

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：33111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23270

研究課題名(和文) 温熱刺激が筋肥大を誘発する新規機構の解明とその応用：温度感受性チャンネルに着目して

研究課題名(英文) Relationship between chronic heat stress protocols and skeletal muscle adaptation

研究代表者

池上 諒 (Ryo, Ikegami)

新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・助教

研究者番号：70881770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は温熱刺激による筋肥大の効果を検討した。筋細胞内のカルシウム緩衝能力は遅筋と速筋で異なることが報告されている。温度感受性チャンネルから放出されるカルシウムイオンが温熱刺激による筋肥大のメカニズムであると考えられるため、緩衝能力の高い遅筋と緩衝能力の低い速筋で温熱刺激負荷後の細胞内カルシウムイオン濃度及び筋肥大シグナルの活性を計測した。その結果、温度感受性チャンネルは速筋と比較し遅筋で多く、温熱刺激負荷後の筋肥大シグナルの活性は速筋で高いことが示唆された。これらの知見は臨床における筋肥大を目的とした温熱刺激利用において、対象とする筋選択する必要性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最終的な目標は、温熱刺激による筋肥大メカニズムを解明し、運動トレーニングに変わる新たな筋肥大方法として臨床応用への発展を目指すことである。近年、温熱刺激はタンパク合成経路を活性化させることが示されている。しかしながら、そのメカニズムは未解明であり、臨床現場において筋肥大目的に温熱療法を適応し成功した例は無い。本研究は筋繊維タイプにより温熱刺激に対する筋肥大の効果が異なることを示唆しており、今後温熱刺激による筋肥大を臨床応用する上で有用なプロトコルの立案への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of thermal stimulation on muscle hypertrophy in slow-twitch and fast-twitch muscles. Therefore, we measured the intracellular calcium ion concentration and the activity of the muscle hypertrophy signaling pathway in fast-twitch muscle, which exhibits lower buffering capacity compared to slow-twitch muscle with higher buffering capacity, following thermal stimulation. The findings indicate a higher prevalence of temperature-sensitive channels in slow muscles compared to fast muscles. Furthermore, the activity of the hypertrophic signal was observed to be higher in fast muscles following the application of thermal stimulation. These findings underscore the potential efficacy of thermal stimulation as a valuable tool for promoting muscle hypertrophy in clinical practice. Consequently, careful consideration should be given to muscle selection when utilizing thermal stimulation for clinical applications in muscle hypertrophy.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：温熱療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 温熱療法は物理療法の一つとして古くから慢性疼痛の除去や関節可動域の改善を目的にリハビリテーション現場で使用されてきた。近年、温熱刺激は骨格筋タンパク合成経路 (mTOR 経路) を活性化させる可能性が示されており、運動トレーニングを必要としない新たな骨格筋肥大方法への応用が期待されている (Yoshihara et al., 2013)。しかしながら、温熱刺激がタンパク合成経路を活性化させ筋肥大を誘発する詳細なメカニズムは不明である。このような背景から、臨床現場において筋肥大目的に温熱療法を適応し成功した例は無い。

(2) 骨格筋に温熱刺激を負荷すると、骨格筋の筋小胞体に存在する温度感受性チャネルである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) が活性化し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) が増加することが報告されている (Ikegami et al., 2019)。カルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) は骨格筋の収縮及び弛緩を制御するだけでなく、骨格筋タンパクの合成 (Mtor 経路)・分解 (カルパイン経路) に寄与するシグナル伝達物質としての役割が知られている。したがって、温熱刺激による TRPV1 活性化を介した  $[Ca^{2+}]_i$  増加が温熱刺激による筋肥大のメカニズムである可能性がある。

(3) 骨格筋細胞内に放出された  $Ca^{2+}$  は筋小胞体に存在する筋小胞体  $Ca^{2+}$  ATP-ase である SERCA やミトコンドリアに瞬時に取り込まれる。ミトコンドリアは筋繊維タイプにより量が異なり、速筋と比較して遅筋は豊富に存在する。したがって、遅筋は速筋と比較し  $[Ca^{2+}]_i$  を一定に保つ能力 (緩衝能力) が高い。 $[Ca^{2+}]_i$  の増加しにくい遅筋は速筋と比較して温熱刺激による筋肥大の効果が減弱するという仮説を検証するために本実験を行った。

### 2. 研究の目的

速筋と比較して遅筋は温熱刺激による筋肥大の効果が減弱するという仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象動物

8週齢の C57BL/6j マウスを対象とした。すべてのマウスは室温  $24 \pm 1$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  で 12 時間のサイクルで管理された飼育室において、飼料と水をそれぞれ自由摂取できる状態で飼育した。

#### (2) 熱刺激負荷方法

三種混合麻酔下においたマウスの両後肢を  $15 \text{ cm}^2$  のパッドで挟み、パッドに温水を還流することにより局所的な温熱刺激を負荷した。

##### 2-1. 一過性温熱刺激負荷

マウスを無作為に対象群 (CONT) と温熱刺激負荷群 (HEAT) 群に振り分けた。HEAT 群は前述した温熱刺激負荷方法を用いて 30 分間温熱刺激を負荷した。対象群は 30 分室温に放置した。負荷終了後ただちにヒラメ筋 (SOL) 及び長趾伸筋 (EDL) を摘出し凍結保存した。

##### 2-2. 慢性温熱刺激負荷

マウスを無作為に対象群 (CONT) と温熱刺激負荷群 (HEAT) 群に振り分けた。HEAT 群は前述した温熱刺激負荷方法を用いて 1 日 1 回 30 分、計 14 回温熱刺激を負荷した。対象群は 1 日 1 回 30 分、計 14 回室温に放置した。最終負荷から 24 時間後に SOL 及び EDL を摘出し筋重量を測定した。

#### (3) ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティング法を用いて、TRPV1、リアノジン受容体 (RyR)、HSP70 のタンパク量及び CaMKII, p70S&k のリン酸化を定量した。簡潔に述べるとサンプルを 7.5 % ポリアクタミドゲルで 150 V で 60 分間分離し、次にセミドライ式転写装置を使用して 400mA で 60 分間 Amersham Hybond-P membrane に転写した。転写後、Blocking One を使用して室温で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、メンブレンを一次抗体に 4 晩インキュベートした。その後、メンブレンをそれぞれの一次抗体に対応する二次抗体を使用し室温で 1 時間インキュベートし、タンパク質の定量を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) EDL 及び SOL における $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えるチャネルの定量

温熱刺激負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えるタンパク質である TRPV1 のタンパク量は EDL と比較し SOL で有意に高値であった (Fig1. A, B) . 対照的に RyR 受容体のタンパク量は EDL と比較して SOL で有意に低値であった (Fig1. A, C) .

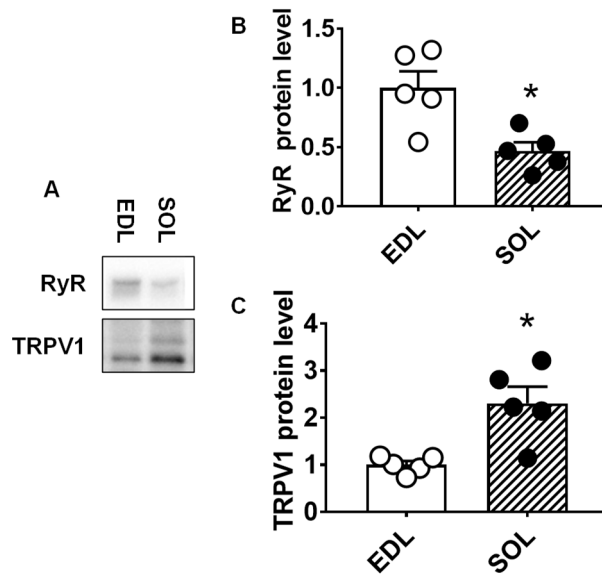


Fig 1. EDL , SOL における RyR (B) 及び TRPV1 (C) の定量

##### (2) 一過性温熱刺激負荷による筋肥大シグナル伝達物質の活性化

HSP70のタンパク量は EDL , SOL 共に CONT と比較して HEAT で有意に増加していた (Fig2. A, B) . CaMKII のリン酸化は EDL , SOL 共に CONT と比較し HEAT で有意に低下していた (Fig2. A, D) . P70S6k のリン酸化は EDL , SOL 共に CONT と比較し HEAT で増加傾向であったが有意差は見られなかった(Fig2. A, C) .

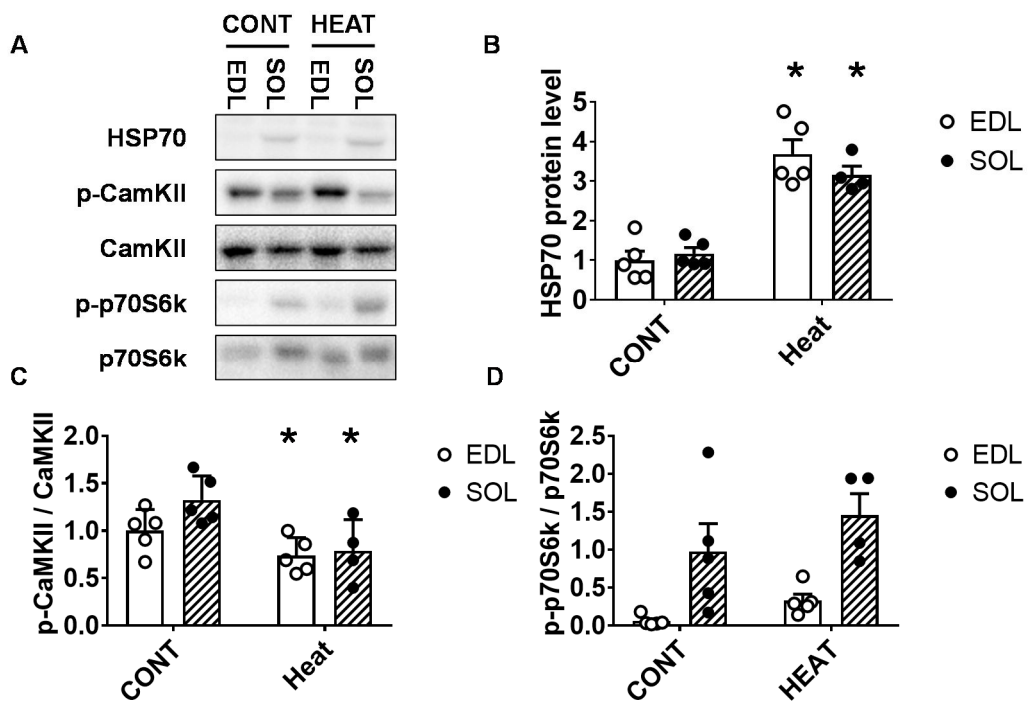


Fig 2. 一過性温熱刺激負荷による筋肥大シグナル伝達物質の活性化. A:代表的なバンド画像 , B:HSP70 , C:CaMKII , D:p70S6k

(3) 慢性温熱刺激負荷による筋重量の変化

14回の慢性的な温熱刺激を負荷した結果 EDL ,SOL 共に筋重量に有意な変化は見られなかった (Fig 3) .

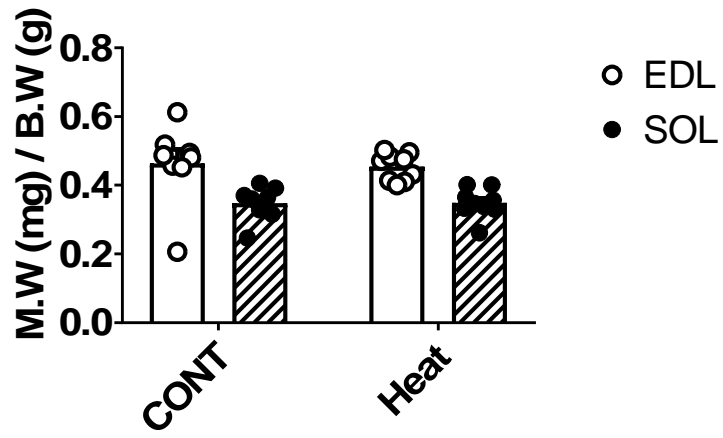


Fig 3. 慢性温熱刺激負荷による筋重量の変化

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

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 -

〔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 池上諒, 狩野豊
2. 発表標題 I型糖尿病は熱刺激による細胞内カルシウムイオン増加を抑制する
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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