

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19889

研究課題名(和文)骨格筋の繰り返し損傷による慢性化した炎症病態の解明

研究課題名(英文)Chronic inflammatory pathology due to repetitive skeletal muscle injury

研究代表者

高木 領 (Takagi, Ryo)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・特別研究員

研究者番号：00801705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：過度な運動は骨格筋の損傷を惹起し、機能低下を招く。伸張性収縮による筋損傷後では、損傷1日後に対して2日後に機能がさらに低下した。筋損傷を制御する細胞内カルシウムイオン濃度の動態は、伸張性収縮直後に観察された濃度上昇部位が筋線維内を伝播するように進行し、かつ新たな濃度上昇部位が出現することが明らかとなった。そこで、筋損傷後の介入として代表的なアイシングの効果を検証した結果、伸張性収縮後の濃度上昇部位を拡大させ、筋線維損傷や機能低下が増悪した。これらより筋損傷の治療を行う上で温度管理の重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は環境因子の基礎構成因子の一つであり、古くから研究の対象となってきた。骨格筋の機能や適応に及ぼす影響も多く調べられてきたが、本研究では初めて筋損傷後の温度低下の影響をリアルタイムに明らかにすることに成功した。細胞内カルシウムイオン濃度は筋損傷のみならず肥大やミトコンドリア適応にも関与する因子であることから今後さらに低温アプローチが発展することが期待される。また臨床ではアイシングは治療として最も親しまれている手段となっているが、本研究では筋損傷後の応急処置としてのアイシングの是非を問いかける知見となる。今後もアイシングに関する基礎知見を積み上げていく必要性を提起した成果である。

研究成果の概要(英文)：Excessive exercise induces skeletal muscle damage and functional decline. After muscle injury by eccentric contractions, function was further impaired at 2 days post-injury compared to 1 day post-injury. The dynamics of intracellular calcium ion concentration that regulates muscle damage was found to progress in such a way that the sites of concentration increase observed immediately after eccentric contractions propagate within the muscle fibers, and new sites of concentration increase appear. Therefore, we examined the effect of icing, a typical intervention after muscle injury, and found that it increased the number of hyperintensified areas after eccentric contractions, and aggravated muscle fiber damage and functional decline. These results indicate the importance of temperature control in the treatment of muscle injury.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：骨格筋 物理療法 アイシング 筋損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 過度な運動後の効果的な治療法は、筋損傷を最小限に抑え、その後の筋機能の回復を早めることを目的としている。これらの治療法のうち、患部に適用される寒冷療法は、血管収縮を誘発し、痛みや腫脹、活性酸素の生成を軽減する効果を有する。筋線維損傷に対する効果としては、運動誘発性筋損傷の7日後に複数回の冷却により、筋クレアチンキナーゼの流出が減少することが報告されており、これは筋線維損傷の減少を示している( )。一方で、Chengら( )の報告では、激しい運動後の回復が寒冷療法によって損なわれることが示唆されている。

(2) 細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ )の上昇は、伸張性収縮に起因する筋線維損傷の原因と考えられている。等尺性収縮でも $[Ca^{2+}]_i$ は上昇するが、伸張性収縮ではストレッチ活性化  $Ca^{2+}$ チャンネルを介した細胞外  $Ca^{2+}$ 流入により、その上昇が増幅される。この $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、カルシウム依存性プロテアーゼ (カルパイン)やホスホリパーゼを活性化し、興奮-収縮連関を破綻させ膜透過性を高めるとともに筋線維壊死を促進する。低温は筋小胞体の  $Ca^{2+}$ の取り込みを減少させ、 $Ca^{2+}$ の放出速度を増加させる。従って、もし寒冷療法が実際に運動後の回復を損なうことと関連する場合、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加が関与している可能性がある。

(3) 正確な温度介入を伴う生体内 $[Ca^{2+}]_i$ イメージングには、僧帽筋のような非常に薄い形状の筋を使用する必要がある。ラット脊柱僧帽筋は損傷を受けやすいIIb型とIIx型の線維を約52%含んでいる。ヒトの筋が寒冷療法に反応して幅広い温度変化をすることを考慮して、伸張性収縮直後の筋に温度変化処理(最大10℃まで)を施した。寒冷療法が伸張性収縮による $[Ca^{2+}]_i$ 応答を上昇させ、より大きな筋線維損傷と収縮機能障害に関連するという仮説を検証するために、正確な運動処方が可能な前脛骨筋を用いて組織学および機能解析のための実験を行った。

### 2. 研究の目的

(1) 寒冷療法が伸張性収縮による $[Ca^{2+}]_i$ 応答を上昇させ、より大きな筋線維損傷と収縮機能障害に関連するという仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

in vivo イメージング (実験1)ではWistar雄ラット12匹の脊柱僧帽筋を対象に、機能、組織学解析 (実験2)では同ラット14匹の前脛骨筋を対象とした。

#### (2) in vivo イメージング

イソフルラン麻酔下で露出した脊柱僧帽筋をKrebs-Henseleit bufferに浸漬させ、 $Ca^{2+}$ 蛍光指示薬であるfura 2を導入した。340/380nmのレシオメトリックな画像から $[Ca^{2+}]_i$ を推定した。

##### 伸張性収縮

電気刺激装置に連結されたモーター装置により、安静時筋長の10%の伸張を与えた。4msのパルスを10ms間隔で700msの間、電気刺激を行った。伸張は刺激開始200ms後に開始し、各電気刺激終了時に筋を直ちに安静時の長さに戻した。この収縮を3秒おきに合計50回行った後、 $[Ca^{2+}]_i$ の高い部位が誘導されることを確認した。

##### 温度変化

最終収縮直後、30℃のbufferBに筋を浸し、5分後に温度変化実験にてイメージングを開始した。温度変化は、30、20、30、10、30℃の順で5分間ずつ行った。各5分条件の開始時と終了時に、340/380nmの励起光で撮影し、その蛍光強度比から $[Ca^{2+}]_i$ を算出した。本研究では、比(340/380nm)が1.9を超えるものを高 $[Ca^{2+}]_i$ 部位と定義した。

##### ダントロレンを用いた阻害実験

上記の温度変化実験の後、再び10℃まで温度を下げ、5分後にダントロレン負荷実験を行った。ダントロレンはリアノジン受容体(RyR)チャンネルを介した $Ca^{2+}$ 放出を抑制する。

#### (3) 機能、組織学解析

##### 伸張性収縮

右脚の前脛骨筋に対して電極を用いて経皮的に刺激した(10ms間隔で4msのパルスを700ms、3秒間隔で40回)。最初の200msは足首の角度を一定に保ち、次の500msは足関節を等速背屈させた(速度は毎秒240°、範囲は足関節角60°から180°)。

##### 温度処理

伸張性収縮後、皮下に温度プローブを設置した。収縮20分後、砕いた氷をポリエチレン袋に

封入して作製した氷嚢を負荷（緩やかに圧迫しながら 20 分間保持）するアイシング群と室温の水で負荷するコントロール群に群分けした。

#### 足関節のトルク測定

収縮直前，1 日後，2 日後に足関節の等尺性背屈トルクを測定した。経皮刺激（10ms 間隔の 4ms パルスで総刺激時間 300ms）の強度は最大等尺性張力を生じるように調整した。

#### 形態学的解析

摘出して凍結保存した前脛骨筋をクライオスタットで切断し，ヘマトキシリン・エオジン染色とその後の形態学的解析に使用された。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験 1-1; 伸張性収縮後の筋線維内における局所的な $[Ca^{2+}]_i$ の増加

伸張性収縮後では，平均  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇し，周囲よりも高濃度の部位が局所的に観察された。

#### (2) 実験 1-2; 温度低下による $[Ca^{2+}]_i$ への影響

図 1 は，異なる温度条件を順次適用した場合の  $[Ca^{2+}]_i$  変動を示す。パネル VII と VIII で示される 10 条件では，高  $[Ca^{2+}]_i$  部位が大幅に増加した。これらの高  $[Ca^{2+}]_i$  部位は，伸張性収縮を負荷していない筋に対する温度変化では確認されなかった。この効果は，筋を 30 に戻すことで消失した。

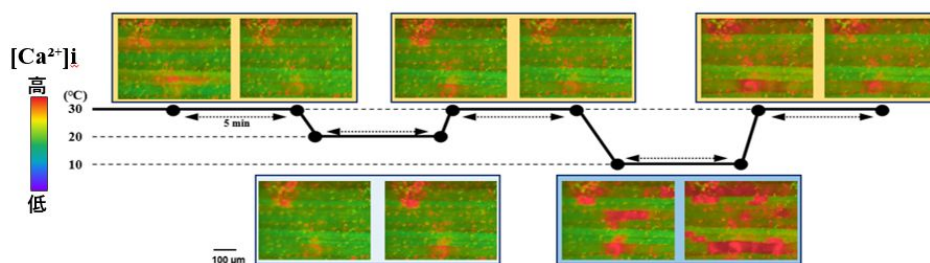


図1. 伸張性収縮後の温度変化が  $[Ca^{2+}]_i$  に及ぼす影響

#### (3) 実験 1-3; ダントロレンで除去された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇

伸張性収縮と温度低下による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は，500  $\mu$ M のダントロレン負荷により消失した。

#### (4) 実験 2; アイシングによる伸張性収縮後の筋機能低下と形態変化

下腿前面にアイシングを行うと，全脛骨筋の表面温度は 5 分以内に 10 に達した。アイシングは，伸張性収縮による発揮張力低下を悪化させた。また，アイシングは筋線維損傷の進行には影響を与えなかったが，損傷の程度を悪化させた。

#### < 引用文献 >

- Siqueira AF, Vieira A, Bottaro M, Ferreira-Junior JB, Nobrega OT, de Souza VC, Marqueti RC, Babault N, Durigan JLQ. Multiple coldwater immersions attenuate muscle damage but not alter systemic inflammation and muscle function recovery: a parallel randomized controlled. *Sci Rep* 8: 10961, 2018. doi:10.1038/s41598-018-28942-5.
- Cheng AJ, Willis SJ, Zinner C, Chaillou T, Ivarsson N, Ortenblad N, Lanner JT, Holmberg HC, Westerblad H. Post-exercise recovery of contractile function and endurance in humans and mice is accelerated by heating and slowed by cooling skeletal muscle. *J Physiol* 595: 7413-7426, 2017. doi:10.1113/JP274870.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0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 <sup>2+</sup> 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 Takagi Ryo, Tabuchi Ayaka, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo cooling induced intracellular Ca <sup>2+</sup> elevation and tension in rat skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14921	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木領、狩野豊
2. 発表標題 伸張性収縮後のアイシングが筋線維内カルシウムイオン濃度と骨格筋機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木領、池上諒、田淵絢香、田中嘉法、狩野豊
2. 発表標題 ラット骨格筋の安静時における温度低下は細胞内カルシウムイオン濃度を低下させる
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木領, 池上諒, 田淵絢香, 田中嘉法, 狩野豊
2. 発表標題 ラット骨格筋の温度低下が細胞内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木領, 田淵絢香, 狩野豊
2. 発表標題 ラット骨格筋における冷却誘発性カルシウム動態の生体内イメージング
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021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 狩野研究室ホームページ <a href="http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html">http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html</a>
---

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