

脊髄損傷に伴う下肢筋萎縮に対する 電気刺激の抑制効果

緒 方 知 徳

(受付 2016 年 10 月 31 日)

緒 言

骨格筋の萎縮は寝たきりやギプス固定、宇宙飛行などにより惹起されるが、これには筋活動量の低下が深く関与している。交通事故や激しい接触プレイを伴うスポーツでは運動神経の束を内包する脊椎を損傷し、下半身の運動不随に陥る重大な事故が生じるケースがある。脊椎損傷の場合、筋と神経接合部位はインタクトな状態であるが、上位の運動神経の分断により、運動野からの活動電位が骨格筋に伝わらず、廃用性の筋萎縮を招く。

ノーマルな神経筋の連結が維持されている骨格筋では、筋量はタンパク質の合成量と分解量のバランスにより影響を受ける。例えば、身体活動量の増加は筋の収縮タンパク質の mRNA の合成増加を促す一方で、収縮タンパク質の分解量を減少させる (Yarasheski 2003)。反対に不活動は、収縮タンパク質の mRNA の合成量を低下させ、収縮タンパク質の分解を亢進させる (Thomason, Biggs et al. 1989)。

廃用性の筋萎縮に関しては、筋タイプによってその影響が異なる。例えば、ヒラメ筋のような主に遅筋線維で構成されている筋は、腓腹筋のように主に速筋線維で構成される筋より筋萎縮の程度が大きく、筋活動量の低下に伴う影響が大きい。例えば、Roy らは、16日間のラット後肢懸垂モデルにおいて、腓腹筋重量が26%低下したのに対して、ヒラメ筋重量は45%低下したことを報告している (Roy, Baldwin et al. 1991)。脊椎の部分的除去 (Spinal cord Isolation, SI) は、最も顕著な筋萎縮を生じさせる不活動モデルであり、神経活動がほぼゼロとなる脊椎損傷の実験モデルとして用いられている。

脊椎損傷からの回復に関して、様々な試みがなされている。近年では幹細胞を用いて損傷した部位の神経細胞を再生させ、運動機能を回復させること (Tashiro, Nishimura et al. 2016) や埋め込み電極による硬膜外電気刺激を用いて歩行などの随意運動を行わせること (Angeli, Edgerton et al. 2014) が可能となりつつある。一方で、脊椎の損傷後に骨格筋の萎縮は急速に進行する。このため、再生医療や硬膜外刺激による治療により随意運動が可能になった時には、既に筋肉が萎縮し、運動を行うことが困難となっていることも考えられる。このことから、脊椎の損傷後は神経レベルでの治療と筋機能の維持をセットで考える必要がある。

骨格筋の収縮は、運動野または脊髄から発生した活動電位が運動神経を介して筋細胞に伝わることで生じる興奮収縮連関によって起こる。この活動電位の発生を介した筋収縮は、直接運動神経に刺激を与えることによっても生じる。このため、電気刺激を用いて筋収縮を誘発させる筋活動を定期的に行うことによって、筋萎縮を軽減することや萎縮から回復させることも可能である。例えば、Marquesteらは、腓骨神経を切除した後に前脛骨筋を定期的に収縮させる電気刺激を10週間行った場合、筋の萎縮レベルが顕著に軽減されたことを報告している (Marqueste, Alliez et al. 2004)。脊椎損傷モデルにおいても電気刺激での筋萎縮軽減効果が確かめられており、Kimらは、脊椎の部分的摘出後に30日間にわたり坐骨神経へ電気刺激を行った結果、刺激を行っていない腓腹筋より刺激を受けた腓腹筋が37%高い重量であり、腓腹筋の萎縮を部分的に抑えることができることを報告している (Kim, Roy et al. 2007)。また、彼らは刺激を受けた筋は収縮特性も高いレベルで維持されていることを示している (Kim, Roy et al. 2007)。しかし、脊椎損傷モデルでの電気刺激による筋サイズや筋機能への改善効果は速筋で高いようであるが、ヒラメ筋のような遅筋では萎縮を軽減する方法が確立しておらず、最適な刺激や頻度を明らかにすることが必要である。

タンパク質の構造形成や保護の働きを持つ“分子シャペロン”の代表的なタンパク質群として Heat shock proteins (HSPs) が挙げられる。HSPsは様々な刺激によって骨格筋内で発現増加することが知られている。その中でも HSP72 は、熱や運動などにより筋内で著しく発現量が増加することが知られている (Ogata, Oishi et al. 2009) (Oishi, Taniguchi et al. 2002)。近年、HSP72の骨格筋内での役割が明らかになりつつあり、筋内での発現量の増加は高強度運動などから筋のダメージを部分的に減少させること (Liu, Lin et al. 2013) (Miyabara, Martin et al. 2006) (Miyabara, Nascimento et al. 2012) や老化に伴う筋萎縮や筋損傷の軽減に関与する可能性も示唆されている (Broome, Kayani et al. 2006)。不活動に伴い骨格筋は萎縮するが、この際筋内の HSP72 の発現量も大きく減少することが報告されている (Naito, Powers et al. 2000)。このことは筋細胞の保護機能の低下を意味しており、筋の脆弱性を招くとともにリハビリテーションをスムーズに行う際の妨げになることも考えられる。しかしながら、筋への電気刺激が HSP72 のような細胞保護タンパク質の発現にどのような影響を与えるかは不明であり、これを明らかにすることは筋機能の維持という観点から重要な意味を持つ。

そこで本研究では、脊椎損傷に伴う筋肉の萎縮を防ぐとともに、筋収縮特性や細胞保護タンパク質に与える筋電気刺激の効果を明らかにすることを目的として、坐骨神経近部位に埋め込んだ電気刺激発生装置により脊椎損傷モデルラットの骨格筋を2週間にわたり刺激した。現在のところ、筋萎縮を軽減するために最も適した収縮刺激の周波数や頻度は確立されていないが、本研究で用いた刺激はすべての筋タイプが完全収縮すると考えられる 100 Hz で短

時間のアイソメトリック筋収縮と休息を繰り返すモデルであり、筋の萎縮や収縮特性を強く維持できること仮定して実施した。本研究は、筋サイズや筋機能を維持するために最適な刺激の頻度を検討するだけでなく、細胞保護機能と筋活動の関連性を知る上でも重要な知見をもたらすものとなった。

方 法

実験動物

実験には、成熟齢の雌 sprague-dawley ラット（体重 234.8 ± 2.5 g）を用い、無作為にコントロール群（Control: Cont, 6 匹）、脊髄損傷群（Spinal cord isolation: SI, 6 匹）に分類した。本研究のすべての手順は、カリフォルニア大学（ロサンゼルス校）の動物実験研究倫理委員会の承認のもと、アメリカ生理学領域の動物実験に関するガイドラインに沿って行われた。脊髄損傷は脊髄を部分的に摘出する外科的手術を行い、脊髄損傷群の右脚の坐骨神経近接部には小型のワイヤレス電気刺激装置（BION 社製、以降 BION と表記）を埋め込み、左脚を SI 群、BION が埋め込まれた右脚を SI+Stim 群とした。外科的手術後、ラットは飲食物を自由摂取とし、実験期間中は 1 日 3 回の排尿の補助を行った。また、少なくとも 1 日に 1 度は脚の神経反射がないことを確認し、筋や関節の固化を防ぐためのストレッチを行った。

外科的手術

脊髄の部分的摘出手術は、完全な無菌下で Grossman ら（muscle & nerve 1998）により報告されている方法に従って行った。ラットは、ketamine hydrochloride（100 mg/体重 kg）および xylazine（5 mg/体重 kg）の投与により麻酔下におかれ、背部を切開し、胸椎の中央部にて脊髄を切断後に部分的に除去した。また、脊椎後根も切断し神経活動を完全に遮断した。切開した背部の縫合後、右脚の腰部付近を切開し、坐骨神経に沿って BION を埋め込んだ。すべての外科手術は、厳密な滅菌環境で行われた。

電気刺激

BION は、ワイヤレスで生体内に移植可能な小型機器（直径 2 mm、長さ 16 mm）であり、高周波の電気刺激を行うことができる。刺激は外部からの高周波発生ユニットに結合したコイルから送られる。コイルは、ラットの下肢から 10 cm 距離を置いて設置した。コイルから送られる BION の刺激は、坐骨神経を介して下肢筋群に伝えられることで筋収縮を誘発することとなる。BION による刺激を行う際には、かかとの角度を 90 度、膝を 120 度に固定して行った。電気刺激は、100 Hz の周波数にて、4 秒間の刺激オンと 4 秒間の刺激オフの

サイクルで5分間継続し5分間の休憩とる、これを3セット行った。このBIONによる刺激プロトコルは1日3度（7時、12時、17時）実施し、14日間継続した。

筋の収縮特性の測定及び摘出

14日間のBIONによる電気刺激後、ヒラメ筋の収縮特性の測定のために、Royら（Roy, Zhong et al. 2002）の方法に従って、麻酔下での下肢の皮膚切開および神経束および筋の分離を行った。ヒラメ筋のかかと側の腱を切断し、ワイヤーを取り付け、筋のアイソメトリック、アイソトニック収縮特性を測定する筋力測定装置に接続した。また、ヒラメ筋の運動神経束に電極を取り付け、電気刺激による収縮特性の測定を行った。

ラット両脚の下肢ヒラメ筋のMax twitch tension, Contraction time, Half relaxation time, Pmax (maximum isometric tension), Fatigue index は、運動神経束に取り付けた電極を介して誘発した筋収縮を筋力測定装置により記録した。Max twitch tension および Half relaxation time は、最適筋長下における10回の収縮によって決定した。Pmax は、5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 Hz の周波数での張力を測定し、最も大きな張力を発揮した周波数でさらに最適な筋長を確認し、その値を記録した。Fatigue index は、2分間に40 Hz のパルスを送る電気刺激後の発揮張力の低下率に基づき決定した。

筋収縮特性の測定後、ラット両脚の下肢筋は速やかに摘出され、筋重量の測定後に液体窒素にて速やかに凍結した。その後、生化学的分析を行う足底筋は、ホモジナイジングバッファー溶液を用いて攪拌機で均質化し、10000 g で遠心分離後に上澄み液をタンパク定量した。定量したサンプル溶液 1 ul あたり 2 ug となるよう水と泳動用サンプルバッファーで調整した。

生化学的分析（SDS-PAGE および Immunoblotting）

足底筋から抽出したタンパク質は、Laemmli（1970年）らの方法に従って10%のアクリルアミドゲルおよび4%のスタッキングゲルにより分離した（Laemmli 1970）。泳動用サンプルバッファーに溶け込んだトータル 80 ug のタンパク質をそれぞれのゲルレーンに注入した。電気泳動は、ゲルあたり 40 mA の定電流で約60分間通電し、サンプルバッファーの色素がゲルの下限まで移動するまで行った。その後、ゲルは速やかにプレートから取り外され、トランスファープロットティングに移動した。

ゲル内の分子量ごとに移動したタンパク質は、セミドライプロットティングユニットを用いてPVDF紙に転写した。転写は、ゲルあたり 90 mA の定電流で約60分間通電することにより行った。トランスファープロットティング終了後に、PVDF紙は5%濃度のスキムミルクを入れたTTBS（100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.8% NaCl, and 0.05% Tween 20）溶液に浸し、

約1時間のブロッキングを行った。その後、サンプルはTTBS溶液で洗浄され、5%牛血清アルブミンを含むTTBS溶液で希釈したHSP72の1次抗体（SPA-810, Assay Designs）に浸し、4°Cで12時間培養した。サンプルはTTBS溶液で洗浄後、5%牛血清アルブミンを含むTTBS溶液で希釈した2次抗体（horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG）に浸し、1時間培養した。その後、サンプルはTTBSで洗浄し、ケミルミネッセンス反応を得るためにECL溶液に浸し、Fuji LAS3000システム（Las-3000; FUJI FILM, Tokyo, Japan）で観察し、MultiGauge software（Ver. 3.0; FUJI FILM）にてバンド面積及び濃度を定量した。

統計処理

すべてのデータは、平均値±標準誤差で示した。群間の有意差は、一元配置分散分析およびTukey Kramerポストホックテストによって有意差検定を行った。すべての有意差は、P<0.05レベルをもって決定した。

結 果

1. 下肢電気刺激による筋重量への影響

表1は、同週齢のコントロール群（Cont群）および2週間の脊椎分離群（SI群）、SI+坐骨神経への電気刺激群（SI+Stim群）から摘出した筋重量と体重当たりの相対筋重量を示している。遅筋であるヒラメ筋の重量は、Cont群と比較してSI群では50%の低下、SI+Stim群では34%の低下となった。体重当たりの筋重量で見ると、SI群では38%の減少であるが、SI+Stim群では20%程度の減少となり、BIONによる電気刺激が部分的にヒラメ筋重量の低

Table 1: Absolute and relative muscle weights after electrostimulation to spinal cord-isolated rat hind limb.

表1：脊髄損傷ラットへの下肢電気刺激による筋重量の変化

	Soleus		Plantaris		Tibialis anterior		Extensor digitorum longus	
	Absolute muscle weight (mg)	Relative muscle weight (mg/g B.W.)	Absolute muscle weight (mg)	Relative muscle weight (mg/g B.W.)	Absolute muscle weight (mg)	Relative muscle weight (mg/g B.W.)	Absolute muscle weight (mg)	Relative muscle weight (mg/g B.W.)
Cont	136.67 ± 14.18	0.52 ± 0.04	293.83 ± 22.71	1.12 ± 0.05	533.4 ± 8.91	2.02 ± 0.09	124.5 ± 8.62	0.48 ± 0.03
SI	68.5 ± 9.4 ^{*#}	0.32 ± 0.04 ^{*#}	151.67 ± 17.13 ^{*#}	0.71 ± 0.09 ^{*#}	306.33 ± 37.58 ^{*#}	1.42 ± 0.16 ^{*#}	78.33 ± 5.68 ^{*#}	0.36 ± 0.03 ^{*#}
SI+Stim	91.17 ± 9.52 [*]	0.42 ± 0.03 [*]	243.67 ± 17.72 [*]	1.13 ± 0.08	597.67 ± 49.42	2.79 ± 0.26 [*]	134.83 ± 11.07	0.63 ± 0.06 [*]

Cont: Control, SI: Spinal cord isolation, SI+Stim: Spinal cord isolation + BION electrostimulation, CT: Contraction time, HRT: Half relaxation time, B.W.: Body weight. * vs. Cont, # vs. SI+Stim

下を抑制していることが認められた。速筋線維が多く占める足底筋では、筋重量がSI群はCont群の48%に減少したが、SI+Stim群では17%の減少であった。体重当たりの相対筋重量では、SI群ではCont群より有意に低かったが(37%の減少)、SI+Stim群ではその低下が完全に抑制された(101%)。同じく速筋である前脛骨筋および長指伸筋では、SI群で認められる筋重量の低下が絶対筋重量、相対筋重量ともに完全に抑制された。このような結果は、BIONによる電気刺激が、筋萎縮の抑制に効果的であることを示すとともに、その効果は速筋でより高いことを示唆している。

2. 下肢電気刺激によるヒラメ筋の筋収縮特性への影響

Table 2にはヒラメ筋のMax twitch tension(最大筋単収縮)、Contraction time(収縮時間)、Half relaxation time(弛緩時間)、Pmax(最大発揮筋張力)、Fatigue index(筋持久力)を示した。Max twitch tensionは、Cont群とSI+Stim群に比べてSI群で有意に低いものの、筋重量当たりでみるRelative max twitchはCont群、SI群、SI+Stim群間に差は認められなかった(Table 1)。Contraction timeはCont群に比較して、SI群とSI+Stim群で有意な短縮が認められた。Half relaxation timeでは、SI群とSI+Stim群でCont群に比べて短縮を示した。Pmaxは、筋が最も大きな張力発揮を示す指標である。Cont群と比較すると、SI群では68%の発揮張力の低下が認められた一方、SI+Stim群では26%の低下であった。筋重量当たりの最大発揮張力(Specific tension)は、SI群で36%の低下がみられるが、SI+Stim群ではCont群との差は認められず、筋の単位面積当たりにおいて電気刺激が最大発揮張力の低下を完全に抑制することが示された(Table 2およびFigure 1)。次に、筋の持久力を示すFatigue indexは、Cont群と比較してSI群では14%低い値を示したが、SI+Stim群では差は認められず、2週間の電気刺激により筋持久力の低下が完全に抑制されることが

Table 2: Muscle contractile features of soleus muscle after electrostimulation to spinal cord isolated rat hind limb.

表2：脊椎損傷ラットへの下肢電気刺激によるヒラメ筋の張力特性の変化

	Max twitch tension (g)	Relative max twitch (g/g M.W.)	Contraction time (ms)	Half Relaxation time (ms)	Pmax (g)	Specific tension (Pmax(g)/mg M.W.)	Fatigue index (Ratio)
Cont	47.64 ± 10.86	0.35 ± 0.06	38.81 ± 4.97	58.54 ± 10.64	221.42 ± 20.27	1.62 ± 0.11	0.90 ± 0.04
SI	24.12 ± 9.53 ^{*#}	0.39 ± 0.13 [#]	28.99 ± 2.55	35.46 ± 9.96 ^{*#}	72.41 ± 27.56 ^{*#}	1.04 ± 0.33 ^{*#}	0.77 ± 0.14 ^{*#}
SI+Stim	44.86 ± 8.72	0.49 ± 0.08 [*]	32.68 ± 2.57	34.48 ± 5.97 [*]	165.09 ± 19.16 [*]	1.81 ± 0.06	0.91 ± 0.15

Cont: Control, SI: Spinal cord isolation, SI+Stim: Spinal cord isolation + BION electrostimulation, CT: Contraction time, HRT: Half relaxation time, M.W.: Muscle weight. * vs. Cont, # vs. SI+Stim

脊髄損傷に伴う下肢筋萎縮に対する電気刺激の抑制効果

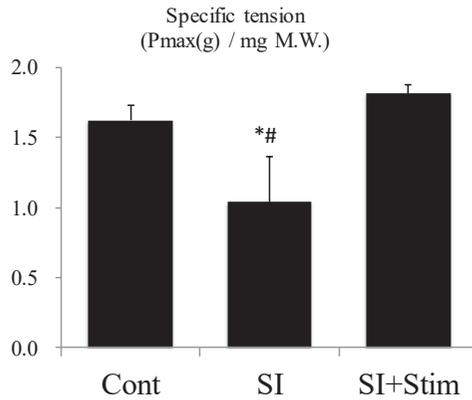


Figure 1. Maximum isometric tension per soleus muscle mass after electrostimulation to spinal cord-isolated rat hind limb.

Cont: Control, SI: Spinal cord isolation, SI+Stim: Spinal cord isolation + BION electrostimulation, CT: Contraction time, HRT: Half relaxation time. * vs. Cont, # vs. SI+Stim

図 1. 脊髄損傷ラットへの下肢電気刺激に伴うヒラメ筋重量あたりの最大発揮筋張力の変化

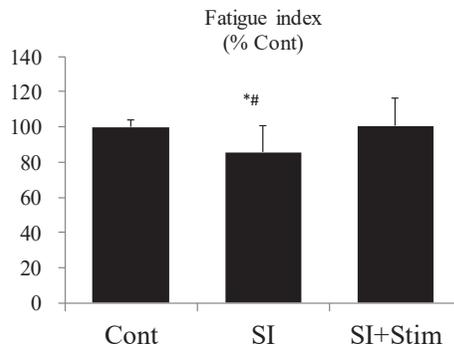


Figure 2. Endurance performance of soleus muscle (Fatigue index) after electrostimulation to spinal cord-isolated rat hind limb.

Cont: Control, SI: Spinal cord isolation, SI+Stim: Spinal cord isolation + BION electrostimulation, CT: Contraction time, HRT: Half relaxation time. * vs. Cont, # vs. SI+Stim

図 2. 脊髄損傷ラットへの下肢電気刺激に伴うヒラメ筋持久力の変化

明らかになった (Table 2 および Figure 2)。

3. 下肢電気刺激による足底筋内 HSP72 発現量の変化

Figure 3 には、ウエスタンプロティングによる足底筋内の HSP72 発現量を示した。

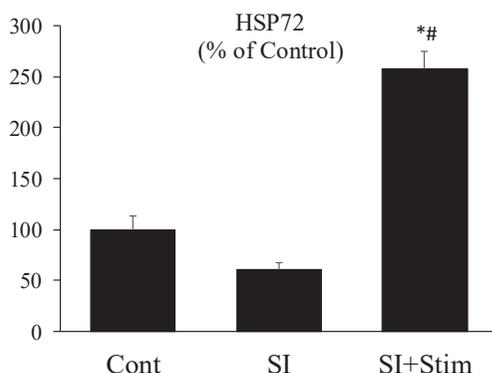


Figure 3. The expression level of HSP72 in plantaris muscle after electrostimulation to spinal cord-isolated rat hind limb.

Cont: Control, SI: Spinal cord isolation, SI+Stim: Spinal cord isolation + BION electrostimulation, CT: Contraction time, HRT: Half relaxation time. * vs. Cont, # vs. SI + Stim

図3. 脊椎損傷ラットへの下肢電気刺激に伴う足底筋のHSP72発現量

HSP72 発現量は、SI 群では Cont 群の60%に減少した。一方で、SI+Stim 群は、2 週間の筋電気刺激により Cont 群の278%まで発現量の有意な増加がみられた。このような結果は、脊椎損傷によって減少する HSP72 は、電気刺激により顕著に高いレベルまでその発現量を増加させることを示すものである (Figure 3)。

考 察

本研究では、ラットの脊椎の一部を摘出することで神経活動を完全に抑制する脊椎損傷モデルを用いて、筋萎縮の進行とこれを抑制する電気刺激の効果を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究で得られた主な知見は、(1) 脊椎損傷モデルのラットでは、2 週間の実験期間においてすべての下肢筋群が著しく萎縮するが、100 Hz の電気刺激を定期的にと与えた下肢では、筋萎縮が軽減(遅筋)または完全に抑制(速筋)された、(2) ヒラメ筋の筋発揮張力の低下は、電気刺激によって筋単位面積あたりでは完全に抑制され、高い持久力を持っていた、(3) 足底筋における細胞保護タンパク質 (HSP72) は脊椎損傷によって発現量が減少するが、電気刺激によって顕著に高いレベルまで発現増加する、というものであった。

骨格筋の萎縮の主要な要因は、活動量の低下によってタンパク質の合成量が減少し、分解量が増加することにある。筋収縮は、活動電位が運動神経を介して筋細胞に伝わりミオシン

とアクチンの相互的な滑走によって生じる。繰り返しの筋収縮は、成長因子の増加や筋衛星細胞の活性化を介して収縮タンパク質の合成を促す一方で、タンパク質の分解を抑制する (Yarasheski 2003)。運動神経の断裂を伴う脊椎の損傷は、断裂部以下の神経の活動を完全に遮断し、筋活動の著しい低下と筋萎縮をもたらす。このため、不活動性筋萎縮を抑制するためには、生体内外から筋収縮活動を強制的にもたすことが有用であると考えられる。本研究では、坐骨神経に沿って小型電気刺激発生装置 (BION) を移植し、すべての下肢筋群を外的刺激によって収縮させた。これまで皮膚表面から電気刺激を与えることで筋萎縮を抑制する研究や一部の筋の神経に直接刺激を与える研究 (Marqueste, Alliez et al. 2004) が主流であったが、これらの方法では一部の筋しか収縮できないことや神経部分を生体外と直接つなげる必要があるために感染症を引き起こすリスクがあった。このため、生体外からの電磁波によってすべての下肢筋群を収縮させる本研究のモデルは人への応用性も高いと考えられる。

先行研究においても、BION を用いた脊椎損傷に伴う筋萎縮の軽減効果がいくつか報告されている (Kim, Roy et al. 2010) (Kim, Roy et al. 2007) (Kim, Roy et al. 2008)。例えば、Kim らは本研究と同様に坐骨神経近位部に BION を移植し、100 Hz で30秒ごとに1秒間の刺激を5分間×6セッションを一日2度、これを30日間継続して行ったが、足底筋では萎縮軽減効果が38%、ヒラメ筋の萎縮軽減への効果は24%であり、両筋ともにコントロールレベルより重量が有意に低かったことを報告している (Kim, Roy et al. 2010)。これまで発表されている研究では、いずれも脊椎損傷後の筋萎縮を完全に抑制するには至っていない。本研究では、これまで行われていない電気刺激の新たなプロトコルを作り出すことも目的の一つであった。その結果、本研究の介入 (100 Hz で4秒刺激オン4秒刺激オフを5分間、3セットを一日3度) によって速筋群の重量の低下 (萎縮) を完全に抑制することできた。一方で、ヒラメ筋の重量は電気刺激を行っていないSI群より高いレベルであったものの、コントロール群と比べると低かった。このような結果は、本実験で用いたプロトコルがこれまで実施されてきた先行研究のものより効果が高いことを示しているが、ヒラメ筋のような遅筋の萎縮を完全に抑制するには不十分であったことを意味している。本研究で用いた100 Hz の刺激は、下肢のほぼすべての筋が完全強縮する強い刺激であり、これ以上の頻度での刺激は、筋損傷を招く可能性がある。そのため、今後収縮プロトコルを修正する際には、刺激の周波数ではなく、刺激の回数や休息時間の改良を視野に入れる必要があるだろう。

次に、ヒラメ筋の筋収縮特性への電気刺激の効果であるが、最大単収縮張力である **Max twitch tension** や最大筋張力発揮を示す **Pmax** は、筋重量当たりで見ると完全に低下が抑制されていた。このことは、繰り返し行われる電気刺激による筋収縮が、筋細胞の収縮機能を維持するのに十分なレベルであったことを示している。また、筋の収縮持続力を示す **Fatigue**

index も電気刺激によってコントロールと同レベルに維持されており、持久力の低下も完全に抑制できることが示された。このような結果は、先行研究では得られておらず、本実験で用いたプロトコルがリハビリテーションの一環として有用であることを示唆している。

筋のサイズや収縮特性の維持に加えて、筋細胞の脆弱化を防ぐこともリハビリテーションでは重要である。本研究では、細胞保護の機能を持つことが報告されている HSP72 の発現量への電気刺激の効果を検討した。HSP72 は、熱により発現量が増加するタンパク質として発見されたが、近年の研究によりタンパク質の三次元構造形成の補助や変性を防ぐ働きをもつ分子シャペロンとしての機能を持つことが明らかになっている (Ku, Yang et al. 1995) (Glover and Lindquist 1998)。HSP72 は、骨格筋内において熱や運動によって増加する一方で、不活動によって減少する。筋内での HSP72 の発現は、不活動性筋萎縮に部分的に影響を与えることが示唆されている (Senf, Dodd et al. 2008, Senf, Dodd et al. 2010) (Naito, Powers et al. 2000)。例えば、Naito らは事前に熱を加えることで筋内の HSP72 の発現量を増加させたラット骨格筋では、その後の不活動による筋萎縮が軽減したことを報告している。また、Senf らは HSP72 を遺伝子レベルで増加させたラットのヒラメ筋では、7 日間の後肢懸垂に伴う筋萎縮が約 40% 軽減したことを報告している (Senf, Dodd et al. 2008)。これらの先行研究に基づく、足底筋において筋電気刺激により顕著に増加した HSP72 は、脊椎損傷に伴う筋萎縮の抑制に貢献していることが推察される。

不活動になった筋肉は、萎縮するだけでなく損傷を受けやすい脆弱化が起こることが知られている。例えば、Taillandier らは、不活動後のラットの脚の再接地後にタンパク質のユビキチン化による筋タンパク質の分解が顕著に高まることを報告しており (Taillandier et al. 2003)、不活動により脆弱化した筋が機械的負荷によって損傷することが示唆される。この不活動性の筋の脆弱化に関して、HSP72 はその働きにより筋を保護する可能性を持つことが示唆されている。例えば、事前に HSP72 を増加させるような不活動中の温熱負荷は、その後の再接地 (再活動) に伴う軽減させる (Selsby, Rother et al. 2007)。また、HSP72 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、疲労困憊に至るような運動後の筋細胞のダメージが低く、筋持久力も高かったことが報告されている (Liu, Lin et al. 2013)。このことから、電気刺激によって HSP72 を高いレベルまで増加させた筋では、細胞保護機能が高まることが推察され、脊椎損傷後のリハビリテーションにおいても筋の損傷を防ぐ観点から高い有益性を持つと考えられる。

脊椎損傷後の治療の早期では、運動神経レベルでの再生治療とその後のリハビリテーションに向けた準備が必要である。本研究では、特に脊椎損傷中に生じる不活動性筋萎縮を防ぐとともに筋機能をできるだけ高い状態で維持するという観点から下肢筋群を収縮させる電気刺激モデルを用いた。すべての筋の萎縮を完全に防ぐことは出来なかったが、筋の収縮特性

の維持や細胞保護機能の獲得という点から、本研究で用いた電気刺激プロトコルはこれまでの先行研究と比較しても高い有用性があると考えられる。今後の研究では、さらに良いプロトコルを探索するとともに、その効果を高めるようなサプリメントや薬剤投与などを組み合わせることも検討すべきであろう。また、本研究では、細胞保護という観点から HSP72 の発現量を検討したが、代謝機能や筋の細胞レベルでの形状なども今後検討することで、電気刺激の効果をより明確にすることができるだろう。

謝 辞

本研究は、筆者が広島修道大学の派遣研究制度を活用し、2014年9月～2015年8月までのカリフォルニア大学（ロサンゼルス校）に派遣された際の、Dr. Edgerton の神経生理学教室での研究成果の一部である。本研究の実施に際して協力いただいた、Hui Zhong 医師、Roland R Roy 博士および Reggie Edgerton 教授に深い感謝の意を表します。

参 考 文 献

- Angeli, C. A., V. R. Edgerton, Y. P. Gerasimenko and S. J. Harkema (2014). "Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans." *Brain* **137** (Pt 5): 1394–1409.
- Broome, C. S., A. C. Kayani, J. Palomero, W. H. Dillmann, R. Mestril, M. J. Jackson and A. McArdle (2006). "Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity." *Faseb j* **20**(9): 1549–1551.
- Dodd, S., B. Hain and A. Judge (2009). "Hsp70 prevents disuse muscle atrophy in senescent rats." *Biogerontology* **10**(5): 605–611.
- Glover, J. R. and S. Lindquist (1998). "Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins." *Cell* **94**(1): 73–82.
- Kim, J. A., R. R. Roy, S. J. Kim, H. Zhong, F. Haddad, K. M. Baldwin and V. R. Edgerton (2010). "Electromechanical modulation of catabolic and anabolic pathways in chronically inactive, but neurally intact, muscles." *Muscle Nerve* **42**(3): 410–421.
- Kim, S. J., R. R. Roy, J. A. Kim, H. Zhong, F. Haddad, K. M. Baldwin and V. R. Edgerton (2008). "Gene expression during inactivity-induced muscle atrophy: effects of brief bouts of a forceful contraction countermeasure." *J Appl Physiol (1985)* **105**(4): 1246–1254.
- Kim, S. J., R. R. Roy, H. Zhong, H. Suzuki, L. Ambartsumyan, F. Haddad, K. M. Baldwin and V. R. Edgerton (2007). "Electromechanical stimulation ameliorates inactivity-induced adaptations in the medial gastrocnemius of adult rats." *J Appl Physiol (1985)* **103**(1): 195–205.
- Ku, Z., J. Yang, V. Menon and D. B. Thomason (1995). "Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy." *Am J Physiol* **268** (6 Pt 1): C1369–1374.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680–685.
- Liu, C. C., C. H. Lin, C. Y. Lin, C. C. Lee, M. T. Lin and H. C. Wen (2013). "Transgenic overexpression of heat shock protein 72 in mouse muscle protects against exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage." *J Formos Med Assoc* **112**(1): 24–30.
- Lomonosova, Y. N., B. S. Shenkman and T. L. Nemirovskaya (2012). "Attenuation of unloading-induced rat

- soleus atrophy with the heat-shock protein inducer 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin." *FASEB J* **26**(10): 4295–4301.
- Marqueste, T., J. R. Alliez, O. Alluin, Y. Jammes and P. Decherchi (2004). "Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair." *J Appl Physiol* (1985) **96**(5): 1988–1995.
- Miyabara, E. H., J. L. Martin, T. M. Griffin, A. S. Moriscot and R. Mestril (2006). "Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(4): C1128–1138.
- Miyabara, E. H., T. L. Nascimento, D. C. Rodrigues, A. S. Moriscot, W. F. Davila, Y. AitMou, P. P. deTombe and R. Mestril (2012). "Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy." *Pflugers Arch* **463**(5): 733–741.
- Naito, H., S. K. Powers, H. A. Demirel, T. Sugiura, S. L. Dodd and J. Aoki (2000). "Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats." *J Appl Physiol* (1985) **88**(1): 359–363.
- Naito, H., S. K. Powers, H. A. Demirel, T. Sugiura, S. L. Dodd and J. Aoki (2000). "Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats." *J Appl Physiol* **88**(1): 359–363.
- Ogata, T., Y. Oishi, K. Higashida, M. Higuchi and I. Muraoka (2009). "Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**(5): R1557–1563.
- Oishi, Y., K. Taniguchi, H. Matsumoto, A. Ishihara, Y. Ohira and R. R. Roy (2002). "Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature." *J Appl Physiol* (1985) **92**(3): 1097–1103.
- Roy, R. R., K. M. Baldwin and V. R. Edgerton (1991). "The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity." *Exerc Sport Sci Rev* **19**: 269–312.
- Roy, R. R., H. Zhong, R. J. Monti, K. A. Vallance and V. R. Edgerton (2002). "Mechanical properties of the electrically silent adult rat soleus muscle." *Muscle Nerve* **26**(3): 404–412.
- Selsby, J. T., S. Rother, S. Tsuda, O. Prakash, J. Quindry and S. L. Dodd (2007). "Intermittent hyperthermia enhances skeletal muscle regrowth and attenuates oxidative damage following reloading." *J Appl Physiol* (1985) **102**(4): 1702–1707.
- Senf, S. M., S. L. Dodd and A. R. Judge (2010). "FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70." *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(1): C38–45.
- Senf, S. M., S. L. Dodd, J. M. McClung and A. R. Judge (2008). "Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy." *Faseb J* **22**(11): 3836–3845.
- Tashiro, S., S. Nishimura, H. Iwai, K. Sugai, L. Zhang, M. Shinozaki, A. Iwanami, Y. Toyama, M. Liu, H. Okano and M. Nakamura (2016). "Functional Recovery from Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation Combined with Treadmill Training in Mice with Chronic Spinal Cord Injury." *Sci Rep* **6**: 30898.
- Thomason, D. B., R. B. Biggs and F. W. Booth (1989). "Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle." *Am J Physiol* **257** (2 Pt 2): R300–305.
- Yarasheski, K. E. (2003). "Exercise, aging, and muscle protein metabolism." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **58**(10): M918–922.