

組織幹細胞を活性化させる新規コンディショニング法と トレーニング効果増強法の開発

豊橋創造大学 後藤 勝 正

Activation of Skeletal Muscle-Specific Stem Cells by Using a New Novel Conditioning and Training Combined with Cellular Stresses

by

Katsumasa Goto

*Laboratory of Physiology, School of Health Sciences,
Toyohashi SOZO University*

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of cold and mechanical stresses on mice soleus muscle. Male C57BL/6J mice (10 weeks old) were assigned into cold-stressed and mechanical-stressed groups. Mice hindlimbs of cold-stressed group were exposed to ice-cold water (4°C) for 10 min. Mice hindlimbs of mechanical-stressed group were kept at maximal dorsiflexion for 10 min. In soleus, the mRNA expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), which plays a key role in the regeneration of injured tissues, was up-regulated by the exposure to cold stress. Pax7 is a marker for muscle-specific stem cells, so-called muscle satellite cells. Pax7 mRNA in soleus was up-regulated by mechanical stress. A role of stress response in skeletal muscle plasticity was investigated by using heat shock transcription factor 1 (HSF1)-knock out (HSF1-KO) and overexpressed (HSF1-Tg) mice. HSF1 highly regulates the stress response in mammalian skeletal muscles. The regrowth of atrophied soleus muscles was partially depressed in HSF1-KO mice. Functional overloading-associated hypertrophy of soleus muscles was enhanced in HSF1-Tg mice. These observations suggested that the stress response plays an important role in the plasticity

of skeletal muscles. The effects of training and conditioning could be enhanced by the selective application (s) of cellular stresses on skeletal muscles.

要 旨

本研究では、骨格筋に対する冷却ストレス刺激ならびに機械的ストレス刺激の影響について、マウス (C57BL/6J) を用いて検討した。マウスヒラメ筋に対する冷却ストレス刺激は、損傷した組織再生において重要な bFGF mRNA の発現を、機械的ストレス刺激は骨格筋組織幹細胞である筋衛星細胞の特異的マーカーである Pax7 mRNA の発現をそれぞれ増大させた。また、細胞外刺激におけるストレス応答の役割をマウス骨格筋のストレス応答において重要な役割を担っている heat shock transcription factor 1 (HSF1) をノックアウトしたマウスならびに過剰発現したマウスを用いて検討した。その結果、萎縮した骨格筋の再成長および骨格筋肥大がストレス応答により促進した。したがって、骨格筋に与えるストレス刺激を適切な選択が、トレーニング効果やパフォーマンスを向上させるコンディショニングにおいて重要であることが示唆された。

緒 言

スポーツ選手は種目特性に適応して合理的な種々のトレーニング方法を駆使して、骨格筋機能の向上を図っている。さらにトレーニング終了後には、次回のトレーニングや試合に向けて休息を取るとともにアイシングやマッサージなどコンディショニングを処方している⁹⁾。しかし、近年、こうしたアイシングやマッサージなどによるコンディショニングが普及しているにもかかわらず、スポーツによる損傷 (外傷・障害) は増加する傾向にあり、選手生命は延伸し

ているとは言い難い。この原因の1つとして、コンディショニング方法の問題を挙げることができる。競技力を高めるトレーニングは各競技特性に応じたものであるのに対して、コンディショニングは画一的であることが多い。コンディショニングに対する考え方は、急性期における「RICE」の原則に基づいている。しかし、RICEにおける安静と冷却療法については、その科学的根拠に関する報告^{9,12)}は乏しい。

トレーニングに伴う断続的な骨格筋の収縮は、骨格筋細胞や腱などに微細な損傷を招く¹²⁾。こうした微細な損傷をいかに早期に回復に導くかが、筋機能の回復と超回復というトレーニング効果の獲得へつなげると考えられる。損傷により低下した筋機能の回復には、骨格筋組織幹細胞である筋衛星細胞の活性化が必須である^{2,8,21)}。しかし、組織幹細胞の活性化という観点から、各種処置法の影響についての検討はない。そこで本研究では、骨格筋に対する冷却療法 (冷却刺激) およびストレッチ (機械的刺激) の影響を検討した。

1. 方 法

本研究は、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」、「豊橋創造大学における研究に係る生命倫理に関する指針」および「豊橋創造大学遺伝子組換え動物実験安全規定」に従い、豊橋創造大学生命倫理委員会による審査・承認を経て実施された。

1.1 冷却刺激ならびに機械的刺激の影響

1.1.1 刺激条件および筋組織摘出

実験には、生後10週齢のC57BL/6J雄性マウスを用いた。マウスを対照群、冷却群および機械的刺激群の3群に分類した。冷却群のマウスは、麻酔下にて氷水に両下肢を10分間浸して冷却刺激を負荷した。この冷却方法により、マウスヒラメ筋の筋温は $36.7 \pm 1.0^\circ\text{C}$ から冷却直後で $14.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$ 、15分後に $22.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ になる。また、機械的刺激群のマウスも同様に麻酔下にて、足関節を最大背屈位に固定し、この肢位を10分間保持した。冷却および機械的刺激共に、負荷前、負荷直後および負荷終了15分後に対照群を含む3群全てのマウスよりヒラメ筋を摘出した。

1.1.2 分析方法

摘出したヒラメ筋は、即座に結合組織を除去し、筋湿重量を測定後、全RNAを抽出し、cDNAを作成した後にbasic fibroblast growth factor (bFGF) (5'-GTGCCAACCGGTACCTTGCTA-3', 5'-TCAGTGCCACATACTGGAG-3'), Pax7 (5'-ACTTCAAGCAGGTGACATCCACA-3', 5'-ACCCTCACGGGCAGATCATT-3'), HSF1 (5'-ACAGTGTCACCCGGCTGTTG-3', 5'-GACTGCACCAGTGAGATCAGGAA-3') の mRNA 発現を SYBR green I を用いたインターカラー法による RT-PCR 法 (タカラバイオ社製 Thermal Cycler Dice Real Time System) にて評価した。

1.2 細胞外刺激におけるストレス応答の役割

1.2.1 刺激条件および筋組織摘出

実験には、熱ショック転写因子1 (HSF1) を欠損したマウス (HSF1-KOマウス)¹¹⁾ ならびに HSF1 過剰発現マウス (HSF1-Tgマウス)⁶⁾ を用いた。また、HSF1-KOマウスの対照には wild type の ICR マウス (WT) を、HSF1-Tgマウスの WT には C57BL/6J マウスを用いた。

type の ICR マウス (WT) を、HSF1-Tgマウスの WT には C57BL/6J マウスを用いた。

A. 筋萎縮とその後の再成長

廃用性萎縮後の再成長について、HSF1-KOマウスを用いて検討した。マウスに2週間の後肢懸垂を施し、その後通常飼育に戻して2週間回復させた。懸垂前、懸垂直後および回復2週間後に両後肢よりヒラメ筋を摘出した。

B. 代償性肥大

協同筋腱切除に伴う筋肥大について、HSF1-Tgマウスを用いて検討した。マウス左後肢の腓腹筋および足底筋の腱を切除してヒラメ筋に過剰な負荷を掛け、処置後4週間後にヒラメ筋を摘出した。対側の右後肢ヒラメ筋を対照とした。

1.2.2 分析方法

摘出したヒラメ筋は、即座に結合組織を除去し、筋湿重量を測定後、筋組織を哺乳類組織用 lysis 溶液 (CellLytic™-MT, Sigma-Aldrich, St. Louis, 米国) を用いてホモジネートし、筋タンパクを抽出した。筋タンパク量を測定した後、heat shock protein 27d (HSP27d) の発現量を Western blotting 法により測定評価した。

1.3 統計学的解析

全ての測定値は平均 \pm 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. 結果

2.1 冷却刺激ならびに機械的刺激の影響

図1には、骨格筋における各 mRNA に対する冷却刺激ならびに機械的刺激の影響を示し

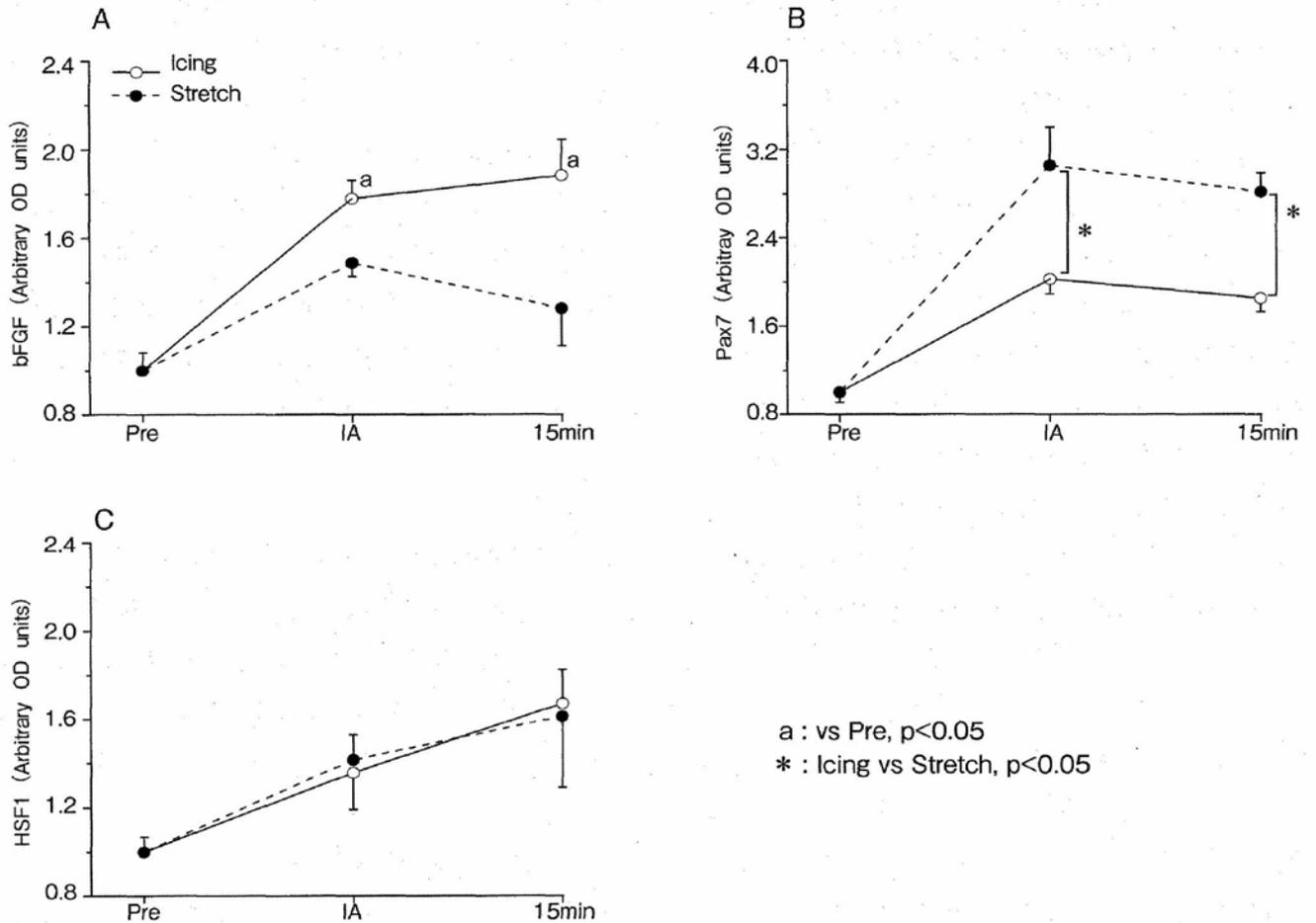


図1 Responses of basic fibroblast growth factor (A), Pax7 (B), and heat shock transcription factor 1 (C) mRNA expressions in soleus muscle to icing and stretch.

bFGF: basic fibroblast growth factor, HSF1: heat shock transcription factor 1, Pre: before the application of stress, IA: immediately after the application of stress, 15 min: 15 min after the application of stress.

た。冷却刺激により、ヒラメ筋におけるbFGF mRNA発現増加が観察された。刺激前に比して、冷却直後および15分後で有意に高値を示した ($p<0.05$)。しかし、機械的刺激では、刺激直後にbFGF mRNA発現が増加する傾向が認められたが、有意な変化ではなかった。Pax7 mRNA発現では、冷却刺激で発現が上昇する傾向を認めたものの有意な変化ではなかった。一方、機械的刺激では有意な発現増加が観察され、相互作用が認められた ($p<0.05$)。HSF1 mRNA発現は、両刺激共に有意な変化は認められなかった。

のヒラメ筋重量が懸垂前に比べてWTで約71%、HSF1-KOで約69%それぞれ減少した (図2)。萎

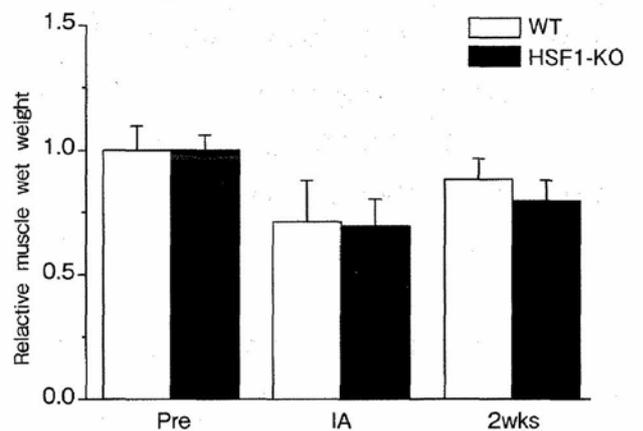


図2 Changes in the relative soleus muscle wet weight to body weight during the regrowth from unloading-induced muscle atrophy. WT: wild type mice, HSF1-KO: heat shock transcription factor 1-knock-out mice, Pre: before hindlimb suspension, IA: immediately after 2 weeks of hindlimb suspension, 2wks: 2 weeks of ambulation recovery

2.2 細胞外刺激におけるストレス応答の役割

A. 筋萎縮とその後の再成長

2週間の後肢懸垂により、体重当たりの相対

縮後2週間の回復によりWTで懸垂前の88%に回復したが、KSF1-KOでは79%までの回復にとどまった。懸垂前のヒラメ筋組織内HSP27dの発現量は、WTに比べてHSF1-KOで低値を示した。2週間の後肢懸垂により、両マウス共にHSP27dの発現量が低下し、2週間の回復で懸垂前のレベルまで回復した。しかし、HSF1-KOのHSP27d発現量の変化は、WTに比べて小さかった(図3)。

HSP27d

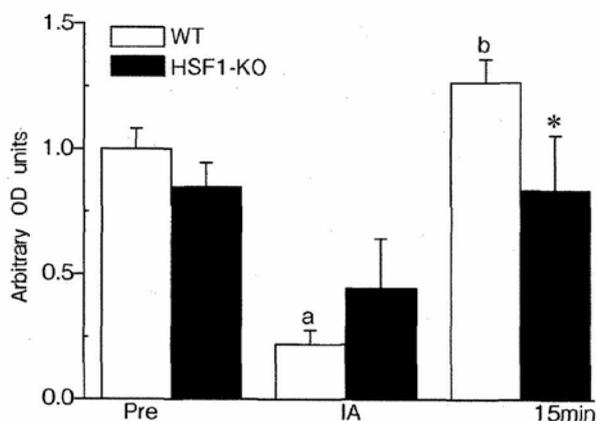


図3 Changes in the relative expression of heat shock protein 27d in soleus muscle during the regrowth from unloading-induced muscle atrophy

HSP27d: heat shock protein 27d. Other abbreviations are the same as in 図2

a : vs Pre, p<0.05, b : vs IA, p<0.05, * : vs WT, p<0.05

B. 代償性肥大

共同筋腱切除4週間後における体重当たりの相対的ヒラメ筋重量は、WTで約38%の増加が認められた(図4, p<0.05)。一方、HSF1-Tgでは約73%の増加が認められ(p<0.05)、WTに比べて有意に高値を示した(p<0.05)。ヒラメ筋HSP27d発現量では、処置前でHSF1-TgがWTに比べて有意に高値を示した(図5, p<0.05)。両マウス共に4週間の代償性肥大によりHSP27d発現量は有意に増加した(p<0.05)が、その増加率はHSF1-Tgで有意に大きいものであった(p<0.05)。

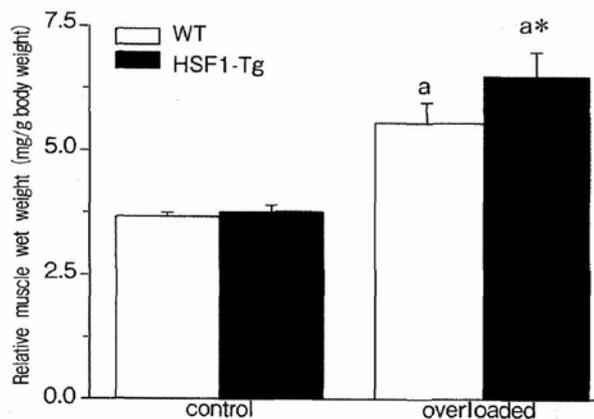


図4 Changes in the relative muscle wet weight to body weight of soleus muscle

WT: wild type mice, HSF1-Tg: heat shock transcription factor 1-transgenic mice, control: untreated collateral control, overloaded: functionally overloaded

a : vs control, p<0.05, * : vs WT, p<0.05

HSP27d

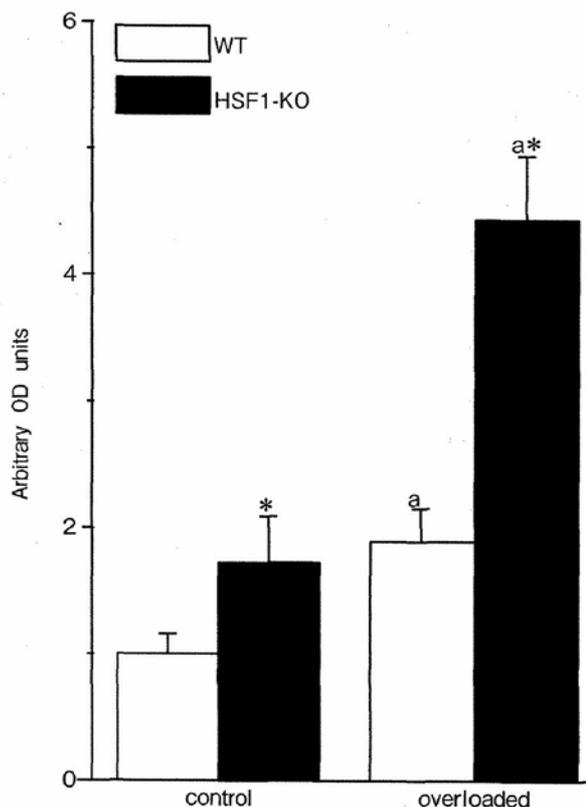


図5 Changes in the relative expression of heat shock protein 27d in soleus muscle

HSP27d: heat shock protein 27d. Other abbreviations are the same as in 図4.

a : vs control, p<0.05, * : vs WT, p<0.05

3. 考 察

本研究では、骨格筋に対する冷却ならびに機械的刺激の影響を検討し、冷却刺激はbFGF mRNAを、機械的刺激はPax7 mRNAの発現をそれぞれ増加させた。また、萎縮した骨格筋の再成長および骨格筋肥大がストレス応答により促進した。

bFGF

bFGFは線維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞など他の細胞に対しても増殖作用を持ち²⁰⁾、インスリン様成長因子と同様に筋衛星細胞を活性化する^{17, 19, 25)}。しかし、冷却刺激や機械的刺激が骨格筋におけるbFGF発現に及ぼす影響は明らかでない。本研究では、冷却刺激はbFGF mRNAの発現を増大させたが、機械的刺激には明らかな作用は認められなかった。一般に、骨格筋損傷の急性期には血管収縮による損傷血管へ血流および炎症反応の抑制などによる腫脹軽減を目的に冷却療法が選択される¹²⁾。しかし、冷却刺激による炎症反応抑制は、組織再生を遅延化することも予想される¹³⁾。その一方で、組織再生には血管の再構築などが必要であることから、bFGF発現増加は組織再生を促すことが示唆されている^{14, 25)}。本研究では損傷骨格筋を対象としておらず、この点は今後検討すべき課題であろう。また、機械的刺激により有意ではないがbFGF発現増加が認められており、刺激の強度など選択によっては機械的刺激も組織再生を促進できるかもしれない。

Pax7

Pax7は休止期および活性化した筋衛星細胞の核に発現することから、筋衛星細胞のマーカーとして用いられている^{13, 15, 16, 22, 26)}。骨格筋Pax7の発現増加すなわち筋衛星細胞数の増加は、骨格筋の肥大や再成長、あるいは損傷からの再生

時に認められる^{13, 15, 16)}。本研究では、機械的刺激によるPax7 mRNAの発現が増大した。骨格筋に対する負荷の増大は、筋衛星細胞数を増加させて、筋肥大を促す¹⁶⁾。したがって、本研究で用いた機械的刺激は筋肥大効果を持つものであったと考えられる。一方、冷却刺激でもPax7 mRNA発現は増加したが、有意な変化ではなかった。したがって、冷却刺激は筋衛星細胞数の増加には寄与しないと考えられた。

ストレス応答と骨格筋可塑性

温熱刺激などの細胞ストレスは、ストレス応答を惹起して細胞内にはheat shock proteins (HSPs)を誘導する²⁴⁾。温熱刺激を予め与えることで、荷重除去による骨格筋萎縮が抑制できること¹⁸⁾、温熱刺激により骨格筋肥大が起こること^{7, 23)}が報告されている。こうした温熱刺激の効果は、HSPsの分子シャペロン効果であると考えられている¹⁾。一方、骨格筋トレーニングも骨格筋内のHSPs発現を誘導する^{3, 4)}ことから、骨格筋の肥大にもストレス応答の関与が示唆されている^{21, 23)}。本研究では、HSF1-KOでは、荷重除去によって萎縮したヒラメ筋の再成長は部分的に抑制された。一方、HSF1-Tgでは、過負荷によるヒラメ筋の肥大が促進した。これらの結果は、骨格筋の量的増加におけるHSF1を介したストレス応答の関与を示唆すると考えられた。

HSPsは分子量によりファミリーを形成し²⁴⁾、HSPsの中でもHSP27はHSP70と同様に骨格筋活動により発現が誘導される¹⁰⁾。骨格筋におけるHSP70に関する報告は多数あるものの、HSP27についての詳細は明らかでない。骨格筋のHSP27は、nuclear factor of κ B (NF- κ B)の負の制御因子として作用し、骨格筋特異的ユビキチンリガーゼを阻害して廃用性筋萎縮を抑制することが報告されている⁵⁾。本研究では、萎縮後の再成長時ならびに筋肥大時においてWTのHSP27d発

現の増加が認められた。また、筋肥大が促進した HSF1-Tg では、HSP27d の発現増加も WT に比べて大きく、逆に再成長が抑制された HSF1-KO では HSP27d の発現誘導が抑制された。したがって、ストレス応答に伴う HSP27d の発現誘導は、骨格筋量の増加において重要な反応であると考えられた。したがって、ストレス応答を制御することでトレーニング効果を増大させたり、トレーニング後の回復を促進させることが可能となると考えられる。

4. まとめ

本研究では、骨格筋機能の回復に必須である組織幹細胞に対するコンディショニングとしての細胞ストレスについて検討した。本研究の結果、冷却刺激ならびに機械的刺激は、骨格筋細胞および組織幹細胞に異なる反応を惹起することが明らかとなった。冷却刺激はトレーニングや運動直後の筋損傷時に有効であり、機械的刺激は慢性期の筋再生におおて有効であることが示唆された。また、コンディショニングによる骨格筋機能の調整において重要な骨格筋タンパク合成には、ストレス応答が関与していることが示された。したがって、適切な骨格筋へのストレス刺激が、コンディショニングにおいて重要であ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。また、本研究で用いた遺伝子改変動物 (HSF1-KO および HSF1-Tg) ならびに抗 α -HSP27d 抗体は山口大学大学院医学研究科生体シグナル解析医学講座の中井彰教授より分与されたものである。ここに謝意を表します。本研究を実施するに当たりサポートをいただいた豊橋創造大学大学院健康科学研究科生体機能学分野教室員の

皆様に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Beckmann R.P., Mizzen L.A., Welch W.J.: Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248: 850-854 (1990)
- 2) Best T.M., Hunter K.D.: Muscle injury and repair. *Phys. Med. Rehabil. Clin. North Am.*, 11: 251-266 (2000)
- 3) Chilibeck P.D., Calder A.W., Sale D.G., Webber C.E.: A comparison of strength and muscle mass increases during resistance training in young women. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 77: 170-175 (1988)
- 4) Desplanches D., Ecochard L., Sempore B., Mayet-Sornay M.H., Favier R.: Skeletal muscle HSP72 response to mechanical unloading: influence of endurance training. *Acta Physiol. Scand.*, 180: 387-394 (2004)
- 5) Dodd S.L., Hain B., Senf S.M., Judge A.R.: Hsp27 inhibits IKK β -induced NF- κ B activity and skeletal muscle atrophy. *FASEB J.*, 23: 3415-3423 (2009)
- 6) Fujimoto M., Takai E., Hayashi T., Kitaura Y., Tanaka Y., Inoue S., Nakai A.: Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J. Biol. Chem.*, 280: 34908-34916 (2005)
- 7) Goto K., Okuyama R., Sugiyama H., Honda M., Kobayashi T., Uehara K., Akema T., Sugiura T., Yamada S., Ohira Y., Yoshioka T.: Effects of heat stress and mechanical stretch on protein expression in cultured skeletal muscle cells. *Pflügers Arch.*, 447: 247-253 (2003)
- 8) Grounds M.D.: Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications. *Curr. Opin. Neurol.*, 12: 535-543 (1999)
- 9) Guillodo Y., Saraux A.: Treatment of muscle trauma in sportspeople (from injury on the field to resumption of the sport). *Ann. Phys. Rehabil. Med.*, 52: 246-255 (2009)
- 10) Huey K.A.: Regulation of HSP25 expression and phosphorylation in functionally overloaded rat plantaris and soleus muscles. *J. Appl. Physiol.*, 100: 451-456 (2006)

- 11) Inoue S., Izu H., Takaki E., Suzuki H., Shirai M., Yokota Y., Ichikawa H., Fujimoto M., Nakai A.: Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.*, 279: 38701-38709 (2004)
- 12) Järvinen T.A., Järvinen T.L., Kääriäinen M., Aärimaa V., Vaittinen S., Kalimo H., Järvinen M.: Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 21: 317-331 (2007)
- 13) Kojima A., Goto K., Morioka S., Naito T., Akema T., Fujiya H., Sugiura T., Ohira Y., Beppu M., Aoki H., Yoshioka T.: Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J. Orthop. Sci.*, 12: 74-82 (2007)
- 14) Liu H.Z., Li Q., Yang X.Y., Liu L., Liu L., An X.R., Chen Y.F.: Expression of basic fibroblast growth factor results in the decrease of myostatin mRNA in murine C2C12 myoblasts. *Acta Biochim.*, 38: 697-703 (2006)
- 15) Matsuba Y., Goto K., Morioka S., Naito T., Akema T., Hashimoto N., Sugiura T., Ohira Y., Beppu M., Yoshioka T.: Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta Physiol.*, 196: 329-339 (2009)
- 16) Morioka S., Goto K., Kojima A., Naito T., Matsuba Y., Akema T., Fujiya H., Sugiura T., Ohira Y., Beppu M., Aoki H., Yoshioka T.: Functional overloading facilitates the regeneration of injured soleus muscles in mice. *J. Physiol. Sci.*, 58: 397-404 (2008)
- 17) Nagata Y., Honda Y., Matsuda R.: FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation. *Cell Struct. Funct.*, 35: 63-71 (2010)
- 18) 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)
- 19) Olwin B.B., Hannon K., Kudla A.J.: Are fibroblast growth factors regulators of myogenesis in vivo? *Prog. Growth Factor Res.*, 5: 145-158 (1994)
- 20) 恩田宗彦, 石渡俊行, 浅野伍朗: 内膜損傷血管の修復過程における basic fibroblast growth factor と vascular endothelial growth factor の役割. *脈管学*, 34: 233-241 (1994)
- 21) Seale P., Rudnicki M.A.: A new look at the origin, function, and "stem cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.*, 218: 115-124 (2000)
- 22) Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M.A.: Pax 7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102: 777-786 (2000)
- 23) Uehara K., Goto K., Kobayashi T., Kojima A., Akema T., Sugiura T., Yamada S., Ohira Y., Yoshioka T., Aoki H.: Heat stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn. J. Physiol.*, 54: 263-271 (2004)
- 24) Welch W.J.: Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.*, 72: 1063-1081 (1992)
- 25) Yablonka-Reuveni Z., Seger R., Rivera A.J.: Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J. Histochem. Cytochem.*, 47: 23-42 (1999)
- 26) Zammit P., Beauchamp J.: The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation*, 68: 193-204 (2001)