



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	熱刺激がモノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットの横隔膜における収縮機能に及ぼす影響
Author(s) 著 者	阿部, 真佐美
Degree number 学位記番号	第 100 号
Degree name 学位の種別	修士 (理学療法学)
Issue Date 学位取得年月日	2015-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

修士論文の内容の要旨

保健医療学研究科 博士課程前期 理学療法学・作業療法専攻 身体機能代償学分野	学籍番号 13MP04 氏 名 阿部 真佐美
論文題名 (日本語) 熱刺激がモノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットの横隔膜における収縮機能に及ぼす影響	
論文題名 (英語) Effects of heat stress on contractile function in the diaphragm from rat with monocrotaline-induced pulmonary hypertension	
<p> 【目的】肺高血圧症 (PH) では、息切れや著しい運動耐容能の低下が高い頻度で認められ、日常生活が障害される。近年、これらの症状が、主な吸気筋である横隔膜の筋力低下に起因することが示唆されている。また、PH 横隔膜では、筋線維の萎縮とともに、単位断面積あたりの張力 (固有張力) の著しい低下が認められている。固有張力低下のメカニズムは十分明らかにされていないが、PH 患者の横隔膜から採取したスキンドファイバー (除膜筋線維) において Ca^{2+} 誘因性の最大固有張力の低下が認められることから、筋原線維タンパク質の選択的な減少もしくは酸化的な修飾がその要因であると考えられている。一方、近年、熱刺激が Heat shock protein (HSP) 72 の発現を介して、タンパク質の分解を抑制すること、また、抗酸化酵素を増加させることで、酸化ストレスから細胞を保護することが報告されている。そこで本研究では、モノクロタリン (MCT) 誘発性 PH ラットを用い、熱刺激が PH 横隔膜の収縮機能低下を抑制するかどうかを検討した。 </p> <p> 【方法】5 週齢の Wistar 系雄性ラットを、対照 (C) 群、モノクロタリン (MCT) 誘発性 PH (M) 群、それらに熱刺激を加えた C+H 群及び M+H 群に分けた。PH は、麻酔下にて 10 mg/ml の MCT 溶液を腹腔内に投与 (60 mg/kg) することで作成した。熱刺激として、2 日に 1 回ずつ、ラット下腹部から尾方全体を 42 度の温水に 30 分間浸した。MCT 投与 4 週間後に、横隔膜を採取し、筋束を作成して電気生理学的に単収縮及び強収縮張力を測定した。また、生化学的方法を用い、筋原線維タンパク質、HSP 及び抗酸化酵素の発現量と、筋原線維タンパク質の酸化的修飾の量を分析した。 </p> <p> 【結果】横隔膜の最大固有張力は、C 群と比較して M 群で低下した。HSP72 発現量は、熱刺激を負荷した群で著しい増加が認められた。一方、各群間において、筋原線維タンパク質であるミオシンやトロポニン T の発現量に差異は認められなかった。C 群と比較して、M+H 群で抗酸化酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 2 及びカタラーゼの発現量が増加した。筋原線維タンパク質において、酸化ストレスの指標である 3-ニトロチロシン、マロンジアルデヒド、S-ニトロシル化、メチオニンスルホキシドの量に、各群間で差異は認められなかった。さらに、追加実験において、SOD およびカタラーゼの作用を有する抗酸 </p>	

化剤である EUK-134 の投与により、M 群の張力低下が抑制された。

【考察】本研究の結果、熱刺激は、PH ラットの横隔膜における固有張力の低下を抑制する可能性が示唆された。また、これらの効果は、HSP72 発現量の増加を伴っていたことから、HSP72 の働きを介して生じたのかもしれない。しかしながら、固有張力の低下に関与すると考えられるミオシンやトロポニン T の減少は、PH 横隔膜において観察されなかった。したがって、本研究において認められた熱刺激の効果は、HSP72 によるタンパク質分解抑制作用を介さない、別の因子によって誘引されたものと考えられる。一方、興味深いことに、熱刺激により、PH 横隔膜において、抗酸化酵素である SOD2 やカタラーゼの増加が認められた。PH 横隔膜では、呼吸数が顕著に増加すること、また、収縮活動量の増大は、筋機能低下の要因となる活性酸素種の生成を増加させることが示されている。したがって、これらの知見から、PH 横隔膜の機能低下には酸化ストレスが関与しており、熱刺激は抗酸化酵素の発現量を増加させることで収縮機能の改善に寄与することが示唆される。この考えを支持するように、本研究では、SOD 及びカタラーゼの機能を有する抗酸化物質である EUK-134 が PH 横隔膜の機能低下を防止することが明らかとなった。

【結論】熱刺激が PH に伴う横隔膜の固有張力の低下を抑制する可能性が示唆された。そのメカニズムとして、熱刺激によって抗酸化酵素発現が増加し、筋原線維機能の低下を抑制する可能性が考えられる。

キーワード：肺高血圧症，横隔膜，熱刺激，抗酸化酵素，筋原線維タンパク質

【OBJECTIVE】 Patients with pulmonary hypertension (PH) suffer from dyspnea and decreased exercise tolerance, which are associated with impairment in activity of daily living. Recently, clinical studies suggest the pivotal role of inspiratory muscle dysfunction in PH-induced dyspnea. The mechanism underlying PH-induced diaphragm dysfunction is unclear, but can be explained by selective loss and/or oxidative modifications of myofibrillar proteins. Heat stress was shown to increase heat shock protein (HSP) 72 and antioxidative enzymes, and thus inhibit the catabolic and oxidative signaling. Here, we examined the effect of heat stress on diaphragm function in rat with PH.

【METHODS】 Male Wistar rats were randomly assigned to control (C), control with heat stress (C+H), PH (M), PH with heat stress (M+H) group. PH was induced in rats by a single injection of monocrotaline (60 mg/kg). C+H and M+H group were exposed to heated water at 42°C for 30 min every other day for 4 weeks. After 4 weeks of injection, diaphragm muscle was removed and analyzed for force production. To assess mechanisms underlying the effects of heat stress, we measured expression of myofibrillar proteins, HSP, antioxidative enzymes, and redox modifications.

【RESULTS】 Compared with C group, there was a decreased tetanic force per cross-sectional area in the M group. The levels of HSP72 were increased in the CH and MH groups, but there was no difference in the expression levels of myosin and troponin T between the groups. The levels of superoxide dismutase (SOD) 2 and catalase were increased in M+H group. The levels of redox modification, including 3-nitrotyrosin, malondialdehyde, S-Nitroso-Cysteine, and methionine sulfoxide, did not differ between the groups. Furthermore, in an additional experiment, administration

of the antioxidant EUK-134, a SOD and catalase mimetic, significantly improved tetanic force per cross-sectional area in the M group.

【DISCUSSION】 Our data suggest that heat stress can protect against diaphragm dysfunction in PH rat. These effects were accompanied by the increased HSP72 expression, implying the protective role of HSP72 in PH diaphragm. However, there was no change in myosin and troponin T expression in PH diaphragm. Thus, these data suggest that heat stress-induced improvement in diaphragm contractility would not be mediated by anti-proteolytic effects of HSP72. Intriguingly, heat stress induced upregulation in SOD2 and catalase in PH diaphragm. It was reported that breathing frequencies are markedly increased in patients and rats with PH. Moreover, increased contractile activity has been shown to cause overproduction of reactive oxygen species, which can depress force production in skeletal muscle. Thus, these data suggest that the protective effect of heat stress can be mediated by increased antioxidative capacity in PH diaphragm. This suggestion was supported by our findings that the administration of antioxidant, EUK-134, recovered the force depression in PH diaphragm.

【CONCLUSION】 The present study suggests that heat stress can ameliorate PH-induced diaphragm dysfunction. These protective effects could result from increased antioxidative capacities through upregulation of SOD2 and catalase.

Keywords : pulmonary hypertension, diaphragm, heat stress, antioxidant, myofibrillar proteins

- 1 論文内容の要旨は、研究目的・研究方法・研究結果・考察・結論等とし、簡潔に日本語で1,500字程度に要約すること。併せて英語要旨も日本語要旨と同様に作成すること。
- 2 2枚目からも外枠だけは必ず付けること。

論文審査の要旨及び担当者

報 告 番 号	第 100 号	氏 名	阿部 真佐美
論 文 審 査 担 当 者	主 査： 乾 公美 副主査： 古畑 智久 副主査： 小塚 直樹		
<p>熱刺激がモノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットの 横隔膜における収縮機能に及ぼす影響</p> <p>Effects of heat stress on contractile function in the diaphragm from rat with monocrotaline-induced pulmonary hypertension</p> <p>PH(肺高血圧症)は、息切れや運動耐容能の低下が認められADLが障害される。近年、これらは横隔膜の筋力低下に起因することが示唆されている。PH 横隔膜は筋線維萎縮と共に固有張力の低下を生じる。そのメカニズムは不明であるが、筋タンパク質の減少もしくは酸化的要因が考えられている。一方、HSP(Heat Shock Protein)72が筋タンパク質の分解を抑制し抗酸化酵素を増加させ細胞を保護することが報告されている。本研究では、モノクロタリン誘発性PHラットに熱刺激を加え、PH横隔膜の収縮機能低下を抑制するかを検討した。</p> <p>方法は、C(対象)群、M(モノクロタリン誘発性PH)群、C+H(Cに熱刺激負荷)群、M+H(Mに熱刺激負荷)群の筋張力、筋タンパク質、HSP、抗酸化酵素の発現量や筋タンパク質の酸化的修飾量を分析した。</p> <p>筋固有張力は、M群で低下、HSP72は熱刺激負荷群で増加した。ミオシンやトロポニンTの発現量は変わらなかった。抗酸化酵素は、M+H群で増加したが、酸化ストレスの種々の指標に差異はなかった。抗酸化剤であるEUK-134の投与によりM群の張力低下が抑制された。以上により、PHに起因する横隔膜筋の筋力低下に対し、熱刺激負荷はHSP72による筋タンパク質分解によるものではなく、抗酸化酵素の発現量を増加させることで収縮機能の維持に貢献することが示唆された。</p> <p>本研究は、PHに起因する横隔膜筋の筋力低下に対し、温熱療法の有効性とその機序を検討した基礎的研究である。副主査より、酸化ストレス検出の改善策や至適熱刺激強度の設定などについて今後の研究の方針についての記述を加えるようにとの意見があった。</p> <p>研究の意義や目的、方法、結果、考察は、修士(理学療法)の学位に相応しいとの評価を受け、副査の意見に沿った修正がなされたので合格と判断した。</p>			

※報告番号につきましては、事務局が記入します。