

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04074

研究課題名（和文）筋細胞の適応を導くターゲット分子を目で見て理解するマルチバイオイメージング

研究課題名（英文）Multi-bioimaging of target molecules controlling skeletal muscle fiber adaptation

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） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋適応において観察される細胞の損傷から再生プロセスにおける細胞内カルシウムイオン濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）および過酸化水素濃度 $[H_2O_2]_i$ の時空間パターンとその制御機構の解明を目的とした。主な知見は以下の通りである。1) 骨格筋の伸張性収縮時、筋線維の伸展量に依存する $[Ca^{2+}]_i$ 変動パターンが存在する。2) 運動後の $[Ca^{2+}]_i$ 変動は、筋小胞体におけるリアノジン受容体によって制御され、筋損傷の誘発に関与する。3) 筋収縮による $[H_2O_2]_i$ の変化は小さく、運動時の $Ca^{2+}$ 蓄積を誘発する主因子ではないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、筋肉量やミトコンドリア量をコントロールする細胞内のスイッチ機構の存在がカルシウムイオンと活性酸素種のダイナミクス（細胞質中の空間的・時間的な濃度変化の連続）と関係することを明らかにした。このスイッチ機構の解明は、アスリートをはじめ、高齢者に対する筋肉量やミトコンドリア量をコントロールする運動プログラムの開発に応用できるため、社会的にも大きな意義を有している。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to evaluate the spatiotemporal patterns of intracellular calcium ion concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and hydrogen peroxide concentration ( $[H_2O_2]_i$ ) involved in skeletal muscle adaptation and to elucidate their regulatory mechanisms. The main findings are as follows: 1) In the eccentric contraction mode of skeletal muscle, the  $[Ca^{2+}]_i$  variation pattern is dependent on muscle fiber extension; 2) Post-exercise  $[Ca^{2+}]_i$  dynamics is regulated by sarcoplasmic ryanodine receptors, which are involved in the induction of muscle damage; 3) Changes in  $[H_2O_2]_i$  associated with muscle contraction are small, indicating that  $[H_2O_2]_i$  is not the main factor inducing  $Ca^{2+}$  accumulation during exercise.

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 活性酸素種 バイオイメージング

## 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と持久性能力の低下は、Quality of Life や健康寿命などに直結するリスクファクターである。現在まで、筋肉量やミトコンドリア量を維持する筋細胞適応の分子メカニズムについては十分な理解が得られていない。筋肉量やミトコンドリア量をコントロールする細胞内のスイッチ機構の存在が明らかになれば、様々な手段によって筋細胞の適応を効果的に導くことが可能となる。

本研究は、細胞適応を誘導するスイッチ（切替装置）の役割がカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )と活性酸素種 (ROS) のダイナミクス（細胞質中の空間的・時間的な濃度変化の連続）にあるという仮説を検証する。本研究はこれらの関連物質を「目で直接観察できるマルチバイオイメージングモデル」の構築に挑戦する。スイッチ機構の解明は、アスリートをはじめ、高齢者に対する筋肉量やミトコンドリア量をコントロールする運動プログラムの開発に応用できるため、社会的にも大きな意義を有している。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞適応のスイッチと考えられる分子 ( $\text{Ca}^{2+}$ , ROS) をモニターする *in vivo* バイオイメージングをマウスおよびラットモデルを用いて確立することを目標とした。これまで、細胞適応を理解するための研究アプローチは、運動を負荷した筋組織を個体から摘出し、細胞、タンパク質、遺伝子レベルに細分化することが一般的であり、シグナル分子のダイナミクスを明らかにできなかった。本研究は、以下のような2つの研究課題を設定し、運動後の細胞環境において、 $\text{Ca}^{2+}$  と ROS ダイナミクスはパターン化された規則性により細胞適応スイッチの ON/OFF を制御していることを予想した。

課題 1：骨格筋における細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の時間・空間的な変化パターンは様々な細胞応答を制御する重要な細胞シグナルである。本研究は、骨格筋損傷から再生プロセスにおける  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の時空間パターンを評価し、その制御機構の解明に焦点をあてた。

課題 2：活性酸素(ROS)の一つである過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) に着目し、筋収縮時の細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 ( $[\text{H}_2\text{O}_2]_i$ ) の時間・空間的な変化パターンを定量する。さらに、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の時空間パターンとの対応関係を解明する。

## 3. 研究の方法

実験動物：マウス(C57BL/6J), ラット(Wistar)

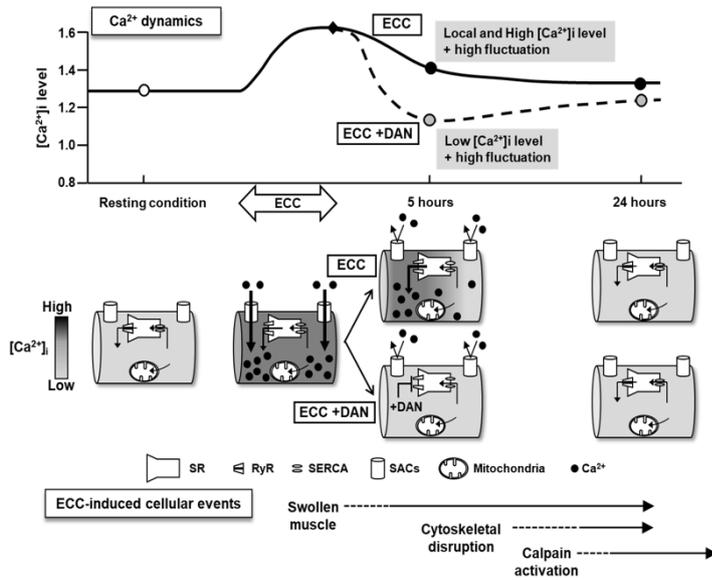
実験モデル：*in vivo* バイオイメージングモデル(Sonobe et al. 2008, Eshima et al. 2013, 2017 を改変)による検討：骨格筋にカルシウム蛍光指示薬( $\text{Ca}^{2+}$ , Fura-2) or ROS 感受性蛍光タンパク質 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , HyPer)を導入する。蛍光顕微鏡下において、細胞質中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  をリアルタイムに測定する。細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  は筋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、関連タンパク質であるリアノジン受容体、筋小胞体カルシウムイオン ATPase, ミトコンドリアカルシウム単輸送体の薬理的阻害モデルによる検証を実施する。

#### 4. 研究成果

<課題 1> 筋損傷を誘発する運動様式である伸張性収縮 (ECC) では張力発揮時の筋線維膜の伸張が特徴である。これまで、ECC が誘導する  $[Ca^{2+}]_i$  蓄積の動態は報告されているものの、筋伸張と  $[Ca^{2+}]_i$  との直接的な関係性は評価されていなかった。そこで、筋線維長に着目し、ECC による  $[Ca^{2+}]_i$  蓄積は、筋線維長の変化によって規定されるという仮説を検証した。下腿の表層筋である前頸骨筋 (TA) を筋線維軸に沿って 3 部位 (遠位部, 中央部, 近位部) を観察できる評価モデルを構築した。その結果、ECC による筋長変化は遠位部の伸展量が最も大きく、近位部は小さいことが確認され、 $[Ca^{2+}]_i$  の増加は遠位部から先行して観察された。つまり、 $[Ca^{2+}]_i$  は伸展量依存的に蓄積することが明らかとなった。この機構は、細胞膜上の伸展活性化チャネル (Stretch activated channels: SACs) からの  $Ca^{2+}$  流入が筋長変化に依存していることによって説明できる。さらに、この実験において注目すべき知見は、ECC を継続して繰り返した場合、および時間経過とともに  $[Ca^{2+}]_i$  の部位差は解消され 3 部位で同程度に均一化されたことである。遠位部で先行的に蓄積した  $Ca^{2+}$  から、隣接部位へ  $Ca^{2+}$  上昇が伝播する機構の存在が考えられる。これは骨格筋におけるストア  $Ca^{2+}$  を介した  $Ca^{2+}$  伝播機構の存在を示唆するものである。骨格筋細胞は、細胞が線維状で長く、多核細胞という特徴を有している。そのため、ECC 負荷から 1 時間後の細胞内  $Ca^{2+}$  の均一化は、細胞内において同一の形質や機能を維持するために重要な機構であるかもしれない。

ECC 時の伸展に依存した  $Ca^{2+}$  蓄積、ならびに細胞内機構による伝播的な  $Ca^{2+}$  蓄積によって顕著に上昇した  $[Ca^{2+}]_i$  は、その後どのような時系列変化を辿るのかについて、ECC5 時間後と 24 時間後に着目して検証を行った。ECC の 1 時間後では、蓄積した  $Ca^{2+}$  が均一化する。ところが、興味深いことに ECC5 時間後において、 $Ca^{2+}$  の分布が不均一であり、局所的に  $Ca^{2+}$  高濃度領域が発生した。24 時間後では運動前と類似した  $[Ca^{2+}]_i$  空間分布が確認された。一方この局面では、HE 染色による組織学的所見により、観察領域の約 60% において筋損傷像が確認された。これらの結果は、ECC 後の骨格筋では、運動 5 時間後まで持続的に  $Ca^{2+}$  が蓄積するパターンを有し、これは 24 時間後に顕著となる筋細胞の浮腫や浸潤応答に先行することを示している。この機構を解明するために、本研究では RyR の  $Ca^{2+}$  ハンドリング機構の変化に着目した。RyR の阻害剤であるダントロレンの投与モデルを用いて、この応答についての検証を行った。運動直後にダントロレンを投与したところ、RyR の阻害は ECC 5 時間後に特徴的な  $Ca^{2+}$  蓄積パターンを解消し、さらに 24 時間後の筋損傷を 60% から 30% まで約 5 割抑制した。したがって ECC 後の骨格筋では、RyR を介した局所かつ高濃度  $Ca^{2+}$  蓄積パターンが存在し、筋損傷の誘発因子となっていることが明らかとなった。運動誘発性筋損傷は、打撲や挫滅などの外傷とは異なり、筋損傷が筋線維の局所に生じることが特徴である。これまで、運動誘発性の筋損傷が筋線維の特定領域に限定される機序は不明であった。本研究の ECC 後の RyR に依存性した特定領域での高レベル  $[Ca^{2+}]_i$  時空間特性は、運動誘発筋損傷の誘発機構を説明できる初めての研究成果である。ところで、本研究は、ECC 後には運動前には認められない  $Ca^{2+}$  のゆらぎ成分 (RMS,  $[Ca^{2+}]_i$  fluctuation) を持つことを発見した。さらに、この成分は RyR 非依存的であることを明らかにした。しかしながら、この成分のもつ生理学的意義については解明できなかった。RyR 阻害の影響を受けなかったタンパク質分解酵素 calpain-1 の活性化、ならびに約 30% の筋損傷が残存されたことは、高レベルの  $[Ca^{2+}]_i$  時空間特性では説明できないことから、 $Ca^{2+}$  のゆらぎ成分による浮腫や浸潤応答などの関与がある可能性を残している。

### ECC 収縮後の $[Ca^{2+}]_i$ 変化と筋損傷に関連する細胞応答の時系列模式図



安静時 ( $\sim 1.24$ ) から ECC 時に  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇 ( $\blacklozenge$ :  $\sim 1.60$ ), 5 時間後でも持続的に高値であり ( $\sim 1.36$ ), その後 24 時間後には ECC 前の安静時レベルまで回復することを明らかにした ( $\sim 1.28$ , 実線). ダンントロレン (DAN) により ECC 後 5 時間の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は抑制された (破線). ECC 時の  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は伸展活性化チャンネル (SACs) を介した細胞外  $Ca^{2+}$  流入から生じるのに対して ECC 5 時間後の  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は主にリアノジン受容体 (RyR) の変性に起因することが考えられる. ECC 24 時間後までに一部の筋線維が腫脹して細胞骨格の完全性が失われるといった組織学的な異常が見られた. カルパインは ECC 後 24 時間から活性化され 3 日以上活性化したままであることが報告されている. 白丸 (安静時, pre-ECC), 黒丸 (ECC), 灰色丸 (ECC+ DAN) は本実験で得られた平均値を示している.

<課題 2> 筋収縮負荷前後の *in vivo*  $[H_2O_2]_i$  動態について調べた. 筋収縮モデルである単縮 (1 Hz, 60 秒間) と強縮 (100 Hz, 30 秒間) の張力曲線を比較したところ, 単縮刺激は, 60 秒間で張力低下は観察されなかった. 強縮刺激では初期値と比較して 65~70% 程度張力が低下した. 張力特性には, 単縮および強縮直後から 15 分間の  $[H_2O_2]_i$  を評価した. その結果, *in vivo* モデルである本研究において, 短縮刺激 60 秒間では有意な  $[H_2O_2]_i$  の増加は観察されず, 強縮刺激 30 秒間においても  $[H_2O_2]_i$  は 6% 程度であった. これまで, 収縮刺激時において, 培養細胞と単離した成熟筋線維を比較すると成熟筋線維のほうが ROS 濃度の増加量は低く, これには細胞の成熟度と ROS の調節機能が関係していると推察されている. さらに本研究は, 低酸素由来の  $H_2O_2$  生成を排除できるモデルであることから,  $H_2O_2$  生成と除去バランスが高度に保持されたモデルであると考えられる. したがって, 生理的な細胞環境下において, 筋収縮が誘導する  $H_2O_2$  蓄積は少なく, 恒常性が維持されることを示唆している.

本研究の収縮条件は, 短時間 (60 秒間以内) のモデルであった. これまでの研究では, 最大下運動であれば抗酸化剤は筋疲労を軽減する効果を発揮することが示されている. したがって, 長時間運動における筋細胞内  $H_2O_2$  と  $Ca^{2+}$  濃度の関係性について検討する必要がある. さらに, ROS 生成に関して, 筋細胞膜に存在する NOX2 由来の関与があるかもしれない. 例えば, 伸張性の筋収縮様式では, 細胞膜の SAC チャンネルを活性化し, 細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を亢進する. ROS においても, 細胞膜の伸展性との関係性を解明する必要があるだろう.

#### 引用文献

Sonobe T, Inagaki T, Poole DC, Kano Y. Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle *in vivo*: role of stretch-activated channels. *Am J Physiol.* 2008 Apr;294(4):R1329-37.

Eshima H, Tanaka Y, Sonobe T, Inagaki T, Nakajima T, Poole DC, Kano Y. *In vivo* imaging of intracellular  $Ca^{2+}$  after muscle contractions and direct  $Ca^{2+}$  injection in rat skeletal muscle in diabetes. *Am J Physiol.* 2013 Sep 15;305(6):R610-8.

Eshima H, Miura S, Senoo N, Hatakeyama K, Poole DC, Kano Y. Improved skeletal muscle  $Ca^{2+}$  regulation *in vivo* following contractions in mice overexpressing PGC-1  $\alpha$ . *Am J Physiol.* 2017 Jun 1;312(6):R1017-R1028.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tabuchi A, Craig JC, Hirai DM, Colburn TD, Kano Y, Poole DC, Musch TI.	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
1. 著者名 Amano Y, Nonaka Y, Takeda R, Kano Y, Hoshino D.	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 Takagi R, Tabuchi A, Asamura T, Hirayama S, Ikegami R, Tanaka Y, Hoshino D, Poole DC, Kano Y.	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 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 Ikegami Ryo, Eshima Hiroaki, Nakajima Toshiaki, Toyoda Shigeru, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 320
2. 論文標題 Type I diabetes suppresses intracellular calcium ion increase normally evoked by heat stress 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 R384 ~ R392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00168.2020	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 Shimotsu Rie, Hotta Kzuki, Ikegami Ryo, Asamura Tomoyo, Tabuchi Ayaka, Masamoto Kazuto, Yagishita Kazuyoshi, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 320
2. 論文標題 Vascular permeability of skeletal muscle microvessels in rat arterial ligation model: in vivo analysis using two-photon laser scanning microscopy	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 R972 ~ R983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00135.2020	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 e14921
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 Watanabe Daiki, Ikegami Ryo, Kano Yutaka	4. 巻 599
2. 論文標題 Predominant cause of faster force recovery in females than males after intense eccentric contractions in mouse fast twitch muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4337 ~ 4356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP281927	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 -

1. 著者名 Tabuchi Ayaka, Tanaka Yoshinori, Takagi Ryo, Shirakawa Hideki, Shibaguchi Tsubasa, Sugiura Takao, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 322
2. 論文標題 Ryanodine receptors mediate high intracellular Ca <sup>2+</sup> and some myocyte damage following eccentric contractions in rat fast-twitch skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R14 ~ R27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00166.2021	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田淵絢香, 田中嘉法, 高木領, 白川英樹, 狩野豊
2. 発表標題 運動誘発性の損傷骨格筋に特徴的な細胞内カルシウムイオン変動パターン
3. 学会等名 第75回 日本体力医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池雄大, 田淵絢香, 高木領, 狩野豊
2. 発表標題 伸張性収縮の繰り返し効果における細胞内カルシウムイオン濃度
3. 学会等名 第75回 日本体力医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出牛逸輝, 池上諒, 田淵絢香, 狩野豊
2. 発表標題 ラット除神経モデルによる安静時の骨格筋カルシウムイオン変動
3. 学会等名 第75回 日本体力医学会
4. 発表年 2020年

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
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 狩野豊
2. 発表標題 骨格筋線維のin vivoバイオイメージング
3. 学会等名 第6回 日本筋学会 (招待講演)
4. 発表年 2020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 <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
研究協力者	田淵 絢香  (Tabuchi Ayaka)		

6. 研究組織（つづき）

	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	高木 領  (Takagi Ryo)		
研究協力者	田中 嘉法  (Tanaka Yoshinori)		
研究協力者	星野 太佑  (Hoshino Daisuke)		

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			
米国	Kansas State University			