : Song ら, *Am J Sports Med* 2004

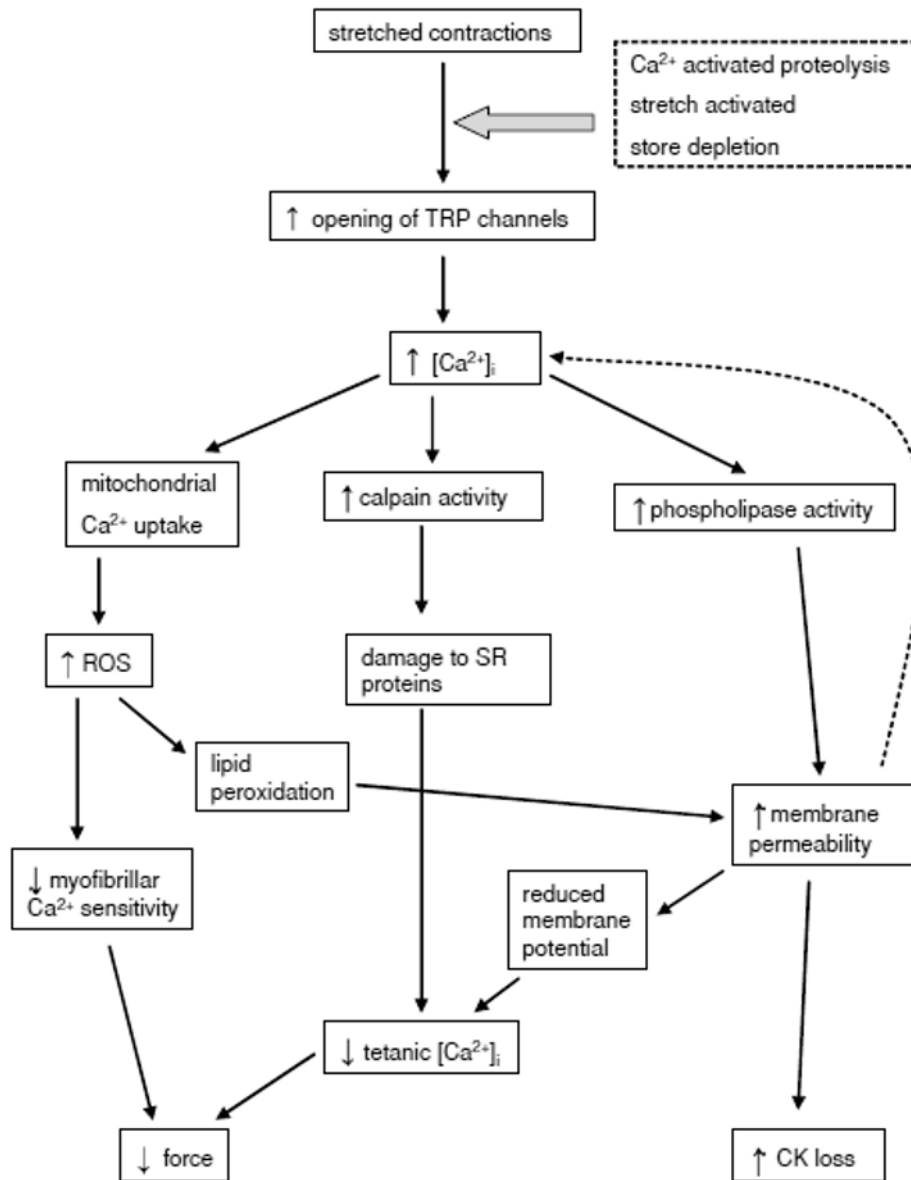


図 1-3. 伸張性運動による筋損傷に関わる経路

伸張性収縮に伴い、カルシウムイオンによるタンパク質分解の活性化や伸張刺激による TRP チャンネルの開口などが起こり、細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの流入が生じる。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は様々な経路を介して損傷を招くと考えられており、これによる膜の透過性亢進が二次的に細胞外からのさらなるカルシウムイオン流入を引き起こし、悪循環に陥ると考えられている。

Ca²⁺ : カルシウムイオン、TRP channel : 一過性受容器電位チャンネル、ROS : 活性酸素、SR : 筋小胞体、CK : クレアチンキナーゼ

引用元 : Allen ら, *J Physiol* 2005

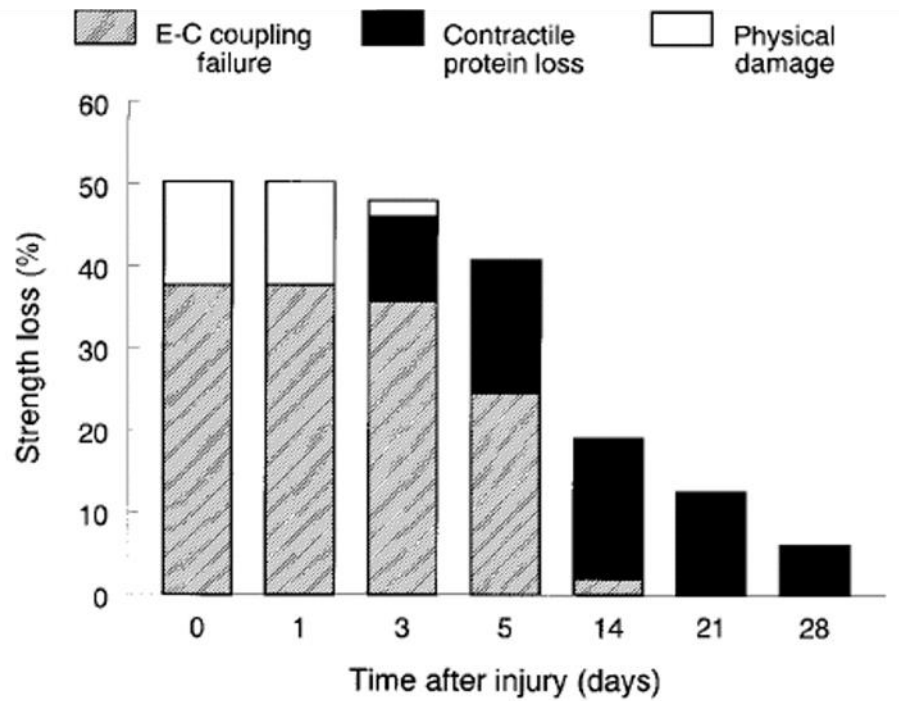


図 1-4. 伸張性運動後の筋力低下における要因の程度

筋損傷初期における筋力低下の原因は主に興奮収縮連関の障害や微細構造の破綻であると考えられており、収縮タンパク質の喪失による筋力低下は相対的に損傷後期において主要な因子と考えられている。

E-C coupling：興奮収縮連関

引用元：Warren ら, *J Orthop Sports Phys Ther* 2002

1.2.2. 筋損傷の予防と筋損傷後の介入

運動前に一般的に行われるプレコンディショニングとして、ウォーミングアップやストレッチが挙げられる。Fradkin ら (2006) の総説においては、これまでのウォーミングアップと損傷リスクに関する先行研究からは、ウォーミングアップが損傷に及ぼす影響を明確に答えることは困難であると報告されている。また運動前のストレッチについても、ストレッチが筋痛・損傷リスクに及ぼす影響はない可能性があるとして報告されている (Herbert ら 2002)。

筋損傷後の処置に関しては、代表的な RICE 処置 (Rest : 安静、Icing : 冷却、Compression : 圧迫、Elevation : 挙上) は主に炎症を軽減させるために推奨されている (ACPSM 1998)。しかし、Takagi ら (2011) の報告では、挫滅損傷後のアイシングは筋再生を遅延させ、線維化を増悪させる。また、損傷後の回復を促進する目的で行われる電気療法もそのエビデンスはほとんどないことが報告されている (Van der Windt 1999)。一方で、Malliaropoulos ら (2004) は、ハムストリングスの損傷に対してストレッチを 1 日 1 回と 4 回行う群に分けたところ、4 回行う方が損傷後の復帰に要す時間が短縮したと報告している。しかし、損傷からの回復を示す指標が、関節可動域の改善とリハビリテーションに要した時間のみであり、基礎メカニズムは十分に明らかにされていない。

過去の損傷により発揮張力の低下した筋群に対して、伸張性収縮を取り入れた運動療法は、損傷の再発を軽減させる (Croisier 2002)。また、筋損傷後の早期運動介入は再生筋線維の横断面積の回復を促進し、線維化を抑制することが報告されている (Murakami ら 2015)。しかし、運動介入の効果が損傷により変化を受けるのか否かに関しては明らかになっていない。

1.2.3. 繰り返し効果

繰り返し効果とは、伸張性収縮による筋損傷は 1 回目と比較して引き続く数日から数か月以内の 2 回目において軽減する (Schwane ら 1983, Highman ら 1963) という適応である。この場合の筋損傷とは筋力低下や遅発性筋痛、血中クレアチンキナーゼ活性などの間接的な指標によって観察されるものである (図 1-5)。繰り返し効果に貢献する因子として、これまで運動単位の動員パターンなどの神経因子の変化 (Golden ら 1992) や運動単位動員の協調性変化 (Hortobagyi ら 1998, Pierrynowski ら 1987) が影響しているのではないかと考えられてきたが、神経制御を介さない電気刺激による収縮においても繰り返し効果は認められ、他の因子の関与も示唆されている (Sacco ら 1992, McBride ら 2003)。

Armstrong ら (1990) は、1 回目の損傷で不可逆性の損傷を受けた筋線維が新たに抵抗性のある筋線維に再生する可能性を示唆した。この抵抗性に関して、既存の筋線維へのサルコメアの追加 (Morgan ら 1999) や中間フィラメントの再構築 (Friden ら 1984) などが考えられている。

近年では、細胞外マトリクスの変化も繰り返し効果に関与する可能性が示唆されている。細胞外マトリクスは機械的情報交換の役割を持ち、さらに力の伝達に関与する。Mackey ら (2011) は、筋損傷後に細胞外マトリクスの再構築が起こり、2 回目の筋損傷から筋線維を保護する可能性を報告している。また、関節の固定による筋内における結合組織の増加と損傷ストレスに対する筋損傷の軽減が深く関連している可能性も示唆されている (Lapier ら 1995)。

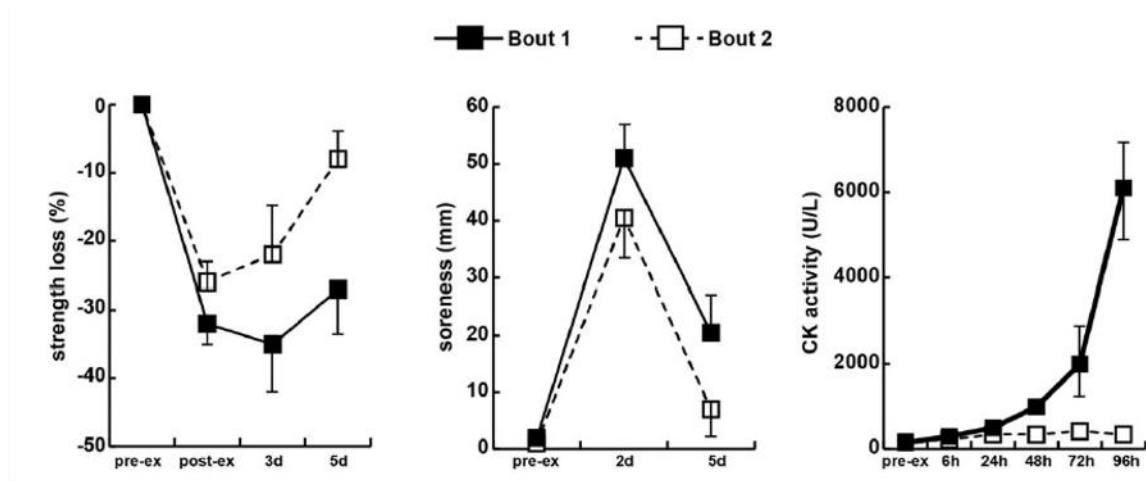


図 1-5. 伸張性運動 1 回目 (■)、2 回目 (□) における筋力低下 (左)、疼痛 (中)、血中クレアチンキナーゼ活性 (右)

1 回目の伸張性運動後と比較して、2 回目の運動後の筋力低下や疼痛の程度、血中クレアチンキナーゼ活性などの損傷指標は全て低減される。

Pre-ex : 運動前、Post-ex : 運動直後、CK activity : クレアチンキナーゼ活性

引用元 : Hyldahl ら, *Muscle Nerve* 2014

1.2.4. レジスタンス運動に対する同化応答

骨格筋量はタンパク質合成速度と分解速度のバランスにより調節されている (Biolo ら 1995, Biolo ら 1997, Phillips 2004)。タンパクの合成速度は分解速度よりも動態が大きい傾向にあることから、骨格筋の肥大は主に筋タンパク質合成の制御によると考えられている (Greenhaff ら 2008)。筋タンパク質合成と筋量の増加は、栄養摂取やサイトカイン、ホルモン、成長因子によっても影響を受けるが、レジスタンス運動が筋肥大を引き起こすメカニズムにおける主要因子として考えられている。筋肥大は筋横断面積の増加を反映し、各筋線維の容積増加に依る (Luthi ら 1986, Paul ら 2002, Toigo ら 2006)。筋線維数の増加も骨格筋の肥大に貢献するが、これは主にげっ歯類において報告されている (Kelly ら 1996)。

筋量を制御する機構の一つに、張力による機械的刺激が挙げられる (Goldberg ら 1975)。図 1-6 に示すように、レジスタンス運動中の筋収縮は、mechanotransduction (機械的情報伝達) として知られているタンパク質合成を制御する様々な生化学的応答をもたらすと考えられている (Hornberger 2011)。筋内のシグナル分子のリン酸化はレジスタンス運動への適応において重要である (Hornberger 2011)。レジスタンス運動は主に mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナル伝達を活性化し、タンパク質合成を増加する (Chesley ら 1992, Dreyer ら 2006, Phillips ら 1997)。

“1.2.2. 筋損傷の予防と筋損傷後の介入”でも述べたが、筋損傷後の機能回復を目的として、運動療法が用いられる (Murakami ら 2015)。しかし、“1.2.3. 繰り返しの効果”で述べたように、損傷を引き起こす過度な運動に対して様々な骨格筋の適応が生じると考えられているため (McHugh ら 1999)、一度損傷した筋ではレジスタンス運動に対する同化応答も何らかの影響を受けることが考えられる。

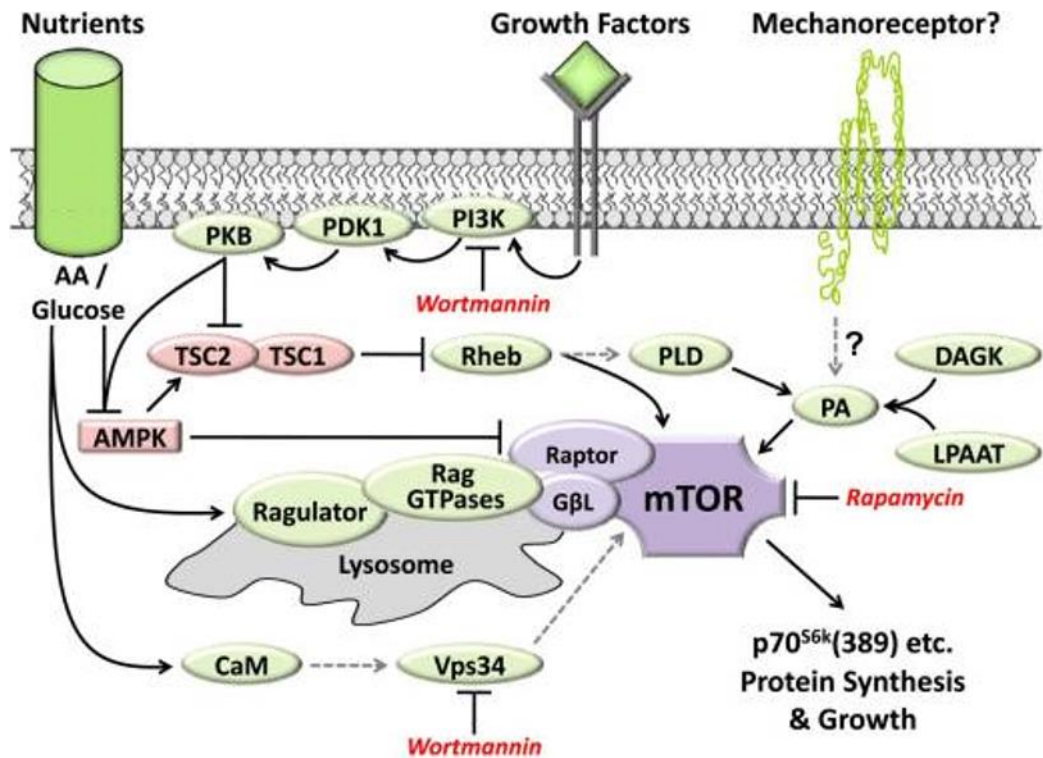


図 1-6. mTORC1 シグナルを制御する代表的なメカニズム

mTORC1 シグナルは、成長因子や栄養、機械的刺激などの様々な刺激により活性化され、タンパク質合成において重要な因子である p70S6K をリン酸化させると考えられている。

紫：mTORC1 複合体、緑：mTORC1 シグナルを刺激するシグナル分子、赤：mTORC1 シグナルを抑制する分子

破線は、明らかになっていない制御経路を示す。

引用元：Hornberger, *Int J Biochem Cell Biol* 2011

第2章 研究目的及び研究課題

骨格筋の損傷後における回復を促進する適切な運動療法を確立する上で重要となる、損傷した筋の特性、特に運動に対する応答を明らかにすることを目的とする。本研究では損傷に対する生理学的な適応に着目し、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズムを明らかにすることで運動に対する応答特性に関する知見を得ることを課題とした。以下に示す研究課題 1-3 は主に一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズムの解明を、研究課題 4 は一度損傷した骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答を明らかにすることを目的として設定している（図 2-1）。

研究課題 1 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減

これまで繰り返し効果に関する先行研究はヒトを対象にした報告が多く、基礎メカニズムの解明には至っていない。損傷の発生は部位、筋線維タイプによって異なることが報告されている。よって本研究では部位・筋線維タイプ毎に、収縮による部分的な壊死が観察可能な収縮による筋損傷動物モデルを確立し、一度損傷した骨格筋が引き続く損傷に対して応答を低減させる実験系を立ち上げることを第一の課題とした。

研究課題 2 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答に関連する因子

研究課題 1 における動物モデルを用いて、収縮による損傷軽減に関連すると報告されている因子を生理学的・生化学的・組織学的な手法を用いて調べることで、どの因子が損傷した筋線維の適応により強く関連しているかを調べることを目的とした。

研究課題 3 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズム

研究課題 2 で関連が示唆された損傷軽減因子の働きや役割から、最初に筋に与えられた損傷が、2

度目の収縮によって生じる損傷経路のどの部分に影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とした。これにより研究課題 2 で示す損傷した骨格筋の特性変化が実際に運動に対する応答変化にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにできるものと期待される。

研究課題 4 一度損傷した骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答

一度損傷した骨格筋の運動に対する応答の変化は、筋力向上・筋肥大を目的としたレジスタンス運動に対する応答にも影響を及ぼすことが考えられる。よって研究課題 4 では、損傷後の回復を促進する介入手段の一つとしての適切な運動療法の確立へと貢献できる知見として、収縮により損傷した骨格筋がレジスタンス運動に対してどのような応答変化を示すのかを明らかにすることを目的とした。

損傷した骨格筋の運動に対する応答特性に着目

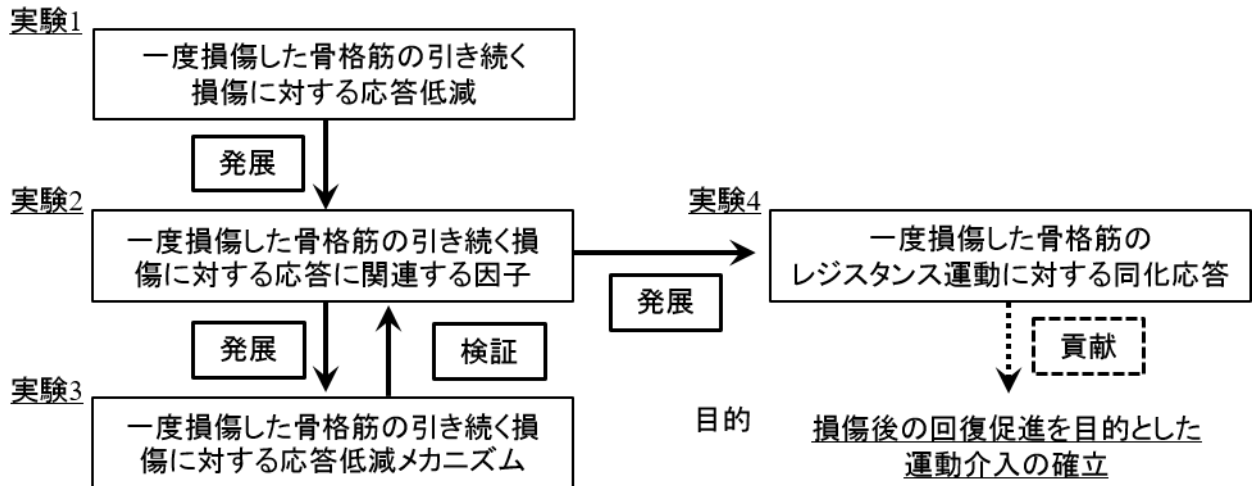


図 2-1. 研究課題及び研究課題の全体像

実験 1-3 は主に「一度損傷した骨格筋の引き続き損傷に対する応答低減メカニズム」を解明することを主な目的として構成されており、実験 4 は実験 2 で得られる所見から推測される「過去の損傷がレジスタンス運動に対する同化応答に及ぼす影響」を明らかにすることを主な目的として構成されている。これらの実験から得られる知見は、損傷からの回復を促進する適切な運動療法を確立することに貢献できるものと考えられる。

第3章 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答

3.1. 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減（実験1）

3.1.1. 背景と目的

負荷の強い運動、特に短縮性収縮や等尺性収縮よりも伸張性収縮の局面を多く含む運動は、骨格筋に微細な損傷を惹起する場合がある（Howatson ら 2008, Nosaka 2011）。この損傷は筋力低下や筋痛のみならず筋線維の部分的な壊死も引き起こすことがある（Bobbert ら 1986, Nosaka ら 2001）。興味深いことに、運動により損傷した筋は1回目の損傷から数日～数か月の期間にわたり損傷に対する耐性を獲得する、つまり筋損傷の症状は連続した負荷の強い運動時において、1回目より2回目で軽減する（Byrnes ら 1985, Clarkson ら 1992, Nosaka ら 2001）。この現象は「繰り返し効果」と呼ばれている。短縮性収縮や等尺性収縮による運動においても繰り返し効果を認めるが、その程度は伸張性収縮による運動と比較して軽度である（Lima ら 2015, Margaritelis ら 2015）。

McHugh ら（1999）は、繰り返し効果のメカニズムには神経、結合組織、筋線維における複雑な適応が関連していることを示唆している（図3-1）。神経の適応では、動員される運動単位が変化することで、負荷が分散されることが考えられている（Nosaka ら 1995）。結合組織の適応においては、伸張性収縮後に受動的、動的筋スティフネスが増加し（Reich ら 2000）、このことが筋節の構造や並びを維持する上で重要な細胞骨格タンパク質の適応に貢献していると考えられている（McHugh 2003）。筋線維における適応では、伸張性収縮による損傷により筋節が増加し（Lynn ら 1998）、伸張刺激が軽減されることが考えられている（Morgan 1990）。また筋小胞体のストレスに対する耐性増加が興奮収縮連関の障害を軽減させる可能性も示唆されている（Clarkson ら 1988）。さらに、1回目の損傷に対する炎症反応が続く2回目の損傷に対する防御機構に関わる可能性も考えられている（McHugh 2003）。しかし、その中のどの因子が損傷軽減に大きく貢献しているか、またそのメカニズムは明らかになっていない。

繰り返し効果に関する先行研究は、主に壊死の生じない程度の損傷介入を用いて、筋力低下や血中

クレアチンキナーゼ活性などの指標について調べてきたが、これでは損傷した筋線維や部位を同定することは困難である (Byrnes ら 1985, Clarkson ら 1992, Hyldahl ら 2015, Nosaka ら 2001)。部分的な壊死を生じさせる収縮では、筋線維タイプにより伸張性収縮に対する損傷耐性が異なることが報告されている。すなわち、ミオシン重鎖 IIb または IIx を有する速筋線維 (以後タイプ IIb または IIx) は遅筋線維であるタイプ I 線維と比較して損傷を受けやすい (Lieber ら 1988, Lieber ら 1991)。さらに、タイプ IIb, x 線維はラット腓腹筋の浅層を占めている (Kasuga ら 2010)。つまり、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減に貢献する因子を絞り込むには伸張性収縮による部分的な壊死を受けやすい筋線維もしくは部位に着目する必要があると考えられる。

本実験では、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズムを解明する上で必要な伸張性運動による部分的な壊死を引き起こすことができる動物モデルを用いた実験系の開発を目的として、損傷部位の特徴を明らかにできるかどうかを検証した。

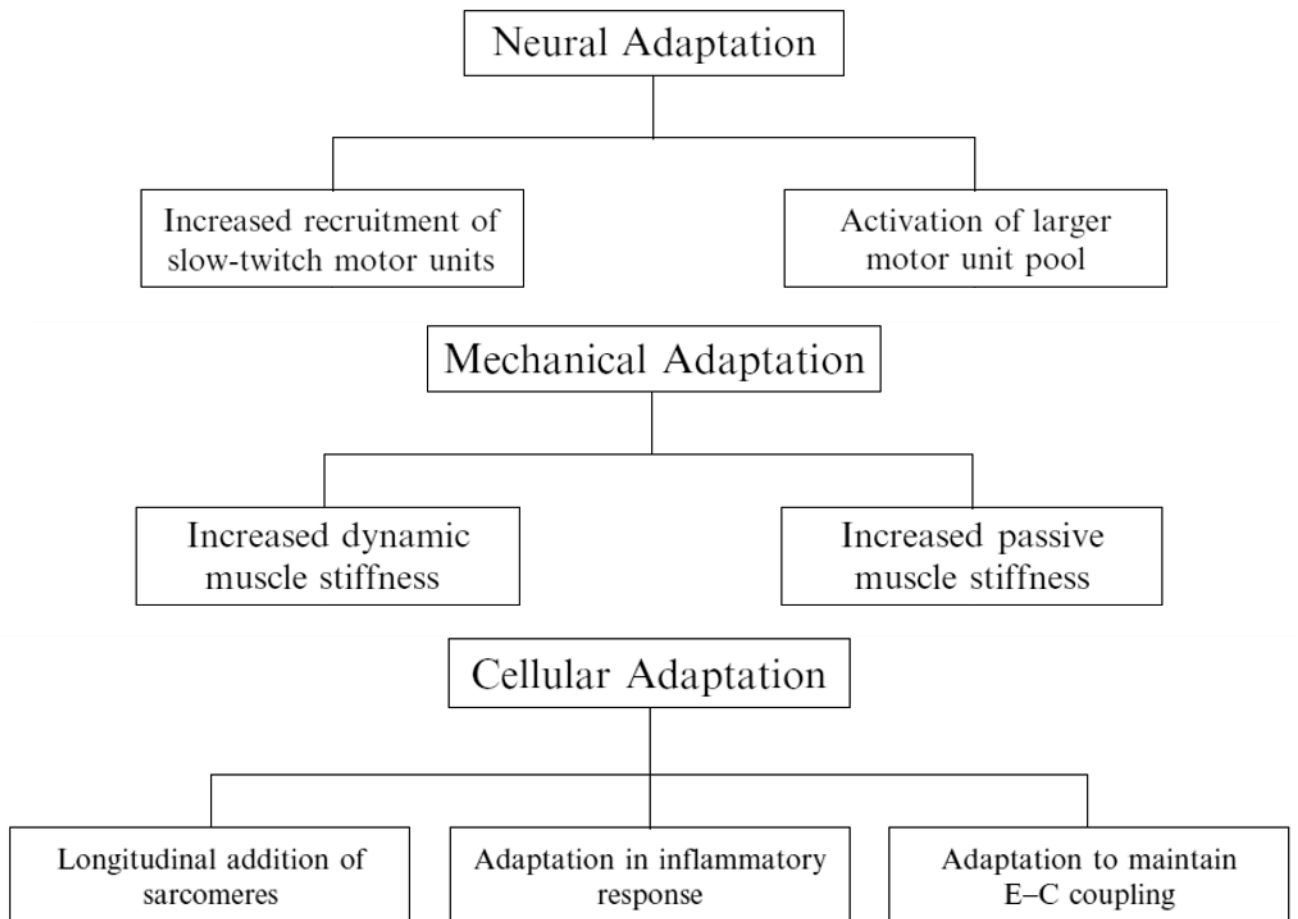


図 3-1. 繰り返し効果への関連が示唆されている神経適応（上）、機械的適応（中）、細胞適応（下）

E-C coupling：興奮収縮連関

引用元：McHugh, *Scand J Med Sci Sports* 2003

3.1.2. 方法

3.1.2.1. 実験動物

本実験は、10 週齢の Wistar 系雄ラット（日本クレア，東京，日本）を用いた。すべてのラットは、12 時間の明暗サイクルに管理された飼育室において飼育した。餌と水はそれぞれ自由摂取とした。

3.1.2.2. 実験プロトコル（図 3-2）

ラットを無作為に単回損傷（単回）群と繰り返し損傷（繰り返し）群の 2 群に分けた。10 週齢時に繰り返し群の右脚腓腹筋に対して伸張性収縮を実施し、14 週齢時に両群の同筋に対して同様の伸張性収縮を実施した。繰り返し群における 4 週の間隔は初回の伸張性収縮からの等尺性筋力の回復に要する期間から設定した。14 週齢時の伸張性収縮の直前、1 日後において、両群の動物は後述する方法により足関節トルクを測定後、イソフルラン吸入麻酔薬の過剰投与により屠殺した（各群匹数：直前 $n=6$ ；1 日後 $n=6$ ）。解析に用いる筋サンプルとして、右脚腓腹筋の筋腹部位を即座に液体窒素で凍結し、 -80°C で保管した。

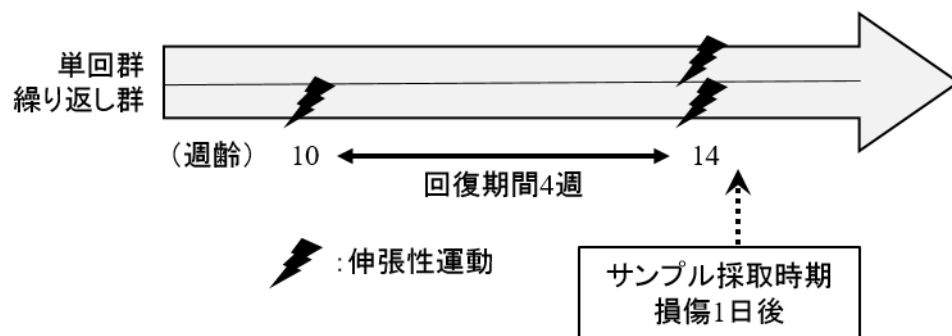


図 3-2. 実験 1（一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減）プロトコル

3.1.2.3. 伸張性収縮

伸張性収縮は図 3-3 に示すように先行研究（Song ら 2004）を参考としてプロトコルを作成し実施した。ラットはイソフルランの吸入投与による麻酔下にて、上記の先行研究同様の等速性動力計台に腹臥位で固定し、右脚腓腹筋の筋腹とアキレス腱部位に電極を貼り、電気刺激を施した。最大刺激強度は後述するように設定した。強縮刺激は 100Hz, 4 ミリ秒刺激幅の条件で 0.3 秒間与えられた。電気

刺激と同時に、右足関節は等速性に背屈させ、伸張性収縮を誘導した。フットプレートに固定した足関節は角速度毎秒 180 度、運動範囲 60 度から 125 度（背屈底屈中間位を 90 度とする）で背屈され、この伸張性収縮を 2 秒毎に連続 60 回実施した。伸張性収縮中の足関節底屈トルクの最大値や力積のモーメントを示す角運動量を算出した。最大腫脹や脚の引きずりは伸張性収縮直後のみ認めたが、損傷後の再生過程に及ぼす未知の影響を除くため、事後の鎮痛処置等は実施しなかった。

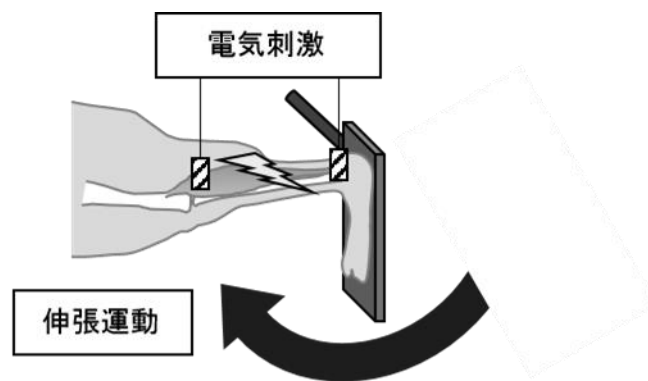


図 3-3. 電気刺激と伸張運動による伸張性収縮モデル

3.1.2.4. 等尺性筋力

先行研究 (Song ら 2004) を参考として、等尺性筋力の指標として等尺性足関節トルクの測定を実施した。刺激強度は最大等尺性単収縮張力を示す電圧に設定した。測定足関節角度は 90 度で実施した。

3.1.2.5. 組織学的評価

伸張性収縮により筋線維に生じる部分的な壊死を同定するためにエバンスブルー色素を使用した (Barbier ら 2004)。エバンスブルー色素は膜の透過性が亢進し、変性する筋線維中に浸潤する (Barbier ら 2004, Lovering ら 2004, Lovering ら 2007)。このエバンスブルー色素が浸潤した筋線維を蛍光顕微鏡で観察することで、変性筋線維、つまり壊死に至る筋線維を同定した。具体的には、14 週齢時の伸張性収縮直後に、無菌のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解させたエバンスブルー色素を 1 mg EBD / 0.1 mL PBS / 10 g 体重で腹腔内投与し、1 日後に筋サンプルを採取した。

免疫組織学的観察は先行研究 (Tsutaki ら 2013) を参考としてプロトコルを作成し実施した。解析対象の腓腹筋サンプルの凍結切片を室温で 0.25% (v/v)ピクリン酸、2%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) 中で 15 分間固定した。固定後、切片を室温で 5%ヤギ血清、1% (v/v) TritonX-100 を含む 0.1 M PB 中で 1 時間ブロックした。その後、ミオシン重鎖 I (BA-F8)、ミオシン重鎖 IIa (SC-71)、ミオシン重鎖 IIx (BF-35)、ミオシン重鎖 IIb (BF-F3) 一次抗体を用いて 4°C にて一晩反応させた。いずれのミオシン重鎖抗体も Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, United States) から購入した。二次抗体は室温で 1 時間反応させた。

各筋線維タイプにおけるエバンスブルー色素陽性筋線維の割合を算出するために、同一切片上でエバンスブルー色素陽性筋線維と各ミオシン重鎖抗体陽性の筋線維を照合した。

3.1.2.6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。群間差は Welch *t* 検定を用い、筋線維タイプ間においては、一元配置分散分析後に Tukey's *post hoc* 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ に設定した。

3.1.3. 結果

3.1.3.1 体重と足関節底屈トルクによる機械的指標

14 週齢時の伸張性収縮前における体重、等尺性底屈トルク、また伸張性収縮時の最大トルク（いずれも体重当たりの値を含む）に群間差は認めなかった（表 3-1）。唯一、14 週齢時の伸張性収縮時における角運動量（体重当たり）は繰り返し群において単回群と比較して有意に高値を示した。

3.1.3.2. 最大等尺性トルク

伸張性収縮 1 日後に測定した等尺性筋力は単回群で収縮前の $57.3 \pm 4.84\%$ 、繰り返し群で $72.2 \pm 5.50\%$ まで低下した（図 3-4）。その低下率は繰り返し群において単回群と比較して有意に低値を示した。

3.1.3.3. 筋横断面におけるエバンスブルー色素陽性筋線維の割合

エバンスブルー色素陽性筋線維の割合は単回群で $4.43 \pm 0.86\%$ 、繰り返し群で $0.09 \pm 0.03\%$ であり、繰り返し群で単回群と比較して有意に低値を示した（図 3-5）。初回の伸張性収縮後の代表的なエバンスブルー色素陽性筋線維の写真を示す。数多くのエバンスブルー色素陽性筋線維が腓腹筋浅層において観察された。また、データには示していないが、深層において筋線維の変性所見（Takagi ら 2011）を認めないことは、ヘマトキシリン-エオシン染色によっても確認された。

3.1.3.4. 筋線維タイプ毎のエバンスブルー色素陽性筋線維数の割合

各筋線維タイプとエバンスブルー色素陽性筋線維を同一切片上で照らし合わせた結果（図 3-6 上の写真は、単回群の筋浅層におけるタイプ IIb 線維とエバンスブルー色素陽性筋線維の一例）、エバンスブルー色素陽性筋線維の割合は両群ともにタイプ IIb, x でタイプ IIa とタイプ I と比較して有意に高値を示した（図 3-6 下）。

表 3-1. 体重と足関節底屈トルクによる機械的指標

	単回	繰り返し
体重(10週齢時) (g)	284.3 ± 11.7	286.9 ± 15.2
体重(14週齢時) (g)	387.9 ± 23.3	371.3 ± 16.7
等尺性強縮トルク(14週齢時、伸張性運動前) (mN・m)	201.3 ± 20.5	180.9 ± 8.4
等尺性強縮トルク(14週齢時、伸張性運動前、体重当たり) (mN・m・kg ⁻¹)	520.5 ± 67.8	477.6 ± 12.0
最大トルク(14週齢時、伸張性運動中) (mN・m)	326.8 ± 35.7	353.3 ± 64.4
最大トルク(14週齢時、伸張性運動中、体重当たり) (mN・m・kg ⁻¹)	820.6 ± 90.2	941.2 ± 172.3
角運動量(14週齢時、伸張性運動時) (mN・m・s)	2907.1 ± 140.7	3109.6 ± 258.0
角運動量(14週齢時、伸張性運動時、体重当たり) (mN・m・s・kg ⁻¹)	7304.2 ± 353.6	8292.4 ± 688.0 *

各群のサンプル数：6匹、シンボル（*）は単回群に対する有意差を示す。

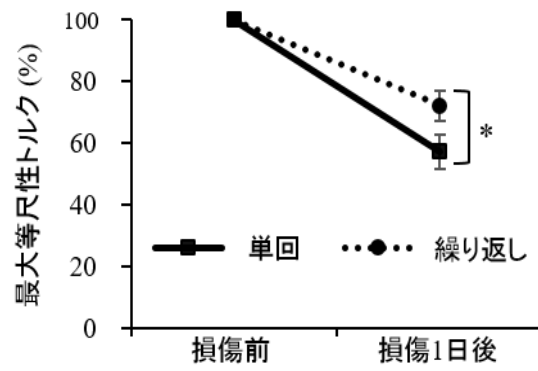


図 3-4. 最大等尺性トルク

それぞれの群において、伸張性収縮 1 日後に測定した最大等尺性トルクを収縮直前の値に対する相対値 (%) として示す。シンボル (*) は群間の有意差を示す。

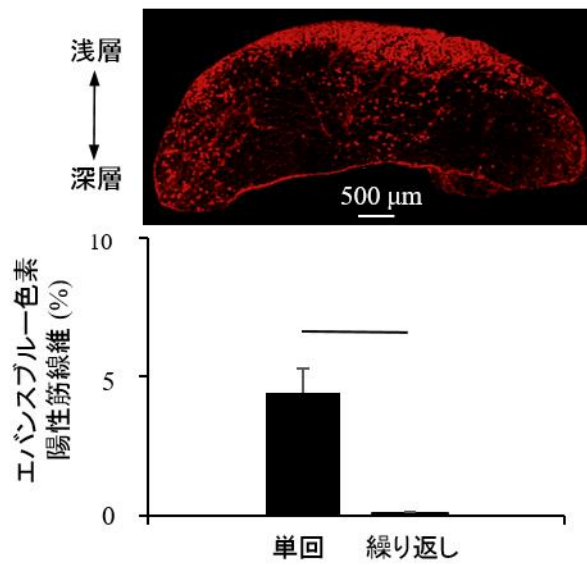


図 3-5. 筋横断面におけるエバンスブルー色素陽性筋線維数の割合

伸張性収縮 1 日後における筋全体のエバンスブルー色素陽性筋線維数の割合 (%) を示す。

上の写真は、筋腹部位の横断面における代表的なエバンスブルー色素陽性筋線維（赤色）の組織像を示す。筋線維以外にも赤く観察される部位があるが、筋線維は線状ではなく点状と観察される。

横棒は群間の有意差を示す。

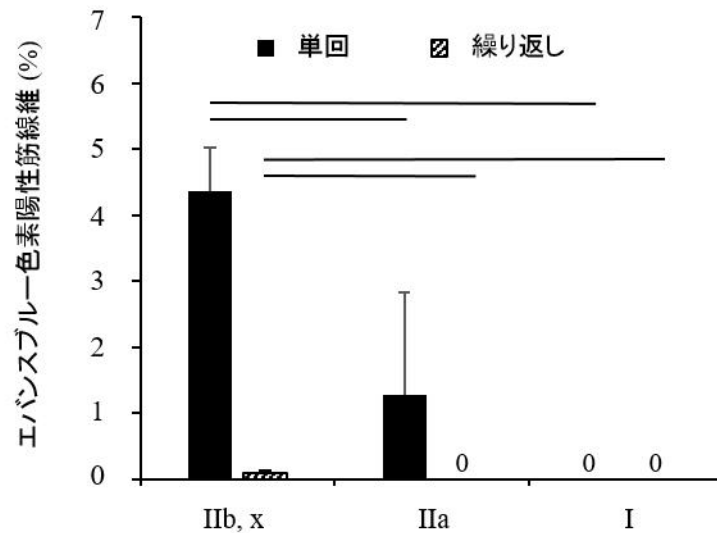
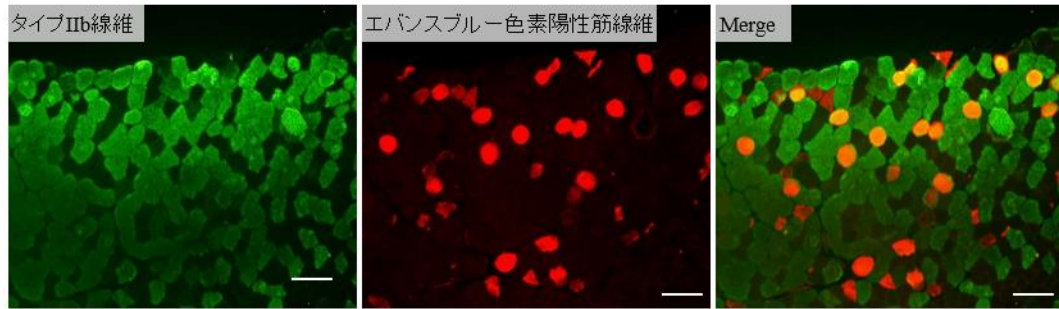


図 3-6. 筋線維タイプ毎のエバンスブルー色素陽性筋線維数の割合

伸張性収縮 1 日後における筋線維タイプ (IIb, x と IIa と I に分類) 毎のエバンスブルー色素陽性筋線維数の割合 (%) を示す。

上の写真は一例として、筋浅層部位におけるタイプ IIb 線維とエバンスブルー色素陽性筋線維を同一切片上で Merge させた写真を示す。Bars = 50 μ m.

横棒はそれぞれ次に対する有意差を示す：単回群、繰り返し群のそれぞれにおける IIb, x vs. IIa と IIb, x vs. I.

3.1.4. 考察

一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズムを解明する上で必要な、伸張性運動による筋損傷を用いた実験系を開発した。本モデルにおける伸張性収縮プロトコルは部分的な壊死を引き起こすことを確認し、またその損傷が浅層かつタイプ IIb, x 線維に生じる特徴を有することを確認した。

本実験の繰り返し群では、1 回目の伸張性収縮による筋損傷から 28 日後である、2 回目の伸張性収縮直前までに等尺性筋力は単回群の損傷していない筋と同等のレベルまで回復した。また、14 週齢時の伸張性収縮における足関節最大トルクは両群で同レベルであり、角運動量（体重当たり）は繰り返し群において、単回群と比較して有意に高値を示した。つまり、これらは過去の損傷は少なくとも 28 日後において、収縮能には大きな影響を及ぼさないことを示す。

また、本モデルでは筋収縮を誘発するために、麻酔下で制御された電気刺激を用いた。電気刺激による筋収縮は全筋線維を強制的に動員する刺激である。つまり、これまでの能動的運動モデル (Byrnes ら 1985, Hyldahl ら 2015) と比較して、神経を除く結合組織や筋線維における適応を明らかにすることに適するモデルである。

筋損傷の指標として、本実験では、まず筋力低下の程度を測定した。筋力低下は筋疲労時にも生じる現象であるが、本実験の測定は損傷 1 日後に実施しており、筋疲労ではなく筋損傷に起因する筋力低下と考えられる。先行研究同様に本実験でも、過去の損傷は 2 度目の伸張性収縮後の筋力低下を軽減することが明らかとなった。つまり McHugh (2003) による報告同様に結合組織や筋線維における適応が生じていることを示唆する。

次に、本実験では部分的な壊死をもたらす伸張性収縮モデルを用いたため、筋横断面における壊死筋線維数も同様に軽減するかどうかを検証した。筋線維の壊死部位を同定するために、エバンスブルー色素は広く用いられている。エバンスブルー色素陽性筋線維（壊死筋線維）の割合は、繰り返し群において単回群と比較して有意に低値を示した。つまり筋力低下のみならず部分的な壊死においても損傷の軽減が示された。

壊死部位の特徴に関して、繰り返し群においては、筋線維の部分的な壊死は 2 回目の伸張性収縮後

においてほとんど認めなかったが、単回群における初回の伸張性収縮後では主に腓腹筋浅層において著明なエバンスブルー色素陽性筋線維を認めた。浅層部位は主にタイプ IIb, x 線維が占めている (Kasuga ら 2010)。本研究でも筋線維タイプ毎の部分的な壊死を調べたところ、先行研究 (Lieber ら 1988, Lieber ら 1991) 同様にタイプ IIb, x 線維はタイプ IIa, I 線維と比較して、伸張性収縮誘発性筋損傷を受けやすいことが示された。

まとめると、本モデルにおける初回の伸張性収縮による損傷は続く同様の伸張性収縮に対する抵抗性を増加させ、部分的な壊死を生じさせる収縮においても損傷の軽減が確認された。そして、初回の伸張性収縮による損傷は浅層かつタイプ IIb, x 線維で顕著であった。Butterfield ら (2006) は、繰り返し効果における適応は骨格筋内で不均一に生じることを示唆している。これらより、繰り返し群に関連する因子を絞り込むために部分的な壊死が生じやすい浅層もしくはタイプ IIb, x 線維における変化は重要であると考えられる。

3.2. 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答に関連する因子（実験 2）

3.2.1. 背景と目的

繰り返し効果は神経、結合組織、筋線維それぞれにおける適応によって生じると考えられている（Mchugh 2003）が、その中でどの因子がより強く損傷軽減に貢献しているかは明らかになっていない。実験 1 で用いた伸張性収縮プロトコルでは、タイプ IIb, x 線維においてタイプ IIa, I と比較して壊死が生じやすく、タイプ IIb, x が占める腓腹筋浅層において顕著な損傷が引き起こされた。つまり、本モデルを用いて損傷を受けやすい筋線維タイプもしくは浅層部位における変化を明らかにすることで、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減により強く貢献する因子を絞り込むことが可能になると考えられる。

一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減に貢献する因子の候補として、筋線維タイプの遅筋方向への移行が考えられる。カルジオトキシンによる筋の部分的な壊死では再生期において筋線維タイプはタイプ II からタイプ I へと大きく移行する（Matsuura ら 2007）。運動による損傷とカルジオトキシンによる損傷では損傷メカニズムは異なるが、様々なタイプの筋損傷後の再生過程は同様である（Baoge ら 2012）。つまり、伸張性収縮により部分的な壊死に至ったタイプ IIb, x 線維もその再生過程においてタイプ I 線維の方向に移行する可能性がある。実験 1 からも 2 回目の損傷における筋線維タイプ毎の損傷の受けやすさは、単回の損傷の場合と同様にタイプ IIb, x 線維がタイプ I 線維と比較して損傷を受けやすいことが示された。これらより、筋線維タイプ移行が一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減に大きく貢献するかもしれない。

筋線維タイプ間の損傷に対する抵抗性の違いには、Heat shock protein 72 (HSP72)やコラーゲン量が影響しているかもしれない。HSP72 の発現増加やコラーゲン量の増加は筋線維の損傷に対する抵抗性を強化することが報告されている（Hyldahl ら 2015, Liu ら 2013, Shima ら 2008）。しかし、タイプ IIb, x 線維は他タイプの筋線維と比較して安静時の HSP72 発現量は少なく（Oishi ら 1998）、筋線維周囲のコラーゲン量も同様に少ないことが報告されている（Kovanen ら 1984）。これら HSP72 やコラーゲン発現はタイプ移行以外にも影響を受けて変化する。例えば、強制的な伸張刺激や強度の高い運

動は筋線維の HSP72 発現を増加させる (Liu ら 2013, Shima ら 2008)。また激しい筋損傷は細胞外マトリクス再構築の一環としてコラーゲン蓄積を生じ、筋スティフネスの増加を招く (Huard ら 2002, Yoseph ら 2015)。このように HSP72 やコラーゲン発現は筋線維タイプ移行に伴う変化と独立した経路によっても、伸張性収縮による壊死が生じやすい部位において大きく増加する可能性がある。

本研究では、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減に関連する候補因子の中で、その関連性の強さを明らかにするために、実験 1 の筋損傷モデルを用いて、損傷-再生筋線維のタイプ移行、損傷を受けやすい浅層部位における HSP72、コラーゲン発現について調べた。

3.2.2. 方法

3.2.2.1. 実験動物

本実験は、実験 1 同様に 10 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、12 時間の明暗サイクルに管理された飼育室において飼育した。餌と水はそれぞれ自由摂取とした。

3.2.2.2. 実験プロトコル (図 3-7)

ラットを無作為に損傷後群と対照群の 2 群に分けた。10 週齢時に損傷後群の右脚腓腹筋に対して実験 1 同様の伸張性収縮を実施し、14 週齢時に両群の動物は後述する足関節スティフネスを測定後、イソフルラン吸入麻酔薬の過剰投与により屠殺した (各群 $n=6$)。実験 1 において損傷後群の 14 週齢時において引き続き損傷に対する応答低減は確認されている。解析に用いる筋サンプルとして、右脚腓腹筋の筋腹部位を即座に液体窒素で凍結し、 -80°C で保管した。

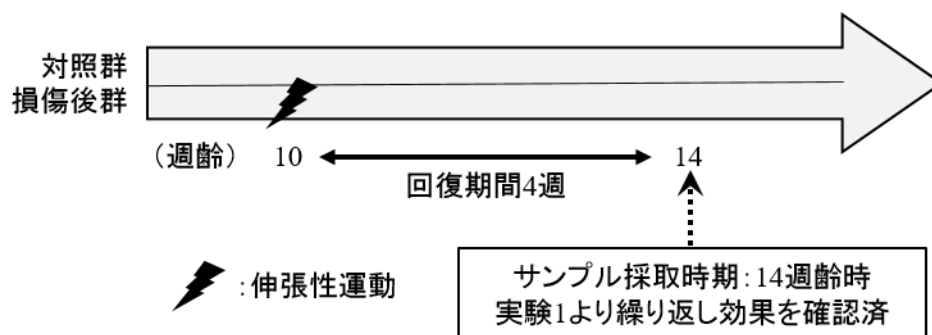


図 3-7. 実験 2 (一度損傷した骨格筋の引き続き損傷に対する応答に関連する因子) プロトコル

3.2.2.3. 組織学的評価

免疫組織学的観察は実験 1 同様である。一次抗体には、ミオシン重鎖 I (BA-F8)、ミオシン重鎖 IIa (SC-71)、ミオシン重鎖 IIx (BF-35)、ミオシン重鎖 IIb (BF-F3)、HSP72 (C92F3A-5)、I 型コラーゲン (LB-1102, コスモバイオ, 東京, 日本) 一次抗体を用いた。封入は未熟な再生筋線維を示す中心核筋線維を同定するために diamidino-2-phenylindole を含む封入剤 (H-1200, VECTASHIELD, California, United States) を用いた。

I 型コラーゲン陽性面積は先行研究 (Takagi et al., 2011) を参考として、ImageJ ソフトを用いて腓腹

筋浅層、深層のそれぞれにおいて 0.0625 mm² の範囲で 10 か所から測定した。

3.2.2.4. 生化学的評価

HSP72 量はウエスタンブロッティングにより測定した。筋サンプルをプロテアーゼインヒビターとホスファターゼインヒビターを含む RIPA 溶液を用いてホモジナイズした。その後、4°C下で 15 分間 20,000 g で遠心分離し、タンパク濃度は Lowry 法により RC DC Protein Assay を用いて測定した。その後、各サンプルは 3X サンプル溶液に溶解させ、95°C で 5 分間煮沸した。20µg のタンパクを 10% SDS-PAGE に分け、PVDF 膜に転写した後に、5% スキムミルクで室温、1 時間でブロッキングし、4°C 下一晩 HSP72 抗体 (C92F3A-5, Enzo Life Sciences, New York, United States) と反応させた。二次抗体は室温で 1 時間反応させ、化学発光試薬を用いてシグナルを検出した。イメージ画像は Ez-capture ソフトを用いて、シグナルは CS analyzer ソフトを用いて定量化した。画像撮影後、PVDF 膜は Coomassie Brilliant Blue で染め、タンパクアプライ量を均一化した (Welinder ら 2011)。

総コラーゲン量は QuickZyme Total collagen assay kit (QuickZyme Biosciences, Zuid-Holland, Nederland) を用いて指示書に記載されたプロトコルにて実施した。解析には一定量の凍結乾燥サンプルを用いて、ヒドロキシプロリン量による間接的な定量でコラーゲン量を測定した。

3.2.2.5. 足関節スティフネス

足関節静止受動トルクは関節スティフネスを評価するために先行研究 (Ochi ら 2008) を参考として測定した。イソフルランによる麻酔下で伸張性収縮を実施する際に使用した等速性動力計台を用いて、足関節を毎秒 5 度で 90 度から 130 度に背屈させた。発揮された静止トルクのうち、粘性成分の影響を最小限にするために、伸張終了後から 90 秒後のトルク値を関節スティフネス値として用いた。

3.2.2.6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。群間差は Welch *t* 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ に設定した。

3.2.3. 結果

3.2.3.1. 全筋線維数のタイプ構成と中心核筋線維のタイプ構成

筋全体のミオシン重鎖タイプ構成を図 3-8a に示した。損傷後群において、対照群と比較してタイプ IIa 線維の割合が高く、タイプ IIb, x 線維の割合が低値を示した。中心核を示す再生筋線維は繰り返し群においてのみ認め、全筋線維数の 4.9% であり、そのほとんどがタイプ IIb, x であった (図 3-8b)。

3.2.3.2. HSP72 発現

HSP72 発現量は損傷後群で対照群と比較して有意に高値を示した (図 3-9a)。またその発現部位は、両群において、主に深層に認めた。損傷後群では対照群と比較して深層を中心にしてより広い範囲での HSP72 発現を認めた (図 3-9b)。一方、浅層ではどちらの群においても HSP72 発現をほとんど認めなかった。HSP72 発現はタイプ IIa, I 線維において強く発現していた (図 3-9b の矢頭、矢印)。

3.2.3.3. コラーゲン量と分布変化

総コラーゲン量は損傷後群において対照群と比較して有意に高値を示した (図 3-10a)。図 3-10b は浅層の I 型コラーゲンの発現を示しており、損傷後群において、より厚く筋線維を取り囲む I 型コラーゲンの発現像を観察した。この発現面積を定量化した結果、深層における I 型コラーゲン陽性面積の割合は両群で有意差を認めなかったが、浅層においては、損傷後群が対照群と比較して有意に高値を示した (図 3-10b)。

3.2.3.4. 足関節の静止受動トルク

ラット足関節の静止受動トルクは関節スティフネスを評価するために測定した (図 3-11)。損傷後群において静止受動トルクは対照群と比較して有意に高値を示した。同様の結果が体重で除した静止受動トルクにおいても認められた (データは示していない)。

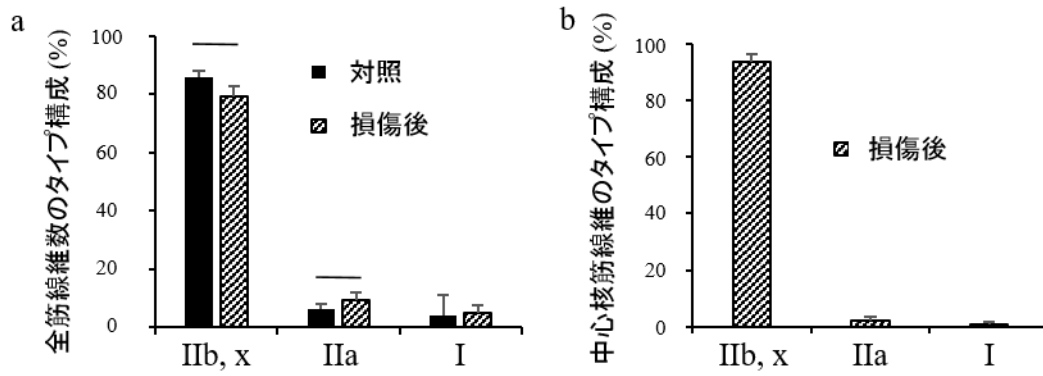


図 3-8. 全筋線維数のタイプ構成と中心核筋線維のタイプ構成

aは筋横断面におけるミオシン重鎖タイプ毎の筋線維割合 (%) を示す。bは中心核を示す再生筋線維におけるタイプ毎の筋線維数割合 (%) を示す。

中心核筋線維のタイプ構成は損傷後群のみの値 (対象群では中心核筋線維を認めないため)

aにおける横棒は群間の有意差を示す。

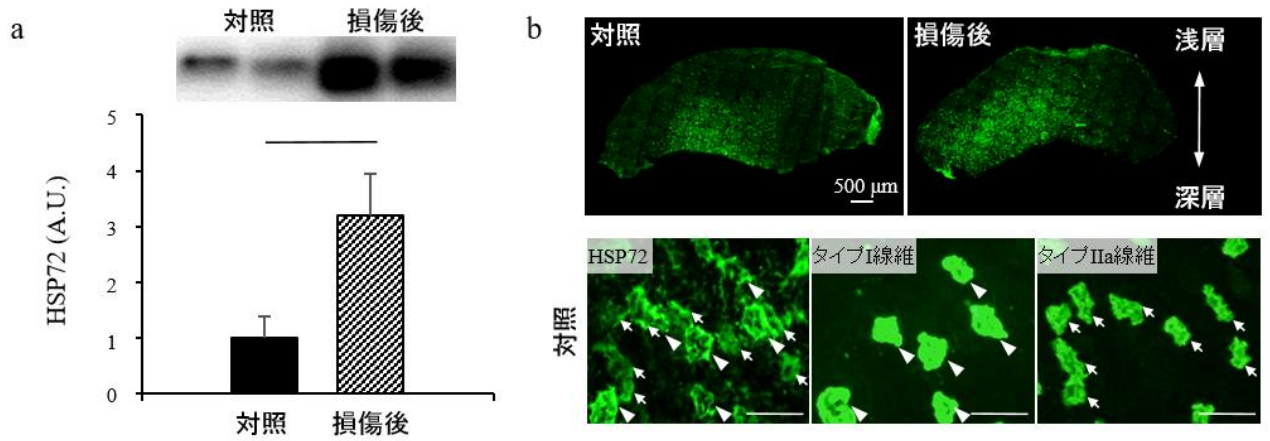


図 3-9. 筋重量当たりの HSP72 量、横断面における HSP72 発現像、対照群における HSP72 発現とタイプ IIa, I 線維

a は各群における筋重量当たりの HSP72 量を示す。b は各群の横断面における HSP72 発現（上）と対照群におけるタイプ IIa, I 線維と HSP72 発現（下）を示す。

a における横棒は群間の有意差を示す。矢印と矢頭はそれぞれ、連続切片における同じ筋線維を示す。

HSP72 : Heat shock protein 72. Bars = 50 μm.

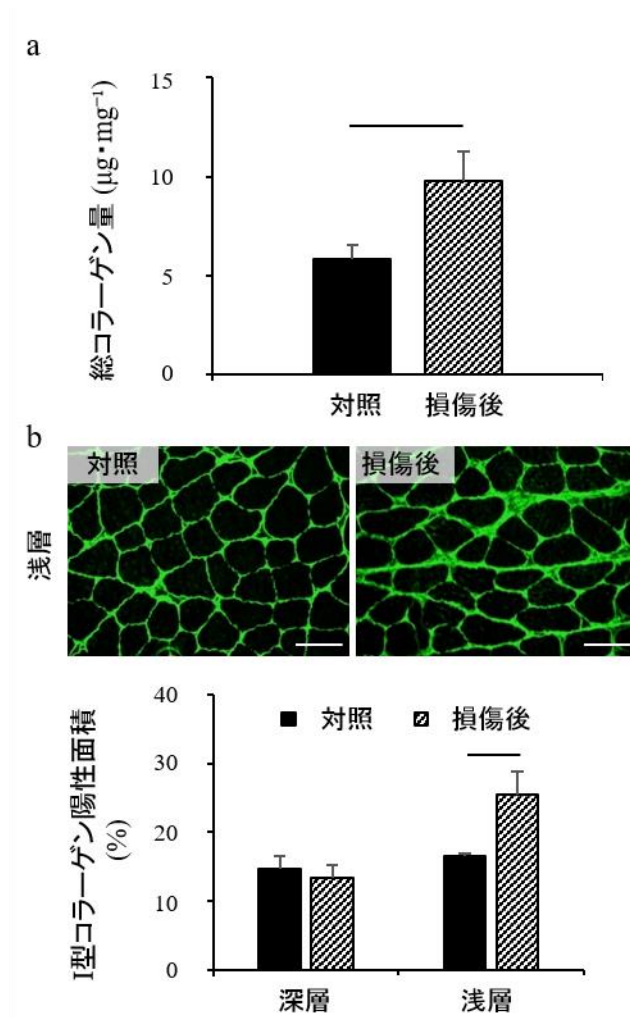


図 3-10. 筋重量当たりの総コラーゲン量、横断面における浅層部位の I 型コラーゲンの発現、浅層と深層における I 型コラーゲン陽性面積の割合

a は筋重量当たりの総コラーゲン量を示す。b は筋浅層、深層それぞれの横断面における I 型コラーゲン陽性面積の割合を示す。写真は筋浅層における代表的な組織像を示す。Bars = 50 μm.

横棒は群間の有意差を示す。

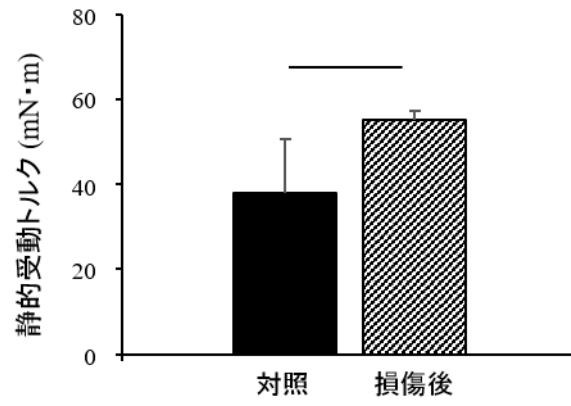


図 3-11. 足関節の静的受動トルク

各群の静的受動トルクを示す。横棒は群間の有意差を示す。

3.2.4. 考察

本研究は、運動による損傷の軽減に関連すると報告されている因子を対象にして、実験 1 で作製した筋損傷動物モデルにおける損傷部位特異的な変化であるかどうかを調べた。初回の伸張性収縮による損傷は、筋全体においては筋線維タイプ構成や HSP72 発現、コラーゲン量を変化させたが、損傷部位特異的な変化はコラーゲン量のみで認めた。これらの所見は、損傷部位におけるコラーゲン蓄積が非損傷部位における HSP72 発現の増加や筋線維タイプ移行と比較して、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減に深く貢献することを示唆する。

損傷により筋線維タイプが移行する可能性として、カルジオトキシンによる筋損傷では再生過程においてタイプ II からタイプ I へと移行することが報告されている (Matsuura ら 2007)。筋損傷の原因は様々であるが、損傷後の再生過程は同様であると考えられている (Baoge ら 2012)。よって、初回の伸張性収縮によって損傷を受けたタイプ IIb, x 線維がタイプ I へと移行し、損傷耐性を獲得する可能性がある。本研究では、損傷後群の筋全体において、対照群と比較してタイプ IIb, x 線維の割合が減少し、タイプ IIa 線維の割合が増加した。しかし、再生筋線維のほとんどがタイプ IIb, x のミオシン重鎖を発現していた。つまり、筋全体における筋線維タイプの遅筋方向への移行は再生筋線維における筋線維タイプの移行を示しているわけではないようである。Salvini ら (1999) によると、損傷後の筋線維タイプ移行は筋線維を支配する運動神経の軸索分枝速度がタイプ間で異なるために生じる。よって、損傷後のタイプ移行はタイプ II, I が同時に損傷するような場合に生じるかもしれない。本研究の伸張性収縮による損傷では、部分的に壊死した筋線維のほぼ全てがタイプ IIb, x であったため、再生筋線維はタイプ移行を示さなかったものと考えられる。壊死しなかった筋線維の遅筋方向へのタイプ移行については、壊死が生じない程度の伸張性収縮を繰り返し実施することで同様の変化を招くことが報告されている (Ochi ら 2007)。そのメカニズムは明らかになっていないが、本実験においても伸張性収縮が壊死しなかった筋線維に対してタイプ移行を誘導する何らかの影響を及ぼした可能性がある。筋線維タイプの移行に関してまとめると、本実験程度の筋損傷の程度であれば、損傷による筋線維タイプ移行は一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減において主要な役割を果たしていないようである。

HSP72 は伸張や収縮などの機械的刺激の増加に応じて発現が増加し、HSP72 の過剰発現モデルでは過度な運動による筋損傷は抑制される (Liu ら 2013, Shima ら 2008)。本実験では、筋全体における HSP72 発現量は、損傷後群において対照群と比較して有意に高値を示したが、伸張性収縮により最も負荷のかかると考えられる腓腹筋浅層においては著明な発現増加は認めなかった。つまり、筋全体における HSP72 発現の増加も筋線維タイプ移行同様に、タイプ IIb, x 線維もしくは筋浅層における変化を示しているわけではないようである。腓腹筋浅層において HSP72 発現が増加しなかった理由として、サンプル採取時期が初回の損傷から 4 週後であるため、HSP72 の発現増加がその間に基準レベルまで戻った可能性がある。また先行研究 (Oishi ら 1998) 同様にタイプ IIa, I 線維が他タイプと比較してより強く HSP72 を発現していたことから、筋全体におけるタイプ IIb, x 線維割合の減少、タイプ IIa 線維割合の増加が HSP72 増加に少なくとも部分的に貢献していることが考えられる。これらの所見より、HSP72 の発現増加も筋線維タイプ移行同様に一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減において主要な役割は担っていないことが示唆されるが、断定的な結論を得るには、HSP72 発現量と発現部位を時系列的に観察する必要がある。

激しい筋損傷は筋線維間のコラーゲン蓄積 (Lieber ら 2013, Thorsteinsdottir ら 2011) を伴う線維化を生じ (Takagi ら 2011)、筋スティフネスに影響する (Feit ら 1989, Lopez ら 2012)。筋スティフネスの増加は筋線維の機械的感受性を低下させる (Boppart ら 2006, Smith ら 2011) ことで損傷に対する抵抗性を増大させることが報告されている (Lapier ら 1985)。本研究では、筋全体において、損傷後群で対照群と比較してコラーゲン量は有意に多く、同時に足関節スティフネスも増大した。さらに、I 型コラーゲンの増加が損傷後群の腓腹筋浅層において認められた。骨格筋の細胞外マトリクス構成物の中で、I 型コラーゲンは最も豊富に存在し、筋スティフネスに貢献する (Feit ら 1989, Lieber ら 2013, López ら 2012, Thorsteinsdottir ら 2011)。これらの所見は筋全体におけるコラーゲン量の増加が、損傷しやすい腓腹筋浅層部位における変化を反映している可能性を示唆する。これらより、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減において、タイプ IIb, x 線維周囲の I 型コラーゲン蓄積が重要な役割を果たす可能性がある。

まとめると、初回の伸張性収縮による損傷は、筋全体における筋線維タイプの遅筋方向への移行や HSP72 発現量、コラーゲン量を増加させたが、I 型コラーゲンのみが損傷を受けやすい腓腹筋浅層に

において特異的な変化を示した。つまり、損傷部位におけるコラーゲン蓄積が壊死していない部位における HSP72 発現増加や筋線維タイプ移行と比較して、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減においてより重要な役割を果たすことが示唆された。

3.3. 一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズム（実験 3）

3.3.1. 背景と目的

激しい運動、特に伸張性収縮を伴う運動は骨格筋の損傷を惹起しやすいことは実験 1-2 で述べてきた。図 3-12 に示すように、運動による損傷において、細胞内カルシウムイオン濃度は重要な因子であり（Duncan 1978）、伸張活性化チャンネルを介した細胞外からのカルシウムイオン流入が大きな貢献を果たすと考えられている（Hamill ら 1996, Suchyna ら 2000）。これは伸張性収縮が短縮性収縮や等尺性収縮と比較して損傷を惹起しやすい原因の一つとして考えられている。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇はカルシウム依存性のタンパク質分解酵素であるカルパインやリン脂質分解酵素であるホスホリパーゼを活性化し、細胞骨格や細胞膜の損傷を引き起こす（Belcastro ら 1998, Duncan ら 1987, Howl ら 1990）。骨格筋には主にカルパイン-1,2,3 が存在するが、これらの活性化を阻害する leupeptin やカルパスタチンを用いた先行研究（Branca ら 2000, Ono ら 2004）より、特にカルパイン-3 が筋損傷に大きく関与することが報告されている。また、ホスホリパーゼの活性による細胞膜の損傷は、膜の透過性を亢進させ、二次的な細胞外からのカルシウムイオン流入を引き起こす（Duncan ら 1987, Howl ら 1990）。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は他にも、ミトコンドリアの活性酸素産生を増加させ（Brookes ら 2004）、筋線維のカルシウムイオン感受性を低下させることで力発揮の低下を引き起こす（Moopanar ら 2005）。活性酸素はまた膜の過酸化反応を誘発し、上記で示した膜の透過性亢進にも関与することが報告されており、悪循環を引き起こす（Mason ら 1997, Child ら 1998）。

実験 2 において、一度損傷した骨格筋において筋全体での筋線維タイプの遅筋方向への移行、コラーゲン量の増加を認めた。これら筋線維タイプの移行（Lieber ら 1998）とコラーゲン量の増加（Hyldahl ら 2015）はともに損傷軽減に関与することが報告されている。しかし、そのメカニズムは明らかになっていない。筋線維タイプに関連して、Gissel ら（2001）は、遅筋優位の筋における収縮による細胞内カルシウム濃度の上昇は速筋優位の筋と比較して緩やかであることを報告している（図 3-13）。また、コラーゲンに代表される細胞外マトリクスは、メカニカルストレスの伝達などに関連する（Sarasa-Renedo ら 2005）。コラーゲン蓄積を伴う線維化は、筋のスティフネスを増加させ（Lopez ら 2012）、

機械的感受性の低下を招く (Smith ら 2011)。機械的感受性の低下は、損傷に対する抵抗性を増大させると報告されている (Boppart ら 2006)。機械的感受性の低下に関して、細胞外マトリクスと筋線維の結合増加が、伸張性収縮時の張力と強い相関関係を示す c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) を抑制する (Martineau ら 2001, Boppart ら 2006)。細胞外からのカルシウムイオン流入には膜に存在する伸張活性化チャネルが大きな役割を持つため (Hamill ら 1996, Suchyna ら 2000)、コラーゲンの増加がこのイオン流入に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。これらより、筋線維タイプの遅筋方向への移行やコラーゲン量増加といった骨格筋特性の変化が、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制する可能性が考えられる。

本研究では、実験 1 で確認した部分的な壊死を引き起こす筋損傷を参考として、14 週齢時における伸張性収縮を壊死が生じない強度に変更して実施した。これにより上記で述べた二次的なカルシウムイオン流入の影響を極力除いた、初期の細胞内カルシウムイオン濃度上昇の影響を調べることができるものとする。このモデルを用いて、2 回目の伸張性収縮時におけるカルシウム依存性のカルパイン活性や自己分解を中心にカルシウムイオンが関与する因子を調べることで、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズムに関する知見を得ることを目的とした。

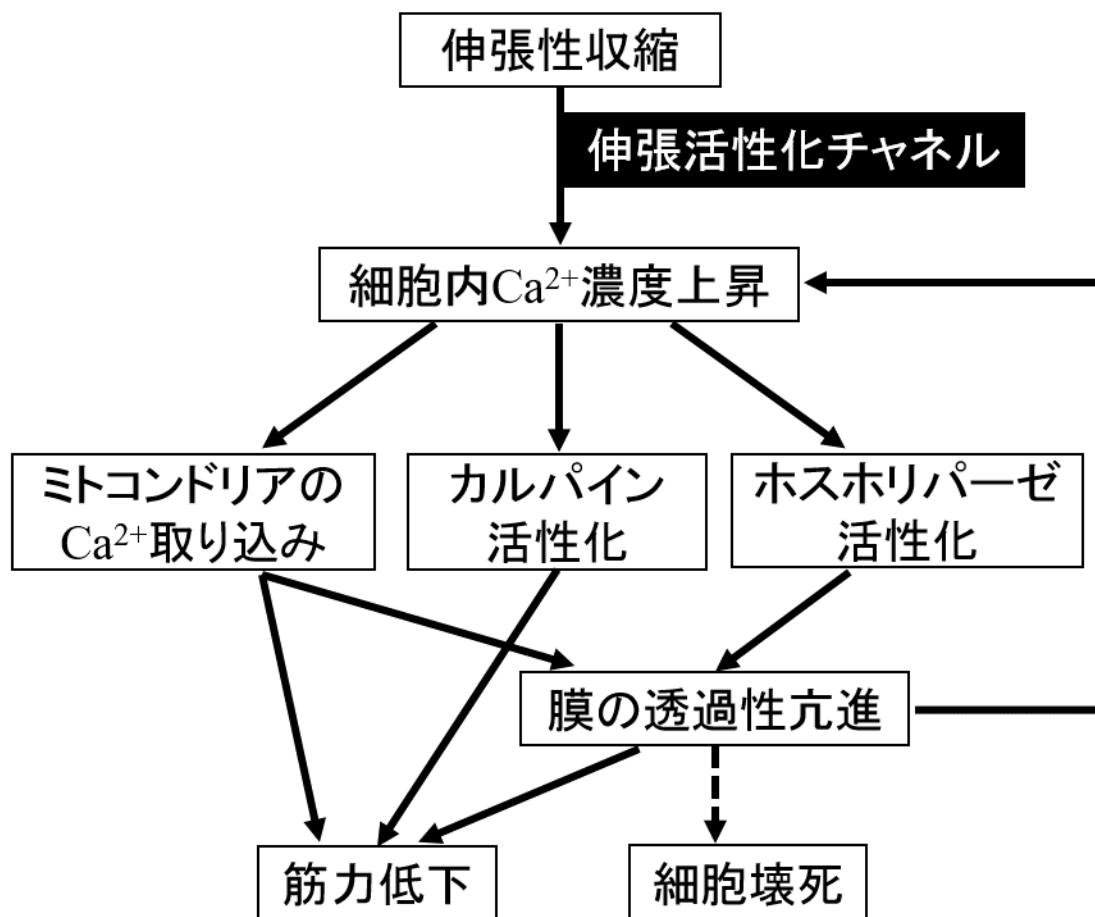


図 3-12. 伸張性運動による筋損傷に関わる経路

伸張性収縮は、伸張活性化チャネルを開口させ、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は様々な経路を介して筋力低下や膜の透過性亢進を招く。著明な膜の透過性亢進が二次的に細胞外からのさらなるカルシウムイオン流入を引き起こし、悪循環に陥り、壊死に至るものと考えられている。

引用元：Allen ら, *J Physiol* 2005

上記を元に著者が手を加え作成した。

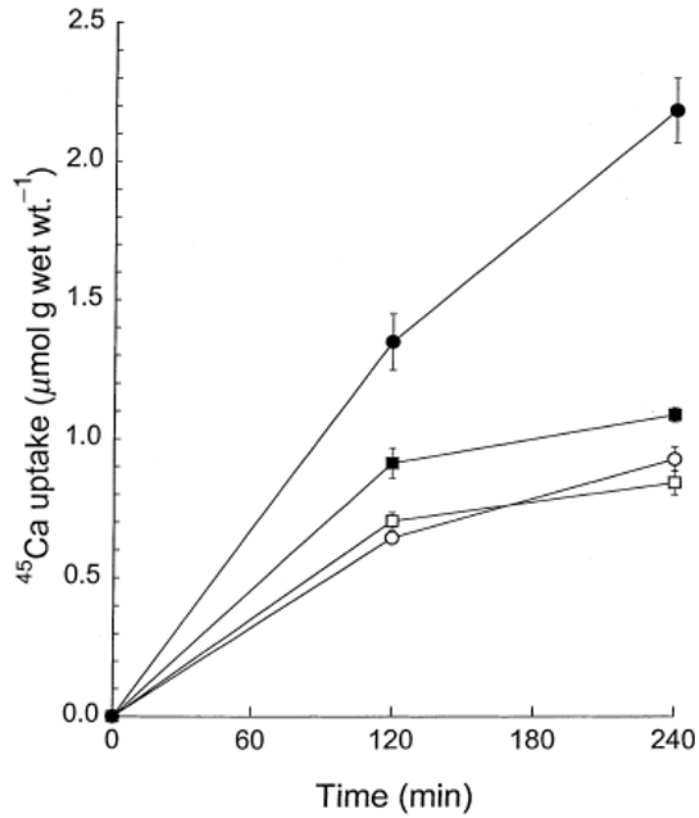


図 3-13. ラットヒラメ筋（遅筋線維優位）と長趾伸筋（速筋線維優位）における安静時もしくは電気刺激時の ^{45}Ca 取込み

静止長における等尺性収縮を刺激条件 1Hz, 1ms 刺激幅, 10V にて実施した際の経時的な取込みを示す。

□ヒラメ筋（安静）○長趾伸筋（安静）■ヒラメ筋（刺激）●長趾伸筋（刺激）

数値は平均値±標準誤差

引用元：Gissel and Clausen, *Acta Physiol Scand* 2001

3.3.2. 方法

3.3.2.1. 実験動物

本実験は、実験 1-2 同様に 10 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。すべてのラットは、12 時間の明暗サイクルに管理された飼育室において飼育した。餌と水はそれぞれ自由摂取させた。

3.3.2.2. 実験プロトコル (図 3-14)

ラットを無作為に軽損傷群と重-軽損傷群の 2 群に分けた。10 週齢時に重-軽損傷群の右脚腓腹筋に対して実験 1-2 同様の伸張性収縮を実施し、14 週齢時に両群の同筋に対して後述する変更を加えた伸張性収縮を実施した。10 週齢時の伸張性収縮による等尺性筋力の低下は少なくとも 4 週後までに回復することは実験 1 にて確認している。14 週齢時の直前、直後、6 時間後、1 日後において実験 1 同様に足関節底屈トルクを測定後、右脚腓腹筋の筋腹部位を即座に液体窒素で凍結し、 -80°C で保管した (各群各時点匹数 : $n = 6$)。

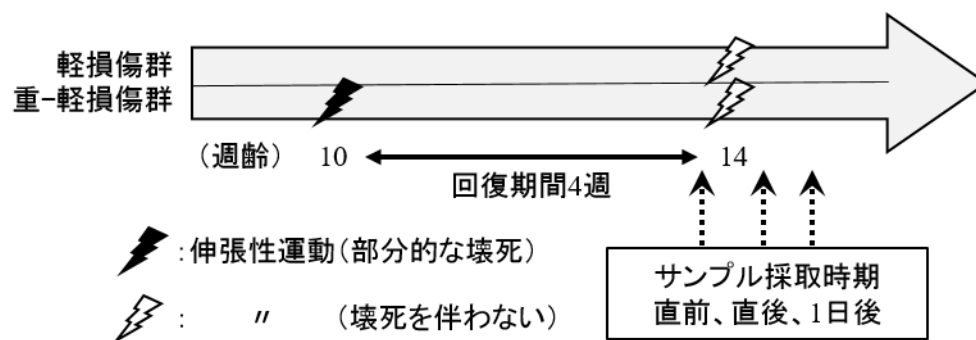


図 3-14. 実験 3 (一度損傷した骨格筋の引き続き損傷への応答低減メカニズム) プロトコル

3.3.2.3. 伸張性収縮プロトコル

14 週齢時の伸張性運動のプロトコルは、膜の著明な透過性亢進を生じない、つまり部分的な壊死を引き起こさない程度の伸張性収縮プロトコルに設定した。強縮を誘発する刺激条件は、10 週齢時の部分的な壊死を引き起こす伸張性収縮から以下の変更を加えた：電気刺激時間を 3 秒から 2 秒に、足関節運動における角速度を毎秒 180 度から 30 度に、運動範囲を足関節 60 度から 125 度を 60 度から 120

度（足関節底背屈中間位を 90 度とする）に変更した。強縮は 10 秒毎に 10 回を 1 セットとし、間隔 3 分空けて 5 セット実施した。

3.3.2.4. 組織学的評価

伸張性収縮による膜の透過性亢進を観察するため、実験 1 同様にエバンスブルー色素を用いた組織学的観察を実施した。方法は実験 1 同様である。

3.3.2.5. 生化学的評価

実験 2 同様のサンプル調整方法、検出条件でウェスタンブロッティングを実施した。カルパイン-1, 3 の測定に用いたサンプルの調整は、Kanzaki ら (2014) による先行研究を参考として、5M 窒素、2.04M チオ尿素、10mM ニリン酸ナトリウム、0.13% 2-メルカプトエタノール、10mM EGTa、10mM EDTA を含むホモジナイズバッファーを用いて実施した。以下の操作は実験 2 同様である。一次抗体には、calpain-1 (C0355, シグマ, 東京, 日本)、calpain-3 (NCL-CALP-12A2, Leica Biosystems, 東京, 日本)、JNK リン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵; 9251, Cell Signaling Technology, 東京, 日本)、Total JNK (9252, Cell Signaling Technology) を用いた。二次抗体は室温で 1 時間反応させ、化学発光試薬を用いてシグナルを検出した。イメージ画像は Ez-capture ソフトを用いて、シグナルは CS analyzer ソフトを用いて定量化した。画像撮影後、膜は Coomassie Brilliant Blue で染め、タンパクアプライ量を均一化した (Welinder ら 2011)。

総カルパイン活性は Calpain activity assay キット (ab65308, Abcam, Cambridge, UK) を用いて、指示書に記載されているプロトコルに倣い、一定量の凍結乾燥サンプルを用いて定量した。初めの抽出段階では、2-メルカプトエタノール, Digitonin, EDTA を含むバッファーが用いられ、操作中のカルパイン自己活性化を防止する。その後、CHAPS, 2-メルカプトエタノール, EDTA を含むバッファーと反応させ、カルパイン基質を用いた蛍光検出を行うことで、細胞質の活性化カルパインのみを定量化することができる。

カルボニル化タンパクの定量は検出キット (ROIK03, SHIMA laboratories, 東京, 日本) を用いて、使用指示書に記載されているプロトコルを参考としてプロトコルを作成し実施した。測定に用いたサンプルやプロトコルは JNK リン酸化検出の際に用いたものと同様である。

3.3.2.6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。群間差は Welch *t* 検定を用い、エバンスブルー色素陽性筋線維の割合における 3 群間には一元配置分散分析後に Bonferroni's *post hoc* 検定を用いた。その他においては二元配置（過去の損傷×時間）分散分析後に Bonferroni's *post hoc* 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ に設定した。

3.3.3. 結果

3.3.3.1. 14 週齢時での伸張性収縮の機械的指標

最大足関節トルクと総仕事量（ともに体重当たり）において、群間差は認めなかった（表 3-2）。

3.3.3.2. 筋力低下とエバンスブルー色素陽性筋線維の割合

14 週齢時での損傷 1 日後における等尺性最大トルクの低下は、重-軽損傷群で軽損傷群と比較して有意に低値を示した（図 3-15a）。またエバンスブルー陽性筋線維は、両群ともに損傷していない筋と同等の値を示した（図 3-15b）。

3.3.3.3. 総カルパイン活性

総カルパイン活性の経時的変化において、交互作用は認めず、重-軽損傷群の平均値が軽損傷群と比較して有意に高値を示し、損傷直後、6 時間後の平均値が損傷前と比較して有意に高値を示した（図 3-16a）。また 14 週齢時の伸張性収縮による総カルパイン活性の増加は、交互作用なく、重-軽損傷群の平均値は軽損傷群と比較して有意に低値を示し、損傷 6 時間後の平均値は損傷直後と比較して有意に低値を示した（図 3-16b）。

3.3.3.4. カルパイン-1 の自己分解

カルパインの自己分解はカルシウム依存性であり、主に細胞内カルシウムイオン濃度に左右される（Murphy ら 2006）。両群ともに損傷 15 分後のカルパイン-1 自己分解は損傷前と比較して有意に高値を示し、損傷 6 時間後において損傷直後と比較して有意に低値を示したが、軽損傷群のみ損傷 6 時間後も損傷前と比較して有意に高値を示した（図 3-17a）。また損傷前において、重-軽損傷群で軽損傷群と比較して有意に高値を示した。よって 14 週齢時の伸張性収縮によるカルパイン-1 自己分解の増加を比較したところ、交互作用はなく、重-軽損傷群の平均値が軽損傷群と比較して有意に低値を示し、損傷 6 時間後の平均値も損傷 15 分後と比較して有意に低値を示した（図 3-17b）。また 14 週齢時の損傷前におけるカルパイン-1 の総タンパク量は、重-軽損傷群において軽損傷群と比較して有意に高値を

示した (図 3-17c)。データには示していないが、カルパイン-1 自己分解をその総タンパク量で除した比較では、図 3-17b に示す結果と変わりなかった。

3.3.3.5. カルパイン-3 の自己分解

軽損傷群において、損傷 15 分後のカルパイン-3 自己分解が損傷前、損傷 6 時間後と比較して有意に高値を示した (図 3-18a)。一方、損傷前と損傷 6 時間後において、重-軽損傷群が軽損傷群と比較して有意に高値を示し、損傷 15 分後では低値を示した。よって、14 週齢時の伸張性収縮によるカルパイン-3 自己分解の増加を比較したところ、軽損傷群の損傷 15 分後で損傷 6 時間後、重-軽損傷群の損傷 15 分後と比較して有意に高値を示した (図 3-18b)。またカルパイン-3 の総タンパク量は損傷前において、カルパイン-1 同様に重-軽損傷群が軽損傷群と比較して有意に高値を示した (図 3-18c)。データには示していないが、カルパイン-3 自己分解をその総タンパク量で除した比較では、図 3-18b に示す結果と変わりなかった。

3.3.3.6. カルボニル化タンパク

タンパクのカルボニル化は、膜の過酸化反応により生じるため (Allen ら 2005)、活性酸素の影響を推察する指標として測定した。活性酸素軽損傷群では損傷 6 時間後において損傷前、損傷 15 分後より有意に高値を示した (図 3-19a)。一方、重-軽損傷群も損傷 6 時間後において損傷前と比較して有意に高値を示した。また損傷前、損傷直後において、重-軽損傷群は軽損傷群と比較して有意に高値を示した。よって、14 週齢時の伸張性収縮によるカルボニル化タンパクの増加を比較したところ、軽損傷群の損傷 6 時間後は損傷 15 分後また重-軽損傷群の損傷 6 時間後と比較して有意に高値を示した (図 3-19b)。

3.3.3.7. JNK リン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)

両群ともに損傷 15 分後において損傷前、損傷 6 時間後と比較して有意に高値を示した (図 3-20)。さらに損傷 15 分後では重-軽損傷群が軽損傷群と比較して有意に低値を示した。損傷前における Total JNK のタンパク量においては、群間差を認めなかった (データは示していない)。

表 3-2. 14 週齡時の伸張性収縮時の足関節底屈トルク.

	軽損傷	重-軽損傷
最大トルク(体重当たり) ($\text{mN}\cdot\text{m}\cdot\text{kg}^{-1}$)	913.4 \pm 104.5	836.3 \pm 65.9
角運動量(体重当たり) ($\text{N}\cdot\text{m}\cdot\text{s}\cdot\text{kg}^{-1}$)	22.5 \pm 0.6	21.4 \pm 1.5

各群のサンプル数：6 匹

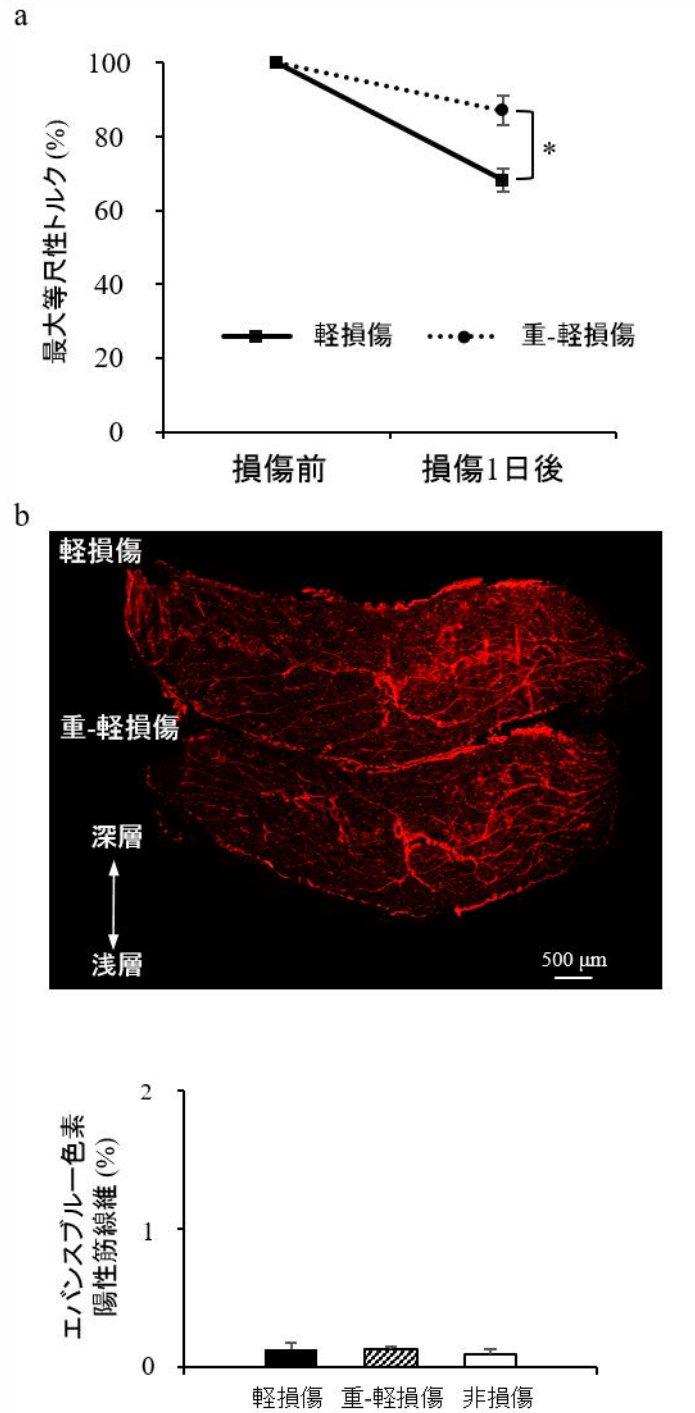
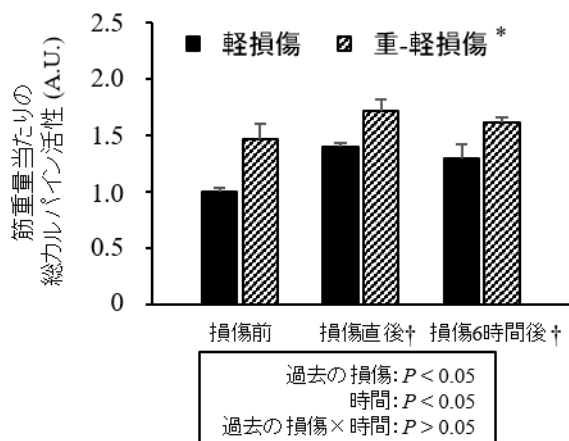


図 3-15. 14 週齢時の損傷 1 日後における最大等尺性トルクとエバンスブルー陽性筋線維

a は、それぞれの群において、14 週齢時での伸張性収縮 1 日後に測定した最大等尺性トルクを収縮直前の値に対する相対値 (%) として示す。シンボル (*) は群間の有意差を示す。

b は、14 週齢時での伸張性収縮 1 日後における筋腹部位の横断面におけるエバンスブルー色素陽性筋線維数の割合 (%) を示す。写真は、代表的なエバンスブルー色素 (赤色) の組織像を示す。筋線維以外の部分が赤く観察される。

a



b

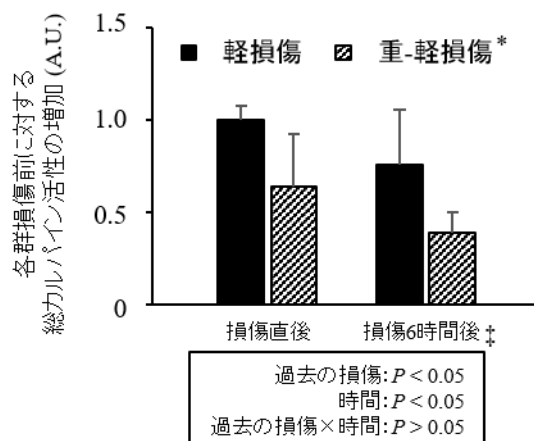


図 3-16. 14 週齢時の伸張性収縮における筋重量当たりの総カルパイン活性と損傷前に対する総カルパイン活性の増加

a は、筋重量当たりの総カルパイン活性の経時変化を示す。

b は、各群の 14 週齢時の損傷前に対する損傷後の総カルパイン活性の増加を示す。

a, b ともに交互作用は認めず、各シンボルはそれぞれ次に対する平均値間の有意差を示す：*, vs. 軽損傷; †, vs. 損傷前; ‡, vs. 損傷直後。

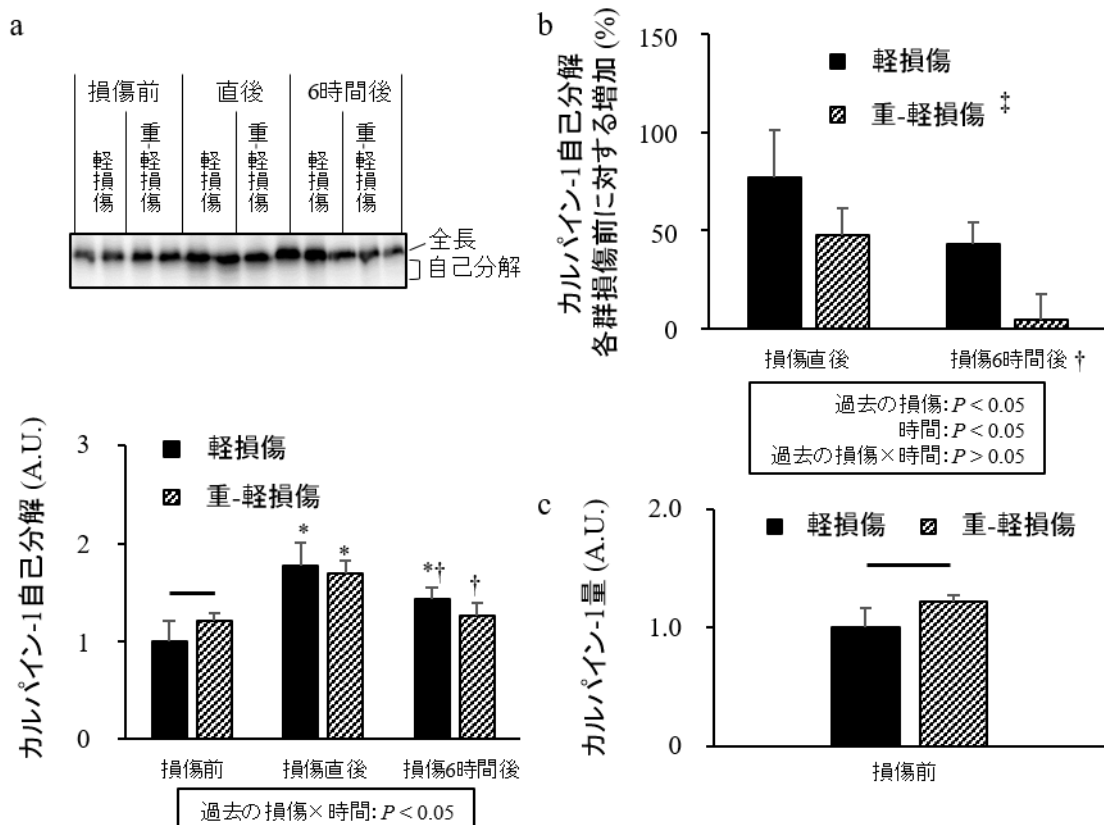


図 3-17. 14 週齢時での伸張性収縮前後におけるカルパイン-1 自己分解、損傷前に対する自己分解の増加、損傷前のカルパイン-1 タンパク量

a は、14 週齢時の伸張性収縮前後におけるカルパイン-1 自己分解のタンパク量を示す。b は、各群の 14 週齢時での伸張性収縮後における収縮前に対するカルパイン-1 自己分解量の増加を示す。c は、自己分解したカルパイン-1 と自己分解していない全長のカルパイン-1 の総量を示す。各シンボルはそれぞれ次に対する有意差を示す：*, vs. 損傷前; †, vs. 損傷直後; ‡, vs. 軽損傷。a においては交互作用を認めるも、b においては交互作用を認めず、主効果による平均値間の有意差のみを示す。a, c における横棒は群間の有意差を示す。

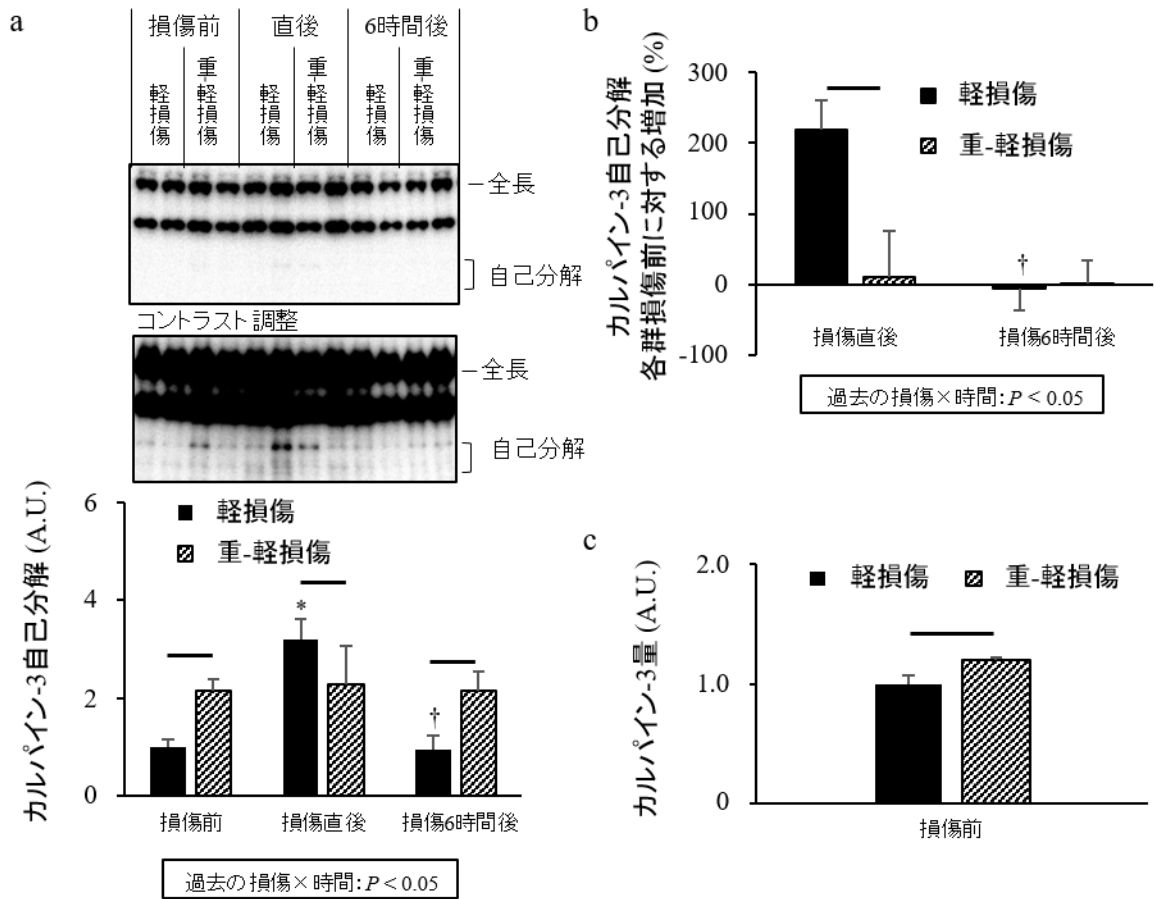


図 3-18. 14 週齢時での伸張性収縮前後におけるカルパイン-3 自己分解、損傷前に対する自己分解の増加、カルパイン-3 のタンパク量

a は、14 週齢時の伸張性収縮前後におけるカルパイン-3 自己分解のタンパク量を示す。b は、各群の 14 週齢時での伸張性収縮後における収縮前に対するカルパイン-3 自己分解量の増加を示す。c は、自己分解したカルパイン-3 と自己分解していない全長のカルパイン-3 の総量を示す。各シンボルはそれぞれ次に対する有意差を示す：* , vs. 損傷前; † , vs. 損傷直後. 横棒は群間の有意差を示す。

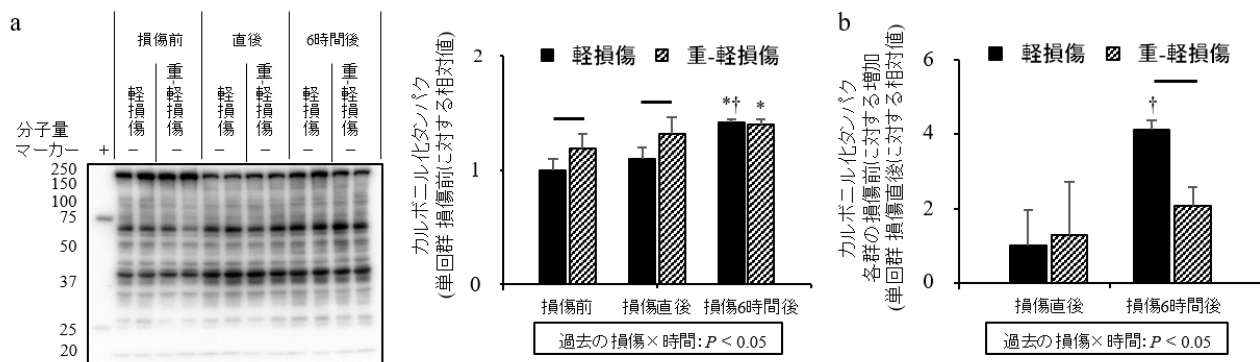


図 3-19. 14 週齢時での伸張性収縮前後におけるカルボニル化タンパク、損傷前に対するカルボニル化タンパクの増加

a は、14 週齢時の伸張性収縮前後におけるカルボニル化タンパクを示す。左の代表的なバンド像において、カルボニル化タンパクは全分子量の値から算出される。b は、各群の 14 週齢時での伸張性収縮後における収縮前に対するカルボニル化タンパクの増加を示す。各シンボルはそれぞれ次に対する有意差を示す：*, vs. 損傷前; †, vs. 損傷直後。横棒は群間の有意差を示す。

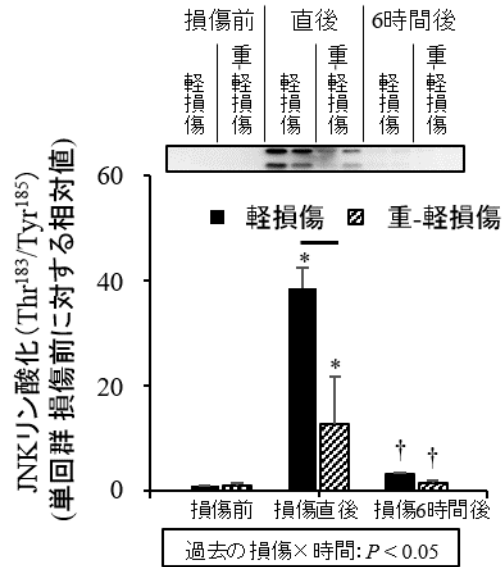


図 3-20. JNK リン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)

14 週齢時の伸張性収縮前後における JNK リン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) タンパク量を示す。各シンボルはそれぞれ次に対する有意差を示す：*, vs. 損傷前; †, vs. 損傷直後。横棒は群間の有意差を示す。

JNK : c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N 末端キナーゼ)

3.3.4. 考察

本研究は、著明な膜損傷を伴わない伸張性収縮を用いることで、二次的なカルシウムイオン流入の影響を極力除いた、初期の細胞内カルシウムイオン濃度上昇の影響を調べた。その結果、一度損傷した骨格筋において、伸張性収縮によるカルシウム依存性カルパイン活性の上昇が軽減した。これは、2 回目の伸張性収縮時の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制されたことを示唆する結果であり、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減メカニズムの一端であるかもしれない。

本実験の実験系において、実験 1 同様に 14 週齢時の伸張性収縮時における最大足関節トルクと総仕事量（ともに体重当たり）は過去の損傷による影響は見られなかった。これは過去の損傷は本モデルにおける損傷 28 日後の筋収縮に大きな影響を及ぼさないことを示唆する。

運動による損傷の代表的な指標として主にヒトを対象とした研究では、筋力低下や血中キナーゼ活性、疼痛などが用いられ (Hyldahl ら 2014)、動物を対象とした研究では膜損傷をみるエバンスブルー色素陽性筋線維の数や割合も用いられることが多い (Hamer ら 2002)。本実験では、実験 1 において筋力低下と膜損傷の軽減を確認した筋損傷動物モデルを改良して、14 週齢時に実験 1 とは異なる比較的強度の緩やかな伸張性収縮プロトコルを実施した。その結果、重-軽損傷群では軽損傷群と比較して損傷 1 日後における筋力低下の程度は有意に軽減した。また膜損傷を示すエバンスブルー色素陽性筋線維は両群において非損傷側の左側の同筋と同等の値を示した。膜の透過性亢進による細胞内へのカルシウムイオン流入はイオンチャネルを介するイオン流入とは異なり二次的に生じるとされているものの、これらの所見は、著明な膜損傷を引き起こさない程度の筋損傷において、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減が確認されたことを示すものである。つまり以下に示す損傷直後のカルシウム依存性カルパイン活性の上昇などは 1 次的なカルシウムイオン流入に起因するものと考えられる。

カルパイン活性 (Ono ら 2004)、特にカルパイン-3 (Verburg ら 2005) は運動による損傷において、重要な因子として報告されている。本実験では、総カルパイン活性の他に、カルパイン-1 とカルパイン-3 の自己分解を調べた。Goll ら (2003) によると、カルパイン-1 は自己分解することで、カルシウムイオン濃度が低値でも活性化されることを報告している。またカルパイン-3 は、自己分解すること

で活性化するという報告がある (Diaz ら 2004, Taveau ら 2003)。本実験の 14 週齢時における伸張性収縮による総カルパイン活性の上昇において、過去の損傷による影響で有意差を認めた。同様にカルパイン-1 の自己分解の増加も重-軽損傷群で軽損傷群と比較して有意に低値を示した。さらにカルパイン-3 自己分解の増加においては、損傷 15 分後において重-軽損傷群が軽損傷群と比較して有意に低値を示した。これらの結果は、2 回目の伸張性収縮によるカルパイン活性の上昇は 1 回目の伸張性収縮による上昇と比較して有意に低値であることを示す。つまり、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する筋力低下の軽減には、カルパイン活性の上昇が抑制されたことが貢献していることを示唆する。

上記で示したカルパインの活性や自己分解は、カルシウム依存性といわれているように、主に細胞内カルシウムイオン濃度に左右される (Murphy ら 2006)。また細胞内カルシウムイオン濃度はカルパイン活性以外の経路、活性酸素によっても筋力低下などの筋損傷を引き起こす (Moonpanar ら 2005)。この活性酸素は膜の過酸化反応により、タンパクのカルボニル化を引き起こすことも報告されている (Allen ら 2005)。カルパイン活性の上昇については上記で示したが、カルパイン-1 とカルパイン-3 はともに総タンパク量が、重-軽損傷群において軽損傷群と比較して高値を示した。よって、各カルパイン自己分解を総タンパク量で除した値においても、重-軽損傷群は軽損傷群と比較して低値を示した。さらに伸張性収縮によるカルボニル化タンパクの増加を比較したところ、重-軽損傷群において軽損傷群と比較して有意に低値を示した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定することは技術的に困難であり観察できなかったが、本実験の結果は伸張性収縮による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制されたことを示唆する。カルボニル化タンパクの結果もその仮説を裏付けるものであると考えられる。

伸張性収縮による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には、細胞外からの流入が重要と考えられているが、損傷早期のイオン流入は主にチャネルを介したものであり、膜の透過性亢進によるイオン流入は二次的に起こると考えられている。実験 1 において、部分的な壊死に至る損傷において膜の透過性亢進の軽減を認めたが、本実験における損傷では両群ともに著明な膜の透過性亢進は認めなかった。よって、上記で示した細胞内カルシウムイオン濃度上昇の抑制は、チャネルを介した一次的なイオン流入の軽減を示す可能性がある。

本実験では、筋線維タイプの遅筋方向への移行とコラーゲン蓄積から伸張性収縮による細胞内カル

シウムイオン濃度の上昇が軽減するという仮説を立てた。筋線維タイプに関しては、収縮による細胞内へのカルシウム取込みが遅筋優位のヒラメ筋において速筋優位の長趾伸筋と比較して低値を示すことが報告されている (Gissel ら 2001)。また、コラーゲンに代表される細胞外マトリクスは、メカニカルストレスの伝達などに関連するため (Sarasa-Renedo ら 2005)、コラーゲンの増加がこのイオン流入に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。JNK リン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) は骨格筋にかかる張力に依存して増加することが報告されており (Martineau ら 2001)、本実験において、重-軽損傷群の損傷 15 分後の JNK リン酸化は軽損傷群と比較して有意に低値を示した。また実験 2 において、静止受動トルクは損傷により増加することが確認されている。これらの結果は、伸張性収縮時に伸張活性化チャンネルが存在する細胞膜の伸張ストレスを直接示すものではないが、筋線維にかかる機械的刺激による負荷は一度損傷した骨格筋において軽減している可能性がある。

本実験において、14 週齢時の損傷前におけるカルパイン活性やカルボニル化タンパクが重-軽損傷群で軽損傷群と比較して有意に高値を示した。これは過去の伸張性収縮に伴う損傷によって、28 日後においても細胞内カルシウムイオン濃度が高値を示していることを示唆する。Ronghua ら (2015) は、神経損傷後の再生骨格筋において少なくとも損傷から 28 日後までカルパイン-3 活性が高値を示すことを報告している。カルパイン-3 活性の半減期は 10 分より短い (Kinbara ら 1998, Sorimachi ら 1993)。よって、本実験における 14 週齢時の損傷前における重-軽損傷群で観察されたカルパイン活性の高値は、10 週齢時の細胞内カルシウムイオン濃度上昇による活性ではないものと考えられる。カルパイン-3 はタンパク質分解酵素としての働き以外にも、筋機能や維持などあらゆる側面、例えばサルコメアの再構築 (Ojima ら 2010, Murphy ら 2009, Cohen ら 2006) に関わる可能性が報告されている。これらからも筋損傷後の筋力低下から回復段階にある再生過程におけるカルパインの活性化は、伸張性運動後の活性とは異なり、筋再生における重要な役割があるのかもしれない。今後、カルパイン活性の局在など、筋再生過程における活性と筋損傷時の活性の違いに関する詳細な解析が望まれる。

本実験の結果をまとめると、著明な膜の透過性亢進を伴わない筋損傷においても、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷への応答低減が認められ、損傷に関わるカルパイン活性やタンパクのカルボニル化は抑制されることが明らかとなった。これは細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制されているために生じたものと考えられる。この細胞内カルシウムイオン濃度上昇の軽減が伸張活性化チャンネル

からのイオン流入と関連する可能性が示唆されたが、今後、部位または筋線維タイプ毎の応答差異に着目して、更なる知見を得る必要がある。

3.4. 第3章のまとめ

本研究では、ラット腓腹筋を対象とした電気刺激を用いた伸張性収縮により一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減を認めるモデルを作製し、損傷軽減に関わることが報告されている代表的な因子について損傷した筋線維や部位の適応への関連性を検証した。また、関与が示唆された因子の役割から損傷経路のどの部分に影響を及ぼすかを調べることで、損傷した筋の特性を明らかにしようとした。その結果、以下の所見を得た。

①電気刺激と足関節運動を制御した伸張性収縮モデルにおいて、部分的な壊死を引き起こす程度の収縮では膜の透過性亢進と筋力低下、壊死を引き起こさない程度の収縮では筋力低下、といった損傷の指標で引き続く損傷に対する応答低減を認める動物モデルを作製した。本モデルでは部分的に壊死した筋線維をタイプ別に観察することができ、筋線維特異的なまたは部位特異的な適応を調べることができる新しいモデルとして有用である。

②これまで損傷軽減に関連することが報告されてきた筋線維タイプ移行や HSP72 発現、コラーゲン量の損傷した筋線維における適応への関与を調べたところ、筋全体ではタイプ IIb, x からタイプ IIa への筋線維タイプ移行、HSP72 発現量増加、受動的関節スティフネス増加を伴うコラーゲン量増加を認めたが、損傷した筋線維または損傷を受けやすい部位における適応においては、I型コラーゲンのみが特異的な変化を示すことが明らかになった。

③一度損傷した骨格筋において変化を認めた因子が損傷経路にどのような影響を及ぼすかに関して仮説を立てたところ、運動による筋損傷において重要な因子として考えられている細胞内カルシウムイオン濃度に影響を及ぼす可能性が挙げられた。実験3におけるカルパイン自己分解の結果から、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷に対する応答低減において伸張性収縮による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制されている可能性が示された。特に、コラーゲン蓄積に関連して、筋スティフネスの増加による機械的感受性の低下が伸張性収縮時に筋に加わる張力を軽減させる可能性が示唆された。

今後の課題として、コラーゲン蓄積や筋線維タイプの遅筋方向への移行、HSP72 発現の増加がどのように損傷軽減に関わるかを明らかにするために、実験 3 のように筋全体の伸張性収縮に対する応答を比較するのではなく、組織学的所見により筋線維タイプ別または筋の浅層、深層など部位毎における応答を調べる必要がある。または、遺伝子組み換えによる強制発現などによって、それぞれの因子の筋損傷における役割を調べることも有用であるかもしれない。特に、コラーゲン蓄積の関与に関しては、架橋結合を抑制する薬剤などを用いた実験も引き続く損傷への応答低減におけるコラーゲン蓄積の影響を検証する上で重要であると考えられる。また、他にも損傷軽減に関わる因子が変化している可能性が大いに考えられるため、検証を続けていく必要があるだろう。

第4章 一度損傷した骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答（実験4）

4.1. 背景と目的

骨格筋量は、筋タンパク質合成と分解のバランスにより制御される（Biolo ら 1995, Biolo ら 1997, Phillips ら 2004）。レジスタンス運動は、主に mammalian target of rapamycin complex 1（以下、mTORC1）シグナル伝達を活性化し（Laplante ら 2012, Sengupta ら 2010）、筋タンパク質合成を増加させる（Chesley ら 1992, Dreyer ら 2006, Phillips ら 1997）。それゆえにレジスタンス運動は筋力向上を伴う筋量の増加に重要である（Baar ら 1999, Mayhew ら 1999）。

骨格筋は、様々な刺激に対して適応を示す可塑性の高い組織である一方、細胞の恒常性を維持する性質も持ち、連続する刺激に対する応答を低減することが知られている（Brook ら 2015, Ogasawara ら 2013）。実験 1,3 における損傷に対する応答も同様であり、伸張性運動によって損傷した骨格筋は引き続き同様の運動による損傷を軽減させる（Bymes ら 1985, Clarkson ら 1992, Nosaka ら 2001）。その損傷耐性の増加に関連して、実験 2 において HSP72 発現の増加やコラーゲン蓄積が明らかとなった。HSP72 は、細胞の統合性を保持するために様々な刺激から骨格筋を保護する働きを持ち（Liu ら 2013）、コラーゲンに代表される細胞外マトリクスと筋線維を結合するインテグリンの増加は運動で活性化される mTORC1 シグナルを抑制することが報告されている（Boppart ら 2006）。これらより、損傷後の骨格筋では、損傷していない筋と比較してレジスタンス運動に対する同化応答が抑制される可能性が考えられる。

また、Goodman ら（2012）によると、絶食や協働筋切除による機械的過負荷といった様々な刺激に対する骨格筋の同化応答は筋線維タイプ毎に異なることが報告されている。レジスタンス運動に対する骨格筋の同化応答に関しては、Tannerstedt ら（2009）の報告によると、レジスタンス運動に対する p70S6K リン酸化応答はタイプ II 線維においてタイプ I 線維と比較して有意に高値を示す。よって、損傷していない筋においては、速筋タイプ優位にレジスタンス運動に対する同化応答が増大することが考えられる。一方、一度損傷した筋においては、浅層や深層など部位毎に異なる特性変化が生じているため、各筋線維タイプにおいて異なる変化を示す可能性が考えられる。

本実験では、実験 1 で用いた伸張性収縮プロトコルを用いて損傷を引き起こした骨格筋に対して、伸張性収縮を用いたレジスタンス運動を負荷し、損傷していない筋と比較して同化応答にどのような変化が生じるのかを調べた。

4.2. 方法

4.2.1. 実験動物

本実験は、10 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。すべてのラットは、12 時間の明暗サイクルに管理された飼育室において、餌と水はそれぞれ自由摂取させた。

4.2.2. 実験プロトコル (図 4-1)

ラットを無作為にレジスタンス運動のみを実施する運動群と損傷後にレジスタンス運動を負荷する損傷-運動群の 2 群に分けた。損傷-運動群の右脚腓腹筋に対して 10 週齢時に実験 1, 2 同様の損傷を与え、14 週齢時に両群の同筋に対して単回のレジスタンス運動を負荷した。損傷-運動群における 4 週の間隔は初回の伸張性収縮による筋損傷からの等尺性筋力の回復に要する期間から設定した。14 週齢時のレジスタンス運動の直前または 15 分後、6 時間後において、両群の動物はイソフルラン吸入麻酔薬の過剰投与により屠殺した (各群各時点匹数: $n=6$)。屠殺の際に、筋タンパク質合成速度を測定するために SUnSET 手技を用いた (Ogasawara ら 2014)。Puromycin (Calbiochem, Darmstadt, BRD) を PBS に溶解し、筋サンプルを採取する 12 時間前から絶食とし、15 分前に腹腔内に投与した。右脚腓腹筋の筋腹部位は即座に液体窒素で凍結し、生化学的・組織学的な解析を行うまで -80°C で保管した。

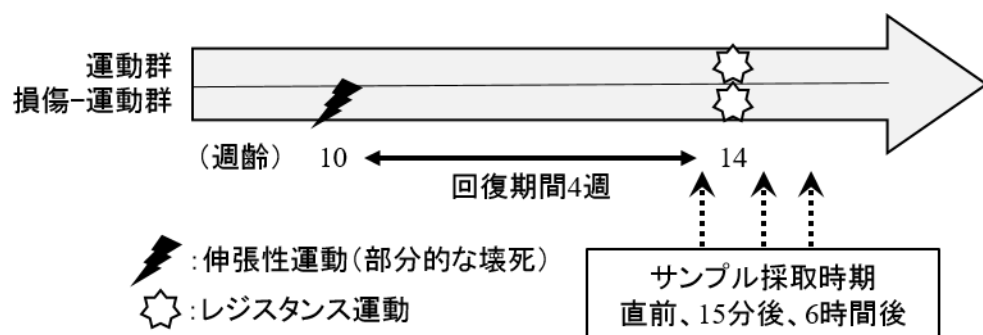


図 4-1. 実験 4 (一度損傷した骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答) プロトコル

4.2.3. レジスタンス運動プロトコル

レジスタンス運動のプロトコルは、実験 3 の 14 週齢時における伸張性収縮と同じである。ラットはイソフルランの吸入投与による麻酔下にて、等速性動力計台に腹臥位で固定し、右脚腓腹筋に対して

電極を介して電気刺激を施した。最大刺激強度は実験 1 同様に設定した。強縮刺激は 100Hz, 4 ミリ秒刺激幅の条件で 2 秒間与えられた。電気刺激と同時に、右足関節は等速性に背屈させ、伸張性収縮を誘導した。強制伸張の速度と範囲は毎秒 30 度、60 度から 120 度（背屈底屈中間位を 90 度とする）とした。この伸張性収縮 1 セットに 10 秒毎に連続 10 回、セット間 3 分で 5 セット実施した。

4.2.4. 生化学的評価

同化応答に関連するタンパク量の測定には、ウェスタンブロッティングを用い、先行研究 (Ogasawara ら 2014, Takagi ら 2016) を参考として作成したプロトコルで実施した。凍結筋サンプルはプロテアーゼインヒビターとホスファターゼインヒビターを含む RIPA バッファーにホモジナイズした。その後、4°C、3 分間、2,000 g で遠心分離し、上清の一部をタンパク質合成速度の測定用サンプルとして採取した。残った上清は再度 4°C、15 分間、20,000 g で遠心分離した。タンパク濃度は RC DC Protein Assay を用いて Lowry 法で測定し、3X サンプルバッファーで調整後、95°C で 5 分間煮沸した。20µg のタンパクを SDS-PAGE に分け、膜に転写した。その後、5% スキムミルク、0.1% Tween-20 を含む TBS で 1 時間、室温でブロッキングし、4°C 下で一晩、各一次抗体：puromycin (MABE343, Millipore, Darmstadt, BRD)、p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹; 9205, Cell Signaling Tehnology)、rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}; 2215, Cell Signaling Technology)、Total rpS6 (2217, Cell Signaling Technology) と反応させた。二次抗体は室温で 1 時間反応させ、化学発光試薬を用いてシグナルを検出した。イメージ画像は Ez-capture ソフトを用いて、シグナルは CS analyzer ソフトを用いて定量化した。画像撮影後、膜は Coomassie Brilliant Blue で染め、タンパクアプライ量を均一化した (Welinder ら 2011)。

ミオシン重鎖の電気泳動は、Tsutaki ら (2013) の方法を参考としてプロトコルを作成し実施した。凍結筋サンプルは、プロテアーゼインヒビター、10% SDS、40mM DTT、5mM EDTA、100mM Tris-HCl (pH 8.0) を含むバッファーを用いてホモジナイズした。その後、4°C、15,490 g で 5 分間遠心分離を実施し、採取した上清のタンパク濃度を TAKARA BCA Protein Assay キット (Takara Bio Inc., 草津, 日本) を用いて bicinchoninic acid assay により測定した。その後、100mM DTT、4% SDS、160mM Tris-HCl (pH 6.8)、43% グリセロール、0.2% bromophenol blue、dH₂O を含むサンプルバッファーで最終濃度 20 ng/µL になるように調整した。電気泳動は、30% グリセロールと 7.5% アクリルアミドより成る分離

ゲルと 30%グリセロール、4%アクリルアミドのスタッキングゲルを用いて、4°C、140 V 定電圧で 18 時間実施した。電気泳動後、ゲルは銀染色 KANTO III (KANTO Chemical Co., Inc., 東京, 日本) を用いて染色し、各バンドは CS analyzer ソフトを用いて定量化した。

4.2.5. 組織学的評価

免疫組織学的観察は実験 2 と同様の方法で実施した (Takagi ら 2016)。中でも、リン酸化タンパクの同定には、Miura ら (2009) の先行研究を参考としてプロトコルを作成し実施した。腓腹筋の凍結切片を即座に-20°Cで 30 分間 100%エタノールを用いて固定し、その後以下の一次抗体と 3%ヤギ血清を含む 0.1 MPB を用いて一晩 4°Cで反応させた : puromycin (MABE343)、rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}; 2215) ミオシン重鎖 I (BA-F8)、ミオシン重鎖 IIa (SC-71)、ミオシン重鎖 IIx (BF-35)、ミオシン重鎖 IIb (BF-F3)。二次抗体は室温で 1 時間反応させ、その後、Goodman ら (2012, 2011) の方法に倣って、染色画像を同一条件で撮影し、グレースケールに変換後、各筋線維のシグナル強度を ImageJ ソフトにより定量化した。腓腹筋横断面における各筋線維タイプのサンプリングは、タイプ IIa, I 線維は全数測定し、タイプ IIb, IIx 線維は少なくとも 1 切片につき 200 本は無作為に選択した。

4.2.6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。群間差は Welch *t* 検定を用いた。免疫組織化学とウエスタンブロットティングの相関関係は Pearson の積率相関係数 (product-moment correlation coefficient) を用いて検定した。その他の検定には二元配置 (過去の損傷×時間) 分散分析後に Bonferroni's *post hoc* 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ に設定した。

4.3. 結果

4.3.1. 筋タンパク質合成

両群ともにレジスタンス運動 6 時間後において、運動前、運動 15 分後と比較して有意に高値を示した (図 4-2)。さらに運動 15 分後、6 時間後において、損傷-運動群は運動群と比較して有意に高値を示した。

4.3.2. mTORC1 シグナル：p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹) と rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244})

mTORC1 の下流標的である p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹) は、両群において運動 15 分後、6 時間後において運動前と比較して有意に高値を示した (図 4-3a)。さらに損傷-運動群は運動 6 時間後において運動 15 分後や運動群の運動 6 時間後と比較して、有意に高値を示した。p70S6K の下流因子である rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) は、運動群において運動 15 分後、6 時間後において運動前と比較して有意に高値を示し、損傷-運動群では運動 6 時間後において運動前、運動 15 分後と比較して有意に高値を示した (図 4-3b)。群間差は運動 15 分後において、運動群が損傷-運動群と比較して有意に高値を示し、運動 6 時間後において、損傷-運動群が運動群と比較して有意に高値を示した。rpS6 の総タンパク量は運動前において、損傷-運動群が運動群と比較して有意に高値を示した。

4.3.3. 各筋線維タイプ特異的な筋タンパク質合成と rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) 応答

ウェスタンブロットティングによる筋タンパク質合成、rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) の各サンプル値と本実験の免疫組織化学による同サンプル値 (横断面全体のシグナル強度) の相関関係を調べたところ、筋タンパク質合成、rpS6 リン酸化ともに正の相関関係を認めた (図 4-4a, b)。

運動前の各筋線維タイプにおける筋タンパク質合成、rpS6 リン酸化値を図 4-4c, d に示す。まず、筋タンパク質合成は、両群ともに以下の順であった：IIb < IIx < IIa < I。さらに、損傷-運動群のタイプ IIa 線維は運動群の同タイプ線維と比較して有意に高値を示した。rpS6 リン酸化においては、両群の平均値が以下の順を示した：IIb, IIx < IIa, I。

レジスタンス運動に対する各筋線維タイプ特異的な筋タンパク質合成と rpS6 リン酸化応答を図 4-

4e, fに示す。まず、筋タンパク質合成における群間差は、損傷-運動群では運動群と比較してタイプ IIxを除く全線維タイプで有意に高値を示した。各群内のタイプ間差は、運動群ではタイプ IIb, x 線維がタイプ IIa, Iと比較して有意に高く、損傷-運動群ではタイプ IIb 線維で他タイプと比較して有意に高く、タイプ IIx がタイプ IIa と比較して有意に高値を示した。次に、rpS6 リン酸化の群間差では、損傷-運動群が、タイプ IIb を除く全筋線維タイプにおいて運動群と比較して有意に高値を示した。各群内のタイプ間差は、運動群、損傷-運動群それぞれで以下の順を示した：I < IIa < IIx < IIb (運動群)、IIb, I < IIx, IIa (損傷-運動群)。

4.3.4. ミオシン重鎖タイプ構成

ミオシン重鎖のタイプ構成比において、損傷-運動群は運動群と比較して運動前における IIa の割合が高く、IIb の割合が低値を示した (図 4-5)。

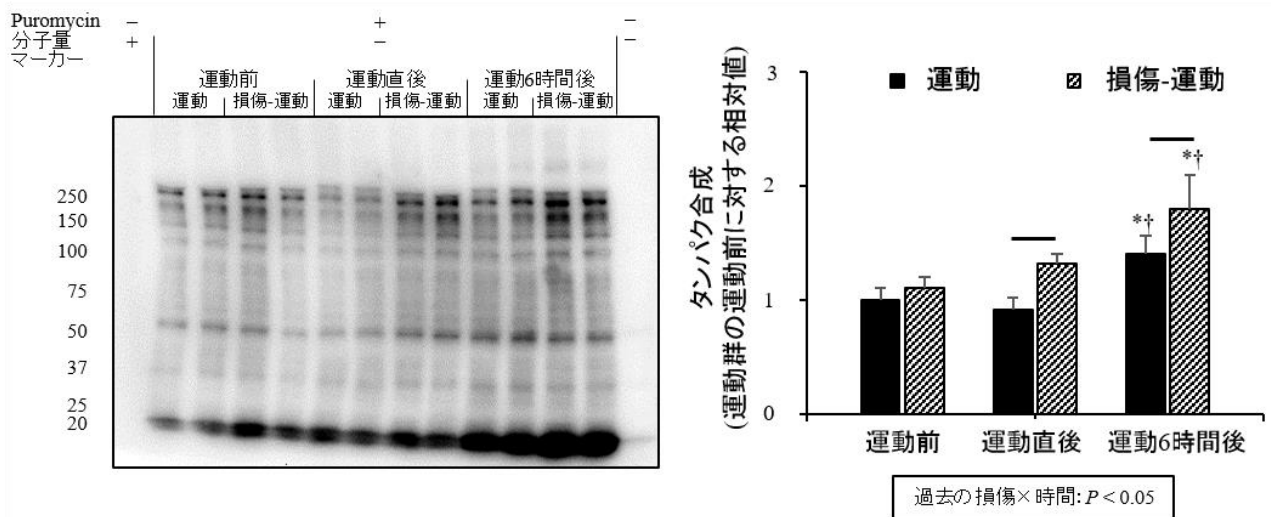


図 4-2. 14 週齢時のレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答の時系列変化.

14 週齢時のレジスタンス運動の直前、15 分後、6 時間後におけるタンパク質合成応答を示す。左の代表的なバンド像において、タンパク質合成は全分子量の値から算出される。各シンボルはそれぞれ次に対する有意差を示す：*, vs. 運動前; †, vs. 運動 15 分後。横棒は群間の有意差を示す。

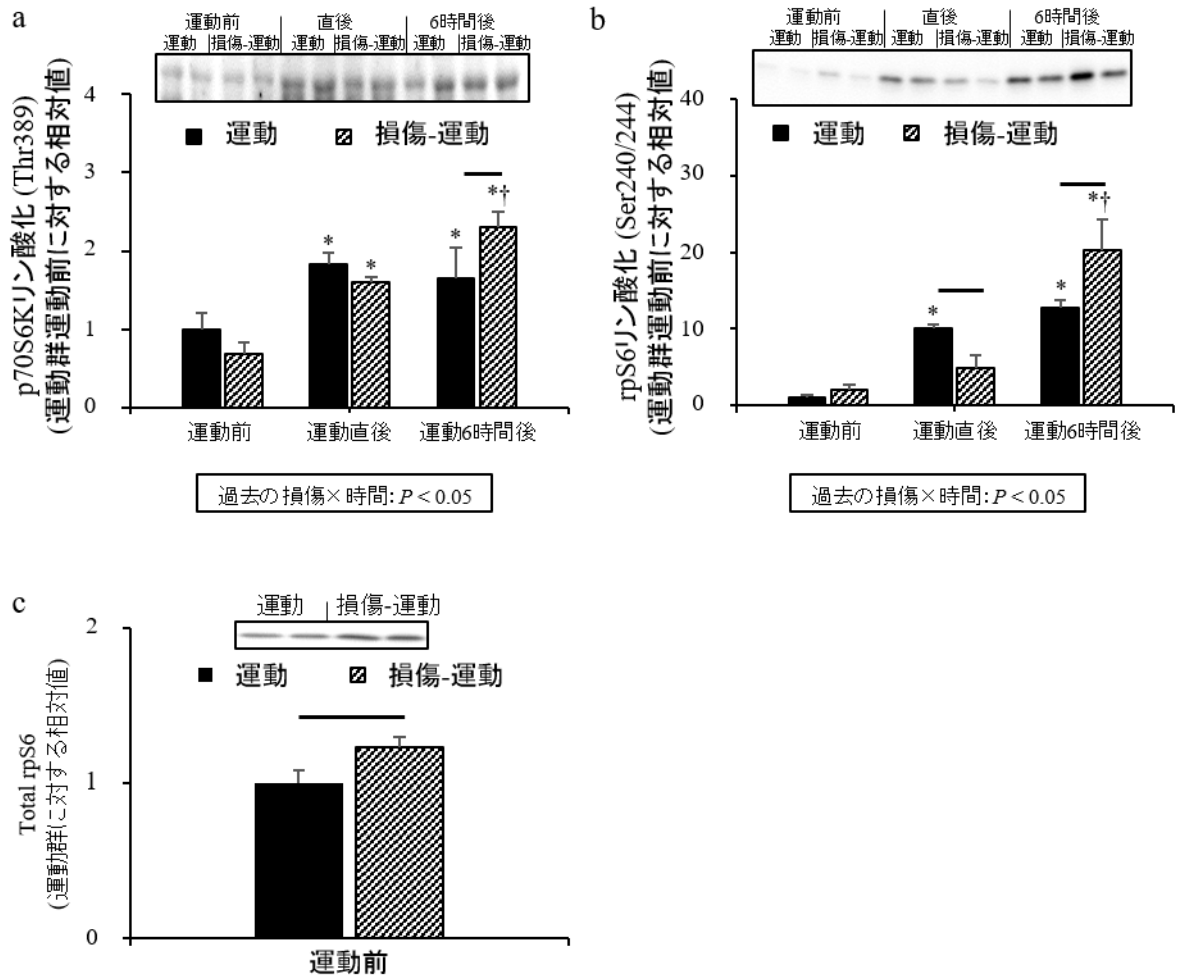
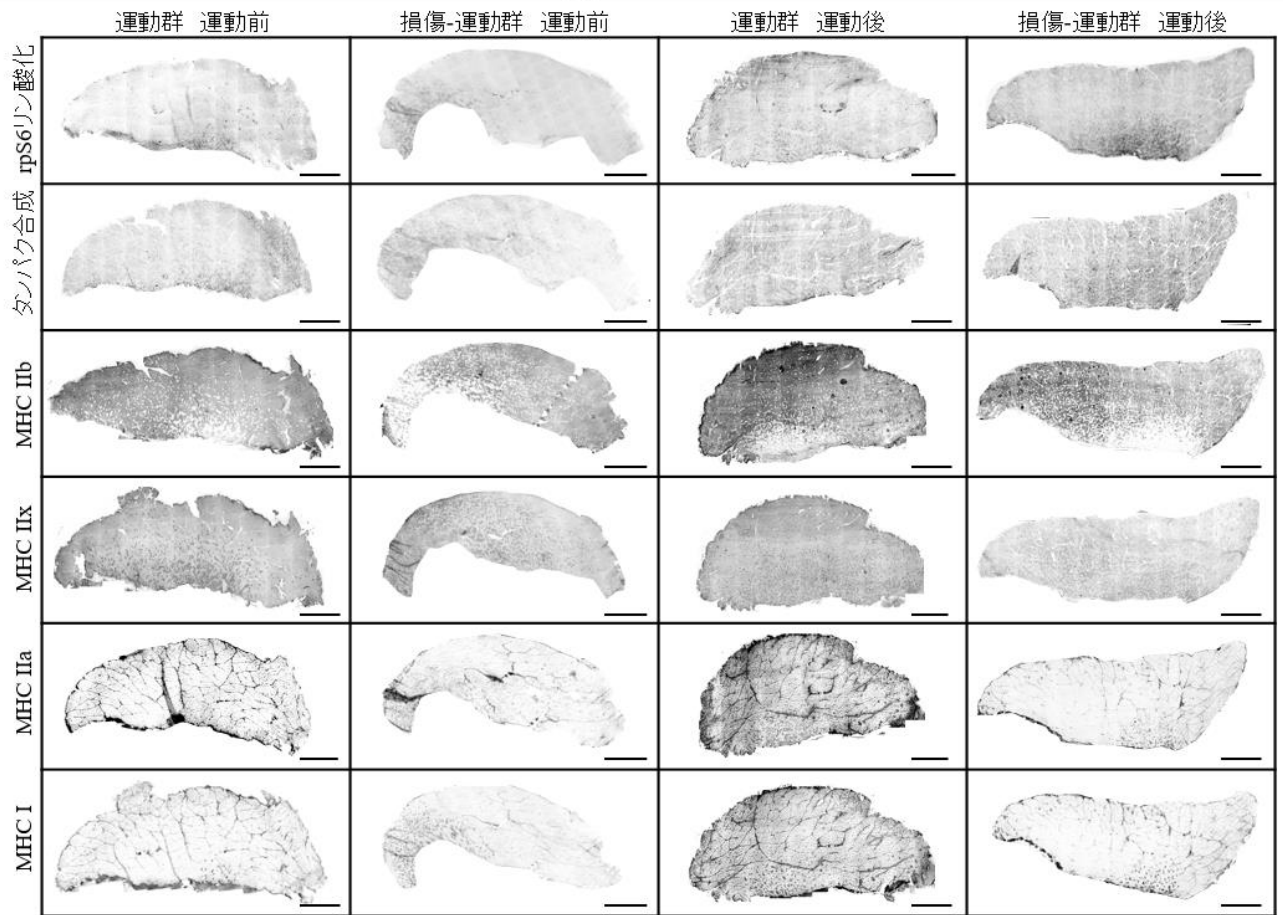


図 4-3. 14 週齢時のレジスタンス運動前後の p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹)、rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244})、運動前の rpS6 Total 量

a, b は、それぞれ 14 週齢時での伸張性収縮前後における p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹)、rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) のタンパク量を示す。c は、14 週齢時でのレジスタンス運動前における rpS6 Total 量を示す。

各シグナルはそれぞれ次に対する有意差を示す：*, vs. 運動前; †, vs. 運動直後. 横棒は群間の有意差を示す。



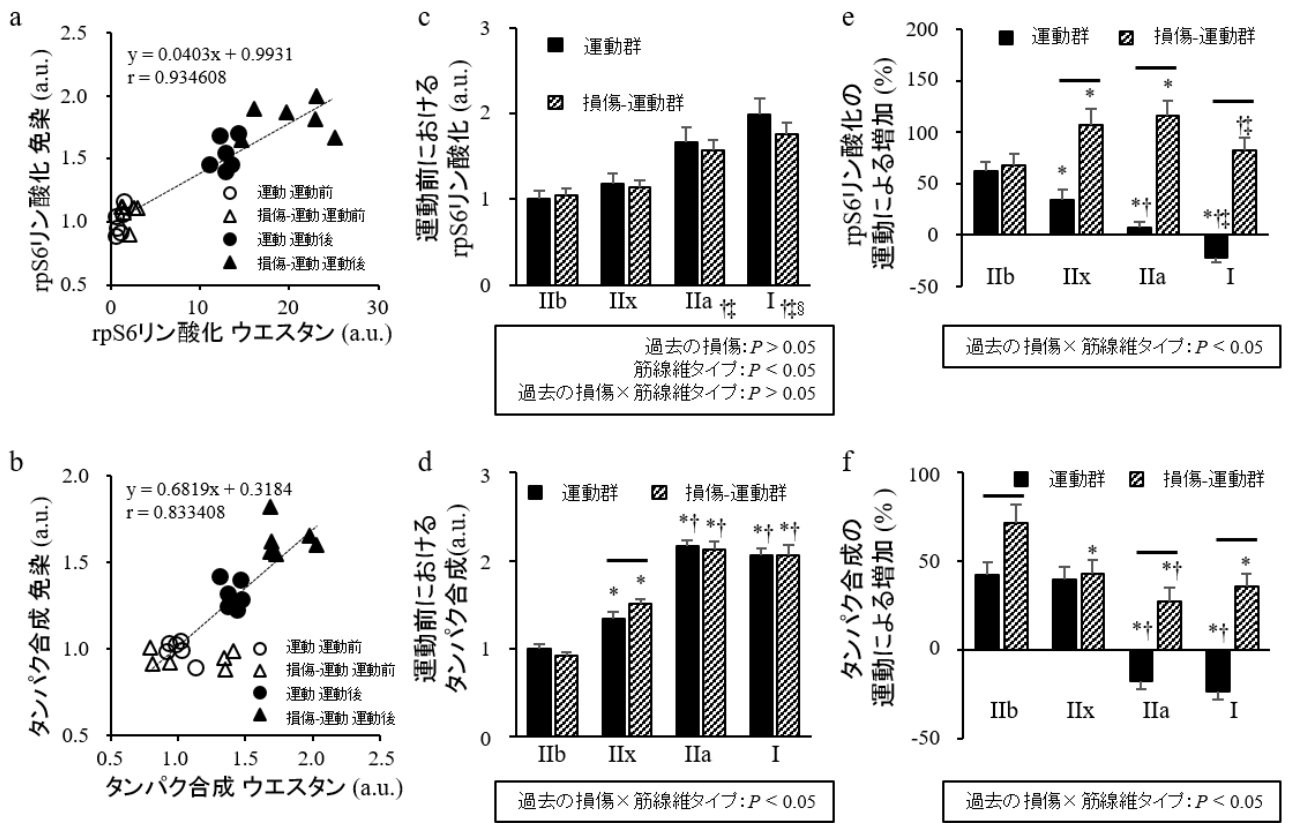


図 4-4. rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) とタンパク質合成における免疫組織化学とウエスタンブロットそれぞれから算出した値の相関関係、筋線維タイプ毎のレジスタンス運動前後の rpS6 リン酸化、タンパク質合成

前頁に代表的な rpS6 リン酸化、タンパク質合成、ミオシン重鎖タイプの免疫組織化学による筋腹部位における横断面の組織像を示す。

a, b : それぞれ rpS6 リン酸化、タンパク質合成におけるウエスタンブロット値と免疫組織化学より定量化した値の相関関係を示す。c, d : それぞれレジスタンス運動前の筋線維タイプ毎の rpS6 リン酸化、タンパク質合成を示す。e, f : それぞれレジスタンス運動 6 時間後における rpS6 リン酸化、タンパク質合成の運動前値に対する比を示す。c では、交互作用を認めず、主効果のみを示す。d, e, f では交互作用を認めた。

各シンボルはそれぞれ次に対する有意差を示す : *, vs. IIb; †, vs. IIx; ‡, vs. IIa. d-f における横棒は群間の有意差を示す。

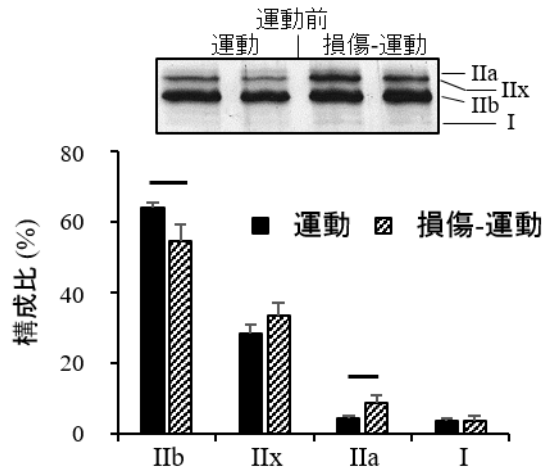


図 4-5. ミオシン重鎖タイプ構成

14 週齢時のレジスタンス運動前における各ミオシン重鎖の構成比を示す。

横棒は群間の有意差を示す。

4.4. 考察

本実験は、過去の損傷がレジスタンス運動に対する骨格筋の同化応答に及ぼす影響を調べた。その結果、一度損傷した筋のレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答は損傷していない筋と比較して有意に高く、また、mTORC1 シグナルの活性も損傷した筋で損傷していない筋と比較して有意に高値を示した。さらに、筋線維タイプ別に同化応答を調べることで、過去の損傷によりタイプ IIb, IIa, I 線維のタンパク質合成応答が増大することが明らかになった。

レジスタンス運動によるタンパク質合成の増加は、運動群において運動 6 時間後に運動前、運動 15 分後と比較して有意に高値を示した。損傷-運動群のタンパク質合成応答に関して、実験 2 より、損傷した筋で増加する HSP72 発現やコラーゲン量によって損傷した筋のレジスタンス運動に対する応答は低減されるという仮説を立てた。しかし、本実験における損傷-運動群は運動 6 時間後において運動群と比較して有意に高値を示した。運動前においては群間差がなかったことから、過去の損傷によってレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答が増大することが示された。

タンパク質合成は、主に mTORC1 シグナルに制御され、シグナルを代表する因子に p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹) が知られている (Laplante ら 2012, Sengupta ら 2010)。p70S6K は翻訳調節に関わる (Marabita ら 2016, Ohanna ら 2005) ことから、本実験では p70S6K リン酸化と p70S6K の下流因子である rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) を調べた。運動群では運動 15 分後、6 時間後において p70S6K リン酸化、rpS6 リン酸化が増加したが、損傷-運動群では運動 6 時間後における p70S6K と rpS6 リン酸化は、運動群と比較して有意に高値を示した。これらの所見は、過去の損傷により運動後の mTORC1 シグナル伝達の活性が増加したことを示す。つまり、本実験における過去の損傷によるタンパク質合成応答の増大も mTORC1 シグナル伝達の活性化に依る可能性が示された。一方で、運動 15 分後における各群の応答において、特に rpS6 リン酸化では運動群において損傷-運動群と比較して有意に高値を示した。運動による同化応答において、筋線維タイプ毎で時間における差異がある可能性が考えられている (Tannerstedt ら 2009)。つまり、実験 2 で示したように、過去の損傷による筋線維タイプ構成の変化が影響している可能性が考えられる。今後、さらに細かなタイムコースにおける応答を観察する必要があると考えられる。

Goodman ら (2012) は、免疫組織化学による解析から筋線維タイプ毎の刺激に対する同化応答は異なることを明らかにした。例えば、協働筋切除による機械的過負荷に対するタンパク質合成応答では、タイプ IIb 線維は他タイプの筋線維と比較して有意に低値を示し、タイプ IIx 線維はタイプ IIa 線維と比較して有意に低値を示した。免疫組織化学による分析に関しては、各サンプルの標準化が困難であり、定量化には問題があると考えられている。しかし、本研究では筋タンパク質合成と rpS6 リン酸化の両方において、免疫組織化学とウェスタンブロットティングの値に良好な相関関係を認めた。これにより、本研究においては筋線維タイプ特異的な応答は信頼できるデータであり、筋全体の応答と対比して考察できると考えられる。

まず、運動群では、レジスタンス運動に対するタンパク質合成応答は以下のタイプ間差を示した：IIa, I < IIb, IIx。同様に rpS6 リン酸化応答も以下のタイプ間差を示した：I < IIa < IIx < IIb。Tannerstedt ら (2009) によると、レジスタンス運動に対する p70S6K リン酸化の応答はタイプ II においてタイプ I と比較して有意に高い。これより、本研究の筋線維タイプ特異的なレジスタンス運動に対する同化応答は、過去の研究報告を支持し、かつより詳細に明示する所見であることが示された。また、損傷していない筋のタイプ IIb, IIx 線維におけるタイプ IIa, I 線維より大きなタンパク質合成応答は、mTORC1 シグナル伝達の活性化に依る可能性が示された。

次に、損傷-運動群のタンパク質合成応答におけるタイプ間差は、タイプ IIb 線維で他タイプと比較して有意に高値を示し、タイプ IIx 線維もタイプ IIa 線維より有意に高値を示した。一方、rpS6 リン酸化応答のタイプ間差は以下の様に示された：IIb, I < IIx, IIa。これは過去の損傷はタンパク質合成応答に対して筋線維タイプ毎に異なる影響を及ぼすことを示す結果である。またメカニズムは不明であるが、損傷後の筋線維タイプ毎の応答において、rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) 応答はタンパク質合成応答と必ずしも一致しなかった。この応答差異の解明には更なる研究が必要と考えられる。

群間差においては、タイプ IIb, IIa, I 線維のタンパク質合成応答は、損傷-運動群において運動群と比較して有意に高値を示し、タイプ IIx, IIa, I 線維の rpS6 リン酸化応答も損傷-運動群において運動群と比較して有意に高値を示した。これらの所見は、損傷によって増加した筋全体のタンパク質合成応答は主にタイプ IIb, IIa, I 線維のタンパク質合成応答の増加に依ることを示す。タイプ IIx 線維においては、レジスタンス運動前の安静時におけるタンパク質合成速度が過去の損傷により高値を示したため、

運動に対する応答に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。また、特にタイプ IIa, I 線維においては、過去の損傷によりタンパク質合成応答が大きく変化したことに関して、筋線維タイプ毎に同化応答を誘発するために必要な運動の量や様式、回数、強度は異なるものと考えられている (Tannerstedt ら 2009)。よって、過去の損傷によるコラーゲン蓄積などを含む骨格筋の組織学的変化が、各筋線維タイプに及ぶ運動刺激に何らかの影響を与えたことが要因の一つとして考えられる。

加えて、実験 2 で示したように、損傷により筋全体における筋線維タイプ構成は変化する。本実験においても、ミオシン重鎖構成は、損傷-運動群で運動群と比較して IIb の割合は有意に低く、一方 IIa の割合は有意に高値を示した。損傷-運動群のレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答において、タイプ IIa 線維はタイプ IIb 線維と比較して有意に低値を示したことから、損傷によるミオシン重鎖構成の変化は筋全体におけるタンパク質合成応答の増加には貢献しない因子であると考えられる。

仮説に反して、レジスタンス運動に対する同化応答が増大したことに関して、本研究で用いたレジスタンス運動は、Boppart ら (2006) の報告を参考にして伸張性収縮によって構成されたプロトコルであり、収縮回数や頻度などの調整による同化応答の差異は明らかになっていない。今後、同様の伸張性収縮を用いて条件を調整した他のプロトコルによる検証や等尺性収縮など他の収縮様式によるレジスタンス運動に対する同化応答を調べ、本実験で観察された応答を検証する必要があるものと考えられる。

まとめると、損傷した骨格筋はタイプ IIb, IIa, I におけるレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答を増大させた。一方、筋線維タイプ特異的な損傷による rpS6 リン酸化応答の変化は、タンパク質合成応答の変化と完全には一致しなかった。また、過去の損傷による単回のレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答への影響が、長期のレジスタンス運動に対する適応、筋肥大にどのような影響を及ぼすかについても、更なる研究による解明が必要である。

4.5. 第4章のまとめ（実験4）

第4章では、実験1-3で得た所見を基に、過去の損傷によるHSP72発現やコラーゲン量の増加から、レジスタンス運動に対する同化応答も抑制されるのではないかと仮説を立て、過去の損傷がレジスタンス運動によるタンパク質合成応答に及ぼす影響について検証した。その結果、以下の所見を得た。

①過去の損傷により、筋全体のレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答は増大し、タンパク質合成の制御に大きく関わるmTORC1シグナルを代表するp70S6Kリン酸化（Thr³⁸⁹）やその下流因子であるrpS6リン酸化（Ser^{240/244}）も同様に応答が増大した。

②上記のレジスタンス運動に対する同化応答を筋線維タイプ毎に調べたところ、過去の損傷はタイプIIb, IIa, I線維におけるレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答を増大させた。しかし、各筋線維タイプのrpS6リン酸化（Ser^{240/244}）応答はタンパク質合成応答と必ずしも一致しないことが明らかとなった。

これらより、過去の損傷はその後のレジスタンス運動に対するタンパク質合成応答をタイプIIb, IIa, I線維において増加させることが示された。また、本実験の結果から長期のレジスタンス運動に対する効果（筋肥大や筋力向上）を単純に推察することは困難であり、この点については更なる検証・実験が必要であると考えられる。

第5章 総合論議

本研究では、筋損傷後の骨格筋に対する適切な運動療法を確立する上で重要と考えられる、損傷した筋の運動に対する応答特性を明らかにすることを目的として取り組んだ。この章では、本研究で定めた研究課題のもと得られた所見を総合的に論議していきたい。

実験1では、骨格筋の損傷に対する生理学的な適応である、引き続き損傷に対する応答低減、を調べる上で必要となる動物モデルの開発を目的とした。本研究では、損傷した筋線維を識別するために、部分的な壊死に至る程度の伸張性収縮を筋損傷として設定した。Leeら(2014)の報告では、部分的な壊死を伴わない程度の伸張性収縮においても神経の機能障害が生じる。つまり、日常生活において広く認められる遅発性筋肉痛を示す筋損傷と本研究の部分的な壊死を伴う筋損傷では、その後の適応や筋の特性変化が異なることが大いに考えられる。部分的な壊死を伴わない程度の筋損傷における引き続き損傷への応答低減メカニズムに関しては、今後の課題であるが、損傷した筋線維の指標として何をを用いるのかについては、筋損傷における分野において統一されていないため、慎重な検証が必要となる。また、1回目において伸張性収縮の程度を弱めた場合、引き続き損傷への応答低減は弱まるということが報告されている(Nosakaら2001)。このような場合、本実験で明らかとなった関連因子も異なる変化を示している可能性があり、損傷の間隔など調整された異なる実験系による検証が必要であろう。いずれにしても本研究で着目したように、損傷した筋線維の変化であるのか、損傷を免れた筋線維の変化であるのか、しっかりと区別して捉えることは損傷筋線維の特性変化を明らかにする上で、非常に有用であることが示された。また、この方法は様々な刺激に対する筋線維タイプ毎の応答に応用できるであろう。

他にも、本実験では、制御された筋収縮を誘発するために麻酔下で経皮的に腓腹筋を電気刺激する方法を用いたために、神経における適応を調べるモデルには適していないことが課題として挙げられる。一度損傷した骨格筋の引き続き損傷への応答低減と神経の適応を調べるためには、能動的運動モデル(Byrnesら1985, Hyldahlら2015)が必要であると考えられるが、一度損傷した筋に対して2回目も同様の刺激を与えることが可能であるかどうかは慎重に検証しなければならない。本研究では、機械的な刺激自体の変化が引き続き損傷への応答低減に関与するという適応とはいえない因子を限り

なく排除することを目的とした。電気刺激と関節運動を組み合わせた収縮様式を調節することができ、足関節のトルク発揮として、機能的な指標を測定することが可能となる。これにより、筋の興奮収縮連関の破綻や収縮タンパク質や構造タンパク質の消失による影響を観察することができるモデルである。実験 1 の結果は、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷への応答低減が、結合組織や筋線維における適応に基づくことを強く支持するものである。本モデルを用いて一度損傷した骨格筋の引き続く損傷への応答低減メカニズムを明らかにした後に、臨床における検証へと発展することが生理学的な適応を適切に理解する上で重要と考えられる。

実験 2 では、一度損傷した骨格筋の引き続く損傷への応答低減を示す骨格筋の特性変化をいくつかの候補を挙げて、その関連性を明らかにした。その中で、最も運動誘発性筋損傷の軽減に関与する可能性が高いと特定された因子が、コラーゲン蓄積である。コラーゲンに代表される細胞外マトリクスが、損傷後の過程において増加することは一般的に「線維化」として捉えられる (Wynn 2008)。損傷後の線維化は、筋損傷の程度が激しいほど顕著に起こる一方 (Stauber 1989)、損傷以外にも加齢や不動など様々な原因によって生じ、骨格筋の正常な機能を損なう機能障害として考えられてきた (Brack 2007, Akpulat 2016)。しかし、近年では、コラーゲン量が増加することと、運動誘発性筋損傷の軽減の間には密接な関連があると報告されており (Hyldahl 2015)、線維化が再生不全の結果生じる単なる機能障害であるのか、それとも他に意義のある適応であるのか、その明確な答えは出ていない。線維化も骨格筋の一種の適応という考え方から本研究の成果を捉えれば、初回の筋損傷が招く損傷ストレスに対する骨格筋の適応として、コラーゲンが増加すると捉えることができる。今後、骨格筋を含む様々な臓器に起こる線維化に対して、その意義や役割を再考する検証がなされることで、より適切な線維化に対する対処・捉え方が確立することが期待される。

次に、本実験モデルでは引き続く損傷への応答低減への関連は大きくない因子として示したが、運動による損傷後の変化として、筋線維タイプの遅筋方向への移行を認めた。仮に、本研究で用いた損傷プロトコルよりも激しい筋損傷 (例えばタイプ I 線維の壊死を生じる程度) を用いれば、タイプ I 線維への移行を含むより大きな遅筋方向への移行を認め、引き続く損傷への応答低減に大きく貢献する因子として筋線維タイプの移行が主因子として捉えることができるかもしれない。筋全体で認めた筋線維タイプの移行に関して、長期の運動介入、特に伸張性収縮を用いた運動では、本研究同様に筋線

維タイプの遅筋方向への移行が報告されているため (Hather ら 1991, Staron ら 1989, Adams ら 1993, Ochi ら 2007)、伸張性収縮が壊死しなかった筋線維に及ぼした影響として考えられる。部分的な壊死を伴わない程度の筋損傷においても神経の損傷は生じるため (Lee ら 2014)、部分的な筋線維の脱神経支配、再神経支配の過程において、筋線維タイプ移行が生じているのかもしれないが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。このように日頃からの運動習慣は、健康や精神面への効果のみならず、損傷の予防としても重要な役割を持つことが考えられるが、その一因に筋線維タイプの変化が挙げられることが明らかとなった。

上記同様に、本研究における引き続き損傷への応答低減への関連性は小さいものと考えられた因子として、HSP72 発現の増加が挙げられる。HSP72 は筋線維タイプ毎に安静時の発現量は異なり (Oishi ら 1998)、筋線維タイプによる耐性の違いに影響するものと考えられる。また、HSP72 は骨格筋が様々なストレスを受けることで、その発現量を増加させる (Liu ら 2003, Shima ら 2008)。本研究のプロトコルでは 1 回目の損傷後 28 日における特性を調べたため、HSP72 増加の関与は小さかった可能性が考えられた。今後の課題でもあるが、損傷後早期の引き続き損傷への応答低減においては、HSP72 発現の増加は損傷を受けやすい腓腹筋浅層において著明に生じる可能性が考えられる。また日頃からの運動習慣は、筋線維タイプの移行のみならず HSP72 発現の高い状態が維持されているのかもしれない。このように、引き続き損傷の時期や損傷の頻度によっては HSP72 発現の増加が損傷軽減に貢献する主因子である可能性が考えられる。

このように各因子の損傷軽減に対する貢献は、損傷の程度や損傷後の時期により、大きく異なる可能性が考えられる。また、本研究によって明らかにされなかった他の因子 (一度損傷した筋における損傷軽減に関わる特性) の影響もあるだろう。このように今後、一度損傷した骨格筋の特性を網羅的に調べる必要があるかもしれない。それらの成果は、更なる一度損傷した筋の生理学的な適応を明らかにして、その適応メカニズムを応用した方法が臨床適用へと発展されることが期待される。

実験 3 では、一度損傷した骨格筋の引き続き損傷への応答低減メカニズムの一端を示唆する所見を得たが、実際にコラーゲンがどのようにその応答低減に関与しているか更なる検証が必要である。引き続き損傷への応答低減は、1 回目の損傷後数日から数か月の範囲で認めることが報告されており (Byrnes ら 1985, Clarkson ら 1992, Nosaka ら 2001)、本研究で作製した動物モデルでは続く損傷の間

隔を4週間としている。慢性的にストレスを受ける場合、線維化はもとに戻らないが、一過性の損傷ストレスに対する線維化は骨格筋の適応能から徐々に戻る可能性があることから、損傷後後期における引き続き損傷への応答低減においては、コラーゲン蓄積は有力な候補として考えられる。今後、損傷した筋の線維化の状態を時系列的に追っていくことで、線維化の程度が引き続き損傷への応答低減の程度と関連するのであれば、その応答低減への有力な貢献因子として支持する確かな根拠となるだろう。

本研究では損傷経路の初期の重要な因子であるカルシウムイオンが関与する因子の変化が明らかになったが、これまで述べてきたようにまだ明らかにされていない他の適応因子（一度損傷した筋の特性変化）の貢献などが考えられる。よって、伸張性収縮という刺激から筋の部分的な壊死、筋力低下が生じるまでの損傷経路に関するより詳細な調査が必要であると考えられる。それらの所見は、それぞれの損傷関連因子が、どのような直接的、間接的な影響を及ぼしているかを示す重要な所見であり、それらからどの程度の損傷軽減効果が損傷経路のどの部分に生じているかが明らかになることが期待される。

また、筋損傷の軽減に着目したことで細胞内カルシウムイオン濃度への影響を示唆する結果を得たが、他の観点から考えれば、過去の損傷はカルシウムイオン以外にも他のイオン動態に影響を及ぼす可能性が考えられる。それらは、筋損傷以外にも筋疲労耐性などの本研究で指標とした機能以外の筋機能に何らかの影響を及ぼすことが考えられる。筋線維タイプ移行も生じているため、結果の解釈には注意が必要ではあるが、今後、この点についても筋の機能評価を詳細に調べることで損傷した筋の特性を広角的に捉えることができるだろう。

実験4では、実験1-3で明らかとなった損傷した骨格筋の引き続き損傷への応答低減メカニズムを基に、一度損傷した骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答を調べた。引き続き損傷に対する応答低減を損傷ストレスへの感受性低下、または恒常性維持能の向上として捉えられることができるのであれば、筋肥大・筋力向上を引き起こす同化応答の増大を目的としたレジスタンス運動に対しても、感受性低下、恒常性維持によるネガティブな影響が及ぶのではないかと仮説を立てた。結果は、仮説に反して、筋タンパク質合成を主とするレジスタンス運動に対する同化応答は過去の損傷により増大した。実験3では運動による損傷において大きな役割を持つカルパイン分解系への影響を調べ、引き

続く損傷時には分解系の活性が抑制されることを示した。今後、刺激強度を変えた更なる検証が必要ではあるが、これらの示された現象だけから考えると、損傷した骨格筋は引き続き損傷ストレスに対する感受性低下、耐性向上を示す一方、適度な運動ストレスに対しては、感受性の増大を示すといった、非常に興味深い適応を示すものと捉えることができるだろう。

上記のレジスタンス運動に対する同化応答においても、実験 2 同様に筋線維タイプ、部位毎に詳細に調べた結果、筋線維タイプや部位による偏りなく、全体的な同化応答の増大を認めた。つまり、コラーゲン蓄積や筋線維タイプ移行、HSP72 発現の増加といった一度損傷した筋の特性変化は、筋損傷を代表とする異化応答は抑制するものの (Lapier ら 1985, Hyldahl ら 2015, Lieber ら 1988, Lieber ら 1991, Liu ら 2013, Shima ら 2008)、タンパク質合成を主とする同化応答にはそれほど大きな影響は及ぼさないことが考えられる。運動に対する異化応答と同化応答の経路において、両者に共通する因子や相互関係は十分に明らかになっておらず、本研究の成果を考察することが難しい。今後、運動刺激のストレス量を調整した実験系による検証で、同化・異化応答の変化がどのように関連しているのかを調べて、両者に関連する因子や関係性を明らかにする糸口をつかむ必要がある。

また実験 4 の考察における課題においても触れたが、これら過去の損傷がレジスタンス運動に対する骨格筋の同化応答に及ぼす影響は、直接長期の運動介入に対する適応、筋肥大と結びつけることは困難である。本研究で着目した損傷に対する生理学的な適応からも言えることではあるが、同程度の刺激を繰り返し与えることは、骨格筋の恒常性の維持から応答低減を招く結果となるだろう。よって、単回のレジスタンス運動に対する骨格筋の応答を明らかにするだけでは、長期のレジスタンス運動に対する骨格筋の適応、筋肥大の程度を予想することは困難である。この課題を解決するために、等尺性収縮による筋収縮などの他の刺激に対する応答を調べることや、繰り返し時の応答変化を明らかにしていく必要があるだろう。

さらに筋タンパク質合成の増加において、重要と考えられている mTORC1 シグナル伝達の活性も、いくつかの先行研究でも触れられているが、タンパク質合成応答と相関関係を認めない結果となった。p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹) 抗体を用いた免疫組織化学による筋線維タイプ毎の応答検証も必要と考えられるが、技術的な問題が解決されず、実施に至っていない。また、mTORC1 シグナル伝達とタンパク質合成応答の時間差異も考慮に入れ、複数の時点における検証も必要と考えられる。mTORC1 以外

の重要な未知のシグナル経路が存在するのかもしれないが、今回の様に各筋線維タイプ毎に調べる手法はその解決に大きく役立つことが期待される。

また本研究で用いた部分的な壊死を伴う筋損傷ではなく、軽損傷後のレジスタンス運動効果は本実験4と異なる結果が得られるものと考えられる。他にも、臨床における筋損傷後に大きな問題となる運動を再開するタイミングに関連して、筋損傷後早期のレジスタンス運動に対する骨格筋の応答も明らかになっていない。損傷の程度と損傷からの経過時間により、損傷した筋の特性がどのように変化するのか、基礎的な理解を得るためにも、今後更なる検証が必要になると考えられる。

このように本研究により明らかになった所見から更なる課題が多く見出された。これらの課題を一つ一つ検証し、明らかにすることで、損傷後の生理学的応答メカニズムや損傷した筋の特性、運動に対する応答変化の真相に近づき、本研究の目的である骨格筋の損傷後における運動療法や電気療法など様々な介入を適切に行うための指針を確立することができるものと期待される。

第6章 総括

本研究の目的は、筋損傷からの回復を促進する適切な運動療法の確立を図る上で、必要不可欠な一度損傷した骨格筋の運動に対する応答特性に関する知見を得ることである。主に実験 1-3 では、一度損傷した筋の損傷に対する応答低減メカニズムに関して、実験 4 では一度損傷した筋のレジスタンス運動に対する同化応答に関して取り組んだ。以下に得られた所見についてまとめる。

本実験 1-3 で得られた所見から、骨格筋の生理学的な適応において、過去の損傷によって増加したコラーゲンや変化した筋線維タイプ構成により、伸張性収縮に伴う細胞内カルシウムイオン濃度上昇が抑制されることが示唆された。これは、損傷を予防するプレコンディショニングとして、そのまま実践に応用できるものではないが、今後の研究課題を明らかにし、着実に損傷予防に関わる新たな所見を得ることに成功している。また損傷後の線維化に対する機能障害としての従来への捉え方のみだけでなく、線維化も一種の生理学的な適応であるという捉え方を支持する所見は非常に価値のあるものであると考えられる。

実験 4 で得られた一度損傷した筋のレジスタンス運動に対する同化応答に関する所見は、過去の損傷が引き続く損傷から筋を保護する一方で、レジスタンス運動に対するタンパク質合成応答は全体的に増大させるという非常に興味深い結果であった。まず、過去の損傷によるタンパク質合成応答の増大に関して、本研究で用いた運動は伸張性収縮により成り立っており、他の等尺性収縮や短縮性収縮と比較して、強度は強いものである。負荷の大きさと同化応答の関係は不明な点が未だ多いものの、本研究の同化応答にその収縮様式による負荷の違いが影響している可能性もあり、今後、等尺性収縮などを用いたレジスタンス運動による検証が必要であろう。しかし、本研究の成果は臨床におけるトレーニング処方に再考の機会を投じる貴重な所見である。例えば、損傷側と非損傷側で同様のプログラムで運動を負荷した場合、本研究の成果から損傷側と非損傷側では異なる応答、つまりトレーニング効果が異なるということである。これは、本来得たい運動効果と実際の運動効果が異なるだけでなく、その応答差異は長期の適応を変化させ、身体機能の不均衡を生む危険性がある。その不均衡はパフォーマンス力にも影響するばかりか、運動負荷の偏位を生じ、偏った疲労の蓄積や過負荷側の損傷、障害に繋がる危険性も考えられる。今後、損傷側に適切な運動プロトコルの開発が望まれるが、まだ

基礎メカニズムは明らかになっておらず、今後の重要課題として挙げられる。

このように本実験 1-4 で得られた損傷の基礎メカニズムと生理学的な適応、損傷後の運動に対する応答に関する所見は、生理学的応答の基礎を理解する一助にはなっているが、依然として不明な部分を多く残している。今後、本研究から生まれた新たな課題に取り組むことで、プレコンディショニングや運動療法における具体的な処方など臨床応用に向けた貢献や基礎生理学に繋がる基礎メカニズムの解明が期待される。

謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院 総合文化研究科 石井 直方 教授、名古屋工業大学大学院 生命・応用科学専攻 小笠原 理紀 准教授に深甚なる謝意を表します。また本研究において、ご指導を賜りました日本体育大学大学院 体育科学研究科 中里 浩一 教授、健康科学・スポーツ医科学系 蔦木 新 助教、日本学術振興会 特別研究員 田村 優樹さん、また、本稿の作成に際して御校閲賜りました東京大学大学院 総合文化研究科 八田 秀雄 教授、福井 尚志 教授、久保 啓太郎 准教授、寺田 新 准教授に心から感謝の意を表します。さらに、研究に際しご協力頂いた石井研究室、中里研究室の皆様にも心から御礼申し上げます。

引用文献

- Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 74:911-915.
- Akpolat U, Onbasilar I, Kocaefe YC (2016) Tenotomy immobilization as a model to investigate skeletal muscle fibrosis (with emphasis on Secreted frizzled-related protein 2). *Physiol Genomics* 48:397-408.
- Allen DG, Whitehead NP, Yeung EW (2005) Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *J Physiol* 567:723-735.
- Armstrong R (1990) Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 22:429-435.
- Association of chartered Physiotherapists in Sports Medicine. Guidelines for the management of soft tissue (musculoskeletal) injury with Protection, Rest, Ice, Compression and Elevation (PRICE) during the first 72 hours. Chartered Society of Physiotherapy Guidelines 1998.
- Baar K, Esser K (1999) Phosphorylation of p70(S6K) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol* 276:120-127.
- Badalamente MA, Stracher A (2000) Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve* 23:106-111.
- Balnave CD, Allen DG (1995) Intracellular calcium and force in single mouse muscle fibres following repeated contractions with stretch. *J Physiol* 488:25-36.
- Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S et al (2012) Treatment of skeletal muscle injury: a review. *ISRN Orthop* [Internet]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/689012/>. doi:10.5402/2012/689012.
- Barbier J, Popoff MR, Molgó J (2004) Degeneration and regeneration of murine skeletal neuromuscular junctions after intramuscular injection with a sublethal dose of Clostridium sordellii lethal toxin. *Infect Immun* 72:3120-3128.
- Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA (1998) Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem* 179:135-145.
- Biolo G., Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR (1995) Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 268:514-520.

- Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR (1997) An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol* 273:122–129.
- Bobbert MF, Hollander AP, Huijing PA (1986) Factors in delayed onset muscular soreness of man. *Med Sci Sports Exerc* 18:75-81.
- Boppart MD, Burkin DJ, Kaufman SJ (2006) Alpha7beta1-integrin regulates mechanotransduction and prevents skeletal muscle injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:1660-1665.
- Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA (2007) Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increased fibrosis. *Science* 317:807-810.
- Branca D, Gugliucci A, Bano D, Brini M, Carafoli E (1999) Expression, partial purification and functional properties of the muscle-specific calpain isoform p94. *Eur J Biochem* 265:839-846.
- Brook MS, Wilkinson DJ, Mitchell WK, Lund JN, Szewczyk NJ, Greenhaff PL, Smith K, Atherton PJ (2015) Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training, matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling. *FASEB J* 29:4485-4496.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Andres MW, Sheu SS (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:817-833.
- Brooks SV, Faulkner JA (1996) The magnitude of the initial injury induced by stretches of maximally activated muscle fibres of mice and rats increases in old age. *J Physiol* 497:573-580.
- Butterfield TA, Herzog W (2006) The magnitude of muscle strain does not influence serial sarcomere number adaptations following eccentric exercise. *Pflugers Arch* 451:688-700.
- Byrnes WC, Clarkson PM, White JS, Hsieh SS, Frykman PN, Maughan RJ (1985) Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. *J Appl Physiol* 59:710-715.
- Chesley A, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Atkinson SA, Smith K (1992) Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. *J Appl Physiol* 73:1383-1388.
- Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE (1998) Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 30:1603-1607.
- Clarkson PM, Nosaka K, Braun B (1992) Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid

adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 24:512-520.

Clarkson PM, Tremblay I (1988) Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J Appl Physiol* 65:1-6.

Cohen N, Kudryashova E, Kramerova I, Anderson LV, Beckmann JS, Bushby K, Spencer ML (2006) Identification of putative in vivo substrate of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics* 6:6075-6084.

Croisier JL, Forthomme B, Namurois MH, Vanderthommen M, Crielaard JM. (2002) Hamstring muscle strain recurrence and strength performance disorders. *Am J Sports Med* 30:199-203.

Diaz BG, Moldoveanu T, Kuiper MJ, Campbell RL, Davies PL (2004) Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J Biol Chem* 279:27656-27666.

Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB (2006) Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol* 576: 613-624.

Duncan CJ (1978) Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* 34:1531-1535.

Duncan CJ, Jackson MJ (1987) Different mechanisms mediate structural changes and intracellular enzyme efflux following damage to skeletal muscle. *J Cell Sci* 87:183-188.

Feit H, Kawai M, Mostafapour AS (1989) The role of collagen crosslinking in the increased stiffness of avian dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 12:486-492.

Fradkin AJ, Gabbe BJ, Cameron PA (2006) Does warming up prevent injury in sport? The evidence from randomized controlled trials? *J Sci Med Sport* 9:214-220.

Friden J, Kjorell U, Thornell L (1984) Delayed muscle soreness and cytoskeletal alterations: an immunocytological study in man. *Int J Sports Med* 5:15-18.

Gissel H, Clausen T (2003) Ca²⁺ uptake and cellular integrity in rat EDL muscle exposed to electrostimulation, electroporation, or A23187. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:132-142.

Gissel H, Clausen T (2001) Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol Scand* 171:327-334.

- Goldberg AL, Etlinger JD, Goldspink DF, Jablecki C (1975) Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med Sci Sports* 7:185-198.
- Golden C, Dudley G (1992) Strength after bouts of eccentric or concentric actions. *Med Sci Sports Exerc* 24:926-933.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83:731-801.
- Goodman CA, Kotechi JA, Jacobs BL, Hornberger TA (2012) Muscle fiber type-dependent differences in the regulation of protein synthesis. *PLoS One* 7:e37890.
- Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, Hornberger TA (2011) Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J* 25:1028-1039.
- Greenhaff PL, Karagounis L, Peirce N, Simpson EJ, Hazell M, Layfield R, Wackerhaque H, Smith K, Atherton P, Selby A, Rennie MJ (2008) Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:595-604.
- Guharay F, Sachs F (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352:685-701.
- Hamer PW, McGeachie JM, Davies MJ, Grounds MD (2002) Evans Blue Dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat* 200:69-79.
- Hamill OP, McBride DW Jr (1996) The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev* 48:231-252.
- Hather BM, Tesch PA, Buchanan P, Dudley GA (1991) Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiol Scand* 143:177-185.
- Haws CM, Lansman JB (1991) Developmental regulation of mechanosensitive calcium channels in skeletal muscle from normal and mdx mice. *Proc Biol Sci* 245:173-177.
- Head SI, Williams DA, Stephenson DG (1992) Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 248:163-169.
- Herbert RD, Gabriel M (2002) Effects of stretching before and after exercising on muscle soreness and risk of

injury: systematic review. *BMJ* [Internet]. Available from: <http://www.bmj.com/content/325/7362/468>. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7362.468>.

Highman B, Altland PD (1963) Effects of exercise and training on serum enzyme and tissue changes in rats. *Am J Physiol* 205:162-166.

Hornberger TA (2011) Mechanotransduction and the regulation of mTORC1 signaling in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1267-1276.

Hortobagyi T, Houmard J, Fraser D, Dudek R, Lambert J, Tracy J (1998) Normal forces and myofibrillar disruption after repeated eccentric exercise. *J Appl Physiol* 84:492-498.

Howatson G, van Someren KA (2008) The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 38:483-503.

Howl JD, Publicover SJ (1990) Permeabilisation of the sarcolemma in mouse diaphragm exposed to Bay K 8644 in vitro: time course, dependence on Ca²⁺ and effects of enzyme inhibitors. *Acta Neuropathol (Berl)* 79:438-443.

Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84:822-832.

Hyldahl RD, Hubal MJ (2014) Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. *Muscle Nerve* 49:155-170.

Hyldahl RD, Nelson B, Xin L et al (2015) Extracellular matrix remodeling and its contribution to protective adaptation following lengthening contractions in human muscle. *FASEB J* 29:2894-2904.

Kano Y, Masuda K, Furukawa H, Sudo M, Mito K, Sakamoto K (2008) Histological skeletal muscle damage and surface EMG relationships following eccentric contractions. *J Physiol Sci* 58:349-355.

Kanzaki K, Kuratani M, Matsunaga S, Yanaka N, Wada M (2014) Three calpain isoforms are autolyzed in rat fast-twitch muscle after eccentric contractions. *J Muscle Res Cell Motil* 35:179-189.

Kasuga N, Ishido M, Suzuki H, Yuki A (2010) Characteristic of muscle fiber after type transformation. *Bulletin of Aichi University of Education* 59:35-41.

Kelley G (1996) Mechanical overload and skeletal muscle fiber hyperplasia: a meta-analysis. *J Appl Physiol* 81:1584-1588.

- Kinbara K, Ishiura S, Tomioka S, Sorimachi H, Jeong SY, Amano S, Kawasaki H, Kolmerer B, Kimura S, Labeit S, Suzuki K (1998) Purification of native p94, a muscle-specific calpain and characterization of its autolysis. *Biochem J* 335:589-596.
- Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E (1984) Collagen of slow and fast twitch muscle fibres in different types of rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 52:235-242.
- Lapier TK, Burton HW, Almon R, Cerny F (1995) Alterations in intramuscular connective tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. *J Appl Physiol* 78:1065-1069.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274-293.
- Lee K, Kouzaki K, Ochi E, Kobayashi K, Tsutaki A, Hiranuma K, Kami K, Nakazato K (2014) Eccentric contractions of gastrocnemius muscle-induced nerve damage in rats. *Muscle Nerve* 50:87-94.
- Lieber RL, Fridén J (1988) Selective damage of fast glycolytic muscle fibers with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. *Acta Physiol Scand* 133:587-588.
- Lieber RL, Fridén J (1999) Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. *J Sci Med Sport* 2:253-265.
- Lieber RL, Ward SR (2013) Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 305:241-252.
- Lieber RL, Woodburn TM, Fridén J (1991) Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain. *J Appl Physiol* 70:2498-2507.
- Lima LC, Denadai BS (2015) Attenuation of eccentric exercise-induced muscle damage conferred by maximal isometric contractions: a mini review. *Front Physiol* 6:300.
- Liu CC, Lin CH, Lin CY, Lee CC, Lin MT, Wen HC (2013) Transgenic overexpression of heat shock protein 72 in mouse muscle protects against exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage. *J Formos Med Assoc* 112:24-30.
- López B, Querejeta R, González A, Larman M, Díez J (2012) Collagen cross-linking but not collagen amount associates with elevated filling pressures in hypertensive patients with stage C heart failure: potential role of lysyl oxidase. *Hypertension* 60:677-683.
- Lovering RM, De Deyne PG (2004) Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:230-238.

- Lovering RM, Roche JA, Bloch RJ, De Deyne PG (2007) Recovery of function in skeletal muscle following 2 different contraction-induced injuries. *Arch Phys Med Rehabil* 88:617-625.
- Luthi J, Howald H, Claassen H, Rosler K, Vock P, Hoppeler H (1986) Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise. *Int J Sports Med* 7:123-127.
- Lynn R, Talbot JA, Morgan DL (1998) Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *J Appl Physiol* 85:98-104.
- Mackey AL, Brandstetter S, Schjerling P, Bojsen-Moller J, Qvortrup K, Pedersen MM, et al. (2011) Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *FASEB J* 25:1943-1959.
- Malliaropoulos N, Papalexandris S, Papalada A, Papacostas E (2004) The role of stretching in rehabilitation of hamstring injuries: 80 athletes follow-up. *Med Sci Sports Exerc* 36:756-759.
- Marabita M, Baraldo M, Solagna F, Ceelen JJ, Sartori R, Nolte H, Nemazanyy I, Pyronnet S, Kruger M, Pende M, Blaauw B (2016) S6K1 is required for increasing skeletal muscle force during hypertrophy. *Cell Rep* 17: 501-513.
- Margaritelis NV, Theodorou AA, Baltzopoulos V, Maganaris CN, Paschalis V, Kyparos A, Nikolaidis MG (2015) Muscle damage and inflammation after eccentric exercise: can the repeated bout effect be removed? *Physiol Rep* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26660557>. doi:10.14814/phy2.12648.
- Martineau LC, Gardiner PF (2001) Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *J Appl Physiol* 91:693-702.
- Mason RP, Walter MF, Mason PE (1997) Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med* 23:419-425.
- Matsuura T, Li Y, Giacobino JP, Fu FH, Huard J (2007) Skeletal muscle fiber type conversion during the repair of mouse soleus: potential implications for muscle healing after injury. *J Orthop Res* 25:1534-1540.
- Mayhew DL, Kim JS, Cross JM, Ferrando AA, Bamman MM (2009) Translational signaling responses preceding resistance training-mediated myofiber hypertrophy in young and old humans. *J Appl Physiol* 107:1655-1662.
- McBride TA (2003) Stretch-activated ion channels and c-fos expression remain active after repeated eccentric bouts. *J Appl Physiol* 94:2296-2302.

- McHugh MP (2003) Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sport* 13:88-97.
- McHugh MP, Connolly DA, Eston RG, Gleim GW (1999) Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. *Sports Med* 27:157-170.
- Miura K, Teraishi T (2009) *In situ* detection of physiologically phosphorylated protein (Seiriteki na Tanpakusitsu no Rinsanka no Genichi deno Kenshutsu). *Seikagaku* 81:619-622.
- Moopanar TR, Allen DG (2005) Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺-sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J Physiol* 564:189-199.
- Morgan DL (1990) New insight into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophys J* 57:209-221.
- Morgan DL, Allen DG (1999) Early events in stretch-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 87:2007-2015.
- Murakami I, Nishihira Y, Numata O, Takemasa T (2015) The effect of exercise following muscle injuries on healing process. *Bull Facul Health & Sci, Univ. of Tsukuba* 38:149-152.
- Murphy RM, Lamb GD (2009) Endogenous calpain-3 activation is primarily governed by small increases in resting cytoplasmic [Ca²⁺] and is not dependent on stretch. *J Biol Chem* 284:7811-7819.
- Murphy RM, Snow RJ, Lamb GD (2006) μ -Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:116-122.
- Nosaka K. Exercise-induced muscle damage and delayed onset muscle soreness (2011) In: Cardinale M, Newton R, and Nosaka K, editors. *Strength and Conditioning: Biological Principles and Practical Applications*. Chichester: Wiley-Blackwell 179-192.
- Nosaka K, Clarkson PM (1995) Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 27:1263-1269.
- Nosaka K, Sakamoto K, Newton M, Sacco P (2001) The repeated bout effect of reduced-load eccentric exercise on elbow flexor muscle damage. *Eur J Appl Physiol* 85:34-40.
- Ochi E, Hirose T, Hiranuma K, Min SK, Ishii N, Nakazato K (2010) Elevation of myostatin and FOXOs in prolonged muscular impairment induced by eccentric contractions in rat medial gastrocnemius muscle. *J Appl Physiol* 108:306-313.

Ochi E, Nakazato K, Ishii N (2007) Effects of eccentric exercise on joint stiffness and muscle connectin (titin) isoform in the rat hindlimb. *J Physiol Sci* 57:1-6.

Ochi E, Nakazato K, Song H, Nakajima H (2008) Aging effects on passive resistive torque in the rat ankle joint after lengthening contractions. *J Orthop Sci* 13:218-224.

Ogasawara R, Kobayashi K, Tsutaki A, Lee K, Abe T, Fujita S, Nakazato K, Ishii N (2013) mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 114:934-940.

Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S (2014) The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306:1155-1162.

Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A, Pende M (2005) Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7:286-294.

Ojima K, Kawabata Y, Nakao H, Nakao K, Doi N, Kitamura F, Ono Y, Hata S, Suzuki H, Kawahara H, Bogomolovas J, Witt C, Ottenheijm C, Labeit S, Granzier H, Toyama-Sorimachi N, Sorimachi M, Suzuki K, Maeda T, Abe A, Aiba A, Sorimachi H (2010) Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J Clin Invest* 120:2672-2683.

Oishi Y, Ishihara A, Ifuku H, Taniguchi K, Matsumoto H (1998) Fiber type specific distribution of stress proteins in rat skeletal muscle. *Tairyoku kagaku* 47:87-92.

Ono Y, Kakinuma K, Torii F, Irie A, Nakagawa K, Labeit S, Abe K, Suzuki K, Sorimachi H (2004) Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J Biol Chem* 279:2761-2771.

Paul AC, Rosenthal N (2002) Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 156:751-760.

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3710-3714.

Phillips SM (2004) Protein requirements and supplementation in strength sports. *Nutrition* 20:689-695.

Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR (1997) Mixed muscle protein synthesis and breakdown

after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 273:99-107.

Pierrynowski M, Tudus P, Plyley M (1987) Effects of downhill or uphill training prior to a downhill run. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56:668-672.

Reich TE, Lindstedt SL, LaStayo PC, Pierotti DJ (2000) Is the spring quality of muscle plastic? *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol* 278:1661-1666.

Ronghua W, Yingying Y, Jian Y, Yan L, Jianmei Z, Mei L (2015) Calpain 3 expression pattern during gastrocnemius muscle atrophy and regeneration following sciatic nerve injury in rats. *Int J Mol Sci* 16:26927-26935.

Sacco P, Jones D (1992) The protective effects of damaging eccentric exercise against repeated bouts of exercise in the mouse tibialis anterior muscle. *Exp Physiol* 77:757-760.

Safran MR, Seaber AV, Garrett Jr WE (1989) Warm-up and muscular injury prevention. *Sports Med* 8:239-249.

Salvini TF, Morini CC, Selistre de Araújo HS, Ownby CL (1999) Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) venom. *Anat Rec* 254:521-533.

Sarasa-Renedo A, Chiquet M (2005) Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports* 15:223-230.

Schwane J, Johnson S, Vandenakker C, Armstrong R (1983) Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. *Med Sci Sports Exerc* 15:51-56.

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40:310-322.

Shima Y, Kitaoka K, Yoshiki Y, Maruhashi Y, Tsuyama T, Tomita K (2008) Effect of heat shock preconditioning on ROS scavenging activity in rat skeletal muscle after downhill running. *J Physiol Sci* 58:341-348.

Smith LR, Fowler-Gerace LH, Lieber RL (2011) Muscle extracellular matrix applies a transverse stress on fibers with axial strain. *J Biomech* 44:1618-1620.

Song H, Nakazato K, Nakajima H (2004) Effect of increased excursion of the ankle on the severity of acute eccentric contraction-induced strain injury in the gastrocnemius: an in vivo rat study. *Am J Sports Med* 32:1263-1269.

Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K (1993) Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* 268:10593-10605.

Spencer MJ, Mellgren RL (2002) Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 11:2645-2655.

Staron RS, Malicky ES, Leonardi MJ, Falkel JE, Hagerman FC, Dudley GA (1989) Muscle hypertrophy and fast type conversions in heavy resistance-trained women. *Eur J Appl Physiol* 60:71-79.

Stauber WT (1989) Eccentric action in muscles: Physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sports Sci Rev* 17:157-185.

Suchyna TM, Johnson JH, Hamer K, Leykam JF, Gage DA, Clemo HF, Baumgarten CM, Sachs F (2000) Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *J Gen Physiol* 115:583-598.

Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I (2003) Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* 23:9127-9135.

Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A (2011) Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol* 110:382-388.

Takagi R, Ogasawara R, Tsutaki A, Nakazato K, Ishii N (2016) Regional adaptation of collagen in skeletal muscle to repeated bouts of strenuous eccentric exercise. *Pflugers Arch* 468:1565-1572.

Tannerstedt J, Apró W, Blomstrand E (2009) Maximal lengthening contractions induce different signaling responses in the type I and type II fibers of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 106:1412-1418.

Thorsteinsdóttir S, Deries M, Cachaco AS, Bajanca F (2011) The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev Biol* 354:191-207.

Toigo M, Boutellier U (2006) New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol* 97:643-663.

Tsutaki A, Ogasawara R, Kobayashi K, Lee K, Kouzaki K, Nakazato K (2013) Effect of intermittent low-frequency electrical stimulation on the rat gastrocnemius muscle. *Biomed Res Int* [Internet]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/480620/>. doi:10.1155/2013/480620.

van der Windt DA, van der Heijden GJ, van den Berg SG, ter Riet G, de Winter AF, Bouter LM (1999) Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. *Pain* 81:257-271.

Vandebrouck C, Duport G, Cognard C, Raymond G (2001) Cationic channels in normal and dystrophic human myotubes. *Neuromuscul Disord* 11:72-79.

Verburg E, Murphy RM, Stephenson DG, Lamb GD (2005) Disruption of excitation-contraction coupling and titin by endogenous Ca^{2+} -activated proteases in toad muscle fibres. *J Physiol* 564:775-790.

Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA, Armstrong RB (2002) What mechanisms contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal muscle injury? *J Orthop Sports Phys Ther* 32:58-64.

Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB (1999) Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med* 27:43-59.

Warren GL, Lowe DA, Hayes DA, Karwoski CJ, Prior BM, Armstrong RB (1993) Excitation failure in eccentric contraction-induced injury of mouse soleus muscle. *J Physiol* 468:487-499.

Welinder C, Ekblad L (2011) Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10:1416-1419.

Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214:199-210.

Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, Gottlieb PA, Sachs F, Allen DG (2005) Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the *mdx* mouse. *J Physiol* 562:367-380.

Yoseph B, Soker S (2015) Redefining the satellite cell as the motor of skeletal muscle regeneration. *JSAB* 5:76-82.

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. Takagi R, Ogasawara R, Tsutaki A, Nakazato K, Ishii N (2016) Regional adaptation of collagen in skeletal muscle to repeated bouts of strenuous eccentric exercise. *Pflugers Arch* 468:1565-1572.