

温熱療法は筋疲労を予防するか

— 温熱負荷が筋細胞のエネルギー代謝、Ca イオン動態に及ぼす影響 —

西 田 昌 司

Does Thermotherapy Prevent Muscle Fatigue?

— The Effects of Hyperthermia on Energy Metabolism and Ca Movement of Muscle Cells —

NISHIDA Masashi

要 旨

背景

デスクワークの増加やスマートフォンの頻用により、肩こりや腰痛、眼精疲労などの筋疲労が増加している。その回復方法として温熱療法がよく用いられ、血流の改善や神経系のリラックス効果が報告されているが、筋肉への直接的な効果は明らかにされていない。

目的

温熱療法が直接筋肉に作用して疲労を予防するかを、C2C12（マウス骨格筋由来筋芽細胞）の温熱負荷モデルを用い、温熱が筋細胞のエネルギー代謝と Ca イオン動態に及ぼす影響から検討した。

方法、結果

42°Cでの細胞培養は、C2C12に熱ショック蛋白70を誘導したことより、温熱負荷が筋細胞に直接作用し、ストレス応答を惹起することが示された。温熱負荷は、ミトコンドリアの好氣的代謝を亢進し、嫌氣的代謝による乳酸産生を抑制した。また、温熱負荷は筋小胞体の ATP 依存性 Ca ポンプを活性化し、細胞質から小胞体への Ca イオンの回収を促進した。

結論

以上より、温熱負荷は筋細胞のエネルギー産生効率を上昇させ、細胞質の Ca イオン濃度を低下させることにより、弛緩を促進することが明らかとなった。従って、温熱療法は筋細胞のエネルギー産生と Ca イオン動態に直接作用することにより、筋疲労を回復させる可能性が示唆された。

キーワード：熱ショック蛋白70、好氣的代謝、Ca ポンプ

Abstract

Rationale

Increases in VDT work and smartphone use increase the incidence of muscle fatigue, such as lower back pain, shoulder stiffness, and asthenopia. Thermotherapy is frequently used to recover from muscle fatigue. It is supposed to improve blood flow and to induce neurological relaxation. However, whether hyperthermia directly affects the physiology of muscle cells is not elucidated.

Objectives

To investigate the direct effect of thermotherapy on muscle tissue, I examined the effect of hyperthermia on energy metabolism and Ca ion movement of cultured C2C12, myoblast cells isolated from mouse skeletal muscle tissue.

Methods and results

Cell culture at 42 °C induced heat shock protein 70 (HSP70) in C2C12 indicates that hyperthermia affected directly on the muscle cells and caused stress response. Hyperthermia augmented aerobic metabolism in mitochondria and decreased lactate production by anaerobic metabolism in the cytosol. Ca ion uptake to the endoplasmic reticulum by ATP dependent Ca pump was also promoted by hyperthermia.

Conclusions

These results indicate that hyperthermia improves the efficiency of energy metabolism and Ca ion movement of muscle cells directly and promotes muscle relaxation. Therefore, thermotherapy is supposed to improve muscle fatigue through the improvement of energy metabolism and Ca ion handling of muscle tissue.

Keywords: HSP70, aerobic metabolism, Ca pump

背景

筋疲労の動向

骨格筋はヒトの体重の約40%を占める最大の臓器で、運動や姿勢の維持、さらに体温の産生などの重要な機能を担っている¹⁾。一方、重量物の運搬や長距離走のように強度が強く持続が長い運動は、筋疲労を惹起して筋肉の機能不全をもたらす。近年、運動時の四肢の筋疲労のみならず、生活習慣の変化によって様々な筋疲労を自覚するようになった。長時間のデスクワークによる姿勢の維持は、腰痛や肩こりなどの体幹の筋疲労を起こす。また VDT 作業やスマートフォンの普及と頻用は、ストレートネックや眼精疲労など頸肩部や眼部の筋疲労の原因となっている。骨格筋は随意筋であるため、筋収縮は神経によって筋肉が刺激されることにより開始する。そのため、長時間にわたる筋肉の活動では、神経-筋接合部において神経が持続的に活性化されるために神経伝達物質が枯渇し、筋細胞の収縮が開始されずに筋疲労の状態となる。また、長時間の筋収縮によって、筋組織の血管が圧迫され続けることも原因となる。筋肉は収縮のために多くのエネルギーを消費する。圧迫によって血液循環が悪化すると、エネルギー産生源として栄養素の供給が低下し、筋細胞が収縮できなくなる。また、血流は自律神経系によっても調節されているため、主観的な疲労感の増加によって自律神経系の失調が生じると、血管は収縮してエネルギー供給がさらに低下する。

一方、筋細胞自体の変化が筋疲労を生み出す場合もある。骨格筋細胞の収縮は神経-筋接合部の神経末端から放出された神経伝達物質が、筋細胞の受容体である Ca チャネルに結合することから始まる。細胞膜の Ca チャネルを介して筋細胞外から流入した Ca イオンは、筋小胞体の Ca チャネルを刺激し、さらに大量の Ca イオンが小胞体から細胞質に放出される。細胞質の Ca イオン濃度が上昇すると、骨格筋細胞の横紋構造を作る収縮蛋白質であるアクチン線維とミオシン線維が結合し、ミトコンドリアの好氣的代謝で産生した ATP のエネルギーを用いてミオシン頭部がアクチン線維上を滑ることにより、筋細胞の収縮が生じる。その後、Ca イオンが小胞体内に汲み上げられることによって細胞質の Ca イオン濃度が低下すると、ミオシン頭部がアクチン線維から離れることにより、筋細胞の弛緩が起こる。従って筋細胞が正常に収縮・弛緩を繰り返すには、細胞内での Ca イオンの動態、収縮蛋白質の量と構成、好氣的代謝による ATP 産生の3つが重要となる²⁾。逆に筋疲労では、筋小胞体への取り込みが阻害されて細胞質に Ca イオンが滞留したり、収縮蛋白質の質的・量的異常によって筋線維のアセンブリーが傷害されたり、好氣的代謝が減少して嫌氣的代謝が増加することによって ATP 産生量が低下し乳酸産生が増加したりする。乳酸の増加による酸性化は、収縮蛋白質の構造異常をさらに悪化させる。

筋疲労と温熱

このような筋疲労を回復させる方法として、ストレッチやマッサージなどが用いられている。これらの理学療法は、筋肉を直接刺激して血流を回復させたり自覚的な疲労感を低減させる効果を持つが、作用機構は明らかでない。一方、温浴は日本人にとって身近な生活習慣であるとともに、疾患の治療法としても古くから用いられてきた³⁾。温浴の作用機構としては、含有成分による化学的な作用と物理的な作用として静水圧や浮力、さらに温熱が挙げられる⁴⁾。近年では温熱に特化したサウナやホットパックなども、温熱療法として利用されている。特に心疾患では温熱刺激を用いた和温療法が実用化されており、慢性心不全を改善することが報告されている⁵⁾。骨格筋においても、温浴やサウナによって筋疲労が早く回復したり、筋疲労に対する耐性を増加させるという報告もなされている⁶⁾。

温熱が筋疲労の改善に有効な原因としては、血管拡張による血流量や血流速度の増加、自律神経刺激によるリラックス効果が挙げられる。しかしラットでは、温熱刺激により廃用性筋萎縮が抑制され筋肉が肥大することも示されており⁷⁾、温熱が筋細胞自体に影響を与える可能性も考えられる。細胞レベルでは、ストレスとしての温熱刺激に対して恒常性を維持する様々な機構が明らかとなっている⁸⁾。細胞膜には温度感受性 TRP チャンネルが存在し、これが温熱刺激に対する受容体として働くことも報告されている⁹⁾。温熱刺激によって TRP チャンネルが活性化されると、様々なストレス応答を惹起する。その一つである小胞体ストレス応答では、温熱により変性した蛋白を小胞体に蓄積して処理する際に、変性蛋白質輸送や修復に働く熱ショック蛋白 (HSP) の転写が活性化される¹⁰⁾。温熱負荷に対する HSP 発現による応答は原核生物から広くヒトに至るまで保存されているが、温熱刺激が実際に筋細胞に直接的な効果を発揮し、筋疲労の回復を促進するのかは不明である。

本研究では、温浴が筋肉に直接作用して筋疲労を回復させるかを、マウス骨格筋由来の筋芽細胞 (C2C12) の温熱負荷モデルを用いて検証した。そのため、まず C2C12 の筋細胞への分化と温熱負荷プロトコールを確認した後、温熱負荷が筋細胞に与える影響をエネルギー産生と小胞体の Ca イオン取り込みの2つを指標に検討した。

方 法

筋芽細胞の温熱負荷モデルの作成

骨格筋組織から単離し継代されてきた C2C12 は、線維芽細胞様の形態を示し、10%牛胎仔血清を含む増殖培地中で活発な対数増殖を示す。サブコンフルエントに達した後に2%馬血清を含む分化培地に交換して培養を継続すると、1週間後には筋細胞が融合を始め、2週間後には複数の核を持った筋管構造を示す骨格筋へと分化していることが確認できる (図1)。

温熱負荷が実際に培養筋細胞にストレスを与え、細胞のストレス応答を惹起しているかは、ストレス蛋白質としての熱ショック蛋白70 (HSP70) 発現で確認した。C2C12 を CO₂ インキュベーターで通常の5%CO₂、37℃の条件で培養した後、庫内温度を42℃に上昇させる。15分から2時間の温熱負荷を加えた後に37℃に戻し、直後から24時間後に細胞から蛋白質を回収

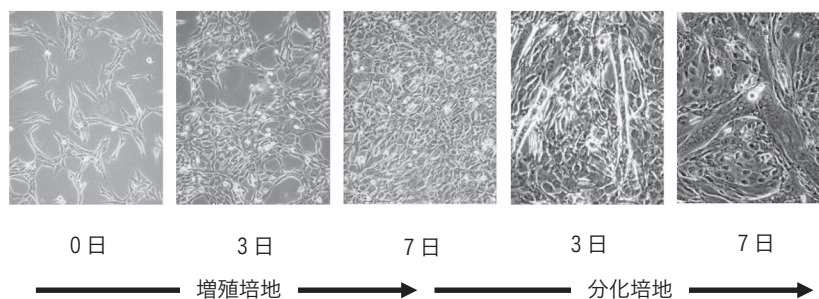


図1 C2C12の増殖と分化

し、アガロースゲル電気泳動で分子量別に分別した。蛋白質を PVP メンブレンにウェスタンブロッティングした後に酵素標識抗 HSP70 抗体で免疫染色し、発光法を用いて検出した。

好氣的・嫌氣的代謝の測定

今回、温熱負荷が筋細胞の好氣的代謝と嫌氣的代謝に及ぼす影響を、WST-1 試薬を用いて検討した。テトラゾリウム塩を含む WST-1 試薬は、 NAD^+ から NADH への還元反応と共役させるとホルマザン色素を産生する。生細胞に WST-1 試薬を添加すると、ミトコンドリアの電子伝達系の還元反応による NAD^+ から NADH への還元と共役し、ホルマザン色素の産生量によって好氣的代謝活性を測定することができる。また WST-1 試薬を細胞培養上清と乳酸脱水素酵素存在下で反応させると、細胞が産生した乳酸の酸化による NAD^+ から NADH への還元と共役し、乳酸産生量を測定することができる。その結果、嫌氣的代謝の活性も評価可能である。

ATP 産生量の測定

ATP 産生量の測定には、ホタルルシフェラーゼによる化学発光法を用いた。ルシフェラーゼは、ATP から AMP への脱リン酸反応と共役してルシフェリンからオキシルシフェリンへの酸化反応を触媒する。従って、オキシルシフェリンの化学発光を測定することにより、ATP 量を定量することが可能である。

細胞内 Ca イオン濃度の測定

細胞内 Ca イオン濃度の検討には、Ca イオン感受性蛍光色素 Fluo4 を用いた。Fluo4 は Ca イオンと結合すると緑色の蛍光を発する。従って Fluo4 を取り込ませた細胞に励起光を照射し、生じた蛍光の強度を測定することにより相対的な細胞質の Ca イオン濃度を定量することが可能である。

結果

温熱負荷が筋細胞の HSP70 発現に及ぼす影響

42℃の温熱負荷を加えると、分子量 70 kDa の位置に HSP70 特異的なバンドを検出したことより、C2C12 は温熱負荷によりストレス応答を起こしていることが確認できた (図 2)。HSP70 は、30分間の温熱負荷によって発現を開始し、以後 2 時間まで、負荷時間に比例して発現量が増加した。一方、HSP は負荷直後から検出可能であったが、12時間をピークに発現が増加し、24時間では若干の発現量の減少を認めた (図 3)。

以上より、温熱負荷は負荷時間依存性にストレス蛋白質の HSP70 を筋細胞に誘導するが、その持続は約 1 日であることが明らかとなった。HSP70 は分子シャペロンとして働き、ミトコンドリアへの物質輸送やミトコンドリア膜への蛋白質組み込みを補助することが知られている。温熱負荷が筋細胞に HSP70 を誘導したことから、筋細胞はストレス応答としてミトコンドリアを活性化し、エネルギー産生を亢進させている可能性が示唆される。

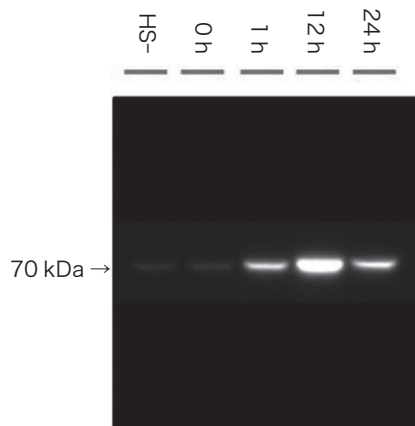


図 2 HSP70 の検出

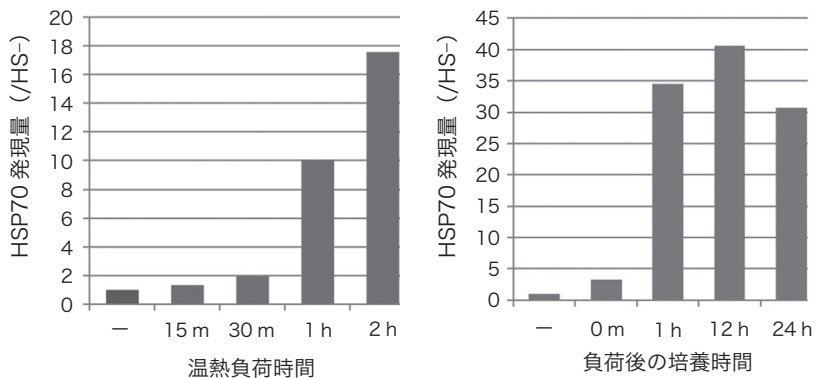


図 3 温熱負荷 (HS) による HSP70 の発現

温熱負荷が筋細胞のエネルギー産生系に及ぼす影響

筋細胞のエネルギー産生は、ミトコンドリアにおける好氣的代謝と細胞質における嫌氣的代謝によって行われる。好氣的代謝が活発な細胞では酸素を利用してより多くのエネルギーを産生することができるため、疲労しにくい筋肉となる。一方、嫌氣的代謝は酸素の少ない条件でもエネルギーを産生できるが、エネルギー産生量は少なく、さらに副産物として乳酸が産生されるために筋疲労が発生しやすくなる。HSP70は細胞質からミトコンドリア内膜へ好氣的代謝を担う電子伝達系の蛋白質群を輸送するため、温熱負荷によるHSP70誘導は好氣的代謝を亢進し、筋疲労の原因となる嫌氣的代謝は抑制する可能性が考えられる。

まず、C2C12に温熱負荷を加えた後にWST-1試薬を添加し、電子伝達系の活性を測定した。15分から2時間までのいずれの温熱負荷群においても、温熱負荷をかけない群(HS-)と比較して、負荷直後には有意な吸光度の上昇が認められた。しかし負荷後に時間が経過するに従って、吸光度は減少した(図4)。従って、温熱負荷は電子伝達系を活性化することによって好氣的代謝を亢進させることが示された。

次に、C2C12の培養液を回収し、WST-1試薬を用いて筋細胞の乳酸産生量を測定した。培養上清中の乳酸濃度がC2C12の培養時間依存性に増加していることから、嫌氣的代謝の副産物としての乳酸が測定できていることがわかる。C2C12に温熱を負荷し、負荷2時間後に培養上清を回収して乳酸産生量を測定すると、負荷時間に依存して乳酸産生量が減少した。2時間の温熱負荷では、温熱負荷を加えない群と比較して乳酸濃度が約50%と有意な減少を示した(図5)。従って、温熱負荷は、C2C12の嫌氣的代謝を抑制することが明らかとなった。

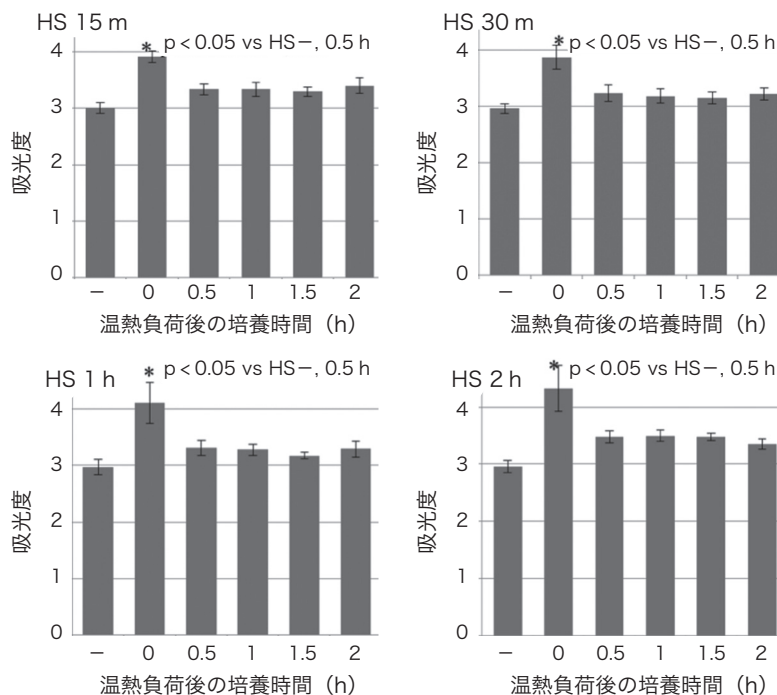


図4 温熱負荷 (HS) が電子伝達系に及ぼす影響

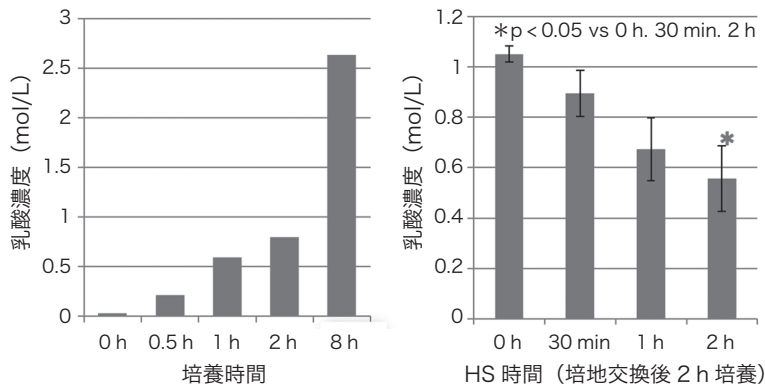


図5 温熱負荷 (HS) が乳酸産生量に及ぼす影響

これらの結果は、C2C12 に対する温熱負荷は負荷時間依存性にミトコンドリアの好氣的代謝を亢進するとともに、細胞質における嫌氣性代謝を抑制することを示唆する。エネルギー代謝に及ぼす温熱負荷の効果は負荷直後から 2 時間までの比較的短時間で発揮されるのに対し、ストレス蛋白質 HSP70 は負荷後 12 時間にかけて発現が増加することから、シャペロン蛋白質としての HSP70 誘導とは異なるメカニズムが代謝系の制御には関与している可能性が示唆される。

温熱負荷が筋細胞の ATP 産生に及ぼす影響

このような温熱負荷による細胞質の嫌氣性代謝の抑制とミトコンドリアの好氣的代謝の亢進が、最終的なエネルギー源としての ATP 産生量に及ぼす影響を検討した。

C2C12 に 15 分から 2 時間の温熱負荷を加え、負荷直後から 6 時間にかけて ATP を抽出してルシフェリンとルシフェラーゼを添加し、ATP 産生量を検討した。図 6 に示すように、いずれの温熱負荷時間でも、負荷 30 分後から 1 時間後に ATP 産生量が増加し、6 時間後には減少する傾向を示したが、測定値のばらつきが大きく、有意差は認められなかった。高エネルギー化合物の ATP は反応性が高く、細胞からの抽出過程で分解が起こりやすいため、今回の検討では再現性のあるサンプリングに至らなかったことが測定誤差の原因となったと考えられる。

温熱負荷が筋細胞の細胞内 Ca イオン動態に及ぼす影響

以上のような温熱負荷のエネルギー代謝に及ぼす影響が筋細胞の収縮・弛緩特性にどのような影響を与えるかを、収縮・弛緩の調節因子である Ca イオン動態に着目して検討した。

図 7 a) に示すように、C2C12 に Fluo4 を取り込ませた後にカルシウムイオノフォア A23187 を添加すると、A23187 を通って細胞内に流入した Ca イオンが小胞体の Ca イオン感受性 Ca チャネルを活性化する。その結果、小胞体から大量の Ca イオンが放出され、細胞質 Ca イオン濃度が急激に上昇し (①)、筋収縮が引き起こされる。その後、Ca イオンは ATP のエネルギーを使った Ca ポンプの働きにより小胞体に回収されるため、細胞内 Ca イオン濃度は減少し (②)、筋細胞は弛緩する。最後に観測される蛍光強度の上昇 (③) は、A23187 によって生じる非生理的な膜障害により、細胞外から流入する Ca イオンによるものである (図 7 b))。

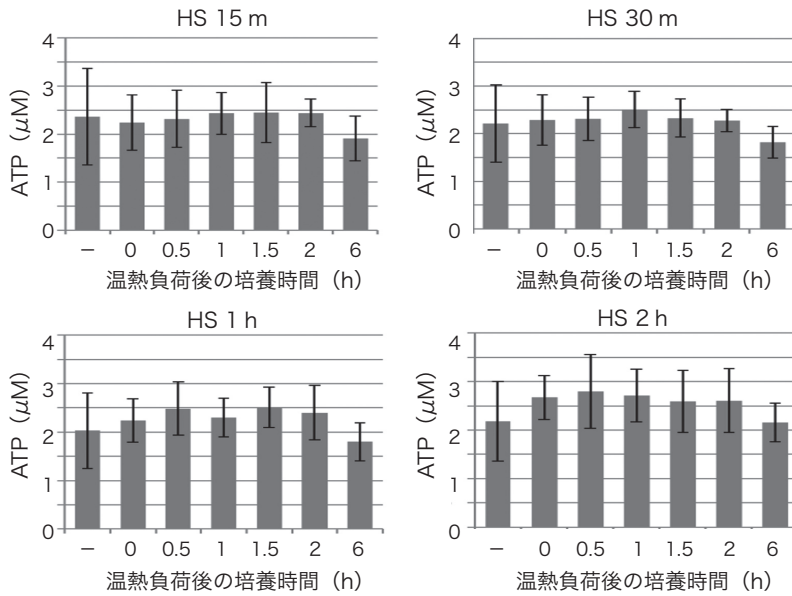


図6 温熱負荷 (HS) が ATP 産生に及ぼす影響

a) C2C12 + Fluo4

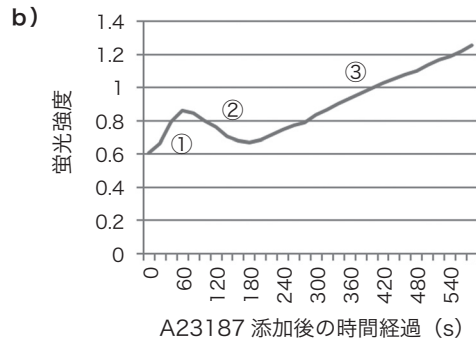


図7 細胞内 Ca イオン濃度の測定

従って本実験では、蛍光強度の下行脚 (②) の勾配で ATP を用いた小胞体への Ca イオン取り込みを測定することにより、温熱負荷によるエネルギー代謝の変化が筋肉の収縮・弛緩特性に及ぼす影響を評価した。C2C12 に15分から2時間の温熱負荷を加え、Fluo4 を取り込ませた後に A23187 で刺激し、刺激直後から4.5時間後にかけて蛍光強度を測定した。温熱負荷を加えない群と比較すると、15分から1時間のいずれの温熱負荷群においても、温熱負荷直後から1.5時間にかけて蛍光強度から算出した Ca イオン回収速度が増加した。しかし Ca イオン回

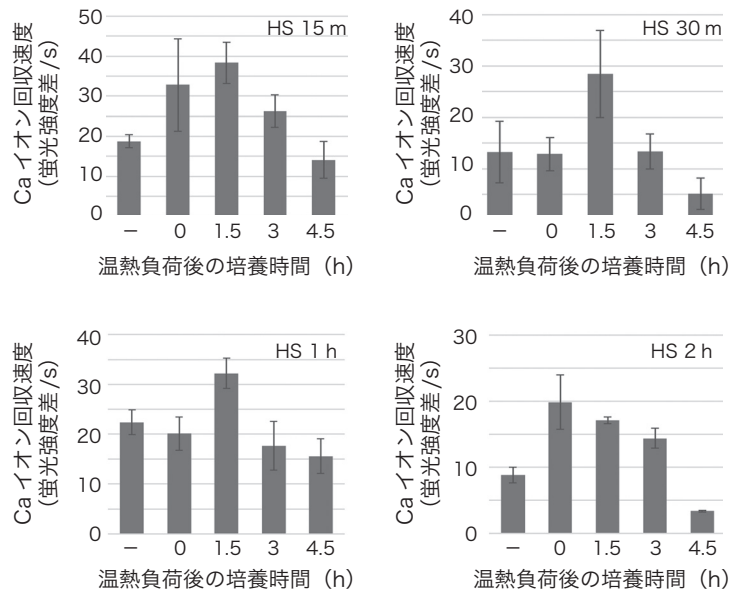


図8 温熱負荷 (HS) が細胞内 Ca イオン濃度に及ぼす影響

収速度は、15分から2時間のいずれの群においても、その後4.5時間にかけて減少した。2時間の温熱負荷では短時間の温熱負荷よりも早く、負荷直後から Ca イオン回収速度が増加した (図8)。

以上の結果から、温熱負荷による好氣的代謝の亢進は、エネルギーを必要とする小胞体への Ca イオン取り込みを介して筋弛緩を促進する可能性が示された。従って、温熱負荷は次の筋収縮への準備を整えることにより、疲労することなく収縮・弛緩を繰り返す筋細胞を作ることが示唆される。

考 察

温浴が筋疲労の予防・回復に有効であるかを、培養骨格筋細胞 C2C12 の温熱負荷モデルを用い、筋細胞のエネルギー代謝、Ca イオン動態を指標として検討した。42°C の温熱負荷は筋細胞にシャペロン蛋白質の HSP70 を誘導したことより、細胞のストレス応答を惹起したことが示された。HSP70 はミトコンドリアへの蛋白質輸送や蛋白質再構成を助けることから、ミトコンドリア内膜の電子伝達系活性を検討したところ、温熱負荷は電子伝達系を活性化し、ミトコンドリアの好氣的代謝を亢進させた。一方、細胞質における嫌氣的代謝は、温熱負荷によって抑制された。好氣的代謝は嫌氣的代謝よりもエネルギー源である ATP 産生効率が高く、筋疲労の原因となる乳酸を産生することも無い¹¹⁾。今回の検討では、サンプリングの困難さから ATP 産生量の有意な増加は証明できなかったが、温熱負荷はエネルギー産生系を嫌氣性から好氣性にシフトさせることにより、エネルギー産生効率を上昇させて疲労しにくい筋肉を作ることが示された。

エネルギー産生の効率化が筋疲労を抑制するメカニズムの一つとして、細胞における Ca イ

オン動態への効果が挙げられる。筋肉の運動は規則正しい収縮と弛緩の繰り返しによって生じ、特に収縮が重要と考えられている。しかし筋肉の収縮は完全な弛緩が得られない場合は持続的な拘縮に至り、正常な筋肉の運動が妨げられる。この際、弛緩へのトリガーとなるのが細胞質のCaイオン濃度である。細胞質のCaイオン濃度はCaイオン貯蔵庫としての小胞体が調節しており、その際、小胞体膜のCaポンプがATPのエネルギーを利用して細胞質のCaイオンを小胞体へ汲み入れることによって、Caイオン濃度を低下させて筋弛緩をもたらす²⁾。今回の実験結果から、温熱負荷が細胞質のCaイオンの回収速度を上昇させたことから、筋細胞は温熱負荷による好氣的代謝によって得られたエネルギーを利用し、Caポンプを活性化して細胞質のCaイオン濃度を低下させていることがわかる。その結果、筋細胞に十分な弛緩がもたらされることにより、温熱負荷は疲労しにくい筋肉を作っていると考えられる。

今回の検討では、温熱負荷がストレス蛋白質の誘導によって筋細胞のエネルギー産生系とCaイオン動態を修飾し、筋肉の収縮・弛緩特性を変化させることにより筋疲労を抑制していることが示された。温熱が細胞にストレス応答を惹起するメカニズムとしては、熱受容体の活性化を介したメカニズム⁹⁾や熱変性分子による小胞体ストレス誘導によるメカニズムが提唱されている。後者ではシャペロン蛋白質の誘導が重要な分子機構として示されている¹⁰⁾。筋細胞でのHSP70誘導は温熱負荷による小胞体活性化の最初のストレス応答となる可能性がある。

しかし、温熱負荷後のHSP70誘導とエネルギー産生系やCaイオン回収速度の時間経過は異なっていたことより、HSP70のシャペロンとしての作用とは別の機構で、温熱負荷が筋細胞の表現系を変化させている可能性も考えられる。また、ヒトの温浴では、通常は40℃から42℃の範囲で体表を加熱する。今回の42℃による温熱負荷はヒトの入浴を模擬しているが、筋肉が存在する深部体温は体表からの加熱では同等の温度上昇を示さないことも知られている¹²⁾。今後、温度や持続時間、繰り返し回数や間隔などの温熱負荷条件を検討することで、ヒトの筋疲労回復に応用可能な知見が得られると考えられる。

本研究の一部は、2019年度神戸女学院大学研究所研究助成、神戸女学院大学人間科学部教育研究助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) エレイン N. マリーブ. 人体の構造と機能 (第4版). 医学書院. 第6章 筋系. 2015; 177-210.
- 2) ブルース アルベルト, デニス ブレイ, カレン ホプリンら. Essential 細胞生物学 (原著第4版). 南江堂. 第17章 筋収縮. 2016; 592-598.
- 3) 阿岸裕幸, 大塚吉則. 生気象学とリハビリテーション. リハビリテーション医学. 1995; 32: 447-455.
- 4) 中野匡隆. 運動後の疲労回復方法としての入浴が身体に及ぼす生理学的な影響. 東邦学誌. 2013; 42: 97-107.
- 5) 鄭忠和, 宮田明, 田中信行. 和温療法一心不全に対する革新的治療一. J Cardiol Jpn Ed. 2011; 6: 9-18.
- 6) 湯浅敦智, 吉田英樹. 運動前の温熱刺激が筋疲労耐性に与える影響. 理学療法科学. 2012; 27: 623-627.
- 7) 片岡英樹, 沖田実, 中居和代ら. 温熱負荷によるラット骨格筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果について

- て. 理学療法学. 2004 ; 31 : 331-336.
- 8) 藤本充章, 中井彰. 熱ストレス応答による恒常性維持の機構. 生化学. 2009 ; 81 : 465-473.
 - 9) 富永真琴. 温度感受性 TRP チャンネル. 漢方医学. 2013 ; 37 : 164-175.
 - 10) 金本聡自, 今泉和則. 小胞体ストレスと疾患. 生化学. 2018 ; 90 : 51-59.
 - 11) ブルース アルベルト, デニス ブレイ, カレン ホプリンら. Essential 細胞生物学 (原著第 4 版). 南江堂. 第13章 細胞が植物からエネルギーを得る仕組み. 2016 ; 419-443.
 - 12) 山崎文夫. 入浴に伴う体温, 循環機能および温熱性快適感の変化—室温の影響—. 山口県立大学学術情報. 2016 ; 9 : 9-17.

(原稿受理日 2020年 3月 7日)