

温度感受性チャネルによる骨格筋細胞内
カルシウムイオンの制御

池上 諒

電気通信大学大学院 情報理工学研究科

博士（理学）の学位申請論文

2020年3月

温度感受性チャネルによる骨格筋細胞内
カルシウムイオンの制御

博士論文審査委員会

主査 狩野 豊 教授

委員 白川 英樹 准教授

委員 平野 誉 教授

委員 松田 信爾 准教授

委員 三瓶 巖一 准教授

委員 星野 太佑 准教授

著作権所有者

池上 諒

2020 年

Regulation of calcium homeostasis in skeletal muscle cells by temperature-sensitive ion channels

Ryo Ikegami

Abstract

The homeostasis of intracellular calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in skeletal muscle affects muscle function and protein biosynthesis. The temperature-sensitive channel (Transient receptor potential vanilloid 1: TRPV1) is activated by heat stimulation above 40 °C and promotes Ca^{2+} influx from the extracellular space.

The purpose of this study was to clarify the relationship between temperature sensitivity of TRPV1 and calcium ion homeostasis in skeletal muscle cell. Heat stress in vivo bioimaging model for small animals has been developed. The following research results were obtained through experiments.

1) The activation temperature threshold of TRPV1 correlates with changes in Ca^{2+} accumulation. 2) Muscle contraction induces inactivation of TRPV1 and suppresses $[Ca^{2+}]_i$ increase by heat stimulation. 3) TRPV1 in type 1 diabetes model skeletal muscle is less sensitive to heat stimulation.

These results demonstrated novel mechanism by which TRPV1 controls Ca^{2+} homeostasis in muscle cells. This mechanism plays physiologically important role in maintaining muscle function under high temperature environment.

温度感受性チャネルによる骨格筋細胞内 カルシウムイオンの制御

池上 諒

和文要約

骨格筋細胞内の温度変化は、収縮速度や疲労耐性に関連するほか、タンパク質合成の刺激因子の一つであることが示されている。本研究では、温度感受性チャネルである Transient receptor potential Vanilloid 1 (TRPV1) と筋細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 恒常性の関係に焦点を当てた。

本博士論文は、以下の4章で構成されている。

第1章： Ca^{2+} の細胞内変動にともなう骨格筋機能と形態適応について解説し、熱刺激が Ca^{2+} 恒常性に与える影響についての筋生理学的な研究知見を取りまとめた。

第2章：熱刺激負荷時の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)動態を生体内環境下(*in vivo*)の骨格筋を用いて明らかにした。骨格筋に対する熱刺激の影響を検討した研究は、その多くが培養細胞や摘出筋など生体外環境下(*in vitro*)で行われている。血流は筋温を調節する重要な要素であるため、熱刺激が骨格筋に与える影響は*in vivo*と*in vitro*条件では異なる可能性がある。本研究は、血流が維持された

in vivo モデルの骨格筋において熱負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を評価したはじめての研究である。第2章の前半では、熱刺激 (40 °C) が $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響を検討した。その結果、熱刺激は $[Ca^{2+}]_i$ を増加させることが明らかにされた。また、この熱刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 増加の要因は、TRPV1 を介したSRからの Ca^{2+} 放出が主因子であることが示された。さらに、熱刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、筋収縮により抑制されることが明らかになった。第2章の後半では、筋収縮と熱刺激の組み合わせによって、TRPV1 とリアノジン受容体 (RyR) の相互作用及びTRPV1 のリン酸化動態の影響を検討した。その結果、熱刺激及び熱刺激+筋収縮の条件下において、TRPV1 とRyRによる Ca^{2+} 放出が相互に影響を受ける現象は認めなかった。また、TRPV1 のリン酸化は、熱刺激により増加し、筋収縮により熱刺激負荷時のリン酸化は抑制された。以上のことから、第2章では、筋収縮がTRPV1 のリン酸化応答を抑制することによって不活性化し、熱刺激に対する Ca^{2+} 恒常性が維持される機構を明らかにした。

第3章：第3章の前半では、Streptozocin (STZ) 誘発性糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に対する熱刺激の影響を検討した。その結果、糖尿病モデル骨格筋では40°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が変化せず、45°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが明らかにされた。さらに、糖尿病モデル骨格筋では熱刺激負荷時 (40°Cもしくは45°C刺激) にTRPV1 のリン酸化が認められず、TRPV1 の総タンパク量自体も低下していた。したがって、45°Cの熱刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はTRPV1 を介したものでない可能性が示された。

第3章後半では、STZ 誘発性糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に対するカプサイシン (TRPV1 アゴニスト) 負荷の影響を検討した。その結果、糖尿病モデル骨

骨筋では熱刺激負荷時とは対照的に $[Ca^{2+}]_i$ がカプサイシンによって増加することが明らかとなった。さらに、糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ は10分以降で対照群と比較して有意に増加した。以上の結果より、糖尿病モデル骨格筋におけるTRPV1は、熱に対する感受性が特異的に低下していることが示唆された。

第4章：各実験を通じて得られた研究結果をまとめ、熱刺激と Ca^{2+} 恒常性の機構について筋生理学的な視点から考察を加えた。

本博士論文の結論として、*in vivo* 環境下において熱刺激負荷時の骨格筋細胞質内 Ca^{2+} を観察することにより主に以下の4点が明らかにされた。1) 熱刺激による細胞質内への Ca^{2+} 流出はTRPV1が主要因として作用する。2) 筋収縮はTRPV1の活性化を抑制し、結果として熱刺激負荷による Ca^{2+} 流入を抑制する。3) 糖尿病状態の骨格筋は熱刺激に対する Ca^{2+} 流入の閾値が異なる。4) 糖尿病状態の骨格筋ではTRPV1の総タンパク量の低下と熱刺激に対する感受性が減弱する。これらの結果は、TRPV1が筋細胞内 Ca^{2+} 恒常性に寄与する新規メカニズムであり、暑熱環境下での筋機能を維持するための合目的な機構として重要な発見であると考えられる。

目次

略語一覧	1
序論	4

第1章—先行研究のまとめ

骨格筋の概要	10
骨格筋細胞内における Ca^{2+} 制御	10
細胞内 Ca^{2+} と骨格筋機能	13
糖尿病と骨格筋細胞内 Ca^{2+}	14
熱の産生と放出	15
Transient Receptor Potential (TRP) チャンネル	17
Transient receptor potential Vanilloid 1 (TRPV1)	21
<i>In vivo</i> バイオイメーjing技法	28
第1章のまとめ	30

第2章—熱刺激が骨格筋細胞内 Ca^{2+} 恒常性に与える影響

背景	31
方法	33

結果	42
考察	53
第2章のまとめ	57
第3章—糖尿病モデルの骨格筋における TRPV1 の特徴	
背景	58
方法	60
結果	64
考察	75
第3章のまとめ	78
第4章—統括及び議論	
本研究で得られた知見のまとめ	80
本研究の学術的位置づけ	83
将来の展望	85
謝辞	87
引用文献	88

略語一覧

AMPK	AMP-activated protein kinase (AMP 活性化型タンパク質キナーゼ)
ATP	Adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
CAP	Capsaicin (カプサイシン)
CPZ	Capsazepine (カプサゼピン)
Ca ²⁺	Calcium ion (カルシウムイオン)
CaCl ₂	Calcium chloride (塩化カルシウム)
CaM	Calmodulin (カルモジュリン)
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II (カルシウムイオン/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II)
DAN	Dantrolen (ダントロレン)
DHPR	Dihydropyridine receptors (ジヒドロピリジン受容体)
DIA	Diabetes (糖尿病)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
DRG	Dorsal root ganglion (後根神経節)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
IGF	Insulin-like growth factors (インスリン様成長因子)
KCl	Potassium chloride (塩化カリウム)
KHB	Krebs-Henseleit buffer (クレブス緩衝液)
MCU	Mitochondrial calcium uniporter (ミトコンドリアカルシウムユニポーター)
MgSO ₄	Magnesium sulfate (硫酸マグネシウム)
NOS	Nitric oxide synthase (一酸化窒素合成酵素)

NaCl	Sodium chloride (塩化ナトリウム)
NaF	Sodium fluoride (フッ化ナトリウム)
NaHCO ₃	Sodium hydrogen carbonate (炭酸水素ナトリウム)
NaVO ₄	Sodium orthovanadate (オルトバナジウム酸ナトリウム)
PGC1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ コアアクチベータ α)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (ホスホイノシチド 3 キナーゼ)
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸)
PKA	protein kinase A (プロテインキナーゼ A)
PKC	protein kinase C (プロテインキナーゼ C)
RyR	Ryanodine receptor (リアノジン受容体)
SERCA	Sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase (筋小胞体 Ca ²⁺ -ATP アーゼ)
SR	Sarcoplasmic reticulum (筋小胞体)
STZ	Streptozocin (ストレプトゾシン)
T1DM	Type 1 diabetes mellitus (一型糖尿病)
TRP	Transient receptor potential (一過性受容体電位)
TRPA	Transient receptor potential ankyrin (一過性受容体電位アンキリン)
TRPM	Transient receptor potential melastatin (一過性受容体電位メラスタチン)
TRPV	Transient receptor potential vanilloid (一過性受容体電位バニロイド)

- [Ca²⁺]_i Intracellular Ca²⁺ concentration (細胞内カルシウムイオン濃度)
- mTOR Mammalian target of rapamycin (ラパマイシン標的タンパク質)

序論

骨格筋は、ヒトの生体において体重の約 40 %を占める最大の器官であり、運動能力や健康に深く関与している。骨格筋の収縮・弛緩は骨格筋細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度により制御されている。筋収縮は、ジヒドロピリジン受容体 (dihydropyridine receptors; DHPR) に活動電位が伝搬し、リアノジン受容体 (ryanodine receptor; RyR) を介して筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) から Ca^{2+} が放出され細胞質内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が増加することにより誘発される。また、筋弛緩は SR から放出された Ca^{2+} が筋小胞体カルシウム ATP アーゼ (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SERCA) により SR に取り込まれることにより生じる。

通常、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は Ca^{2+} が瞬時に SERCA により取り込まれるため、筋収縮後でも一定であり、 Ca^{2+} 恒常性が保たれている。一方で、筋疲労時には Ca^{2+} 取り込みが低下し、筋細胞内に Ca^{2+} が蓄積するとともに発揮張力が低下することが示されている (Allen *et al.*, 2008b; Sonobe *et al.*, 2008)。さらに、 Ca^{2+} は、筋機能だけでなくタンパクの合成 (mTOR 経路) 及び分解 (カルパイン経路) の両方に寄与するシグナル伝達物質としての役割がある。したがって、 Ca^{2+} は筋機能や骨格筋形態に影響を与える可能性がある。

骨格筋は ATP 分解によりエネルギーを得て筋収縮を行う。具体的に ATP は、収縮時のミオシンや、弛緩時に Ca^{2+} を取り込むために SERCA で利用される。その際、SERCA 及びミオシン ATPase で使用されたエネルギーの約 70% は熱に変換される (Rall & Woledge, 1990; Reggiani *et al.*, 1997)。したがって、骨格筋は筋収縮時に多量の熱を発生させる。これまでの研究により、筋温は持続的に運動を行うと上昇し、疲労困憊時では筋温が 42°C を超えることが報告されている

(Brooks *et al.*, 1971). また、筋温が上昇する際に、血流は生体内において熱を放散させるラジエーターとして機能している。実際に骨格筋の血流量は熱ストレスにより増加する (Heinonen *et al.*, 2011).

これまでの研究により、温度感受性チャネルである Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) が骨格筋の SR に発現していることが明らかにされている (Xin *et al.*, 2005; Lotteau *et al.*, 2013). TRPV1 は 42°C の熱刺激により開口し、細胞質内に Ca^{2+} を流入させる機能を有する (Caterina *et al.*, 1997; Vyklicky *et al.*, 1999; Xin *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2013; Lotteau *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Obi *et al.*, 2017). これまで、TRPV1 の研究は神経細胞を用い広く研究が進められてきた。神経細胞において TRPV1 は主に細胞膜上に存在し、活性化することにより細胞外から Ca^{2+} を流入させる (Caterina *et al.*, 1997). 一方で骨格筋において、TRPV1 は細胞膜では無く SR に発現しており、活性化することにより筋小胞体から Ca^{2+} を放出させる (Xin *et al.*, 2005; Lotteau *et al.*, 2013). このように骨格筋における TRPV1 は神経細胞と比較し存在する場所が異なり、筋の収縮・弛緩に重要な SR の Ca^{2+} 放出・取り込み機能に関与することが特徴である (Fig.1).

TRPV1 は糖尿病により活性化し、糖尿病性神経症発症の要因となることが示されている (Hong & Wiley, 2005; Hong *et al.*, 2008; Bishnoi *et al.*, 2011; Khomula *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Pabbidi & Premkumar, 2017). また、糖尿病状態の骨格筋では微小血管の構造や血行動態に障害をきたしている (Sexton *et al.*, 1994; Kindig *et al.*, 1998; Eshima *et al.*, 2015). さらに、糖尿病状態の骨格筋では健常群と比較 Ca^{2+} 緩衝能が低下していることが報告されている (Eshima *et al.*, 2013). したがって、糖尿病状態の骨格筋では健常状態と比較し、熱刺激により過度に細胞内に Ca^{2+} が蓄積し、細胞内 Ca^{2+} 恒常性が損なわれる可能性がある。

前述したこれまでの研究を統合すると、熱刺激は TRPV1 を介して骨格筋細胞内に Ca^{2+} を流入させ、 Ca^{2+} 恒常性に影響を及ぼすが、筋収縮や糖尿病下では TRPV1 を介した Ca^{2+} 恒常性が変化している可能性がある。しかしながら、これまでに生体環境下で熱刺激が骨格筋の細胞内 Ca^{2+} 恒常性に与える影響を検討した例はない。そこで、本研究では熱刺激下で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を観察可能な *in vivo* バイオイメージング技法を開発し、生体内環境下で熱刺激がラット骨格筋の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響を明らかにした。

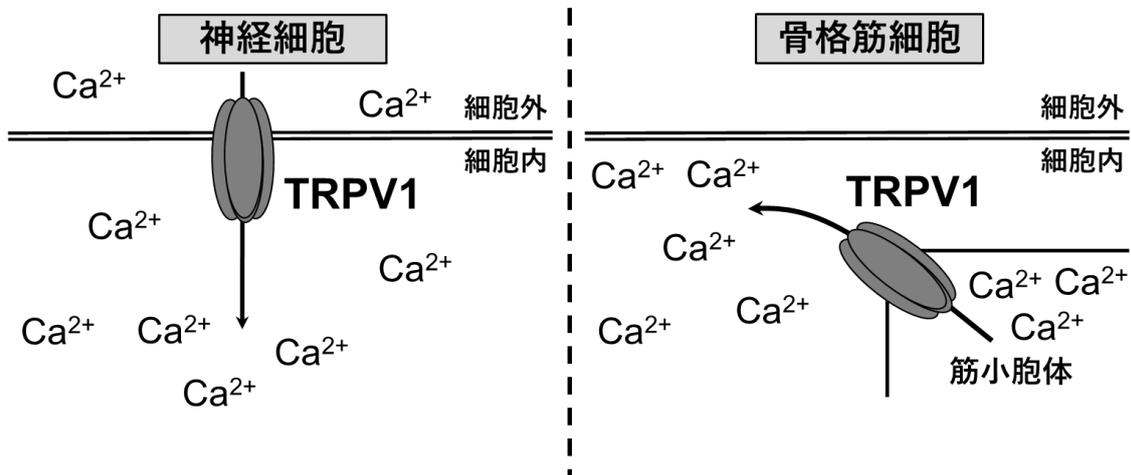


Fig 1. 神経細胞と骨格筋細胞の TRPV1 存在場所の概略図

神経細胞において TRPV1 は主に細胞膜上に存在し、熱や化学物質により活性化すると細胞外から Ca^{2+} を細胞内に流入させる。一方で、骨格筋における TRPV1 は筋小胞体に発現しており、熱や化学物質により活性化すると筋小胞体から Ca^{2+} を放出させる。

本論文の目的

本博士論文の主目的は、熱刺激が骨格筋細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 恒常性に与える影響を明らかにすることである。近年、温度感受性でチャネルある TRPV1 が骨格筋の筋小胞体に存在していることが明らかにされている。TRPV1 は 40°C 以上の熱刺激により活性化し、細胞質内に Ca^{2+} を流入させる。 Ca^{2+} は骨格筋の機能や骨格筋細胞の適応を調節する重要な役割がある。本研究の目的を達成するために、下記の4つの検討課題を設定した。

本論文の構成

第1章—先行研究のまとめ

1) Ca^{2+} による骨格筋機能・形態制御及び、2) 熱刺激が骨格筋に与える影響の2つの点を中心に、これまで得られている研究分野の知見を整理し概説した。

第2章—熱刺激が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響

検討課題1

先行研究において血流の維持された生体内環境下で、熱刺激が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響について検討した例はない。そこで本検討課題では生体内環境下において熱刺激が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響を明らかにした。

検討課題2

筋収縮を繰り返すことにより、筋細胞質内に Ca^{2+} が蓄積する。したがって、暑熱環境下での筋収縮は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が著しく上昇する可能性がある。そこで本検討課題では、熱刺激+筋収縮負荷が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響を明らかにした。

検討課題 3

TRPV1 はリン酸化及び脱リン酸化によりその活性が変化する。本検討課題では筋収縮が TRPV1 のリン酸化に与える影響を検討した。

第 3 章—糖尿病モデルの骨格筋における TRPV1 の特徴

検討課題 1

糖尿病ラットは神経細胞における TRPV1 の温度感受閾値の低下により、熱刺激に対する逃避行動が亢進していることが報告されている。したがって、骨格筋においても熱に対する感受性が亢進している可能性がある。そこで本検討課題では糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に対する熱刺激の影響を明らかにした。

検討課題 2

これまでの研究により糖尿病モデルの神経細胞において TRPV1 のタンパク量及び機能が変化していることが明らかにされている。したがって、本検討課題では糖尿病モデル骨格筋における TRPV1 の発現量及び、熱刺激が TRPV1 のリン酸化に与える影響を検討した。

検討課題 3

Capsaicin は代表的な TRPV1 のアゴニストである。TRPV1 は Capsaicin と熱を感知する部位が異なる。そこで本検討課題では糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に対する Capsaicin 負荷の影響を明らかにした。

第 4 章—統括

第 2 章及び第 3 章で得られた知見を統括し、学術的、臨床的な位置づけ及び当該研究領域の展望について議論した。

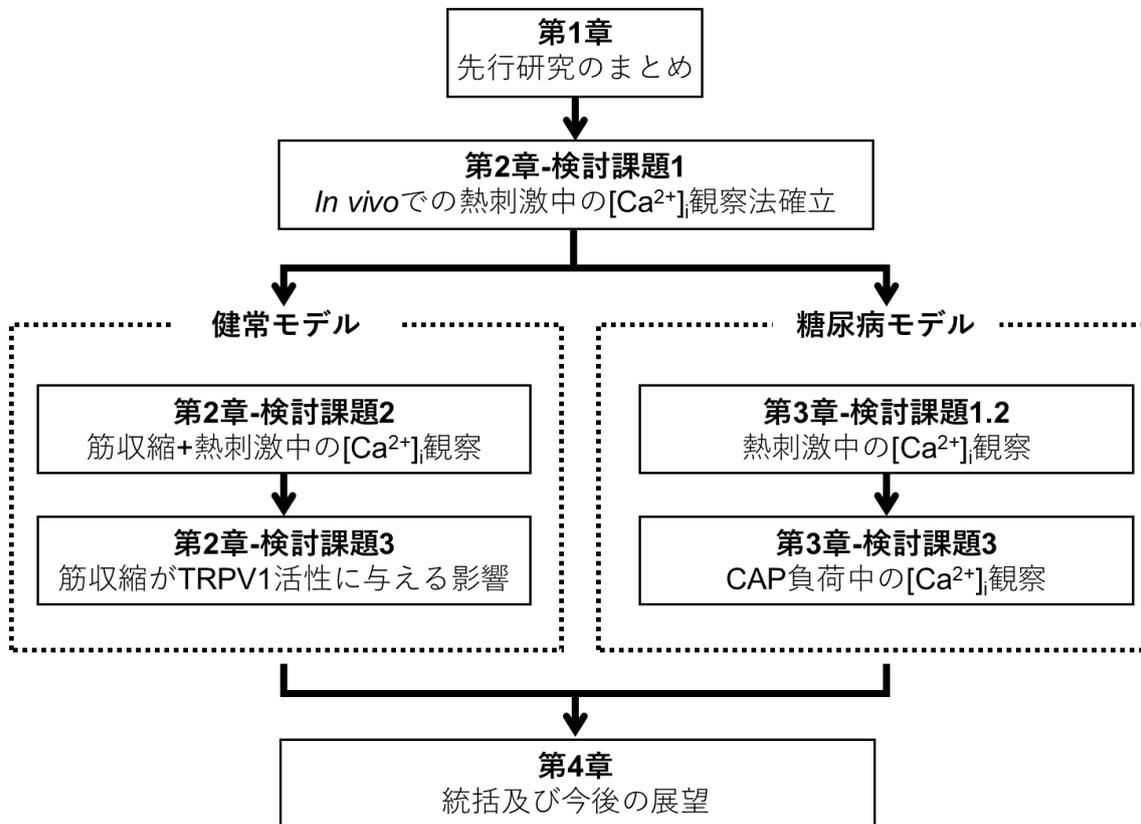


Fig.2 本研究論文の概要

第 1 章—先行研究のまとめ

骨格筋の概要

骨格筋は人体の重量の約 40 %を占める最大の器官である。骨格筋以外の多くの細胞は細胞膜に囲まれた中心に核が一つ存在し、その周囲に細胞小器官が局在している。一方で、骨格筋を構成する筋線維と呼ばれる細胞はときに数十センチの長さに至り、さらに多数の核を有する。筋線維は基底膜に覆われており、筋線維と基底膜の間に筋衛星性細胞と呼ばれる単核細胞が存在する。筋衛星細胞は幹細胞であり、筋線維が障害を受けると活性化し障害部位に融合し修復を行う (Dumont *et al.*, 2015)。単核細胞であれば致命的な障害でも、筋線維は多核細胞であるため筋衛星細胞を動員することにより容易に修復が可能である。このように、他の細胞と異なり骨格筋は非常に優れた可塑性を持つ。また、筋線維はミオシン重鎖のアイソフォームにより機能の異なる主に 3 つのタイプ (I 型, IIa 型, IIb 型) に分類される (Komi & Karlsson, 1979)。I 型は発揮張力が低く持久性に優れた線維であり、IIb 型は発揮張力が高く持久性に乏しい。IIa 型は I 型と IIb 型の間位置する性質を有する。

骨格筋細胞内における Ca^{2+} 制御

筋収縮時における Ca^{2+} の放出機構

Ca^{2+} は骨格筋において収縮を引き起こす因子である。通常、骨格筋細胞質内の Ca^{2+} 濃度は $0.1 \mu\text{M}$ と極めて低濃度に保たれている。一方で、細胞外や SR 内の Ca^{2+} 濃度は 1mM と細胞内と比較して高濃度である。筋収縮時には、SR の Ca^{2+} が細胞質内に流入することにより一過性に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する。

筋収縮時における一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は主に活動電位が横行小管に存在する DHPR を経て、SR に存在する RyR から流出することにより生じる (Lanner *et al.*, 2010). RyR は 4 つのアイソフォームが存在しており、骨格筋では RyR1 が発現している. アクチンフィラメントとミオシンフィラメントの結合は、放出された Ca^{2+} がトロポニンに結合することにより生じる. ミオシンフィラメントの頭部に存在する ATP 分解酵素が活性化され ATP を分解することによりエネルギーを得て筋収縮が行われる.

骨格筋における Ca^{2+} 取り込み機構

SR から細胞質に放出された Ca^{2+} は SR 上に存在する SERCA により再び SR 内へ取り込まれる. 骨格筋において SERCA は SERCA1 及び SERCA2 の 2 つのサブタイプが発現している. SERCA は遅筋線維の SR では SERCA2, 速筋線維では SERCA1 がそれぞれ多く発現している (MacLennan *et al.*, 1997). 筋弛緩は SERCA の働きにより $[Ca^{2+}]_i$ が低下することにより生じる (Fig. 3).

また、SR 以外に Ca^{2+} を取り込む細胞内小器官として、ミトコンドリアが挙げられる. ミトコンドリアは、 Ca^{2+} を一時的に貯蔵することにより $[Ca^{2+}]_i$ の制御に関与する. 実際に、ミトコンドリアが増加した骨格筋では筋収縮後に $[Ca^{2+}]_i$ の蓄積が抑制されることが報告されている (Eshima *et al.*, 2017). ミトコンドリアによる Ca^{2+} の取り込みは、mitochondrial calcium uniporter (MCU) と呼ばれるタンパク質により制御されている (Bernardi, 1999). ミトコンドリアは細胞質内の Ca^{2+} 濃度が数百 μM を超えると MCU を介して Ca^{2+} を取り込む.

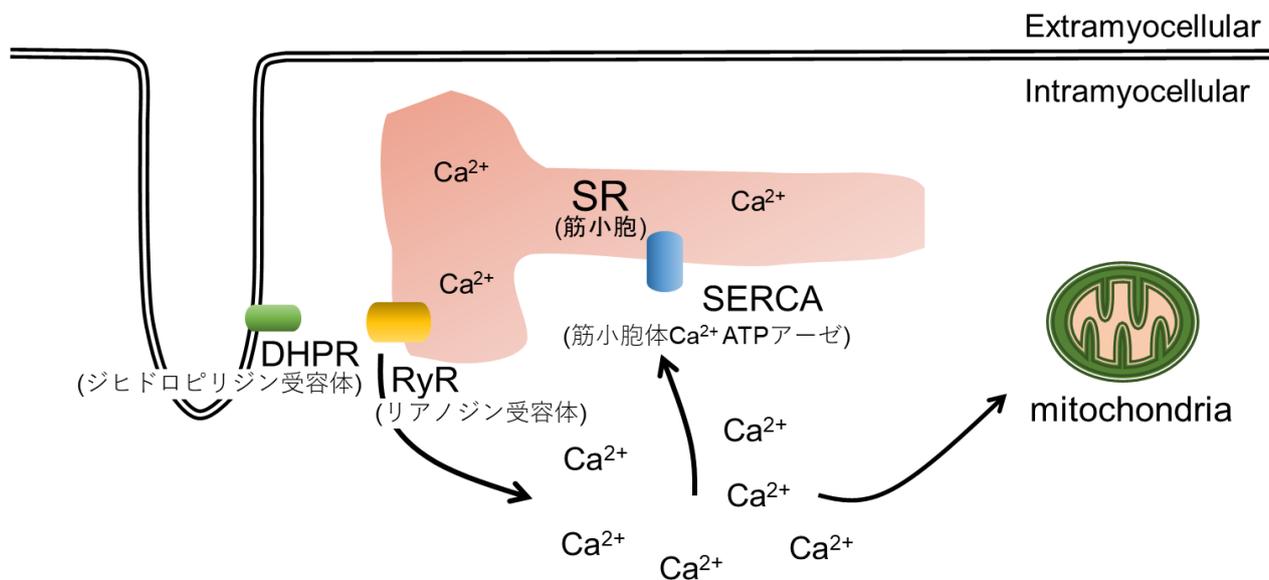


Fig. 3 骨格筋における Ca²⁺制御機構の概要図

骨格筋内の [Ca²⁺]_i は、SR からの Ca²⁺流出と SERCA 及びミトコンドリアによる Ca²⁺取り込みの相互作用により決定される。

細胞内 Ca^{2+} と骨格筋機能

筋疲労の定義は「最大張力または最大短縮速度の低下」である (Bigland-Ritchie & Woods, 1984; Sogaard *et al.*, 2006). 前述の通り, 筋収縮・弛緩は細胞質内の Ca^{2+} により制御されている. したがって, SR による Ca^{2+} の放出・取り込み障害は最大張力及び最大短縮速度低下の要因となる. Allen & Westerblad (Allen *et al.*, 2002) はスキンドファイバー (単一筋線維から細胞膜を除去して作成される) を用いた実験により, 筋疲労時に SR からの Ca^{2+} 放出が低下することを報告している. このメカニズムは, 細胞質内のリン酸塩が増加すると SR に入り, Ca^{2+} に結合することにより遊離 Ca^{2+} が減少するためであると説明している. また, Hill ら (Hill *et al.*, 2001) はヒト外側広筋から得られた試料において, 膝伸展運動後に筋発揮張力の低下と共に SR の Ca^{2+} 放出だけでなく Ca^{2+} 取り込み能力も低下していることを報告している. さらに, Sonobe ら (Sonobe *et al.*, 2008) は, 生体内環境下のラット骨格筋において, 筋収縮負荷により筋発揮張力の低下と共に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が経時的に上昇することを報告している. Eshima ら (Eshima *et al.*, 2013) は, Sonobe らと同様の実験手法により SZT 誘発性糖尿病モデルラット骨格筋において, 筋収縮後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低下が健常群と比較して遅延していることを報告している.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は, Ca^{2+} 依存性タンパク質分解酵素であるカルパインを活性化させる (Allen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Murphy, 2010). カルパインはカルパイン1, カルパイン2, カルパイン3の3つのアイソフォームが存在し, カルパイン3は骨格筋特異的である (Murphy, 2010). 活性化されたカルパインは, タイチン, ジャンクトフィリン, トロポニン, トロポミオシンなど細胞内タンパク質を分解する (Goll *et al.*, 2003).

糖尿病と骨格筋細胞内 Ca^{2+}

糖尿病は、筋萎縮、筋力低下及び運動耐容能の低下を引き起こす可能性がある。齧歯類を用いた研究では、薬理的 (Streptozocin: STZ) に誘発された I 型糖尿病は、筋発揮張力の低下、易疲労性および筋の脆弱性の増加をもたらす (Grossie, 1982; Paulus & Grossie, 1983; van den Zegel *et al.*, 1984; Cotter *et al.*, 1989; Medina-Sanchez *et al.*, 1991; Kumke *et al.*, 1997; Aughsteen *et al.*, 2006)。同様に、ヒトにおいて糖尿病神経障害を発症した糖尿病患者は筋量及び筋力が低下する (Andersen *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2005)。

糖尿病による骨格筋機能的障害のメカニズムは、糖尿病における他の組織と同様に Ca^{2+} 緩衝能力の障害に関連している (Levy *et al.*, 1994)。前述した通り、骨格筋の収縮弛緩は SR の Ca^{2+} 放出 - 取り込みに制御される。収縮後の弛緩は、主に SERCA を介した細胞質から SR への Ca^{2+} 取り込みにより生じるが、これまでに STZ 誘発性糖尿病ラットにおいて、SERCA の活性が低下していることや (Eibschutz *et al.*, 1984)、SERCA の発現量が低下していることが示されている。さらに、近年 Eshima ら (Eshima *et al.*, 2013) は糖尿病モデル骨格筋においてミトコンドリアの機能障害が Ca^{2+} 緩衝能力低下に関連していることを明らかにしている。

熱の産生と放出

哺乳類は、低温時には自ら熱を産生し、高温時には熱を放出するなど体温を一定に保つ機能が存在するため、外気温に関わらず活動が可能である。これは、哺乳類の体温機能調節が非常に優れていることを示している。本項において主に骨格筋における熱の産生と放出について説明する。

骨格筋における熱産生

筋収縮・弛緩時に関与する ATPase は、主に 3 種類である。具体的には、筋収縮に関与するミオシン ATPase、細胞内のイオン勾配や膜電位の保持や筋弛緩時に関与する Na^+ / K^+ ATPase 及び SERCA である。筋収縮・弛緩時に使用される ATP から生成されるエネルギーは、20-30%が機械的エネルギーとなり 70-80%は熱エネルギーに変換される (Kushmerick *et al.*, 1992; Reggiani *et al.*, 1997; Ryschon *et al.*, 1997; Wackerhage *et al.*, 1998; Barclay & Weber, 2004; Jones *et al.*, 2004)。したがって、筋収縮時は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、ミオシン及び SERCA による ATP 加水分解により多量に熱が発生する。実際に運動により疲労困憊となったラット外側広筋では、安静時に 34-35°C程度に保たれていた筋温が 42°C程度まで上昇することが報告されている (Brooks *et al.*, 1971)。また、全身麻酔の併発症である悪性高熱症は、骨格筋における SR からの Ca^{2+} リークにともなう連続的な SERCA による ATP 消費が原因である (Rosenberg *et al.*, 2015)。

血流による熱放散

血流は熱を放散させる重要な因子である。これまでの研究により、筋温の上昇は一酸化窒素合成酵素 (Nitric Oxide Synthase: NOS) を亢進させ、血管拡張物質である一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) 産生を増加させることにより骨格筋の血

流を増加させることが示されている (Harris *et al.*, 2003). さらに, 筋温の上昇は酸素消費量を増大させ, 代謝的に血管を拡張させることが示されている (Heinonen *et al.*, 2011). 血液の温度は深部体温と同程度の温度に保持されている。したがって, 筋温が上昇した部位の血流が増加することにより, 筋から血液へ熱が拡散する。熱を取り込んだ血液が皮膚血管へと輸送され, 皮膚から熱が放散される。このように, 血流は筋温を維持するラジエーターとして機能する。

糖尿病は, 末梢循環不全を誘発する代表的な疾病である。これまでの研究により, 糖尿病状態の骨格筋では微小血管の構造や血行動態に障害をきたしていることが示されている (Sexton *et al.*, 1994; Kindig *et al.*, 1998; Eshima *et al.*, 2015). 血流が熱放散に重要な役割を果たすことを考慮すると, 糖尿病状態の骨格筋では, 筋温上昇時に筋の熱を放散させる機能が低下している可能性がある。

Transient Receptor Potential (TRP) チャンネル

Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルは、1989 年にショウジョウバエ TRP 遺伝子が同定されて以来、世界中で精力的な研究がなされており、様々な機能を有するイオンチャネルファミリーを形成している (Fig. 4)。本項ではその中で特に温度感受性を持つ TRP チャンネルについて説明する。

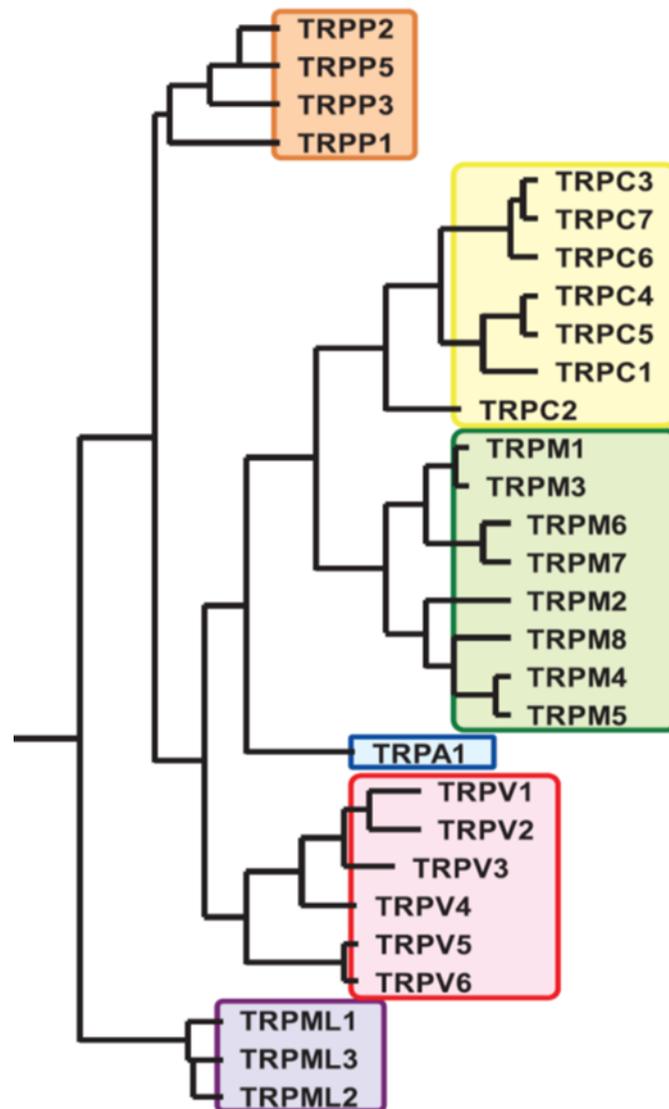


Fig. 4 TRP チャンネルファミリー (Numata *et al.*, 2009)

温度感受性 TRP チャネル

温度感受性 TRP チャネル (Thermo-TRPs) は、冷温から高温で活性化する様々なチャネルが存在し、主に感覚神経においてその機能が解明されてきた。これまでに明らかにされている Thermo-TRPs は以下の 6 つである (Fig. 5)。TRP vanilloid (TRPV) 1 及び 2 は痛みを伴う高温 (40-50°C程度) により活性化し TRPV3 及び 4 は体温程度の温度により活性化する。TRP melastatin (TRPM) 8 は痛みを伴わない体温以下程度の冷温により活性化し、TRP ankyrin (TRPA) 1 は 20°C以下の痛みを伴う冷温で活性化する。活性化されたチャネルは Ca^{2+} を含むカチオンの細胞質内への流入を亢進する (Vay *et al.*, 2012; Naziroglu & Braid, 2017)。

Thermo-TRPs はそれぞれアゴニストや炎症メディエーターにより、活性化する温度閾値が変化することが明らかにされている。特に、TRPV1 や TRPA1 は様々な疼痛性障害と関連するため、鎮痛などの観点から研究が進められている (Vay *et al.*, 2012)。

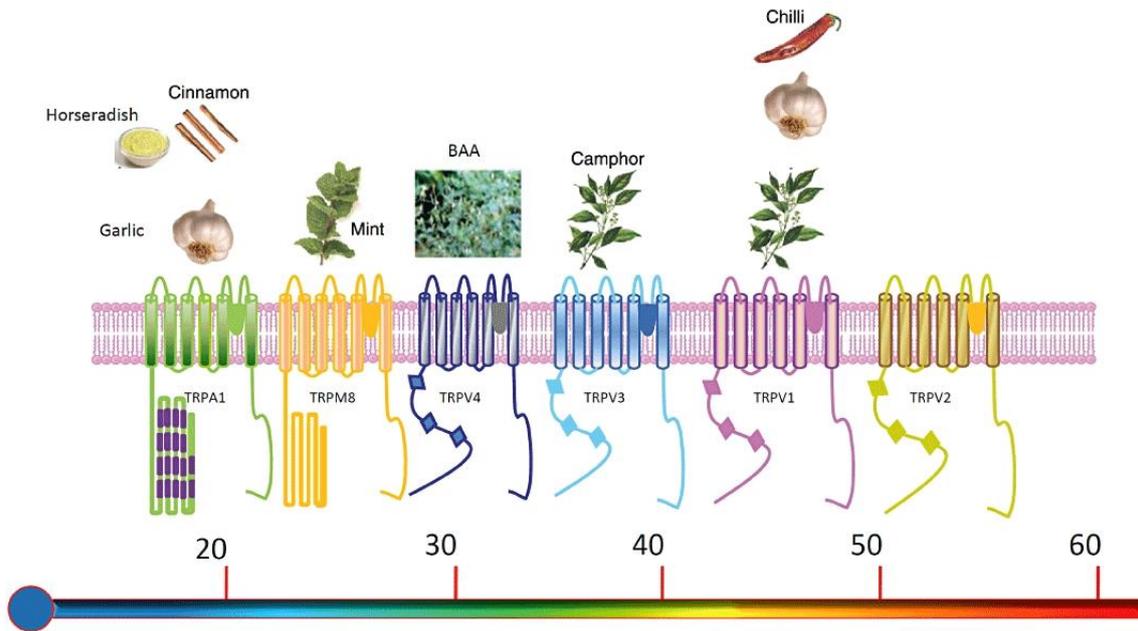


Fig. 5 Thermo-TRPs の概略図

各チャネルは、6つの膜貫通ドメイン (S1-S6)、膜貫通セグメント5 (S5) と6 (S6) をつなぐポアリング、長い細胞質N及びC末端を有する。図下の数字は温度を示しており、非常に高い高温 (TRPV2) から非常に低い低温 (TRPA1) まで明確な温度閾値が存在する。各チャネルは特定のアゴニストが存在し、アゴニストや生体内の合成物質により感知する温度閾値は影響を受ける (Vay *et al.*, 2012).

Table.1 Thermo-TRPs の具体的な温度閾値及び活性化刺激 (Vay *et al.*, 2012).

Channel	Temperature sensitivity	Non-thermal agonists	Function
TRPV1	≥42°C	Capsaicin, low pH, ethanol, anadamide, NADA, 12-HPETE, camphor, resiniferatoxin, allicin, 2-APB, lidocaine, gingerol, shogaol, piperine monoacylglycerols, ω-3 fatty acids, membrane stretch	Noxious heat sensor; also involved in inflammatory pain, thermal hyperalgesia, hippocampal long-term depression, diabetes, obesity, bladder function, hypertension, gastrointestinitis, hypothermia, renal excretory function.
TRPV2	≥52°C	2-APB, cannabidiol, membrane stretch	Possible extreme heat sensor; innate immune system
TRPV3	32°C~39°C	2-APB, camphor, carvacrol (from oregano), incensole acetate, thymol, eugenol	Warmth; possible involvement in noxious heat detection
TRPV4	27°C~34°C	Membrane stretch, phorbol ester, 5,6-EET, anandamide, arachidonic acid, BAA	Warm temperature sensation and volume regulation; possible involvement in noxious mechanical pain and thermal hyperalgesia
TRPM8	25°C~34°C	Menthol, icilin, eucalyptol	Innocuous cold perception, behavioural thermoregulation, cold-mediated analgesia; cold nociception in some neurons
TRPA1	≤17°C	Cinnamaldehyde, acrolein, chlorine, ROS, formalin, fatty acids, mustard oil, allicin, icilin, gingerol, prostanoids, NSAIDs, isoflurane, propofol, etomidate, dihydropyridines, clotrimazole, nicotine, menthol	Cold, mechanical and chemically induced nociception, cold hyperalgesia

Transient receptor potential Vanilloid 1 (TRPV1)

TRPV1 の概要

TRPV1 は TRPV サブファミリーで最初にラット後根神経節からクローニングされた非選択的カチオンチャネルである (Caterina *et al.*, 1997). TRPV1 は高い Ca^{2+} 透過性を有し, カプサイシン (Caterina *et al.*, 1997; Karai *et al.*, 2004; Mandadi *et al.*, 2006), 熱 ($> 43^\circ\text{C}$) (Caterina *et al.*, 1997; Numata *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Obi *et al.*, 2017; Ranatunga, 2018; Ikegami *et al.*, 2019), 酸 (Tominaga *et al.*, 1998; Baumann & Martenson, 2000; Jordt *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2007) および特定の脂質 (Zygmunt *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2003; Soler-Torrónteras *et al.*, 2014) により活性化する. これまでの研究により, 神経細胞において TRPV1 は細胞膜に位置し, Ca^{2+} を含むカチオンを細胞質内に流入させることが示されている. 近年, TRPV1 は神経細胞だけでなく, 筋細胞や脂肪細胞など様々な細胞において存在が確認されている (Fernandes *et al.*, 2012). さらに, TRPV1 は, 細胞膜だけでなく, 小胞体 / 筋小胞体やミトコンドリアなど細胞内小器官において Ca^{2+} を制御するために機能的に発現していることが明らかにされている (Zhao & Tsang, 2017).

TRPV1 の構造

TRPV1 は他の TRP チャネルと同様に, 細胞内に位置する N 末端及び C 末端, 6 つの膜貫通セグメント (S1-S6) 及び S5 と S6 の間に形成されるポアループ領域を持つ (Fig. 6). TRPV1 の N 末端に存在する 6 つのアンキリンリピートは, カルモジュリン (Calmodulin: CaM) と ATP を含むいくつかのタンパク質と相互作用をきたす因子となっている (Lishko *et al.*, 2007). 一方, TRPV1 の C 末端は

TRPV1 モノマーの四量体化を調節する重要な構造である (Garcia-Sanz *et al.*, 2004). さらに, TRPV1 の温度知覚領域は C 末端に局在していることが明らかにされている (Brauchi *et al.*, 2007). また, C 末端には温度知覚領域だけでなくホスホイノシタイド及びプロテインキナーゼによる感受性の調節部位も存在する (Cortright & Szallasi, 2004; Voets & Nilius, 2007).

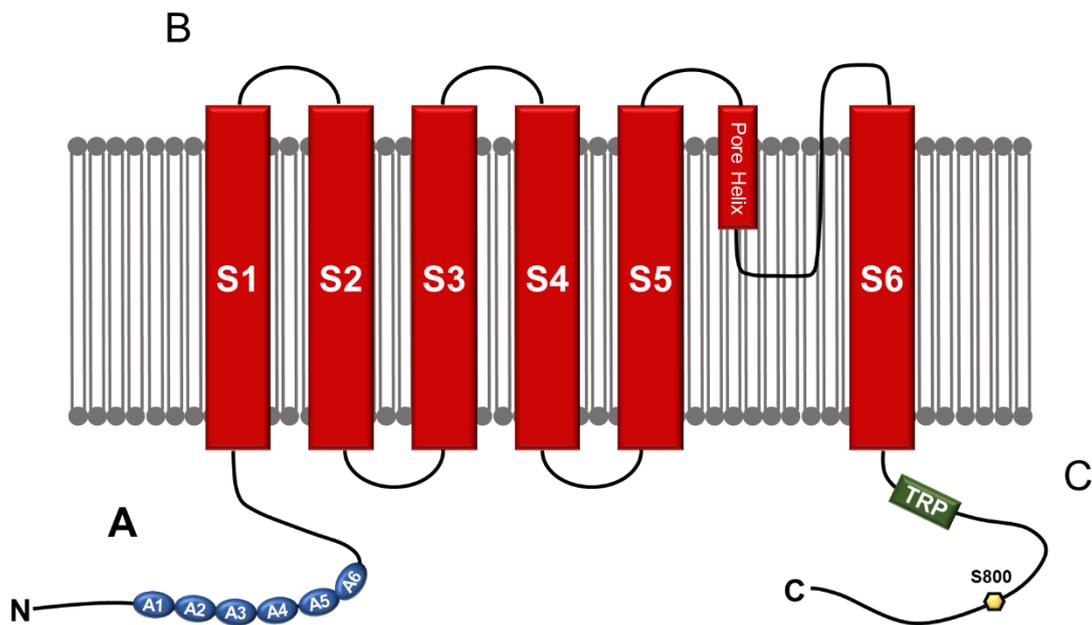


Fig. 6 TRPV1 の構造

A: 6つのアンキリンリピートを含むN末端. B: 6つの膜貫通セグメント (S1-S6). C: TRP ドメイン及び Protein kinase A (PKA), Protein kinase C (PKC), Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP₂) 及び CaM 結合部位を含む C 末端 (Christie *et al.*, 2018 より改変).

熱による活性化

TRP チャンネルの一部は、温度変化により開口することから Thermo-TRPs チャンネルと呼ばれている。Thermo-TRPs の中で TRPV1 の温度閾値は約 43°C であるとされている (Caterina *et al.*, 1997)。しかしながら、TRPV1 は温度上昇により開口率が上昇していくため、43°C 以下でもある程度の開口率がある。したがって、温度閾値とは、神経細胞における活動電位や、骨格筋においては $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる閾値を意味する。また、TRPV1 の温度閾値は組織の損傷や炎症により放出される炎症性メディエーターの作用により低下する。炎症状態の組織における TRPV1 の温度閾値は体温程度である (Sugiura *et al.*, 2002)。さらに、TRPV1 の温度閾値は生物種により異なる。暑熱環境に適応している哺乳類 (暑熱環境に生息しているリスの一種など) における TRPV1 は熱誘発性の開口率の上昇が大幅に抑制されている (Laursen *et al.*, 2016)。非常に興味深いことに、暑熱耐性のある哺乳類の TRPV1 は熱に対する感受性が低下しているものの、カプサイシンや酸に対する感受性は失われていない (Laursen *et al.*, 2016)。このように、TRPV1 の機能は細胞環境に対応することが可能である。

TRPV1 活性化の制御

感作

TRPV1 活性化の増強は特定のキナーゼ (Protein kinase A: PKA, Protein kinase C: PKC, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: CaMKII 及び Src キナーゼ) によるリン酸化により制御される (Winter *et al.*, 2013)。一般的に TRPV1 のリン酸化は、外部刺激に対する感受性を増加させる (Amadesi *et al.*, 2006; Vellani *et al.*, 2010)。それぞれのキナーゼは TRPV1 をリン酸化させる残基が異なり、熱刺激時

に重要な残基として Ser 800 が挙げられている(Winter *et al.*, 2013). Ser 800 は主に PKC によりリン酸化される (Fig. 7).

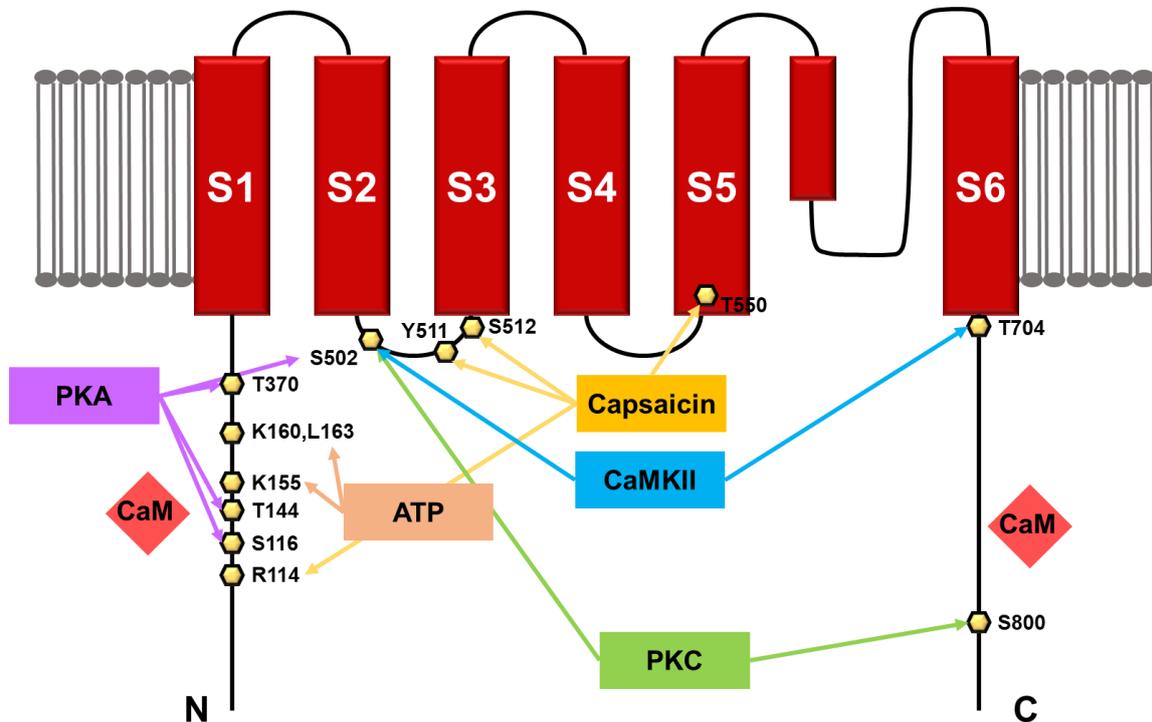


Fig. 7 TRPV1 の活性増加に関与するキナーゼと残基の概要

代用的なキナーゼとそれに対応する残基を示している。キナーゼにより活性化に関与する残基が異なる。また、複数のキナーゼにより活性化する残基も存在する。CaM は TRPV1 に直接結合することにより TRPV1 の開口率を減少させる (Jara *et al.* 2008 より改変)。

脱感作

TRPV1 は外部刺激の持続的な暴露により、さらなる刺激に対して応答を弱めることが知られている。実際に、後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) における TRPV1 は、持続するカプサイシン刺激および熱刺激に対して感受性が低下することが示されている (Vyklicky *et al.*, 1999; Mandadi *et al.*, 2006)。TRPV1 の脱感

作は、主に Ca^{2+} に依存しており、カルシニューリンによる脱リン酸化はこのプロセスに関与するとされている (Lishko *et al.*, 2007). また、他のメカニズムとして TRPV1 の脱感作は、CaM の TRPV1 の結合や phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) の加水分解などのメカニズムも関与する. 具体的に、TRPV1 を介した Ca^{2+} 流入は CaM と TRPV1 の結合を誘発し、TRPV1 に対する負のフィードバックとして作用し、開口率を減少させる (Numazaki *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2012). 一方、PIP₂ の枯渇は TRPV1 の脱感作に寄与する (Yao & Qin, 2009). さらに、TRPV1 のエンドサイトーシスは長期の脱感作に関与するとされている (Yao & Qin, 2009).

骨格筋における TRPV1

これまで TRPV1 は神経細胞において広く研究されてきたが、非神経細胞にも TRPV1 の存在が確認され、その役割が解明されてきた (Fernandes *et al.*, 2012). これまでの研究により、骨格筋細胞における TRPV1 は筋小胞体に存在しており、TRPV1 が活性化することで骨格筋細胞内に SR から Ca^{2+} が流出することが *in vitro* 環境下で明らかにされている (Xin *et al.*, 2005; Lotteau *et al.*, 2013). また、TRPV1 の活性化は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存的に Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α (PGC1- α) を活性化させ、ミトコンドリア合成を増加し、運動耐用能を高めることが報告されている (Luo *et al.*, 2012). さらに、TRPV1 は骨格筋細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることにより Mammalian target of rapamycin (mTOR) を活性化させ骨格筋肥大を促すことが示されている (Ito *et al.*, 2013b, a). このように、TRPV1 は細胞質内 Ca^{2+} 恒常性に関与して骨格筋細胞に影響を与えることが示唆されている.

TRPV1 は神経細胞において細胞膜と小胞体の両方に存在している。一方で、骨格筋における TRPV1 の発現場所は、膜分画及び免疫染色により SR に存在し、さらに SERCA と共局在していることが示されてる (Luo *et al.*, 2012; Lotteau *et al.*, 2013). しかしながら、筋幹細胞では SR および細胞膜の両方で確認されることや (Xin *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2012), 神経細胞において TRPV1 の細胞膜発現は神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF), Phosphoinositide 3-kinase (PI3 キナーゼ), インスリン及びインスリン様成長因子 (Insulin-like growth factors: IGF) により増加することが報告されている (Van Buren *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006). したがって、これまで成熟した骨格筋において細胞膜に TRPV1 は存在していないとされてきたが、SR に加えて細胞膜にも存在する可能性があるため、さらなる研究が必要である (Fig. 8).

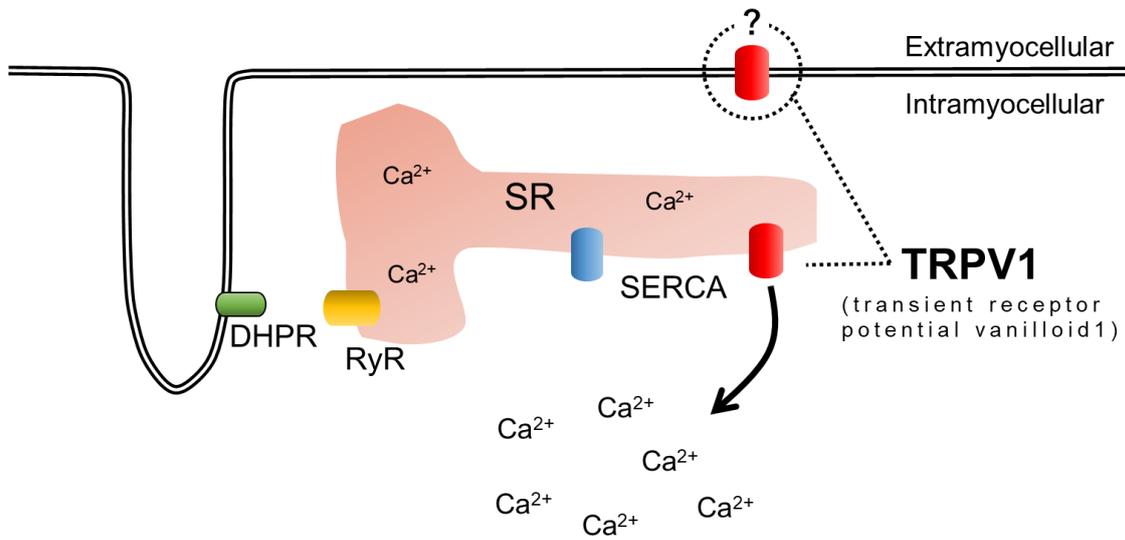


Fig. 8 骨格筋における TRPV1 の局在

これまでの研究により、成熟した骨格筋において TRPV1 は SR のみに存在しているとされている。しかしながら、筋芽細胞の段階では細胞膜に TRPV1 が存在することや、神経細胞において NGF や IGF により細胞膜の TRPV1 が増加することから骨格筋における TRPV1 の発現場所はさらなる検討が必要である。

糖尿病と TRPV1

DRG における温度及び痛覚を感知するニューロンは、糖尿病により過度に活性化し痛みをともなう糖尿病性神経障害を誘発する。痛みを伴う糖尿病性神経障害の根底にあるメカニズムの多くは未解明であるが、TRPV1 が関与する可能性が示唆されている (Todorovic, 2016)。Hong & Wiley (Hong & Wiley, 2005) は、STZ 誘発性糖尿病ラットの DRG ニューロンにおいて、免疫染色により TRPV1 の膜発現が有髄線維 (A) において増加し、無髄線維 (C) において減少していることを報告している。また、Pabbidi ら (Pabbidi *et al.*, 2008) は、STZ 誘発性糖尿病マウス DRG ニューロンにおいて TRPV1 の総タンパク量と活動電位が増加していることを明らかにした。さらに、STZ 誘発性糖尿病ラットの DRG ニューロンにおいて Capsaicin 誘発性の電流が増加したことが報告されている (Jagodic *et al.*, 2007; Shankarappa *et al.*, 2011; Khomula *et al.*, 2013)。

In vivo バイオイメージング技法

本実験では、Ca²⁺感受性蛍光指示薬である Fura2 を脊柱僧帽筋に負荷し、*in vivo* バイオイメージング技法を用いて [Ca²⁺]_i を観察している。*in vivo* バイオイメージング技法を用いることにより、血流を維持して生体内環境下に近い状態で [Ca²⁺]_i 動態をリアルタイムで観察することが可能となる。本実験で用いる Fura2 は、1 mM までの [Ca²⁺]_i を計算することが可能である。また、Fura2 が Ca²⁺ と結合することにより、励起波長がブルーシフト (362 nm→335 nm) するため、335 nm 付近で励起した場合には [Ca²⁺]_i の上昇に伴い蛍光強度が増大するのに対して、370-380 nm 付近で励起した場合は逆に蛍光強度が減少する。したがって 340nm と

380nm の蛍光強度比を算出することにより、退色、光源の強度及び細胞の形態変化等に影響を受けずに $[Ca^{2+}]_i$ 動態を観察することが可能となる。

Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬は Fura2 以外にも様々な物が存在するが、多くの研究は 37 °C 付近で行われており光物理学的な影響は考慮されていない。 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬に対して、温度による影響で最も考慮すべきことは、温度が低い程解離定数 (Kd) が増加する点である (Shuttleworth & Thompson, 1991; Howarth *et al.*, 1995)。 また、蛍光自身が温度により影響を受けることも考慮すべき点である。一般的に量子収率、蛍光強度は温度上昇と反比例的に減少する (Song *et al.*, 1975; Han & Gross, 1992; Rachoisky *et al.*, 2001)。 また、励起状態での蛍光色素のライフタイムは、低温時でより長時間である (van den Zegel *et al.*, 1984; Kumke *et al.*, 1997)。 このように、温度を変化させた際の $[Ca^{2+}]_i$ を観察するにあたり多数の問題点は存在するが、Fura2 は二波長励起を行えるため、各種影響をキャンセルし $[Ca^{2+}]_i$ 動態を観察することが可能である。

第1章のまとめ

1章の前半では、骨格筋の基礎的理解、骨格筋細胞内の Ca^{2+} が骨格筋に与える影響及び骨格筋における熱産生について概説した。 Ca^{2+} は骨格筋機能だけでなく骨格筋形態にも影響を与える。これまで筋収縮が細胞内の Ca^{2+} に与える影響や筋温が精力的に研究されてきた。しかしながら、筋温の上昇が骨格筋の細胞内 Ca^{2+} 恒常性に与える影響に関する研究は発展途上であり、未解明な点が多数存在する。

第1章の後半では TRPV1 についてこれまで得られた知見について整理し概説した。これまで TRPV1 は神経細胞を中心に研究されてきた。近年は神経細胞以外にも発現が確認されてきており、知見が蓄積しつつある。しかしながら、骨格筋において血流の維持された生体内環境下で TRPV1 がどのように機能するかは明らかにされていない。生体内環境下において、骨格筋における TRPV1 の機能を明らかにすることにより、暑熱環境下や病態における TRPV1 が骨格筋に与える影響について新たな知見を提供できると考えられる。

第 2 章—熱刺激が骨格筋細胞内 Ca^{2+} 恒常性に与える影響

背景

骨格筋の温度及びその変化は、骨格筋の収縮速度と疲労度を含む複数の生理学的プロセスに影響を与える (van der Poel & Stephenson, 2002; Moopanar & Allen, 2005; Locke & Celotti, 2014; Ranatunga, 2018). さらに、近年、熱刺激は筋タンパク質合成経路を活性化させることが明らかにされた (Yoshihara *et al.*, 2013). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は骨格筋機能及び機能障害に関連する (Brini & Carafoli, 2009). 本研究では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に熱刺激が与える影響及び、暑熱環境下における筋収縮が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響を検討した.

TRPV1 は、ラットの後根神経節から TRPV ファミリーの中で最初にクローニングされた非選択的カチオンチャネルである (Caterina *et al.*, 1997). TRPV1 は高い Ca^{2+} 透過性を有し、カプサイシン (Caterina *et al.*, 1997; Karai *et al.*, 2004; Mandadi *et al.*, 2006), 熱 ($> 43^\circ\text{C}$) (Caterina *et al.*, 1997; Numata *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Obi *et al.*, 2017; Ranatunga, 2018; Ikegami *et al.*, 2019), 酸 (Tominaga *et al.*, 1998; Baumann & Martenson, 2000; Jordt *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2007) および特定の脂質 (Zygmunt *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2003; Soler-Torronteras *et al.*, 2014) により活性化する. TRPV1 の重要な機能の 1 つは、細胞がおかれる環境により活性化する温度閾値が変化することである. これまで TRPV1 は神経細胞で広く研究されてきたが、非神経細胞にも存在していることが明らかにされており、さまざまな細胞機能に影響を与えることが示されている (Fernandes *et al.*, 2012). 骨格筋細胞において TRPV1 は主に SR に存在し、TRPV1 の活性化によって SR から Ca^{2+} が放出される (Xin *et al.*, 2005; Lotteau *et al.*, 2013). さらに、TRPV1 を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、PGC1- α およびミ

トコンドリア合成を刺激し、酸化リン酸化による ATP 合成能力が高まることによって運動耐性を高める (Luo *et al.*, 2012). さらに, TRPV1 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇によって mTOR が活性化され, 筋肥大を促進することが示されている (Ito *et al.*, 2013b, a). したがって, TRPV1 は細胞質内 Ca^{2+} 恒常性に関与し骨格筋の構造と機能に影響を与える.

筋収縮に利用されるエネルギーは ATP の分解によってもたらされるが, その生成されるエネルギーの約 70% が熱に変換される (Rall & Woledge, 1990; Reggiani *et al.*, 1997). 実際に, 高強度の運動により疲労困憊となった筋では筋温が TRPV1 の活性化温度である 42°C に上昇することが示されている (Brooks *et al.*, 1971). したがって, 暑熱環境下での筋収縮は TRPV1 を介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を著しく増加させ, 結果として $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の恒常性が破綻するという仮説を立てた. 本研究は熱刺激中の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を測定した最初の *in vivo* 実験モデルである.

本研究の目的を達成するために、以下の検討課題を設定した。

検討課題 1

血液循環の保たれた *in vivo* 環境下において、熱刺激は TRPV1 を活性化させ SR からの Ca^{2+} 放出を誘発するのか明らかにする。

検討課題 2

筋収縮は RyR 受容体を介し SR から Ca^{2+} を放出させる。したがって、熱刺激中の筋収縮は TRPV1 を介した SR からの Ca^{2+} 放出と RyR 受容体を介した SR からの Ca^{2+} 放出の相乗効果により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が著しく増加するという仮説を検討する。さらに、RyR 受容体の阻害剤 (Dantrolen: DAN) を負荷し、筋収縮による RyR 受容体を介した Ca^{2+} 放出が TRPV1 に与える影響を検討する。

検討課題 3

熱刺激及び筋収縮が TRPV1 のリン酸化に与える影響を明らかにする。

方法

被験動物

本実験は Wistar 系雄性ラット (n = 72, 10 week of age; Japan SLC, Shizuoka, Japan, 10~15 週齢) を用いた。すべてのラットは、室温 23 ± 1 °C、湿度 55 ± 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 (PMI® Nutrition International) と水をそれぞれ自由摂取できる状態で 1 つのゲージ (42 × 26 cm) に 2 匹ずつ飼育した。全ての実験は、電気通信大学動物実験委員会の承認を得たものであり、本学動物実験指針に沿って行われた。ラットは、ペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg i.p.) の腹腔内注射により麻酔下においた。必要に応じて、麻酔は適時

追加した。実験終了後、ラットはペントバルビタールナトリウムの過剰投与により屠殺された。

外科的処置

脊柱僧帽筋の処置を含む全ての実験手法は、Sonobe ら (Sonobe *et al.*, 2008) の手法に従って実施された。簡潔に述べると、右脊柱僧帽筋を血液循環の損失なく慎重に露出し、筋と同等の大きさのワイヤーが付いた馬蹄形リングに安静時の筋長を維持するように縫合針を用いて固定した。筋収縮刺激負荷のため、筋の両端に電極を結びつけて電気刺激装置に接続した。収縮中の筋発揮張力を測定するため筋の端を運動負荷装置にワイヤーを接続した。筋の湿潤を保つため、95% N_2 + 5% CO_2 で平衡し、pH 7.4 に調整した後、37°Cで温めた Krebs-Henseleit Buffer [KHB (in mM) ; 132 NaCl, 4.7 KCl, 21.8 NaHCO_3 , 2 MgSO_4 , 2 CaCl_2] を表面灌流した。

Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2 AM (5 mM; Dojindo Laboratories) は、DMSO (0.4%) と Pluronic F-127 で溶解し、KHB 溶液で最終濃度 20 μM にした。筋は、37°C のホットプレート上で 60 分、Fura2-AM/KHB 溶液にインキュベートした。インキュベーション後、KHB によって筋表面に付着した余分な Fura-2 AM を完全に除去した。TRPV1 阻害剤として Capsazepine (CPZ: FUJIFLM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を使用した。CPZ は DMSO (0.06%) に溶解させ、KHB 溶液により最終濃度 300 μM に調整した。RyR の阻害剤として Dantrolen (DAN: Sigm-Aldrich, St. Louis, MO) を使用した。DAN は DMSO (1.0%) に溶解させ、KHB 溶液により最終濃度 100 μM に調整した。CPZ 及び DAN は Fura2-AM インキュベーション後に 20 分間インキュベーションを行った。

In vivo イメージング

Fura2-AM を負荷した脊柱僧帽筋をガラスホットプレート (Kitazato, Supply, Shizuoka, Japan) 上に固定した。蛍光顕微鏡による観察方法を Fig. 9 に示す。筋の観察部位に損傷がなく、血流が保持された状態を確認した。サンプリングエリア ($\sim 880 \times 663 \mu\text{m}$) は明視野にて、目印となる血管分岐を用いて選択した。340 nm, 380 nm の励起光波長は、蛍光フィルターに備え付けられているキセノンランプを用いて励起した。取得された画像は画像解析ソフト NIS-Elements を用いて 340 nm 励起時の画像から 380 nm 励起時の画像を除算処理することで Ratio 画像へと変換した ($F_{340}/F_{380} : R$)。Ratio 画像にて線維毎に ROI を配置し (Fig. 10), ソフトウェアにて数値化を行い、初期値 (R_0) からの変化率を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態 (R/R_0) として表した。

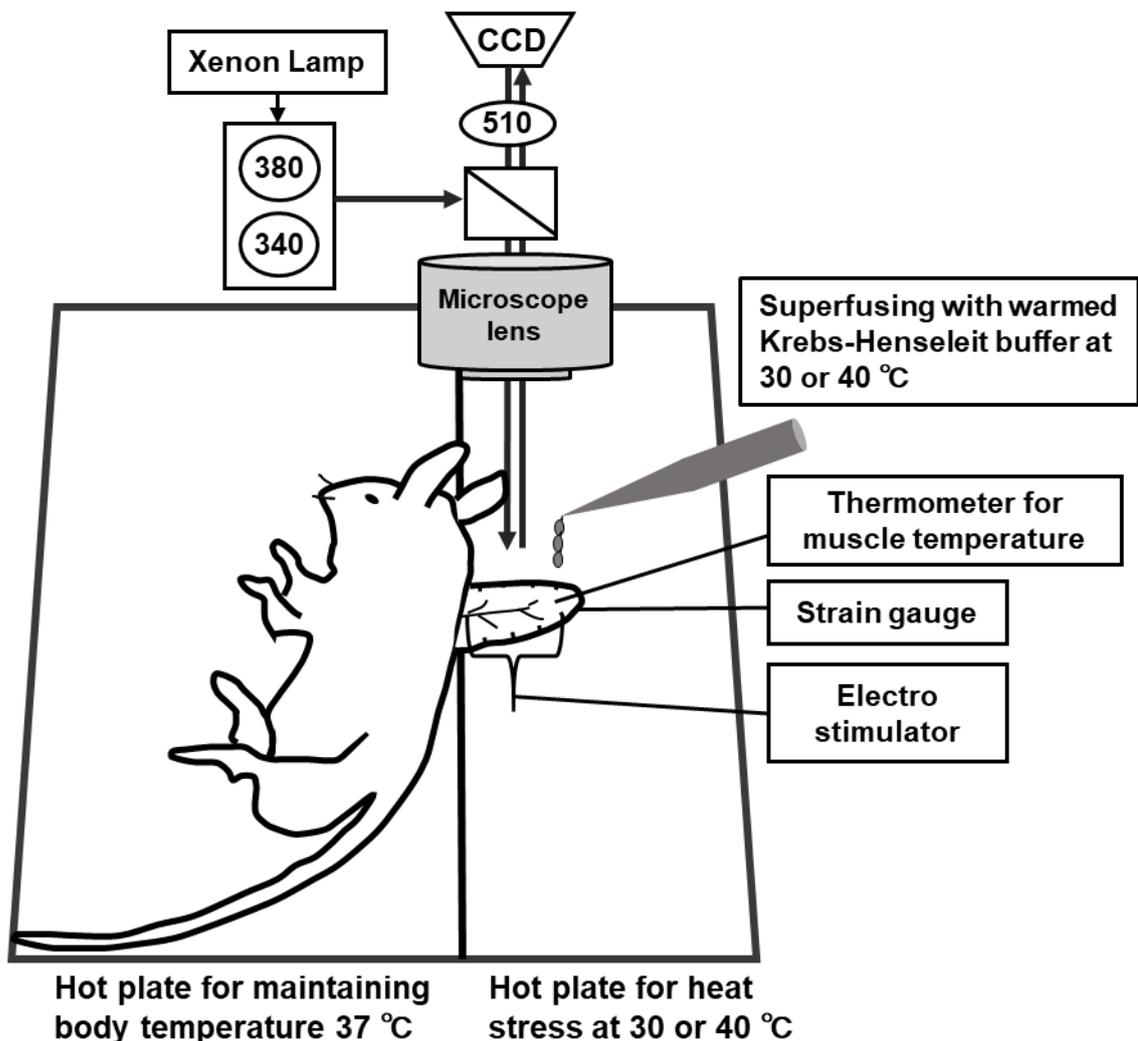


Fig. 9 脊髓僧帽筋における蛍光顕微鏡を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の *in vivo* 観察モデル

2枚の独立したガラス製ホットプレートを使用して体温を 37°C に維持し、筋には 30°C と 40°C の異なる温度環境を設定した。筋の乾燥を防ぐため、Krebs-Henseleit 緩衝液は常に灌流した。筋表面温度は、筋膜上に固定した温度プローブにより測定した。等尺性筋収縮は電気刺激を用いて負荷した。特定のサンプリングエリアから蛍光画像を取得し、レシオメトリック ($R : F_{340} / F_{380}$) 画像を作成し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の初期値からの変化を算出した。

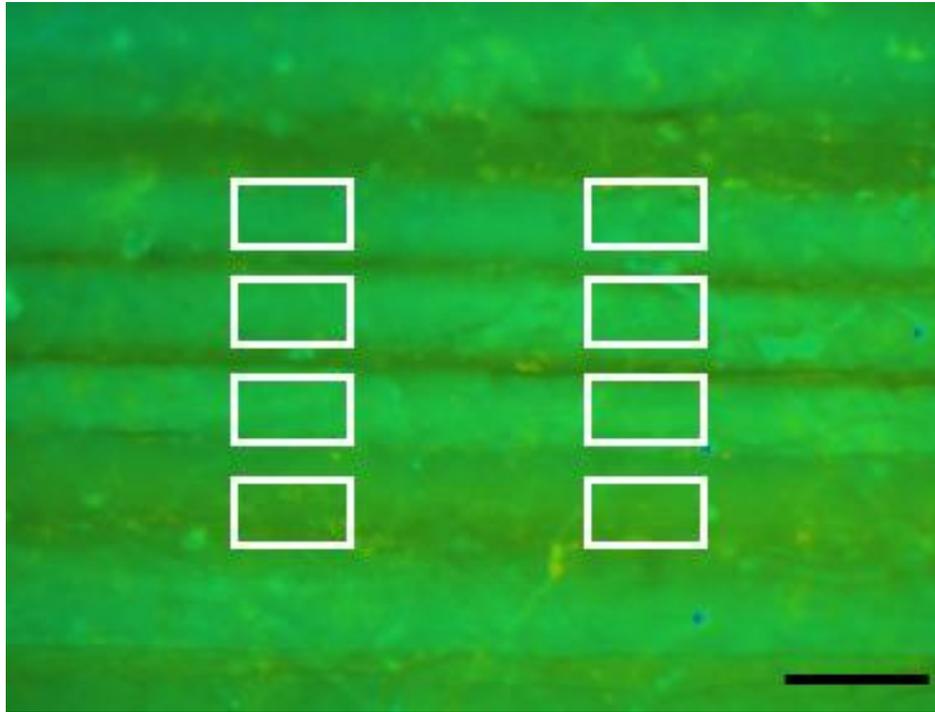


Fig.10 ROI の配置例

in vivo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 観察モデルによって得られたレシオメトリック画像を示す。各線維毎に任意の ROI (白四角) を配置し、初期値 (R_0) からの変化率 (R/R_0) を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態として算出した。(Bar = 100 μm).

実験プロトコル

熱刺激負荷

筋を設置したガラスのホットプレートの温度を調整することにより、脊柱僧帽筋に熱刺激 (40°C) を負荷した (Fig.7). 筋温は、筋表面に取り付けられた温度プローブ (BAT-10: Physitemp Instruments, Clifton, NJ) を使用して測定した. 10分間の安静時筋温 (30°C) の後、各条件 (30 または 40°C) を 20 分間維持した (Fig. 11). また、体温を独立して維持するためにラットの体を別のホットプレート (37°C) 上に設置した. 表筋温は連続的に測定され、値は 5 分間隔の平均を示した.

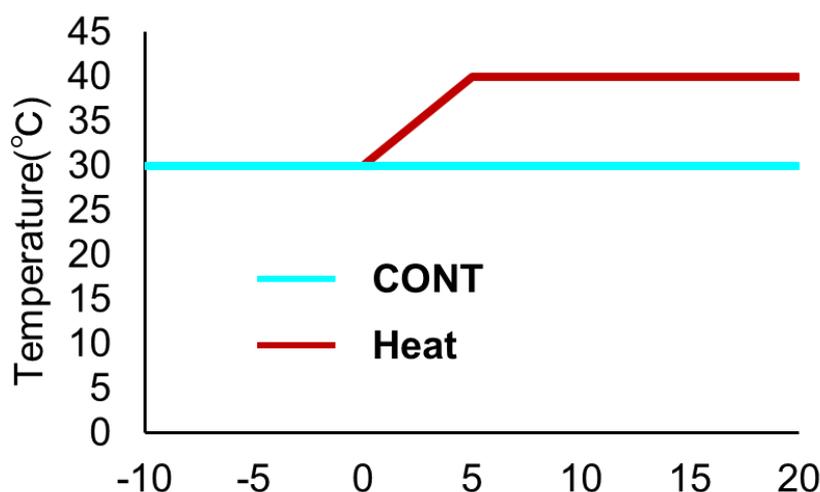


Fig. 11 熱刺激負荷プロトコル

安静 10 分間の後、筋を設置したガラスホットプレートの温度のみを上昇させることにより、脊柱僧帽筋に局所的な熱刺激 (40°C) を 20 分間負荷した.

熱刺激下での筋収縮

熱刺激中の等尺性筋収縮 (isometric contraction: ISO, 100 Hz frequency, 6–10 V, 30 s duration, SEN-8203; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) は2つの異なるパターンで実施した (Fig. 12) : *Protocol 1* ; 熱刺激負荷開始と同時に ISO 負荷を開始し, その後5分ごとに繰り返し ISO を負荷した (計5セット). *Protocol 2* ; 熱刺激の開始から10分後の筋温が $40^{\circ}C$ に達した際に ISO を1セット負荷した.

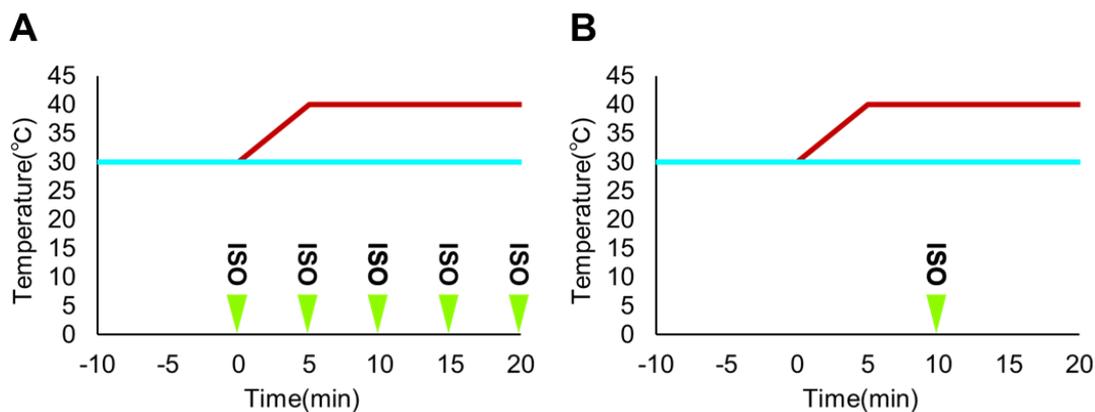


Fig. 12 熱刺激中の筋収縮負荷プロトコル

A : *Protocol 1*, 熱刺激負荷開始である 0 min の時点から計 5 セット ISO を負荷.

B : *Protocol 2*, 筋温が $40^{\circ}C$ に達した 10 分の時点で ISO を 1 セット負荷.

RyR 阻害

DAN (100 μM) の薬理効果を検証するため、10, 20, 40, 60, 80 及び 100 Hz での電気刺激誘導による各ピーク張力を予備実験として測定した。 Ca^{2+} イメージングでは、各実験の開始前に DAN を 20 分間負荷した。その後熱刺激及び熱刺激下での筋収縮 (*Protocol 2*) と同様のプロトコルで Ca^{2+} イメージングを実施した。

Western Blot

Western Blot により、各プロトコルの脊柱僧帽筋における phospho-TRPV1 および phospho-TRPV1 に関連する可能性のあるタンパク質のリン酸化レベルを定量した [対照群, 熱刺激群, 筋収縮群, 熱刺激+筋収縮群 (*Protocol 2*)]. Fura-2AM 負荷による影響を除外するために、同じプロトコルを負荷したラットの異なるグループから筋サンプルを採取した (各グループ $n=4$). 採取した脊柱僧帽筋は以前の研究と同様の氷冷溶解緩衝液 (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 200 mM NaF, 20 mM sodium pyrophosphate, 1 mM NaVO_4 , 1% Nonidet P-40, and 10% glycerol) + プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) + PhosSTOP ホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigm-Aldrich, St. Louis, MO), を使用しホモジナイズを行った (Eshima *et al.*, 2013). ホモジネートを 4°C で 15 分間、15,000 rpm で遠心分離した。上清タンパク質を BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL) を使用して定量した。サンプル (20 μg total protein per lane) を 7.5% ポリアクタミドゲルで 150 V で 60 分間分離し、次にタンク式転写装置を使用して 100 V で 75 分間 Amersham Hybond-P membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写した。転写後、

Blocking One または 3% skim milk (Nacalai Tesque) を使用にて室温で 1 時間ブロッキングをした。ブロッキング後、メンブレンを一次抗体に 4°C で一晩インキュベートした [anti-TRPV1 antibody, 1:1,000, ACC030, Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel); anti-rat phospho-TRPV1 polyclonal antibody, 1:500, KM112, Trans Genic (Fukuoka, Japan); anti-calmodulin-dependent protein kinase II (anti-CaMKII) antibody, 1:1,000, D11A10, Cell Signaling Technology (CST; Tokyo, Japan); anti-phospho CaMKII antibody, 1:1,000, T286, CST; anti-AMPK antibody, 1:1,000, 2532, CST; 及び anti-phospho AMPK antibody, 1:1,000, 2513, CST]。この phospho-TRPV1 抗体は、セリン 800 でリン酸化 TRPV1 と反応する。その後、メンブレンを goat anti-rabbit IgG (SC-2055; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) に室温で 1 時間インキュベートした。Chemi-Lumi One Super Kit (Nacalai Tesque) で検出し、Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences) で分析した。Ponceau-S は、ウエスタンブロット分析の内部ローディングコントロールとして使用した。

統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表記した。統計統計解析は Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) 用いて実施した。[Ca^{2+}]_i に対して two-way ANOVA と Bonferroni post hoc test を実施した。また Western Blot の定量結果に対しても同様に two-way ANOVA と Bonferroni post hoc test を実施した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

検討課題 1

熱刺激が生体内環境下における骨格筋細胞内 Ca^{2+} に与える影響

熱刺激群 (Heat) および熱刺激+TRPV1 阻害剤投与群 (Heat + CPZ) の筋温は 10 分以内に設定温度である 40°C に達し、これは 20 分後まで維持された (Fig. 13). 対照群 (CONT) の表面筋温は実験全体を通して 30°C に維持された.

CONT および Heat + CPZ において、Ratio は 20 分間の観察期間において一定であった. 対照的に、Heat は 10 分以降で Ratio が有意に上昇し 20 分でベースラインの $18.5 \pm 8.1\%$ に増加した (Fig. 15). また、Heat の Fura-2 比の頻度分布は線維間で不均一性を示した (Fig. 16).

検討課題 2

熱刺激下の筋収縮が生体内環境下における骨格筋細胞内 Ca^{2+} に与える影響

Fig. 17 及び Fig. 18 は、熱刺激下の筋収縮における 2 つの Protocol の筋表面温度 (Fig. 17A, Fig. 18A) 及び Ratio 変化を示している (Fig. 17B, Fig. 18B). 30°C 筋表面温度下の ISO において、Ratio は徐々に上昇し 20 分後に $5.6 \pm 7\%$ ($P < 0.05$) 増加した (Fig. 14B). 対照的に、Heat + ISO (Protocol 1) では 20 分間の観察期間において有意な Ratio 変化は観察されなかった (Fig. 17B).

Protocol 2 では、熱刺激中に熱刺激開始から 10 分の時点 (筋表面温度 40°C) で 1 セットの ISO を負荷した結果、Ratio の増加が抑制された. 具体的に、10 分間の熱刺激後 Ratio は $7.9 \pm 2.3\%$ 増加した ($P = 0.32$) が、ISO 1 セットを負荷後に $4.3 \pm 1.9\%$ に減少し、ベースラインとの有意差は消失した ($P > 0.05$, Fig. 17B).

DAN 条件において 40, 60, 80, 100 Hz での筋発揮張力は, CONT 条件と比較して減少した (Fig. 19A). 100 Hz の刺激周波数での筋張力は, CONT と比較して DAN 条件で $27 \pm 3\%$ 減少した (Fig. 19A). DAN 条件下での 100 Hz の値 (76.6 ± 3.2 mN) は, CONT の 40 Hz (64.2 ± 4.0 mN) から 60 Hz (83.6 ± 2.3 mN) に近似した値であった.

Fig. 19B は, Heat + DAN (RyR 阻害) に対する Ratio 応答を示している. DAN の適用は, 熱刺激によって誘発される Ratio の増加に影響を与えなかった ($P > 0.05$, Fig. 19B).

熱刺激によって誘発された Ratio 蓄積に対する DAN の効果が観察されなかったように (Fig. 19B), DAN は Heat + ISO によって誘発された Ratio 増加の抑制に影響を与えなかった (Fig. 19C).

検討課題 3

熱刺激及び筋収縮が TRPV1 のリン酸化に与える影響

Fig.20 及び Fig.21 は Protocol 2 の各条件 (CONT, Heat, ISO, Heat + ISO) の 20 分時点での TRPV1, AMPK, 及び CaMKII のリン酸化を示している. 熱刺激により TRPV1 の Ser 800 でのリン酸化が増加した ($P < 0.05$ vs. CONT, Fig. 20 A and B). 対照的に, Heat + ISO は付随する熱刺激による TRPV1 のリン酸化を著しく阻害した. ISO 単独負荷において TRPV1 のリン酸化は変化しなかった. AMPK のリン酸化は, CONT と比較して ISO により有意に増加した ($P < 0.01$, Fig. 21A and B) が, Heat または Heat + ISO で有意な変化は観察されなかった. CaMKII のリン酸化は, ISO でのみ有意に増加した ($P < 0.05$ vs. CONT, Fig. 21A and C).

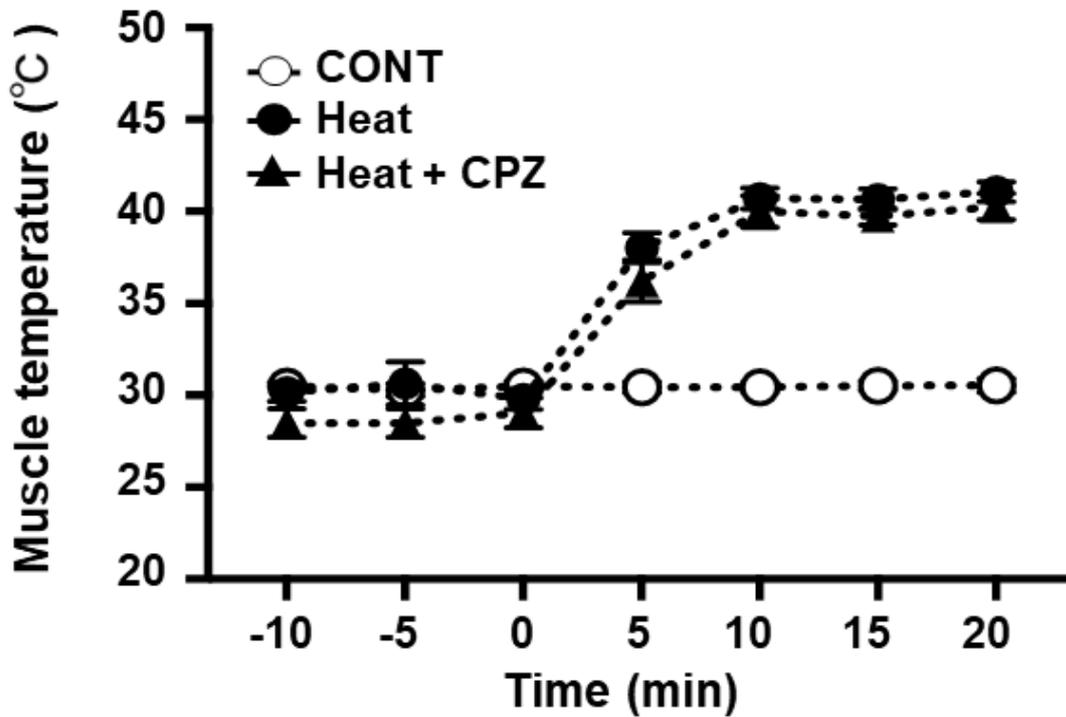


Fig.13 筋表面温度の変化

各群における筋表面温の変化 [対照群 (CONT; n = 12), 熱刺激群 (Heat; n = 7), および熱 + TRPV1 阻害剤群 (Heat + CPZ; n = 6)]. 筋表面温度は筋表面に設置した温度プローブにより連続的に計測し, 5分毎の平均値として示した. 値は平均値 ± 標準誤差を示している.

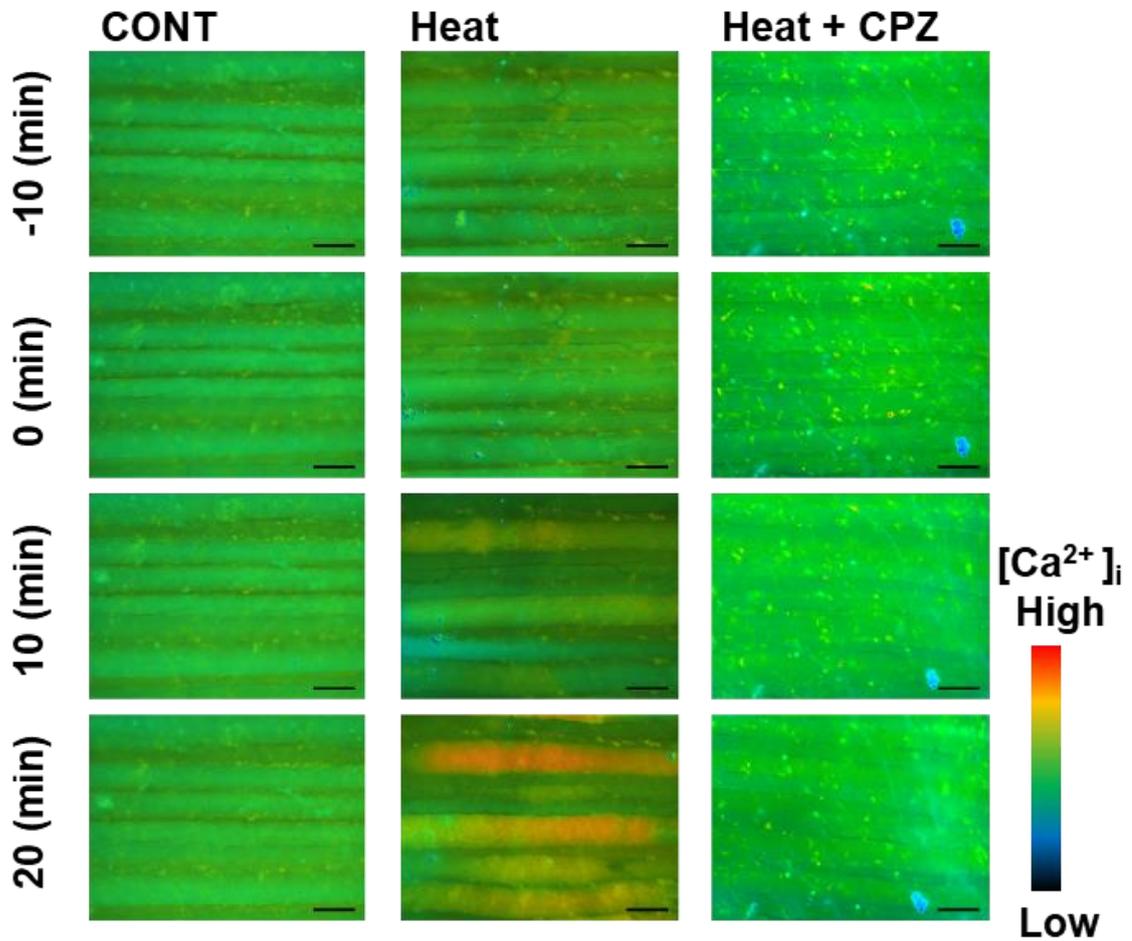


Fig.14 生体内環境下のラット脊柱僧帽筋における熱刺激負荷による筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の代表例

対照群 (CONT), 熱刺激群 (Heat), 熱刺激 + TRPV1 阻害剤群 (Heat + CPZ) における-10分から20分までの代表的な蛍光画像。疑似カラーは色が赤くなるほど Ca^{2+} が蓄積していることを示している (Bar = 100 μm).

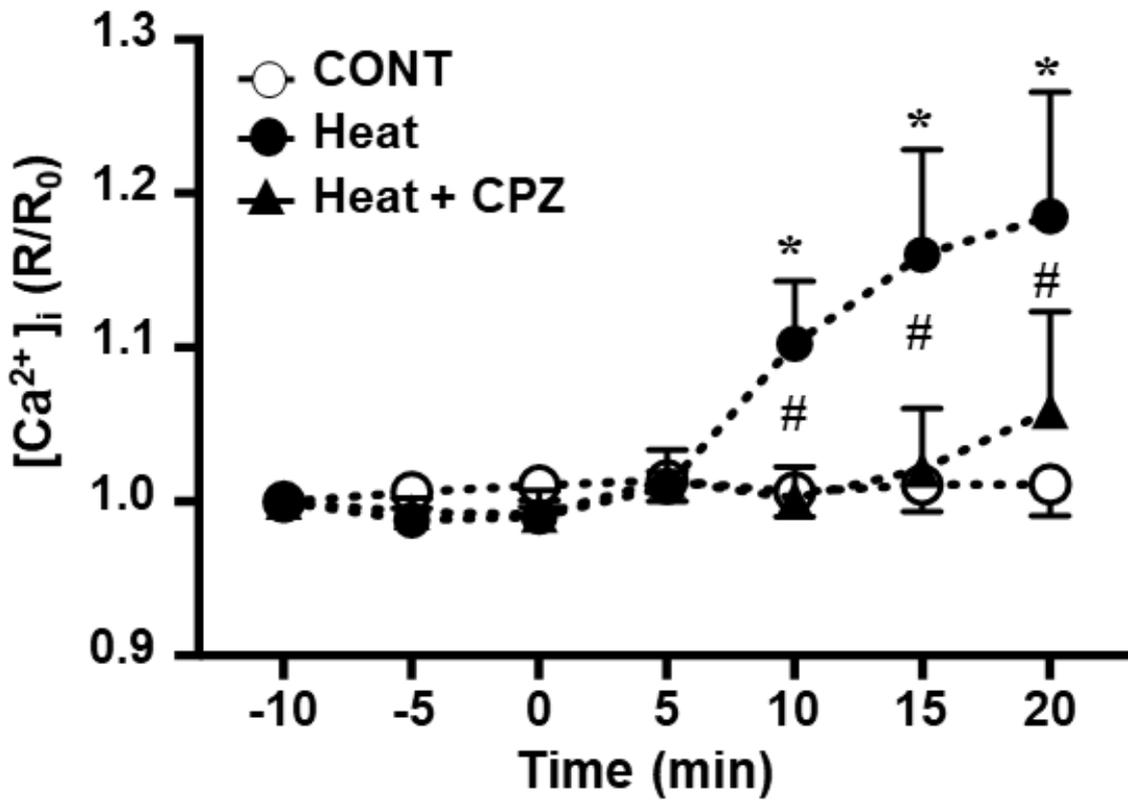


Fig.15 筋細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する異なる熱刺激条件の影響

各群 [対照群 (CONT; n = 12), 熱刺激群 (Heat; n = 7), および熱 + TRPV1 阻害剤群 (Heat + CPZ; n = 6)] における熱刺激負荷中の Ratio 動態. 蛍光画像は 5 分間の測定間隔で連続的に測定した. Ratio 値は安静時 (-10 分) レベル (R_0) からの変化として示した. 値は平均値 \pm 標準誤差を示している. # Heat + CPZ 群の有意差 ($P < 0.05$). *各条件の初期レベル (R_0) との有意差 ($P < 0.05$).

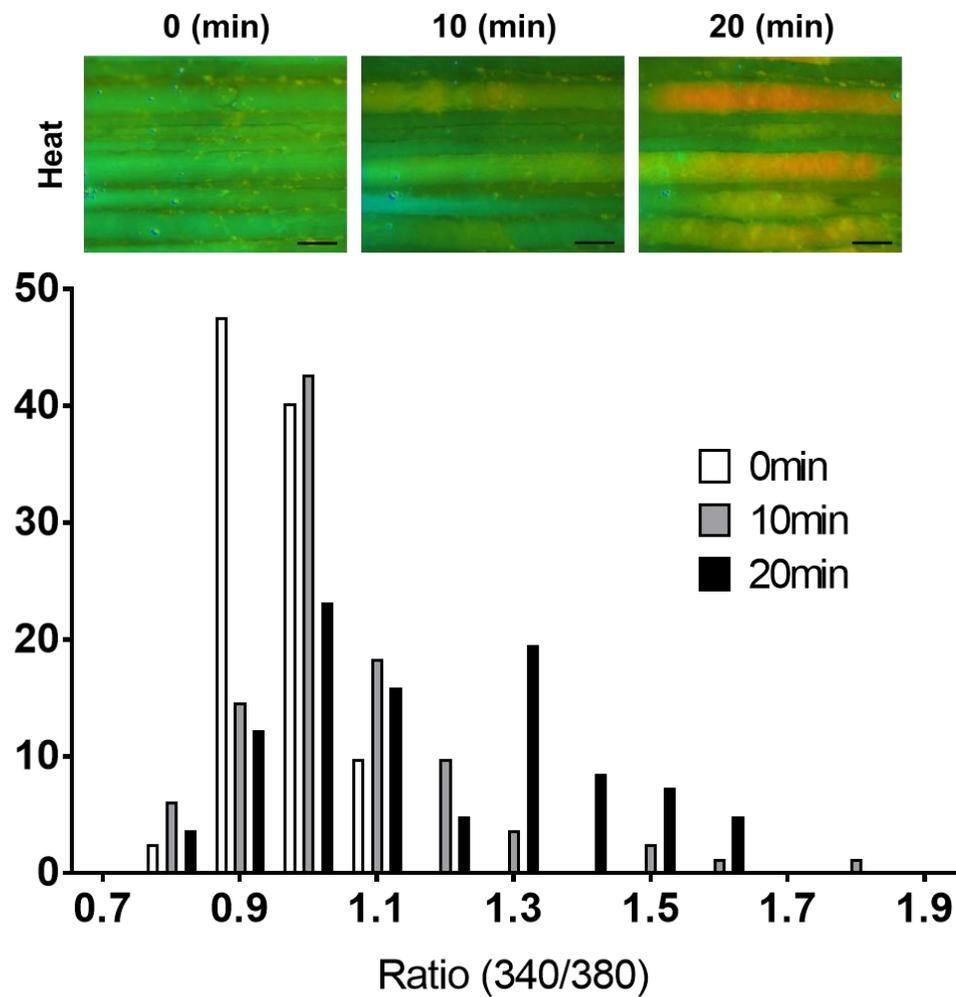


Fig.16 熱刺激群における熱刺激から 0, 10, および 20 分時の Fura-2 レシオ値の相対頻度の分布

各個体 6-8 個の ROI を設置し線維毎の蛍光強度を測定した (Bar = 100 μm).

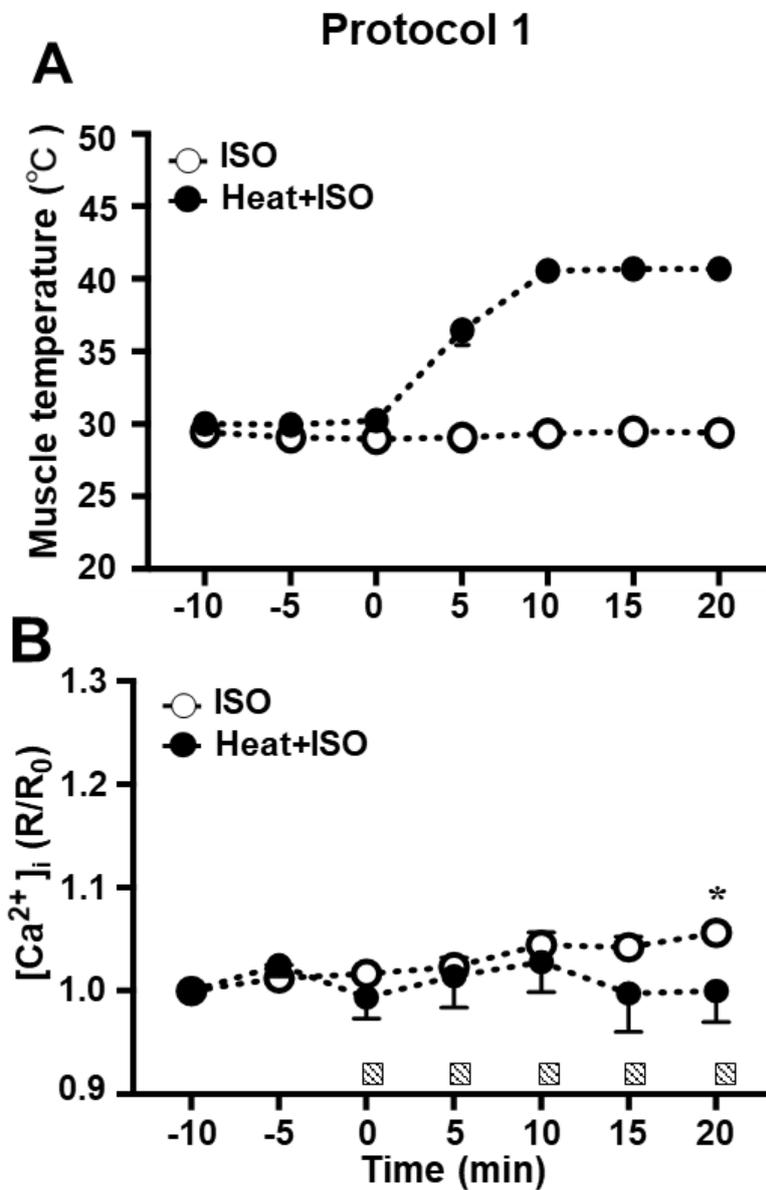


Fig.17 Protocol 1 熱刺激 + 等尺性収縮 (Heat + ISO) および熱刺激なし (ISO) の影響

5 セット ISO (n = 5) および Heat + ISO (n = 4) 条件での筋温 (A) および Ratio (B) の変化. 値は平均値 ± 標準誤差を示している. *各条件の初期レベル (R_0) との有意差 ($P < 0.05$).

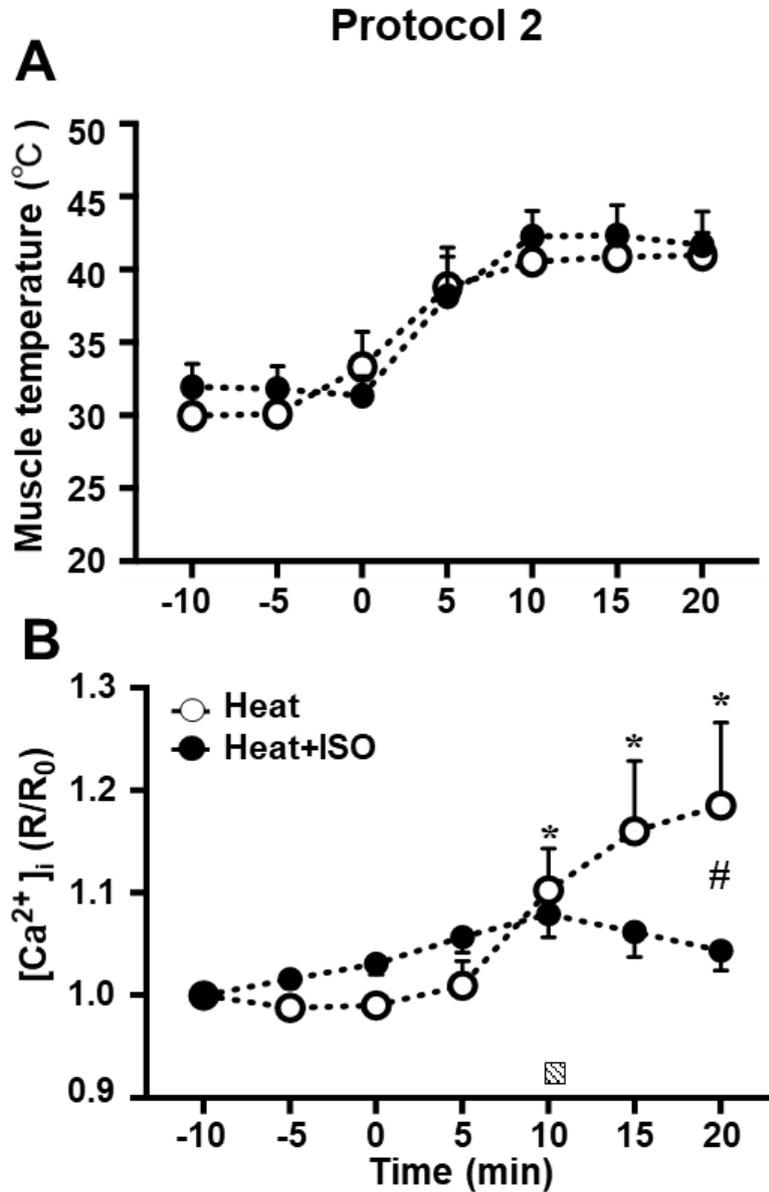


Fig. 18 Protocol 2 熱刺激 + 等尺性収縮 (Heat + ISO) および熱刺激 (Heat) の影響

1セット ISO (n=5) および Heat + ISO (n=4) 条件での筋温 (A) および Ratio (B) の変化. 値は平均値 ± 標準誤差を示している. # Heat vs. CONT または Heat + ISO 群の有意差 (P < 0.05). *各条件の初期レベル (R₀) との有意差 (P < 0.05).

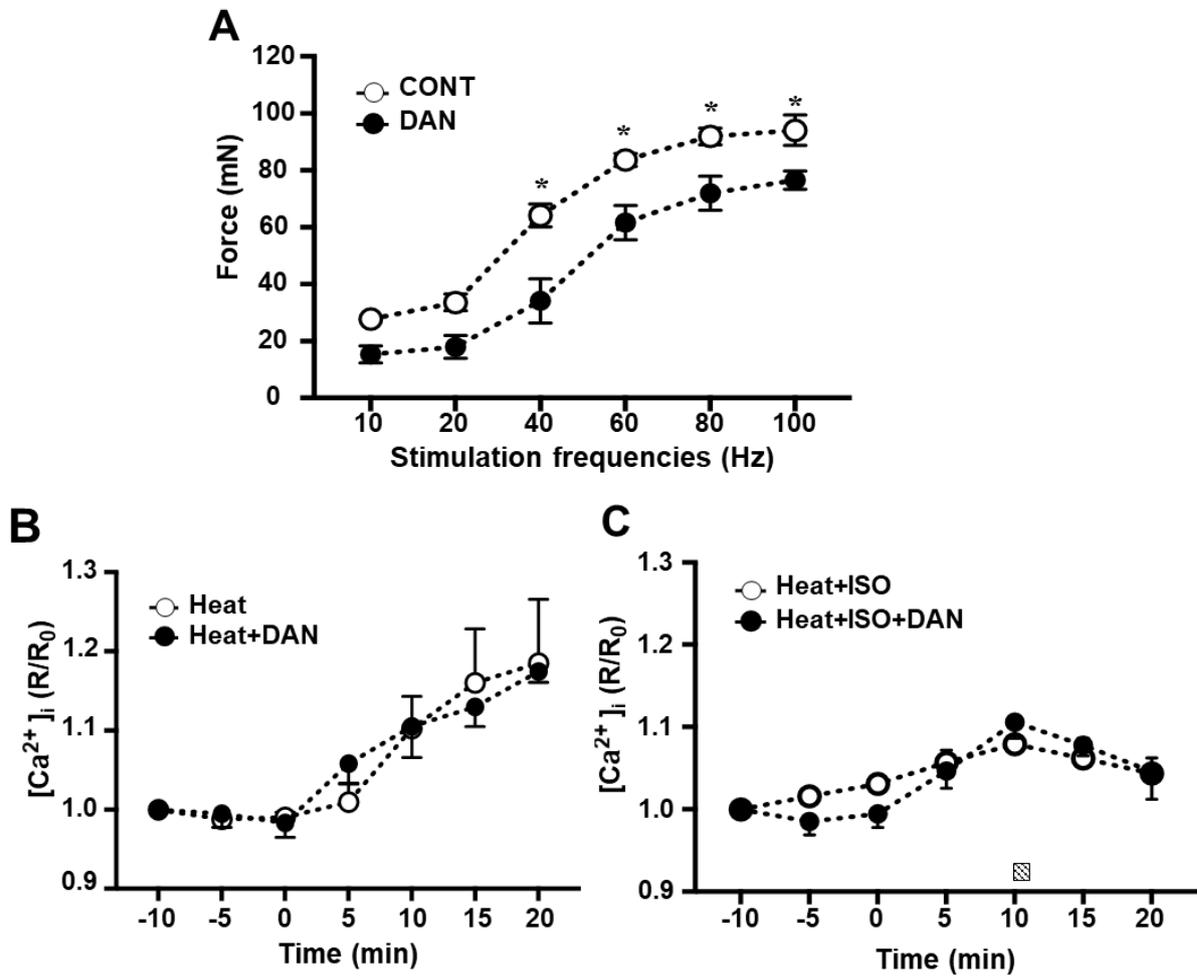


Fig.19 ダントロレンによるリアノジン受容体阻害の影響

A: 10, 20, 40, 60, 80, および 100 Hz の刺激周波数での筋発揮張力に対するダントロレン (DAN) の影響 [コントロール (CONT); n = 5; DAN; n = 3]. B: 熱刺激 (Heat; Fig. 15 と同じデータ) 及び Heat + DAN (n = 5) における Ratio に対する DAN の影響. C: Heat + 等尺性収縮 (ISO; Fig. 18 B と同じデータ) および Heat + ISO + DAN (n = 5) 中の Ratio に対する DAN の影響. 値は平均値 ± 標準誤差を示している. * CONT と DAN の有意差 (P < 0.05).

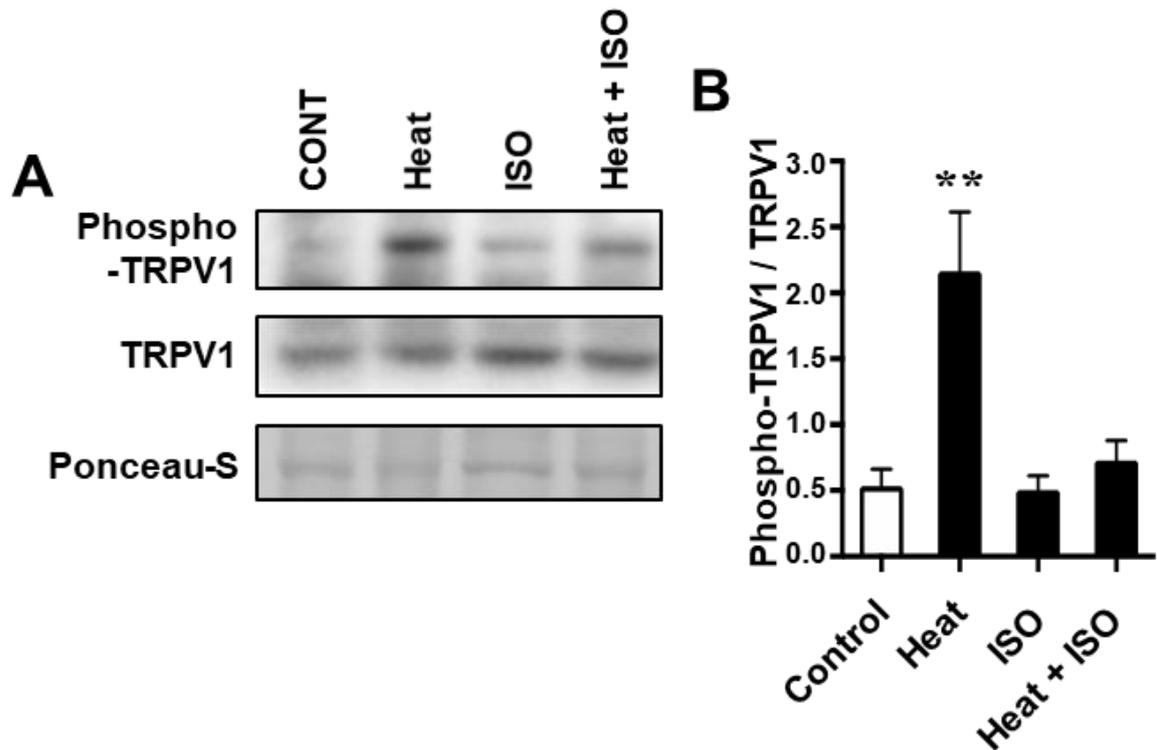


Fig. 20 ウェスタンブロットによる phospho-TRPV1 の定量

A : 対照群 (CONT), 熱刺激群 (Heat), 筋収縮群 (ISO), 熱刺激+筋収縮群 (Heat + ISO) における代表的なバンド画像, B : CONT, Heat, ISO, Heat + ISO における TRPV1 のリン酸化 (各グループ, n = 4). 値は平均値 \pm 標準誤差を示している. * P < 0.05 vs. CONT.

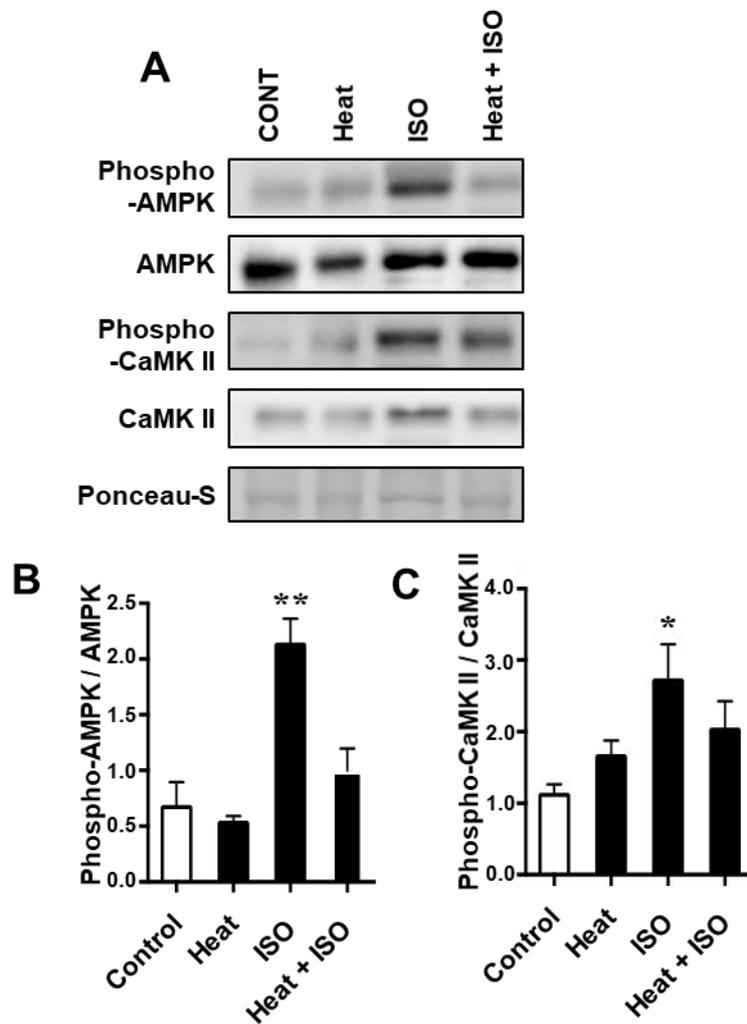


Fig.21 ウェスタンブロットによる phospho-AMPK 及び phospho-CaMKII の定量

A: 対照群 (CONT), 熱刺激群 (Heat), 筋収縮群 (ISO), 熱刺激 + 筋収縮群 (Heat + ISO) における代表的なバンド画像, B: CONT, Heat, ISO, Heat + ISO における AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化, C: Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) のリン酸化 (各グループ n = 4). 値は平均値 ± 標準誤差を示している. * P < 0.05 vs. CONT.

考察

本研究は、血流が保たれている生体内環境下における骨格筋で熱負荷時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ダイナミクスを観察した初めての研究モデルである。主な知見は以下の通りである。1) 40°C の熱刺激は、TRPV1 を介して SR から Ca^{2+} を放出させることにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させる。2) 熱刺激によって誘発される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、等尺性筋収縮によって抑制される。3) 筋収縮は、TRPV1 Ser 800 の脱リン酸化による TRPV1 チャンネルの不活性化を誘発する。これらの結果を総合すると、等尺性収縮による TRPV1 不活化により、筋温が上昇した際でも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 恒常性の維持が可能になることが示唆された。

熱刺激による骨格筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加

本実験で使用された脊柱僧帽筋は、神経や主要な血管を損傷することなく部分的に顕微鏡で観察することが可能である (Bailey *et al.*, 2000; Kindig *et al.*, 2002)。したがって、本研究は安静時の筋組織に見られる血流が、筋収縮及び熱刺激負荷時ともに維持される生体内環境で実施された。血流自体が生体内の温度調節に寄与するため、血流を維持することは熱刺激に対する細胞適応の生理学的研究において非常に重要である。熱刺激下で筋温が深部体温および流入血液の温度を超える場合、筋組織からの熱放散は血流増加によって補助される。興味深いことに、骨格筋の血流は熱刺激自体によって増加する (Heinonen *et al.*, 2011)。

熱刺激負荷による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、TRPV1 の活性化だけでなく、SERCA による Ca^{2+} 取り込みの減衰により生じることが報告されている。具体的に、熱刺激により誘発される SERCA 機能障害は、ミトコンドリアの電子輸送を通じて生成される活性酸素種に起因すると考えられている (van der Poel & Stephenson, 2007)。

しかしながら, Fig. 15 に示すように, TRPV1 の特異的阻害剤である CPZ は, 熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加の大部分を抑制した. したがって, 40°C での SR からの Ca^{2+} 放出は TRPV1 を介しており SERCA による Ca^{2+} 取り込み障害の影響は受けにくいことが示唆された. *in vitro* 実験に基づいて, TRPV1 の活性温度閾値は 40°C (Cao *et al.*, 2013) から 43°C (Caterina *et al.*, 1997) の範囲にあると予想されており, 本研究においては 40°C の熱刺激により TRPV1 の活性化が確認された. 興味深いことに, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は筋線維により異なり, すべての筋線維の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が均一に上昇しないことが明らかとなった (Fig. 16). 現時点では, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 蓄積は筋線維全体で不均一である原因は不明であるが, 筋線維タイプに関係している可能性が考えられる. TRPV1 が発現する SR の体積 (Rall & Woledge, 1990) およびタンパク質組成 (Numazaki *et al.*, 2002) は筋線維タイプに依存する. さらに, 近年ミトコンドリアが Ca^{2+} 緩衝能力において主要な役割を果たしていることが報告されている (Eshima *et al.*, 2017). ミトコンドリア体積密度は筋線維タイプによって異なる. したがって, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の顕著な筋線維間不均一性は, SR ならびにミトコンドリアと関係する筋線維タイプによって影響を受ける可能性がある.

Lotteau ら (Lotteau *et al.*, 2013) はカプサイシン投与後に二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を報告している. このメカニズムについて Lotteau ら (Lotteau *et al.*, 2013) は RyR が TRPV1 由来の Ca^{2+} によって活性化される RyR / TRPV1 クロストークモデルを提唱している. しかしながら, 本研究結果は DAN 負荷によって熱刺激誘発性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が抑制されないことを実証しており (Fig. 19B), 熱刺激誘発性の SR からの Ca^{2+} 放出は RyR ではなく TRPV1 依存性の応答であるという別の仮説を支持する.

筋収縮による TRPV1 媒介性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の阻害

本実験においての重要な側面の 1 つは、筋収縮時を含むプロトコル全体で血流が維持されていることである。したがって、収縮後のわずかな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は、虚血の結果ではない。これまでの研究により、摘出筋において血液供給が遮断された後に見られるような虚血は、それ自体が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる要因であることが実証されている (Sonobe *et al.*, 2008)。

TRPV1 は繰り返される外部刺激に対して応答が小さくなる反応特性、すなわち脱感作を示すことがある。例えば、Capsaicin および熱刺激が繰り返して持続的に TRPV1 に作用した場合、その感受性は初期の応答よりも徐々に減弱することが報告されている (Vyklícky *et al.*, 1999; Mandadi *et al.*, 2006)。本研究結果では、Fig. 17 および 18 に示すように、 40°C の熱刺激が持続している中において、筋収縮は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の蓄積を著しく抑制した。これらの結果は、TRPV1 の温度感受性を低下させる未知のメカニズムの存在を示唆している。Lishko ら (Lishko *et al.*, 2007) は TRPV1 の持続的的刺激に対する脱感作は、 Ca^{2+} 蓄積に依存していると報告している。本研究において、30 秒の等尺性収縮刺激を繰り返し (5 セット)、Protocol 1 でわずかではあるが有意な Ca^{2+} 蓄積を引き起こした (Fig. 17B の 20 分時)。また、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、筋収縮時に一時的に最大 100 倍まで増加する可能性がある (Baylor & Hollingworth, 2011; Gehlert *et al.*, 2015)。このような $[\text{Ca}^{2+}]_i$ トランジェントにより、同時または後続の (Protocol 2) 熱刺激に対する TRPV1 温度感受性が低下する可能性がある。

また、興味深いことに DAN 条件下で低下した収縮張力レベルでさえ、熱刺激誘発性 Ca^{2+} 蓄積の抑制効果を維持し続けた (Fig. 19)。この結果は、低強度の収

縮刺激でさえ熱刺激による Ca^{2+} 蓄積を抑制する可能性が高いことを裏付けている。

TRPV1 のリン酸化に対する筋収縮の影響

TRPV1 のセリン残基の 1 つである Ser 800 のリン酸化は、TRPV1 活性化の重要な制御部位として特定されている (Numazaki *et al.*, 2002)。本実験において、Ser 800 のリン酸化は 40°C の熱刺激により著しく増加した (Fig. 20 A & B)。この結果は、 42°C の熱刺激に 30 分間さらされた培養骨格筋細胞における TRPV1 の Ser 800 残基のリン酸化の増加を報告したこれまでの研究と一致している (Obi *et al.*, 2017)。興味深いことに、筋収縮は熱刺激による Ser 800 のリン酸化を著しく抑制した (Fig. 20 A and B)。これらの結果は、熱刺激によって誘発される Ca^{2+} 蓄積が TRPV1 リン酸化と関連することを示唆している。一方で、TRPV1 活性化後の脱リン酸化は、TRPV1 脱感作のメカニズムの 1 つであると考えられている (Koplas *et al.*, 1997; Piper *et al.*, 1999)。著者の知る限り、筋収縮が TRPV1 脱感作につながることはこれまでに示されていない。骨格筋において、TRPV1 脱感作と Ca^{2+} 蓄積の関係を説明するメカニズムは不明である。ただし、神経細胞における TRPV1 において、 Ca^{2+} / CaM の結合が脱感作を誘発するという知見 (Lishko *et al.*, 2007) は、重要な手がかりを提供する。本研究において筋収縮により CaMKII のリン酸化が有意に増加し (Fig. 21 A and C)、これは、 Ca^{2+} / CaM 上昇を反映し得る (Fong *et al.*, 1989)。したがって、筋収縮による Ca^{2+} / CaM の増加は TRPV1 脱感作を誘発する可能性がある。さらに、最近 AMPK による TRPV1 の負の制御が感覚神経で報告されている (Wang *et al.*, 2018)。したがって、筋収縮によって引き起こされる AMPK リン酸化の増加 (Fig. 21 A and C) が TRPV1 の脱感作に関連する可能性がある。

継続的な筋収縮は、SR機能の低下に起因する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇により筋疲労を誘発する。筋収縮に伴い、筋温は必然的に上昇するため、TRPV1の活性化は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の相乗的な増加に寄与する可能性がある。本研究はTRPV1の脱リン酸化が筋収縮により誘導され、熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が抑制されることを明らかにした。この機序は高温下での筋収縮を維持するために生理学的に重要な機構である。

第2章のまとめ

本研究では、*in vivo* イメージングモデルを使用して、血液循環を維持し、生理的環境下の骨格筋を観察することで、熱刺激及び熱刺激下での筋収縮が筋細胞内 Ca^{2+} 恒常性時に与える影響を明らかにした。検討課題1により、TRPV1を阻害することで熱刺激に起因する Ca^{2+} 蓄積が抑制されることから、熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は主にTRPV1を介して生じることが示された。また、検討課題2により、筋収縮は熱刺激による Ca^{2+} の蓄積を抑制することが実証された。Ser 800に加えて、Ser 116 (Mohapatra & Nau, 2005) 及び Tyr 705 (Li *et al.*, 2014) がTRPV感受性を制御する残基として同定されている。TRPVチャネルファミリー全体の制御メカニズムをさらに解明するために、今後さらなる研究が必要である。熱刺激は、細胞内 Ca^{2+} 動態を調節する主要な要因である。したがって、本研究結果は、暑熱環境下に伴う重度の筋疲労及び温熱療法による筋肉タンパク質合成のメカニズムをより理解するための重要な知見を提供する。

第3章—糖尿病モデルの骨格筋における TRPV1 の特徴

背景

1型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus: T1DM) は筋萎縮及び骨格筋機能低下を誘発する (Cotter *et al.*, 1989; Aughsteeen *et al.*, 2006; Eshima *et al.*, 2013). さらに, $[Ca^{2+}]_i$ を増加させタンパク質分解経路を活性化させる (Baviera *et al.*, 2007; Baviera *et al.*, 2008). $[Ca^{2+}]_i$ の増加は, タンパク質分解だけでなく, 筋機能低下を低下させる重要な要素である (Allen *et al.*, 2008b, a). 2章では Ca^{2+} 透過性を有する TRPV1 の骨格筋における機能を明らかにした. TRPV1 は骨格筋において筋小胞体に局在しており, 40°Cの熱刺激により活性化し筋小胞体から Ca^{2+} を放出させる (Xin *et al.*, 2005; Lotteau *et al.*, 2013; Ikegami *et al.*, 2019). また, TRPV1 の温度感受性は, TRPV1 のリン酸化および脱リン酸化により制御されている (Amadesi *et al.*, 2006; Vellani *et al.*, 2010).

骨格筋における TRPV1 の役割として, TRPV1 の活性化は $[Ca^{2+}]_i$ 依存的に PGC1- α およびミトコンドリア合成を増加させることや, タンパク合成経路を活性化させ骨格筋肥大を促すことが示されている (Amadesi *et al.*, 2006; Vellani *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2013b, a). 一方で, TRPV1 は糖尿病により活性化し, 異痛症 (Hong & Wiley, 2005; Hong *et al.*, 2008; Bishnoi *et al.*, 2011; Khomula *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Pabbidi & Premkumar, 2017), 膀胱機能障害 (Hanna-Mitchell *et al.*, 2013; Sharopov *et al.*, 2018), 微小血管機能障害 (Zhang *et al.*, 2015; Marche *et al.*, 2017), 心筋症 (Marche *et al.*, 2017) 及び骨粗鬆症 (Reni *et al.*, 2016) など様々な病態の要因となることが示されている. また, 炎症状態では軽度の pH の低下や ATP, bradykinin などにより TRPV1 の温度に対する閾値が体温以下

に低下することが知られている (Tominaga *et al.*, 1998; Sugiura *et al.*, 2002; Reni *et al.*, 2016). このように, TRPV1 は生体に様々な影響を与えるが, 糖尿病状態の骨格筋における TRPV1 の機能は明らかにされていない.

骨格筋収縮に使用されるエネルギーは ATP より得られ, その約 70%は熱に変換される (Rall & Woledge, 1990; Reggiani *et al.*, 1997). これまでの研究により, 筋温は持続的に運動を行うと上昇し, 疲労困憊時では筋温が 42°Cを超えることが報告されている (Brooks *et al.*, 1971). 筋温が上昇する際に, 血流は生体内において熱を放散させるラジエーターとして機能している. 実際に骨格筋の血流量は熱刺激により増加する (Heinonen *et al.*, 2011). しかしながら, これまでの研究において糖尿病状態の骨格筋では微小血管の構造や血行動態に障害をきたしていることが報告されている (Sexton *et al.*, 1994; Kindig *et al.*, 1998; Heinonen *et al.*, 2011). したがって, 糖尿病状態の骨格筋では熱刺激の影響を受けやすい可能性がある. 本研究では T1DM 骨格筋では TRPV1 の機能亢進及び熱刺激への虚弱性の結果, 熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が著しく増加すると仮定し検討を行った.

本研究の目的を達成するために、以下の検討課題を設定した。

検討課題 1

熱刺激が糖尿病 (diabete: DIA)骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響を明らかにする。

検討課題 2

DIA 骨格筋における TRPV1 の温度感受閾値を検討する。

検討課題 3

Capsaicin 負荷が DIA 骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響を明らかにする。

方法

被験動物

本実験は Wistar 系雄性ラット (n=74, 10 week of age; Japan SLC, Shizuoka, Japan, 10~15 週齢) を用いた。ラットを2つのグループに分けた：健康なコントロール (CONT) 及び糖尿病 (DIA) ラット。DIA は以前の研究に従って、Streptozocin (STZ) の腹腔内投与により作成した(Eshima *et al.*, 2013)。実験は、STZ 処置から 4 週間後に実施した (>300 mg / dl, blood glucose)。すべてのラットは、室温 23±1 °C、湿度 55±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 (PMI® Nutrition International) と水をそれぞれ自由摂取できる状態で 1 つのゲージ (42 × 26 cm) に 2 匹ずつ飼育した。全ての実験は、電気通信大学動物実験委員会の承認を得たものであり、本学動物実験指針に沿って行われた。ラットは、ペントバルビタールナトリウム (60 mg / kg i.p.) の腹腔内注射により麻酔した。必要に応じて、麻酔は適時追加した。実験終了後、ラットはペントバルビタールナトリウムの過剰投与により屠殺された。

外科的処置

脊柱僧帽筋の処置を含む全ての実験手法は、Sonobe ら (Sonobe *et al.*, 2008) の手法に従って実施された (第2章 方法参照)。

Ca²⁺蛍光指示薬 Fura-2 AM (5 mM; Dojindo Laboratories) は、DMSO (0.4%) と Pluronic F-127 で溶解し、KHB 溶液で最終濃度 20 μM にした。TRPV1 活性化剤として、アゴニストである Capsaicin (CAP: FUJIFLM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を使用した。CAP は DMSO (1%) に溶解させ、KHB 溶液により最終濃度 500 μM に調整したものを表面灌流することにより負荷した。

In vivo イメージング

Fura2-AM を負荷した脊柱僧帽筋をガラスホットプレート (Kitazato, Supply, Shizuoka, Japan) 上に固定した。蛍光顕微鏡による観察方法は第2章に示したものと同様の方法を使用した。筋の観察部位に損傷がなく、血流が保持された状態を確認した。サンプリングエリア (~880×663 μm) は明視野にて、目印となる血管分岐を用いて選択した。340 nm, 380 nm の励起光波長は、蛍光フィルターに備え付けられているキセノンランプを用いて励起した。2対の蛍光画像は、レシオメトリーとして、510 nm の発光波長フィルターを通して観察した。取得された画像は画像解析ソフト NIS-Elements を用いて 340 nm 励起時の画像から 380 nm 励起時の画像を除算処理することで Ratio 画像へと変換した (F_{340}/F_{380} : R)。Ratio 画像をソフトウェアにて数値化し、初期値 (R_0) からの変化率を $[Ca^{2+}]_i$ 動態 (R/R_0) として表した。

実験プロトコル

熱刺激負荷

第2章の検討課題1で示したプロトコルと同様の方法を用い、CONT および DIA ラットの脊柱僧帽筋に熱刺激を負荷した。簡潔に述べると、筋温は筋表面に取り付けられた温度プローブ (BAT-10: Physitemp Instruments, Clifton, NJ) を使用して測定した。10分間の安静時筋温 (30°C) の後、各条件 (CONT 30°C, CONT 40°C, DIA 30°C, DIA 40°C及び DIA 45°C) を20分間維持した。また、体温を独立して維持するためにラットの体を別のホットプレート (37°C) 上に設置した。表筋温は連続的に測定され、値は5分間隔の平均を示した。

Capsaicin 負荷

10分間の安静時筋温 (30°C) の後、各条件 [CONT CAP (500 μ M) 及び DIA CAP (500 μ M)] を20分間維持した。KHB 及び CAP は筋の乾燥を防ぐために断続的に灌流させた。

Western Blot

TRPV1 および Phospho-TRPV1 タンパク質の定量は各条件を負荷した CONT 及び DIA の脊柱僧帽筋を用いて、第2章の検討課題3で示したプロトコルに従って実施した。

統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表記した。統計統計解析は Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) 用いて実施した。[Ca²⁺]_i 定量対して two-way ANOVA と Bonferroni post hoc test を実施した。また TRPV1 のリン酸化の定量に対しても同様に two-way ANOVA と Bonferroni post hoc test を実施した。有意水準は P < 0.05 とした。

結果

検討課題 1

熱刺激が DIA 骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響

CONT 40°C及び DIA 40°Cにおいて、表面筋温は 10 分以内に目標温度である 40°C以上に達し、20 分まで維持された (Fig. 22)。一方で、CONT 30°C及び DIA 30°Cの表面筋温は実験全体を通じて 30°Cに維持された (Fig. 22)。

CONT 30°C, DIA 30°C及び DIA 40°Cにおいて 20 分間の観察期間中に Ratio の有意な変化は観察されなかった。対照的に、CONT 40°Cは 10 分以降で Ratio が有意に上昇し 20 分でベースラインの $12.9 \pm 6\%$ に増加した (Fig. 24)。

Fig. 25 は TRPV1 総タンパク質の発現を示している。TRPV1 の発現は、CONT と比較して DIA で $27.6 \pm 7\%$ 減少した。Fig.26 は、各条件 (CONT 30°C, CONT 40°C, DIA 30°C及び DIA 40°C) の 20 分時点での TRPV1 リン酸化を示している。CONT 40°Cにおいて TRPV1 リン酸化が増加した ($P < 0.05$ vs CONT)。対照的に、DIA 条件は熱刺激による TRPV1 リン酸化を阻害した。

検討課題 2

DIA 骨格筋における TRPV1 の温度感受閾値の検討

DIA 45°Cにおいて表面筋温は 10 分以内に 45°Cに達し、20 分まで維持した (Fig. 27 B)。DIA 45°Cは、10 分以降で Ratio が有意に上昇し 20 分でベースラインの $41.8 \pm 11\%$ に増加した (Fig. 27 B)。

DIA 45°Cにおける TRPV1 のリン酸化は DIA 30°C及び DIA 40°Cと比較し有意差は認めなかった (Fig. 28)。

検討課題3

Capsaicin 負荷が DIA 骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響

Fig. 29 は CONT 及び DIA に対する Capsaicin 負荷時の Ratio の経時変化を示している。CONT における Ratio は初期値と比較し Capsaicin 負荷から 10 分の時点で $15.9 \pm 2.3\%$ 上昇し、その後 10 分間プラトーな値を維持した。一方、DIA における Ratio は初期値と比較し Capsaicin 負荷から 10 分の時点で $21.4 \pm 3.9\%$ 、20 分の時点で $29.9 \pm 1.3\%$ 上昇した。

Fig. 30 は、CONT 及び DIA における Capsaicin 負荷から 20 分時点での TRPV1 リン酸化を示している。CONT 及び DIA の両群で TRPV1 のリン酸化が低下した。

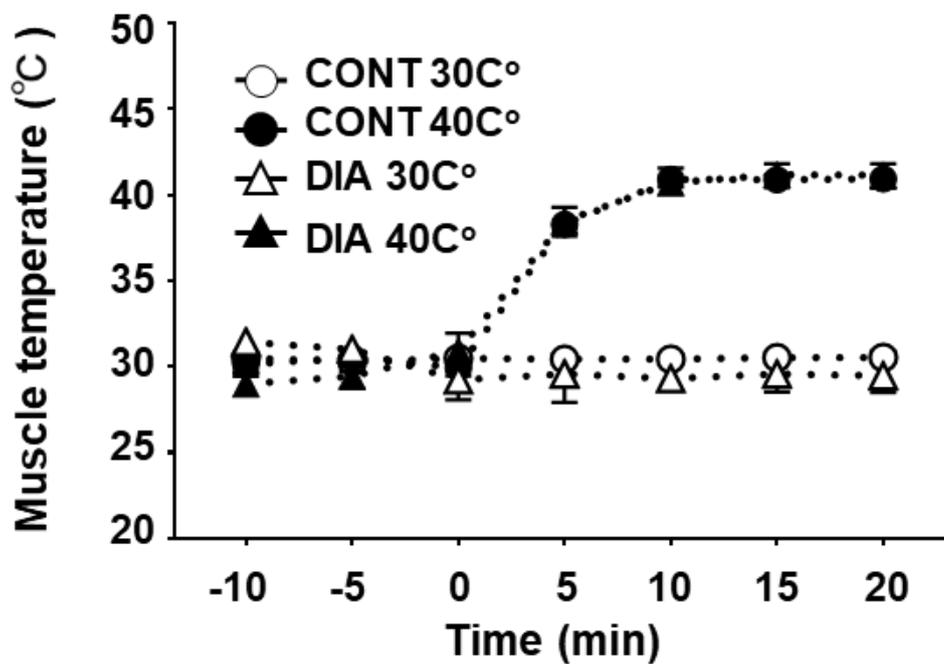


Fig. 22 筋表面温度の変化

各群における表面筋温の変化 [対照群 30°C (CONT 30°C : n = 10), 対照群 40°C (CONT 40°C: n = 10), 糖尿病 30°C (DIA 30°C: n = 3) 及び糖尿病 40°C (DIA 40°C: n = 7)]. 筋表面温度は筋表面に設置した温度プローブにより連続的に計測し、5分毎の平均値として示した。値は平均値 ± 標準誤差を示している。

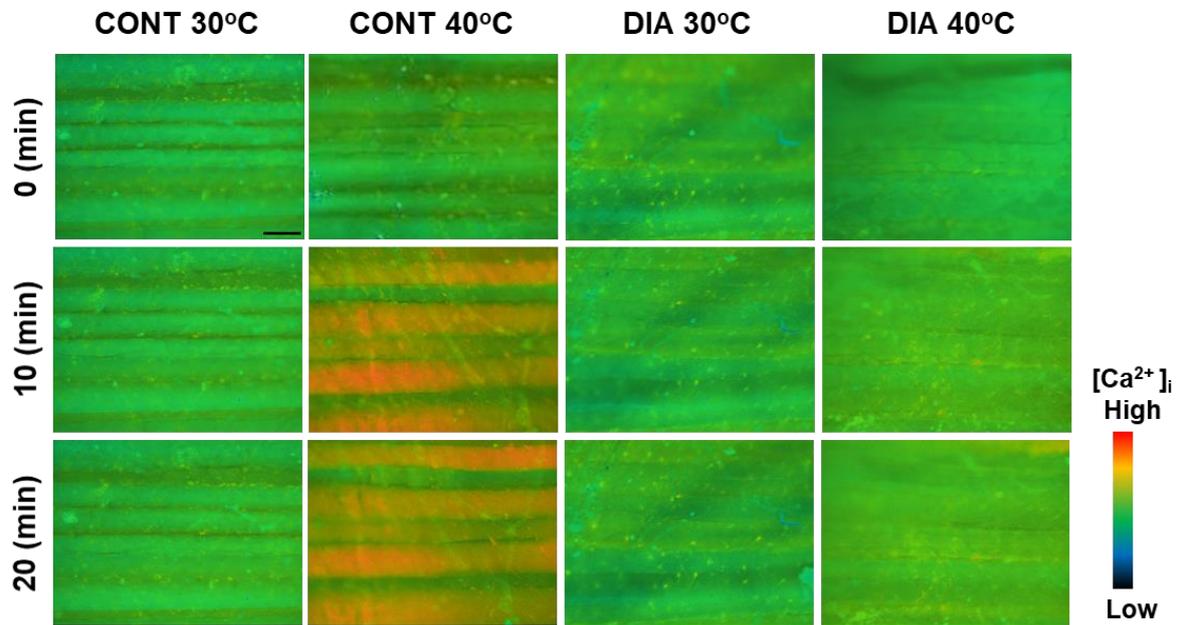


Fig. 23 生体内環境下のラット脊柱僧帽筋における熱刺激負荷による筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の代表例

対照群 30°C (CONT 30°C), 対照群 40°C (CONT 40°C), 糖尿病 30°C (DIA 30°C) 及び糖尿病 40°C (DIA 40°C) における 0 分から 20 分までの代表的な蛍光画像。疑似カラーは色が赤くなるほど Ca^{2+} が蓄積していることを示している (Bar = 100 μ m).

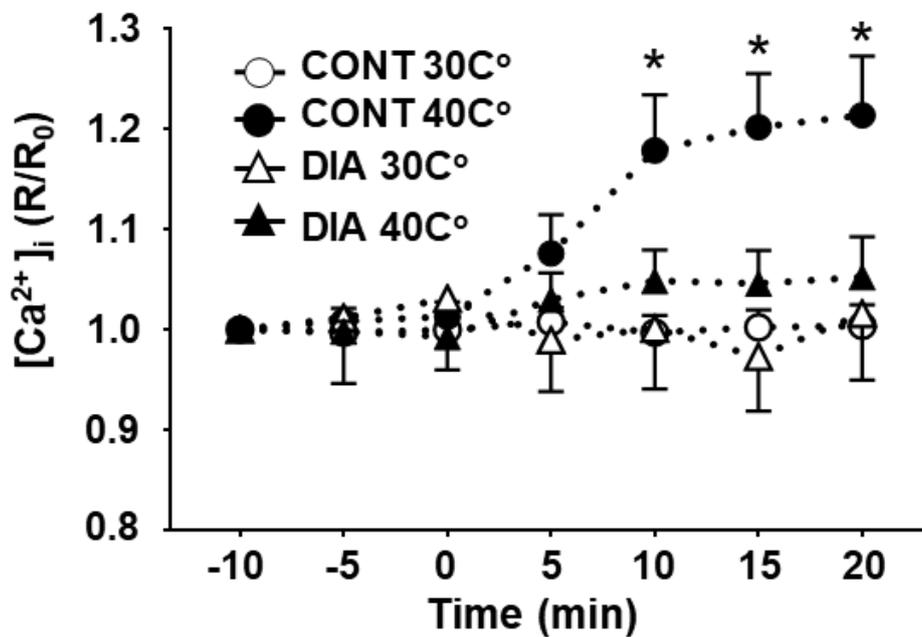


Fig. 24 筋細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する熱刺激条件の影響

各群における熱刺激負荷中の Ratio 動態 [対照群 30°C (CONT 30°C : n = 14), 対照群 40°C (CONT 40°C: n = 10), 糖尿病 30°C (DIA 30°C: n = 3) 及び糖尿病 40°C (DIA 40°C: n = 7)]. Ratio は 5 分間の測定間隔で連続的に測定した. Ratio 値は安静時 (-10 分) レベル (R_0) からの変化として示した. 値は平均値 \pm 標準誤差を示している. *各条件の初期レベル (R_0) との有意差 ($P < 0.05$).

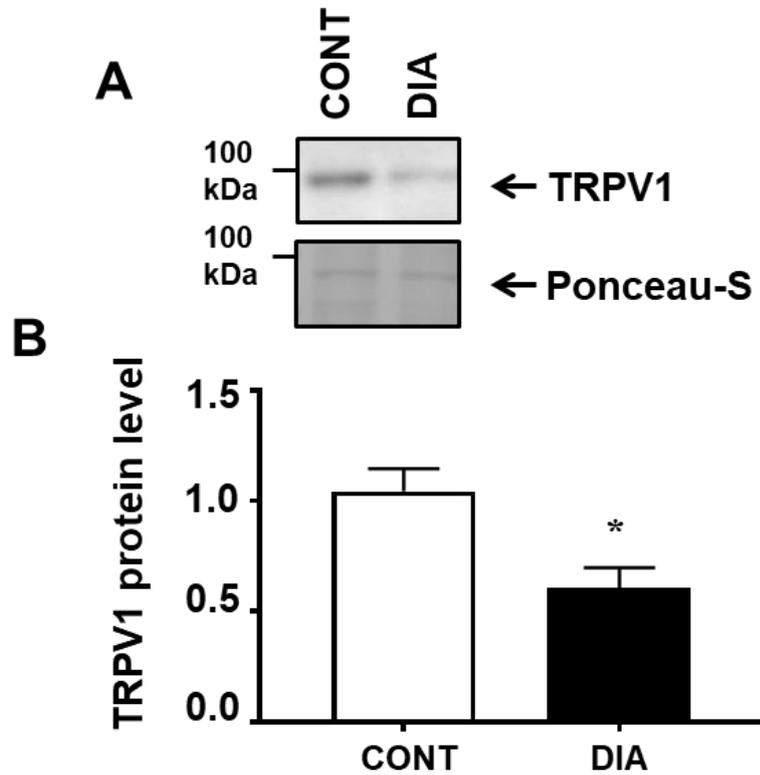


Fig. 25 糖尿病モデルの TRPV1 の変化

A : 対照群 (CONT) 及び糖尿病群 (DIA) における代表的なバンド画像, B : CONT 及び DIA における TRPV1 のタンパク量 (各群 n = 6). データは相対値として表しており, CONT を基準値 (1.0) とした. 値は平均値 \pm 標準誤差を示している. * P < 0.05 vs. CONT.

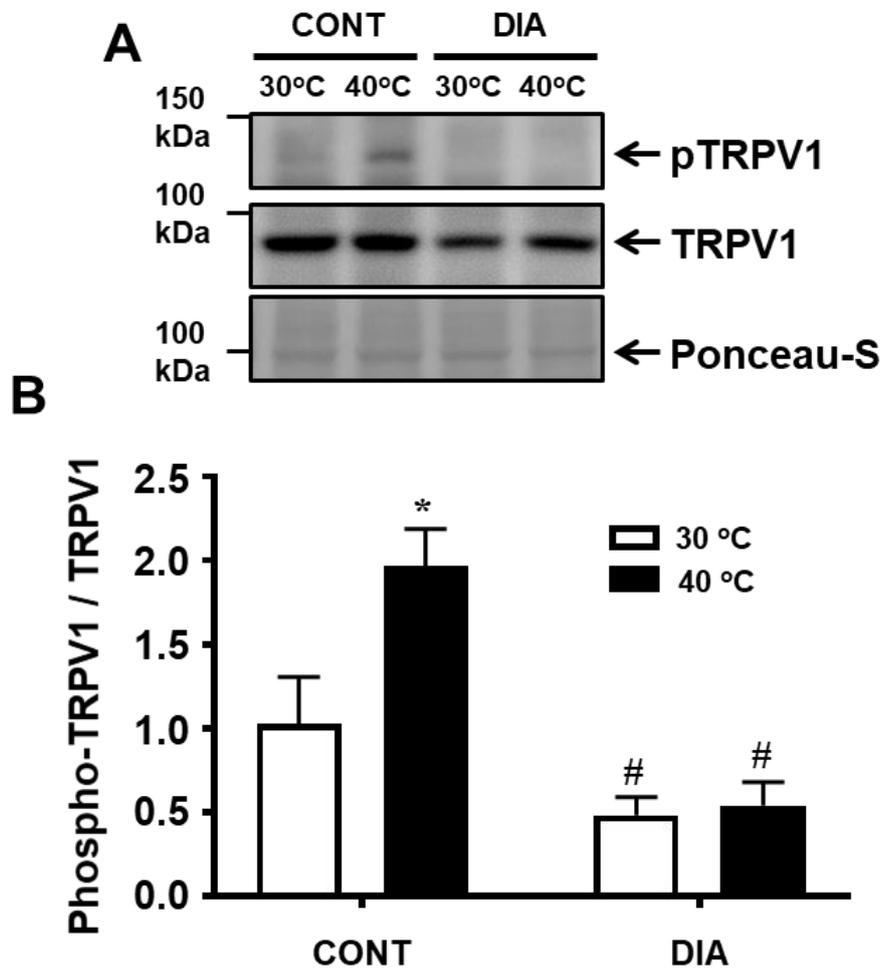


Fig.26 熱刺激後の phospho-TRPV1 の変化

A : 各群における代表的なバンド画像, B : 各群における TRPV1 のリン酸化 [対照群 30°C (CONT 30°C: n = 6), 対照群 40°C (CONT 40°C: n = 6), 糖尿病 30°C (DIA 30°C: n = 7) 及び糖尿病 40°C (DIA 40°C: n = 7)]. データは相対値として表しており, CONT を基準値 (1.0) とした. 値は平均値 ± 標準誤差を示している.

* P < 0.05 vs. CONT 30°C, # P < 0.05 VS, CONT 40°C.

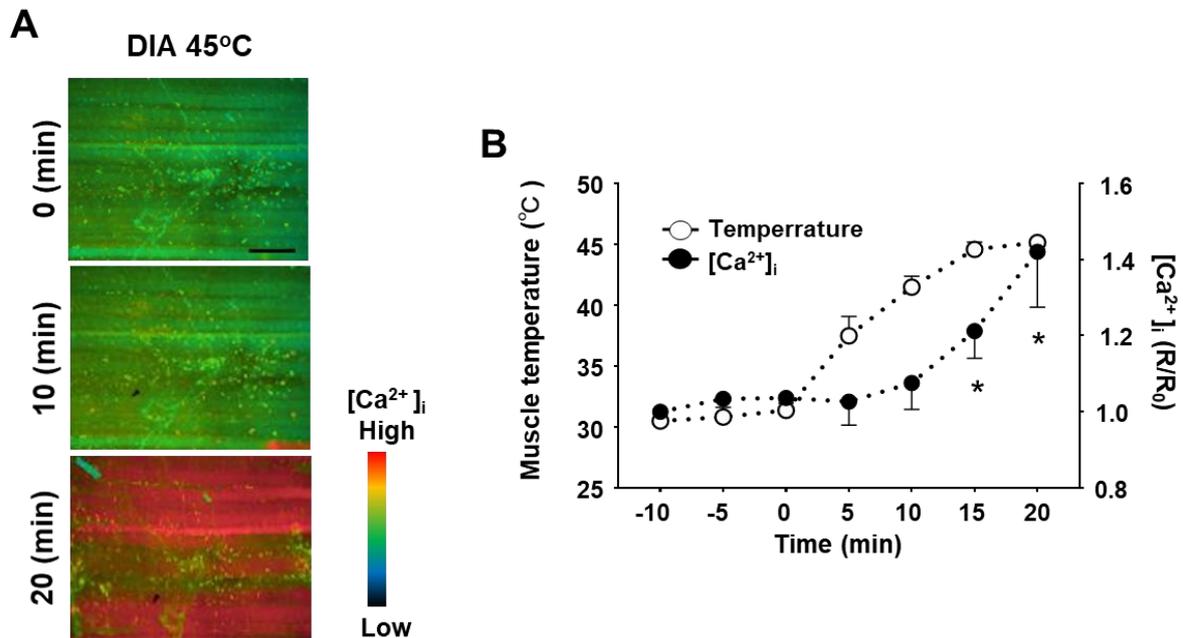


Fig. 27 糖尿病 45°C負荷モデルの筋表面温度の変化及び[Ca²⁺]_iの変化

A: 糖尿病 45°C負荷群 (DIA 45°C) における 0分から20分までの代表的な蛍光画像。疑似カラーは色が赤くなるほどCa²⁺が蓄積していることを示している。

B: DIA 45°Cにおける熱刺激負荷時のRatio及び表面筋温の変化 (n=4)。Ratioは5分間の測定間隔で連続的に測定した。Ratio値は安静時(-10分)レベル(R₀)からの変化として示した。また、筋表面温度は筋表面に設置した温度プローブにより連続的に計測し、5分毎の平均値として示した。値は平均値 ± 標準誤差を示している。*各条件の初期レベル(R₀)との有意差(P<0.05)。

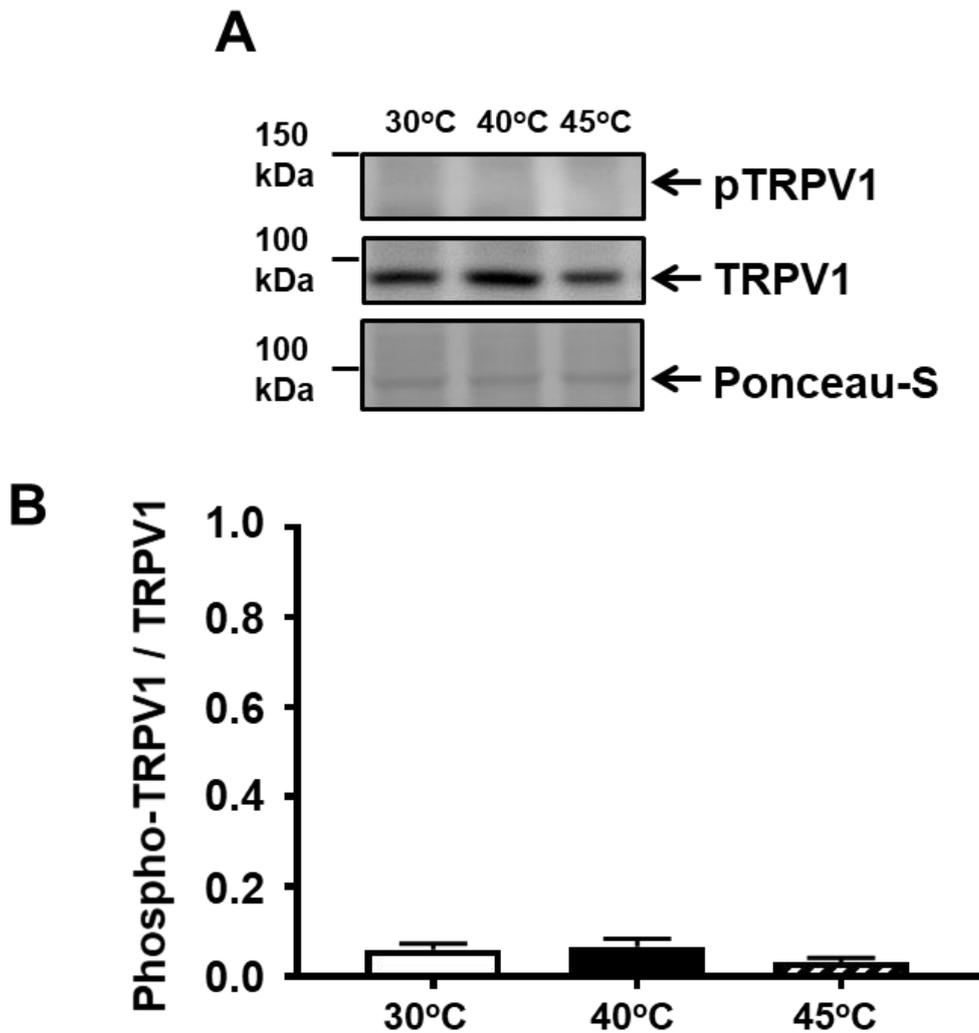


Fig. 28 糖尿病モデル骨格筋における異なる熱刺激温度と phospho-TRPV1 変化
 A: 代表的なバンド画像, B: 糖尿病 (DIA) に対する各温度負荷時の TRPV1 リン酸化 (DIA 30°C n = 7, DIA 40°C n = 7 及び DIA 45°C n = 5). DIA 30°C及び DIA 40°Cは Fig. 26 と同データ. 値は平均値 ± 標準誤差を示している.

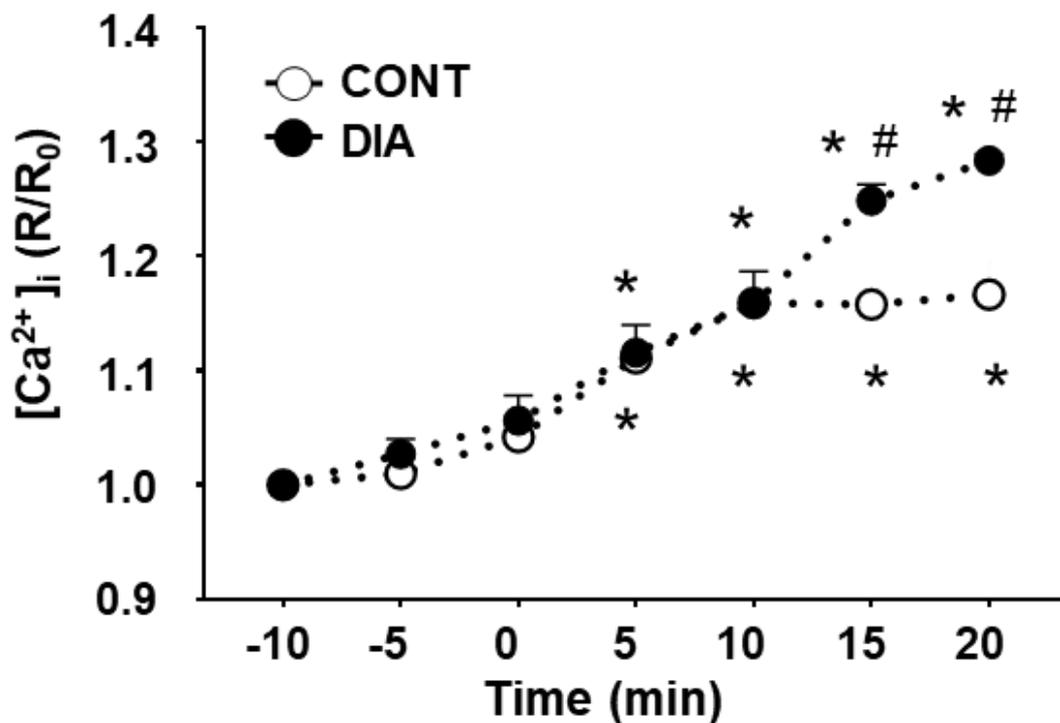


Fig. 29 筋細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する Capsaicin の影響

対照群 (CONT: n = 7) 及び糖尿病群 (DIA: n = 4) における Capsaicin 負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態. $[Ca^{2+}]_i$ は 5 分間の測定間隔で連続的に測定した. Ratio 値は安静時 (-10 分) レベル (R_0) からの変化として示した. 値は平均値 \pm 標準誤差を示している. * P < 0.05 vs. 0min, # P < 0.05 vs, CONT.

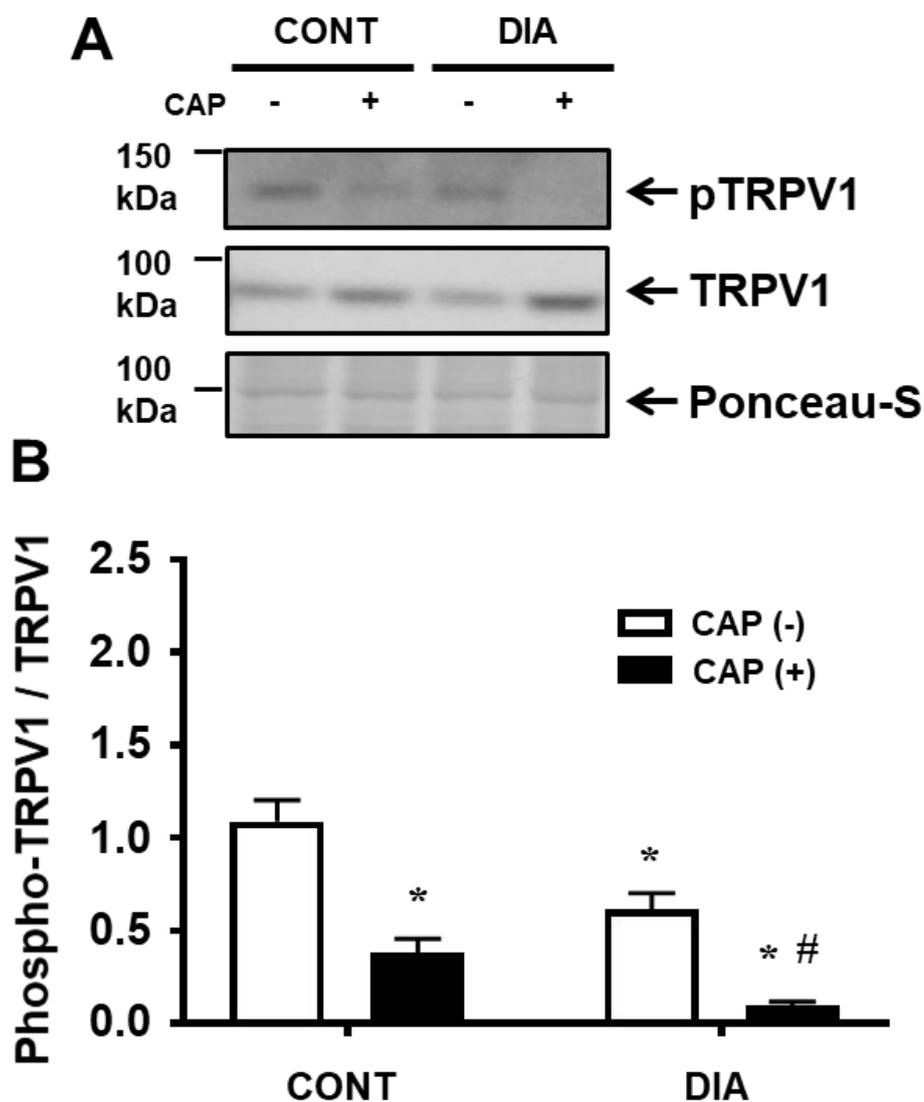


Fig. 30 Capsaicin 負荷時の phospho-TRPV1 の変化

A : 対照群 (CONT) 及び糖尿病 (DIA) における代表的なバンド画像, B : CONT 及び DIA に対する Capsaicin 負荷時の TRPV1 リン酸化 (各群 n=5). データは相対値として表しており, CONT CAP(-) を基準値 (1.0) とした. 値は平均値 ± 標準誤差を示している. * P<0.05 vs. CONT CAP(-), # P<0.05 VS, DIA CAP (-).

考察

本研究は、生体内環境下で STZ 誘発性糖尿病モデル骨格筋における熱刺激負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態及び TRPV1 の温度感受性を初めて明らかにしたものである。主な知見は以下の通りである。1) CONT が 40°C の熱刺激により TRPV1 活性化し $[Ca^{2+}]_i$ が増加するのに対して、DIA では 40°C の熱刺激において $[Ca^{2+}]_i$ に変動は見られない。2) DIA では TRPV1 のタンパク量と熱刺激によるリン酸化量が減少している。3) Capsaicin 負荷では、熱刺激と異なり $[Ca^{2+}]_i$ が CONT と比較して DIA で有意に増加した。これらの結果を統合すると、糖尿病状態の骨格筋では、TRPV1 のタンパク量及び熱感受性が低下しており、健常モデルと比較して熱刺激に対する細胞応答が減弱していることが明らかとなった。

熱刺激負荷による $[Ca^{2+}]_i$ 変化

糖尿病における TRPV1 の機能は後根神経節 (DRG) を中心に研究されてきた。これまでの研究により、糖尿病性神経症は TRPV1 の機能亢進と関連していることが示されている (Hong & Wiley, 2005; Hong *et al.*, 2008; Bishnoi *et al.*, 2011; Khomula *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Pabbidi & Premkumar, 2017)。具体的に、Hong と Wiley (Hong & Wiley, 2005) は、STZ 投与 4 週後のラット神経細胞において、対照群と比較して Capsaicin 誘発性電流が増加していることを報告している。また、Pabbidia ら (Pabbidi & Premkumar, 2017) は、STZ 誘発性糖尿病マウスにおいて、STZ 処置から一週間後に熱に対する逃避行動が亢進していることを報告している。さらに、Cui ら (Cui *et al.*, 2014) は STZ 誘発性糖尿病ラットにおいても、STZ 処置から 7 日から 28 日において熱に対する逃避行動が亢進していることを明らかにしている。これらの研究とは対照的に、本研究において STZ 処置

から14日後の糖尿病ラット骨格筋は40°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ 変化を認めなかった (Fig. 23, 24). さらに, DIA では CONT と比較し $[Ca^{2+}]_i$ が増加する温度閾値が異なり, 45°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が増加した (Fig. 27). これらの結果は, 糖尿病モデル骨格筋は熱刺激に対して反応性が低下していることを示唆している.

Capsaicin 負荷による $[Ca^{2+}]_i$ 変化

興味深いことに, 本研究において DIA は40°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が変化しなかった一方で, TRPV1 のアゴニストである Capsaicin 負荷により $[Ca^{2+}]_i$ が増加した (Fig. 29). この結果は, DIA 骨格筋の TRPV1 において, 熱刺激に対する感受性が低下しているが, アゴニストに対する感受性は残存していることを示している. また, DIA では CONT と比較し Capsaicin 負荷から10分以降で $[Ca^{2+}]_i$ が有意に増加した. $[Ca^{2+}]_i$ は SR からの Ca^{2+} 放出と SR 及びミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みの差により決定される. 前述した通り, STZ 誘発性糖尿病ラットの GRG ニューロンにおいてカプサイシンによる電流が増加することが示されている (Hong & Wiley, 2005). 一方で, Eshima ら (Eshima *et al.*, 2013) は STZ 誘発性ラットの骨格筋においてミトコンドリアの機能障害により Ca^{2+} 緩衝能力が低下しており, その結果として筋収縮後の $[Ca^{2+}]_i$ が CONT と比較し DIA で増加することを報告している. 本研究において, Capsaicin 負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ が DIA で高値であった根本的な原因は不明であるが, TRPV1 の過剰な活性化及び Ca^{2+} 取り込み障害の両方が関与している可能性がある.

糖尿病における TRPV1 のタンパク量及びリン酸化量の変化

TRPV1 の活性はリン酸化及び脱リン酸化により調節される。TRPV1 の Ser 800 残基は、活性化反応の重要な制御部位として特定されている (Numazaki *et al.*, 2002)。TRPV1 の Ser 800 残基がリン酸化されるとチャネルの開口率が増加する (Vellani *et al.*, 2001)。実際に、STZ 誘発性糖尿病モデルの DRG では TRPV1 のリン酸化が増加していることが報告されている (Hong & Wiley, 2005)。本研究において、CONT では先行研究と同様に 40°C の熱刺激により TRPV1 のリン酸化が増加した (Obi *et al.*, 2017; Ikegami *et al.*, 2019)。対照的に、DIA は CONT と比較して TRPV1 の総タンパク量の低下だけでなく熱刺激による TRPV1 のリン酸化も低下していた (Fig. 25 and 26)。第2章において、骨格筋において TRPV1 のリン酸化の低下が TRPV1 を介した Ca^{2+} 流入を抑制することを確認した。したがって、DIA は TRPV1 リン酸化低下により熱刺激負荷時に $[Ca^{2+}]_i$ が変化しなかった可能性がある。また、本研究において DIA は 45°C の熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の増加を認めたと、TRPV1 のリン酸化に有意差は認めなかった (Fig. 28)。したがって、DIA における 45°C での $[Ca^{2+}]_i$ 増加は TRPV1 以外の要因によるものであることが示唆された。

また、Capsaicin 刺激において、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を認めたにも関わらず CONT 及び DIA 共に TRPV1 Ser 800 でのリン酸化が減少した。Mandadi ら (Mandadi *et al.*, 2006) は、TRPV1 Ser 800 が Capsaicin 刺激によりリン酸化される部位ではないことを報告している。Capsaicin による TRPV1 活性化に関連する残基として、Thr 550 及び Tyr 511 が知られている。しかしながら、これらの残基のリン酸化を標識する抗体は現在作成されていない。したがって、Western Blot により Capsaicin 負荷時の TRPV1 リン酸化を定量することは困難であり、多くの研究はパッチク

ランプ法や、 Ca^{2+} イメージングにより Capsaicin 負荷時の TRPV1 活性を評価している。

第3章のまとめ

本研究では、*in vivo* イメージングを用い、血液循環を保ち生体内環境下の STZ 誘発性糖尿病モデルの骨格筋における熱刺激に対する TRPV1 の機能を明らかにした。本研究により、STZ 誘発性糖尿病の骨格筋における TRPV1 は 40°C の熱刺激負荷時に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が変動しないこと及び 40°C の熱刺激により TRPV1 のリン酸化が誘発されないことが証明された。さらに、DIA では熱刺激による TRPV1 活性化が抑制されているにも関わらず、Capsaicin のアゴニストに対する活性は維持されていることが示された。Laursen ら (Laursen *et al.*, 2016) は、暑熱環境下で生活する哺乳動物の TRPV1 (DRG ニューロンを単離した実験系) おいて、温度感受性のみが低下し、化学的刺激 (Capsaicin) に対する感受性は維持されていることを示している。この結果は、TRPV1 が細胞環境に柔軟に適応した結果であると考えられている。本研究結果も同様に、循環障害により熱放散機能の低下した糖尿病状態の骨格筋において、TRPV1 が細胞環境に適応したものであるかもしれない。

TRPV1 の活性化は前述したように糖尿病性神経症に関連する。一方で、近年、TRPV1 は骨格筋の形態及び機能を改善させる可能性が示されており、筋萎縮や筋機低下に対する新たな治療標的となることが期待されている。具体的には、これまでの研究により、TRPV1 は活性化することにより骨格筋肥大やミトコンドリアの新生に関与することが示されている (Luo *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2013b, a)。したがって、糖尿病モデル骨格筋における TRPV1 の機能を明らかにすることは、糖尿病における筋萎縮やその治療法に新たな知見を提供する。

本研究は STZ 誘発糖尿病動物を用いて行った。Johnston ら (Johnston *et al.*, 2007) は、STZ の直接作用 (すなわち高血糖とは無関係) が筋線維の成長に影響を及ぼすことを示した。糖尿病と骨格筋における TRPV1 の機能をより明確にするために、1 型糖尿病や 2 型糖尿病モデルなどによる代替モデルを検討することも必要であるかもしれない。

第4章—統括及び議論

本研究で得られた知見のまとめ

本研究の目的は、熱刺激時の骨格筋細胞内 Ca^{2+} 動態及び骨格筋における TRPV1 の役割を明らかにすることであった。以下に第1章から第3章より得られた知見を簡潔にまとめる。

第1章—先行研究のまとめ

Ca^{2+} による骨格筋機能及び形態制御及び熱刺激が骨格筋に与える影響を中心に、これまで得られている筋生理学領域の知見を中心に概説した。

第2章—熱刺激が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響

骨格筋に対する熱刺激の影響を検討した研究は、培養細胞や摘出筋など生体外環境下で行われてきた。血流は筋温を調整する重要な要素であるため、熱刺激が骨格筋に与える影響は生体内環境下と生体外環境下では異なる可能性がある。本研究は、血流が保たれている生体内環境下における骨格筋で熱負荷時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を初めて観察したものである。

第2章の前半では、熱刺激が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響を検討した。その結果、熱刺激は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させることが明らかにされた。また、この熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の要因は、TRPV1を介したSRからの Ca^{2+} 放出が主であることが示された。さらに、熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は、筋収縮により抑制されることが示された。

また、DAN負荷によりRyR受容体とTRPV1の関係性を検討した。その結果、RyR受容体とTRPV1の相互作用は認められなかった。この結果により、熱刺激負荷時の Ca^{2+} 放出にRyR受容体は関与せず、TRPV1からの Ca^{2+} 放出が主であることが示唆された。さらに、RyR受容体を阻害し、筋発揮張力が低下した状態の

筋収縮により熱刺激負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ 増加は抑制された。したがって、本実験で使
用した収縮刺激以下の低強度の収縮刺激でも熱刺激負荷時の $[Ca^{2+}]_i$ 増加は抑制
される可能性がある。

第2章の後半では、熱刺激負荷時の TRPV1 リン酸化を主に検討した。その結
果、TRPV1 のリン酸化は、熱刺激により増加し、筋収縮により熱刺激負荷によ
るリン酸化は抑制された。さらに、CaMKII のリン酸化は筋収縮及び筋収縮+筋
収縮群において増加傾向であった。CaMKII は一度活性化すると自己リン酸化す
るため、CaM / Ca^{2+} 量を必ずしも反映しない。しかしながら、CaM / Ca^{2+} が存在
しなければ CaMKII は活性化しないため、CaMKII のリン酸化は一過性に CaM /
 Ca^{2+} が増加したことを示唆している。一方で、一過性に増加した CaM / Ca^{2+} が
TRPV1 に結合した場合、その作用時間や TRPV1 の開口率をどの程度抑制させる
かは明らかにされていない。また、CaMKII 自体は TRPV1 の Ser 800 とは別の部
位をリン酸化させるキナーゼである。したがって、CaMKII リン酸化の結果は
CaM / Ca^{2+} による TRPV1 の不活性化を直接的に説明するデータではない。ま
とめると、第2章では、筋収縮が TRPV1 を不活性化し、熱刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 恒
常性を維持することを明らかにした。筋収縮と TRPV1 のリン酸化は関連するが、
その詳細なメカニズムは今後の検討課題である。

第3章—糖尿病モデルの骨格筋における TRPV1 の特徴

TRPV1 は糖尿病における様々な合併症に関連する。これまでの研究において
糖尿病状態が TRPV1 に与える影響は、主に神経細胞を用いて検討されてきた。
本研究は、生体内環境下で STZ 誘発性糖尿病モデル骨格筋における熱刺激負荷
時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態及び TRPV1 の温度感受性を初めて明らかにした。

第3章の前半では、STZ 誘発性糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に対する熱刺激の影響を検討した。その結果、糖尿病モデル骨格筋では40°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が変化せず、45°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが明らかにされた。さらに、糖尿病モデル骨格筋では熱刺激負荷時(40°Cもしくは45°C刺激)にTRPV1のリン酸化が認められなかった。したがって、45°Cの熱刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はTRPV1を介したものでないことが示された。45°Cの熱刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇するメカニズムは本研究では明らかにされていない。40°Cの刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が筋線維毎に異なるのに対し、45°Cの刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はすべての筋線維で均一であった。したがって、45°Cの刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はチャンネルを介したものではなく、細胞膜の損傷など細胞外からの Ca^{2+} 流入が関与している可能性がある。

第3章後半では、STZ 誘発性糖尿病モデル骨格筋の $[Ca^{2+}]_i$ に対するCapsaicin負荷の影響を検討した。その結果、糖尿病モデル骨格筋では熱刺激負荷時とは対照的に $[Ca^{2+}]_i$ がCapsaicinによって増加することが明らかとなった。TRPV1はCapsaicinと熱を感知する部位が異なることがこの結果をもたらした可能性がある。また、糖尿病モデルは対照群と比較してCapsaicin負荷により有意に $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。しかしながら、糖尿病モデルではTRPV1のタンパク量が低下している。これらの結果を統合すると、糖尿病モデルでは、TRPV1の機能が增強しているのではなく、 Ca^{2+} 緩衝能力低下の結果対照群と比較して $[Ca^{2+}]_i$ が増加した可能性がある。まとめると、糖尿病モデル骨格筋におけるTRPV1は、熱に対する感受性が特異的に低下していることが示唆された。

まとめ

第2章及び第3章の知見を統合すると、TRPV1は細胞内の Ca^{2+} 恒常性を保つために、その活性化レベルを変化させる可能性が示された。具体的に、第2章の熱刺激+筋収縮モデル実験において、熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は抑制された。さらに、第3章の糖尿病モデルに対する熱刺激負荷実験において、糖尿病により熱刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は抑制された。筋収縮時は一過性に細胞質内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する。また、糖尿病モデル骨格筋はミトコンドリアの機能障害により Ca^{2+} 緩衝能力が低下し、健常モデルと比較して Ca^{2+} が蓄積しやすい (Eshima *et al.*, 2013)。このように $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇するような刺激や細胞環境において、TRPV1は不活性化され、結果として Ca^{2+} 恒常性が保たれることが示唆された。 Ca^{2+} は細胞質内において筋収縮・弛緩及びタンパク合成・分解を制御するセカンドメッセンジャーとして機能するため、TRPV1の活性化ならびに不活性化は、筋機能及び筋形態に影響を与えるイオンチャネルとして重要な役割を持つことが考えられる。

本研究の学術的位置づけ

筋機能との関連

これまでに、熱刺激が骨格筋に与える影響は主に筋発揮張力など骨格筋のパフォーマンスに着目して研究が展開されてきた。しかしながら、骨格筋の収縮・弛緩を制御する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に熱刺激が与える影響については十分理解されていない。本研究では、「神経細胞におけるTRPV1は熱刺激により活性化し Ca^{2+} を細胞内に流入させる」という先行研究に着想を得て、生体内環境下の骨格筋において同

様の現象が生じるか検討した。本研究は初めて生体内環境下の骨格筋において熱刺激が $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響を解明しただけでなく、筋収縮刺激により TRPV1 が抑制され、その結果として熱刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の増加が抑制されることを明らかにした。筋収縮により TRPV1 が抑制されることは、これまでに生体内環境下及び生体外環境下のすべての先行研究において明らかにされていない。本研究結果は、TRPV1 の細胞内 Ca^{2+} 恒常性を調節する新たなメカニズムを解明した。これは暑熱環境下での筋機能を維持するための合目的的な機構として重要な発見であると考えられる。

病態モデルとの関連

TRPV1 は糖尿病の多くの合併症と関連する。糖尿病の代表的な合併症 (3 大合併症) として、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症及び糖尿病性腎症が挙げられる。この中で、特に糖尿病性神経症における TRPV1 の役割が多く研究されてきた。また 3 大合併症以外に、糖尿病は筋萎縮や骨格筋機能低下を誘発する代表的な因子である。これまでの研究において糖尿病が TRPV1 の機能に影響を与え、様々な病態に関連することは明らかにされている。しかしながら、骨格筋の TRPV1 に対する糖尿病の影響はこれまで明らかにされていない。本研究は STZ 誘発性糖尿病モデルを使用し、糖尿病モデル骨格筋における TRPV1 の機能を初めて明らかにした。先行研究において、STZ 処置から 4 週間後の DRG ニューロンにおいて、TRPV1 の膜発現が有髄線維 (A) において増加し、無髄線維 (C) において減少していること (Hong & Wiley, 2005) や、TRPV1 タンパク質と活動電位が増加していること (Pabbidi *et al.*, 2008) が特徴づけられてきた。骨格筋においては、本研究が STZ 処置から 4 週間後、TRPV1 の発現量は低下するとともに熱刺激に対する感受性も減弱することを明らかにした。このような糖尿病モデ

ル骨格筋における TRPV1 の特徴は、糖尿病が誘発する骨格筋機能低下や筋萎縮を解明する上で重要な手がかりとなり得る知見である。

将来の展望

本研究は、熱刺激負荷時の骨格筋細胞内 Ca^{2+} を TRPV1 に着目して明らかにした。近年、熱刺激は骨格筋機能だけでなく、骨格筋の形態維持にも影響を与える可能性が示唆されている。ここでは、熱刺激による筋肥大に TRPV1 が重要な因子である可能性を述べる。

全身または患部に熱刺激を負荷する温熱療法は、古くから行われている物理療法の一つである。温熱療法の効果としては、循環の促進や疼痛の軽減、代謝の促進などが挙げられる。近年、骨格筋において、温熱刺激が筋タンパク質量を増加させ、筋肥大や筋量増加に関与する可能性が示唆されており、運動トレーニングの困難な患者の筋量回復や萎縮抑制効果への応用が期待されている。その一方、温熱刺激が骨格筋肥大を誘発する詳細な分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。これまで熱刺激が熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP) を増加させ、この HSP の増加が骨格筋量増加に関与している可能性や (Ohno *et al.*, 2010; Locke & Celotti, 2014), 熱刺激により骨格筋肥大シグナル伝達経路が活性化されることにより筋肥大が生じる可能性 (Rommel *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 2010) が示唆されている。熱刺激による Ca^{2+} 流入は熱刺激によるタンパク質合成及び分解経路を制御している可能性が高い。実際に、Capsaicin 負荷による TRPV1 の活性化は筋肥大を誘発する (Ito *et al.*, 2013b, a)。さらに TRPV1 をノックアウトするとトレーニングによる筋肥大も抑制されることが示されている (Ito *et al.*, 2013a)。

その一方、リハビリテーションなどの臨床現場で骨格筋肥大を目的に温熱療法が成功した事例は見当たらない。その理由は、筋肥大を導く熱刺激のプロトコルが確立できないためである。熱刺激が骨格筋肥大シグナル伝達経路を活性化させるメカニズム解明は、臨床応用への手がかりとなる。本研究が解明した骨格筋における TRPV1 を介した Ca^{2+} 流入の特徴は、筋収縮自体が熱刺激の Ca^{2+} 流入を減弱させる点である。温熱刺激による Ca^{2+} 流入を筋収縮が阻害することは暑熱環境下での運動実施には合目的な機構であるものの、温熱療法の立場からすると予想外の結果である。筋力トレーニングによる筋肥大プロトコルと熱刺激による筋肥大プロトコルの組み合わせが、相乗的な効果を認めずに、むしろ抑制的な関係性を持っていることを意味する。これらの知見は、効果的に筋肥大を誘発する温熱療法プロトコルの立案に寄与すると考えられる。また、筋萎縮を併発する糖尿病において、TRPV1 の温度感受性が低下するという知見は、糖尿病患者への温熱療法の再考を促す基礎知見である。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導、御校閲を受け賜りました、狩野 豊 教授には深く心から御礼申し上げます。また、本稿作成に当たり御校閲賜りました電気通信大学 情報理工学研究科 白川 英樹 准教授、平野 誉 教授、松田 信爾 准教授、三瓶 巖一 准教授、星野 太佑 准教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、様々なご指導を賜りましたカンザス州立大学 David Pool 氏に心から御礼申し上げます。そして本実験に際しご協力を頂いたユタ州立大学の江島 弘晃氏、本稿作成の際に様々な助言を下された狩野研究室及び星野研究室の諸先輩方並びに後輩方に感謝申し上げます。

引用文献

- Allen DG, Kabbara AA & Westerblad H. (2002). Muscle fatigue: the role of intracellular calcium stores. *Can J Appl Physiol* 27, 83-96.
- Allen DG, Lamb GD & Westerblad H. (2008a). Impaired calcium release during fatigue. *J Appl Physiol (1985)* 104, 296-305.
- Allen DG, Lamb GD & Westerblad H. (2008b). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88, 287-332.
- Allen DG, Whitehead NP & Yeung EW. (2005). Mechanisms of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *J Physiol* 567, 723-735.
- Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N & Bunnett NW. (2006). Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C ϵ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol* 575, 555-571.
- Andersen H, Gadeberg PC, Brock B & Jakobsen J. (1997). Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia* 40, 1062-1069.
- Andersen H, Gjerstad MD & Jakobsen J. (2004). Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 27, 2382-2385.
- Andersen H, Poulsen PL, Mogensen CE & Jakobsen J. (1996). Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. *Diabetes* 45, 440-445.
- Andersen H, Schmitz O & Nielsen S. (2005). Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med* 22, 1401-1407.
- Aughstee AA, Khair AM & Suleiman AA. (2006). Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. *JOP* 7, 382-389.

- Bailey JK, Kindig CA, Behnke BJ, Musch TI, Schmid-Schoenbein GW & Poole DC. (2000). Spinotrapezius muscle microcirculatory function: effects of surgical exteriorization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H3131-3137.
- Barclay CJ & Weber CL. (2004). Slow skeletal muscles of the mouse have greater initial efficiency than fast muscles but the same net efficiency. *J Physiol* 559, 519-533.
- Baumann TK & Martenson ME. (2000). Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin- gated channels. *J Neurosci* 20, RC80.
- Baviera AM, Zanon NM, Carvalho Navegantes LC, Migliorini RH & do Carmo Kettelhut I. (2007). Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E702-708.
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC, Migliorini RH & Kettelhut IC. (2008). Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. *Muscle Nerve* 38, 1027-1035.
- Baylor SM & Hollingworth S. (2011). Calcium indicators and calcium signalling in skeletal muscle fibres during excitation-contraction coupling. *Prog Biophys Mol Biol* 105, 162-179.
- Bernardi P. (1999). Mitochondria in muscle cell death. *Ital J Neurol Sci* 20, 395-400.
- Bigland-Ritchie B & Woods JJ. (1984). Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue. *Muscle Nerve* 7, 691-699.
- Bishnoi M, Bosgraaf CA, Abooj M, Zhong L & Premkumar LS. (2011). Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. *Mol Pain* 7, 52.
- Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F & Latorre R. (2007). Dissection of the components for PIP2

- activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10246-10251.
- Brini M & Carafoli E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89, 1341-1378.
- Brooks GA, Hittelman KJ, Faulkner JA & Beyer RE. (1971). Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am J Physiol* 221, 427-431.
- Cao E, Cordero-Morales JF, Liu B, Qin F & Julius D. (2013). TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron* 77, 667-679.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Christie S, Wittert GA, Li H & Page AJ. (2018). Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 420.
- Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V & Walker JM. (2003). N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 278, 13633-13639.
- Cortright DN & Szallasi A. (2004). Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem* 271, 1814-1819.
- Cotter M, Cameron NE, Lean DR & Robertson S. (1989). Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. *Q J Exp Physiol* 74, 65-74.
- Cui YY, Xu H, Wu HH, Qi J, Shi J & Li YQ. (2014). Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats. *PLoS One* 9, e102052.

- Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC & Rudnicki MA. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol* 5, 1027-1059.
- Eibschutz B, Lopaschuk GD, McNeill JH & Katz S. (1984). Ca²⁺-transport in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum of the chronically diabetic rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 45, 301-304.
- Eshima H, Miura S, Senoo N, Hatakeyama K, Poole DC & Kano Y. (2017). Improved skeletal muscle Ca²⁺ regulation in vivo following contractions in mice overexpressing PGC-1alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 312, R1017-R1028.
- Eshima H, Poole DC & Kano Y. (2015). In vivo Ca²⁺ buffering capacity and microvascular oxygen pressures following muscle contractions in diabetic rat skeletal muscles: fiber-type specific effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309, R128-137.
- Eshima H, Tanaka Y, Sonobe T, Inagaki T, Nakajima T, Poole DC & Kano Y. (2013). 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.
- Fernandes ES, Fernandes MA & Keeble JE. (2012). The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 166, 510-521.
- Fong YL, Taylor WL, Means AR & Soderling TR. (1989). Studies of the regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Mutation of threonine 286 to alanine and aspartate. *J Biol Chem* 264, 16759-16763.
- Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G & Ferrer-Montiel A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24, 5307-5314.
- Gehlert S, Bloch W & Suhr F. (2015). Ca²⁺-dependent regulations and signaling in skeletal muscle: from electro-mechanical coupling to adaptation. *Int J Mol Sci* 16,

1066-1095.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W & Cong J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev* 83, 731-801.

Grossie J. (1982). Contractile and electrical characteristics of extensor muscle from alloxan-diabetic rats. An in vitro study. *Diabetes* 31, 194-202.

Han X & Gross RW. (1992). Nonmonotonic alterations in the fluorescence anisotropy of polar head group labeled fluorophores during the lamellar to hexagonal phase transition of phospholipids. *Biophys J* 63, 309-316.

Hanna-Mitchell AT, Ruiz GW, Daneshgari F, Liu G, Apodaca G & Birder LA. (2013). Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304, R84-93.

Harris MB, Blackstone MA, Ju H, Venema VJ & Venema RC. (2003). Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H333-340.

Heinonen I, Brothers RM, Kemppainen J, Knuuti J, Kalliokoski KK & Crandall CG. (2011). Local heating, but not indirect whole body heating, increases human skeletal muscle blood flow. *J Appl Physiol (1985)* 111, 818-824.

Hill CA, Thompson MW, Ruell PA, Thom JM & White MJ. (2001). Sarcoplasmic reticulum function and muscle contractile character following fatiguing exercise in humans. *J Physiol* 531, 871-878.

Hong S, Agresta L, Guo C & Wiley JW. (2008). The TRPV1 receptor is associated with preferential stress in large dorsal root ganglion neurons in early diabetic sensory neuropathy. *J Neurochem* 105, 1212-1222.

Hong S & Wiley JW. (2005). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 280, 618-627.

- Howarth FC, Singh J, Waring JJ, Hustler BI & Bailey M. (1995). Effects of monovalent cations, pH and temperature on the dissociation constant (KD) for the fluorescent indicator mag-fura-2 at different excitation wavelengths. *Magnes Res* 8, 299-306.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM & Di Marzo V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8400-8405.
- Ikegami R, Eshima H, Mashio T, Ishiguro T, Hoshino D, Poole DC & Kano Y. (2019). Accumulation of intramyocyte TRPV1-mediated calcium during heat stress is inhibited by concomitant muscle contractions. *J Appl Physiol (1985)* 126, 691-698.
- Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y & Takeda S. (2013a). Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med* 19, 101-106.
- Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y & Takeda S. (2013b). Capsaicin mimics mechanical load-induced intracellular signaling events: involvement of TRPV1-mediated calcium signaling in induction of skeletal muscle hypertrophy. *Channels (Austin)* 7, 221-224.
- Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, Mancuso S, Joksovic PM, Rosenberg ER, Bayliss DA, Jevtovic-Todorovic V & Todorovic SM. (2007). Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J Neurosci* 27, 3305-3316.
- Johnston AP, Campbell JE, Found JG, Riddell MC & Hawke TJ. (2007). Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1033-1040.
- Jones AM, Campbell IT & Pringle JS. (2004). Influence of muscle fibre type and pedal rate on the VO₂-work rate slope during ramp exercise. *Eur J Appl Physiol* 91, 238-245.

- Jordt SE, Tominaga M & Julius D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8134-8139.
- Karai LJ, Russell JT, Iadarola MJ & Olah Z. (2004). Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *J Biol Chem* 279, 16377-16387.
- Khomula EV, Viatchenko-Karpinski VY, Borisyuk AL, Duzhy DE, Belan PV & Voitenko NV. (2013). Specific functioning of Cav3.2 T-type calcium and TRPV1 channels under different types of STZ-diabetic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 1832, 636-649.
- Kindig CA, Richardson TE & Poole DC. (2002). Skeletal muscle capillary hemodynamics from rest to contractions: implications for oxygen transfer. *J Appl Physiol (1985)* 92, 2513-2520.
- Kindig CA, Sexton WL, Fedde MR & Poole DC. (1998). Skeletal muscle microcirculatory structure and hemodynamics in diabetes. *Respir Physiol* 111, 163-175.
- Komi PV & Karlsson J. (1979). Physical performance, skeletal muscle enzyme activities, and fibre types in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol Scand Suppl* 462, 1-28.
- Koplas PA, Rosenberg RL & Oxford GS. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17, 3525-3537.
- Kumke MU, Shu L, McGown LB, Walker GT, Pitner JB & Linn CP. (1997). Temperature and quenching studies of fluorescence polarization detection of DNA hybridization. *Anal Chem* 69, 500-506.
- Kushmerick MJ, Meyer RA & Brown TR. (1992). Regulation of oxygen consumption in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol* 263, C598-606.

- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD & Hamilton SL. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996.
- Lau SY, Procko E & Gaudet R. (2012). Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J Gen Physiol* 140, 541-555.
- Laursen WJ, Schneider ER, Merriman DK, Bagriantsev SN & Gracheva EO. (2016). Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 11342-11347.
- Levy J, Gavin JR, 3rd & Sowers JR. (1994). Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am J Med* 96, 260-273.
- Li L, Hasan R & Zhang X. (2014). The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKC β II. *J Neurosci* 34, 8246-8258.
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB & Gaudet R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54, 905-918.
- Locke M & Celotti C. (2014). The effect of heat stress on skeletal muscle contractile properties. *Cell Stress Chaperones* 19, 519-527.
- Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C & Van Coppenolle F. (2013). Characterization of functional TRPV1 channels in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *PLoS One* 8, e58673.
- Luo Z, Ma L, Zhao Z, He H, Yang D, Feng X, Ma S, Chen X, Zhu T, Cao T, Liu D, Nilius B, Huang Y, Yan Z & Zhu Z. (2012). TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 α upregulation in mice. *Cell Res* 22, 551-564.
- MacLennan DH, Rice WJ & Green NM. (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 272, 28815-28818.

- Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD & Tominaga M. (2006). Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123, 106-116.
- Marche P, Dubois S, Abraham P, Parot-Schinkel E, Gascoin L, Humeau-Heurtier A, Ducluzeau PH & Mahe G. (2017). Neurovascular microcirculatory vasodilation mediated by C-fibers and Transient receptor potential vanilloid-type-1 channels (TRPV 1) is impaired in type 1 diabetes. *Sci Rep* 7, 44322.
- Medina-Sanchez M, Rodriguez-Sanchez C, Vega-Alvarez JA, Menedez-Pelaez A & Perez-Casas A. (1991). Proximal skeletal muscle alterations in streptozotocin-diabetic rats: a histochemical and morphometric analysis. *Am J Anat* 191, 48-56.
- Mohapatra DP & Nau C. (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280, 13424-13432.
- Moopanar TR & Allen DG. (2005). Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C. *J Physiol* 564, 189-199.
- Murphy RM. (2010). Calpains, skeletal muscle function and exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, 385-391.
- Naziroglu M & Braidy N. (2017). Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel Targets for Treating Chemotherapy-Induced Peripheral Pain. *Front Physiol* 8, 1040.
- Numata T, Kozai D, Takahashi N, Kato K, Uriu Y, Yamamoto S, Kaneko T, Shinmoto T & Mori Y. (2009). [Structures and variable functions of TRP channels]. *Seikagaku* 81, 962-983.
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H & Tominaga M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8002-8006.

- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H & Tominaga M. (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277, 13375-13378.
- Obi S, Nakajima T, Hasegawa T, Kikuchi H, Oguri G, Takahashi M, Nakamura F, Yamasoba T, Sakuma M, Toyoda S, Tei C & Inoue T. (2017). Heat induces interleukin-6 in skeletal muscle cells via TRPV1/PKC/CREB pathways. *J Appl Physiol (1985)* 122, 683-694.
- Ohno Y, Yamada S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T & Goto K. (2010). A possible role of NF-kappaB and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats. *Gen Physiol Biophys* 29, 234-242.
- Pabbidi MR & Premkumar LS. (2017). Role of Transient Receptor Potential Channels Trpv1 and Trpm8 in Diabetic Peripheral Neuropathy. *J Diabetes Treat* 2017.
- Pabbidi RM, Cao DS, Parihar A, Pauza ME & Premkumar LS. (2008). Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons. *Mol Pharmacol* 73, 995-1004.
- Paulus SF & Grossie J. (1983). Skeletal muscle in alloxan diabetes. A comparison of isometric contractions in fast and slow muscle. *Diabetes* 32, 1035-1039.
- Piper AS, Yeats JC, Bevan S & Docherty RJ. (1999). A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J Physiol* 518 (Pt 3), 721-733.
- Rachofsky EL, Osman R & Ross JB. (2001). Probing structure and dynamics of DNA with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence. *Biochemistry* 40, 946-956.
- Rall JA & Woledge RC. (1990). Influence of temperature on mechanics and energetics of muscle contraction. *Am J Physiol* 259, R197-203.

- Ranatunga KW. (2018). Temperature Effects on Force and Actin(-)Myosin Interaction in Muscle: A Look Back on Some Experimental Findings. *Int J Mol Sci* 19.
- Reggiani C, Potma EJ, Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA & Stienen GJ. (1997). Chemo-mechanical energy transduction in relation to myosin isoform composition in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 502 (Pt 2), 449-460.
- Reni C, Mangialardi G, Meloni M & Madeddu P. (2016). Diabetes Stimulates Osteoclastogenesis by Acidosis-Induced Activation of Transient Receptor Potential Cation Channels. *Sci Rep* 6, 30639.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3, 1009-1013.
- Rosenberg H, Pollock N, Schiemann A, Bulger T & Stowell K. (2015). Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 10, 93.
- Ryschon TW, Fowler MD, Wysong RE, Anthony A & Balaban RS. (1997). Efficiency of human skeletal muscle in vivo: comparison of isometric, concentric, and eccentric muscle action. *J Appl Physiol (1985)* 83, 867-874.
- Ryu S, Liu B, Yao J, Fu Q & Qin F. (2007). Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci* 27, 12797-12807.
- Sexton WL, Poole DC & Mathieu-Costello O. (1994). Microcirculatory structure-function relationships in skeletal muscle of diabetic rats. *Am J Physiol* 266, H1502-1511.
- Shankarappa SA, Piedras-Renteria ES & Stubbs EB, Jr. (2011). Forced-exercise delays neuropathic pain in experimental diabetes: effects on voltage-activated calcium channels. *J Neurochem* 118, 224-236.
- Sharopov BR, Gulak KL, Philyppov IB, Sotkis AV & Shuba YM. (2018). TRPV1 alterations in urinary bladder dysfunction in a rat model of STZ-induced diabetes. *Life Sci* 193, 207-213.

- Shuttleworth TJ & Thompson JL. (1991). Effect of temperature on receptor-activated changes in $[Ca^{2+}]_i$ and their determination using fluorescent probes. *J Biol Chem* 266, 1410-1414.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD & Davis JB. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129, 227-230.
- Sogaard K, Gandevia SC, Todd G, Petersen NT & Taylor JL. (2006). The effect of sustained low-intensity contractions on supraspinal fatigue in human elbow flexor muscles. *J Physiol* 573, 511-523.
- Soler-Torronteras R, Lara-Chica M, Garcia V, Calzado MA & Munoz E. (2014). Hypoximimetic activity of N-acyl-dopamines. N-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1alpha protein through a SIAH2-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2730-2743.
- Song PS, Chae Q & Briggs WR. (1975). Temperature dependence of the fluorescence quantum yield of phytochrome. *Photochem Photobiol* 22, 75-76.
- Sonobe T, Inagaki T, Poole DC & Kano Y. (2008). 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.
- Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF & Gordon SE. (2006). Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 128, 509-522.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H & Mizumura K. (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88, 544-548.
- Todorovic SM. (2016). Painful Diabetic Neuropathy: Prevention or Suppression? *Int Rev Neurobiol* 127, 211-225.

- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI & Julius D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.
- Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME & Premkumar LS. (2005). Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain* 1, 17.
- van den Zegel M, Boens N & de Schryver FC. (1984). Fluorescence decay of 1-methylpyrene in small unilamellar 1-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. A temperature and concentration dependence study. *Biophys Chem* 20, 333-345.
- van der Poel C & Stephenson DG. (2002). Reversible changes in Ca(2+)-activation properties of rat skeletal muscle exposed to elevated physiological temperatures. *J Physiol* 544, 765-776.
- van der Poel C & Stephenson DG. (2007). Effects of elevated physiological temperatures on sarcoplasmic reticulum function in mechanically skinned muscle fibers of the rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C133-141.
- Vay L, Gu C & McNaughton PA. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165, 787-801.
- Vellani V, Kinsey AM, Prandini M, Hechtfisher SC, Reeh P, Magherini PC, Giacomoni C & McNaughton PA. (2010). Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Mol Pain* 6, 61.
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB & McNaughton PA. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534, 813-825.
- Voets T & Nilius B. (2007). Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol* 582, 939-944.
- Vyklicky L, Vlachova V, Vitaskova Z, Dittert I, Kabat M & Orkand RK. (1999). Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol* 517 (Pt 1), 181-192.

- Wackerhage H, Hoffmann U, Essfeld D, Leyk D, Mueller K & Zange J. (1998). Recovery of free ADP, Pi, and free energy of ATP hydrolysis in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 85, 2140-2145.
- Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K & Dai Y. (2018). Negative Regulation of TRPA1 by AMPK in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 67, 98-109.
- Winter Z, Buhala A, Otvos F, Josvay K, Vizler C, Dombi G, Szakonyi G & Olah Z. (2013). Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel--an overview of the current mutational data. *Mol Pain* 9, 30.
- Xin H, Tanaka H, Yamaguchi M, Takemori S, Nakamura A & Kohama K. (2005). Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 756-762.
- Yao J & Qin F. (2009). Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor. *PLoS Biol* 7, e46.
- Yoshihara T, Naito H, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Ogura Y, Sugiura T & Katamoto S. (2013). Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 207, 416-426.
- Zhang BT, Yeung SS, Allen DG, Qin L & Yeung EW. (2008). Role of the calcium-calpain pathway in cytoskeletal damage after eccentric contractions. *J Appl Physiol (1985)* 105, 352-357.
- Zhang X, Huang J & McNaughton PA. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 24, 4211-4223.
- Zhang Y, Chen Q, Sun Z, Han J, Wang L & Zheng L. (2015). Impaired capsaicin-induced relaxation in diabetic mesenteric arteries. *J Diabetes Complications* 29, 747-754.
- Zhao R & Tsang SY. (2017). Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel.

J Cell Physiol 232, 1957-1965.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D & Hogestatt ED. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457.

RESEARCH ARTICLE

Accumulation of intramyocyte TRPV1-mediated calcium during heat stress is inhibited by concomitant muscle contractions

Ryo Ikegami,¹ Hiroaki Eshima,² Takuro Mashio,¹ Tomosada Ishiguro,¹ Daisuke Hoshino,¹ David C. Poole,³ and Yutaka Kano¹

¹Department of Engineering Science, Bioscience, and Technology Program, The University of Electro-Communications, Chofugaoka, Chofu, Tokyo, Japan; ²Department of Nutrition and Integrative Physiology, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah; and ³Departments of Anatomy and Physiology and Kinesiology, Kansas State University, Manhattan, Kansas

Submitted 31 July 2018; accepted in final form 7 January 2019

Ikegami R, Eshima H, Mashio T, Ishiguro T, Hoshino D, Poole DC, Kano Y. Accumulation of intramyocyte TRPV1-mediated calcium during heat stress is inhibited by concomitant muscle contractions. *J Appl Physiol* 126: 691–698, 2019. First published January 24, 2019; doi:10.1152/jappphysiol.00668.2018.—Heat stress promotes intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) accumulation via transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. We tested the hypothesis that muscle contractile activity concomitant with heat stress would accelerate the increase in $[Ca^{2+}]_i$ via TRPV1, further impairing $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis. Spinotrapezius muscles of adult Wistar rats were exteriorized in vivo and loaded with the fluorescent Ca^{2+} probe fura 2-AM. Heat stress (muscle surface temperature 40°C) was used as TRPV1 activator. An isometric contraction (100 Hz, 5–10 V, 30 s) was induced electrically concomitant with heat stress. $[Ca^{2+}]_i$ was determined for 20 min using in vivo fluorescence microscopy, and the phosphorylation response of TRPV1 was determined by Western blotting. Heat stress induced a significant $[Ca^{2+}]_i$ increase of $18.5 \pm 8.1\%$ at 20 min and TRPV1 phosphorylation (+231%), which was inhibited by addition of the TRPV1 inhibitor (capsazepine). However, contrary to expectations, the heat stress and isometric contraction condition almost completely inhibited TRPV1 phosphorylation and the consequent $[Ca^{2+}]_i$ elevation ($<2.8\%$ accumulation during heat stress, $P > 0.05$). In conclusion, this in vivo physiological model demonstrated that isometric muscle contraction(s) can suppress the phosphorylation response of TRPV1 and maintain $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis during heat stress.

NEW & NOTEWORTHY This investigation is the first document the dynamics of intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) increase in the myoplasm of skeletal muscle fibers in response to heat stress where the muscle blood flow is preserved. Heat stress at 40°C drives a myoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ accumulation in concert with transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) phosphorylation. However, muscle contraction caused TRPV1 channel deactivation by dephosphorylation of TRPV1. TRPV1 inactivation via isometric contraction(s) permits maintenance of $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis even under high imposed muscle temperature.

heat stress; isometric; muscle contraction; myocyte calcium homeostasis; TRPV1

INTRODUCTION

Muscle temperature and changes thereof impact multiple physiological processes including muscle contraction velocity and fatigability (24, 29, 34, 42). Moreover, it has recently been recognized that heat stress is a stimulus for muscle protein synthesis (46). Given the overarching role of intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in muscle function and dysfunction (5), this investigation sought to determine the impact of heat stress on intramyocyte $[Ca^{2+}]_i$ and establish if this can be modified by concomitant muscle contraction. As supported by the evidence below, the relationship between $[Ca^{2+}]_i$ dynamics and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel control via phosphorylation was of particular interest as a putative mechanistic link by which heat stress impacts muscle function.

TRPV1 is a nonselective cation channel that was cloned initially from the dorsal root ganglion of the rat (8). TRPV1 has high Ca^{2+} permeability and is activated by capsaicin (8, 19, 27), heat (7, 8, 22, 31, 43), acid (2, 18, 36, 40), and certain lipids (9, 16, 37, 38, 47). One of the important attributes of TRPV1 is the interdependence of its sensitivity with the intracellular environment. Although TRPV1 has been extensively studied in nerve cells, TRPV1 is also expressed in nonneuronal cells and plays a role in various cellular functions (12). In skeletal muscle cells, TRPV1 is mainly expressed in the sarcoplasmic reticulum and Ca^{2+} flows into the myoplasm by TRPV1 activation (25, 45). In addition, an increase in intramyocyte $[Ca^{2+}]_i$ via TRPV1 stimulates peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α and mitochondrial synthesis and increases exercise tolerance (26). Furthermore, in a recent report, TRPV1 has been shown to activate the mammalian target of rapamycin (mTOR) by elevating $[Ca^{2+}]_i$ thereby promoting muscle hypertrophy (17). Thus there is abundant evidence that the TRPV1 channel plays a role in myoplasmic Ca^{2+} homeostasis with the potential to impact skeletal muscle structure and function.

Muscle contraction is powered by ATP splitting with ~70% of the energy produced being converted to heat (33, 35). Thus during intense heavy or severe intensity exercise, especially when continued to exhaustion, muscle temperature can rise up to 42°C, which exceeds the activation threshold of TRPV1 (6). Therefore, we hypothesized that muscle contractile activity superimposed on a preheated muscle would accelerate the

Address for reprint requests and other correspondence: Y. Kano, Dept. of Engineering Science, Bioscience, and Technology Program, Univ. of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 1828585 Japan (e-mail: kano@pc.uec.ac.jp).

increase in $[Ca^{2+}]_i$ via TRPV 1, resulting in a breakdown of $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and consequently increased $[Ca^{2+}]_i$. To our knowledge this study is the first in vivo experimental (i.e., circulation intact) model capable of measuring intramyocyte $[Ca^{2+}]_i$ changes during concomitant contractile and heat stress. Because of the importance of TRPV1 channel control to $[Ca^{2+}]_i$ dynamics, we further hypothesized that TRPV1 phosphorylation would associate with elevated $[Ca^{2+}]_i$.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats ($n = 72$, 10 wk of age; Japan SLC, Shizuoka, Japan) were used in this study. All rats were housed in a temperature-controlled room at $23 \pm 2^\circ C$ with a light-dark cycle of 12 h and maintained on rat chow and water ad libitum. All experiments were conducted under the guidelines established by the Physiological Society of Japan and were approved by University of Electro-Communications Institutional Animal Care and Use Committee. During all experimental procedures, the rats were anesthetized using pentobarbital sodium (60 mg/kg ip), and supplemental doses of anesthesia were administered as needed. At the end of experimental protocols, animals were killed by pentobarbital sodium overdose.

Muscle Preparation

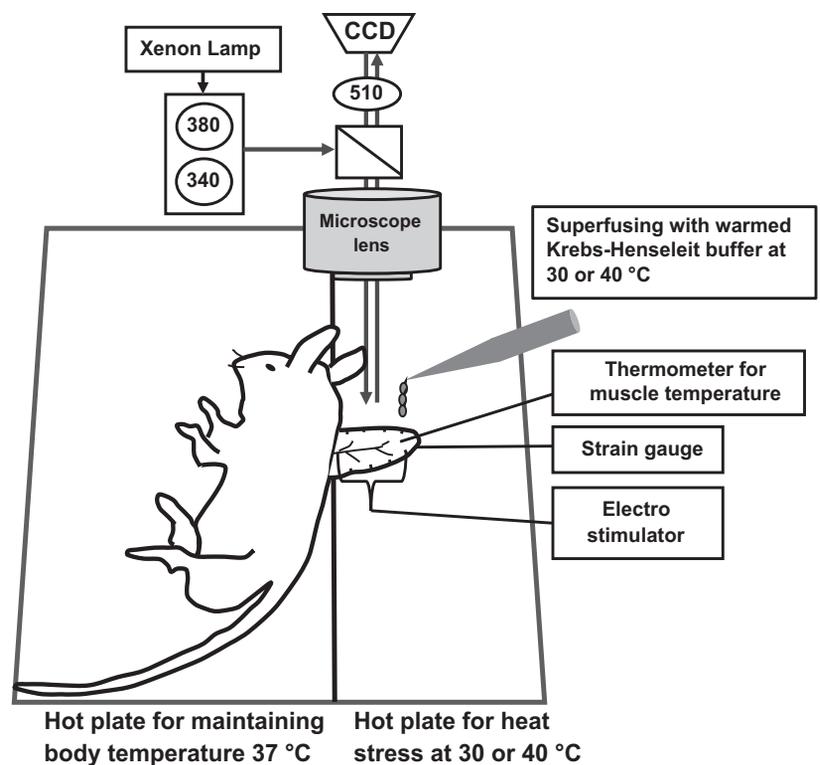
Experimental techniques, including the spinotrapezius muscle preparation and $[Ca^{2+}]_i$ imaging, were performed as described previously (39). Briefly, the right spinotrapezius muscle was gently exteriorized with minimal blood loss and tissue/microcirculatory damage and attached to a wire horseshoe around the caudal periphery by eight equidistant perimeter sutures (Fig. 1). For the contraction protocols, electrodes were placed on the dorsal spinotrapezius surface along the caudal periphery, facilitating whole muscle contractions. The exposed muscle tissue was moistened by continuously superfusing with warmed Krebs-Henseleit buffer [KHB (in mM); 132 NaCl, 4.7 KCl,

21.8 $NaHCO_3$, 2 $MgSO_4$, and 2 $CaCl_2$] equilibrated with 95% N_2 -5% CO_2 and adjusted to pH 7.4. The fluorescent Ca^{2+} indicator fura 2-AM (5 mM; Dojindo Laboratories) was dissolved in 0.4% DMSO and pluronic F-127 and dispersed into KHB solution at a final concentration of 10 μM . Muscles were incubated in fura 2-AM/KHB solution for 60 min on a $37^\circ C$ hotplate. After incubation, muscles were rinsed with fura 2-AM-free KHB solution to remove nonloaded fura 2-AM. The TRPV1 inhibitor capsaizepine (CPZ; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) was dissolved in 0.06% DMSO and mixed into KHB solution at a final concentration of 300 μM . The ryanodine receptor (RyR) inhibitor dantrolene (DAN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in 1.0% DMSO and mixed into KHB solution at a final concentration of 100 μM . After fura-2 incubation and rinse, DAN (100 $\mu mol/l$) was applied for 10 min before the start of experiments.

Calcium Ion Image Analysis

The spinotrapezius muscles loaded with fura 2-AM were mounted on the glass hotplate (Kitazato Supply, Shizuoka, Japan) and observed by fluorescence microscopy using a $\times 10$ objective lens (0.30 numerical aperture; Nikon, Tokyo, Japan). After it was ensured that the spinotrapezius muscle was not grossly damaged and supported robust capillary blood flow indicative of healthy function, a sampling area ($880 \times 663 \mu m$) was selected using branching vessels as landmarks, and bright-field images were captured. Thereafter, 340- and 380-nm wavelength excitation light was delivered using a Xenon lamp equipped with appropriate fluorescent filters, and pairs of fluorescence images were captured through the 500-nm emission wavelength filter for ratiometry. Fluorescence images were captured by a high-sensitivity CCD digital camera (ORCA-Flash2.8; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) using image-capture software (NIS-Elements Advanced Research; Nikon). Basically, image acquisition was carried out every 5 min with all protocols. Image acquisition for the muscle contraction protocols was initiated at rest just after electrical stimulation. The specific region of interest (ROI) for the Ca^{2+} measurement

Fig. 1. Schematic showing direct microscopic in vivo observation of spinotrapezius muscle and intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). Independent glass hotplates were used for maintaining body temperature at $37^\circ C$ and applying control temperature ($30^\circ C$) and heat stress ($40^\circ C$) to the muscle. Heat stress was applied for 20 min after 10 min of rest. Krebs-Henseleit buffer solution was continuously superfused, and the muscle temperature was either kept constant at $30^\circ C$ or raised to $40^\circ C$. Muscle temperature was measured by direct contact with a thermometer. Isometric muscle contraction(s) were elicited by electrical stimulation. Fluorescence images were captured from the specified region of interest, and ratiometric (R: F340/F380) images were used to calculate intramyocyte $[Ca^{2+}]_i$ alterations.



was set along the muscle fiber. Two ROIs were set on five muscle fibers for each rat.

Experimental Protocols

Exposure to heat stress. Heat stress (40°C) was applied to the spinotrapezius by adjusting the temperature of the glass hotplate underlying the muscle (Fig. 1). The muscle temperature was measured using a temperature probe (BAT-10; Physitemp Instruments, Clifton, NJ) attached to the muscle surface. The required condition (either 30 or 40°C) was maintained for 20 min after a 10-min normothermic stabilization (30°C) period. Importantly, the rat's body was maintained on a separate hot plate (37°C) to maintain the body temperature independently. The surface muscle temperature was measured continuously, and the value is expressed as an average at 5-min intervals.

Isometric contractions during heat stress. Isometric muscle contractions (electrical stimulation, 100-Hz frequency, 6–10 V, 30 s duration, SEN-8203; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) during heat stress were conducted in two different patterns. For *protocol 1*, isometric muscle contraction was initiated simultaneously with the onset of heat stress and thereafter repeated every 5 min. For *protocol 2*, a single 30-s isometric muscle contraction was initiated 10 min after start of the heat stress period when the muscle typically had reached 40°C.

Pharmacologic inhibition of the RyR function. To verify the pharmacological effect of DAN (100 μmol/l), peak tension induced by electrical stimulation at 10, 20, 30, 40, 60, 80, and 100 Hz was measured in preliminary investigations. In Ca²⁺ image analysis experiments, DAN was applied for 10 min before the start of each experiment. This experimental protocol was the same as for the heat stress and isometric contractions (*protocol 2*).

Western Blot Analysis

Western blotting was performed to determine the protein expression levels of phospho-TRPV1 in the spinotrapezius muscles from each group [i.e., control and *protocols 1* and *2*]. To avoid any potential confounding effects of fura 2-AM loading, muscle samples were taken from different groups of rats who underwent the same protocols (each group $n = 4$). Spinotrapezius muscle samples were homogenized as previously described (11) using ice cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 200 mM NaF, 20 mM sodium pyrophosphate, 1 mM NaVO₄, 1% Nonidet P-40, and 10% glycerol) with a protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) and PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatant proteins were then quantified using BCA protein assay kit (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL). The samples (20 μg total protein per lane) were separated on 7.5% polyacrylamide gels for 60 min at 150 V and then transferred to Amersham Hybond-P membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 75 min at 100 V using the wet method. After the transfer, the membranes were blocked with Blocking One or 3% skim milk (Nacalai Tesque) at room temperature for 1 h. After blocking, the membranes were then incubated with primary antibodies [anti-TRPV1 antibody, 1:1,000, ACC030, Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel); anti-rat phospho-TRPV1 polyclonal antibody, 1:500, KM112, Trans Genic (Fukuoka, Japan); anti-calmodulin-dependent protein kinase II (anti-CaMK II) antibody, 1:1,000, D11A10, Cell Signaling Technology (CST; Tokyo, Japan); anti-phospho CaMK II antibody, 1:1,000, T286, CST; anti-AMPK antibody, 1:1,000, 2532, CST; and anti-phospho AMPK antibody, 1:1,000, 2513, CST] at 4°C overnight. This phospho-TRPV1 antibody reacts with phosphorylated TRPV1 at serine 800. Subsequently, the membranes were added to goat anti-rabbit IgG linked to peroxidase (SC-2055; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 h at room temperature. The bound antibodies were detected by Chemi-Lumi One Super Kit (Nacalai Tesque) and analyzed with Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences). Ponceau-S was used as an internal loading control for Western blot analysis.

Statistical Analysis

Values are expressed as means ± SE. Statistical analyses were performed in Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). The changes in [Ca²⁺]_i from resting levels were compared within groups using a two-way ANOVA with repeated measures followed by Dunnett's post hoc test. The comparisons between groups were analyzed using a two-way ANOVA with repeated measures followed by post hoc comparisons of the group means using the Tukey's multiple comparison test. One-way ANOVAs were used for relative protein data. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Exposure to Heat Stress

In the heat stress (Heat; 40°C) and Heat + CPZ groups, the muscle temperature reached its target temperature of 40.0°C within 10 min, and this was maintained through 20 min (Fig. 2B). In contrast, the surface muscle temperature of the control (CONT) was maintained at $30.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ throughout the experiment.

In the CONT and the Heat + CPZ group, no significant change in [Ca²⁺]_i was observed over the 20-min observation period. In contrast, by 10 min a significant [Ca²⁺]_i elevation was evident in the Heat, which increased by $18.5 \pm 8.1\%$ of baseline at 20 min (Fig. 2C). The frequency distribution of the fura 2 ratio value in the Heat protocol demonstrates a temporal and spatial heterogeneity within each ROI (Fig. 2D).

Effect of Inhibition of RyR Function on [Ca²⁺]_i Response to Heat

Figure 3A depicts [Ca²⁺]_i responses to DAN (RyR inhibition) applied during heating condition. DAN application did not impact the [Ca²⁺]_i increase induced by hyperthermia ($P > 0.05$, Fig. 3A).

[Ca²⁺]_i Change To Heat + Isometric Muscle Contraction

Figure 4 shows the muscle temperature (Fig. 4, A and C) and [Ca²⁺]_i (Fig. 4, B and D) for the two protocols of isometric muscle contraction (ISO) and Heat. In the ISO under 30°C muscle condition, [Ca²⁺]_i gradually rose and had increased by $5.6 \pm 7\%$ ($P < 0.05$) after 20 min (i.e., 5 sets ISO, Fig. 4B). In contrast, there was no significant change over the 20-min observation period in the Heat + ISO group (Fig. 4B).

In *protocol 2*, a single ISO performed at 10 min during Heat, when the target muscle temperature of 40°C had been attained, curtailed any increase of [Ca²⁺]_i. Specifically, after 10 min of Heat [Ca²⁺]_i had increased by $7.9 \pm 2.3\%$ ($P = 0.32$) but imposition of single ISO decreased this to $4.3 \pm 1.9\%$, which was not different from baseline ($P > 0.05$, Fig. 4D).

Effect of Inhibition of RyR Function on [Ca²⁺]_i Response to Heat + ISO

In the DAN condition, the muscle tension at 40, 60, 80, and 100 Hz was significantly reduced compared with the CONT condition (Fig. 3B). The muscle tension at 100-Hz stimulation frequency was decreased by $27 \pm 3\%$ in the DAN condition compared with CONT. The tension at 100 Hz with DAN (76.6 ± 3.2 mN) approximated to between 40 Hz (64.2 ± 4.0 mN) and 60 Hz (83.6 ± 2.3 mN) in the CONT.

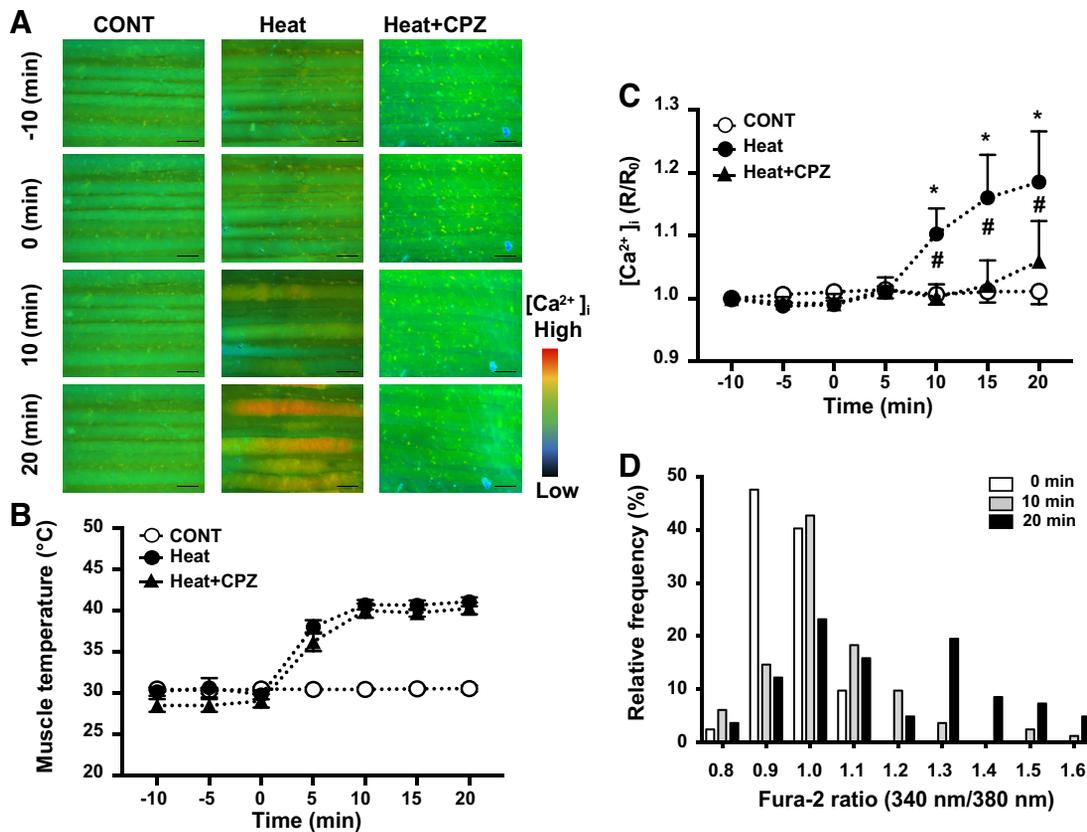


Fig. 2. *A:* typical example of changes in intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) during in vivo heat stress in rat spinotrapezius muscle. Scale bar = 100 μ m. *B:* change of muscle temperature for control (CONT; $n = 12$), heat stress (Heat; $n = 7$), and Heat + transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) inhibitor [capsazepine (CPZ); $n = 6$] conditions. *C:* influence of the different heat stress conditions on $[Ca^{2+}]_i$. Fluorescence was measured continuously during the 5-min measurement interval and ratiometrically quantified data were graphed as changes from precondition (i.e., -10 min) levels (R₀). *D:* frequency distribution of fura 2 fluorescence ratio at 0-, 10-, and 20-min in Heat condition. Values shown are means \pm SE. #Significantly different ($P < 0.05$) from initial level for each condition. *Significant difference ($P < 0.05$) between Heat and CONT or Heat + CPZ condition.

Just as there was no effect of DAN on the $[Ca^{2+}]_i$ accumulation induced by the Heat condition (Fig. 3A), the suspension of the heat stress-induced $[Ca^{2+}]_i$ response was also not impacted by DAN (Fig. 3C).

TRPV1, AMPK, and CaMK II Phosphorylation: Effects of Heat + ISO

Figure 5 portrays TRPV1, AMPK, and CaMK II phosphorylation levels at the 20-min time point for each condition (i.e.,

CONT, Heat, ISO, and Heat + ISO) in protocol 2. The Heat condition increased phosphorylation at serine 800 of TRPV1 ($P < 0.05$ vs. CONT). In contrast, combined Heat + ISO significantly inhibited the phosphorylation of TRPV1 by the concomitant Heat. ISO alone did not alter TRPV1 phosphorylation level. The phosphorylation level of AMPK was significantly increased by ISO ($P < 0.01$) compared with CONT, but no significant change was observed in Heat or Heat + ISO. Phosphorylation of CaMK II increased significantly only under ISO ($P < 0.05$ vs. CONT).

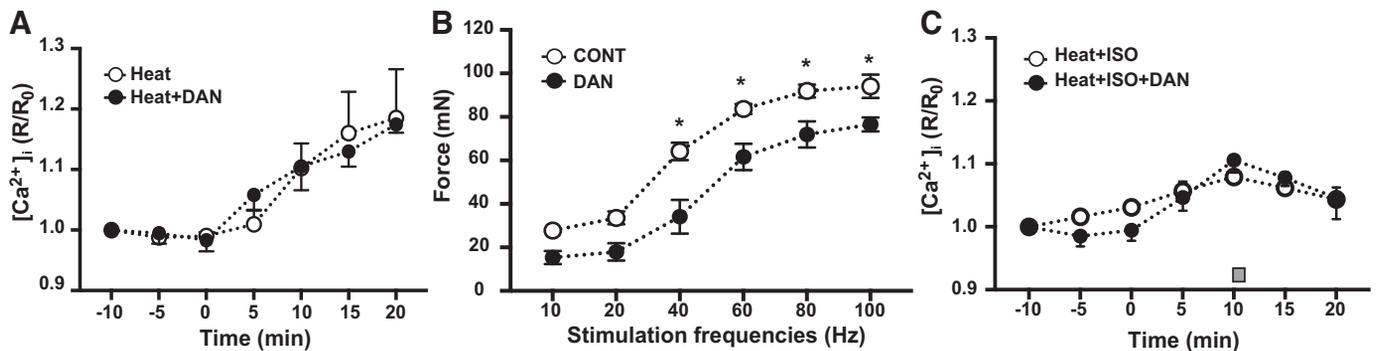


Fig. 3. *A:* effect of dantrolene (DAN) on intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) during heat stress (Heat; same data as Fig. 2C) and Heat + DAN ($n = 5$). *B:* effect of dantrolene (DAN) on muscle tension at 10-, 20-, 40-, 60-, 80-, and 100-Hz stimulation frequencies [control (CONT); $n = 5$; DAN; $n = 3$]. Small gray bar indicates loading time of muscle contraction. Values shown are means \pm SE. *Significant difference ($P < 0.05$) between CONT and DAN. *C:* effect of DAN on $[Ca^{2+}]_i$ during Heat + isometric contraction (ISO; same data as Fig. 4D) and Heat + ISO + DAN ($n = 5$).

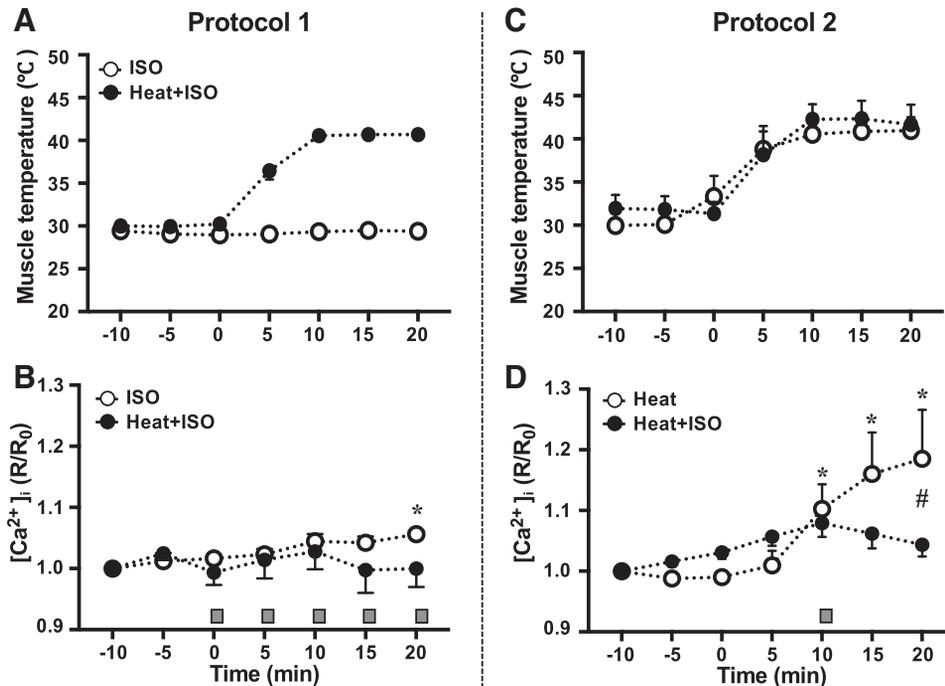


Fig. 4. *A* and *B*: protocol 1: influence of 5×30 s of continuous isometric contractions (ISO) with (Heat + ISO) and without (ISO) heat stress; change of muscle temperature (*A*) and in vivo intramyocyte calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) (*B*) during 5 repeated ISO contractions ($n = 5$) and Heat + ISO ($n = 4$) conditions. *C* and *D*: protocol 2: effect of a single ISO contraction on $[Ca^{2+}]_i$ applied after 10 min of heat stress; change of muscle temperature (*C*) and in vivo $[Ca^{2+}]_i$ (*D*) in Heat (same data as Fig. 2*C*) and Heat + ISO ($n = 4$) conditions. Small gray bar indicates loading time of muscle contraction. Values shown are means \pm SE. #Significant difference ($P < 0.05$) between Heat and Heat + ISO. *Significantly different ($P < 0.05$) from initial level for each condition.

DISCUSSION

This investigation is, to our knowledge, the first to document the dynamics of $[Ca^{2+}]_i$ increase in the myoplasm of skeletal muscle fibers in response to heat stress in vivo where the muscle blood flow is preserved. The principal original findings are as follows: 1) heat stress at 40°C drives a myoplasmic Ca^{2+} accumulation in concert with TRPV1 phosphorylation; 2) heat stress-induced $[Ca^{2+}]_i$ accumulation is abolished by isometric muscle contraction(s); and 3) muscle contraction(s) caused TRPV1 channel deactivation by dephosphorylation of TRPV1 serine 800. Collectively, these data revealed that TRPV1 inactivation via isometric contraction(s) permits maintenance of

$[Ca^{2+}]_i$ homeostasis even under high imposed muscle temperature.

Increase of Cytoplasmic Ca^{2+} Concentration by Heat Stress

The spinotrapezius muscle used in this experiment is capable of partial microscopic observation without injury to the nerves or major vessels (1, 20). Thus the present investigation was conducted in an in vivo environment where the blood flow found in resting muscles was sustained along with any physiological contraction(s)- and/or hyperthermia-induced hyperemia. Since blood flow itself contributes to temperature regulation in vivo, maintaining the blood flow state is extremely

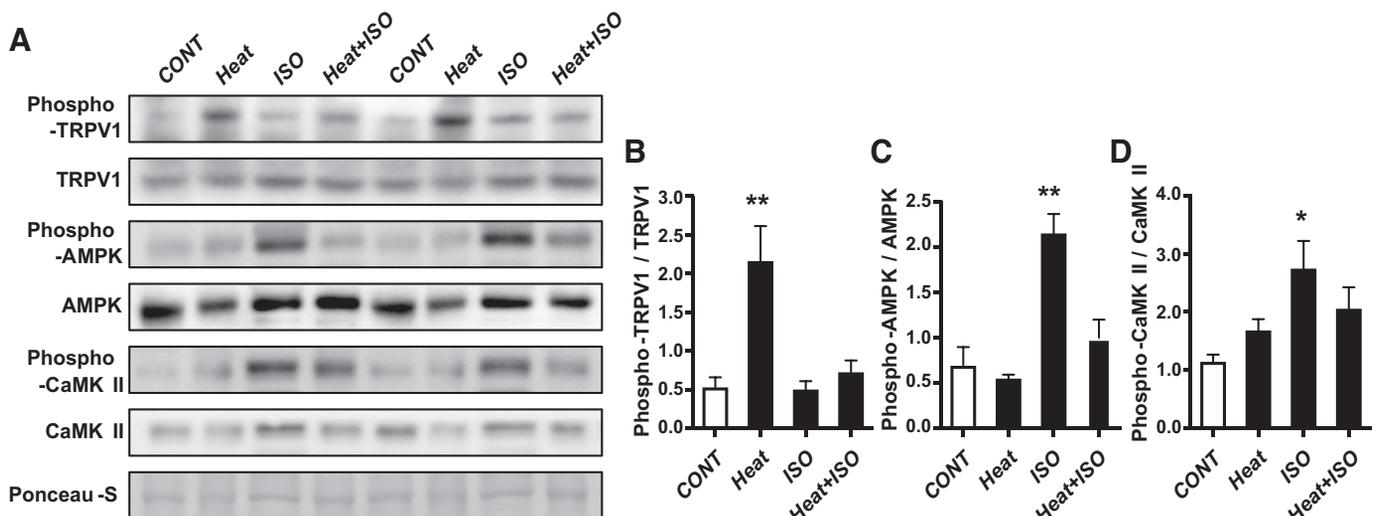


Fig. 5. *A–D*: representative band image (*A*), quantification of phosphorylation and total protein level on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) (*B*), AMPK (*C*), and calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) (*D*) for control (CONT), heat stress (Heat), isometric contractions (ISO), and Heat + ISO (all groups, $n = 4$). Values shown are means \pm SE. Data are expressed as relative values with the reference value (1.0) as the untreated muscle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from CONT.

important for physiological studies of heat stress. When the muscle temperature exceeds body core temperature and that of the inflowing blood as herein under the heat stress condition, heat dissipation from the muscle is aided by the associated increase in blood flow. Interestingly, skeletal muscle blood flow is increased by heat stress per se (15).

Elevation of $[Ca^{2+}]_i$ during heat stress occurs not solely by TRPV1 channel activation but also via attenuation of Ca^{2+} uptake by the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA; Ref. 41). SERCA dysfunction caused by heat stress is thought to result from reactive oxygen species produced through the mitochondrial electron transport system (41). However, as shown in Fig. 2, CPZ, a specific inhibitor of TRPV1, inhibited the majority of the increase in $[Ca^{2+}]_i$ due to heat stress supporting that, of the two candidate mechanisms, Ca^{2+} influx into the cytoplasm in response to heat stress at 40°C herein was via TRPV1, and thus any influence of Ca^{2+} uptake failure by SERCA was therefore relatively minor. Based on in vitro experiments, the activity threshold of TRPV1 is expected to be in the range of ~40 (7) to 43°C (8) and TRPV1 activation by heat stress at 40°C herein was confirmed. Interestingly, however, the accumulation dynamics of $[Ca^{2+}]_i$ was found to be substantially heterogeneous across muscle fibers (Fig. 2, A and D). Although it is not possible to specify the causal factors for this phenomenon at the present time, it is quite likely that the activity of TRPV1 is dependent on muscle fiber type. The volume (33) and protein composition (30) of the sarcoplasmic reticulum that houses TRPV1 is dependent on the specific muscle fiber type, which may in-and-of-themselves help modulate the fiber type-specific responses of TRPV1 to heat stress. In addition, we have recently demonstrated that mitochondria play a major role in Ca^{2+} buffering (10) and we speculate that the pronounced interfiber heterogeneity of $[Ca^{2+}]_i$ accumulation may be related to differences in mitochondrial volume density among fiber types.

Based on the biphasic $[Ca^{2+}]_i$ increase after capsaicin administration, Lotteau et al. (25) proposed a RyR/TRPV1 cross talk model in which RyR is activated by TRPV1-derived Ca^{2+} . In the present investigation, we have demonstrated that the heat stress-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was not suppressed by DAN loading (Fig. 3B) supporting the alternative thesis that heat stress-induced Ca^{2+} influx is a TRPV1-dependent response rather than RyR/TRPV1 cross talk.

Inhibition of TRPV1-Mediated Ca^{2+} Accumulation by Muscle Contraction

One key facet of our preparation is that blood flow is maintained throughout the protocol including during muscle contractions. Thus the slight $[Ca^{2+}]_i$ accumulation after contractions is not the result of ischemia. We have previously demonstrated that such ischemia as seen after the blood supply is severed, as seen for isolated muscle preparations, in-and-of itself leads to an elevated $[Ca^{2+}]_i$ even in noncontracting muscle (39).

TRPV1 shows desensitization to further stimulation by exposure to sustained external stimuli. Specifically, previous studies have shown a decreased TRPV1 susceptibility to sustained capsaicin and thermal stimulation (27, 43). In the present investigation, as shown in Fig. 4, B and D, muscle contractions intervened to significantly inhibit Ca^{2+} accumulation

during sustained heat stress at 40°C. These findings indicate the presence of a, so far, undetermined mechanism that decreases thermal TRPV1 sensitivity. Lishko et al. (23) reported that desensitization of TRPV1 to sustained stimulation was dependent on Ca^{2+} accumulation. Accordingly, repeated (5 times) 30-s isometric contraction bouts caused (as seen at 20 min in Fig. 4B) a slight, but significant, Ca^{2+} accumulation in protocol 1. Also, dependent on the precise contraction parameters $[Ca^{2+}]_i$ during muscle contractions may transiently increase up to 100-fold (4, 14). It is quite possible that such $[Ca^{2+}]_i$ transients may reduce TRPV1 sensitivity to concomitant or subsequent (protocol 2) heat stress.

Also, it was notable that even the decreased level of contractile tension produced under DAN conditions continued to maintain the inhibitory effect of heat stress-induced Ca^{2+} accumulation (Fig. 3C). This observation supports that even low-intensity stimulation is highly likely to suppress Ca^{2+} accumulation due to heat.

The Effect of Muscle Contraction on TRPV1 Phosphorylation

Phosphorylation of serine 800, one of the two serine residues of TRPV1, has been identified as an important site of control for the activation response (30). In this experiment, the phosphorylation of the serine 800 residue was significantly increased by heat stress at 40°C (Fig. 5B). This result is consistent with a previous finding of an increased phosphorylation of the serine 800 residue in cultured skeletal muscle cells exposed to heat stress at 42°C for 30 min (31). Interestingly, muscle contractions markedly suppressed serine 800 phosphorylation by heat stress (Fig. 5B). These results demonstrate that Ca^{2+} accumulation induced by heat stress is dependent on TRPV1 phosphorylation. On the other hand, dephosphorylation after activation of TRPV1 is considered to be one of the mechanisms of TRPV1 desensitization (21, 32). To our knowledge, muscle contraction has not previously been shown to lead to TRPV1 desensitization. In skeletal muscle, the mechanism underpinning the correlation between TRPV1 desensitization and Ca^{2+} accumulation is unknown. However, the fact that Ca^{2+} /CaM binding desensitizes TRPV1 in neurons (23) may offer an important clue. In the present study, muscle contraction(s) significantly increased CaMK II phosphorylation (Fig. 5D), reflecting elevated Ca^{2+} /CaM levels (13). Therefore, CaMK II activation by muscle contraction(s) may induce TRPV1 desensitization. In addition, negative modification of TRPV1 by AMPK has been reported recently in sensory neurons (44), and it has been determined that TRPV1 and TRPA1 coexpress and functionally interlink with each other (3). Therefore, it is feasible that the rapid muscle contraction(s)-induced increase of AMPK phosphorylation (Fig. 5C) acts to desensitize TRPV1.

Continuous muscle contraction induces muscle fatigue, in part, by elevating myoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ consequent to decreased SR function. Activation of TRPV1 may contribute to the increase of $[Ca^{2+}]_i$ because muscle contraction is accompanied necessarily by muscle temperature elevation. However, because dephosphorylation of TRPV1 is induced by muscle contraction, and the increase of Ca^{2+} in the cytoplasm is suppressed during heat stress, this mechanism may constitute

an important physiological pathway for sustaining muscle contraction despite elevated temperatures.

Summary and Perspective

Using an in vivo bioimaging model to maintain blood circulation and a close-to-physiological muscle physicochemical environment, we resolved the effects of muscle contraction on simultaneously applied heat stress. By inhibiting TRPV1, it was apparent that Ca^{2+} accumulation consequent to heat stress occurs principally via TRPV1. Importantly, we demonstrated that muscle contraction intervenes to suppress heat stress-induced Ca^{2+} accumulation by reducing TRPV1 phosphorylation. Furthermore, it was determined that suppression of Ca^{2+} influx via TRPV1 by muscle contraction is caused by dephosphorylation of the serine 800 residue. In addition to serine 800, serine 116 (28) and tyrosine 705 (22) have been identified as residues controlling TRPV1 sensitivity. Additional prospective studies are indicated to elucidate further the controlling mechanisms for the entire TRPV channel family. Heat stress is a major factor regulating intracellular Ca^{2+} dynamics. Therefore, the findings of the present investigation provide important clues for better understanding the profound muscle fatigue that attends hyperthermia and possibly also the mechanism(s) of thermal stress-induced muscle protein synthesis.

GRANTS

This work was supported in part by Japan Society for the Promotion of Science KAKENHI Grants 17K19897, 16H0324, 15K12665, and 23650403; Yamaha Motor Foundation for Sports; Uehara Memorial Foundation; and Sasakawa Scientific Research Grant from The Japan Science Society.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.I., H.E., T.M., T.I., D.C.P., and Y.K. conceived and designed research; R.I., H.E., T.M., T.I., D.H., and Y.K. performed experiments; R.I., T.M., T.I., D.H., and Y.K. analyzed data; R.I., H.E., T.M., T.I., D.C.P., and Y.K. interpreted results of experiments; R.I., D.C.P., and Y.K. prepared figures; R.I., T.M., T.I., D.C.P., and Y.K. drafted manuscript; XXX edited and revised manuscript; R.I., H.E., T.M., T.I., D.H., D.C.P., and Y.K. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Bailey JK, Kindig CA, Behnke BJ, Musch TI, Schmid-Schoenbein GW, Poole DC. Spinotrapezius muscle microcirculatory function: effects of surgical exteriorization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H3131–H3137, 2000. doi:10.1152/ajpheart.2000.279.6.H3131.
- Baumann TK, Martenson ME. Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels. *J Neurosci* 20: RC80, 2000. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-11-j0004.2000.
- Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol* 75: 181–200, 2013. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183811.
- Baylor SM, Hollingworth S. Calcium indicators and calcium signalling in skeletal muscle fibres during excitation-contraction coupling. *Prog Biophys Mol Biol* 105: 162–179, 2011. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.06.001.
- Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89: 1341–1378, 2009. doi:10.1152/physrev.00032.2008.
- Brooks GA, Hittelman KJ, Faulkner JA, Beyer RE. Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am J Physiol* 221: 427–431, 1971. doi:10.1152/ajplegacy.1971.221.2.427.
- Cao E, Cordero-Morales JF, Liu B, Qin F, Julius D. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron* 77: 667–679, 2013. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.016.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824, 1997. doi:10.1038/39807.
- Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 278: 13633–13639, 2003. doi:10.1074/jbc.M211231200.
- 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 α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 312: R1017–R1028, 2017. doi:10.1152/ajpregu.00032.2017.
- 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 Regul Integr Comp Physiol* 305: R610–R618, 2013. doi:10.1152/ajpregu.00023.2013.
- Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 166: 510–521, 2012. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.
- Fong YL, Taylor WL, Means AR, Soderling TR. Studies of the regulatory mechanism of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. Mutation of threonine 286 to alanine and aspartate. *J Biol Chem* 264: 16759–16763, 1989.
- Gehlert S, Bloch W, Suhr F. Ca^{2+} -dependent regulations and signaling in skeletal muscle: from electro-mechanical coupling to adaptation. *Int J Mol Sci* 16: 1066–1095, 2015. doi:10.3390/ijms16011066.
- Heinonen I, Brothers RM, Kempainen J, Knuuti J, Kalliokoski KK, Crandall CG. Local heating, but not indirect whole body heating, increases human skeletal muscle blood flow. *J Appl Physiol (1985)* 111: 818–824, 2011. doi:10.1152/jappphysiol.00269.2011.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8400–8405, 2002. doi:10.1073/pnas.122196999.
- Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med* 19: 101–106, 2013. doi:10.1038/nm.3019.
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8134–8139, 2000. doi:10.1073/pnas.100129497.
- Kárai LJ, Russell JT, Iadarola MJ, Oláh Z. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sensory neurons. *J Biol Chem* 279: 16377–16387, 2004. doi:10.1074/jbc.M310891200.
- Kindig CA, Richardson TE, Poole DC. Skeletal muscle capillary hemodynamics from rest to contractions: implications for oxygen transfer. *J Appl Physiol (1985)* 92: 2513–2520, 2002. doi:10.1152/jappphysiol.01222.2001.
- Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17: 3525–3537, 1997. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-10-03525.1997.
- Li L, Hasan R, Zhang X. The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKC β II. *J Neurosci* 34: 8246–8258, 2014. doi:10.1523/JNEUROSCI.0278-14.2014.
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54: 905–918, 2007. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.027.
- Locke M, Celotti C. The effect of heat stress on skeletal muscle contractile properties. *Cell Stress Chaperones* 19: 519–527, 2014. doi:10.1007/s12192-013-0478-z.
- Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C, Van Copenolle F. Characterization of functional TRPV1 channels in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *PLoS One* 8: e58673, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0058673.
- Luo Z, Ma L, Zhao Z, He H, Yang D, Feng X, Ma S, Chen X, Zhu T, Cao T, Liu D, Niluis B, Huang Y, Yan Z, Zhu Z. TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 α upregulation in mice. *Cell Res* 22: 551–564, 2012. doi:10.1038/cr.2011.205.

27. Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD, Tominaga M. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123: 106–116, 2006. doi:10.1016/j.pain.2006.02.016.
28. Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280: 13424–13432, 2005. doi:10.1074/jbc.M410917200.
29. Moopanar TR, Allen DG. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J Physiol* 564: 189–199, 2005. doi:10.1113/jphysiol.2005.083519.
30. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277: 13375–13378, 2002. doi:10.1074/jbc.C200104200.
31. Obi S, Nakajima T, Hasegawa T, Kikuchi H, Oguri G, Takahashi M, Nakamura F, Yamasoba T, Sakuma M, Toyoda S, Tei C, Inoue T. Heat induces interleukin-6 in skeletal muscle cells via TRPV1/PKC/CREB pathways. *J Appl Physiol (1985)* 122: 683–694, 2017. doi:10.1152/jappphysiol.00139.2016.
32. Piper AS, Yeats JC, Bevan S, Docherty RJ. A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J Physiol* 518: 721–733, 1999. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0721p.x.
33. Rall JA, Woledge RC. Influence of temperature on mechanics and energetics of muscle contraction. *Am J Physiol* 259: R197–R203, 1990. doi:10.1152/ajpregu.1990.259.2.R197.
34. Ranatunga KW. Temperature effects on force and actin-myosin interaction in muscle: a look back on some experimental findings. *Int J Mol Sci* 19: 1538, 2018. doi:10.3390/ijms19051538.
35. Reggiani C, Potma EJ, Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Stienen GJ. Chemo-mechanical energy transduction in relation to myosin isoform composition in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 502: 449–460, 1997. doi:10.1111/j.1469-7793.1997.449bk.x.
36. Ryu S, Liu B, Yao J, Fu Q, Qin F. Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci* 27: 12797–12807, 2007. doi:10.1523/JNEUROSCI.2324-07.2007.
37. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129: 227–230, 2000. doi:10.1038/sj.bjp.0703050.
38. Soler-Torrónteras R, Lara-Chica M, García V, Calzado MA, Muñoz E. Hypoximimetic activity of N-acyl-dopamines. N-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1α protein through a SIAH2-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 1843: 2730–2743, 2014. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.07.005.
39. 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 Regul Integr Comp Physiol* 294: R1329–R1337, 2008. doi:10.1152/ajpregu.00815.2007.
40. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531–543, 1998. doi:10.1016/S0896-6273(00)80564-4.
41. van der Poel C, Stephenson DG. Effects of elevated physiological temperatures on sarcoplasmic reticulum function in mechanically skinned muscle fibers of the rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C133–C141, 2007. doi:10.1152/ajpcell.00052.2007.
42. van der Poel C, Stephenson DG. Reversible changes in Ca(2+)-activation properties of rat skeletal muscle exposed to elevated physiological temperatures. *J Physiol* 544: 765–776, 2002. doi:10.1113/jphysiol.2002.024968.
43. Vyklický L, Vlachová V, Vitásková Z, Dittert I, Kabát M, Orkand RK. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol* 517: 181–192, 1999. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0181z.x.
44. Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K, Dai Y. Negative regulation of TRPA1 by AMPK in primary sensory neurons as a potential mechanism of painful diabetic neuropathy. *Diabetes* 67: 98–109, 2018. doi:10.2337/db17-0503.
45. Xin H, Tanaka H, Yamaguchi M, Takemori S, Nakamura A, Kohama K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 756–762, 2005. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.016.
46. Yoshihara T, Naito H, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Ogura Y, Sugiura T, Katamoto S. Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 207: 416–426, 2013. doi:10.1111/apha.12040.
47. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452–457, 1999. doi:10.1038/22761.