

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22800

研究課題名（和文）骨格筋細胞の温度バイオイメージング技法の開発

研究課題名（英文）Development of bioimaging technique for temperature measurement in skeletal muscle myofibers

研究代表者

狩野 豊（Kano, Yutaka）

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・教授

研究者番号：90293133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内の温度分布や変化を詳細に解析することは、細胞が示すさまざまな機能を解明することに結びつく。本研究は生きた動物の骨格筋を摘出することなく、生体内環境下で温度分布を画像化する技術の確立を目的として実施された。ラット骨格筋細胞に温度感受性蛍光プローブを導入し、骨格筋の収縮-弛緩による温度動態を明らかにした。骨格筋内へのカルシウムインジェクションによって、収縮弛緩サイクルを観察するモデルを構築し、温度変化をリアルタイムで観察した。この実験モデルによって、細胞質内のカルシウムイオン調節機構を担う細胞小器官である筋小胞体が、収縮弛緩サイクルの筋温変化に重要な役割を持つことが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋細胞内の温度分布が *in vivo* 環境下において画像化できる技術の確立は、わずかな温度変動でも影響される筋代謝、DNAやタンパク質構造の変化との関係性を追求できるモデルを提唱する。そのため、本研究による *in vivo* 温度イメージングモデルの確立は、生理学分野の基礎研究や理学療法への応用などの点で、学術的、臨床的にも利用価値の高いことが予想される。

研究成果の概要（英文）：Real-time analysis of intracellular temperature distribution leads to the elucidation of various cellular functions. This study was conducted to establish a technique to image temperature distribution in the *in vivo* environment without removing skeletal muscle from live animals. In the experiment, temperature-sensitive fluorescent probes were loaded into rat muscle cells. A model was constructed to observe the contraction-relaxation cycle by direct calcium ion injection into the cells, and temperature changes were observed in real time. This experimental model revealed that the sarcoplasmic reticulum, a cell organelle that regulates calcium ion in the cytoplasm, plays an important role in the muscle temperature changes during the contraction-relaxation cycle.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋 筋細胞 細胞内温度 カルシウムイオン 筋収縮

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

恒温動物の細胞機能は温度に敏感に依存すると考えられている。細胞内の温度変化を詳細に解析することは、細胞が示すさまざまな機能を解明することに結びつく。近年、温度感受性蛍光プローブが開発された (Uchiyama et al., 2015)。温度感受性蛍光プローブによる評価法は、細胞内の温度分布を明らかにする画期的な研究手法として注目されている。しかしながら、これまでの研究は培養細胞などの限定された環境下の評価にとどまっており、生きた個体レベルで、細胞内の温度分布を評価した研究は報告されていない。個体レベルでは、拍動や呼吸による振動、細胞の大きさや形状変化などが温度分布を評価するための障壁となっている。本研究は、in vivo環境下で骨格筋細胞レベルでの温度変化をリアルタイムに捉えることに挑戦する。

2. 研究の目的

本研究は、生きた動物個体の筋細胞の変化を画像化する方法であるin vivoイメージング技術を基盤として、感受性蛍光プローブを利用した細胞内温度評価モデルを構築することである。さらに、骨格筋の収縮-弛緩サイクルにおける筋細胞内温度の変化を生じる生理学的な機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本実験はWistar系雄性ラット (日本エスエルシー)、10-13週齢を用いた。動物実験のプロトコルは電気通信大学動物実験委員会の承認を得たものであり、動物実験指針に沿って行われた。実験中、ラットは小動物用簡易吸入麻酔装置 NARCOBIT-E (II型)を用いて、イソフルラン麻酔下において実施された。実験の詳細は以下の結果とともに示す。

4. 研究成果

温度感受性蛍光プローブと骨格筋細胞内温度の評価 (実験1)

はじめにin vivo環境下にて単一骨格筋細胞に温度感受性蛍光プローブ (Cellular Thermoprobe for Fluorescence Ratio, フナコシ) を導入し、プローブ導入細胞における熱動態測定を行なった。本研究において対象とした脊柱僧帽筋は外科的剥離後も環状の血管ネットワーク構造が保持され、細胞の生理活性が維持される。また薄膜状の筋であるために光透過性が高く、顕微鏡下でのイメージングに適した特徴を有する。蛍光温度プローブは最終的に49.3 μM になるように調整し、ガラスキャピラリーに封入した。外科的に一部を露出した脊柱僧帽筋の単一筋線維にマイクロインジェクション法によってプローブを導入した。蛍光プローブを負荷した筋をホットプレート上に設置し、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon) 10倍レンズを用いて観察した。458 nmの励起波長を用いて、515 nm, および580 nmの2種類の蛍光をW-VIEW GEMINI (浜松ホトニクス)を用いて観察した。観察開始前に筋温を25°Cに保持した。さらに熱負荷条件として温度を段階的に上昇させ、最終的に筋温が40°Cに達するように調節した。

Fig.1は熱負荷実験中の脊柱僧帽筋の筋表面温度と温度感受性蛍光プローブレス値

(580nm/515nm)の変化を示している。筋表面温度は筋表面上に設置された温度センサーによって連続的に計測された。図に示されるように筋温は実験中に線形に上昇し、各測定における測定のばらつきは少なかった。39°C以上の温度域では、筋線維の膨張が観察された。これらの筋形状の変化は、細胞内のカルシウムイオンなどの恒常性が欠如したことが考えられる (Ikegami et al. 2018)。

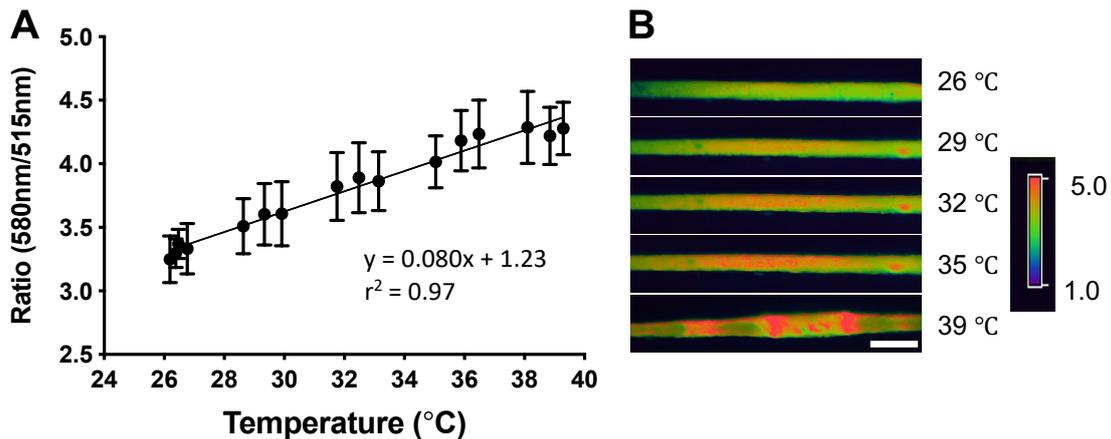


Figure 1. A: The quantitative relationship between the ratio of fluorescence (580/515 nm) and muscle temperature (N = 4, n = 4). N = number of animals. n = number of muscle fibers measured. Values shown are expressed as means \pm SE. B: Representative example of changes in intracellular temperature in rat spinotrapezius muscle myocyte. Scale bar = 100 μ m. Pseudocolor bar indicates the 580/515-nm ratio value.

実験1の結果より、in vivo環境下において温度感受性蛍光プローブをマイクロインジェクション法を用いることで骨格筋細胞に導入することが可能であり、導入細胞に熱ストレスを加えることで細胞の生理活性を維持したまま細胞内の熱動態の測定が行えることが確認された。

カルシウムイオン(Ca²⁺)導入モデルと骨格筋細胞内温度の評価 (実験2)

細胞内のCa²⁺の変化は、筋細胞において収縮と弛緩を制御する。このとき、単一筋線維レベルでの筋温変化に関する評価モデルは確立されていない。そこで、実験2では、Ca²⁺をマイクロインジェクション法によって、直接注入した際の温度変化を明らかにする実験モデルを構築した。先行研究(Wakizaka et al. 2017)を参照して、インジェクション条件を設定した (Ca²⁺濃度, 2mM)。筋小胞体(SR)に存在するCa²⁺-ATPase(SERCA)は、ATPを加水分解し、そのエネルギーを用いて細胞質内のCa²⁺をSR内に回収することで筋が弛緩する。そのため、SERCAを薬理的に阻害するシクロピアゾン酸(cyclopiazonic acid : CPA)の負荷モデルを設定した。

Fig.2は、Ca²⁺-free, 2mM Ca²⁺, CPA + 2mM Ca²⁺の各条件における筋温度の経時変化を示している。Ca²⁺-free群の結果では5°C以内の温度変化であった。一方、2mM Ca²⁺では注入から2分後に最大値(38.3 \pm 1.4°C)を示し、その後もCa²⁺-freeよりも高い値を示した。CPA + Ca²⁺では注入直後の値はCa²⁺と同程度の値を示したが、その後急速に減少し、Ca²⁺-freeよりも低い値を示した。

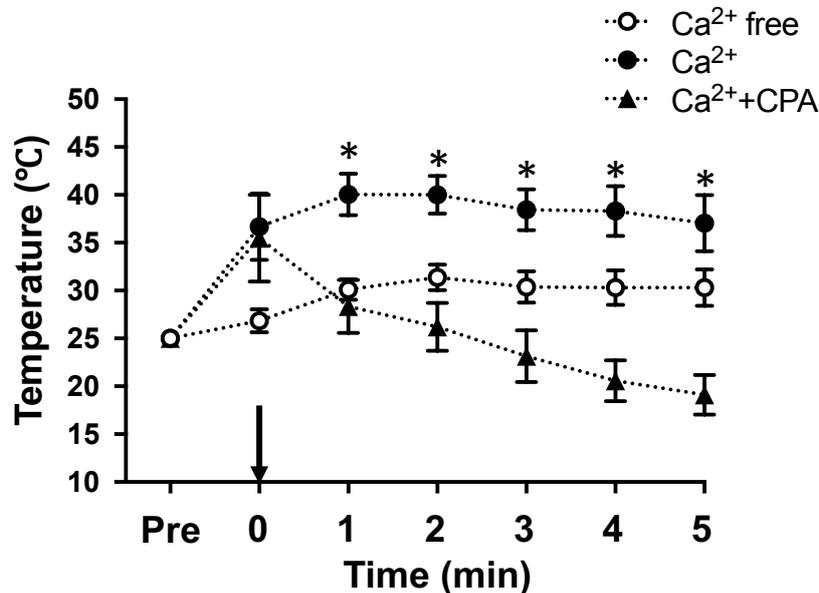


Figure 2. Influence of Ca²⁺ injection with/without CPA in vivo on intracellular temperature. Values shown are means \pm SE (Ca²⁺ free condition: N = 5, n = 13, Ca²⁺ condition: N = 5, n = 10, Ca²⁺+CPA condition: N = 4, n = 7). N = number of animals. n = number of muscle fibers measured. The injection time point is shown with an arrow. There was a significant interaction effect for treatment condition (Ca²⁺ injection with/without CPA) and time course of injection (P < 0.001). Significant difference between each condition at the same time point: *P < 0.05 (Ca²⁺ with vs. without CPA). CPA, cyclopiazonic acid.

Fig.3は、Ca²⁺インジェクションモデルにおける、筋収縮ならびに細胞質内Ca²⁺レベル動態と筋細胞内温度変化について比較した。細胞質内Ca²⁺は、先行研究(Sonobe et al. 2008)のプロトコールによって、Fura-2AMを用いて測定した。Ca²⁺インジェクション直後に、骨格筋の短縮ならびにカルシウムイオンの増加が観察された。この時、筋温は、直後の値(36.7 \pm 3.5°C)よりも10秒(38.3 \pm 3.0°C)から60秒(39.6 \pm 2.3°C)秒間の筋温が高値で持続する動態を示した。一方、CPA負荷プロトコールでは、直後の値(38.4 \pm 4.2°C)は同程度であったが、その直後から低下し、60秒後では30.5 \pm 2.1°Cであった。これらの結果から、筋収縮と弛緩サイクルにおける熱の制御機構が推察できる。収縮直後の筋温上昇はCPAによる影響が認められないことから、トロポニンによる結合、ミオシンATPase、ミオシン-アクチン相互作用などによる熱発生の関与が考えられる。一方、弛緩期における熱発生は、CPAの関与が極めて大きいことが考えられる。SRによる細胞質からのCa²⁺回収にともなうSERCAの作用が熱産生の主因子であることが示唆される。

以上の通り、本研究は、in vivo単一筋線維という細胞の局所的な筋温変動と収縮-弛緩サイクルの関係性を直接的に提示した研究モデルであり、生理学分野の基礎研究や理学療法への応用などの点で、学術的、臨床的にも利用価値の高いことが予想される。

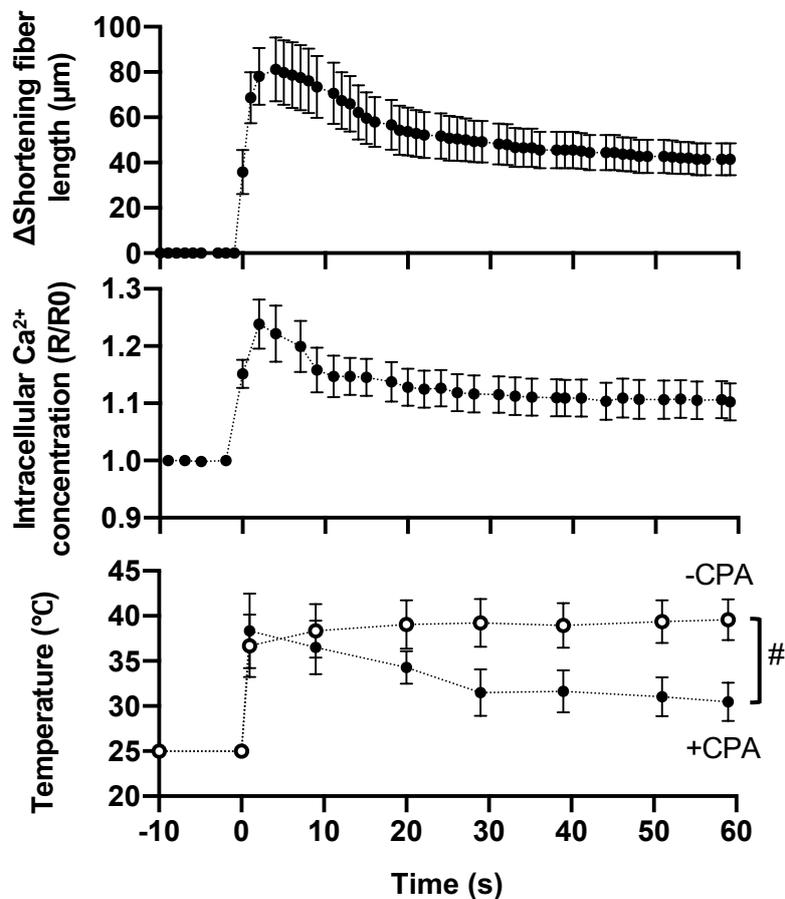


Figure 3. Changes in muscle fiber length (i.e., extent of shortening), intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and intracellular temperature induced by 2.0 mM Ca^{2+} injection into a single rat spinotrapezius muscle myocyte. Values shown are means \pm SE (Fiber length: N = 10, n = 10, $[\text{Ca}^{2+}]_i$: N = 10, n = 17, Temperature with/without CPA : N = 5 and 4, n = 10 and 6). N = number of animals. n = number of muscle fibers measured. There was a significant effect for CPA treatment condition (# $P < 0.001$). CPA, cyclopiazonic acid.

文献

Ikegami R, Eshima H, Mashio T, Ishiguro T, Hoshino D, Poole DC, & Kano Y. (2019). Accumulation of intramyocyte TRPV1-mediated calcium during heat stress is inhibited by concomitant muscle contractions. *J Appl Physiol* 126: 691–698, 2019.

Sonobe T, Inagaki T, Poole DC, & Kano Y. (2008). Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: Role of stretch-activated channels. *American Journal of Physiology* 294, R1329–R1337.

Uchiyama S, Tsuji T, Ikado K, Yoshida A, Kawamoto K, Hayashi T & Inada N. (2015). A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature. *Analyst* 140, 4498-4506.

Wakizaka M, Eshima H, Tanaka Y, Shirakawa H, Poole DC & Kano Y. (2017). In vivo Ca^{2+} dynamics induced by Ca^{2+} injection in individual rat skeletal muscle fibers. *Physiol Rep* 5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagi Ryo, Tabuchi Ayaka, Asamura Tomoyo, Hirayama Seiya, Ikegami Ryo, Tanaka Yoshinori, Hoshino Daisuke, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 320
2. 論文標題 In vivo Ca ²⁺ dynamics during cooling after eccentric contractions in rat skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R129 ~ R137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00253.2020	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
1. 著者名 Poole David C., Kano Yutaka, Koga Shunsaku, Musch Timothy I.	4. 巻 253
2. 論文標題 August Krogh: Muscle capillary function and oxygen delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology	6. 最初と最後の頁 110852 ~ 110852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2020.110852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Amano Yuhei, Nonaka Yudai, Takeda Reo, Kano Yutaka, Hoshino Daisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of electrical stimulation induced resistance exercise training on white and brown adipose tissues and plasma meteorin like concentration in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tabuchi Ayaka, Craig Jesse C., Hirai Daniel M., Colburn Trenton D., Kano Yutaka, Poole David C., Musch Timothy I.	4. 巻 100-101
2. 論文標題 Systemic NOS inhibition reduces contracting muscle oxygenation more in intact female than male rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 38 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2020.04.006	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中宏樹, 中田和明, 渡邊大輝, 小林孝嘉, 狩野豊.
2. 発表標題 フォトサーマル顕微鏡を用いた骨格筋線維タイプ別のミトコンドリア形態の評価
3. 学会等名 第74回日本体力医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

電気通信大学 基盤理工学専攻 化学生命工学プログラム 狩野研究室 http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html 電気通信大学 基盤理工学専攻 化学生命工学プログラム 狩野研究室 http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------