

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13185

研究課題名(和文)骨格筋微小循環制御の解明-二光子レーザー顕微鏡によるアプローチ-

研究課題名(英文) Exploring Regulatory Mechanisms of Skeletal Muscle Microcirculation by Using Two-photon Laser Scanning Microscopy

研究代表者

堀田 一樹 (Hotta, Kazuki)

新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・講師

研究者番号：30791248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の血流は運動時に劇的に増加します。本研究では、運動負荷によって損傷を引き起こしたラットの骨格筋において、2光子レーザー走査型顕微鏡を使って、毛細血管の血行動態を3次元的に観察しました。ラットの血管内に蛍光物質を流すことで、血流観察が可能のように工夫しました。運動によって損傷した骨格筋では、蛍光物質が毛細血管の外に漏れ出していることが分かりました。損傷筋において血管透過性に関与する血管内皮増殖因子の発現が起きていること分かり、骨格筋の微小循環の制御は筋細胞と血管の相互作用によって調節されていることが示されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の毛細血管は、筋細胞との様々な物質交換を行う場です。本研究では、骨格筋の毛細血管は血管透過性(血管内外の物質移動のしやすさ)を調節していることを明らかにしました。運動によって損傷を受けた際に、血管透過性が高まり、血球成分などが間質へ漏出しやすくなることで、壊れた細胞の貪食を促進すると考えられました。逆に、再生筋が出現してくる回復期には血管透過性が低下し、再生筋の成熟を促すものと思われました。

研究成果の概要(英文)：Capillary blood flow dramatically increases during exercise. We obtained 3-dimensional images of capillary blood flow of rat skeletal muscle by using two-photon laser scanning microscopy. Fluorescent dye was intravascularly administered to obtain the 3-D images. In normal skeletal muscle, the dye retained in the vessel for an hour after the administration; however, it leaked out from vessel in exercise-induced injured muscle. The amount of extravascular leakage, which indicates microvascular permeability, was elevated in injured muscle as compared to intact muscle. Vascular endothelial growth factor expression was enhanced in swelling myocytes and macrophage infiltrated myocytes, concurrently with microvascular hyperpermeability. These results likely suggest that new insight of regulatory mechanism of skeletal muscle microcirculation by myocyte and capillary endothelium interacting each other.

研究分野：循環生理学，心臓リハビリテーション，理学療法学

キーワード：骨格筋 微小循環 2光子レーザー走査型顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

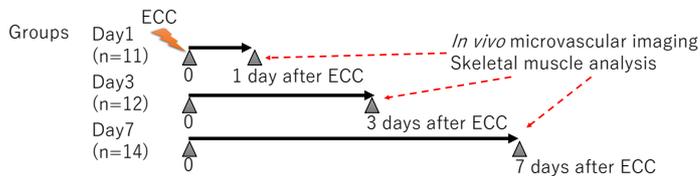


Fig 1. Experimental design

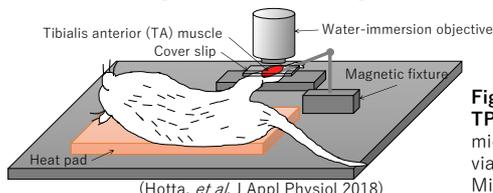


Fig 2. In vivo imaging using TPLSM. Skeletal muscle microcirculation was visualized via TPLSM (TCS-SP5 MP, Leica Microsystems GmbH, Wezlar, Germany) under anesthesia. Fluorescent dye (rhodamine B isothiocyanate-labeled dextran with 70 kDa) was intravenously infused just before image acquisition. 3-D images of TA muscle were acquired every 10 min for 60 min and interstitial leakage of fluorescent dye was volumetrically determined (Fiji, NIH, Bethesda, MD).

一方で、毛細血管がもつ重要な役割の一つとして、血管内外の物質交換が挙げられる。脳や骨格筋は元来血管透過性が低い臓器として知られていたが、これまでに実施された実験条件は骨格筋を生体外に摘出した非生理的な実験条件である。生体内で動物が生きた状態で血管透過性を観察する手法がこれまでなかったため、我々は空間分解能の高い二光子レーザー走査型顕微鏡を用いて、in vivo イメージングの導入を進めることとした。骨格筋の循環動態が理解されることで、糖尿病や心不全の病態や、運動後のアイシングや温熱療法などの物理療法の効果に関して理解が進むと期待された

2. 研究の目的

本研究では、二つの目的を掲げた。一つは、2光子レーザー走査型顕微鏡を用い、in vivo 観察モデルを構築することであり、二つ目の目的はこのイメージング技術を用いて運動負荷後の血管透過性を解明することである。

3. 研究の方法

実験動物として、Wistar 系雄性ラット (10-13 週例) を用いた。実験デザインは Figure 1 に示す通り、ラットを 4 群に分類した。イソフルラン麻酔下にて、ラットの右前脛骨筋に対して電気刺激による伸長性筋収縮 (ECC) を合計 200 回実施することで、運動誘発性筋損傷モデルを作成した。ECC から翌日 (Day1)、3 日後 (Day3)、7 日後 (Day7) および 14 日後 (Day14) に以下に述べるようなイメージングを実施した。

2光子レーザー走査型顕微鏡を用いたイメージング (Fig 2) : イソフルラン麻酔下にて、ラットの右頸動脈にカテーテルを留置し、血管内に蛍光物質 (rhodamine-dextran, 70 kDa) を投与した。右前脛骨筋の皮膚および筋膜を剥離し、Figure 2 に示すように骨格筋の毛細血管の三次元構造を 2光子レーザー走査型顕微鏡 (TCS-SP5 MP, Leica Microsystems GmbH, Germany) を用いて観察した。蛍光物質投与直後から同一部位を 90 分間観察した。

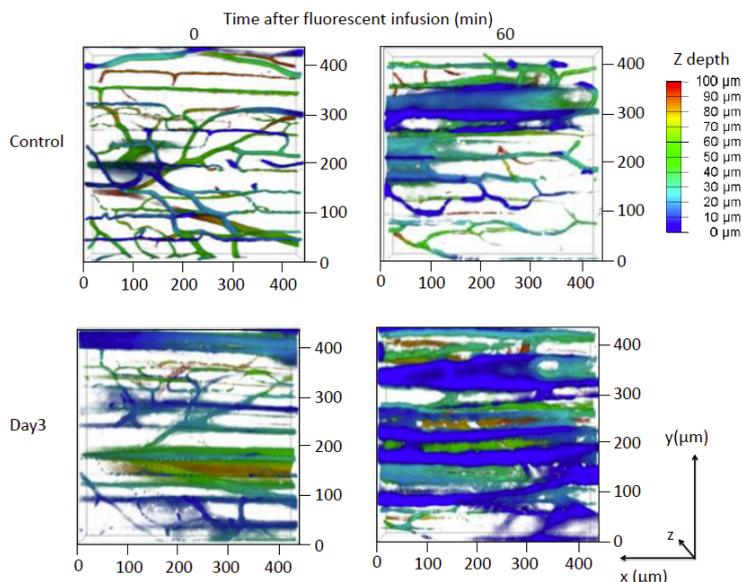


Fig 3. Representative three-dimensional (3D) images of skeletal muscle microvasculature in control and muscle exposed to ECC as a function of time after fluorescent dye infusion. Z-axis depth was expressed by color scale as shown.

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の血流は運動時に劇的に増加する。この背景には、骨格筋の毛細血管における血流増加によって観察され、この事実は 20 世紀初期に August Krogh らによって初めて示された。その後、顕微鏡によるイメージング技術の発展に伴い、運動時の毛細血管における赤血球の移動速度や血管径といった指標についても解明されており、その調節機序の破綻は運動耐性に密接に関係することも明らかとなってきた。

画像解析: 蛍光物質投与直後に得られた画像をベースライン (0 min) とし、そこから血管外に漏出した蛍光物質を 5 分毎に解析し、血管外漏出容積 (Interstitial leakage volume, $\mu\text{m}^3 \times 10^6$) を算出した (Fiji, NIH, USA).

4. 研究成果

Figure 3 に 2光子レーザー走査型顕微鏡によって得られたラットの骨格筋毛細血管の画像の一例を示す。蛍光物質投与直後 (0 min) は、毛細血管が明瞭に観察された。一方で、蛍光物質投与から 60 分後においては、血管外に蛍光物質が漏出した。Day3 では 0 min の時点で既に蛍光物質の漏出が観察され、60 分後には顕著な漏出が観察された (Fig 3)。

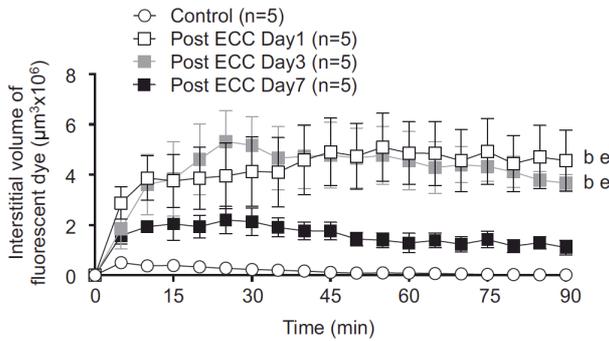


Fig 4. Interstitial volume of fluorescent dye in tibialis anterior muscle over time after infusion of marker. Interstitial volume was calculated by 4-dimensional image analysis. Two-way ANOVA revealed that there was significant interaction between time and group ($F = 12.16, P = 0.0001$). Interstitial volume of dye increased by the first measurement (i.e., 5 min) and reached a plateau by ~15 min after fluorescent dye infusion on day 1 and day 3. Interstitial volume was significantly higher on day 1 and day 3 compared with control and day 7 ($P < 0.05$, respectively). Although leakage volume slightly increased on day 7, there was no significant difference between day 7 and control. b $P < 0.05$ vs. control; e $P < 0.05$ vs. day 7. Values are means \pm SE. Five rats were included in each group

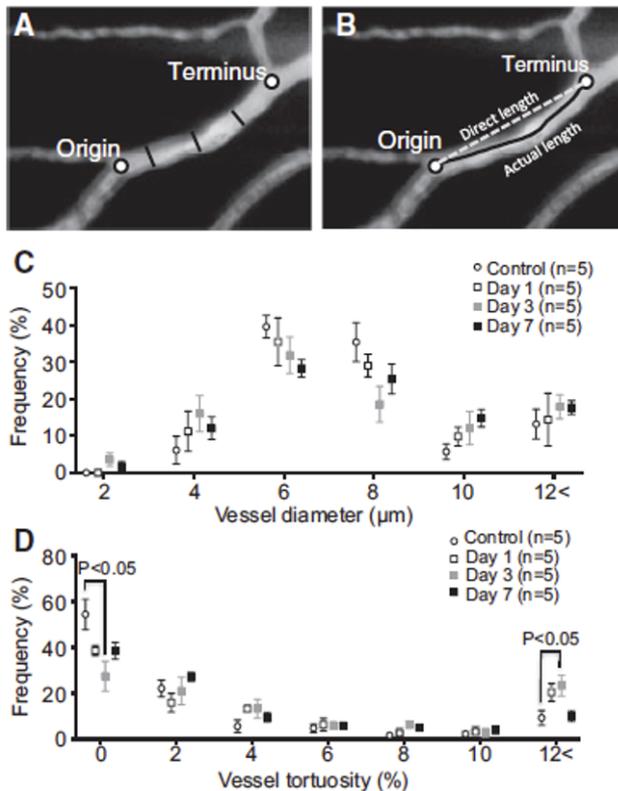


Fig 5. Morphological analysis of skeletal muscle microvasculature. Skeletal muscle microvascular 3-dimensional network was sectioned using bifurcations, and vessel diameter was measured at randomly selected points in each segment (A). Each segment was then traced by hand to calculate actual distance (B). The origin and terminus were directly lined (A) to calculate direct distance to calculate vessel tortuosity. C and D: microvascular diameter (C) and tortuosity (D) in tibialis anterior muscle in control (no ECC) and in muscle day 1, day 3, and day 7 after eccentric contraction (ECC).

Figure 4 に血管外漏出容積の結果を示す。運動負荷を実施していない Control と比較して、Day1, Day3 において血管外漏出容積は有意に高値を示したが、Day7 では有意な差を認めなかった。

Figure 5 に毛細血管の形態的な変化を示す。画像解析により血管径 (Fig 5-C) と湾曲率 (Fig 5-D) を算出した。その結果、コントロールと比べて筋損傷を引き起こした群において血管径には差を認めなかったが、湾曲率の高い (>12%) 血管の割合が有意に高く、湾曲率の低い血管 (< 2%) の割合が有意に低値を示した。

Figure 6 にヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) と免疫組織化学染色の代表例を示す (Fig 6-A)。HE 染色の結果、Day1 で腫大した筋細胞が観察され、Day3 で腫大した筋細胞の周囲に白血球が浸潤しているのが観察された。Day7 では、細胞中央に核が位置した小さな再生筋が観察された。HE 染色の連続切片を用いて、血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) の一次抗体を使用した免疫組織化学染色の結果を示す。コントロールでは VEGF-A の発現は認められなかったのに対して、Day1 では HE 染色で腫大した筋細胞が確認された位置と VEGF の発現の共局在が確認された (Fig 6-A)。Day7 においては、VEGF の発現は確認されなかった。Figure 7-B に VEGF-A 陽性の筋細胞の割合を示す。全ての筋細胞に対する VEGF-A 陽性細胞の割合、および損傷筋に対する VEGF-A 陽性細胞の割合、いずれにおいても Day1 および Day3 は Control と比較して有意に高値を示した。

5. 結語

本研究は、2光子レーザー走査型顕微鏡を用いたラット骨格筋の微小循環イメージングを確立することに成功した。運動によって損傷した骨格筋では、蛍光物質が毛細血管の外に漏出することが明らかとなった。損傷筋において血管透過性に関与する VEGF-A の発現が起きていること分かった。これらのことから、骨格筋の微小循環の制御は筋細胞と血管の相互作用によって調節されていることが示唆された。

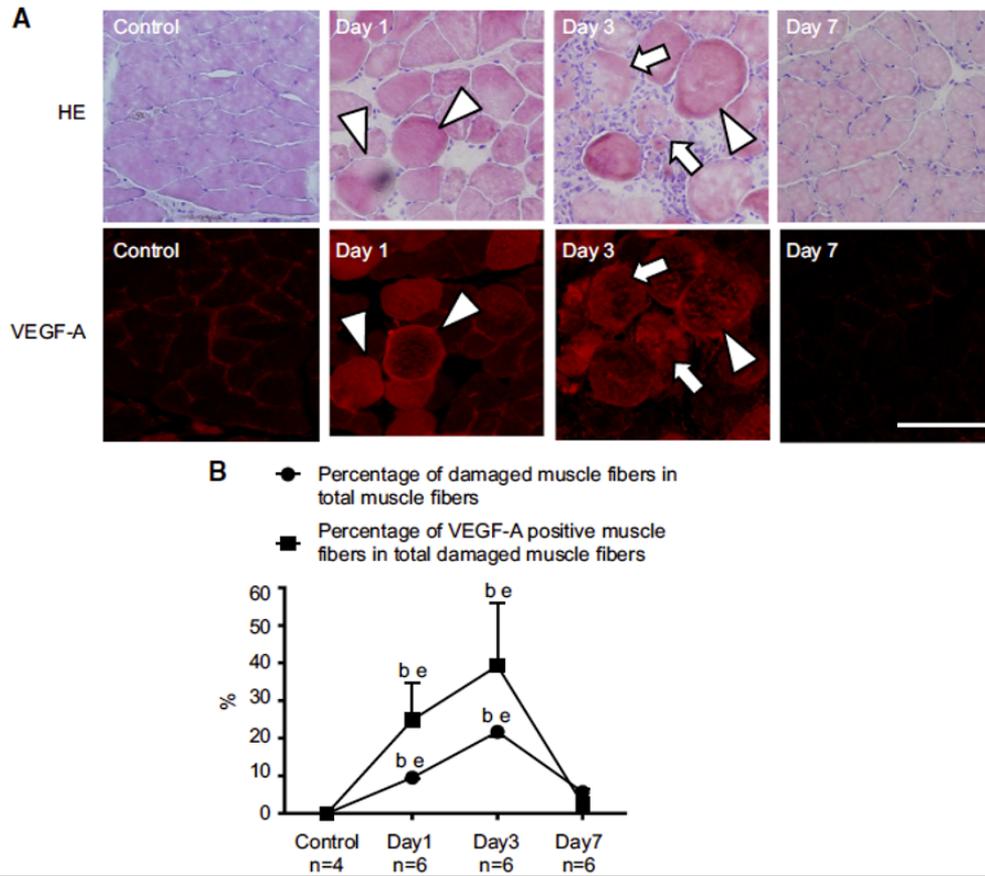


Fig 6. Immunohistochemistry of VEGF-A-positive muscle fibers in the tibialis anterior muscle of control and day 1, day 3, and day 7 post-ECC. A: serial sections stained with hematoxylin and eosin as well as VEGF-A antibody. B: % of damaged muscle fibers colocalized with VEGF-A-positive staining.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuki Hotta, Bradley Behnke, Kazuto Masamoto, Rie Shimotsu, Naoya Onodera, Akihiko Yamaguchi, David Poole, Yutaka Kano	4. 巻 125
2. 論文標題 Microvascular Permeability of Skeletal Muscle After Eccentric Contraction-Induced Muscle Injury: In Vivo Imaging Using Two-Photon Laser Scanning Microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 369-380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jappphysiol.00046.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kazuki Hotta, Brad J Behnke, Kazuto Masamoto, Rie Shimotsu, David C Poole, Yutaka Kano
2. 発表標題 Skeletal Muscle Microvascular Permeability After Eccentric Contraction-Induced Muscle Injury: Novel In Vivo Imaging Using Two-Photon Laser Microscopy
3. 学会等名 ACSM annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Hotta, Rie Shimotsu, Yutaka Kano
2. 発表標題 Insulin-dependent diabetes mellitus enhances microvascular permeability and induces atrophy of rat skeletal muscle: in vivo imaging using two-photon laser scanning microscopy
3. 学会等名 The 2nd Joint Conference of Japanese Physical Therapy Society of Respiratory, Cardiovascular and Diabetes
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田一樹, 正本和人, 柳下和慶, 狩野 豊
2. 発表標題 糖尿病ラットにおける筋損傷後の微小血管透過性：2光子レーザー走査型顕微鏡を用いたin vivoイメージング
3. 学会等名 第73回日本体力医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Hotta, Rie Shimotsu, Kazuto Masamoto, Kazuyoshi Yagishita, Brad J Behnke, David C Poole, Yutaka Kano
2. 発表標題 The Onset of Exercise-induced Microvascular Hyperpermeability is Delayed in Diabetic Skeletal Muscle: In Vivo Imaging Using Two-Photon Laser Scanning Microscopy
3. 学会等名 Experimental Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田一樹, 下津里恵, 狩野 豊
2. 発表標題 運動誘発性筋損傷後の血管透過性の変化: 2光子レーザー顕微鏡を用いた観察
3. 学会等名 第72回日本体力医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuki Hotta, Brad J. Behnke, Kazuto Masamoto, Rie Shimotsu, David C. Poole, Yutaka Kano
2. 発表標題 Skeletal Muscle Microvascular Permeability After Eccentric Contraction-Induced Muscle Injury: Novel In Vivo Imaging Using Two-Photon Laser Scanning Microscopy
3. 学会等名 2018 ACSM Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	狩野 豊 (Kano Yutaka)	電気通信大学大学院・情報理工学研究所・教授 (12612)	