

## ストレス蛋白(HSP 70)が運動による筋損傷・筋疲労の修復に及ぼす影響

小坂 光男\* 山根 基\*\* 加藤 貴英\*\* 小粥 隆司\*\*  
松本 実\*\* 塚中 敦子\*\*\* 大西 範和\*\*\*\*

Effect of stress protein (HSP 70) on recovery following exercise induced muscular damage and fatigue

Mitsuo KOSAKA, Motoi YAMANE, Takahide KATO, Ryuji OGAI,  
Minoru MATSUMOTO, Atsuko TSUKANAKA and Norikazu OHNISHI

### Abstract

Current interest is attracted to the problem on the correlation between physical exercise and heat shock induced protein (HSP 70), especially on the enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 70. From the recent papers, the inducible isoform of the 70kDa heat shock protein (HSP) family, HSP 70kDa has been confirmed to protect cells from protein-damaging stressors and has been associated with not only myocardial protection but also recovery of several tissue damages. In the present review article, therefore, the related papers to exercise induced body hyperthermia, muscular damage and HSP 70 family, and their protection and/or recovery mechanism were collected and analyzed from the view-points of biological functions of stress protein HSP 70 family as well as of Granyl-Granyl Acetone (GGA) the HSP inducer.

### はじめに

熱ショック蛋白 (Heat shock proteins:HSP) の発見は、ショウジョウバエの幼虫に温熱をかけた時、唾液染色体上に特有のパフが出現したことにはじまる<sup>1)</sup>。高温環境下ではほとんどの蛋白合成が抑制されるにもかかわらず HSP は選択的に発現する。その後様々な生物から温熱刺激による HSP の誘導が報告され、種を越えて多くの生物で共通のアミノ酸配列が保存されていることが明らかとなった。それ故、HSP は、

進化の上でも生物の生存に必須であり重要な役割を果たしていると考えられる。また、HSP は温熱刺激以外にも、酸化剤、重金属、アルコール、グルコース飢餓、代謝阻害剤、炎症など様々なストレスにより誘導されることからストレス蛋白とも呼ばれている。このストレス蛋白は、細胞が種々のストレス刺激に曝露された時、細胞にストレス応答を引き起こし、ストレス刺激によって傷害された細胞を修復する。さらに、多くの HSP は、ストレス緊急時のみでなく平常時でも分子シャペロンとして、細胞内で

\*教授, \*\*大学院生, \*\*\*研究生, \*\*\*\*非常勤講師

蛋白の輸送や分解など細胞の生存に必要な基本的な遺伝子産物である<sup>2)</sup>。したがって、最近では、本来の熱ショック蛋白と言うより、ストレス蛋白と呼ばれることが多くなった<sup>4)</sup>。所で、Heat (加温) と Exercise (運動) は余り関係ないように思われるが、実はストレス蛋白 (HSP 70) の誘導をはじめ非常に類似点が多い。加温は最も容易にストレス蛋白を誘導させるストレス因子である。運動、スポーツも生体にとってはストレスでありストレス蛋白を誘導する。ヒトは運動をし、自らをストレスさせてストレス蛋白を誘導し健康維持・増進に役立っている。加温も運動も、分子生物学的立場からストレス蛋白を誘導し生体防御効果を発揮する比較的容易で安全な方法である<sup>3,5)</sup>。幸いな事に、最近ストレス蛋白の誘導が胃粘膜保護薬 granyl granyl acetone (GGA) の経口投与によって容易となり、HSP 誘導による筋内や各種臓器の損傷・修復や細胞保護のメカニズムの解明に注目が集まっている<sup>4,7,9,10)</sup>。これらをふまえて、本総説では運動時に発生する筋損傷や筋疲労の修復に熱ショック蛋白 (HSP 70) が如何に関与しているか簡単に解説を加え、運動生理学分野の基礎知識に資する所存である。

## I ストレス蛋白 (HSP 70) の基礎と臨床

### (a) 培養温度とストレス蛋白の誘導

図1には伊藤によるストレス蛋白の発現とストレスの定量法を示す<sup>3)</sup>。哺乳動物細胞において、熱ショックによるストレス蛋白の誘導条件が一般に43℃を境に大きく異なることが知られている。すなわち、43℃以下の加温 (例えば42℃) ではその加温中にストレス蛋白の産生が起こるが、43℃以上の加温ではその加温中には産生されず、短時間加温後元の培養温度 (37℃) で培養するとストレス蛋白の産生がみられる。しかし、最近 Hatayama ら<sup>6)</sup>は哺乳動物細胞を低培養温度で培養すると熱ショックによるストレス反応が誘導されないことを報告した。マウス FM 3 A 細胞は一般に37℃の培養温度で培養されるが、この細胞は4℃低い33℃の培養温度

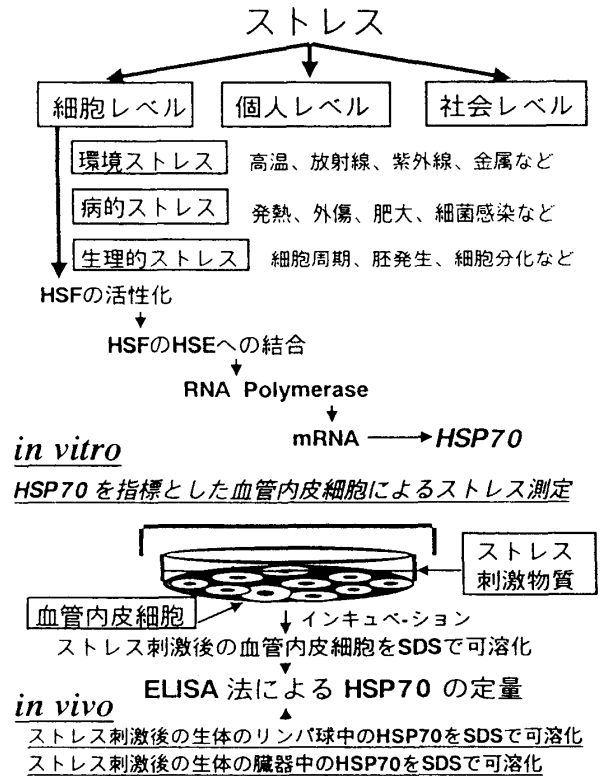


図1. Measurement of stress *in vitro* and *in vivo*. ストレス蛋白 (HSP 70) の発現とストレスの測定および定量法を示す<sup>3)</sup>。

でも正常に増殖する。しかし、37℃で培養された FM 3 A 細胞では42℃の持続加温や、45℃の短時間加温処理によりストレス蛋白の産生が起こるが、33℃の低温度で培養された FM 3 A 細胞にはストレス蛋白の誘導が見られない。また、熱ショック以外の種々の化学物質によるストレス蛋白の誘導もマウス L929細胞において非生理的な培養温度である25℃から33℃において認められない。これらの結果は、哺乳動物細胞のストレス反応は非常に狭い至適培養温度においてのみ誘導されることを示すとともに、ストレス反応の誘導に温度依存的な段階が存在する可能性を示唆する<sup>6)</sup>。しかし、マウス FM 3 A 細胞から分離された温度感受性のユビキチン活性化酵素をもつ変異株細胞 ts85は、39℃の非許容温度において親株 FM 3 A 細胞では見られないストレス蛋白の誘導を引き起こすが、この ts 85細胞に特異的なストレス蛋白の誘導は37℃のみならず33℃の低培養温度においても認められ

ることから、親株 FM 3 A 細胞に見られるストレス蛋白の誘導とは異なることも示されている<sup>6)</sup>。

**(b) 細胞の耐熱性と熱ショック蛋白**

暑熱順化の本体はなにか、以下、細胞レベルに生じる温度耐性と HSP の関連について要約する<sup>8)</sup>。大腸菌、酵母、ショウジョウバエから哺乳類の細胞の加温負荷時に耐熱性と関連の深い HSP (複数の場合は HSPs) が合成されると報告されている (図 1 参照)<sup>39)</sup>。

図 2 (a, b)には各種温度で二種の細胞内に誘導された HSP 70 の典型例を示す<sup>39)</sup>。電気泳動法により 20~120kD の分子量を示す HSPs が合成され、現在まで数十種類発見されている。43℃以下の温度域の加温中に耐熱性誘導に伴って HSPs の合成がある。43℃以上の温度域では

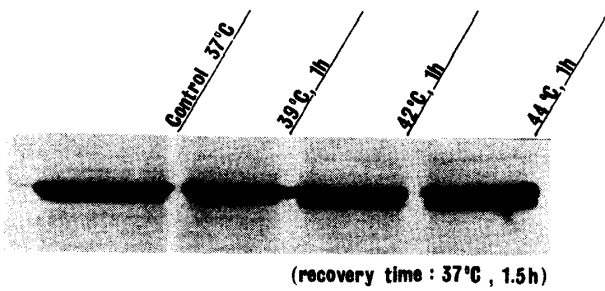
加温後37℃に incubate すると耐熱性が誘導され、HSPsの合成過程は加温直後、ほとんどの蛋白の合成阻害がみられ、2~4 時間後に HSPs が検出できる。耐熱性誘導と HSPs の合成は時間的に相関しており、合成開始時期は 1 回目の加温の damage の大きさにより左右される。Li ら<sup>40)</sup>の報告では 1 回目加温45℃・5分、2 回目加温が45℃・40分である場合と、1 回目45℃・20分、2 回目45℃・25分とでは前者のほうが細胞の耐熱性は早く出現し、70、87、97kD の HSPs の合成が早く開始されると報告している。すなわち、1 回目加温の damage が小さければ耐熱性誘導は早く、したがって HSPs の合成開始も早まり、また耐熱性は 1 回目加温後の時間経過に伴って減弱し、ついには消失する。この点は温度感受性の異なる細胞を用いた場合とはまったく異なっている。耐熱性の減弱・消失は HSPs の減少・消失に伴って起こるとい

図表 2 に示す如く、HSPs の働きをする蛋白は加温処理のみならず、他の要因、たとえば亜硫酸ナトリウム、カドミウム、エタノール、D-リゼルギン酸ジエチルアミド (LSD) および無酸素化によっても合成され、それに伴って耐熱性が細胞に誘導される報告がなされた。暑熱適応の形成過程とこの HSPs の存在を関連づけるとすれば、つぎの推論が可能となる<sup>12)</sup>。すなわち HSPs は生物の系統発生の途上で獲得された形質の 1 つであり、いわゆる生理的温熱環境ではこの遺伝子は休眠 (dormant) の状態にあり暑熱刺激を含む特定のいくつかの侵襲を受け、これが反復刺激されるとき、この遺伝子が読み取られ、HSPs の機能をもった蛋白質が産生されるという<sup>12)</sup>。

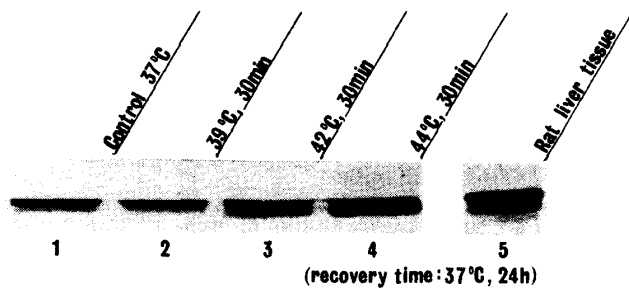
**(c) 温度感受性・耐熱性の誘発—修飾因子**

細胞レベルにおける温度感受性、耐熱性の研究に培養細胞を用いた例は多い。Chinese hamster の CHO-cell を培養して、その細胞の温度感受性・耐熱性を検索した結果を要約する<sup>8)</sup>。

(1) 温度域により細胞致死効果に著しい差異がみられる。暑熱刺激40~46℃の温度域では細胞致死の critical temperature は43℃付近にあり、



a. The induction of hsp 70 by heat shock for 1 hr at various temperature. RAW 246.7 cells were subjected to a heat shock treatment for 1 hr at 36℃, 42℃, 44℃ and had a recovery time for 1.5 hr at 37℃.



b. the induction of hsp 70 by heat shock for 30 min at various temperature. U-937 cells were subjected to a heat shock temperature for 30 min at 39℃, 42℃, 44℃ and had a recovery time for 24 hr at 37℃.

**図 2. 熱ショック蛋白 (HSP 70) の Wester blotting<sup>39)</sup>**

図表 1. ストレス誘導物質、誘導条件の予想される作用機作

ストレス誘導物質, 誘導条件	予想される作用機作
熱ショック 発熱	変性蛋白質の産生
アミノ酸アナログ puromycin	異常蛋白質の生成
重金属 sodium arsenite hydrogen peroxide	酸化剤, SH 基の修飾による蛋白質の構造変化
2,4-dinitrophenol	蛋白質に共有結合性の修飾
グルコース飢餓 2-deoxyglucose	蛋白質のグリコシレーション阻害による異常蛋白質の生成
虚血 酸化的ストレス	酸素フリーラジカルによる蛋白質修飾
心肥大症	異常蛋白質の産生, 細胞の増殖
ウイルス感染	異種蛋白質の出現

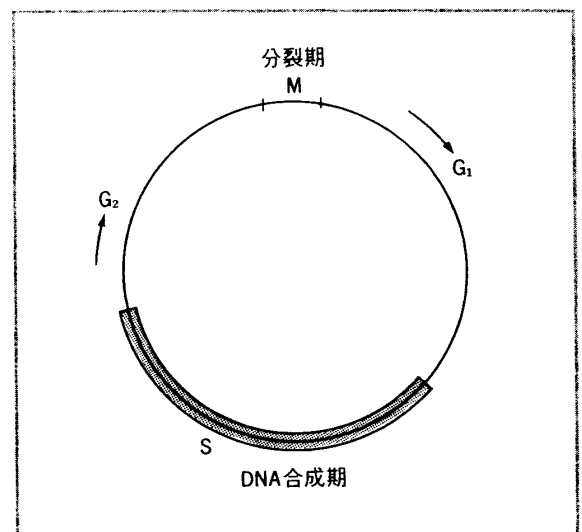
Arrhenius プロットに描くと43℃で直線が折れ曲がり、43℃以上では細胞致死効果は著しい。43℃以上では暑熱による障害の様式および障害からの回復の様式のいずれか、または両方が異なってくると報告されている。

(2) pH が低いと温度感受性の増減効果が著しい。すなわち pH の低下により温熱の効果は著しく増強し、とくに pH7.6~6.7では37℃において細胞致死の影響はないが、42℃の温熱負荷を行なうと温熱致死効果に増強がみられる。

(3) 酸素分圧が低い細胞は温熱刺激に対して高感受性である。低酸素と低 pH は相関しており、この結果は合理的である。Kimら<sup>41)</sup>はブドウ糖の解糖系に阻害効果を示す5-thio-D-glucose で前処理した細胞に正常酸素環境および低酸素環境で暑熱負荷を与え、この薬剤存在下に比較的ゆるい温熱処理 (40.5℃) で相乗的な致死効果がみられるのは低酸素細胞に選択的であり、正常酸素細胞では薬剤と温熱の独立した致死効果以外になんらの synergism もみられなかったと報告している。このことは暑熱負荷による致死の primary site は解糖系であることを示唆している。またグルコース欠乏の環境下で正常酸素細胞に暑熱負荷を加えたとき、グル

コース欠乏による thermoenhancement は観察されないが、低酸素細胞では温度感受性の増強が報告されている。

(4) 暑熱負荷による細胞致死効果には age response がみられ、M-G1 border と DNA 合成期に温度感受性は高い。細胞内の遺伝物質である DNA の複製は細胞の1世代のうちある特定の期間で行なわれ、図3に示すように4つの相(phase)に区分され、図中Sと記したのはDNA

図3. 細胞増殖サイクル<sup>8)</sup>

合成 (DNA synthesis) 期であり、その前後の G1、G2 は DNA 合成をまったく行わない準備期 (gap) であり、G1 では DNA 合成の準備、G2 では細胞分裂 (M は mitosis) の準備がなされており、細胞の増殖は M → G1 → S → G2 → M の順に進む。この細胞サイクル各位相の細胞は暑熱負荷に対してその位相間 age response (phase response) を示し、Chinese hamster CHO 細胞では M 期と S 期 (とくに late S 期) が高感受性、G1 期は比較的低感受性である。ヒトの HeLa 細胞において late S 期が最も高感受性であり、early G1 期が最も温熱に対して低感受性であると報告されている。

(5) 細胞分裂の周期上で S 期と G2 期には block を誘導する。細胞周期の進行中、温熱による block は 43°C 処理された EMT-6 細胞において S 期と G2 期に起こる。温熱による障害は細胞分裂を経ずに回復し、G1 期の温熱処理の障害は G1 期の中に、S 期のそれは S 期から G2 期に移るに伴って回復すること、そして S 期の細胞への温熱分割処理では細胞が S 期にある間に 1 回目の温熱負荷による障害が回復されると報告されている。

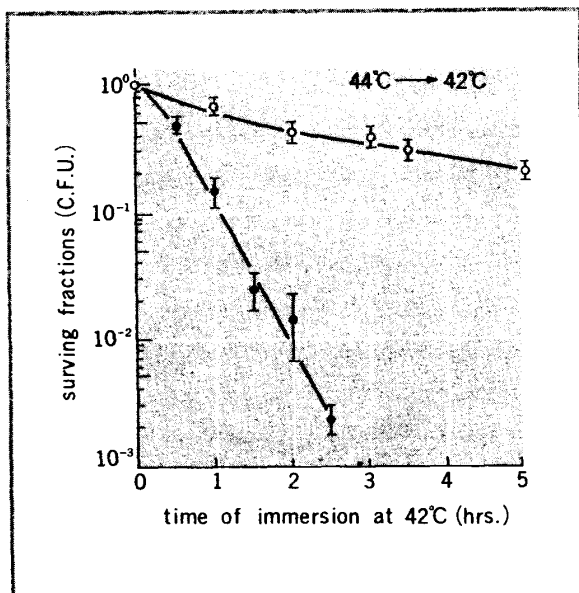
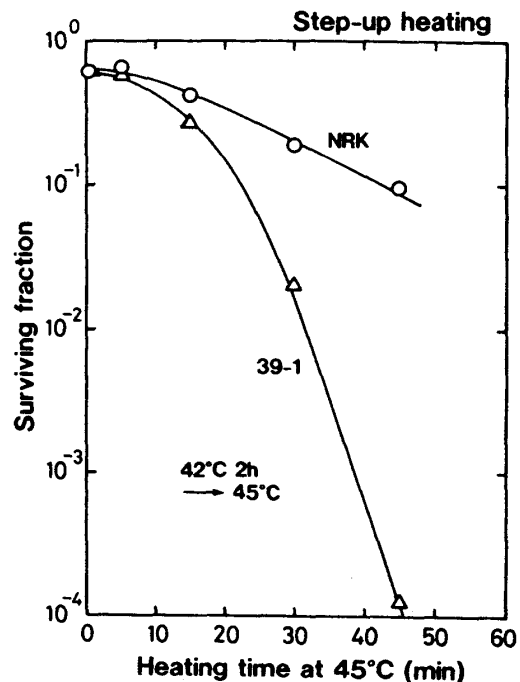


図 4 左. step down heating と耐熱性の減少<sup>12)</sup>  
[Miyakoshi, J. et al.: *Radiat. Res.*, 79: 77-88, 1979 より]

(6) 分割温熱負荷 (step down) により温度感受性の増感が誘導される、step down heating とは約 42.5~43°C より上と下の 2 種類の温度を選び、高い暑熱負荷後に低い暑熱負荷を行う加温様式である。step down heating においては約 43°C より高い温度で一定時間 (たとえば 44°C · 10~15 分) 加熱した細胞を引き続き 43°C より低い温度 (42°C) で種々の時間加温する。こうすると、44°C 前処理加温を伴わない 42°C 単独加温での 42°C 処理時間生存率曲線に比較して、44°C · 15 分前処理加温後の 42°C 処理時間生存率曲線は著明に急勾配となる。図 4 左は 4 種の培養細胞株を用いて 44 → 42°C の step down heating による細胞の致死効果を示している。対照の 42°C 単独加温による生存率に比し生残率は著減している。すなわち、高加温の前処理により、引き続き低加温への細胞の温度感受性は増大することを示す。

(7) 分割温熱 (step up) により温熱耐性が誘導される (図 4 右参照)。step up heating とは前



Thermal sensitivity of NRK(o) and 39-1(Δ) cells at 45°C immediately after pre-heating at 42°C for 2hr

図 4 右. step up heating と耐熱性獲得

項のstep down heatingの逆の加温配置で、たとえば、42℃・2時間後の前加温ののち、44℃加温処理すると44℃単独処理時間生存率曲線を上まわる生存率曲線が得られる<sup>12)</sup>。step down heatingの比較では、Arrhenius plotの屈折点である42.5℃より高い温度で前加温すると、つぎの42℃より低い温度による加温に対する細胞の温度感受性の増大が誘発されるのに対比して、その逆の配置 (step up heating) では、42.5℃より低温での前加温により、そのつぎの42℃より高温による温熱負荷で細胞の温度感受性の減少 (あるいは温熱耐性) が誘発されることになる。

(8) 細胞株により固有の温度感受性を示す。温度感受性は培養細胞株により一様でなく、生体内における組織間に温度感受性が異なることを示唆している。いわゆる differential thermo-sensitivity の存在を裏付けている。同一の培養環境下における細胞内因性の温度感受性が、一般の体細胞と温度ニューロンとで differential thermo-sensitivity を示すかどうか、暑熱順化や体温調節機序に直接的・間接的に関連するかどうか、温熱生理学では重要な問題であり、この方面の研究の進展を期待したい<sup>8)</sup>。

## II 運動—ストレス蛋白 (HSP 70) —筋損傷の修復

### (a) 運動によるストレス蛋白の誘導

運動によるストレス蛋白の誘導メカニズムについての詳細は不明な点が多い。繰り返す要因としては、温度：運動それ自身が引き起こす筋温度と体温 (直腸温) の上昇、血流：運動による虚血—再灌流、酸化：活性酸素の発生、pH：乳酸発生による pH の低下、飢餓：グリコーゲン飢餓 (GRP の誘導)、カルシウム濃度変化：細胞内カルシウムレベルの低下などが上げられる。

骨格筋は肥大するわけであるから、蛋白合成が盛んになるためシャペロンとしてのストレス蛋白が必要となる。Locke ら<sup>13)</sup>は肥大した筋は、type I 線維と HSP 72 が増加すると報告し

ている。Brooks ら<sup>14)</sup>の運動時の筋温度と直腸温に関する報告では、Exhaustive exercise で筋温 44℃、直腸温 43℃と以外に直接運動している筋温は高い。

### (b) 一過性の運動 (動物とヒトの例示)

一過性の運動後の HSP 70 の発現については多くの報告がなされている。Locke ら<sup>15)</sup>はラットのトレッドミル (24min) を 0~60 分間および exhaustion まで行い筋、脾、リンパ球の HSP の発現を、Salo ら<sup>16)</sup>はトレッドミル (26.8 min、64.9±8 min、grade 10%) 運動させ各種筋肉で各種 HSP の発現を、Hernando らはトレッドミル (27min、60min) 運動で、ヒラメ筋、長指伸筋の HSP 72 と HSC 73 が 1.5~2.0 倍に増加したと報告している。

Fehrenbach ら<sup>17)</sup>は、ハーフマラソン競技大会に出場した男性マラソン競技者 12 名と運動習慣のない男性 12 名について、大会前、直後、3、24 時間後に採血し、白血球の各分画 (リンパ球、単球、顆粒球) の各種 HSP の発現をフローサイトで測定し、短時間で細胞内の HSP の発現が変化し、運動習慣のある群は、運動習慣のない群より HSP 70 の発現が低いと報告した。運動競技者は日常的に持久運動を行っており運動ストレスに対する耐性が向上しており、運動未経験者とはストレスとなる運動強度が異なる。運動未経験者にとっては強いストレス運動でも競技者にはストレスとならない。即ち、温熱耐性の如く運動耐性を上手に利用すれば、ストレス蛋白を指標としたトレーニング法が可能となる。伊藤らの運動競技者 5 人のトレッドミル負荷実験では、負荷前に比し、負荷 2 日後の HSP 70 (末梢リンパ球) の発現は約 1.7 倍であった<sup>5)</sup>。

### (c) 持続性の運動 (動物とヒトの例示)

Mattson ら<sup>18)</sup>はラットに 6 日/週、8 週間トレッドミルで持久運動させ、ヒラメ筋 (遅筋) と足底筋 (速筋) についてミトコンドリア内の HSP 60、GRP 75 (glucose-regulated protein) とクエン酸合成酵素活性を測定した結果、ヒラメ筋は両者変化なく、腓腹筋のストレス蛋白とクエン酸合成酵素活性は増大したと報告してい

る。Naito ら<sup>24)</sup>は、持久的トレーニング(トレッドミルを60分/日、5日/週で10週間)は、若齢、老齢ラット共に同程度の骨格筋(遅筋)のHSP 72の発現を増加させ両者に有意性はないが、老齢ラットは速筋においてその発現は有意に低下しており、老化は速筋の応答性を低下させると述べている。よって、HSPの発現から考慮すると、老人にとって、毎日のジョギング効果は、筋力の低下防止になるが、瞬発力は明らかに年と共に低下する(とっさの動作は劣る)ので交通事故など注意すべきである。

ヒトでの報告はわずかであるがLiu ら<sup>19)</sup>は、ボート選手10人に異なった4種の運動方法で4週間トレーニングし、外側広筋のbiopsyでHSP 70の発現量を測定し、2週のトレーニング後に最大のHSP 70の発現を認めている。よって、これからの運動選手のトレーニングもHSP 70を指標に乳酸値、クエン酸分解酵素活性、ATP、クレアチンリン酸などの生化学データとトレッドミル、PWC170の運動能力を総合した分子生物学的なトレーニング法が望まれる。小坂らは一過性に限らず持続性運動による筋疲労や筋損傷の修復には水補給としてスムーズ・ウォーター(ステビア 700cc・大塚製薬KK)、イオン補給としてイオンサプライ(ポカリスエット 340cc・大塚製薬KK)が有効と報告している<sup>45)</sup>。

(d) HSP と動物一心筋・骨格筋機能保全

動物の骨格筋、心筋機能(一部血球細胞)とHSP(70)の関連を報告した論文を簡単にまとめると、Taylor らは例外的にストレス蛋白HSP 72の関与なく急性運動が心筋機能亢進すると報告している<sup>20)</sup>。既述のHatayama ら<sup>6)</sup>の報告によるとHSPの発現条件は温度の高低や刺激時の温度の変化、例えば高温→低温、低温→高温、低温度培養細胞では低温→通常温(37℃)など多種のvariationがあり、更に加温刺激時間、例えば加温中から上記各条件の加温終了は24時間後までHSP発現の潜時も異なり、要するにHSPの誘導条件が狭い範囲に規定されている事が示されてある。Taylor らの報告もこの辺の事情を考慮して報告結果を見る必要がある

る<sup>20)</sup>。桐野ら<sup>11)</sup>の報告は、各組織の虚血ストレスがそのストレスのくり返しによってストレス自体に耐久性(耐性獲得)が発現すること、この発現にHSP 70が耐性獲得に重要な因子であり、fibroblastにHSP 70の抗体を注入すると熱ストレスに対して脆弱となる事が明らかで、HSP 70遺伝子の発現を阻害された細胞は温熱ストレスに対して脆弱となる結果も発表されている<sup>11)</sup>。

各種ストレスによって生体の諸臓器内に誘導されるHSP 70が諸臓器に機能亢進やストレス刺激による組織変性や損傷を保護するとの報告は多い。最近特に心機能に対するHSPの保護作用について多くの研究が行なわれている。Locke ら<sup>22)</sup>は運動によって生じたmyocardial HSP 72が虚血後の心機能回復を促進するののか?の詳細について検討している。彼らは、28匹の雄ラットをcontrol、1 bout exercise(トレッドミル走、30m/min、60min)、3 bouts exercise(1 boutを3日連続)、Heat shock(HS)(42℃、15min)の4群に分け、exercise、HSの24時間後に心臓摘出し、冠血流測定、左心室

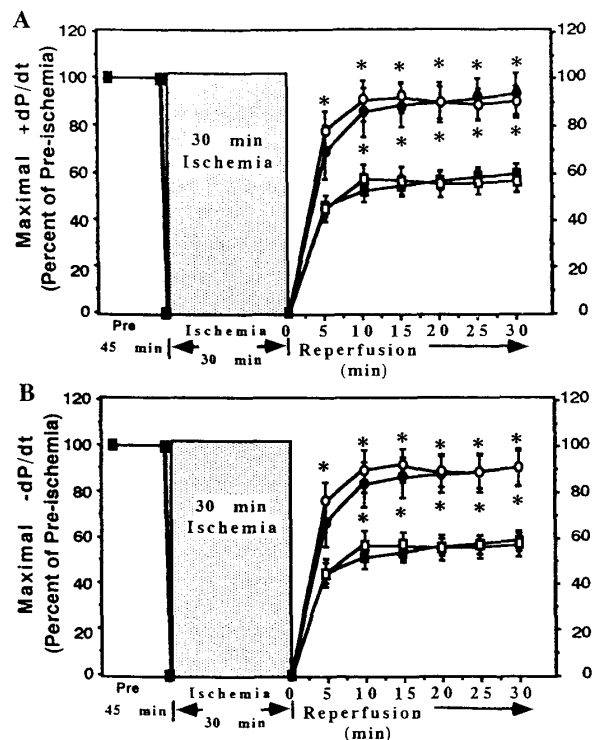


図5 運動と心筋損傷修復<sup>22)</sup>

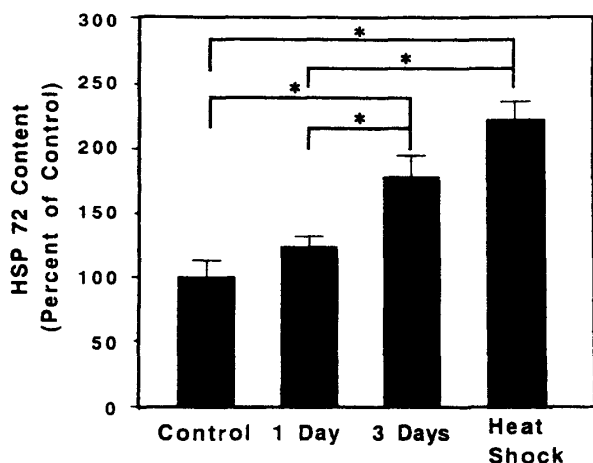


図6 運動量による HSP の発現変化<sup>22)</sup>

収縮・拡張率の測定および HSP 72 量測定を実施した。その実験結果を以下に記した (図 5, 6 参照)。冠血流量については虚血後の再灌流による回復%は群間に有意差はみられなかった。左心室収縮 (+dp/dt)・拡張 (-dp/dt) 速度 (%) については虚血後再灌流時に (3 bouts exercise・HS) の両群と (1 bout exercise・control) の両群で有意差があり (図 5)、左心室圧変化率 (LVDP:Left Ventricular Developed Pressure) についても虚血後再灌流時に (3 bouts exercise・HS) の両群と (1 bout exercise・control) の両群で有意差があった。HSP 72 の Densitometric scanning については (3 bouts exercise・HS) の両群と (1 bout exercise・control) の両群で濃度差は有意であった (図 6)。また左心室の HSP 量と左心室圧の間には有意な相関がみられた。これらの結果から、運動ストレスで HSP 72 の蓄積増量が虚血後左心室の収縮力を回復・促進させ、LVDP の拡大との相関もみられた。このことから HSP 72 が cardio-protective 蛋白と謂われる所以である。Demirel ら<sup>21)</sup> はラット (6ヶ月齢、24ヶ月齢) を用いて control、exercise (60min/day、75% VO<sub>2</sub>max、treadmill running)、hyperthermic (41℃直腸温、15min) の 3 群における myocardial HSP 72 の発現を観察した。その結果 exercise、hyperthermic により成長期ラット、老齢期ラットにおいて myocardial HSP 72 は増加したこと、また exercise、hyperthermic

による myocardial HSP 72 の増加は加齢により減弱することを報告した。これらのことから、myocardial HSP 72 が運動ストレスによって発現し、心筋自体の機能亢進、損傷保護に働くと考えられる。

骨格筋と HSP に関する研究も多数報告されている。Vasilaki ら<sup>30)</sup> は HSP の発現増加によって骨格筋が運動に素早く対応していることを報告している。彼らは、成熟期マウス、老齢期マウスの筋ダメージを伴わない運動 (後肢の等尺性筋収縮) による骨格筋における HSP 発現の能力を検討した。その結果、成熟期マウスの後肢筋で HSP mRNA が増加したが、老齢期マウスの骨格筋では明白ではなかった。反対に、HSF1 (HSTF1) の HSE との結合能は大略両群マウスで変化はなかった。このような老齢期マウスの HSP 発現の能力低下は遺伝子変換 (転写) の違いによると判定されている。運動による HSP 発現に関して、急性の疲労困憊実験のデータは多く報告されているが、慢性運動の実験報告は少ないことから、Samelman<sup>27)</sup> は持続的トレーニングによってラットの心筋や骨格筋で HSP 72/73、HSP 60 の発現が増加するか検討した。その結果、持続的トレーニングにより各ストレス蛋白の発現が増加し、持続的トレーニングはストレスに対する損傷の保護作用を活性化する可能性が考えられた。Poso ら<sup>23)</sup> は、Finnhorse を用いて運動やトレーニングにより骨格筋の HSP 72 mRNA が増加する事を報告している。さらに Naito ら<sup>24)</sup> は老齢期ラットにおける運動トレーニングに対する骨格筋の HSP 発現の増加について報告している。彼らは、成長期ラット (3ヶ月齢) と老齢期ラット (23ヶ月齢) を用い、持続的トレーニング群 (トレッドミル走、77% VO<sub>2</sub>max、60min/day、5 days/week、10weeks) と非トレーニング群に分けて実験を実施し、トレーニング終了後ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋 (赤筋、白筋) の citrate synthase と HSP 72 発現を測定した。その結果、citrate synthase は成長期ラット、老齢期ラット共にすべての筋で増加した。HSP 72 の発現については、遅筋では成長期ラット、老齢期ラット共



に同じような発現を示したが、速筋では加齢に伴って慢性的な運動に対する反応としてのHSP 72発現が鈍くなることを示唆している。またNaitoら<sup>25)</sup>は、ラットにおける後肢懸垂(不活動)前の暑熱暴露によるHSP 72発現増加が筋収縮活動減少に伴う筋萎縮を減弱させることを報告している。HSP 72のシャペロン作用により骨格筋蛋白の分解が抑制されることから、HSP 72が筋収縮活動の減少に伴う筋萎縮の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。このことから、身体トレーニングまたは不活動などによる骨格筋の適応性変化に対してHSPが何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。

Ecochardら<sup>29)</sup>は、誘導型HSPのHSP 72が運動中のラットの骨格筋、特に虚血心筋で合成される事を報告している。彼らは、くり返し運動や慢性の筋虚血ストレスによるラットの骨格筋HSP 72発現への影響を検討した。虚血後1週間で半分のラットに持久的トレーニング(トレッドミル運動、5日/週)を行なわせ、残りの半分のラットはケージに入れて不動化(行動制限)を行なわせた。その結果、持久的トレーニング群では後肢の骨格筋でHSP 72の発現増加が認められたが、行動制限群の骨格筋のHSP 72には変化がなかった。さらに測定されたcytochrome oxidaseとcitrate synthase能力からmitochondrial oxidative capacityは行動制限群では低下、持久的トレーニング群では有意に増加した。しかし、持久的トレーニング群のmitochondrial oxidative capacityの増加は動脈閉鎖によって部分的に阻害を受けており、HSP 72とmitochondrial oxidative capacityは共に虚血と運動の影響を受けていると考えられる。

Milne & Noble<sup>28)</sup>は、HSP 70の誘導は運動の強度に依存する事を報告している。彼らは、ラットを運動群(7群:トレッドミル走のスピードを15m/min~33m/minの間で変化させて群分け)と非運動群に分けて実験を実施した。60分間の運動の24時間後に心筋、広筋(赤筋、白筋)、ヒラメ筋におけるHSP 70量を分析した結果、心筋のHSP 70は運動強度24m/min以上で増加、広筋の赤筋ではHSP 70は24m/min、白筋

では27m/minで増加した。反対にヒラメ筋でのHSP 70は低い強度で増加し、運動強度が高くなるにしたがって減少した。これは筋の動員パターンに関連してHSP 70の発現パターンも変化すると考えられる。

Parooら<sup>26)</sup>は、ホルモンのestrogenが運動後の骨格筋中におけるHSP 70の発現を減少させる事を報告しており、運動後のラット骨格筋中のHSP 70は雄ラットの方が雌ラットより蛋白、mRNAレベルで有意に多いこと報告している。また卵巣摘出ラットは運動に対するHSP 70発現がestrogen投与群より大きく反応し、この事は運動に対する性特有のHSP 70反応が雌特有のestrogenホルモンによってmediateされる事を示している。17 $\beta$ -estradiolや主要内因性estrogenはestrogen receptorの活性に作用しないのみならず、運動によるHSP発現を減少させており、この事はnongenomic humanメカニズムを示唆している。この報告は、性ホルモンが生殖機能以外の生理作用を発揮する事を示す良き知見である。

#### (e) ヒトの運動による心筋、骨格筋のHSP 72誘導発現

ヒトの運動によって発現するHSPは今日まで心筋、骨格筋、肝臓、白血球、脳など幾多の生体臓器での報告がある。Thompsonら<sup>31)</sup>は、エキセントリック(伸張性収縮)運動(single bout)後にヒトの骨格筋でHSP 27とHSC/HSP 70の発現が増加すると報告している。彼らは、被験者に肘屈曲の最大エキセントリックレジスタンス運動(筋損傷が生じる強度)を行なわせ、その48時間後に活動筋(上腕二頭筋)の生検サンプルからHSP 27とHSC/HSP 70を測定した。その結果、HSP 27、HSC/HSP 70共に損傷の上腕二頭筋の方がcontrol armに比べて有意に増加していた。さらにThompsonら<sup>32)</sup>はrepeated bout(two bout)のエキセントリック運動におけるHSP発現の実験を実施している。今回は、2回(bout 1: B1, bout 2: B2)の運動(肘屈曲のエキセントリック運動を50回)を4週間間隔で実施し、上腕二頭筋の筋損傷の評価やHSP発現は運動後48時間で行った。その結

果、筋損傷はB1後には顕著に生じていたが、B2後には損傷の程度は小さくなっていた。HSPの発現は両bout後同じであった。Thompson<sup>33)</sup>らは、ヒトにおいて異なった2つの運動（肘屈曲のエキセントリック運動を50回、downhillでのランニング30分間）による上腕二頭筋と外側広筋中にHSP 27、HSC 70、HSP 70が発現するのか検討している。その結果、運動誘導HSPやmitogen 活性化蛋白キナーゼ反応は特異的局所的運動依存で全身に亘るものではない事を報告している。レジスタンス運動誘導のHSP発現、phosphorylationキナーゼ活性の亢進は、筋肥大となる長期骨格筋の適応に分子生物学的に重要である。McArdleら<sup>34)</sup>は、ヒトの年齢と運動の関連で細胞・分子レベルでのHSPの発現メカニズムを検討している。確かに加齢に伴いヒト骨格筋は小さく弱くなる。さらに骨格筋が運動によって損傷し易く、損傷からの回復において大きな障害を受け、筋が一連の運動に素早く対応出来なくなる。彼らは、HSPなどの蛋白増加が骨格筋の迅速なremodellingを亢進し、一連の運動中の筋損傷に対応、保護に役立っていると考えている。

Febbraioら<sup>35)</sup>はヒト骨格筋の収縮でHSP 72が誘導されるとグリコーゲン利用が減少すると報告している。彼らは筋肉内グリコーゲン利用を抑制するとHSP発現が刺激されると仮説を立て実験を実施した。被験者の一側下肢の筋グリコーゲンを枯渇させ、4～5時間の両下肢膝関節伸展運動（40% leg peak power output）を実施させ、筋グリコーゲン、HSP 72遺伝子とHSP蛋白発現を測定した。その結果、筋グリコーゲン量は実験中継続して枯渇側の下肢でcontrol側に比べて低値であった。運動前はHSP 72遺伝子とHSP蛋白発現は両下肢で変化なし、運動後には枯渇側でHSP 72遺伝子とHSP蛋白発現は増加したが、control側では変化しなかった。運動後血清サンプル中にHSP 72は検索できなかった。この結果は急性運動でHSP 72は増加するが、グリコーゲンレベルが低い時のみである。Febbraio & Koukoulas<sup>36)</sup>はHSP 72遺伝子発現が長時間の疲労困憊運動でヒト骨格筋

中に発現することを報告している。健康な男性被験者に60% VO<sub>2</sub> max 自転車運動を疲労困憊まで実施させた。外側広筋から筋サンプルを採取し、HSP 72 mRNA、glucose、lactate濃度を測定。その結果、筋温は運動の最初10分で上昇、その後一定保持した。筋グリコーゲンは運動中に劇的に低下し、HSP 72 mRNAは疲労困憊前40分と疲労困憊時に安静時と比較して有意に増加した。この結果は急激自転車運動でHSP 72 mRNAは増加、これはコンセントリック運動を通してストレス反応が誘起されている事を示している。Febbraioら<sup>37)</sup>は、運動中活動筋での遺伝子または蛋白発現の増加に先立って血液中にHSP72の発現増加が生じることを報告している。肝臓などの内臓組織において運動中HSP72が発現し、このことは運動におけるHSPの全身性の増加と関連する。

Shastryら<sup>38)</sup>は中程度にトレーニングされているヒトにおいて運動後の白血球におけるHSP 70とHSP 90の発現について検討している。その結果、ある程度トレーニングされたヒトでは、白血球におけるHSP発現のbaseline levelの鈍化が生じ、このことはトレーニングに対する慢性的な適応現象として考えられるかもしれない。

### Ⅲ 筋損傷修復のメカニズム

暑熱・高温ストレスによって細胞内に熱ショック蛋白質（HSP 70）などが誘導されることは既に述べたが、熱ショック蛋白質の耐熱性機序については、今日では、ガン治療のハイパーサーミア研究者の多くの報告がある<sup>42,43)</sup>。茲では、図式化による説明に止めるが、図7に示す如く、熱ショック・温熱ストレスが細胞に刺激として作用すると、細胞内にHSP 70、HSP 90、HSP 47、P 53といった新しい蛋白質の発現や蓄積が促進され、特にHSP 70とP 53は相互絡み合って、細胞を熱障害から防御している。詳しくは、熱ストレスによって蓄積されたP 53の耐熱性蛋白質がswitch盤を経てP 27やP 21と類似のWAF 1分子を誘起し、これが細胞の分裂サ

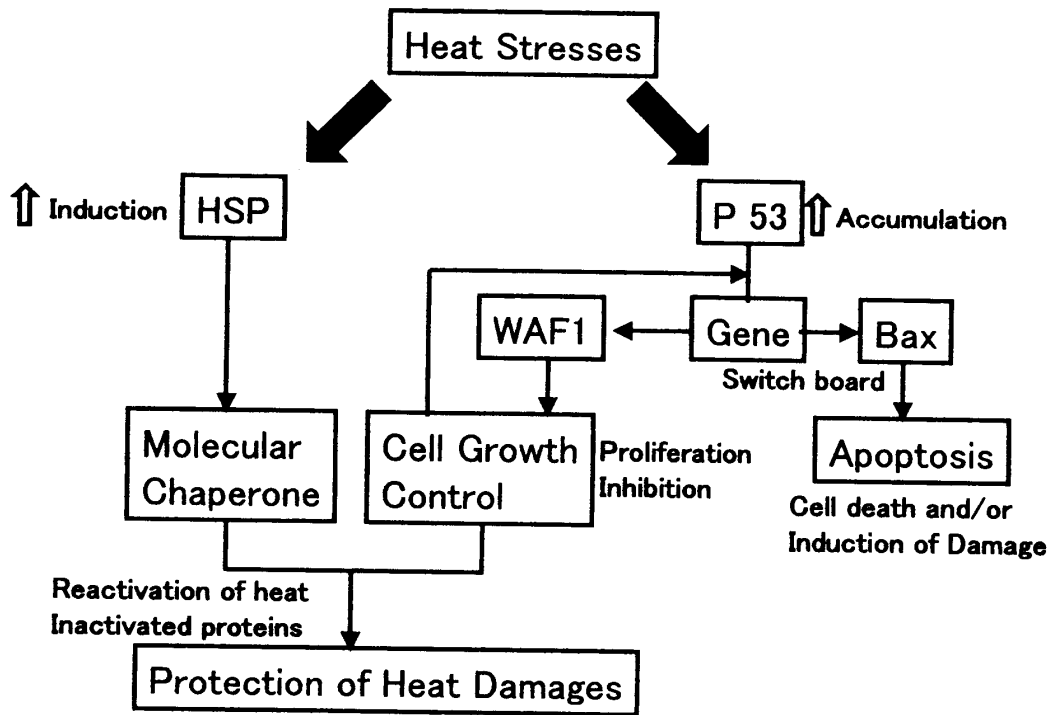


図7. ストレス最低の細胞保護・損傷修復機序を示す図

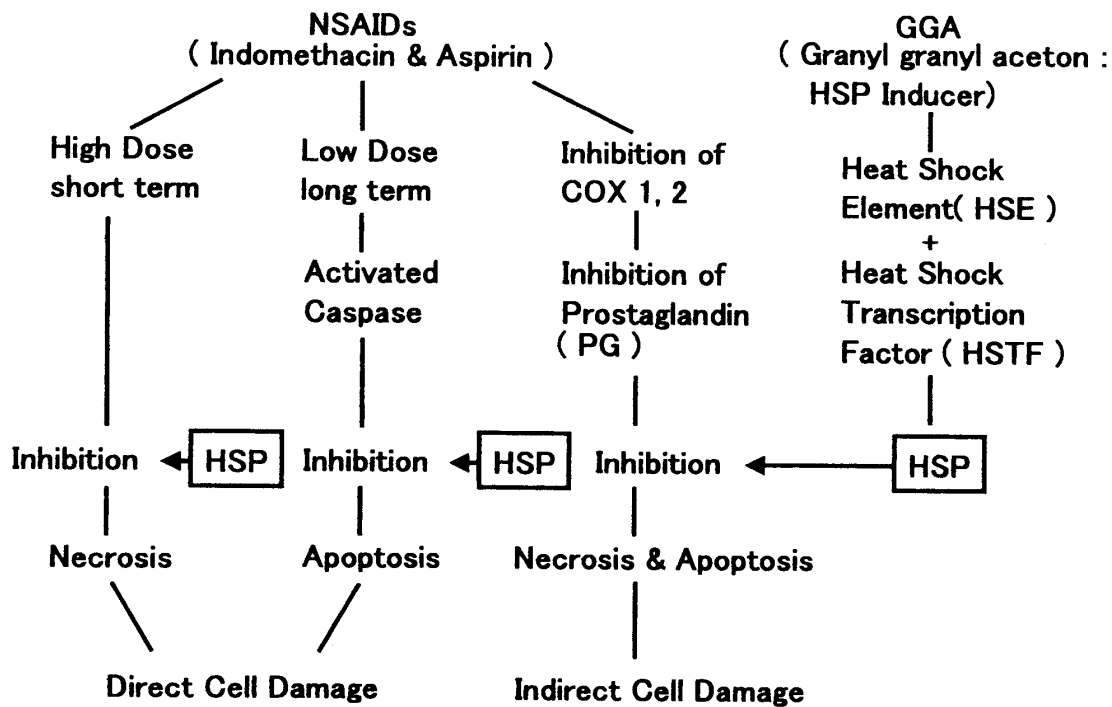


図8. GGA の作用点と作用機序を示す図

イクルに重要な Cdk (Cyclin dependent kinase・2・3・6) と協同して、がん細胞の増殖を制御して HSP の分子シャペロン作用と協力して細胞を熱障害から二重防御機構によって保護してい

るためと考えられる<sup>43,44,45,46</sup>。最近、更に非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) による消化器潰瘍や細胞死の発現が HSP 誘導剤のセルベックス (GGA) 服用によって抑制される事 (図8)

も HSP の細胞障害の保護作用として注目されている<sup>7,10)</sup>。

### まとめ

ストレス蛋白 HSP 70 family は当初温熱ストレスによって細胞間に誘導され、対象の細胞・組織の熱耐性を高め、細胞組織を温熱ストレスによる損傷から保護し、細胞分裂や細胞間での新生蛋白質の発現に深く関係すると考えられて研究が発展したが、本総説で記述の如く、運動を含めて多種のストレスによっても誘導・発現され、分子シャペロンとして生体の多種の臓器組織・細胞・オルガネラ・分子レベルにおける代謝機能にまで作用が及び生体活動を修飾する事が明白となった。これは生体機能として重大かつ興味深い課題である。

### 謝辞

本総説論文の作成に当たり、中京大学特定研究助成（平成14年度）をはじめ中京大学体育学研究所及び大塚製薬株式会社からも多大なるご支援・ご協力を頂き心より感謝とお礼を申し上げます。

### 〈参考文献〉

- (1) Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571–573, 1962.
- (2) 矢原一郎. 総説 ストレス応答とストレス蛋白質. *生化学*, 10, 1244–1261, 1992.
- (3) 伊藤要子. 温熱療法の新しい臨床応用（予備加温）—加温により誘導される HSP 70 の生体防御作用— 今日ストレスは明日の抵抗力— *放射線生物研究*, 33, 381–398, 1998.
- (4) 永田和宏. ストレス蛋白質 —基礎と臨床— 中外医学社, 1994.
- (5) 伊藤要子. プレコンディショニングとしてのストレスタンパク（HSP 70）—Heat（加温）と Exercise（運動）のすすめ— *放射線生物研究*, 37(4), 2002.
- (6) Hatayama, T., Kano, E., Taniguchi, Y., Nitta, K., Wakatsuki, T., Kitamura, T., and Imahara, H. Production of heat shock proteins and induction of thermotolerance in Chinese hamster V79 cells by heat and chemical agents. *Hyperthermic Oncology in Japan' 89* ed. by Saito, M., Tokyo Univ. Press. pp 386–387.
- (7) Hirakawa, T., Rokutan, K., Nikawa, T., and Kishi, K. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology*, 111, 345–357, 1996.
- (8) 小坂光男. 温度適応. 発熱症候群. 文堂堂. pp 154–164, 1989.
- (9) 小坂光男, 山根 基, 松本 実, 十河直太, 小粥隆司, 加藤貴英, 塚中敦子, 垂井彩未, 大西範和. ストレス環境下におけるヒト最高体温の誘発と抑制機序 —ヒト最高体温の再検索— *中京大学体育学論叢*, 44(2), 1–15, 2003.
- (10) 水島 徹. HSP 誘導による臓器保護メカニズム —NSAIDsによる胃粘膜障害と HSP による保護— 第19回日本ハイパーサーミア学会, ランチョンセミナー, *Jpn. J. Hyperth. Onc.*, pp 100, 2002.
- (11) 桐野高明. ストレス蛋白質と臨床 —5. 脳虚血— ストレス蛋白質 —基礎と臨床— 永田編 中外医学社, pp 216–224, 1994.
- (12) Kano, E. et al. Step down heating. *Research News. Hyperthermia, Radiation and Chemicals*. 5, 9–14, 1981.
- (13) Locke, M., Atkinson, B.G., Tanguay, R.M., and Noble, E.G. Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *Am. J. Physiol.*, 266(5 Pt 1), C1240–C1246, 1994.
- (14) Brooks, G.A., Hittelman, K.J., Faulkner, J.A., and Beyer, R.E. Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am. J. Physiol.*, 221(2), 427–431, 1971.

- (15) Locke, M., Noble, E.G., and Atkinson, B.G. Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am. J. Physiol.*, 258(4 Pt 1), C723–C729, 1990.
- (16) Salo, D.C., Donovan, C.M., and Davies, K.J. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 11(3), 239–246, 1991.
- (17) Fehrenbach, E., Passek, F., Niess, A.M., Pohla, H., Weinstock, C., Dickhuth, H.H., and Northoff, H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32(3), 592–600, 2000.
- (18) Mattson, J.P., Ross, C.R., Kilgore, J.L., and Musch, T.I. Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32(2), 365–369, 2000.
- (19) Liu, Y., Mayr, S., Opitz-Gress, A., Zeller, C., Lormes, W., Baur, S., Lehmann, M., and Steinacker, J.M. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *J. Appl. Physiol.*, 86(1), 101–104, 1999.
- (20) Taylor, R.P., Harris, M.B., and Starnes, J.W. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am. J. Physiol.*, 276(3 Pt 2), H1098–H1102, 1999.
- (21) Demirel, H.A., Hamilton, K.L., Shanely, R.A., Tumer, N., Koroly, M.J., and Powers, S.K. Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. *Am. J. Physiol.*, 285(4), H1609–H1615, 2003.
- (22) Locke, M., Tanguay, R.M., Klabunde, R.E., and Ianuzzo, C.D. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am. J. Physiol.*, 269 (1 Pt 2), H320–H325, 1995.
- (23) Poso, A.R., Eklund–Uusitalo, S., Hyyppa, S., and Pirila, E. Induction of heat shock protein 72 mRNA in skeletal muscle by exercise and training. *Equine. Vet. J. Suppl.*, 34, 214–218, 2002.
- (24) Naito, H., Powers, S.K., Demirel, H.A., and Aoki, J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33(5), 729–734, 2001.
- (25) Naito, H., Powers, S.K., Demirel, H.A., Sugiyama, T., Dodd, S.L., and Aoki, J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J. Appl. Physiol.*, 88(1), 359–363, 2000.
- (26) Paroo, Z., Dipchand, E.S., and Noble, E.G. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 282(2), C245–C251, 2002.
- (27) Samelman, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp. Physiol.*, 85(1), 92–102, 2000.
- (28) Milne, K.J., and Noble, E.G. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J. Appl. Physiol.*, 93(2), 561–568, 2002.
- (29) Ecochard, L., Lhenry, F., Sempore, B., and Favier, R. Skeletal muscle HSP72 level during endurance training: influence of peripheral arterial insufficiency. *Pflugers Arch.*, 440(6), 918–924, 2000.
- (30) Vasilaki, A., Iwanejko, L.M., McArdle, F., Broome, C.S., Jackson, M.J., and McArdle, A. Skeletal muscles of aged male mice fail to adapt following contractile activity. *Biochem. Soc. Trans.*, 31(2), 455–456, 2003.
- (31) Thompson, H.S., Scordilis, S.P., Clarkson, P. M., and Lohrer, W.A. A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP 70 in human skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.*, 171(2), 187–193, 2001.
- (32) Thompson, H.S., Clarkson, P.M., and Scordilis, S.P. The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta. Physiol. Scand.*, 174(1), 47–56, 2002.

- (33) Thompson, H.S., Maynard, E.B., Morales, E. R., and Scordilis, S.P. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.*, 178(1), 61–72, 2003.
- (34) McArdle, A., Vasilaki, A., and Jackson, M. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.*, 1(1), 79–93, 2002.
- (35) Febbraio, M.A., Steensberg, A., Walsh, R., Koukoulas, I., van Hall, G., Saltin, B., and Pedersen, B.K. Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J. Physiol.*, 538(Pt 3), 911–917, 2002.
- (36) Febbraio, M.A., and Koukoulas, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.*, 89(3), 1055–1060, 2000.
- (37) Febbraio, M.A., Ott, P., Nielsen, H.B., Steensberg, A., Keller, C., Krstrup, P., Secher, N.H., and Pedersen, B.K. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J. Physiol.*, 544 (Pt 3), 957–962, 2002.
- (38) Shastry, S., Toft, D.O., and Joyner, M.J. HSP 70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta. Physiol. Scand.*, 175(2), 139–146, 2002.
- (39) Lee, J.-M. Effects of heat shock on macrophage. *Trop. Med.*, 33, 135–143, 1991.
- (40) Li, G.C., and Werb, Z. Correlation between synthesis of heat shock protein and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 3218–3222, 1982.
- (41) Kim, S.H., Kim, J.H., and Hahn, E.W. The enhanced killing of irradiated HeLa cells in synchronous culture by hyperthermia. *Radiat. Res.*, 66, 337–345, 1976.
- (42) Kosaka, M., and Okumura, Y. Heat shock proteins induced in mammals by whole body hyperthermia. *Trop. Med.*, 39(1), 7–11, 1977.
- (43) 小坂光男, 大渡伸, 松本孝朗, 他. 体温調節の謎を探る. *環境と健康*, 11(5), 171–178, 1998.
- (44) 小坂光男, 李丁範, 山内正毅. 高温 (高体温, 温熱療法). *疲労と休養の科学*, 15(1), 3–9, 2000.
- (45) 小坂光男, 平田 学, 山根 基, 松本 実, 加藤貴英, 大西範和. 暑熱・運動時熱中症の予防対策と水補給. *中京大学体育学論叢*, 43(2), 55–64, 2002.
- (46) 小坂光男, 山根 基, 松本 実, 加藤貴英, 塚中敦子, 大西範和. ヒト最高体温の再検索. *体力科学*, 51(6), 687, 2002.