

氏名(本籍)	緒方知徳(熊本県)		
学位の種類	博士(学術)		
学位記番号	博甲第4121号		
学位授与年月日	平成18年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	骨格筋肥大と筋線維タイプの変化への熱ショックタンパク質72の関与		
主査	筑波大学教授	学術博士	西平賀昭
副査	筑波大学助教授	医学博士	大森肇
副査	筑波大学助教授	理学博士	武政徹
		博士(医学)	
副査	筑波大学助教授	医学博士	竹越一博

論文の内容の要旨

運動・スポーツにおいて、骨格筋は身体活動を支える最も重要な運動器である。骨格筋は収縮・弛緩を繰り返すことにより、機能的・形態的に大きく変化をみせる。これは、筋の肥大や遅筋化といった身体活動に対する生体の適応現象の一つであり、そのメカニズムを解明することはスポーツの競技力に直結した重要な問題であるにもかかわらず、未だ不明な点が多い。適応現象をもたらす運動・スポーツは、骨格筋に対して熱やフリーラジカル、機械的過負荷といった急性的なストレスを発生させる。骨格筋はこのようなストレスに対して熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein 72: HSP72)を著しく増加させることが報告されている。HSP72が骨格筋内でどのような機能を持っているかはよくわかっていないが、一般的にはHSP72は発生期ポリペプチドに結合し、成熟したタンパク質への3次元構造形成を補助する分子シャペロンとしての機能を持つことが報告されており、タンパク質形成に非常に重要であると考えられている。しかしながら、このHSP72のタンパク質合成に関する機能には特異性があるため、筋タンパク質に対してどのように機能しているかは明確ではない。そこで本論文では、運動によって起こるような筋の肥大(筋タンパク質の合成増加)や筋線維タイプの変化といった適応現象に対するHSP72の関与を検討することを目的とした。本論文では四つの研究課題を設定し、それぞれ異なる筋肥大のモデルに対するHSP72の発現応答を分析し、先行研究および各研究課題の結果から、HSP72の筋適応現象への関与を検討した。

《研究課題1：骨格筋の再生過程におけるHSP72の変化》

運動・トレーニングによって生じるような筋の損傷とその再生肥大におけるHSP72の関与を検討するために、筋の破壊をもたらす局所麻酔薬であるプリバカインをラットヒラメ筋に注入し、筋損傷とその後の回復過程におけるHSP72の変化を検討した。

その結果、筋損傷後の回復過程において、HSP72では筋線維の再生よりも早い段階で合成の増加がみられ、その後筋線維横断面積の回復様相と同様な推移で変化した。このような結果および分子シャペロンとしてタ

ンパク質の合成に関与しているという先行研究から、筋の再生過程において、HSP72は筋線維の形成、あるいは筋タンパク質の合成に関与することが推察された。

《研究課題2：骨格筋におけるHSP72の内因性発現と発育肥大に付随した変化》

骨格筋内におけるHSP72の発現が、ストレス以外の因子に影響を受けているかどうかを検討するために、外因性ストレスのほとんど無いラット胎児期下肢骨格筋におけるHSP72の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、胎児期から性成熟ラットまでのヒラメ筋、足底筋の発育過程におけるHSP72の発現変化と筋の肥大との関連性、ミオシン重鎖成分との関連性を検討した。

その結果、HSP72は胎児期のヒラメ筋および足底筋ですでに発現しており、その発現はI型ミオシン重鎖成分（type I myosin heavy chain: type I MHC）を発現している筋線維に特異的なものであった。ラット胎児期の骨格筋では外因性ストレスがほとんどなく、多重神経支配を受けていることから、異なる筋・筋線維間の収縮および代謝に差がないことが報告されている。このことから、HSP72の発現はtype I MHCを発現している筋線維を構成する因子と深い関連性を持つことが示唆された。また、発育におけるHSP72の発現量は、筋内のtype I MHC含量ならびにラットの身体活動量の変化と一致した推移を示した。これらの点から、早期発育過程におけるHSP72の発現は内因性・外因性両方の因子によって影響を受け、type I線維およびtype I MHCの筋内の量的変化と関連性を持つことが示唆された。

《研究課題3：クレンブテロール誘発性の速筋化を伴う骨格筋肥大におけるHSP72の発現変化》

研究課題2により、HSP72の発現がtype I線維およびtype I MHCの増加に関連性を持つことが示唆されたことから、HSP72のミオシン重鎖成分および筋の肥大への関与をさらに検討するために、速筋化（type II MHCの合成増加）と筋肥大をもたらす薬物であるクレンブテロール投与後のHSP72の発現とミオシン重鎖成分の変化、筋・筋線維の変化を比較検討した。

その結果、クレンブテロールの投与は、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の肥大とtype I MHCの減少およびtype II MHCの増加をもたらした。この時、type I MHCの減少が見られたヒラメ筋と腓腹筋の深層部でHSP72の発現量が減少した。このことから、HSP72がfastタイプの筋線維の肥大やtype II MHCの合成増加には関与していないであろうことが示唆された。

《研究課題4：代償性肥大骨格筋への甲状腺ホルモン投与によるミオシン重鎖およびHSP72の発現変化》

レジスタンス運動の擬似モデルとして、筋の肥大と遅筋化をもたらすラット下肢共動筋切除による足底筋への代償性過負荷を行った。さらに、この代償性過負荷によって起こる遅筋化を阻害することを目的に、ラット腹腔内への甲状腺ホルモン（T3）の投与を行い、HSP72の発現を分析することで運動に伴って起こるような適応現象（筋の肥大・遅筋化）に対するHSP72の作用を検討した。

その結果、足底筋への代償性過負荷は、筋の肥大とミオシン重鎖成分のslow方向への変化（type I MHCの増加）とともにHSP72の増加をもたらした。一方で、代償性過負荷を受けたラットへのT3の投与は、type I MHCとHSP72の増加を抑制した。このような結果は、HSP72の発現が代償性過負荷に伴うストレス応答のみならずtype I MHCの合成増加とも密接に関与していることを示しており、運動に伴って起こる筋の遅筋化（type I MHCの合成増加）にHSP72の発現増加が関与することが示唆された。

本論文では以上の四つの研究課題とその結果から得られた知見を基に、骨格筋においてHSP72は、筋の適応現象として起こるtype I MHCの合成増加に伴う筋の遅筋化や肥大に関与するであろうことを結論付けた。

審査の結果の要旨

本論文は、運動・トレーニングによって骨格筋内で起こる筋の肥大や筋線維タイプの変化に対して、骨格筋内に発現している HSP72 がどのような関与を持つのかを検討したものである。運動ストレスによって著しく発現が増加する HSP72 と筋の適応現象の関連性を検討することは、運動が生体に及ぼすメカニズムを解明する上でも非常に意義深いテーマである。これを解明するために本論文では四つの異なる筋肥大モデルを作成し、それぞれのモデルにおける HSP72 の発現応答を分析することでその機能を検討している。その結果、すべての実験モデルで一貫して HSP72 発現量は筋を構成する slow タイプの収縮タンパク質である type I MHC の合成量の変化と一致した変化を示すことを見出した。これは運動に伴い起こる適応現象である遅筋化に HSP72 が関わることを示唆する知見である。運動は、筋の収縮活動の増加に伴い筋をより持久力に富んだ筋（遅筋）へと変化させるが、これに HSP72 が関与するという知見は非常に重要な意味を持つ。一方で、本論文ではこれまでストレス誘発性の性質を持つとされていた HSP72 が、非ストレス依存的にも遅筋線維に発現することを明らかにした（研究課題 2）。これは、HSP72 と type I MHC の関連性を支持するとともに、本論文のオリジナリティーを高める上で非常に重要なデータであった。

審査では、HSP72 と type I MHC の関連性を直接的に証明することはできないかという意見もなされたが、この問題を解決するためには遺伝子レベルでのノックアウトモデル等を作成する必要があると、技術的にも非常に難しい。これに対し本研究では多くの実験モデルを用いることで HSP72 と type I MHC の関連性を強く支持しており、信頼性の高いデータであると判断された。

以上のように、本論文は運動・トレーニングに関連した骨格筋適応メカニズムにおいて重要な知見を提示しており、体育科学分野において有益なものであると高く評価された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。