

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏 名 高木 領

【緒言】

過度な収縮や力発揮は、筋自身の損傷を惹起する場合がある。これは慣れない運動やスポーツ場面のみならず、高齢者や筋疾患における弱化した筋においては、日常生活動作レベルの運動（特に下り坂や降段時など）においても生じうる。筋損傷は筋力低下などの機能障害を引き起こし、動作能力を低下させる。また疾患の予後や生活の質にも悪影響を及ぼすことが危惧されている。このように、筋損傷はスポーツや介護・医療分野などにおいて非常に身近な問題として考えられる。しかし、筋損傷を予防するプレコンディショニングや筋損傷からの回復を促進する介入手段は十分に確立されていない。この問題を解決する上で、運動による筋損傷の基礎メカニズムや損傷した筋の特性を明らかにすることは重要な手掛かりになることが期待される。

運動によって損傷した筋の特性の一つに、「繰り返し効果」が挙げられる。これは、運動による筋損傷は1回目と比較して引き続く数日～数か月以内における2回目の運動後では、その程度が軽減するという筋の適応である。繰り返し効果には、神経・結合組織・筋細胞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。繰り返し効果に関連する筋の特性やメカニズムに関する所見は、筋損傷を予防するプレコンディショニングの確立に貢献することが期待される。また、繰り返し効果に関連して、一度損傷した筋のレジスタンス運動に対する応答を明らかにすることは、筋損傷からの回復を促進する介入手段の確立に貢献

することが期待される。そこで本研究は、動物を対象とした繰り返し効果モデルを開発し、繰り返し効果に関連する因子やメカニズムを解明すること、さらに同モデルを活用して、過去の損傷が骨格筋の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目的とした。

博士論文の構成は大きく、繰り返し効果モデルの開発と繰り返し効果のメカニズムの解明に関する部分（実験 1-3）と、1 回目の筋損傷がその後のレジスタンス運動時のタンパク合成反応に及ぼす影響に関する部分（実験 4-5）の 2 部から成り立っている。

【実験 1-3】伸張性運動による繰り返し効果に関連する損傷軽減メカニズムの解明

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、骨格筋の損傷を惹起しやすい。さらに伸張性収縮による筋損傷の程度は筋線維タイプ毎に異なる。まず実験 1 では、電気刺激による強縮と伸張を組み合わせた伸張性運動を用いて、部分的な壊死を伴う損傷プロトコルを作成し、繰り返し効果と筋線維タイプ毎の損傷程度を検証した。

Wistar 系雄ラットを 10、14 週齢時に右脚腓腹筋の伸張性運動を実施する群と 14 週齢時のみに運動を実施する群に分けた。14 週齢時での運動後における等尺性足関節底屈トルクの低下や部分的な壊死を示す筋線維数の割合は、過去の損傷により軽減した。また、両群ともに壊死筋線維はミオシン重鎖 IIx, IIb タイプ筋線維（以後タイプ IIx, IIb 線維）においてタイプ IIa, I 線維と比較して有意に高い割合で生じた。同様にタイプ IIx, IIb 線維が占める筋浅層において部分的な壊死を著明に認めた。これらは、タイプ IIx, IIb 線維、もしくは筋浅層における変化が繰り返し効果において重要であることを示唆する。

次に実験 2 では、14 週齢時の運動直前において、損傷程度に関わる筋線維タイプの移行、Heat shock protein 72（HSP72）発現、コラーゲン量を解析した。筋全体において、過去の損傷により、タイプ IIx, IIb 線維の割合が低下し、タイプ IIa 線維の割合が増加した。さらに、HSP72 発現量とコラーゲン量が過去の損傷により増加した。そこで組織学的手法により解析したところ、一度損傷した再生筋線維はほとんどタイプ IIx, IIb を示し、HSP72 発現は筋浅層において変化を認めなかった。一方、I 型コラーゲンが占める横断面積の割合は、過去の損傷により筋浅層で増加した。これらより、筋線維タイプの移行や HSP72 発現の増加よりもコラーゲン量の増加が、損傷部位の適応として繰り返し効果により深く寄与する可能性が示された。

続いて、実験 3 では、上記に示した過去の損傷による変化が、実際に損傷経路にどのような影響を及ぼすかを検証した。運動による筋損傷では、細胞内カルシウムイオン濃度は重要な因子であり、伸張活性化チャ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く貢献すると考えられている。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、筋損傷に関わるタンパク質分解酵素やリン脂質分解酵素を活性化させる。また、細胞膜の透過性亢進は二次的なカルシウムイオンの流入を引き起こし、細胞壊死に至る場合がある。コラーゲンに代表される細胞外マトリクスは、収縮によるメカニカル

ストレスの伝達に関連する。遺伝子操作によって細胞外マトリクスと筋線維との接合関連タンパク質を過剰発現させた先行研究は、伸張性収縮時の張力に関わるシグナル応答が低下したことを報告している。これらより、実験 3 では、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を主な指標として、2 回目の伸張性運動時での損傷経路における変化を検証した。ただし、二次的なカルシウムイオン流入の影響を極力除くために、14 週齢時での伸張性収縮は壊死を引き起こさない強度に変更した。

その結果、14 週齢時での運動後の筋力低下は過去の損傷により軽減し、運動によるカルパイン活性の上昇も軽減した。さらに、カルパインの活性化に関わるカルパイン-1, 3 の自己分解を調べたところ、運動による自己分解の増加も同様に過去の損傷により軽減した。これらは、2 回目の運動時における筋損傷の軽減はカルパイン活性の軽減が一因であり、運動による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制されることを示唆する。さらに伸張性収縮時の張力に関連する JNK リン酸化 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) も、過去の損傷により抑制された。これは伸張活性化チャンネルを介したカルシウムイオンの流入に何らかの影響を及ぼすことが考えられるが、今後、コラーゲン量と伸張活性化チャンネルを介したカルシウムイオン流入の関連性について精査が必要と考えられる。

【実験 4-5】過去の損傷が骨格筋のレジスタンス運動に対する同化応答に及ぼす影響

実験 2 より、過去の損傷によりコラーゲン量、HSP72 発現が増加することが示された。HSP72 は様々な刺激から筋を保護する働きを持つ。また、遺伝子操作による細胞外マトリクスと筋線維の接合関連タンパク質の過剰発現モデルでは、運動によるタンパク合成応答において重要な mTORC1 シグナルの活性が軽減することが報告されている。これらから、過去の損傷は、運動による損傷のみならず同化応答をも軽減させるのではないかと推察される。実験 4 では、タンパク合成応答と mTORC1 シグナル活性を指標に、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調べた。実験系は実験 3 同様であり、14 週齢時の運動介入をレジスタンス運動とした。

その結果、筋全体のレジスタンス運動に対する応答として、タンパク合成の増加は過去の損傷により増大した。同様に、mTORC1 シグナルを代表する p70S6K リン酸化 (Thr³⁸⁹) や rpS6 リン酸化 (Ser^{240/244}) 応答も過去の損傷により増大した。これは、過去の損傷は引き続き損傷は軽減するものの、レジスタンス運動に対する同化応答は増大させることを示唆する所見である。

また、様々な刺激（協働筋切除による過負荷や断食）に対するタンパク合成応答は筋線維タイプ毎に異なる。さらに過去の損傷によるコラーゲンや HSP72 発現の増加は、筋部位により異なった。そこで、実験 5 では、過去の損傷が筋線維タイプ毎のレジスタンス運動に対する同化応答に及ぼす影響を調べた。組織学的手法により、タンパク合成の応答は、過去の損傷によりタイプ IIb, IIa, I 線維で増加した。一方、rpS6 リン酸化応答は、タイプ IIx, IIa, I 線維において過去の損傷により増加した。これらより、筋線維レベルでは、rpS6 リン酸化応答とタンパク合成応答は完全に一致しな

ったが、過去の損傷による筋全体のタンパク合成応答の増大は、主にタイプ IIb, IIa, I 線維の応答に依ることが示された。

【まとめ】

本研究で作製した繰り返し効果モデルにおいて、コラーゲン量増加が損傷軽減に密接に関連する可能性が示された。繰り返し効果のメカニズムでは、細胞内カルシウムイオン濃度上昇の抑制が示唆される結果が得られ、今後、コラーゲン量とカルシウムイオン流入の関連性についての精査が必要と考えられる。

一方、興味深いことに、過去の損傷は引き続き損傷は軽減するものの、運動に対する同化応答は増大させた。つまり過去の損傷は、単に運動に対する応答を鈍化させるわけではなく、損傷応答と同化応答にはそれぞれ異なる適応メカニズムが存在することが考えられる。

本研究による基礎的な所見から得られた上記の課題を今後継続して精査することで、筋損傷の予防や損傷からの回復を促進する介入手段の確立を図る上で、重要な知見を得られることが期待される。