

30. 骨格筋サイズを制御する細胞内 Ca イオンと運動ストレス

狩野 豊

Key words: バイオイメージング, *in vivo*, 筋損傷, 筋肥大

電気通信大学
大学院情報理工学研究科
先進理工学専攻

緒 言

高齢化社会を迎えた我が国においては、加齢による筋萎縮（サルコペニア）と諸疾患の併発などによって、適切な筋量を維持することが困難な症例が多くなっており、大きな社会的問題となっている。

骨格筋のサイズはタンパク質の合成と分解のバランスによって調節されている。近年、それらに関与する細胞内シグナル伝達機構の解明が飛躍的に進んでいる。筋サイズは内因性（内分泌因子）と外因性（メカノストレス）の因子によって調節される。内因性としては成長ホルモンが挙げられる。外因性因子としては、筋収縮に付随するメカノストレスによる物理的な刺激や運動時の低酸素、熱ストレスなどが挙げられる。運動ストレスは外因性に加えて内因性の因子にも影響する複合的なストレスである。

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 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化によって惹起される。さらに、運動時の複合的なストレスによって細胞内のカルシウムイオンは蓄積されることが予想される¹⁾。しかしながら、それらのストレスに対して、筋細胞内 Ca^{2+} が、いつ？どこから？どの場所に？どの位？いつまで？変化を示すのかについては不明の点が多い。これらの情報は生体内のホメオスタシスが維持された *in vivo* 状態で評価することが必要である。最近、著者らは筋細胞内 Ca^{2+} を生きた動物（ラット）の生体内で観察することに成功しており^{2,4)}、これらのモデルを用いてカルシウムイオン動態を明らかにすることを試みた。とくに、本研究は伸張性収縮 (ECC) 様式に着目した。ECC は筋損傷や筋肥大を惹起しやすいことが明らかになっているものの⁵⁾、筋損傷・筋肥大と筋細胞内 Ca^{2+} との関係は明らかになっていない。さらに、運動時において、 Ca^{2+} の蓄積が骨格筋のどの部位から生じるのかは不明である。そこで本研究は、ラットの下肢骨格筋を対象に ECC 後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 蓄積と筋部位との関係性について *in vivo* バイオイメージングを用いて明らかにすることを目的とした。

方 法

これまで、著者らは細胞の恒常性を維持した条件で、細胞内イオンや血流動態を観察する *in vivo* バイオイメージングモデルを構築した^{2,3)}。これは、薄膜状の筋であるラット脊柱僧帽筋を観察対象とするものであり、ラットの個体を顕微鏡下において、カルシウムイオンの動態をリアルタイムで評価する観察モデルである。これまでのモデルの欠点として、*in vivo* での観察が可能であるものの、対象が体幹の筋であるため広範囲の外科的な処置が必要であり、観察時間が数時間程度に限られていた。そこで、本研究では、空間分解能を高めた顕微鏡の導入によって対象をラットの後肢とし、外科的な処置を最低限にとどめて、数日間の動態が連続的に観察できるモデルを構築を目標として実験を実施した。

本研究では、Wistar 系雄性ラットの前脛骨筋 (TA) を対象とした。麻酔下において、TA 筋を外科的に露出させ、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura2-AM を筋細胞内に取り込ませた後、小動物運動負荷装置に固定した。その後、電気刺激による ECC 後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を近位部、中央部、遠位部の 3 箇所に分けて測定した。ECC は、電気刺激 (100 Hz, 0.7 秒, 4-7 V) の 0.2 秒後に足関節を 90° 伸展させる ECC を負荷し、50 回 × 10 セット、1, 5 セット後は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定のために約 14 分、それ以外は 5 分間隔で実施した。波長 340 nm, 380 nm で励起し得られた蛍光画像を画像解析ソフト (NIS-Elements) で除算処理 (F340/F380) し、数値化することで、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を検証した。

さらに、麻酔下で外科的に露出した右後肢における前脛骨筋の筋膜を剥離し、マーカーを貼付して、4つの区間を設定した(図1)。冠状面の筋収縮動態をハイスピードカメラ(200コマ/秒)で撮影し、筋長の動態を部位毎に比較した。

全てのデータは平均値±SEで表記した。全ての統計はPrism version 6.01(GraphPad Software)を用いて、二元配置の分散分析とBonferroni post hoc testを実施した。有意水準は $P < 0.05$ 以下とした。

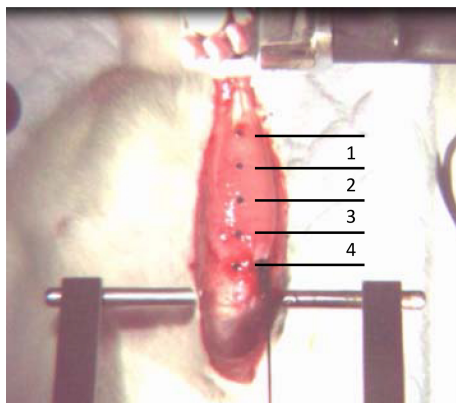


図1. ECC 負荷時の筋細胞膜の伸展程度を評価する実験モデル。

右後肢における前脛骨筋の筋膜を剥離し、マーカーを貼付して4つの区間を設定した(1:遠位部, 2,3:中央部, 4:近位部)。

結果および考察

図2はECC後の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を示したグラフである。ECCのセット数を繰り返すことで、近位、中央、遠位部ともにRatioの値が増加した。このことから、ECCによる $[Ca^{2+}]_i$ 蓄積をラットの下肢骨格筋で観察することに成功したものと判断した。この実験モデルにおいて、とくに興味深い結果はECCによる $[Ca^{2+}]_i$ の蓄積は筋部位によって異なっていた点である。ECCの1セット負荷後は、遠位部で他の部位よりも高い $[Ca^{2+}]_i$ の蓄積が観察された(図2, 図3 a)。

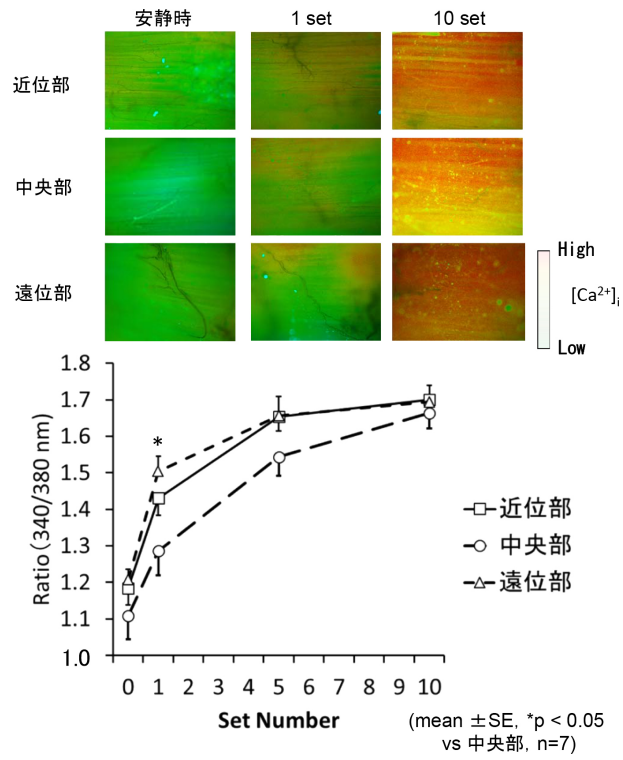


図2. ECC後の $[Ca^{2+}]_i$ 動態における筋部位の比較.

ECCによる $[Ca^{2+}]_i$ の蓄積は筋部位によって異なっていたが(遠位部>近位部>中央部),最終セット(10 set)後は全ての部位で同程度の値を示した.

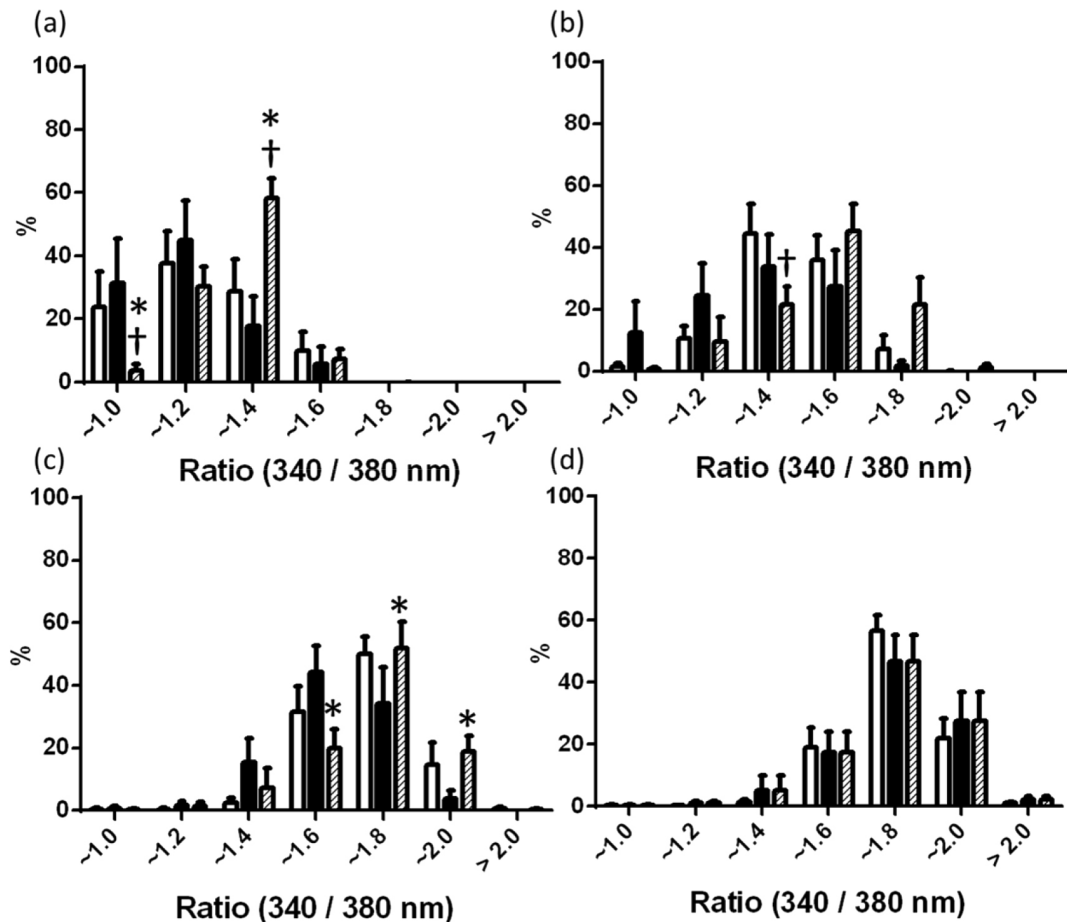


図3. 近位部 (proximal: □), 中央部 (middle: ■), 遠位部 (distal: ▨) の Ratio 値の分布。
 遠位部との群間差 († p < 0.05, * p < 0.05, †: vs 近位部, *: vs 中央部). 値は平均値 ± 標準誤差.

ECC による細胞外からの流入は, stretch activated channels (SAC: 細胞膜伸展チャネル) を介したものであることが指摘されている²⁾. ハイスピードカメラ撮影画像より, ECC 負荷による細胞膜の伸展程度を調べたところ, 近位部よりも遠位部側における筋長の変化量が大きいたことが示された. つまり, 遠位部は SAC の開口度が大きいために, 細胞外からの Ca²⁺流入が多いことが予想できる.

ところが, 最終セット (10 set) 後は全ての部位で同程度の値を示した (図2, 図3 d). これは, ECC の初期は [Ca²⁺]_i 蓄積に部位差が生じるが, 最終的には [Ca²⁺]_i 蓄積は一樣に生じるという可能性を示唆している. 長時間の [Ca²⁺]_i 蓄積は, 筋線維内を伝播し, 細胞内で均一の濃度となる機構が存在しているのかもしれない. その結果, 細胞内のカルシウムに対する損傷・肥大応答が筋細胞全体で調節される可能性が考えられる.

本研究はラット下肢筋を用いて, ECC 後の *in vivo* [Ca²⁺]_i 蓄積動態を測定することに初めて成功し, さらに [Ca²⁺]_i 蓄積は筋部位によって異なる可能性が示唆された. 今後, ECC の収縮条件 (速度, 角度, 頻度) を検討することで, ECC によって生じる [Ca²⁺]_i 蓄積と筋損傷・筋肥大との関連性をより詳細に明らかにしていきたい.

共同研究者

本研究の共同研究者は, 電気通信大学大学院先進理工専攻の江島弘晃, 田中嘉法, 井上直己, 野上俊輔である. 本稿を終えるにあたり, 本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます.

文献

- 1) Kano, Y., Sonobe, T., Inagaki, T., Sudo, M. & Poole, D. C. : Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, **1** : 505-512, 2012.

- 2) Sonobe, T., Inagaki, T., Poole, D. C., & Kano, Y. : Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle *in vivo* : role of stretch-activated channels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **294** : R1329-1337, 2008.
- 3) Sonobe, T., Inagaki, T., Sudo, M., Poole, D. C. & Kano, Y. : Gender differences in intracellular Ca²⁺ accumulation following eccentric contractions of rat skeletal muscle *in vivo*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **299** : R1006-1012, 2010.
- 4) Eshima, H., Tanaka, Y., Sonobe, T., Inagaki, T., Nakajima, T., Poole, D. C. & Kano, Y. : *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.*, **305** : R610-618, 2013.
- 5) Kano, Y., Masuda, K., Furukawa, H., Sudo, M., Mito, K. & Sakamoto, K. : Histological skeletal muscle damage and surface EMG relationships following eccentric contractions. *J. Physiol. Sci.*, **58** : 349-355, 2008.