

学位論文題名

培養骨格筋細胞への純粹圧力刺激は
好氣的代謝活性を亢進する

学位論文内容の要旨

I 緒言

骨格筋はその活動中において、神経からの電氣的興奮による刺激のみならず、収縮や弛緩に伴う機械的刺激にも曝されている。その骨格筋に負荷される機械的刺激には、骨格筋が引っ張られることで生じる伸展刺激と、張力の発生に伴って筋内部に生じる圧力刺激の二つがある。これまでの研究において伸展刺激の作用として、骨格筋代謝および細胞内情報伝達の活性化、そして遺伝子発現の増強が発生することが報告されている。一方、もう一つの機械的刺激である圧力については、Ballard ら (J Appl Physiol 84: 1976-1981, 1998) が歩行運動や走運動中の骨格筋内部の圧力を測定し、動作中の活動筋内部では 180~270 mmHg まで圧力が上昇したと報告している。しかしながら、圧力負荷刺激の骨格筋組織に及ぼす生理学的小および生化学的作用についてはこれまでには検討されていない。Ballard らが報告したような高い圧力が負荷されていることや、筋内圧の上昇が張力発揮という骨格筋の活動期で発生することを考慮すると、何らかの生理学的小・生化学的作用を有していると推測される。そこで、本研究は人為的な圧力負荷が骨格筋の好氣的代謝に影響するかどうかを、培養骨格筋細胞を用いて空気による圧力負荷を行うことによつて検討した。

II 方法

培養骨格筋細胞はラット L6 骨格筋芽細胞を用いた。継代培養には一般的な培養条件である 5%CO₂, 37°C の条件下で 5% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を使用した。圧力負荷は当研究室で作成した圧力負荷装置を用いて、160 mmHg の大気圧を 37°C で 3 時間負荷した。

コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase, SDH) 活性は、可溶性ホルマザンの前駆体である WST-1 を用いた酸化還元反応に基づく比色定量法によつて測定した。

グルコースの利用を評価するために、2-[³H]-Deoxy-glucose (2-[³H]DG) の L6 細胞への取り込みを測定した。圧力負荷後、10 分間の 10 μM 2-[³H]DG (0.5 μCi/ml) の細胞内への取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

乳酸量は乳酸測定器を用いて測定した。細胞外への乳酸排出を圧負荷直後の実験用 DMEM の乳酸値から圧負荷直前の値を差し引いた値より算出した。また、細胞内の乳酸残存量は、圧力負荷後、細胞を一定量の培養液に回収し、細胞を超音波破壊し、細胞内液

を含む溶液の乳酸値より 1 dish 当たりの細胞内乳酸量を算出した。

細胞内情報伝達蛋白質は Immunoblot を用いて検討した。凍結融解によって L6 細胞の細胞膜を破壊し、その後、遠心分離によって細胞内可溶化分画を抽出した。細胞内可溶化分画を SDS-PAGE で展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、リン酸化 extracellular regulated-signal kinases (ERK) を認識する抗体を用いてリン酸化 ERK を検出した。

III 結果

圧力負荷を行った L6 細胞の SDH 活性は、圧力負荷を行っていない細胞の 2.6 倍に活性が亢進していた。2-[³H]DG の細胞内への取り込みも、圧力負荷によって 2.2 倍に亢進していた。

細胞外への乳酸排出は、圧力を負荷しない細胞で $6.8 \pm 0.7 \mu\text{mol/dish lactate}$ であったが、圧力を負荷した細胞では $3.7 \pm 0.5 \mu\text{mol/dish}$ と有意に乳酸排出が抑制されていた。細胞内の乳酸量は圧力負荷を行っていない細胞が $0.23 \mu\text{mol/dish}$ であったのに対し、圧力負荷細胞では $0.32 \mu\text{mol/dish}$ であり、圧力負荷を受けた細胞が有意に高値であった。しかし、細胞内乳酸量の差は乳酸排出量の差ほど大きくなく、細胞外への乳酸排出と細胞内乳酸量の総和は、圧力負荷を行った細胞で有意に小さい値であった。

細胞内情報伝達蛋白質である ERK のリン酸化体は圧力負荷によって有意に増加した。

IV 考察

身体活動中において活動骨格筋の内圧が上昇していることはこれまでも報告されているが、筋内で上昇した圧力の生理学および生化学的な作用については未解明であった。本研究はこの課題の解明を試み、その結果、圧力刺激は骨格筋細胞の SDH 活性およびグルコース取り込みを亢進し、また、乳酸生成を抑制することを明らかとした。これらの知見は圧力刺激が骨格筋細胞の好氣的代謝活性を亢進したことを強く示唆するものである。

圧力刺激が亢進した SDH 活性、つまり TCA 回路の活性は、おもに ADP/ATP 比によって調節されている。これを踏まえると、以下のような 2 つの圧力刺激による好氣的代謝の活性化機序が考えられる。ひとつは、神経刺激によって生じる筋収縮に伴う ATP 消費反応、具体的には、本実験で用いた細胞では、クロスブリッジの形成は起きないため Ca^{2+} などの細胞内物質の膜を介した輸送が亢進した可能性がある。二つ目の可能性としては、圧力刺激が収縮蛋白質なども含む蛋白質合成を促進したことが考えられる。L6 骨格筋筋芽細胞は筋線維 (myofiber) や筋管細胞 (myotube) に分化する性質がある。この過程では代謝が活性化し、多くの ATP も消費する。今回の実験では細胞増殖や肥大という細胞の成長に関わる細胞内情報伝達蛋白質である ERK が活性化しており、この結果は圧力刺激が蛋白質合成を促進したことを意味する可能性がある。現時点では、これらの可能性は推測であり今後の検討が必要であるが、以上の結果は、骨格筋収縮由来の代謝活性化メカニズムの解明に有用と思われる。

これまで骨格筋により産生される乳酸は解糖系の最終代謝産物としてのみ認識されてきたが、近年の研究では乳酸も TCA 回路の基質として利用されることが報告されている。本研究では、細胞内へのグルコース取り込みが亢進しているにもかかわらず細胞外への乳酸排出が抑制された。同時に、細胞内乳酸量も圧力刺激によって僅かであるが増加したことから、乳酸の産生低下ではなく、基質として利用された可能性が高いと考えられる。

以上の結果より、本研究では圧力刺激が骨格筋細胞の好氣的代謝活性を亢進したことを

明らかにした。そして、これらの知見は、筋収縮中の筋内圧上昇が骨格筋の代謝的反応もしくは骨格筋組織の適応を導く刺激の一つである可能性を提示し、骨格筋リハビリテーションや代謝性疾患の治療法としての運動療法について理論的根拠を与える可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 教 授 北 島 顕
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

培養骨格筋細胞への純粹圧力刺激は 好氣的代謝活性を亢進する

運動時の筋収縮によって生じる骨格筋代謝活性の亢進機序については、神経系による電氣的刺激やホルモンなどの化学的刺激の作用機序を検討することで研究が行われてきた。近年、筋収縮に伴って生じる機械的刺激のひとつである受動的伸展刺激が筋細胞内へのグルコースの取り込み亢進や細胞内情報伝達の活性化、そして遺伝子発現を惹起したことが報告されている。一方、筋収縮時には筋内圧が上昇しており、つまり圧力刺激が細胞に負荷されている。ヒトの歩行時および走運動時に測定されたもので、それぞれ 170 mmHg, 270 mmHg までの筋内圧上昇が報告されている。しかしながら、これまでにこの筋内圧上昇の生理学および生化学的影響については検討されていない。そこで、本研究は筋組織への圧力負荷が骨格筋好氣的代謝に影響するかどうかを、L6 培養骨格筋細胞を用いた圧力負荷実験にて検討した。L6 細胞への圧力は圧力負荷用のチャンバー内に細胞を設置し、チャンバー内の大気圧を高めることで負荷した。圧力は歩行時の内圧と同等である 160 mmHg とし、37°C で 3 時間負荷した。L6 骨格筋細胞への圧力負荷によって TCA サイクルの指標であるコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性は約 2.6 倍に亢進した。この SDH 活性は、伸展刺激阻害薬であるガドリニウムを添加した場合であっても約 2.9 倍まで亢進していた。また、細胞内への³H 標識グルコースの取り込みも圧力負荷によって約 2.2 倍に増加した。一方、嫌氣的解糖系の代謝産物として考えられている乳酸の細胞外への排出量は、圧力負荷によって減少していた。これらの結果より、骨格筋細胞への圧力負荷は好氣的代謝を活性化すると結論付けられる。さらに、圧力負荷による好氣的代謝活性化の意義を検討するために、圧力負荷の細胞内情報伝達蛋白質への作用を Immunoblot 法で検討した。その結果、圧力負荷によって L6 細胞の JNK および p38 は活性化が生じなかったが、ERK では活性化が認められた。ERK は細胞の成長や肥大への関与が示唆されていることから、筋細胞への圧力負荷によって生じた好氣的代謝活性化は細胞の成長を促進させるために生

じたと推測される。以上の結果の結論として、運動時の骨格筋内部で生じる圧力上昇が、運動時の骨格筋代謝活性化そして筋組織の適応の促進に関与する一因子であることが推察された。

質疑応答

1. 圧力負荷による L6 細胞の好氣的代謝活性化で生じたエネルギーが蛋白質合成に使用されるのかどうか：進行中の実験において、蛋白質合成阻害薬であるシクロヘキシミドを添加した状態の L6 細胞に圧力負荷を行い、SDH 活性への圧力負荷の作用を検討している。その実験では、ある程度の割合でシクロヘキシミドが SDH 活性を低下させている。そのため、圧力負荷によって生じたエネルギーはある程度蛋白質合成の促進に関係していると考えられる。
2. この圧力負荷の影響は圧力強度依存性なのか。また、他の圧力強度では変化があるのか：平滑筋細胞で行われた圧力負荷の実験では、240 mmHg まで圧力強度依存性の反応が報告されており、同様の実験方法なので、骨格筋細胞でも圧力強度依存性で反応が生じると考えられる。
3. 圧力負荷による細胞の反応には時間的、または圧力強度的な閾値が存在するのか：予備実験では 30 分以内の圧力負荷では代謝反応の亢進が認められなかったもので、時間的な閾値は存在すると考えられる。また、圧力強度についても同様と考えている。
4. この細胞にはグルコース輸送担体が存在しているのか。また、どのアイソフォームが主要な役割を果たすと考えるか：L6 骨格筋細胞には、GLUT1 と GLUT4 が発現していると先行研究で報告されている。生体内での筋収縮時には GLUT4 が主要な取り込み担体となるので、この実験でも GLUT4 が重要な役割を果たしたと考えられる。
5. インスリンでグルコース摂取を亢進した状態で圧力負荷を行った場合、この細胞はどのように反応すると考えられるか：骨格筋のグルコース摂取は生体内でインスリンと筋収縮の 2 つの刺激に依存している。また、それぞれの反応は一方に対し相加的に作用する。今回の実験条件では、インスリンを使用していないため、インスリン依存性のグルコース摂取に対し相加的に作用すると考えられる。
6. 細胞内の圧力刺激の受容器とは：圧力受容体は何らかの蛋白質であると考えられる。圧力刺激がその蛋白質の 3 次元構造を変化させることで、今回のような反応を示したと推測される。

この研究は、骨格筋の好氣的代謝活性化を導く新規因子の存在を証明した点で高く評価された。審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、また、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せ学位申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。