

メタボリックシンドロームの予防と解消のための 効果的な骨格筋増量法の確立

豊橋創造大学 大野善隆
(共同研究者) 同 後藤勝正
弘前学院大学 吉岡利忠

A New Novel Method for The Gain of Skeletal Muscle Mass — Application for Anti-Metabolic Syndrome —

by

Yoshitaka Ohno, Katsumasa Goto
Laboratory of Physiology, Toyohashi SOZO University
Toshitada Yoshioka
Hirosaki Gakuin University

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of heat-stress on skeletal muscles. In vivo experiments by using mice and rats, the wet weights and protein contents in soleus muscles were significantly increased by heat-stress ($p < 0.05$). Histochemical analyses showed the increase in the cross-sectional area of soleus muscle fibers also were observed following heat-stress. The application of heat-stress facilitated the regrowth of atrophied soleus muscles induced by unloading. In the experiments by using cultured mouse skeletal muscles (C2C12), heat-stress stimulated the insulin-related intracellular signals involving Akt and glycogen synthase kinase 3β . These results strongly suggested that heat-stress could cause to increase in not only the basal metabolic rate via muscular hypertrophy but also the stimulation of intracellular glucose metabolism via the activation of insulin-related intracellular signals. Application of heat-stress on skeletal muscles would be a useful tool for the prevention and the improvement of metabolic syndrome.

要 旨

温熱刺激による骨格筋の適応変化について検討した。マウスおよびラットを用いた動物実験より、温熱刺激によりヒラメ筋湿重量および筋タンパク量が有意に増加した ($p < 0.05$)。組織学的評価から、温熱刺激により筋線維断面積の増大が観察された。また、温熱刺激は萎縮した骨格筋の回復を促進した。培養細胞実験より、温熱刺激によりインスリン関連シグナルである Akt および glycogen synthase kinase 3β のリン酸化促進が認められた。したがって、温熱刺激は骨格筋を肥大による基礎代謝増大ならびにインスリン関連シグナルを刺激して糖代謝を活性化させる効果を持つことが示唆された。温熱刺激による骨格筋の肥大と糖代謝活性化は、メタボリックシンドロームの予防や改善だけでなく、老化に伴う排泄機能障害や活動量低下などの骨格筋関連身体諸機能の対抗性変化を抑制できると考えられた。

緒 言

メタボリックシンドロームとは「内臓脂肪型肥満によって、さまざまな病気が引き起こされやすくなった状態」と定義され、内臓脂肪型肥満症候群と呼ばれる^{13, 24)}。肥満症をはじめ糖尿病、脂質異常症（高脂血症）や高血圧は摂取カロリーや栄養バランスなどは生活習慣病と呼ばれ、合併症が多い。前述の病態を2つ以上併せ持つと、持たない人に比べて動脈硬化症や心臓病の発症リスクが大きく高まる^{13, 24)}。

メタボリックシンドローム発症に密接に関連する要因として、食生活を含む生活習慣の偏りを挙げることができる。したがって、生活習慣の改善がメタボリックシンドロームの予防や改善につながるの言うまでもない。生活習慣の改善には、運動習慣を身に付けて運動によりエネルギー消費を増大させることも含まれる。運

動は単にエネルギー消費量を増大させるだけでなく、人の健康に対して様々な効果を持つことが知られており、健康の維持増進のためにその実践が推奨されている。しかし、運動習慣がない者にとって、あらためて運動習慣を身に付けることは困難であるのも事実であり、この点の解消が健康維持増進のための運動を広めるために必要なことであり、運動指導者に課された社会的課題であると言える。

最近我々は、温熱刺激は運動やトレーニングによる骨格筋増量効果を増強すること^{7, 8, 10)}、さらに温熱刺激により骨格筋が肥大すること^{5, 6, 9, 15)}を見出した。しかし、温熱刺激が筋タンパク合成を促進する分子機構の詳細は明らかとなっていない。糖代謝に密接な関連を持つインスリン受容体下流のシグナルの活性化はタンパク合成を促すことが知られている^{2, 4)}。したがって、温熱刺激もインスリン関連シグナルを活性化させて、筋タンパク合成を促すことで筋肥大を引き起こすことが示唆される。温熱刺激がインスリン関連シグナルを活性化するならば、温熱刺激による骨格筋の肥大は単に筋増量による基礎代謝量の増大だけでなく、糖代謝の改善をもたらす可能性が考えられる。

そこで本研究では、メタボリックシンドロームの予防と改善のための温熱刺激の有用性を検討し、具体的な方策を提案することを目的とした。

1. 研究方法

本研究は、動物実験ならびに培養細胞実験の2つの実験系により構成された。動物実験は、日本生理学会が定める「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従い、豊橋創造大学生命倫理委員会ならびに聖マリアンナ医科大学実験動物委員会による審査・承認を経て実施された。

1. 1 動物実験

温熱負荷による筋肥大効果に関する実験

実験には、生後10週齢の雄性マウス(C57BL/6J)を用いた。マウスを対照群および温熱負荷群に分類し、温熱負荷群のマウスには41℃の温熱環境に60分間放置することで温熱刺激を与えた。この温熱刺激条件により、刺激開始およそ45分後にはマウス直腸温が41℃に到達する^{8, 26)}。温熱刺激1日後、1週間後および2週間後に両群のマウスよりヒラメ筋を摘出した。すべてのマウスは、室温23±1℃(平均±標準偏差)、湿度約50%、明暗周期12時間に制御された実験動物飼育室で飼育された。また、餌と水は自由摂取とした。温熱負荷により餌と水の摂取量には大きな変化はない。

温熱負荷による萎縮した骨格筋の回復に関する実験

実験には、生後10週齢の雄性ラット(Wistar系)を用いた。ラットに後肢懸垂^{8, 18)}を2週間負荷して、ヒラメ筋に廃用性萎縮を引き起こした。2週間の懸垂後、そのまま回復させる群および懸垂直後に温熱負荷を施した後に回復させる群に分類した。温熱刺激は、ラットを41℃の温熱環境に60分間放置することで負荷した。この温熱刺激条件により、刺激開始およそ45分後にはラット直腸温が41℃に到達する。懸垂解除10日後にヒラメ筋を摘出した。すべてのラットは、室温23±1℃(平均±標準偏差)、湿度約50%、明暗周期12時間に制御された実験動物飼育室で飼育された。また、餌と水は自由摂取とした。温熱負荷により餌と水の摂取量には大きな変化はない。

1. 2 分析方法

摘出したヒラメ筋は、即座に結合組織を除去し、筋湿重量を測定した。その後、ヒラメ筋の

一部を凍結切片作製用に液体窒素にて冷却したイソペンタンにより急速凍結した。また残りの筋組織を用いて筋乾燥重量を測定し、水分含有量を算出した。急速凍結した筋組織より、クライオスタットにて厚さ7μmの連続凍結切片を作製した。凍結切片に対してヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を施し、筋断面積を評価した。

1. 3 培養細胞実験

実験にはマウス筋芽細胞であるC2C12を用いた。培養にはタイプ1コラーゲンがコーティングされた培養プレート(直径35mm)を用い、C2C12を増殖培地にて3日間培養しサブコンフルエント上体にまで増殖させた。その後、分化培地に交換して培養することで筋管細胞に分化させた後、実験を行った。C2C12に対して温熱刺激(41℃, 60分間)を負荷した。この温熱刺激条件により、培地の温度が温熱刺激開始後およそ45分後に41℃に到達し、維持される⁷⁾。温熱刺激72時間後に細胞を回収し、可溶性筋タンパク量の変化を検討した。また、インスリン関連シグナル伝達系であるAktならびにglycogen synthase kinase 3β(GSK3β)のリン酸化型の発現量についてWestern blotting法により検討した。各タンパク質発現量の比較は、各条件の可溶性タンパク1mg当たりの相対的な発現量とし、温熱刺激前の発現量を対象に温熱負荷後の変動をその相対値として示した。

1. 4 統計学的解析

すべての測定値は平均±標準誤差にて示した。各実験における平均値は、分散分析とそれに続くTukey testによる多重比較により比較を行った。危険率5%未満を持って統計学的に有意差ありと判定した。

2. 研究結果

2.1 動物実験

温熱刺激1週間後に、筋湿重量（図1，12.9%， $p < 0.05$ ）ならびに筋タンパク量の増加が認められた。しかし、筋水分量には変化は認

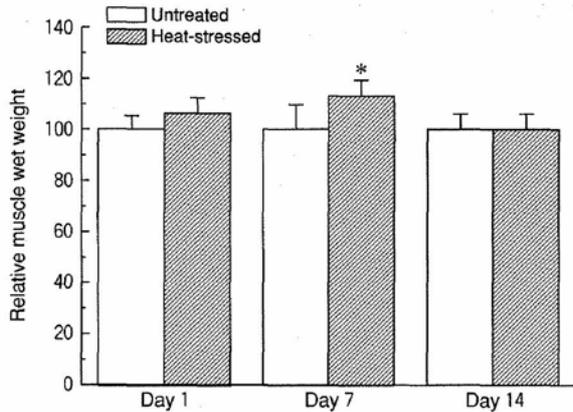


図1 Changes in the relative soleus muscle wet weight to body weight

Untreated: untreated control group, Heat-stressed: heat-stressed group. Values are expressed as the relative value to the mean relative wet weight of the untreated control group at Day 1. $n=5$ per group each day. *: significantly different from untreated control group ($p < 0.05$).

められなかった。平均筋線維横断面積は温熱負荷により有意に増加した ($p < 0.05$)。温熱負荷により、大きな断面積を有する筋線維が増加していた（図2）。

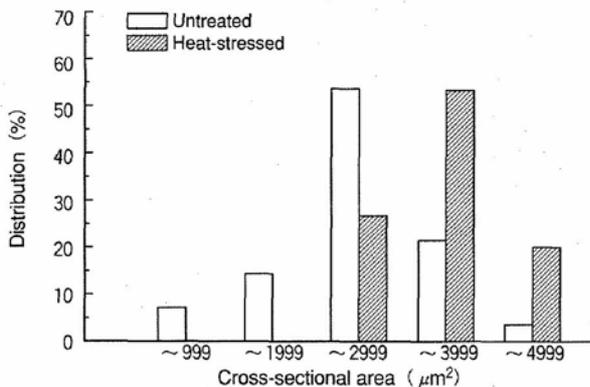


図2 Proportion of the cross-sectional area of soleus muscles

Other abbreviations are the same as in Figure 1.

後肢懸垂とその後の回復期におけるヒラメ筋湿重量および筋タンパク量を図3に示した。後

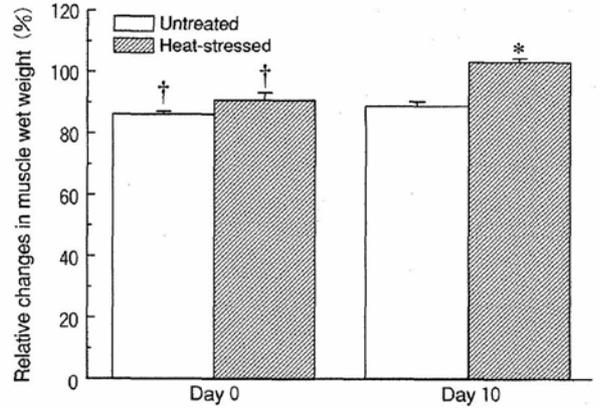


図3 Changes in the relative soleus muscle wet weight to body weight during the regrowth from unloading-induced muscle atrophy

$n=5$ per group each day. †: significantly different from the value before unloading-induced muscle atrophy. *: significantly different from untreated control group ($p < 0.05$).

肢懸垂によりヒラメ筋の湿重量はおよそ12%、筋タンパク量はおよそ25%の低下が認められた ($p < 0.05$)。回復10日後の筋湿重量は、温熱負荷を与えないと対照群の値に比べておよそ10%低い値であった。しかし、温熱負荷により筋湿重量の有意な増加が認められ ($p < 0.05$)、ほぼ対照群の値にまで回復した。

筋タンパク量も同様に、温熱負荷により有意な増加が認められ ($p < 0.05$)、温熱負荷なしでは対照群のおよそ88%であったのに対して、温熱負荷により対照群の103%の値を示した。

2.2 培養細胞実験

培養プレート1枚当たりの平均筋タンパク量は $4.56 \pm 0.31\text{mg}$ であったが、温熱負荷（72時間後）により $5.13 \pm 0.47\text{mg}$ と有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。リン酸化Aktおよびリン酸化GSK3 β の発現量が増大した。リン酸化Aktの発現量は温熱負荷直後に、負荷前の値のおよそ2.2倍にまで増加した（図4）。その後は、増減を繰り返し、温熱負荷6時間後においても負荷前に比べて約67%高い値を示した。リン酸化GSK3 β の発現量は温熱負荷15分後にいったん減少した後に再度増加する2相性の変動を示

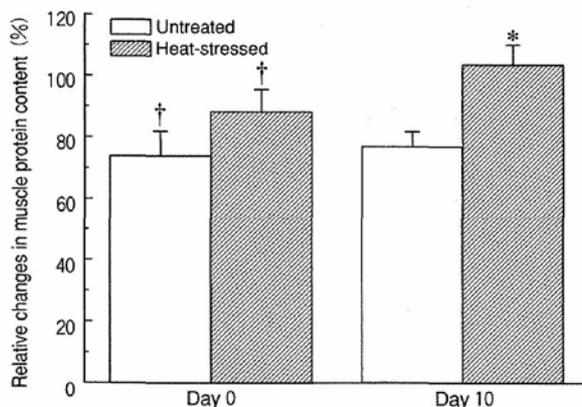


図4 Relative changes in the protein content of soleus muscle during the regrowth from unloading-induced muscle atrophy
n=5 per group each day. †: significantly different from the value before unloading-induced muscle atrophy. *: significantly different from untreated control group (p<0.05).

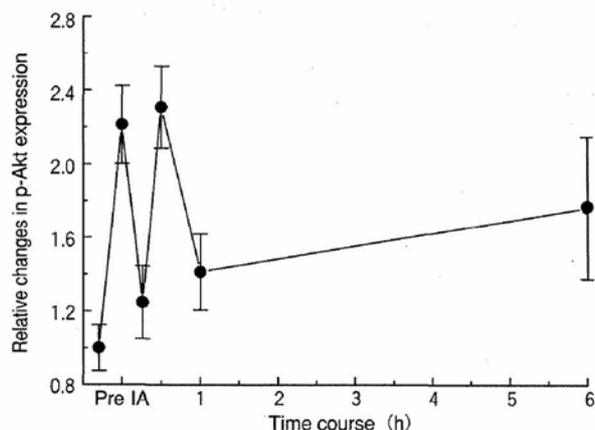


図5 Relative changes in the relative phospho-Akt expression following heat-stress
p-Akt: phospho-Akt, Pre: before heat-stress, IA: immediately after heat-stress.

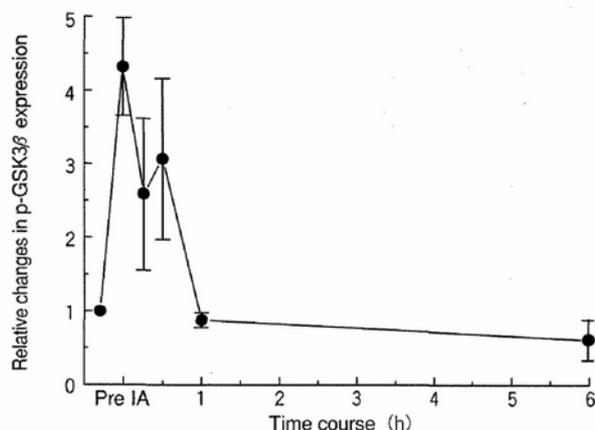


図6 Relative changes in the relative phospho-glycogen synthase kinase 3β expression following heat-stress
p-GSK3β: phospho-glycogen synthase kinase 3β, Pre: before heat-stress, IA: immediately after heat-stress.

した(図5)。温熱負荷1時間後において、リン酸化GSK3βの発現量はほぼ負荷前値まで低下した。リン酸化GSK3βの発現量は温熱負荷直後におよそ300%の増加が認められた。リン酸化GSK3βの発現量は温熱負荷15分後にいったん減少した後に再度増加する2相性の変動を示した。温熱負荷1時間後において、リン酸化GSK3βの発現量はほぼ負荷前値まで低下した。

3. 考察

本研究では、温熱刺激により骨格筋肥大ならびに萎縮からの回復促進がもたらされることが示された。さらに、温熱刺激による筋タンパク合成促進作用は、インスリン関連シグナルであるAktおよびGSK3βのリン酸化が関与していることが示唆された。

一般にトレーニングに代表される運動は、骨格筋をはじめとする様々な身体機能の向上をもたらすことはよく知られている。しかし、トレーニング効果発現の分子機構の全貌は未だ明らかでない。運動・トレーニングは、骨格筋細胞内に熱ショックタンパク質(heat shock proteins: HSPs)を誘導することが知られている^{3, 20, 23, 25)}。しかし、その発現増加の機序ならびに生理学的意義もまた明らかでない。HSPsは、細胞が温熱刺激をはじめとする様々なストレスを受容することでその発現が誘導されることが知られている^{1, 11, 12, 14, 17, 21, 22, 27)}。運動・トレーニングにより骨格筋HSPs発現が増加するということは、運動・トレーニングは骨格筋に対するストレス(ストレサー)であると捉えることができる⁶⁾。したがって、運動・トレーニングに対する筋肥大などの骨格筋諸機能の適応すなわちトレーニング効果とは、骨格筋収縮により発生する様々なストレスに対する適応現象と考えることができる。

本研究で用いた温熱刺激は、骨格筋細胞内の

HSPs発現量を増加させることが確認されている。したがって、本研究で認められた温熱刺激による骨格筋肥大効果は、HSPs発現を伴うストレス応答の結果かも知れない。また、運動やトレーニングによる骨格筋の肥大をストレス刺激による骨格筋筋衛星細胞の適応現象^{7,19)}として捉えると、温熱刺激はこの筋衛星細胞を制御できる刺激として有効であると考えられる。本研究では、筋衛星細胞の動態を評価していないが、温熱刺激により筋衛星細胞が増加することが示唆されている^{7,16,26)}。

本研究により、温熱刺激は骨格筋肥大や萎縮筋の再成長を促進させることから、温熱刺激は筋タンパク合成促進作用を持つことが示された。運動負荷やトレーニングに伴う筋タンパク合成促進には、インスリン様成長因子の関与が示唆されている^{2,4)}。本研究では、インスリン関連シグナルについてAktならびにGSK3 β のリン酸化型の発現量の変化を検討した。その結果、温熱刺激によりAktならびにGSK3 β のリン酸化が促進していることが示され、温熱刺激による骨格筋肥大にインスリン関連シグナルが関与していることが示唆された。インスリンシグナルは、細胞への糖の取り込みを促進し、糖代謝を亢進させる作用を持つ。したがって、温熱刺激は骨格筋細胞容積の増大に伴う基礎代謝量増大だけでなく、糖代謝を改善させる効果も持つことが示唆される。しかし、筋収縮に伴う糖取り込みはインスリンシグナルの関与なしにも引き起こされることが知られている。本研究では、温熱刺激による糖取り込みの促進については直接検討しておらず、今後の検討課題として残された。

4. 結 論

本研究では、温熱刺激が骨格筋の容積ならびに萎縮後の再成長に及ぼす影響を検討した。その結果、温熱刺激により骨格筋の肥大ならびに

再成長が促進されることが示された。また、温熱刺激によりインスリン関連シグナルが作用することが示された。以上より、温熱刺激は骨格筋増量効果だけでなく糖代謝改善作用も期待できることが示唆された。したがって、温熱刺激を利用した骨格筋肥大は、メタボリックシンドロームの予防や改善だけでなく、骨格筋肥大による老化に伴う排泄機能障害や活動量低下などの骨格筋関連身体諸機能の対抗性変化を抑制できることが示唆された。

謝 辞

本研究に対して助成を賜り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) Bushell, A.J., Klenerman, L., Davies, H., Grierson, I., McArdle, A., and Jackson, M.J.: Ischemic preconditioning of skeletal muscle. 2. Investigation of the potential mechanisms involved. *J. Bone Joint Surg.*, 84: 1189-1193 (2002)
- 2) Favier, F.B., Benoit, H., and Freyssenet, D.: Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflügers Arch.*, 456: 587-600 (2008)
- 3) Febbraio, M.A. and Koukoulas, I.: HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.*, 89: 1055-1060 (2000)
- 4) 後藤勝正: 筋肥大のメカニズム. 整形災害外科, 48: 401-408 (2005)
- 5) 後藤勝正: 筋力増強のメカニズム. 理学療法, 24: 914-922 (2007)
- 6) 後藤勝正: リハビリ支援器具としての温熱シートの有用性-温熱負荷による筋力増強-. 老年精神医学, 19: 306-314 (2008)
- 7) Goto, K., Okuyama, R., Sugiyama, H., Honda, M., Kobayashi, T., Uehara, K., Akema, T., Sugiura, T., Yamada, S., Ohira, Y., and Yoshioka, T.: Effects of heat stress and mechanical stretch on protein

- expression in cultured skeletal muscle cells. *Pflügers Arch.*, 447: 247-253 (2003)
- 8) Goto, K., Honda, M., Kobayashi, T., Uehara, K., Kojima, A., Akema, T., Sugiura, T., Yamada, S., Ohira, Y., and Yoshioka, T.: Heat stress facilitates the recovery of atrophied soleus muscle in rat. *Jpn. J. Physiol.*, 54: 285-293 (2004)
 - 9) Goto, K., Kojima, A., Kobayashi, T., Uehara, K., Morioka, S., Naito, T., Akema, T., Sugiura, T., Ohira, Y., and Yoshioka, T.: Heat stress as a countermeasure for prevention of muscle atrophy in microgravity environment. *Jpn. J. Aerospace Environ. Med.*, 42: 51-59 (2005)
 - 10) Goto, K., Oda, H., Morioka, S., Naito, T., Akema, T., Kato, H., Fujiya, H., Nakajima, Y., Sugiura, T., Ohira, Y., and Yoshioka, T.: Skeletal muscle hypertrophy induced by low-intensity exercise with heat-stress in healthy human subjects. *Jpn. J. Aerospace Environ. Med.*, 44: 13-18 (2007)
 - 11) Guttman, S.D., Glover, C.V.C., Allis, C.D., and Gorovsky, M.A.: Heat shock, deciliation and release from anoxia induce the synthesis of the same set of polypeptides in starved *T. pyriformis*. *Cell*, 22: 299-307 (1980)
 - 12) Harris, M.B. and Starnes, J.W.: Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280: H2271-H2280 (2001)
 - 13) 春日雅人：メタボリックシンドロームとは何か？
実験医学, 25: 2205-2261 (2007)
 - 14) Kemp, T.J., Causton, H.C., and Clerk, A.: Changes in gene expression induced by H₂O₂ in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 416-421 (2003)
 - 15) Kobayashi, T., Goto, K., Kojima, A., Akema, T., Uehara, K., Aoki, H., Sugiura, T., Ohira, Y., and Yoshioka, T.: Possible role of calcineurin in heating-related increase of rat muscle mass. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331: 1301-1309 (2005)
 - 16) Kojima, A., Goto, K., Morioka, S., Naito, T., Akema, T., Fujiya, H., Sugiura, T., Ohira, Y., Beppu, M., Aoki, H., and Yoshioka, T.: Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J. Orthop. Sci.*, 12: 74-82 (2007)
 - 17) Liu, Y., Lehmann, M., Baur, C., Storck, M., Sunder-Plassmann, L., and Steinacker, J.M.: HSP 70 expression in skeletal muscle of patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 24: 269-273 (2002)
 - 18) McMahon, C.D., Popovic, L., Oldman, J.M., Jeanplong, F., Smith, H.K., Kambadur, R., Sharma, M., Maxwell, L., and Bass, J.J.: Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285: E82-E87 (2003)
 - 19) Morioka, S., Goto, K., Kojima, A., Naito, T., Matsuba, Y., Akema, T., Fujiya, H., Sugiura, T., Ohira, Y., Beppu, M., Aoki, H., and Yoshioka, T.: Functional overloading facilitates the regeneration of injured soleus muscles in mice. *J. Physiol. Sci.*, 58: 397-404 (2008)
 - 20) Naito, H., Powers, S.K., Demirel, H.A., and Aoki, J.: Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rat. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33: 729-734 (2001)
 - 21) Narasimhan, P., Swanson, R.A., Sagar, S.M., and Sharp, F.R.: Astrocyte survival and HSP70 heat shock protein induction following heat shock and acidosis. *Glia*, 17: 147-159 (1996)
 - 22) Ozer, E.A., Yilmaz, O., Akhisaroglu, M., Tuna, B., Bakiler, A.R., and Ozer, E.: Heat shock protein 70 expression in neonatal rats after hypoxic stress. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 12: 112-117 (2002)
 - 23) Puntschart, A., Vogt, M., Widmer, H.R., Hoppeler, H., and Billeter, R.: Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiol. Scand.*, 157: 411-417 (1996)
 - 24) 酒井寿郎：メタボリックシンドロームの重要因子と創薬開発の新知見。実験医学, 26: 1680-1683 (2008)
 - 25) 轟一弘, 杉浦崇夫, 後藤勝正, 内藤久士, 吉岡利忠: 異なる速度での一過性の走運動とトレーニングに伴うラット骨格筋の熱ショックタンパク質発現量の変化。体力科学, 53: 537-547 (2004)
 - 26) Uehara, K., Goto, K., Kobayashi, T., Kojima, A., Akema, T., Sugiura, T., Yamada, S., Ohira, Y., Yoshioka, T., and Aoki, H.: Heat stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn. J. Physiol.*, 54: 263-271 (2004)
 - 27) Xi, L., Tekin, D., Bhargava, P., and Kukreja, R.C.: Whole body hyperthermia and preconditioning of the heart: basic concepts, complexity, and potential mechanisms. *Int. J. Hyperthermia*, 17: 439-455 (2001)