

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト骨格筋における熱ショックタンパク質の加齢変化と熱ストレス応答  
氏名 山口鉄生

通常生体は環境の変化へ適切に応答することができる。時々刻々と変化する環境からの刺激（ストレス）に対して、生体はその恒常性を維持する方向で応答している。しかし、加齢に伴い出現する生体の変化（運動量の低下、慢性・炎症性疾患の出現、性ホルモンの変化、酸化ストレスの影響など）は、高齢者のストレスへの応答能力の低下を示しているものと考えられる。未曾有な少子高齢化を迎える人類社会では、これらの加齢に伴うストレス応答の減退を解消する適切な方法を明らかにすることが求められている。生体のストレス応答には多くの分子や、シグナル伝達系が関与することが明らかにされている。その中でも、タンパク質の恒常性を維持するために必須な熱ショックタンパク質 (heat shock proteins; HSPs) やシグナル伝達系である Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) が重要な役割を担っていると考えられている。

運動器（骨、軟骨、筋、靭帯）は加齢に伴い、変形性関節症や筋腱炎などをおこし、生活の質(Quality of life)の低下をもたらす。これらの疾患に対しては、症状の程度によって種々の治療（薬物、運動など）が適用されるが、実際には温熱療法が用いられることも多い。一般的に、温熱療法の効果は加温に伴う組織の血流の改善に組織によってもたらされると考えられている。しかしながら、血流の影響に依存しない熱作用が細胞自体へどのような効果を及ぼすのかについて詳細な報告はこれまでほとんど見られていない。

生物に対して通常有害な作用を示すストレスや薬物が、微量であれば逆に生理的な刺激作用を示す場合がある。この生理的的刺激作用を Hormesis という。ギリシャ語の *horme* は to excite を

意味しており、微量のストレスであれば生体に有益な効果をもたらすという生物の普遍的な適応応答効果を表している。Hormesis の効果（Hormeric 効果）を引き出す要因としては、放射線、カロリー制限、熱、アルコール、運動などが知られており、その具体的な作用としては、細胞内においてタンパク質の合成・分解を亢進し、細胞の増殖、分化を適切に維持する影響が報告されている。高齢の動物由来の細胞では修飾されたタンパク質が蓄積しているが、Hormesis によってプロテアソーム系などのタンパク質分解系の機能を促進することで、細胞の抗加齢効果を有することが報告されている。本研究では筋組織に着目し、加齢に伴う細胞のストレス応答低下のメカニズムについて検討するために、HSPs の中で筋組織に多く発現している sHSPs とそのリン酸化を制御する MAPKs の発現様式の変加齢変化について検討した。また、医療の現場で実際に使用されているマイルドな熱ストレスの作用に注目して、恒温動物の筋分化と筋管の形態へ及ぼす影響について調べた。恒温動物の骨格筋培養細胞として、ヒト筋芽細胞、C2C12マウス筋芽細胞、鶏初代培養細胞を用いた。

哺乳類の HSPs の中で、低分子量熱ショックタンパク質 (small HSPs; sHSPs) は骨格筋に恒常的に発現している。安静時状態におけるヒト外側広筋について sHSPs (HSP27 と  $\alpha$ B-crystallin) のリン酸化と細胞内分布の加齢変化についてウエスタンブロット法で調べた。また sHSPs のリン酸化を担っていると考えられている上流のリン酸化酵素である、p38 MAPK、MAPK-activated protein kinase-2、extracellular-signal regulated kinase-1/2 についても調べた。対象は整形外科手術を予定していた若年グループ (15-38歳)、高齢グループ (51-78歳)、それぞれ9人とした。sHSPs のタンパク質レベルは、若年と比較すると高齢群の不溶性分画において高値を示した。sHSPs のリン酸化状態も高齢群の可溶性、不溶性、それぞれにおいて増加していた。さらに、sHSPs のリン酸化の上流であるリン酸化酵素の活性も高齢群において増加していた。また、一般的に加齢に伴うプロテアソームの機能低下により修飾 (ユビキチン化、酸化、糖化など) されたタンパク質が蓄積すると、それらはプロテアソームの機能をより阻害してさらに不溶性分画へと蓄積する。今回の結果では、高齢群の骨格筋でポリユビキチン化タンパク質が集積していた。加齢による酸化ストレスや炎症反応の増加が報告されており、加齢による生体内のメカニズムの変化が、MAPKs の活性化や sHSPs のリン酸化や集積に影響していると考えられる。

筋管形成に対する熱ストレスの直接的な影響を調べたところ、ヒトの骨格筋初代培養細胞と C2C12 マウス筋芽細胞では、39°C で筋芽細胞の融合と伴に筋管形成が促進され、さらに筋管が拡張していた。鳥類 (鶏胚) は体温が 41°C であるが、鶏胚筋芽細胞も 2°C の温度上昇により筋管の拡張が観察され、およそ 2°C の上昇による筋管径の増加は恒温動物において普遍的な現象である事を明らかにした。2°C の温度上昇による遺伝子の変化について、1例ではあるがヒト筋芽細胞を用いて DNA マイクロアレイで調べたところ、抗アポトーシス作用を有する B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) の発現量の増加、myosin heavy chain (MYH) 7 (骨格筋遅筋型ミオシン)

の発現量の増加、MYH1（骨格筋速筋型ミオシン）の減少が観察された。熱ストレス（2°Cの温度上昇）後に観察された筋管径の増加は、遅筋線維への細胞特性の促進が示唆された。さらに、熱ストレス後のC2C12細胞における変化をウェスタンブロット法で調べたところ、不溶性分画でのmyogeninの発現量が増加していた。myogeninは遅筋線維で多く発現することから、今回の筋管拡張は筋管の遅筋化を伴っている可能性がある。2°Cの温度上昇というマイルドなストレスによりmyogeninによる筋芽細胞融合と最終分化の促進、MYHのアイソフォームの変化、Bcl-2による抗アポトーシス作用などの変化がもたらされ、筋管拡張が誘導されたと考えられる。今回得られたこれらの変化について、今後さらに詳細な解析を行う予定である。

骨格筋においては、加齢変化によるミトコンドリアの減少や機能低下が報告されている。ミトコンドリアの機能低下は、エネルギーを必要とする骨格筋のタンパク質の恒常性維持の低下や、インスリン抵抗性の増大につながる。加齢に伴う筋のMYHのアイソフォームの変化については一定の見解は得られていないが、マイルドなストレスによりMYH7の増加、即ち遅筋化を促すことは、ミトコンドリアの減少や機能低下という加齢変化に対しては抗加齢的な効果であり、**Horneric** 効果を有するのではないかと考えられる。また、本研究の結果、高齢者では安静時にすでに沈殿分画におけるsHSPsの上昇を伴ったMAPKsの活性化上昇が観察された。持続的持久性運動を定期的に習慣づけることで、MAPKsのストレス応答が改善することが報告されており、本研究の結果から安静時のMAPKsの活性化を減弱させることが重要であることが示された。今後は、適応能の高い骨格筋の加齢を予防するという観点から、個人に適したマイルドなストレスがあることを科学的に提示すること、そして温熱負荷も含めて**Horneric** 効果を引き出す生活を構築・実践していくことがきわめて重要となってくるであろう。