

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H03240

研究課題名(和文)筋細胞の適応を決定する運動後のカルシウムイオンダイナミクスの重要性

研究課題名(英文)Importance of postexercise calcium ion dynamics to regulate the adaptation of myocytes

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の筋肉量や筋力を維持するための筋細胞適応のメカニズムについては十分な理解が得られていない。本研究は、細胞内に存在するカルシウムイオンが筋肉量や筋機能をコントロールする可能性を調べた。その結果、運動時には細胞内のカルシウムイオンが増加し、しばらく持続的に変動することが明らかになった。この変化は、運動の方法や性差によって異なっていた。このような特徴的なカルシウムイオン変動パターンは、運動による骨格筋量の変化を制御している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や寝たきりなどの不活動状態、あるいは代謝的疾患(糖尿病など)に関連した筋肉量の減少は、Quality of Life(QOL)や健康寿命などに直結するリスクファクターである。本研究によって解明された運動時のカルシウムイオン変動パターンは、筋肉量を維持するための運動トレーニングやリハビリテーションのプログラム開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of skeletal muscle adaptation to maintain muscle mass and strength is not fully understood. This study investigated the possibility that intracellular calcium ion controls muscle mass and muscle function. It was revealed that intracellular calcium ion changes continuously for a while after muscle contractions. These changes were different depending on the type of exercise stress and male/female. The characteristic calcium ion dynamics may control skeletal muscle mass due to exercise stress.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋 カルシウムイオン 可塑性 性差 筋収縮 熱ストレス

1. 研究開始当初の背景

加齢や寝たきりなどの不活動状態,あるいは代謝的疾患(糖尿病など)に関連した筋肉量の減少は,Quality of Life(QOL)や健康寿命などに直結するリスクファクターである。ところが,筋肉量を維持する筋細胞適応のメカニズムについては十分な理解が得られていない。

本研究では,細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})に注目した。運動は複合的な生体ストレスとして身体に作用する。このストレスは内因性(成長ホルモンなど)と外因性(メカニカル,低酸素,熱など)因子に大別できる。これら多くの生体ストレス因子が単独あるいは複合的に細胞質内の Ca^{2+} を変化させるかについては不明の点が多い。筋細胞内 Ca^{2+} の主要な役割は興奮収縮連関(筋収縮と弛緩)の制御である。これに加えて,細胞質内 Ca^{2+} は様々な細胞の適応を調節するシグナル伝達物質としての重要な役割が報告されてる。例えば,培養細胞などの *in vitro*(生体外)実験によって, Ca^{2+} はタンパク合成(mTOR経路)や分解(カルパイン経路)の両方に寄与することが示されている。ところが,複合的なストレス負荷後における Ca^{2+} の生理的な作用については不明である。

2. 研究の目的

運動ストレスは細胞外から Ca^{2+} 流入を促進する(Sonobe *et al.*, 2008; Sonobe *et al.*, 2010)。従来,この Ca^{2+} は筋小胞体やミトコンドリアによって,運動直後から速やかに取り込まれると考えられおり,その生理的な重要性については着目されていない。しかしながら,筋細胞以外の細胞ではイノシトール3リン酸(IP_3)や Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出(CICR)機構などが作用し, Ca^{2+} が周期的に変動するダイナミクス現象が知られている。例えば,受精卵の分裂制御には数時間持続する Ca^{2+} ダイナミクスの関与が必須であることが確かめられている。骨格筋においても,類似した機構が存在し,筋細胞の適応制御に関与していると考えた。そこで,本研究は「運動による様々なストレス因子による Ca^{2+} ダイナミクスが運動適応の多様性(筋肥大と筋損傷)を制御する」という仮説を立てた。運動中だけでなく,運動後においてもストレス負荷時に流入した Ca^{2+} を起点とした Ca^{2+} ダイナミクスが持続的に起こり,その結果として,骨格筋には様々な適応(筋肥大や損傷)が生じる可能性が考えられる。これらは骨格筋の可塑性を特徴づける生体機構の一つであることが予想される。

これらを検証するために,以下に示すような研究課題を設定した。

- (課題1) *in vivo* Ca^{2+} イメージングモデルの作成と運動ストレスによる Ca^{2+} ダイナミクス
- (課題2) 細胞質ならびにミトコンドリアに存在する Ca^{2+} イメージング
- (課題3) 熱ストレスと Ca^{2+} ダイナミクス

3. 研究の方法

- (課題1) *in vivo* Ca^{2+} イメージングモデルの作成と運動ストレスによる Ca^{2+} ダイナミクス

被験動物としてWistar系雄性ラット(10-12週齢,体重250-300g;日本エスエルシー)を用いた。すべてのラットは室温 23 ± 2 ,湿度 $55 \pm 10\%$ で12時間の明暗サイクルに管理された飼育室においてゲージ(42 x 26 cm)内に2匹ずつ入れて飼育した。実験にはエスカイン吸入麻酔液,またはペントバルビタールソディウムを用いて動物の麻酔下で実施した。本実験ではラットの前脛骨筋(Tibialis Anterior: TA)を被験筋とした。運動ストレスはエキセントリック収縮(ECC)として,腓骨神経を介した電気刺激とモーターの回転により実施した。麻酔下のラットの筋を露出させた後,右足を運動負荷装置(RU-72型;本村製作所)に固定した。TA筋を腓骨神経を介した電気刺激(最大下電圧:3-8V,パルス幅:4.0ms,周波数:100Hz,持続時間:700ms,70パルス)により収縮させた。これを3秒に1回,2.5分間続けることで1セット50回とした。また,休息5分間を安静期に設け,10セット行った。細胞内 Ca^{2+} は, Ca^{2+} 蛍光指示薬であるFura2-AM(Dojindo)を用いた *in vivo* バイオイメージングにより観察した。

- (課題2) 細胞質ならびにミトコンドリアに存在する Ca^{2+} イメージング

細胞質内 Ca^{2+} は小胞体とミトコンドリアによって調節されている。そこで,小胞体とミトコ

ンドリアそれぞれの Ca^{2+} を定量し、放出-取込のパターンを明らかにする。転写共役因子 PGC-1 を骨格筋特異的に過剰発現させた筋 PGC-1 マウス（ミトコンドリア増大モデル）と野生型マウスを用いた。前脛骨筋（TA）を被験筋とし、麻酔下で筋を外科的に露出させ、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura-2 を負荷した。その後、薬理的処置（タブシガルギン）による筋小胞体の Ca^{2+} 取込を阻害し、薬理刺激後の安静時 Ca^{2+} 動態を比較検証した。さらに、性差を比較するためオスならびにメスマウスの比較を行った。

（課題3）熱ストレスならびに筋収縮と Ca^{2+} ダイナミクス

熱ストレスはカチオンチャネルである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) を活性化し、細胞質 Ca^{2+} レベルを増加させる。これまで熱ストレスおよび筋収縮が TRPV1 による Ca^{2+} 流入に及ぼす影響は明らかにされていない。Wistar 系雄性ラットを3群に振り分けた (Control 群, Heat 群, Heat + TRPV1 阻害 (CPZ) 群)。麻酔下のラット脊柱僧帽筋を露出し、 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬負荷後に *in vivo* バイオイメージング法を用いて熱刺激負荷中の Ca^{2+} 動態を30分間観察した。熱刺激は安静10分の後、熱刺激負荷用ホットプレートの温度を筋温が $40^{\circ}C$ になるよう調節することにより負荷した。TRPV1 はリン酸化によりチャネルの開口率が増加し、細胞内に Ca^{2+} を流入させる。Heat 群ならびに Heat + TRPV1 阻害20分後の筋を摘出し、TRPV1 のリン酸化の定量を行った。また、Heat 群において、熱ストレスの直前に筋収縮を負荷するモデルでの検証も実施した。

4. 研究成果

（課題1）*in vivo* Ca^{2+} イメージングモデルの作成と運動ストレスによる Ca^{2+} ダイナミクス (Tabuchi *et al.*, 2019)

ECC1 セットあるいは10セットによる筋の近位 (Proximal)、中央位 (Middle)、遠位 (Distal) における細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 動態を観察した。本研究では1) 1セット50回のECC収縮により、より筋が伸展する遠位部において Ca^{2+} が優位に上昇する、2) 収縮のセット数に関係なく、ECC1セットの32.5分後以内に Ca^{2+} の部位差は消失することを明らかにした。また、収縮3日後において筋損傷の割合に部位による違いは認められなかった。これらの結果は、ECCによって筋が伸展する部位からまず Ca^{2+} が蓄積し、その後、細胞内機構によって Ca^{2+} が伝播されることを示唆している。

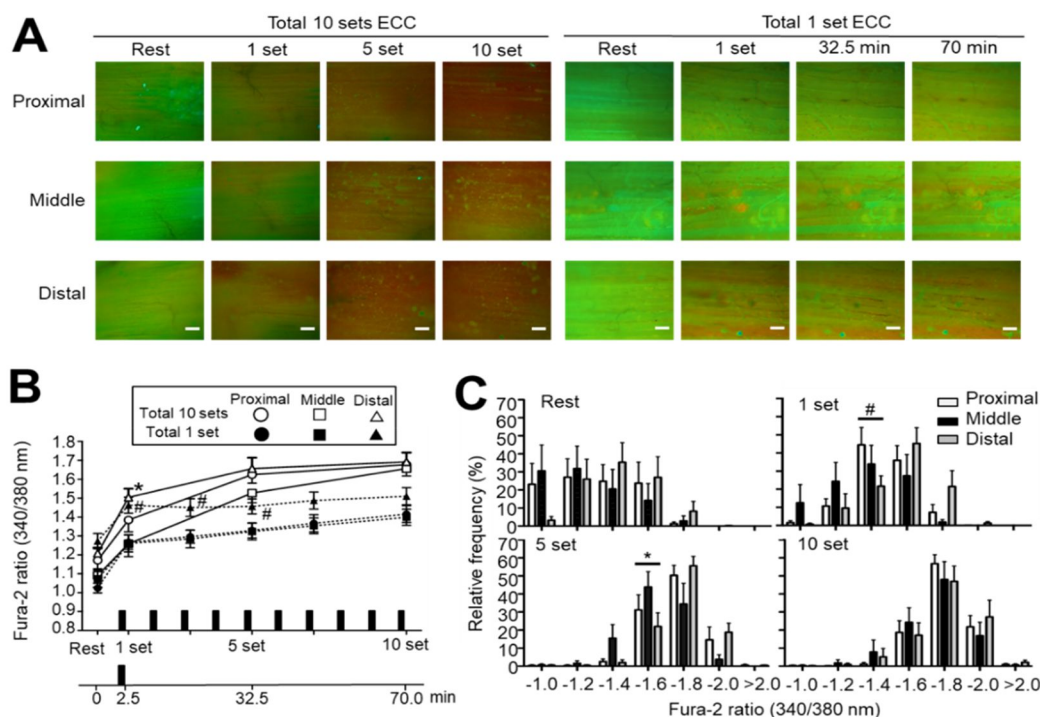


図1 A: 代表的な Ratio 画像 (A, Scale bar = 100 μm). B: Ratio 変化. two-way ANOVA により, 10 セット負荷 (白) あるいは1セット負荷 (黒) で中央位と遠位 (* $P < 0.05$), 近位/中

央と遠位 (#P < 0.05) の間に有意差が認められた (two-way ANOVA) . C : ECC10 セットによる Ratio の分布 . ECC 負荷に伴い, 高い Ratio の割合が増加している . 中央と遠位 (*P < 0.05) , 近位と中央 (#P < 0.05) の間に有意差が認められた (two-way ANOVA) .

(課題2) 細胞質ならびにミトコンドリアに存在する Ca^{2+} イメージング (Eshima *et al.*, 2017; Watanabe *et al.*, 2020)

野生型マウスでは刺激後に細胞質 Ca^{2+} が約 10% 上昇し, その後, 観察 60 分間に Ca^{2+} の漸増的な蓄積が観察された . その一方, PGC-1 マウスは刺激後に Ca^{2+} の上昇が見られず, 刺激 40 分後に Ca^{2+} の上昇が観察された . PGC-1 マウスは野生型マウスよりも薬理的処置による Ca^{2+} 蓄積に遅延が生じることが明らかになった . これは筋内ミトコンドリア含有量の相違によって生じたミトコンドリア Ca^{2+} 取り込み (緩衝能力) の差を反映していることが考えられる . また, ミトコンドリアによる取り込みの性差を検討したところ, オスよりもメスにおいて, その能力は優れており, ミトコンドリア形態と関係することを示した .

(課題3) 熱ストレスと Ca^{2+} ダイナミクス (Ikegami *et al.*, 2019)

Control 群は Ca^{2+} の変化を認めなかった . Heat 群において 10 分以降で有意な Ca^{2+} の上昇が観察された . さらに, 熱センサーチャネルである TRPV1 を阻害 (CPZ) することによりこの Ca^{2+} の上昇は抑制された (図2) . また, RPV1 リン酸化は, Control 群と比較し Heat 群では有意に増加する一方, Heat 群と比較して, Heat+筋収縮群では有意に減少した .

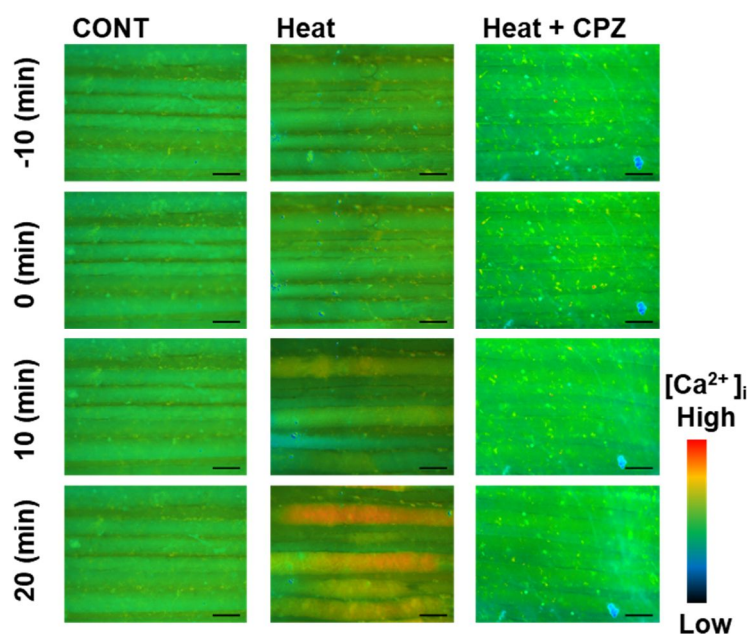


図2 : 生体内環境下のラット脊柱僧帽筋における熱刺激負荷による筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の代表例

対照群 (CONT), 熱刺激群 (Heat), 熱刺激+TRPV1 阻害剤群 (Heat+CPZ) における -10 分から 20 分までの蛍光画像 . 疑似カラーは色が赤くなるほど Ca^{2+} が蓄積していることを示している (Bar = 100 μm) .

まとめ

筋損傷の誘発因子として細胞内 Ca^{2+} の増加が挙げられる . これまで, 摘出筋を用いた知見から, 運動後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が明らかにされてきた . その一方で, 運動負荷後の Ca^{2+} 濃度の空間分布および時間変化については不明であった . 本研究は, ラットやマウスの生体内環境を維持した *in vivo* 観察系を確立することによって, 骨格筋の運動中から運動後の Ca^{2+} 濃度を観察することに成功した . その結果, Ca^{2+} が増加するプロセスには, 運動時の筋細胞膜の伸展量に依存した細胞質内 Ca^{2+} 増加パターンと, 運動後において細胞内の Ca^{2+} 伝播機構によって, 筋線維全体の Ca^{2+} が増加するパターンが存在することが明らかになった (課題1) . これらの結果は,

局所的な筋損傷の発生と筋線維全体の適応という筋組織に特徴的な生体適応のメカニズムを説明する。また、骨格筋細胞において、ミトコンドリアによる細胞質内 Ca^{2+} の取り込み能力は非常に高いことが明らかになった。これらの結果は、 Ca^{2+} が誘導する速筋線維と遅筋線維の損傷程度や、細胞適応の違いを説明する機構として注目される（課題2）。また、熱ストレスは筋小胞体に存在する TRPV1 を介して 40 度前後を温度閾値として、TRPV1 チャンネルをリン酸化して、急激な細胞質内 Ca^{2+} 蓄積を引き起こす。ところが、熱ストレス負荷の直前に筋収縮を負荷した場合、リン酸化が阻害され、 Ca^{2+} 蓄積が抑制されることを発見した（課題3）。これらの知見は、運動ストレス時の熱発生は細胞質内の Ca^{2+} 蓄積の主経路ではないことを示している。

本研究では、運動時の筋収縮ならびに熱ストレスにおける Ca^{2+} 変動を空間的・時系列的な視座から観察し、骨格筋において特徴的な Ca^{2+} ダイナミクスのパターンを明らかにした。これらの Ca^{2+} ダイナミクスは骨格筋の可塑性制御に関係していることが考えられる。

参考文献

Eshima H, Miura S, Senoo N, Hatakeyama K, Poole DC & Kano Y. (2017). Improved skeletal muscle Ca^{2+} regulation in vivo following contractions in mice overexpressing PGC-1alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **312**, R1017-R1028.

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 (1985)* **126**, 691-698.

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. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1329-1337.

Sonobe T, Inagaki T, Sudo M, Poole DC & Kano Y. (2010). Sex differences in intracellular Ca^{2+} accumulation following eccentric contractions of rat skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **299**, R1006-1012.

Tabuchi A, Eshima H, Tanaka Y, Nogami S, Inoue N, Sudo M, Okada H, Poole DC & Kano Y. (2019). Regional differences in Ca^{2+} entry along the proximal-middle-distal muscle axis during eccentric contractions in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **127**, 828-837.

Watanabe D, Hatakeyama K, Ikegami R, Eshima H, Yagishita K, Poole DC & Kano Y. (2020). Sex differences in mitochondrial Ca^{2+} handling in mouse fast-twitch skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol (1985)* **128**, 241-251.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Toshiaki, Koide Seiichiro, Yasuda Tomohiro, Hasegawa Takaaki, Yamasoba Tatsuya, Obi Syotaro, Toyoda Shigeru, Nakamura Fumitaka, Inoue Teruo, Poole David, Kano Yutaka	4. 巻 125
2. 論文標題 Muscle hypertrophy following blood flow-restricted, low-force isometric electrical stimulation in rat tibialis anterior: role for muscle hypoxia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00972.2017	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 Hotta Kazuki, Behnke Bradley, Masamoto Kazuto, Shimotsu Rie, Onodera Naoya, Yamaguchi Akihiko, Poole David, Kano Yutaka	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) https://doi.org/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
1. 著者名 Hiroaki Eshima, Shinji Miura, Nanami Senoo, Koji Hatakeyama, David C. Poole, Yutaka Kano	4. 巻 312
2. 論文標題 Improved skeletal muscle Ca ²⁺ regulation in vivo following contractions in mice overexpressing PGC-1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 1017-1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00032.2017	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 Mario Wakizaka, Hiroaki Eshima, Yoshinori Tanaka, Hideki Shirakawa, David C. Poole, Yutaka Kano	4. 巻 5
2. 論文標題 In vivo Ca ²⁺ dynamics induced by Ca ²⁺ injection in individual rat skeletal muscle fibers	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13180	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 Yoshinori Tanaka, Tadakatsu Inagaki, David C. Poole, Yutaka Kano	4. 巻 310
2. 論文標題 pH buffering of single rat skeletal muscle fibers in the in vivo environment	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R926-933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00501.2015	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 Daiki Watanabe, Koji Hatakeyama, Ryo Ikegami, Hiroaki Eshima, Kazuyoshi Yagishita, David C. Poole, Yutaka Kano	4. 巻 128
2. 論文標題 Sex differences in mitochondrial Ca ²⁺ handling in mouse fast-twitch skeletal muscle in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 241-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00230.2019	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 Ayaka Tabuchi, Hiroaki Eshima, Yoshinori Tanaka, Shunsuke Nogami, Naoki Inoue, Mizuki Sudo, Hidetaka Okada, David C. Poole, Yutaka Kano	4. 巻 127
2. 論文標題 Regional differences in Ca ²⁺ entry along the proximal-middle-distal muscle axis during eccentric contractions in rat skeletal muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 828 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1152/jappphysiol.01005.2018	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

1. 著者名 Ryo Ikegami, Hiroaki Eshima, Takuro Mashio, Tomosada Ishiguro, Daisuke Hoshino, David C. Poole, Yutaka Kano	4. 巻 126
2. 論文標題 Accumulation of intramyocyte TRPV1-mediated calcium during heat stress is inhibited by concomitant muscle contractions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 691 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00668.2018	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 1件）

1. 発表者名 田淵絢香, 白川英樹, 芝口翼, 杉浦崇夫, 狩野豊
2. 発表標題 損傷再生過程における細胞内カルシウムイオンダイナミクスとmTOR系の変化
3. 学会等名 第73回 日本体力医学会 学会大会 福井
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池上諒, 江島弘晃, 星野太佑, 狩野豊
2. 発表標題 熱ストレスおよび筋収縮が筋細胞質内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回 日本体力医学会 学会大会 福井
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayaka Tabuchi, Hideki Shirakawa, David C Poole, Yutaka Kano
2. 発表標題 In vivo intracellular Ca ²⁺ dynamics over 7 days following novel eccentric contractions in rat skeletal muscle
3. 学会等名 第64回アメリカスポーツ医学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田淵絢香, 狩野豊
2. 発表標題 伸張性筋収縮後に観察される筋細胞内Ca ²⁺ ダイナミクス
3. 学会等名 第71回日本体力医学会 学会大会 岩手
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ryo Ikegami, Hiroaki Eshima, David C. Poole, Yutaka Kano
2. 発表標題 Type I diabetes suppresses intracellular calcium ion influx by heat stress in rat skeletal muscle
3. 学会等名 第65回アメリカスポーツ医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵絢香, 江島弘晃, 田中嘉法, 岡田英孝, 狩野豊
2. 発表標題 伸張性収縮に伴う筋部位別の伸展量および細胞内カルシウムイオンの蓄積動態
3. 学会等名 第74回 日本体力医学会 学会大会 つくば
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 狩野研究室 http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html 電気通信大学狩野研究室ホームページ 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
研究協力者	田中 嘉法 (Tanaka Yoshinori) (40791249)	電気通信大学・大学院情報理工学研究所・博士研究員 (12612)	

