

学 位 論 文 題 名

Study on determination of regulatory factor of the exercise capacity and development of new exercise training/therapy based on the mitochondrial function

(ミトコンドリア機能を基盤とした運動能力の調節因子の解明と

新規運動トレーニング・運動療法の確立に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】ヒトや動物における生命活動の唯一のエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate : ATP) は、主に酸素を利用してミトコンドリアにて生成される。特に、身体運動中の骨格筋では安静時に比べて多くの ATP が必要とされることから、これらの遂行に関して骨格筋におけるミトコンドリアでの ATP 産生の役割は大きい。しかしながら、骨格筋ミトコンドリアは、生理的または病的な刺激に反応して機能および形態をダイナミクスに変化させる。そして、このような反応の適応として、運動能力が調節される。例えば、運動トレーニングは、骨格筋ミトコンドリア機能を高めることにより運動能力の増加をもたらす。これに対して、加齢や慢性疾患は、骨格筋ミトコンドリア機能を障害することで運動能力が低下する。注目すべきこととして、運動能力は、代謝疾患や心血管疾患の発症、さらには生命予後に深く関与する。したがって、運動能力および骨格筋ミトコンドリア機能は、ヒトが日常生活を営む根幹となる健康の維持や増進あるいは寿命において重要な役割を担っている。しかしながら、運動能力および骨格筋ミトコンドリア機能を正に制御する因子については不明な点が多い。また、運動能力を向上・改善させる唯一の方法は運動トレーニングあるいは運動療法であるが、これらの効果機序も完全には明らかにされていない。さらに、病態におけるミトコンドリア機能不全に伴う運動能力低下が薬物療法によって改善できるかどうかは不明である。これらの点を解明することによって、運動能力の向上・改善を目指した新たな治療法の開発が期待できる。したがって、本研究の目的は、臨床および基礎研究の両面から、新規運動トレーニングの開発やそのトレーニング効果獲得の機序の解明および運動能力の基盤にある骨格筋ミトコンドリア機能を調節する因子の解明であった。さらに、慢性疾患におけるミトコンドリア機能障害に付随する運動能力低下が改善しうる薬物療法を開発することも目的とした。

【方法・結果】本研究は3つの臨床および基礎研究から構成された。第1章として、1) 血流制限を併用した新規レジスタンス運動が合理的にトレーニング効果を獲得できるか、2) そのトレーニング効果獲得が骨格筋内代謝的負荷 (クレアチンリン酸 (phosphatecreatine : PCr) や pH の低下) の亢進と関連するか、3) 有酸素性運動能力が骨格筋内代謝的負荷の程度に影響するかどうか検証を行った。その結果、血流制限下レジスタンストレーニングは筋横断面積および筋力を有意に増加させた。また、リン磁気共鳴分光法によって測定した血流制限下レジスタンス運動中の骨格筋内代謝的負荷の程度がトレーニング後の筋肥大・筋力増加と密接に関連した。一方、有酸素

性運動能力が高い被験者ほど、自然血流下での運動中の PCr の低下が有意に小さく、血流制限下レジスタンス運動中の PCr の低下が有意に大きかった。さらに、血流制限下レジスタンス運動中の骨格筋内代謝的負荷の程度は有酸素性運動能力と有意な相関関係があった。したがって、血流制限下レジスタンス運動中の骨格筋内代謝的負荷の亢進はトレーニング後の筋肥大および筋力増加と密接に関連することから、トレーニング効果を予測できることが示唆された。また、ミトコンドリア機能を基盤とする有酸素性能力が高いほどトレーニング効果を増大させることが示唆された。

近年、このミトコンドリア機能を基盤とした有酸素性運動能力を調節しうるシグナルとして、脳由来神経栄養因子 (BDNF) とその受容体 (TrkB 受容体) が注目されている。BDNF-TrkB シグナルの活性化は脂肪酸代謝を亢進することが報告されていることから、骨格筋ミトコンドリア機能に関与していることが考えられた。第 2 章では、運動トレーニング誘発性の運動能力と骨格筋ミトコンドリア機能の増加に関する BDNF-TrkB シグナルの役割に関して検討が行われた。その結果、TrkB 受容体アゴニストである 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) を投与したマウスは、運動トレーニングを行ったマウスと同様に、TrkB のリン酸化の増加に一致して、骨格筋ミトコンドリア機能および脂肪酸代謝が増加し、それに付随して運動能力が増加した。同様に、リコンビナントヒューマン BDNF を投与したマウスでも運動能力が有意に増加した。一方、骨格筋培養細胞を用い、カフェインにて骨格筋収縮を誘導すると BDNF-TrkB シグナルは活性化された。また、骨格筋培養細胞への BDNF もしくは 7,8-DHF の添加は直接的に TrkB のリン酸化を増加し、脂肪酸代謝およびミトコンドリアバイオジェネシス関連タンパクの発現を増加させた。一方、これらの増加は抗 TrkB 受容体抗体の投与によって抑制された。したがって、BDNF-TrkB シグナルは、運動トレーニング効果の強力な調節因子であり、運動トレーニング誘発性の運動能力と骨格筋ミトコンドリア機能の増加を制御することが示唆された。

一方、運動能力およびミトコンドリア機能は慢性的な病態で低下することは既存の事実である。そこで、第 3 章では、糖尿病モデルマウスにおける運動能力と骨格筋ミトコンドリア機能におよぼす薬物療法の効果を検討した。その結果、糖尿病モデルマウスではレニン・アンジオテンシン系が活性化し、それに伴い運動能力および骨格筋ミトコンドリア機能を低下させた。この骨格筋ミトコンドリア機能および運動能力の低下はアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の投与により部分的に改善した。また、これまでに糖尿病モデルマウスの運動能力低下と骨格筋ミトコンドリア機能障害に骨格筋酸化ストレスが重要な役割を果たすことが報告されている。したがって、骨格筋における酸化ストレスを検討したところ、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬は酸化ストレスを減少させた。したがって、レニン・アンジオテンシン系の抑制剤は、糖尿病モデルマウスにおける運動能力低下および骨格筋ミトコンドリア機能障害を改善させた。さらに、その骨格筋障害には、酸化ストレスが深く関与していた。

【結論】本研究の結果において、有酸素運動能力および骨格筋ミトコンドリア機能に対して BDNF-TrkB シグナルや酸化ストレスが極めて重要な役割を果たしていることが示された。したがって、今後、BDNF-TrkB シグナル-酸化ストレス制御を軸とした運動能力の向上・改善を目指した介入方法の確立が重要な課題である。また、血流制限下レジスタンス運動のような独創的かつ効果的な運動トレーニング法の開発と臨床応用、さらには有酸素運動やレジスタンス運動を模擬できるような薬剤や自然化合物の探索も重要な課題であると思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	岩崎	倫政
副査	教授	田中	真樹
副査	准教授	遠山	晴一
副査	教授	筒井	裕之

学位論文題名

Study on determination of regulatory factor of the exercise capacity and development of new exercise training/therapy based on the mitochondrial function

(ミトコンドリア機能を基盤とした運動能力の調節因子の解明と
新規運動トレーニング・運動療法の確立に関する研究)

運動能力は、加齢や慢性疾患の発症、さらには生命予後に深く関与する。運動トレーニングは、骨格筋ミトコンドリア機能向上およびミトコンドリア生合成の亢進、骨格筋線維を遅筋線維へシフトさせることで、骨格筋エネルギー代謝を亢進させ運動能力を調節しているが、それを制御する因子については不明な点が多い。脳由来神経栄養因子 (BDNF) はその受容体であるチロシンキナーゼ (TrkB) 受容体を介して、神経の維持や生存、軸索の新芽形成に関与している。また、近年、BDNF はマウス脳ミトコンドリア機能の増加や骨格筋培養細胞において脂肪酸の酸化を亢進することが報告された。

本研究では、運動トレーニングによる運動能力と骨格筋ミトコンドリア機能の増加におよぼす BDNF と TrkB 受容体の役割について検討を行った。

研究 1 として非運動トレーニングマウスを用いた解析から TrkB 受容体アゴニストの投与は運動トレーニング誘発性の運動能力と骨格筋ミトコンドリア機能、遅筋線維の増加において BDNF-TrkB シグナルが重要な要素であることを明らかにした。また、TrkB 受容体アゴニストと同様に、リコンビナントヒト BDNF の投与は非運動トレーニングマウスの運動能力、骨格筋ミトコンドリア機能および遅筋線維を増加させることを明らかにした。次に、研究 2 として骨格筋培養細胞を用いた解析から BDNF 投与は直接的にミトコンドリア機能を増加させ、その増加は抗 TrkB 受容体抗体および AMPK 阻害剤によって抑制されることを明らかにした。さらに、研究 3 として BDNF ノックアウトマウスを用いた解析から BDNF の欠損は運動能力およびミトコンドリア機能を低下させることを明らかにした。これらの結果から運動トレーニング誘発性の運動能力と骨格筋ミトコンドリア機能の増加において BDNF-TrkB シグナルが重要な制御因子であることを解明した。本研究の *in vivo* および *in vitro* の結果は BDNF-TrkB シグナルの活性化が PGC-1 α の発現や AMPK のリン酸化の増加および運動能力を向上させたが、これらは運動トレーニングと同等の効果を示した。したがって、BDNF-TrkB シグナルの刺激は運動トレーニングの代替手段となりうる可能性が考えられる。また、BDNF ノックアウトマウスを用いた研究の結果より BDNF-TrkB シグナルが運動能力およびミトコンドリア機能に必須であることを示唆している。

以上の研究の結果について主査や副査の教授および准教授から、①運動トレーニングも

しくは BDNF 投与における心・脳・神経機能への効果, ②運動能力における骨格筋機能と脳機能の因果関係について, ③BDNF におけるミトコンドリア量, 毛細血管への効果, ④運動能力における他の神経栄養因子の役割について, ⑤ヒトにおける臨床応用について, ⑥今後の研究課題について等の質問を受けた。本研究では, BDNF-TrkB シグナルにおける骨格筋の分子機序を検討した。運動能力は心臓, 肺機能, 末梢循環などの複合要因に決定されると考えられるが, これまでの多くの研究で, それらよりミトコンドリアによる骨格筋エネルギー代謝が最も重要な規定因子であることが明らかにされている。しかしながら, BDNF-TrkB シグナルの活性化による他臓器, 心・脳・神経機能, 毛細血管などへの影響は除外できないため, 今後検討する必要がある。また, BDNF は糖代謝や認知機能に影響を及ぼすことが知られているため, 併せて検討が必要である。今後の方針として, ① BDNF-TrkB シグナルを介した運動能力の制御に, AMPK-Sirt1-PGC-1 経路の他に, 運動能力の制御に重要な分子である CaMK や p38 MAPK の関与について, ②BDNF, TrkB 受容体は神経栄養因子の一つであり, 他の神経栄養因子の役割について, ③BDNF ノックアウトマウスで低下した運動能力およびミトコンドリア機能が運動トレーニングもしくは AMPK の活性化剤である AICAR の投与によって改善するかどうかを検討する必要がある。申請者は, 全ての質問に対して, 自己の実験データや文献的考察に基づいて概ね適切な回答をした。

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ, 申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。