

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750311

研究課題名(和文)筋細径求心神経の機械反応増強の抑制機序の解明と運動時の過剰な昇圧応答抑制の試み

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism behind the low pH-induced augmentation of mechanical response in thin muscle afferents, and the challenge for suppression of exaggerated pressor response to exercise

研究代表者

堀田 典生 (HOTTA, Norio)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：60548577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：第一の目的は酸による筋細径求心神経の機械応答増大の機序を明らかにすることだった。ラット筋細径求心神経線維の活動を *in vitro* にて記録した。酸暴露により機械刺激に対する感受性は有意に増大したが、コンドロイチン硫酸の筋注により、酸の影響は有意に抑制された。このことから、少なくとも、酸による機械応答増大の背景に細胞外マトリクスプロテオグリカンを介する機序の存在を明らかにした。第二の目的は、コンドロイチン硫酸経口摂取により、アシドーシスを伴う運動中の過剰な昇圧応答を抑制できるか検討することであった。コンドロイチン硫酸群とプラセボ群間にて有意な昇圧応答の違いは認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We tested whether the acid-induced facilitation of the mechanical response of thin muscle afferents was suppressed by chondroitin sulfate (CS) using the single-fiber recording technique. Ramp mechanical stimulus was applied to the receptive field. Mechanical threshold and the response magnitude of thin muscle afferents were significantly lowered and increased, respectively, by exposing the receptive field to pH 6.2 buffer solution. After the injection of CS, these acid-induced changes were significantly reduced. No significant difference in attenuation was detected between CS concentrations used. These results suggest that a proteoglycan is responsible for the modulation in acid-induced sensitization of thin muscle afferents. These results also suggest that CS has potential in working against exaggeration of exercise pressor reflex in acidosis. However, in a human study, we could not find any significant effects of oral intake of CS on blood pressure response to exercise.

研究分野：運動生理学

キーワード：血圧 循環 運動昇圧応答 糖タンパク質 運動 アシドーシス 筋細径求心神経 プロテオグリカン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 運動時、活動筋への酸素供給のために、心拍や血圧などの循環応答は反射的に増加する。その反射の機序の一つは、中枢神経系の運動領域からの指令による調節である(セントラルコマンド) (Paterson, *J Physiol*, 2014)。もう一つは、活動筋からの求心性の調節であり、活動筋の収縮などの機械的な情報や、運動によって生じる化学物質や pH の低下などの代謝情報を、“筋細径求心神経”が受容し、中枢へ信号を送ることで、反射的に心拍や血圧応答を増加させると考えられている(Kaufman, *Exp Physiol*, 2012)。

運動中の活動筋ではアシドーシス(pH 低下)が生じ、水素イオン(H<sup>+</sup>)は筋細径求心神経を刺激すると考えられてきた(Boushel et al., *Acta Physiol Scand*, 1998, Victor et al., *J Clin Invest*, 1988, Sinoway et al., *J Appl Physiol*, 1989)。しかし、低 pH に反応する線維は 2 割に満たず(Taguchi et al., *J Neurophysiol*, 2005, Hotta et al., *Neurosci Res*, 2015)、低 pH に対する反応性という点では、筋細径求心神経は運動昇圧反射を起こす調節神経としての役割を満たせ得ないようである。

事実、McArdle's disease では筋で解糖系がブロックされるため、乳酸の産生がおきないが、Vissing et al. (*J Physiol*, 2001) は、その患者においても、運動後虚血による筋交感神経活動増大と昇圧応答を観察し、アシドーシスという単要因は運動昇圧反射に関わっていないことを示唆している。

そこで、皮膚の細径求心神経線維は、酸により機械刺激に対して反応しやすくなるという先行研究(Steen et al., *J Neurosci*, 1992)を参考に、低 pH は筋細径求心神経線維を興奮させ刺激ではなく、機械刺激に対する応答性を増加させるものであるとの仮説の下、ラットの取り出し神経-筋標本を用いた単一神経活動記録を行った。そこでは、運動時に活動筋で生じているような酸性環境下では、筋細径求心神経の機械刺激に対する応答性が増強することを報告した(Hotta et al., *Neurosci Res*, 2015)。

この結果は、運動中のアシドーシス環境下(おそらく活動筋の代謝要求が大きい状況)では、活動筋からの筋細径求心神経を介した上行性信号が増えるため、循環応答のさらなる増強に貢献することを説明し得る。しかし、その機序解明には至らなかった。

一次求心神経の細胞体[培養脊髄後根神経節(DRG)細胞]を用いた研究(Kubo et al., *J Physiol*, 2012)により、酸による機械反応増強作用は、植物レクチンの Iso-lectinB4(IB4)によって標識される細胞(IB4<sup>+</sup>細胞)で生じる。また、動物体内にムコ多糖として存在し、関節痛に対して広く使われる“コンドロイチン硫酸”で細胞を処理すると、酸の機械反応増強作用が抑制されることが明らかにされた(Kubo et al., *J Physiol*, 2012)。

IB4<sup>+</sup>細胞は細胞膜上に versican という糖タンパク質を持つ。versican は、糖鎖としてコンドロイチン硫酸しか持たない(Wu et al., *Cell Res*, 2005)。従って、versican の糖鎖領域に存在するコンドロイチン硫酸は、酸性環境下において荷電が変わることにより形状が変化し、機械受容に関わるチャネルに何らかの影響を及ぼすことが考えられた(Kubo et al., *J Physiol*, 2012)。

この培養脊髄後根神経節細胞を用いた系の弱点は、神経細胞体で生じた現象が、そのまま軸索末端で同じように生じるかは分からないということであった。また、その細胞は、筋だけでなく、皮膚や骨など、どこに由来する神経細胞なのか不明であることもその弱点であった。筋細径求心神経では、7 割以上の線維に versican が発現していると報じられ(Hendrich et al., *Neuroscience*, 2012)、コンドロイチン硫酸処理により筋の細径求心神経線維の酸による機械反応増強作用は抑制されると予想された。

(2) 昨今の日本では、寿命と健康寿命の差が約 10 年あるとされている。筋力低下に伴い要介護状態に陥ることがその原因の一つとされる。そこで、筋力が低下して要介護になる危険度が高い諸症状(ロコモティブシンドローム)の対策として筋力トレーニングが強く勧められている。加えて、アメリカスポーツ医学会も、健康の維持・増進のために、筋力トレーニングの実施を公式に推奨している。特に高齢者に対して積極的に実施されるべきであるが、残念なことに筋力トレーニングは血圧の上昇が大きく、高齢者や心臓・血管系にリスクがある方には向かないとされる。

運動時、活動筋への酸素供給のために血圧は上昇しなければならない。しかし、筋力トレーニングでは、活動筋の酸素需要と血圧上昇の程度には大きなミスマッチがあり、酸素の需要以上に血圧が上昇している。その理由の一つに、先に紹介したアシドーシスに伴う筋細径求心神経の機械反応増強作用があげられ得る。もしも、コンドロイチン硫酸がその作用を抑制することを示せば、筋力トレーニング中の過剰な昇圧応答を抑えることにつながり、運動処方コンプライアンスを拡張することができる。

## 2. 研究の目的

(1) ラット単一神経記録法を用いて、筋細径求心神経線維において、酸による機械反応増強作用がコンドロイチン硫酸により抑制されるかを検討することにより、酸による機械反応増強作用の機序を明らかにすること。

(2) ヒトを対象にした研究により、コンドロイチン硫酸摂取が筋力トレーニング中の過度な血圧上昇を抑制するか明らかにすること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物を用いた研究

68 匹の SD ラットを実験に供し、70 本の総腓骨神経-長指伸筋標本から単一細径求心神経の活動を記録した。標本を Krebs 緩衝液が灌流するチャンパーに静置し、受容野に 10 秒間にて 198mN まで鋸歯状に増加する機械刺激を与え、機械閾値と機械刺激によって得られた活動電位数(スパイク数)を記録した。

酸の機械反応応答増強作用(機械閾値低下、スパイク数増加)をみるために、機械刺激開始 1 分前より pH6.2 の Krebs 緩衝液を受容野に暴露した。酸による機械反応応答増強作用に対するコンドロイチン硫酸の影響をみるために、酸暴露の 5 分前に 0.03 あるいは 0.3% コンドロイチン硫酸を受容野の近傍に筋注した。対照溶液として pH7.4 Krebs 緩衝液を筋注した。

また、化学・熱刺激に対する応答性と酸による機械反応応答増強作用に対するコンドロイチン硫酸の影響の関連性の有無を観察するために、受容野に刺激物質を暴露するか近傍に筋注した。

#### (2) ヒトを対象にした研究

健康な男子大学生 29 名を対象にコンドロイチン硫酸経口摂取前後の脚レジスタンス運動中の昇圧応答の比較を行った。全ての被検者に本研究の目的と方法を、文章並びに口頭にて十分に説明した後、研究に参加することの同意を得た。本研究は、中部大学倫理委員会の了承の下で行われた。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物を用いた研究

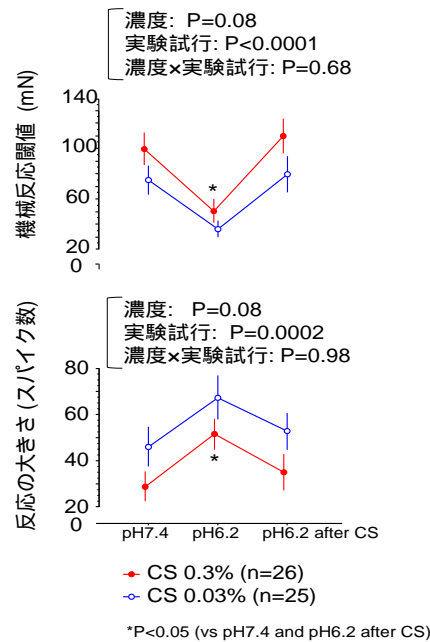
観察した単一神経は機械刺激に応じるタイプのもので、酸暴露だけで反応する線維は少なかったが、酸による有意な機械応答増強を認めた。この結果は、先行研究(Taguchi et al., J Neurophysiol, 2005, Kubo et al., J Physiol, 2012, Hotta et al., Neurosci Res, 2015)と一致していた。

15 線維を対象に対照溶液の受容野近傍への筋注の影響を観察した。酸による有意な機械反応増強作用は依然観察された。この結果から、筋注行為それ自体は酸が及ぼす影響に関係しないことを確認した。

15 線維を対象に、コンドロイチン硫酸の筋注だけで(酸の影響は関係なく)、機械応答が変化しないかを検討した。有意な閾値とスパイク数の変化は認められなかった。従って、コンドロイチン硫酸の筋注のみでは機械応答に影響しないことを確認した。

51 線維を対象に、コンドロイチン硫酸の受容野近傍への筋注の影響を検討した。酸による機械応答増大は減弱した。つまり、閾値

は有意に上昇して酸暴露前のレベルに戻り、スパイク数も有意に低下して酸暴露前のレベルに戻った。この結果は DRG 小型細胞における先行研究(Kubo et al., J Physiol, 2012)と一致した。0.03 と 0.3% の濃度の違いについては有意な影響は認められなかった。



(上図) 繰り返しのある 2 要因の分散分析を用いて解析した。CS はコンドロイチン硫酸、値は平均値と標準誤差。

化学物質や熱に対する応答性が、酸やコンドロイチン硫酸が及ぼす効果と関連があるか検討した。αβ メチレン ATP に対する反応性の有無、酸あるいは酸+ATP に対する反応性の有無、カプサイシンあるいは熱に反応性の有無で、酸による機械反応増強作用あるいは酸による機械反応促進作用のコンドロイチン硫酸による抑制を比較したが、有意な影響は認められなかった。

#### 予想される機序

低い pH により酸感受性イオンチャネル (ASIC) とカプサイシン受容体 (TRPV1) が活性化することが知られている (Xing et al., J Physiol, 2012, Tominaga et al., Neuron, 1998)。当然、これら 2 つのチャネルの活性化を介した機械感受性チャネルの増強が起きたと考えられた。

Copp et al. (Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016) は、Coste et al. (Science, 2010) により発見された機械受容チャネルの候補分子である Piezo1 と Piezo 2 を抑制し、mechano-gated TREK-1 チャネルは抑制しない タランチュラの毒 (GsMTx4) を使ったところ、ストレッチと間欠的な筋収縮中の昇圧応答を下げたことを報告している。末梢血管疾患 (Peripheral arterial disease, PAD) では、虚血によるアシドーシスを伴い、運動昇

圧応答は過剰になることが知られている(Li et al., Front Physiol, 2012) .Copp et al. (Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016) はまた、GsMTx4 により、PAD モデル動物の運動昇圧応答の低下の程度は対照ラットに比べ大きいことを報じている。以上より、少なくとも酸による機械反応増強に関わる機械受容チャンネルの候補分子として Piezo1 と Piezo2 が関わっていると言えそうである。

本研究における線維の化学感受性のタイプの検討にて、酸に ATP を加えた理由は以下の理由からである。(a)骨格筋を支配する DRG 小型細胞は、酸単独よりも ATP を混ぜることで反応するようになるから(Light et al., J Neurophysiol, 2008) ,(b)ATP 暴露前に比べて暴露後では、pH6.9 に対する内向き電流が大きくなること、また、アシドーシス環境の虚血のセンシングには酸と ATP 両者が関わることが示唆されているから(Birdsong et al., Neuron, 2010) ,(c)アシドーシスを惹起する虚血モデルのラットでは、酸感受性イオンチャンネルの ASIC3 のみならず ATP 受容体である P2X3 が増強されていたから(Liu et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, Liu et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol,2011) 。

事実、本研究では、酸だけよりも酸+ATP の方が反応した線維が多かった。本研究では、酸あるいは酸+ATP に反応するかどうかにて比較したが、酸による機械反応増強作用に有意差は認められなかった。

カプサイシンあるいは熱に反応したかどうかにて比較した場合も酸による機械反応増強作用に有意差は認められなかった。これらのことは、ASIC や TRPV1 を介した機械感受性チャンネルの増強を否定するものではないが、他の機序が働いていることを示唆するものと考えられた。

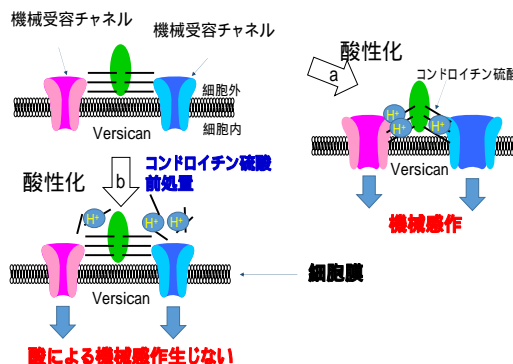
DRG を用いたパッチクランプの研究において、機械刺激に誘発される内向きの電流(MA カレント)はその不活性化の時定数から、Rapidly (RA), Intermediately (IA), Slowly adapting (SA) の 3 種類に分類されている(Drew et al., J Neurosci, 2002, Hu and Lewin, J Physiol, 2006, Kubo et al., J Physiol, 2012) 。

酸による機械反応増強作用は、IB4<sup>+</sup>細胞で RA, IA, SA に関係なく生じることが明らかにされている(Kubo et al., J Physiol, 2012) 。RA は、TRPV1 と ASIC のアンタゴニストである capsazepine とアミロライドで酸による機械反応増強が抑制された。しかし、IA と SA に関しては抑制されなかった(Kubo et al., J Physiol, 2012) 。

IB4<sup>+</sup>細胞は細胞膜上に細胞外マトリクスのプロテオグリカンの一種である versican という糖タンパク質を持ち、versican は、糖鎖としてコンドロイチン硫酸しか持たない性質がある(Wu et al., Cell Res, 2005) 。IA と SA では、コンドロイチン硫酸

やコンドロイチナーゼ処理により酸による機械反応増強作用が抑制された(Kubo et al., J Physiol, 2012) 。

本研究で一番重要な結果は、神経線維レベルにおいても、濃度(0.03, 0.3%)に関係なく、コンドロイチン硫酸により、酸による機械反応増強は抑制されたことである。versican の糖鎖領域に存在するコンドロイチン硫酸は、酸性環境下において荷電が変わることにより形状が変化し、機械受容チャンネルに何らかの影響を及ぼすことがその機序として考えられた(Kubo et al., J Physiol, 2012) 。



(上図) 酸の機械応答を増強作用の予想される機序

IB4<sup>+</sup>細胞は、 $\alpha\beta$  メチレン ATP に反応することが示唆されている(Vulchanova et al., Eur J Neurosci, 1998, Elizabeth et al., Mol Cell Neurosci. 1998, Nakatsuka et al., J Neurophysiol, 2003) 。本研究では、 $\alpha\beta$  メチレン ATP に反応する細径求心線維の割合は、26.2 % であり、皮膚のその割合(40.5%)(Kubo et al., J Physiol. 2015)よりも低かった。

本研究は以下の 2 点について先行研究(Kubo et al., J Physiol, 2012, Hendrich et al., Neuroscience,2012)と矛盾している。(a) Kubo et al. (J Physiol, 2012)では、IB4<sup>+</sup>細胞において酸による機械反応増強作用が観察されている。しかしながら本研究では、酸による機械反応増強の程度に  $\alpha\beta$  メチレン ATP への反応性は有意な影響を及ぼさなかった。(b) 筋細径求心神経の内、70.6% は IB4<sup>+</sup>(Versican を持つ)だと報告されている(Hendrich et al., Neuroscience, 2012) 。それに対して、本研究ではわずか 26.2%しか  $\alpha\beta$  メチレン ATP に反応を示さず少なかった。これらの点については今度の検討課題である。

## (2) ヒトを対象にした研究

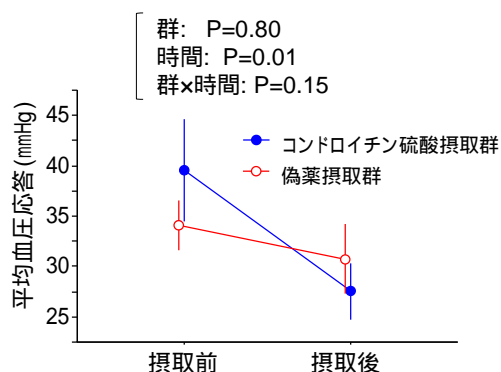
コンドロイチン硫酸摂取群 16 名(以下摂取群)とコンドロイチン硫酸錠と見分けがつかない偽薬摂取群 13 名(以下偽薬群)に分け、ダブルブラインド法を用いて両脚同時レッグプレス中の血圧応答を測定した。コンドロイチンあるいは偽薬の摂取期間は 4-6 週間で、



一日のコンドロイチン硫酸摂取量は 1520mg だった。

事前に 1 回挙上最大重量(1RM)を測定しておき、運動強度はその 60%に設定した。1 セット 15 回をインターバル 1 分にて 5 セット行った。血圧測定は上腕よりオシロメトリック法にて測定し、安静時と運動実施中の最大値の差分を血圧応答とした。本運動直後の乳酸の平均値と標準偏差は  $7.9 \pm 2.8$  mmol/L であった。

摂取群の平均血圧応答は、摂取前に比べて摂取後の方が偽薬群に比して低下していたが、有意差は認められなかった。



(上図) 繰り返しのある 2 要因の分散分析を用いて解析した。値は平均値と標準誤差。

予想通りの結果とならなかった理由に、コンドロイチン摂取期間の不足やアシドーシスのレベルが不十分であった可能性が考えられ、今後の検討課題となり得る。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Hotta N., K. Mizumura. Effects of low pH on the mechanical response of thin-fiber muscle afferents that may be associated with exercise pressor reflex. J Phys Fitness Sports Med. 5(5): 369-372. 2016 査読なし

Hotta, N., A. Kubo, K. Mizumura. Effect of protons on the mechanical response of rat muscle nociceptive fibers and neurons in vitro. Neurosci. Res. 92:46-52. 2015 査読あり

[その他]

ホームページ等

[https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hotta\\_norio/hot\\_lab/kaken\\_2014/](https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hotta_norio/hot_lab/kaken_2014/)

[https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hotta\\_norio/hot\\_lab/kaken\\_2015/](https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hotta_norio/hot_lab/kaken_2015/)

[https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hotta\\_norio/hot\\_lab/kaken\\_2016/](https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hotta_norio/hot_lab/kaken_2016/)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

堀田 典生 (HOTTA, Norio)  
中部大学・生命健康科学部・准教授  
研究者番号: 60548577

(4)研究協力者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)  
中部大学・生命健康科学部・教授

久保 亜沙子 (KUBO, Asako)  
日本大学・歯学部・生理学講座・研究員