

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300221

研究課題名(和文)メカノストレスに対する糖尿病骨格筋のカルシウムイオン動態

研究課題名(英文)Effect of mechanical stress on calcium ion kinetics of the diabetes skeletal muscle

研究代表者

狩野 豊 (Yutaka, Kano)

電気通信大学・情報理工学(系)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) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の予防やその進行を抑制するためには、骨格筋の糖代謝能を正常に保つことが重要である。本研究は糖尿病モデル動物を用いて、筋収縮を繰り返すと疲労の原因となる細胞質のカルシウムイオンが蓄積しやすいことを明らかにした。とくに、カルシウム恒常性と関連する微小血管の血流や酸素運搬に考慮し、それらの細胞内環境が維持された *in vivo* 実験(生体内モデル)によってこの知見を得ることに成功した。糖尿病が誘発する骨格筋の脆弱性はカルシウムの恒常性が深く関与する。

研究成果の概要(英文)：In diabetes mellitus force production in skeletal muscle is impaired and muscle fatigue is increased, consequent to impaired calcium ion homeostasis. This study found that diabetes perturbs the calcium ion regulatory system such that resting calcium homeostasis following muscle contractions is compromised and elevations of calcium are exacerbated. This study considers the impact of diabetes on the capacity of skeletal muscle to regulate calcium, following muscle contractions and, in particular, the relationship between muscle fatigue and elevated calcium ion in a highly ecologically relevant circulation-intact environment. Given the profound microcirculatory dysfunction in diabetes this preparation presents the exciting imperative to investigate the relationships among microvascular function, blood-myocyte oxygen flux and calcium homeostasis as they relate to enhanced muscle fatigability and exercise intolerance.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：バイオイメーjing カルシウムイオン 筋収縮

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の予防やその進行を抑制するためには、骨格筋の糖代謝能を正常に保つことが重要である。それには糖尿病の進行とともに併発する筋萎縮を抑制し、筋量を確保することが必要となる。本研究は糖尿病状態にある骨格筋において、機械的刺激(メカノストレス)に対する筋線維のカルシウムイオン動態に着目し、生体内(in vivo)パイオイメージングによる細胞レベルでのメカノストレス応答性を解明すること、さらに、それらの知見に基づいた糖尿病筋萎縮に対する新しいトレーニング理論を構築することを目標とした。

骨格筋の収縮は、筋小胞体(SR)からの Ca^{2+} 放出と Ca^{2+} 取り込みによる筋細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化によって惹起される。連続的な筋収縮は、収縮期の $[Ca^{2+}]_i$ 低下と弛緩期の $[Ca^{2+}]_i$ 増加を導く。その結果、発揮張力や収縮弛緩速度の低下を引き起こす。この現象は摘出筋や培養筋細胞を用いた *in vitro* の研究において明らかにされている(Chin et al, 1996)。糖尿病は筋萎縮ならびに筋機能の低下を引き起こすが(Cotter et al. 1989, Sanchez et al. 2005, Aughsteeen et al. 2006)、糖尿病患者の骨格筋での $[Ca^{2+}]_i$ 調節機構に障害が生じているか否かは明らかにされていない。また、糖尿病患者あるいは糖尿病モデル動物の骨格筋において、筋収縮時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を *in vivo* で測定した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

我々は、これまでに筋収縮時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を *in vivo* で測定することに成功し、連続的な筋収縮による筋疲労にともない、細胞内に Ca^{2+} が蓄積することを明らかにした(Sonobe et al. 2008, 2010)。本研究は、このシステムを用いて糖尿病モデル動物骨格筋の筋収縮時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を *in vivo* で測定することにより、筋細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 動態に異常があるか否かを検討し、筋細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ の恒常性を障害する要因を明らかにすることで、糖尿病が誘発する骨格筋の脆弱性のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には Wistar 系雄性ラットを用い、ス

トレプトゾトシン(STZ)を腹腔内投与して 1 型糖尿病モデル動物(以下 T1D とする)を作製した。

実験 1. *In vivo* 観察モデルによる検証(図 1): 麻酔下において、薄膜上の骨格筋である脊柱僧帽筋を血流を維持した状態のまま剥離し、筋細胞内に Ca^{2+} 蛍光指示薬(Fura-2 AM)を取り込ませ、以下の条件の下、蛍光顕微鏡による筋細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 動態をリアルタイムに測定した。

<プロトコール 1> 電気刺激による筋収縮後の $[Ca^{2+}]_i$ 蓄積動態を検証した。

<プロトコール 2> 脊柱僧帽筋の一本の筋線維内に、高濃度(2 mM)の Ca^{2+} 溶液を注入し、注入直後の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を秒単位で観察することで細胞質への Ca^{2+} 放出および細胞質からの Ca^{2+} 取り込み能力を測定した。

実験 2. 脊柱僧帽筋を摘出し、 Ca^{2+} 放出と Ca^{2+} 取り込みに関わるタンパク質(Ca^{2+} 放出; リアノジン受容体, Ca^{2+} 取りこみ; Ca^{2+} -ATPase)量を Western blot 法により定量した。

実験 3. 脊柱僧帽筋を摘出し、10 μ m の凍結切片標本を組織化学染色法により染色し、筋横断面積ごとのミトコンドリア(SDH 活性)量を定量した。

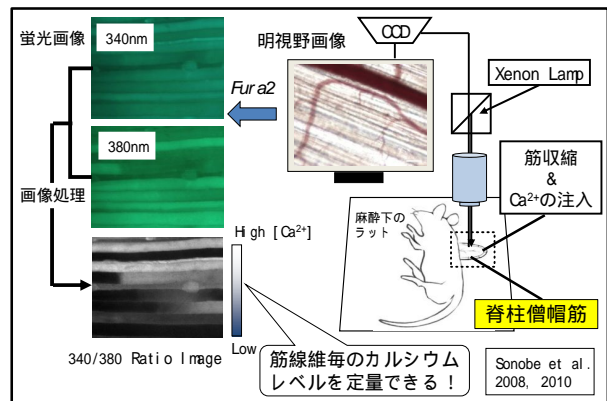


図 1. *In vivo* 環境下における細胞内 Ca^{2+} 測定の実験システム

4. 研究成果

実験 1 により、T1D の骨格筋では、筋収縮数の増加に伴い、筋細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しやすいことを明らかにした。(図 2)。また、高濃度の Ca^{2+} 溶液を細胞内注入したにも関わらず、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が著しく抑制されたことから、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を感知して SR からの Ca^{2+} 放出が生

じる機構(Ca²⁺誘発性 Ca²⁺放出)が減弱している可能性を明らかにした(図 3A) . さらに, コントロールでは, 高濃度の Ca²⁺溶液を注入直後, Ca²⁺レベルが 25%増加し, 注入 60 秒後には 15%の減少が観察されたが, T1D では, 注入 60 秒後でも Ca²⁺の減少が数%であったことから, T1D では Ca²⁺取り込み能力が減少していることが示唆された(図 3B) .

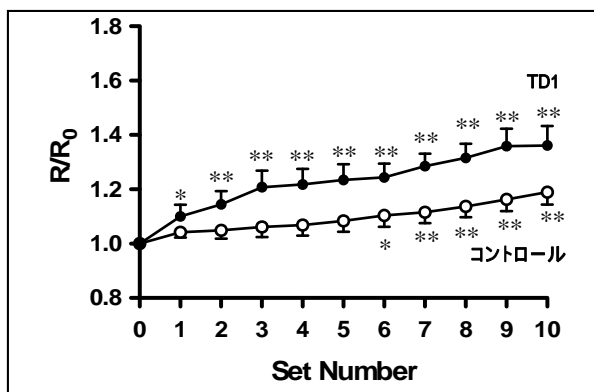


図 2. T1D の骨格筋は筋収縮によって細胞内 Ca²⁺が蓄積しやすい .

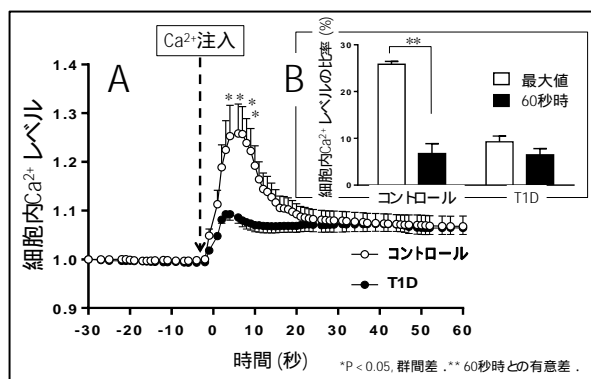


図 3. T1D の骨格筋は Ca²⁺の放出と取り込み能力が低下している .

実験 2 により, T1D の骨格筋は, SR から の Ca²⁺放出に与するリアノジン受容体 (RyR) のタンパク質量が減少していることを明らかにした(図 4 左) . なお SR への Ca²⁺取り込みに関与する Ca²⁺-ATPase (SERCA1 および 2) のタンパク質量に変化はなかった(図 4 右) .

実験 3 により, T1D の骨格筋では, ミトコンドリア含有量の低下が見られ, とくに筋横断面積の少ない筋線維ほどその低下が顕著であることを明らかにした(図 5) .

以上の結果より, T1D の骨格筋では, 筋

収縮により筋細胞内に Ca²⁺が蓄積しやすいことが判明した . また, 細胞質への Ca²⁺放出および細胞質からの Ca²⁺取り込みが減弱しており, Ca²⁺放出の低下は RyR のタンパク質量の減少に起因していることが示唆された . その一方, Ca²⁺取り込みが減弱した機序は SERCA に関係したものではないことを明らかにした .

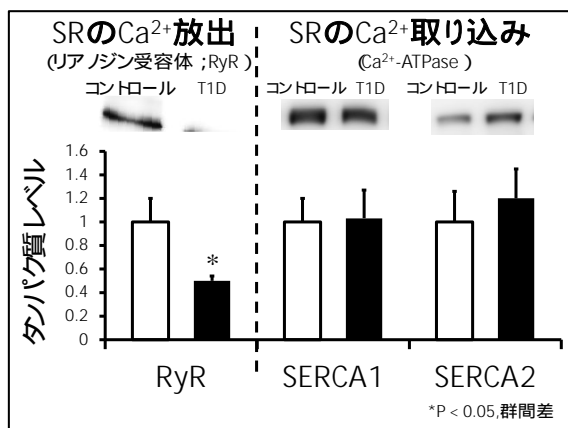


図 4. T1D の骨格筋の Ca²⁺放出の障害は, RyR タンパク質量の有意な低下と関連している .

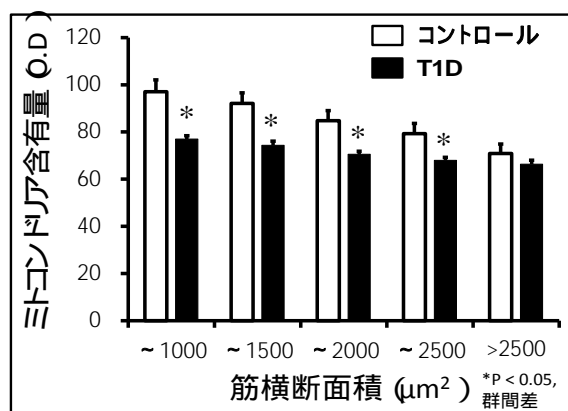


図 5. T1D の骨格筋はミトコンドリア含有量が低下している .

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yutaka Kano, Shinji Miura, Hiroaki Eshima, Osamu Ezaki and David C. Poole. The effects of PGC-1 on control of microvascular P_{O2} kinetics following onset of muscle contractions. J Appl Physiol. (2014.5.12)pii: jap.00080.2014. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Hiroaki Eshima, Yoshinori Tanaka, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki,

- Toshiaki Nakajima, David C. Poole, and Yutaka Kano: In vivo imaging of intracellular Ca²⁺ after muscle contractions and direct Ca²⁺ injection in rat skeletal muscle in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Sep 15;305(6):R610-8. doi: 10.1152/ajpregu.00023.2013. (査読有)
3. Yutaka Kano and Kunihiro Sakuma: Effect of aging on the relationship between capillary supply and muscle fiber size. *Adv. Aging Res.* 2: 37-42, 2013. doi: 10.4236/aar.2013.21005. (査読有)
 4. Tomonobu Sakurai, Osamu Kashimura, Yutaka Kano, Hideki Ohno, Li Li Ji, Tetsuya Izawa, Thomas M. Best. Role of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci*. 2013 Jul;63(4):263-70. doi: 10.1007/s12576-013-0262-y. (査読有)
 5. Paul McDonough, Danielle J. Padilla, Yutaka Kano, Timothy I. Musch and David C. Poole, and Brad J. Behnke. Plasticity of microvascular oxygenation control in rat fast-twitch muscle: Effects of experimental creatine depletion. *Respir. Physiol. Neurobiol*. 181: 14-20, 2012. doi: 10.1016/j.resp.2012.01.003. (査読有)
 6. Shunsaku Koga, Yutaka Kano, Thomas Barstow, Leonardo Ferreira, Etsuko Ohmae, Mizuki Sudo, and David Poole: Kinetics of muscle deoxygenation and microvascular P_{O2} during contractions in rat: Comparison of optical spectroscopy and phosphorescence-quenching techniques. *J. Appl. Physiol*. 112: 26-32, 2012. doi: 10.1152/jappphysiol.00925.2011. (査読有)
 7. Yutaka Kano, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Mizuki Sudo and David C Poole. Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. *J. Phys. Fitness Sports Med*, 1: 505-512, 2012. doi.org/10.7600/jpfsm.1.505 (査読有)
 8. Yutaka Kano, David C. Poole, Mizuki Sudo, Toshiro Hirachi, Shinji Miura and Osamu Ezaki. Control of microvascular P_{O2} kinetics following onset of muscle contractions: Role for AMPK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301: R1350-1357, 2011. doi: 10.1152/ajpregu.00294.2011. (査読有)
 9. Yutaka Kano, Hidetaka Okada, and Yasunori Morioka. What is coefficient of speed endurance to achieve two-hour marathon? *J Appl Physiol*. 2011, 110:275-277 doi: 10.1152/jappphysiol.00563.2010. (査読有)
 10. Tadakatsu Inagaki, Takashi Sonobe, David C. Poole, and Yutaka Kano. Progressive arteriolar vasoconstriction and fatigue during tetanic contractions of rat skeletal muscle are inhibited by α_1 -receptor blockade. *The Journal of Physiological Sciences*. 61: 181-189, 2011. doi: 10.1007/s12576-011-0134-2. (査読有)
 11. Miki Tadaishi, Shinji Miura, Yuko Kai, Yutaka Kano, Yuichi Oishi and Osamu Ezaki. Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, improves endurance performance and peak oxygen uptake. *PLoS ONE* 6(12): e28290. doi: 10.1371/journal.pone.0028290. 2011. (査読有)
 12. 曾野部 崇, 稲垣 薫克, 狩野 豊. バイオイメージングによる運動誘発性筋損傷の評価. *日本整形外科学会雑誌(日整会誌 J. Jap. Orthop. Assoc.)* 85: 415-419, 2011. (査読無)
 13. Tadakatsu Inagaki, Takashi Sonobe, David C. Poole and Yutaka Kano. Arteriolar vasomotor control and

contractile performance during fatiguing tetanic contractions in rat skeletal muscle: role of sympathetic system. *Adv Exp Med Biol.* 2010;662:309-15. doi: 10.1007/978-1-4419-1241-1_44. (査読有)

14. Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Mizuki Sudo, David C. Poole, and Yutaka Kano. Gender differences in intracellular Ca^{2+} accumulation following eccentric contractions of rat skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 299(4):R1006-12. doi: 10.1152/ajpregu.00623.2009. (査読有)

[学会発表](計 29 件)

1. Hiroaki Eshima, Yoshinori Tanaka, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, David C. Poole, and Yutaka Kano: In vivo imaging of intracellular Ca^{2+} after muscle contraction and direct calcium injection in diabetic rat skeletal muscle. *Experimental Biology*, Boston (2013,4,23).
2. Yutaka Kano, Shinji Miura, Osamu Ezaki and David C. Poole: The effects of PGC-1 on control of microvascular PO_2 kinetics following onset of muscle contractions. *Experimental Biology*, Boston, USA (2013,4,22).
3. 狩野 豊. 伸張性収縮による筋損傷と細胞内カルシウムイオン. 体力医学会関東地方会, 東京 (2013,3,30). 招待講演
4. Toshiaki Nakajima, Tomohiro Yasuda, Seiichiro Koide, Nami Takano, Yoshiaki Sato, Yutaka Kano: Repetitive restriction of muscle blood flow enhances mTOR signaling pathways in rat KAATSU model. 77th Annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society. Yokohama. (2013,3,15-17)
5. Yoshinori Tanaka, Tadakatsu Inagaki, Takuma Kimura, David C Poole, Yutaka Kano: In vivo measurement of intercellular pH and contractile

performance during repetitive stimulation in rat skeletal muscle. *Med. Sci. Sport Exer.* San Francisco (2012,5,31).

6. Takuma Kimura, Tadakatsu Inagaki, Yoshinori Tanaka, David C Poole, Yutaka Kano: In vivo imaging of intracellular sodium ion following eccentric contractions in rat skeletal muscle. *Med. Sci. Sport Exer.* San Francisco (2012,5,31).
7. Yoshinori Tanaka, Tadakatsu Inagaki, Takuma Kimura, David C Poole, Yutaka Kano: In vivo measurement of intercellular pH and contractile performance during repetitive stimulation in rat skeletal muscle. *The Systems Biology of Exercise: Cardiorespiratory & Metabolic Integration.* Univ. of Leeds, UK. (2012,8,12-13).
8. 狩野 豊. マラソン 2 時間を考える. 生理学から見たサブ 2. ランニング学会, 東京. (2012,3,18) 招待講演
9. 狩野 豊. 運動による筋組織損傷と循環機能の変化. 第 2 回高気圧酸素スポーツ医学研究会, 東京. (2012,3,10) 招待講演
10. 小出 誠一郎, 狩野 豊, 須藤 みず紀, 佐藤 義昭, 安田 智洋, 中島 敏明. 運動中の筋酸素分圧に及ぼす血流制限の影響. 第 67 回体力医学会, 岐阜 (2012,9,14).
11. 江島 弘晃, 田中 嘉法, 狩野 豊. マイクロインジェクションによる糖尿病骨格筋のカルシウムイオン緩衝能力. 第 67 回体力医学会, 岐阜 (2012,9,14).
12. 田中 嘉法, 稲垣 薫克, 木村 卓磨, 狩野 豊. 筋収縮時の筋細胞内 pH 変化に対する膜輸送体の関与. 第 67 回体力医学会, 岐阜 (2012,9,14).
13. 木村 卓磨, 稲垣 薫克, 田中 嘉法, 狩野 豊. 筋細胞内ナトリウムイオンに対する血流の影響. 第 67 回体力医学会, 岐阜 (2012,9,14).
14. 小出 誠一郎, 狩野 豊, 須藤 みず紀, 安田 智洋, 高野 奈実, 佐藤 義昭, 中

- 島 敏明．運動中の筋酸素分圧，発揮張力，肥大因子タンパク発現に及ぼす血流制限の影響：ラット加圧モデルによる検証．第 18 日本心臓リハビリテーション学会学術集会，大宮（2012,7,15）
15. 狩野 豊．呼吸循環研究のこれまでとこれから．毛細血管の形態と酸素拡散．第 25 回呼吸研究会，山口（2011,9,15）．
 16. 稲垣 薫克，田中 嘉法，木村 卓磨，曾野部 崇，狩野 豊．運動誘発性筋損傷および薬理的筋損傷時の Ca²⁺動態の評価．第 66 回体力医学会，山口（2011,9,16）．
 17. 小野寺 直也，須藤 みず紀，山口 明彦，狩野 豊．運動誘発性筋損傷-再生過程における VEGF の発現パターン．第 66 回体力医学会，山口（2011,9,16）．
 18. 田中 嘉法，稲垣 薫克，木村 卓磨，狩野 豊．単一筋線維レベルでの in vivo pH イメージング．第 66 回体力医学会，山口（2011,9,16）．
 19. 木村 卓磨，稲垣 薫克，田中 嘉法，狩野 豊．伸張性筋収縮後の細胞内ナトリウムイオンの可視化．第 66 回体力医学会，山口（2011,9,16）．
 20. Mizuki Sudo and Yutaka Kano. Effect of blood flow restriction on eccentric contraction induced-muscle fiber damage and hypertrophy signaling pathway in rat model. 16 rd Annual Congress of the European College of Sports Science. Liverpool, UK (2011,7,6) .
 21. 狩野 豊．骨格筋収縮時に見られる微小循環血流と酸素分圧動態の特徴．日本機学会学会，第 22 回バイオエンジニアリング講演会，岡山（2010,1,8）招待講演
 22. 小野寺 直也，須藤 みず紀，山口 明彦，狩野 豊．運動誘発性筋損傷 VEGF mRNA の発現パターン．第 65 回体力医学会，千葉（2010,9,16）．
 23. 須藤 みず紀，狩野 豊．糖尿病骨格筋の損傷 再生機構における筋細胞アポトーシス発生．第 65 回体力医学会，千葉（2010,9,16）．
 24. 大熊 健裕，稲垣 薫克，須藤 みず紀，
 - 狩野 豊．In vivo バイオイメージングによる筋細胞内ミトコンドリア分布の評価．第 65 回体力医学会，千葉（2010,9,16）．
 25. 稲垣 薫克，曾野部 崇，狩野 豊．連続的な筋収縮後の細胞内 pH 動態．第 65 回体力医学会，千葉（2010,9,16）．
 26. Yutaka Kano, David C. Poole, Mizuki Sudo, Shinji Miura, Osamu Ezaki. The role of AMPK in skeletal muscle on microvascular P02 kinetics following onset of muscle contraction. ACSM conference on integrative physiology of exercise. Miami, USA (2010,9,22) .
 27. Mizuki Sudo and Yutaka Kano. Involvement of myofiber apoptosis on eccentric contractions-induced damage and regeneration process in the diabetic rats. ACSM conference on integrative physiology of exercise. Miami, USA (2010,9,22) .
 28. Naoya Onodera, Mizuki Sudo, Akihiko Yamaguchi, Yutaka Kano. Time Course of VEGF-A mRNA Expression Following Eccentric Contractions in Rat Skeletal Muscle. ACSM conference on integrative physiology of exercise. Miami, USA (2010,9,22) .
 29. Tadakatsu Inagaki, Takashi Sonobe, David C. Poole, and Yutaka Kano. Gender influence on muscular Ca²⁺ accumulation pattern following repeated bout of isometric contractions in rat. ACSM conference on integrative physiology of exercise. Miami, USA (2010,9,22) .
- 〔その他〕ホームページ
<http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

狩野 豊 (KANO, Yutaka)

電気通信大学情報理工学研究科・教授

研究者番号：90293133