

筋萎縮に対する運動の抑制効果と 熱ショック蛋白質70との関連性

東京慈恵会医科大学	山内秀樹
(共同研究者) 日本医科大学	三上俊夫
国際武道大学	刈谷文彦
共立薬科大学	木村真規
東京慈恵会医科大学	宮野佐年

Inhibitory Effect of Exercise on Soleus Muscle Atrophy in Relation to Heat Shock Protein 70 Content

by

Hideki Yamauchi, Satoshi Miyano,
Jikei University School of Medicine

Toshio Mikami,
Nippon Medical School

Fumihiko Kariya,
International Budo University

Masaki Kimura,
Kyoritsu College of Pharmacy

ABSTRACT

Our previous findings have provided strong evidence that mechanical stress is an effective countermeasure against unloading-induced atrophy in antigravity skeletal muscles. The generations of heat shock proteins (HSP) are induced in response to mechanical and metabolic stress in the cytosol and play important roles as molecular chaperones for protein synthesis and degradation. HSP70 is down-regulated by mechanical unloading but is up-regulated by mechanical overloading. In the present study, we investigated whether HSP70

acts as a factor for maintaining muscle mass in the skeletal muscle. Female F344 rats (10 months old) were assigned to either control or hindlimb unloaded (HU) group. HU rats had their hindlimbs suspended for 3 weeks with or without isometric resistance exercise (IRE). IRE was done for 30 min a day, 6 days a week, with an additional load of 30% body mass to the tail during HU period. HU decreased maximum force by 76% and myofibrillar protein by 80% in the soleus muscle compared to the control. IRE suppressed the decreases in maximum force and myofibrillar protein (by 25% and 19%, respectively, compared to the control). HU reduced HSP70 expression in the soleus muscle by 53% but IRE prevented this reduction of HSP70 by 16% compared to the control. These findings suggest that HSP70 expression corresponds with changes in muscle mass, and that HSP70 plays an important role in maintaining the muscle mass.

要 旨

本研究では、萎縮進行過程における等尺性抵抗運動が萎縮筋の熱ショック蛋白質 (heat shock protein: HSP) 70の発現低下を抑制するか、また、運動の筋萎縮抑制効果とHSP70の発現変化との関係について成熟ラットを用いて検討した。3週間の非荷重により、ヒラメ筋の最大張力と筋原線維蛋白含量は、対照に比べそれぞれ77%、80%低下した。等尺性抵抗運動(1日1回、30分間)は非荷重による最大張力と筋原線維蛋白含量の低下をそれぞれ57%、64%までに軽減した。HSP70の発現レベルは非荷重により53%低下したが、等尺性抵抗運動を負荷した場合では16%の低下であった。以上の結果から、HSP70の発現レベルは荷重条件や筋量により変化し、運動による筋萎縮抑制機序の一端を担うと考えられた。

緒 言

身体活動低下による骨格筋の萎縮は蛋白質の合成低下と分解亢進により筋蛋白代謝が分解に傾き、筋蛋白含量が低下する現象であるが、筋蛋白変性など質的な変化をとともなう場合が多い。これまでに、筋萎縮に対する防止法の検討がなされている

が、効果的な防止法やその機序に関しては、未だ十分解明されているとは言い難い。

新規蛋白質の合成にはポリペプチド鎖が正常にフォールディングされ、安定した機能型蛋白質へ転換される過程が必須である。また、変性蛋白質はペプチド鎖がアンフォールディングされており、正常な機能蛋白として再生されるためには、リフォールディングされなければならない。再生不可能な状態に陥った蛋白質はプロテアーゼによる分解を受けるが、この処理機構が破綻を来すと封入体などの変性蛋白質の凝集や蓄積が生じ、細胞機能に障害が生じる。これら蛋白質の新規合成や変性蛋白質の再生あるいは分解処理を介添えする働きを担っているのが、分子シャペロンという一群の蛋白質であり、筋萎縮との関連性が注目されている。

分子シャペロンの1つである熱ショック蛋白質 (heat shock protein: HSP) 70は哺乳動物の細胞質に存在し、直接的に蛋白質の品質を管理している。このHSP70と筋萎縮との関係は近年よく研究されており、骨格筋HSP70含量は筋活動低減により萎縮した筋で減少すること¹⁾や温熱ストレスによりHSP70を高めておくと筋萎縮が軽減されること²⁾が報告されている。これらの成績は筋

量保持に対するHSP70の関与を示唆している。

われわれはこれまでに筋萎縮防止法としての運動負荷の効果に関して研究を進めてきたが、運動負荷は骨格筋HSP70量を増加させること³⁾から、運動の萎縮抑制効果にHSP70の発現変化が関与している可能性が考えられる。しかしながら、萎縮進行過程における運動負荷がHSP70の変化に及ぼす影響や運動の筋萎縮抑制効果とHSP70の変化との関係については報告がない。そこで、本研究では萎縮筋に対する運動がHSP70の低下を軽減するか、HSP70が運動の筋萎縮抑制機序の一端となり得るのかを検討した。

1. 研究方法

10カ月齢のFischer344系雌ラット23匹を対照群(n=8)、懸垂群(n=6)、懸垂運動群(n=9)の3群に分けた。懸垂群と懸垂運動群は尾部懸垂により後肢非荷重状態で3週間飼育した。懸垂運動群では他の2群に比べ摂餌量が低下する⁴⁾。したがって、懸垂運動群は飽食条件で飼育したが、対照群と懸垂群に関しては懸垂運動群の前日の摂餌量を調べ、平均摂餌量が等しくなるように給餌調節した。なお、摂水は自由とした。実験遂行に関しては「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会制定)を遵守した。

運動負荷は等尺性抵抗運動とし⁴⁾、1日1回、30分間、週6日実施した。この運動は半筒状にした金網(長さ45cm最大径6.5cm)の平らな床面上で支持するもので、一度、運動装置内にラットを入れると、ほとんど昇降運動はせず、一定の位置で維持している。負荷強度は金網の傾斜角度とラットの尾につける鐘により調節した。運動強度は、最初の1週間は傾斜80度で錘なし、2週目以降は傾斜80度、体重の約30%の錘をつけた条件で2分間+傾斜60度、錘なしで3分間を1セット(計5分間)とし、6セット繰り返し行った。

実験期間終了後、右側ヒラメ筋の等尺性収縮張

力を間接極大電気刺激(0.1msの矩形波)により測定した。測定中、被検筋は95% O₂ - 5% CO₂の混合ガスにて飽和したリンゲル液(37 ± 1℃)中に浸漬した。筋長は最大単収縮張力が得られる長さに固定した。刺激頻度100, 150, 200, 250Hzで1秒間刺激し、頻度に関係なく、最高張力を最大張力とした。測定終了後、両後肢のヒラメ筋を摘出・秤量し、イソペンタン中で瞬間凍結した。凍結サンプルは生化学的分析までデープフリーザー内(-80℃)で保存した。

筋原線維蛋白とミオシン重鎖(myosin heavy chain: MHC)分子種の発現変化を調べるために、左側ヒラメ筋を9倍量のホモジナイズバッファ(200mM sucrose, 100mM KCl, 20mM imidazol, 5mM EDTA, pH 6.8)内で均質化し、Caiozzo et al⁵⁾の方法にしたがって筋原線維蛋白の抽出を行った。抽出後、直ちに牛血清アルブミンを標準液としてLowry法⁶⁾により蛋白濃度を定量した。また、抽出した筋原線維蛋白の一部を5倍量の保存液(50% Glycerol, 100mM Na₄P₂O₇, 5mM EDTA, pH 8.8)と混合し、分析時まで-20℃で保存した。

MHC分子種の分析はTalmadge and Roy⁷⁾の方法にしたがってSDS-PAGEにより行った。濃縮ゲル及び分離ゲルに含まれるアクリルアミドはそれぞれ4%, 8%とした。電気泳動は10℃以下の条件において、サンプルが濃縮ゲルを通過するまで60V、その後は100Vで22時間行った。その後、銀染色(和光純薬)にて可視化した。MHC分子種の相対的比率は乾燥ゲルをスキャナーにてパーソナルコンピュータに取り込み、NIH image(ver. 1.61)を用いて算出した。

HSP70量はNaito et al²⁾の方法にしたがって定量した。右側ヒラメ筋を10倍量のホモジナイズバッファ(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DDT, 0.1% CHAPS)中で均質化し、遠心分離(10,000

rpm, 30分) 後, 上清を回収した. この上清の蛋白濃度を Comassie Pluse Protein Assay Reagent (Pierce 社製) にて牛血清アルブミンを標準液として測定した. 蛋白質量で 20 μ g 相当のホモジナイズ上清を 12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により蛋白質を分子量に応じて分離した後, ウエット式ブロッティング装置 (Bio Rad 社製) にてタンパク質を polyvinylidene difluoride 膜に電気的に転写した. 転写終了後, メンブレンを T-TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.9% Tween-20) で洗浄し, 5% スキムミルクを含む T-TBS にてブロッキング処理 (4 $^{\circ}$ C, 12時間) を行った. メンブレンを T-TBS にて洗浄した後, HSP70 に対するモノクロナル抗体 (anti-Hsp70, Mouse-Mono, Stressgen SPA-810) と反応させ (室温, 2時間), 引き続き alkaline phosphatase 標識の抗マウス IgG と反応させた (室温, 2時間). 最終的にメンブレンを T-TBS とミリQ水にて洗浄し, AttoPhos 試薬キットと反応させ, 蛍光強度をフルオロイメージアナライザー FLA-2000 (富士フイルム社製) にて検出して HSP70 量を定量化した.

各群の値は平均と標準偏差で表した. 平均値の差の検定には一元配置分散分析を用い, 有意であった項目については, Tukey-Kramer の多重比較を行った. 有意基準はいずれも危険率 5% とした.

2. 結果

ヒラメ筋の湿重量, 最大張力, 筋原線維蛋白の変化を表 1 に示した. 懸垂群および懸垂運動群のヒラメ筋重量は対照群に比べ低値を示した. 最大

張力, 筋重量あたりの最大張力, 筋原線維蛋白濃度ならびに含量はいずれの群間においても有意差が認められた.

図 1 に MHC 分子種の相対的比率変化を示した. MHC II b の発現を認めたのは, 懸垂群の 1 匹のみであった. 懸垂群と懸垂運動群では対照群に比べ MHC II x 比率の高値を認めたが, MHC I, II a, II b の比率に差はみられなかった. また, 懸垂群と懸垂運動群間では差がみられなかった.

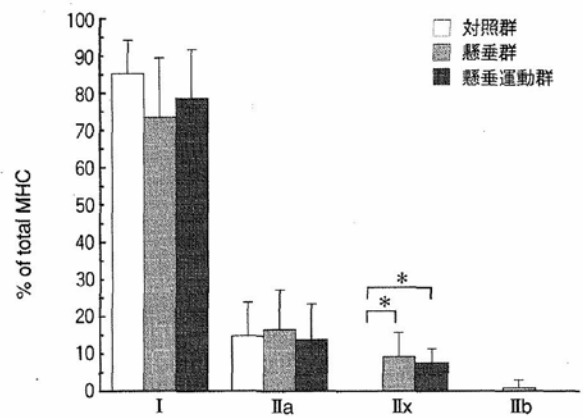


図 1 ミオシン重鎖分子種の構成比率

図 2 に HSP70 量の変化を示した. 懸垂群の HSP70 量は対照群に比べ低値を示したが, 懸垂運動群では対照群と差がみられなかった. 懸垂運動群の HSP70 量は懸垂群に比べ高値を示した.

図 3 に HSP70 量と湿重量あたりの最大張力との関係を示した. 相関係数 0.73 で有意な正相関を認めた.

3. 考察

骨格筋 HSP70 の発現レベルは筋萎縮にともない低下することが示されている¹⁾. また, Naito et al.²⁾ は 8 日間の非荷重によりヒラメ筋重量は

表 1 ヒラメ筋の湿重量, 筋原線維蛋白, 最大張力の変化

	対照群	懸垂群	懸垂運動群
湿重量 (mg)	86.0 \pm 9.9	51.7 \pm 6.6 *	57.0 \pm 7.7 *
筋原線維蛋白濃度 (mg/g)	91.4 \pm 5.7	30.9 \pm 3.3 *	49.1 \pm 6.4 *†
筋原線維蛋白含量 (mg/muscle)	7.89 \pm 1.25	1.60 \pm 0.25 *	2.80 \pm 0.57 *†
最大張力 (g)	133.3 \pm 18.6	31.3 \pm 3.4 *	57.0 \pm 6.8 *†
湿重量あたりの最大張力 (g/mg)	1.55 \pm 0.10	0.61 \pm 0.11 *	1.01 \pm 0.11 *†

*対照群との有意差. †懸垂群との有意差

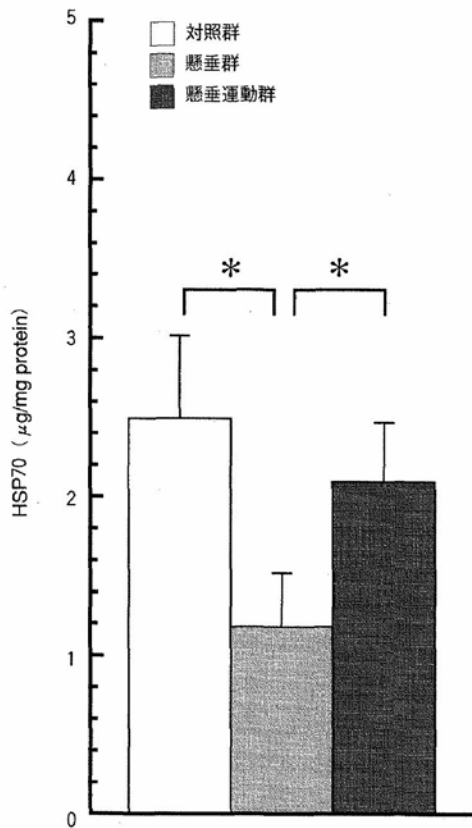


図2 ヒラメ筋HSP70量

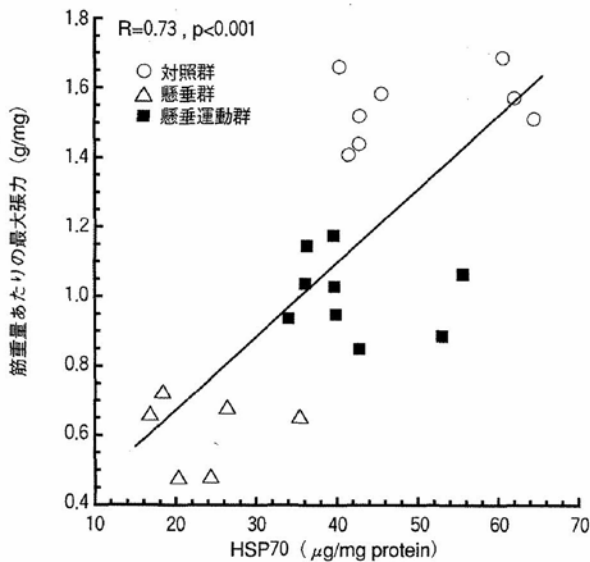


図3 ヒラメ筋の筋あたりの最大張力とHSP70量との関係

25%低下したが、事前の温熱ストレスにより骨格筋HSP70量を高めておくとヒラメ筋重量の低下は17%に軽減されることを報告している。これらの結果はHSP70が筋蛋白代謝を制御し、筋量調節の役割を担っていることを示唆する。

本研究においても、3週間の非荷重により萎縮したヒラメ筋ではHSP70量が対照に比べ53%低

下を示した。しかし、抵抗運動負荷は、萎縮にともなうHSP70量の低下を16%に抑制し、最大張力や筋原線維蛋白の低下を抑制した。この結果は運動による筋萎縮軽減効果にHSP70が関係していることを示唆する。

今回の運動負荷でHSP70量の低下が抑制された原因に関しては明らかでない。HSP70の発現は筋線維タイプ特異的であること^{8,9)}が知られているが、MHC分子種構成比率に運動の影響はみられなかったことから、運動によるHSP70の発現レベルの維持にタイプ変化は関与していなかったと考えられる。単回の温熱ストレスにより、ヒラメ筋HSP70は非荷重8日後でも無処理に比べて35%高いレベルに維持されること²⁾が示されている。この温熱ストレスによるHSP70の産生効果に対し、本研究における運動のHSP70量維持効果は低い結果であった。したがって、運動によるHSP70の発現維持には、機械的的刺激や活性酸素ストレスなど温熱ストレス以外の筋収縮に関連した要因が関与していると考えられる。

われわれは先行研究¹⁰⁾において、非荷重による萎縮ヒラメ筋において、筋線維横断面積の低下と変性筋線維の出現を認めている。また、非荷重による正常（光顕レベルで異常の観察されない）筋線維の横断面積の低下（55%）に比べ最大筋力の低下（77%）は大きく、筋線維の変性が筋力発揮能の低下に関与していることを報告した。非荷重にともない筋線維や細胞内微細構造の異常が生じることは先行研究¹¹⁻¹⁴⁾においても報告されている。その発症機序の詳細に関しては明らかでないが、HSP70の低下が関与している可能性が考えられる。非荷重による筋線維の変性は運動負荷により抑制されること¹²⁾やHSP70量と筋重量あたりの単位張力が正相関を示した結果は、運動によるHSP70量の維持がリフォールディングによる変性蛋白質の安定した機能型蛋白質への修復を介添し、変性蛋白質の蓄積を抑制したと推測される。

4. まとめ

本研究では極度な身体活動制限下における抵抗運動の筋萎縮抑制効果と HSP70 との関係を示した。加齢にともなう筋萎縮が生理的加齢変化だけでなく、日常活動量の低下にも起因していることから、本研究の実験モデルは加齢性筋萎縮に対する抵抗運動の予防効果に HSP70 の制御が関与している可能性を予測させる。活動的な日常生活はストレス耐性の向上により健康長寿を確保する上でも重要であり、高齢期における抵抗運動の実践による筋萎縮予防と HSP70 の発現との機能的関係については興味ある今後の研究課題と考える。

謝 辞

本研究に対し助成下さいました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Oishi Y., Ishihara A., Talmadge R. J., Ohira Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Roy R. R., Edgerton V. R.; Expression of heat shock protein 72 in atrophied rat skeletal muscles. *Acta. Physiol. Scand.*, 172, 12-130 (2001)
- 2) Naito H., Powers S. K., Demirel H. A., Sugiura T., Dodd S. L., Aoki J.; Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J. Appl. Physiol.*, 88, 359-363 (2000)
- 3) Skidmore R., Gutierrez J. A., Guerriero V. Jr., Kregel K. C.; HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am. J. Physiol.*, 268, R92-R97 (1995)
- 4) 山内秀樹, 米本恭三; 廃用性筋萎縮に対する等尺性運動の効果と加齢の影響. *リハ医学* 34, 46-51 (1997)
- 5) Caiozzo V. J., Herrick R. E., Baldwin K. M.; Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin distribution in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, 261, C285-C295 (1991)
- 6) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)
- 7) Talmadge R. J., Roy R. R.; Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.*, 75, 2337-2340 (1993)
- 8) Locke M., Atkinson B. G., Tanguay R. M., Noble E. G.; Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *Am. J. Physiol.*, 266, C1240-C1246 (1994)
- 9) Neuffer P. D., Ordway G. A., Hand G. A., Shelton J. M., Richardoson J. A., Benjamin R. I. J., Williams R. S.; Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 271, C1828-C1837 (1996)
- 10) 山内秀樹, 米本恭三; 筋の退行性変化に対する運動の抑制と加齢の影響. *デサントスポーツ科学* 19, 213-220 (1998)
- 11) Riley D. A., Slocum G. R., Bain J. L., Sedlak F. R., Sowa T. E., Mellender J. W.; Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.*, 69, 58-66 (1990)
- 12) 山内秀樹; 退行性筋萎縮に対する防止法としての筋運動とアナボリックステロイド投与の効果. *日生誌* 58, 331-340 (1996)
- 13) Nonaka I., Miyazawa M., Sukegawa T., Yonemoto K., Kato T.; Muscle fiber atrophy and degeneration induced by experimental immobility and hindlimb suspension. *Int. J. Sports Med.*, 18, S292-S294 (1997)
- 14) Templeton G. H., Padalino M., Manton J., Glasberg M., Silver C. J., Silver P., Demartino G., Leconey T., Klug C., Hagler H., Sutko J. L.; Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.*, 56, 278-286 (1984)