

発表番号 65 (0539)

筋変性疾患における Na^+ 駆動性イオン交換輸送体の 機能破綻の分子機構の解明

若林 繁夫(国立循環器病センター研究所循環分子生理部)

岩田 裕子(国立循環器病センター研究所循環分子生理部)

筋ジストロフィー症はその原因の多くが細胞骨格系タンパク質の遺伝子異常に由来し、筋肉が変性して脱落する難病である。デュシェン型はディストロフィン(Dys)の欠損で起こることが1987年に明らかになり、その後他のタイプのいくつかの筋ジストロフィー症はサルコグリカン(SG)などのDys複合体を形成するタンパク質やそれに関連する細胞骨格系タンパク質の遺伝子異常で起こることが明らかになった。しかしながら、原因遺伝子はかなり解明されてきているものの、遺伝子の欠損がどのような分子メカニズムで筋変性を引き起こすのかは明らかではない。私達はこれまで、筋変性を起こす共通のリスクファクターとして細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に着目してきた。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ・カルパインの活性化をもたらシアポトーシスの進行を促進するが、その最初の Ca^{2+} 上昇を起こす有力な候補として最近ストレッチ活性化チャネル(TRPV2あるいはGRC)を見出した。これと平行して行ってきた薬理学的実験において、私達は最近 Ca^{2+} とは一見関係のない Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)の特異的阻害剤であるカリ

ポライドやEIPAが筋ジストロフィー症マウス(*mdx*)およびハムスター(BIO14.6)の筋変性を著明に改善しうることを見出した。今回培養骨格筋細胞を用いて、NHE阻害剤が病態を改善する分子機構について検討を行った。詳細な実験から、筋ジストロフィー症動物由来の骨格筋細胞ではNHEが恒常的に活性化されていること、NHEの活性化は細胞内 Na^+ 濃度上昇をもたらし、それに伴う $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の機能低下がTRPV2の活性化とともに細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に寄与する可能性が見出された。Dys複合体を構成する遺伝子が欠損することに端を発する筋ジストロフィー症では、細胞膜の機械的脆弱性に基づくストレッチが常に働いている。この持続的な機械刺激は細胞内シグナル系を動かし、さまざまなエフェクター分子の活性変化をもたらす。今回の結果は、私達が以前に示した Ca^{2+} 流入系としてのTRPV2の病態的重要性に加えて、 Ca^{2+} 流出系としてのNHE/NCXの異常が相加的に病態の進行に関与することを示唆している。

助成番号 0539

筋変性疾患における Na^+ 駆動性イオン交換輸送体の機能破綻の 分子機構の解明

若林 繁夫(国立循環器病センター研究所循環分子生理部)

岩田 裕子(国立循環器病センター研究所循環分子生理部)

1. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー症(DMD)は約 3,000 人に一人の男児に発症する難病であり、その原因遺伝子がディストロフィン(Dys)であることが 1987 年に Kunkel らによって特定された⁽¹⁾。その後の研究によって、Dys は筋肉の膜裏打ちに存在する大きな細胞骨格タンパク質であり、数種類のディストログリカン(DG)およびサルコグリカン(SG)と呼ばれるタンパク質などとともに細胞膜上で巨大な Dys 複合体を形成することにより、筋細胞のアクチン/コスタメア構造を細胞外マトリックスに連結し、細胞膜を機械的に安定化する役目を持つことが明らかにされた^(2,3)。興味深いことに、DMD 以外の多くのタイプの筋ジストロフィー症では、Dys 複合体を形成するタンパク質やそれに関連する細胞骨格系タンパク質に遺伝子異常があることも明らかにされている。研究に頻繁に使われる *mdx* マウスでは Dys が^(4,5)、BIO14.6 ハムスターでは δ -SG が欠損している。このように、原因遺伝子はかなり解明されてきているが、遺伝子の欠損がどのような分子メカニズムで筋変性を引き起こすのかは明らかではない。

私達はこれまで、筋変性を起こす共通のリスクファクターとして細胞内 Ca^{2+} に着目してきた。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ・カルパインの活性化をもたらしてアポトーシスの進行を促進するが、その最初の Ca^{2+} 上昇を起こす有力な候補として私達は最近ストレッチ活性化チャネル(TRPV2 あるいは GRC)を発見した⁽⁶⁾。私達がこれまで行ったさまざまな薬理学的実験において、確かに Ca^{2+} 流入を阻害する薬物(トラニラストなど)は筋変性を改善したが⁽⁷⁾、驚くべきことに Ca^{2+} とは一見関係のない Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)の特異的阻害剤であるカリポライドや EIPA が筋ジストロフィー症マウス(*mdx*)およびハムスター(BIO14.6)の筋変性を著明に改善しうることを見出した。

今回培養骨格筋細胞を用いて、NHE 阻害剤が病態を改善する分子機構について検討を行った。詳細な実験から、筋ジストロフィー症動物由来の骨格筋細胞では NHE が恒常的に活性化されていること、NHE の活性化は細胞内 Na^+ 濃度上昇をもたらす、それに伴う $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

交換系(NCX)による Ca^{2+} 排出阻害が TRPV2 の活性化とともに細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に寄与する可能性が見出された。

2. 研究方法

2.1 薬物及び抗体

Na^+ とカップルして H^+ を排出するトランスポーター、 Na^+/H^+ 交換系(NHE)に対する阻害剤(EIPA, 5-(N-Ethyl N-isopropyl)-amiloride) (鐘紡) とカリポライド(Aventis Pharma Chem.)を用いた。また、NHE1⁽⁸⁾、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系 NCX1, NCX2, NCX3⁽⁹⁾、TRPV2 チャネルに対する抗体⁽⁶⁾を用いた。

2.2 動物

細胞骨格系蛋白質欠損で筋ジストロフィーを発症するハムスター(BIO14.6)およびマウス(*mdx*)をモデル動物として用いた。同週令のコントロール動物も使用した。EIPA とカリポライドは給水中にそれぞれ 1 日 3 mg/kg 体重になるよう加え動物に供与した。筋変性の程度は血中クレアチンキナーゼ(CK)活性、組織切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色より、筋機能はグリップテストより各々評価した。

2.3 筋細胞の調製

筋細胞の調製は既報⁽⁶⁾に従った。以下に簡単に記す。各々動物の後足骨格筋(gastrocnemius)を単離しコラゲナーゼとディスパーゼを用いて衛星細胞を得た。20%牛胎児血清および 1%ニワトリ胎児抽出液存在下に培養し増殖させた後、牛胎児血清を除き 5%馬血清にすることにより筋細胞は 1 日以内に分化融合し筋管を形成した。筋管形成後 2-3 日の筋管細胞を筋細胞として実験に用いた。筋細胞はコントロールと筋ジストロフィー症動物からの細胞において見かけ上相違なく両者ともサルコメアを形成していた。

2.4 細胞内 Na^+ 濃度の測定

細胞内 Na^+ 濃度 $[\text{Na}^+]_i$ は Na^+ indicator の SBFI (sodium binding benzofuran isophthalate) を用いて測定した。 $[\text{Na}^+]_i$ のキャリブレーションは 10 μM グラミシジン、1 mM ウアバイン、2 μM モネンシン存在下細胞外液 Na^+ 濃度

を0から20 mMまで変えて行った。 $[Na^+]_i$ はアクアコスモス(浜松フォトニクス)を用いて340 nmと380 nmという二つの異なる励起波長で励起したときの測定波長505 nmの蛍光強度の比を測定した。

2.5 細胞内pHの測定

細胞内pH(pH_i)はBCECFの蛍光を用いて測定した。 pH_i はアクアコスモス(浜松フォトニクス)を用いて440 nmと490 nm二つの異なる励起波長で励起したときの測定波長505 nmの蛍光強度の比より測定した。 pH_i のキャリブレーションは5 μ M ナイジェリシンを含むさまざまなpHの高カリウム(KCl濃度140 mM)溶液を用いて実施した。

2.6 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)測定はカルシウム指示薬 fluo4-AM(インビトロジェン) fura2-AM(ドージンドー社)を細胞に負荷しておこなった。fluo4を用いた Ca^{2+} シグナルの上昇は共焦点レーザー顕微鏡(Bio-Rad MRC-1024ES system)を用いて測定した。相対的 $[Ca^{2+}]_i$ は $\Delta F/F_0$ で表した。 F_0 は静止レベル、 ΔF は刺激後1-2分後の Ca^{2+} 上昇のピーク値と F_0 との差である。fura2-AMを用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定はアクアコスモス(浜松フォトニクス)を用いて340 nmと380 nmという二つの異なる励起波長で励起したときの測定波長505 nmの蛍光強度の比を調べるによりおこなった。

2.7 $^{22}Na^+$ 取り込み

$^{22}Na^+$ 取り込みはコラーゲンIでコートした24穴の培養皿にコントロールとBIO14.6の筋細胞を培養し、37°C、30分間の $^{22}Na^+$ 取り込みを調べた。そのbuffer組成は50 mM NaCl、96 mM cholineCl、1 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM $CaCl_2$ 、10 mM グルコース、0.1%牛血清アルブミン、10 mM HEPES/Tris (pH 7.4)、37 kBq/ml $^{22}NaCl$ と1 mM ウアバインである。また、 $^{22}Na^+$ 取り込み液に0.1 mM EIPA または0.25 mM $GdCl_3$ あるいは0.1 mM EIPA + 0.25 mM $GdCl_3$ を加えた条件でも測定した。

2.8 シリコンチャンバーを用いた細胞ストレッチ

筋細胞をシリコン膜上に培養し、室温で1 Hz 5-20%伸張刺激を与え、CK遊離などの実験に供した。

2.9 グリップテスト

筋肉の機能評価を行うため、細い金網に2本の前足で体重を支えていられる時間を測定した。

2.10 その他の方法

蛋白濃度測定、定量的イムノブロット、組織及び細胞免疫染色は既報に従った⁽⁶⁾。有意検定はunpaired t-テストによって行い、 $P < 0.05$ を棄却域とした。

3. 研究結果

3.1 NHE阻害剤は筋ジストロフィー症モデル動物の骨格筋変性を抑制する。

BIO14.6ハムスターにNHE阻害剤であるEIPAを含む水を飲ませ、14日目に筋変性のマーカーである血中へのクレアチンキナーゼ(CK)流出と組織切片のHE染色を調べた。興味深いことに、EIPA処理したハムスターでは、CKの顕著な減少(Fig. 1A)および中心核の減少(Fig. 1B)など筋変性の改善が認められた。次に、ジストロフィン欠損型のmdxマウスにおいてNHE阻害剤であるカリポライドの効果を検討した。マウスはハムスターと異なり、個体を殺すことなく尾から容易に血液採取できるという利点がある。血中CK濃度を日数を追って調べると、mdxマウスにおける筋変性の第1のピークは2-3週で、第2のピークは10週付近であり、カリポライド摂取によりどの週令マウスにおいても血中CK値の減少が認められた(Fig. 1C)。またマウスを金網に前足でぶら下がりさせ、体重をどのくらいの時間支えていられるかというグリップテストで骨格筋の機能的評価をしたところ、カリポライド摂取により著明な改善効果が示された(Fig. 1D)。コントロールマウスは前足で30秒以上体重を支えられるがmdxマウスでは5秒以内に落下する。カリポライドをのませたmdxマウスは10秒ほど支持時間が延長した(Fig. 1D)。

筋ジストロフィー動物における筋変性にNHE阻害剤が効果的であることから、骨格筋においてNHE活性が上昇し、細胞内 Na^+ 濃度が高くなっている可能性が考えられる。 Na^+ 濃度の増加は間接的にNCX機能を低下させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる要因の一つになる可能性が考えられた。従って、培養骨格筋細胞を用いてそうしたイオン代謝に対するNHE阻害剤の効果を以下に示すように検討した。

3.2 筋ジストロフィー骨格筋細胞では、NHE活性が亢進している。

まず細胞内 Na^+ 濃度に影響すると思われる二つの Na^+ 依存性のトランスポーターNHEおよびNCXに関してその骨格筋における発現量および局在を調べたところ正常およびBIO14.6ハムスター骨格筋組織、ならびに組織由来の培養筋細胞とも明らかな変化は認められなかった(図なし)。

そこで次に直接NHE活性を培養骨格筋細胞を用いて調べた。まずBCECFを用いて pH_i を測定した。 NH_4^+ -prepulseにより細胞内を酸性化し外液に Na^+ を加えることにより pH_i の回復速度をみるという方法でNHE活性を測定した。Fig. 2Aに示すように、 Na^+ 添加により pH_i は急速に回復し、それはカリポライドにより抑制されたので

(図なし)、NHE 活性を反映していることが確かめられた。正常筋細胞では pH_i は < 7 程度までしか回復しなかったが (Fig. 2A)、BIO14.6 からの筋細胞では pH_i 回復速度が速くより高い $pH_i (< 7.2)$ にまで到達した (Fig. 2B)。高 KCl-ナイジェリシンを用いたキャリブレーションを行って静止レベルの pH_i を測定すると、BIO14.6 の筋細胞の方が 0.2 pH ユニット程度 pH_i が高いことが判明した (Fig. 2C)。NHE 活性の pH_i 依存性をしらべると中性付近でコントロール筋細胞はほとんど NHE 活性がないのに BIO では強い活性を示すこと、BIO14.6 で NHE 活性の細胞内 pH 依存性がアルカリシフトしていることが判明した (図なし)。正常筋細胞では PMA 処理によって NHE が活性化され pH_i 依存性がアルカリシフトしたが、BIO14.6 の筋細胞ではすでに NHE が活性化されており pH_i 依存性の PMA によるさらなるアルカリ側へのシフトはほとんどおこらなかった (図なし)。以上のことより、BIO14.6 の筋細胞では何らかの原因により NHE が恒常的に活性化状態にあり、高い pH_i を生じさせていることが判明した。

3.3 細胞内 Na^+ の取り込み、 $[Na^+]_i$ 、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する NHE 阻害剤の効果

NHE の活性化は pH_i の上昇のみならず、細胞内への Na^+ 流入の増加をもたらすことが予想される。そこで実際に $^{22}Na^+$ 取り込みを測定した。まず正常筋細胞では、 $^{22}Na^+$ 取り込みの 60% 以上が NHE の阻害剤 EIPA で抑制された。一方、非特異的カチオンチャンネルの阻害剤ガドリニウムでは 25% の取り込みが抑制されたにすぎなかった。このことは生理的条件下 (2 mM Ca^{2+} 存在下) では非特異的なカチオンチャンネルを介する Na^+ の流入はあまりなく、主な Na^+ 流入は NHE を介していることがわかった (Fig. 3A)。EIPA で阻害される $^{22}Na^+$ 取り込み量は BIO14.6 筋細胞で有意に上昇していた (Fig. 3B)。さらに、 $[Na^+]_i$ を SBFI 蛍光測光によって測定したところ、 $[Na^+]_i$ は BIO14.6 筋細胞では有意に高く (Fig. 3C)、NHE 阻害剤カリポライド処理により上昇した BIO14.6 筋細胞の $[Na^+]_i$ はコントロールレベルまで減少した (Fig. 3D)。これらの結果は BIO14.6 筋細胞では NHE が活性化されており、静止レベルの pH_i のみならず $[Na^+]_i$ の上昇を引き起こしていることが判明した。次に筋細胞を用いて $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した。正常筋細胞では外液 Ca^{2+} 濃度を上昇させてもほとんど $[Ca^{2+}]_i$ は変化しないが BIO14.6 筋細胞では外液 Ca^{2+} 濃度を上昇させる (0.5 mM Ca から 2 mM Ca) と $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する (Fig. 3E)。興味深いことに、BIO14.6 筋細胞をあらかじめカリポライドで処理しておく、 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇が抑制されることがわかった (Fig. 3F)。また、ストレッチ刺激で BIO14.6 筋細胞は細胞変性を起こし CK

が細胞外へ流出するが、 Gd^{3+} 、ルテニウムレッド、L-タイプ Ca チャンネルブロッカーなど Ca^{2+} 流入を阻害する薬物と同様に NHE 阻害剤は CK の流出を抑制した (図なし)。

4. 考察

筋ジストロフィー症における細胞変性は細胞内 Ca^{2+} の持続的上昇が引き金となると考えられている。今回の結果は、その Ca^{2+} 上昇をもたらすひとつの要因として NHE の活性化が関与することを示唆する。NHE の活性化は細胞内 Na^+ 濃度上昇をもたらす、それがおそらくは NCX の機能低下をもたらす可能性が考えられる。筋ジストロフィー症モデル動物における *in vivo* における NHE 阻害剤の著明な病態改善効果は、病態の進行に NHE の活性化の寄与がかなり大きいことを示している。Dys 複合体を構成する遺伝子が欠損することに端を発する筋ジストロフィー症では、細胞膜の機械的脆弱性に基づくストレッチが常に働いている。この持続的な機械刺激は細胞内シグナル系を動かし、さまざまなエフェクター分子の活性化をもたらす。今回の結果は、私達が以前に示した Ca^{2+} 流入系としての TRPV2 の病態的重要性に加えて、 Ca^{2+} 流出系としての NHE/NCX の異常が相加的に病態の進行に関与することを示唆している。

5. 今後の課題

筋ジストロフィー症を起こすさまざまな原因遺伝子があるが、これらが筋変性という似かよった病態を引き起こす分子メカニズムは非常に興味深い。今回の結果を踏まえて、今後こうした病態モデル動物においてどのような機構で NHE が活性化されているのかを明らかにすることは重要であろう。そのような研究は、単なる病態解析だけでなく、将来の新たな創薬シーズの発見につながるものであると考えている。

文献

- (1) Hoffman, E. P., Knudson, C. M., Campbell, K. P., and Kunkel, L. M. (1987) Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* 330, 754-8.
- (2) Campbell, K. P. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80, 675-9.
- (3) Ervasti, J. M., and Campbell, K. P. (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122, 809-23.

- (4) Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., and Barnard, P. J. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244, 1578-80.
- (5) Nigro, V., Okazaki, Y., Belsito, A., Piluso, G., Matsuda, Y., Politano, L., Nigro, G., Ventura, C., Abbondanza, C., Molinari, A. M., Acampora, D., Nishimura, M., Hayashizaki, Y., and Puca, G. A. (1997) Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet* 6, 601-7.
- (6) Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., and Shigekawa, M. (2003) A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol* 161, 957-67.
- (7) Iwata, Y., Katanosaka, Y., Shijun, Z., Kobayashi, Y., Hanada, H., Shigekawa, M., and Wakabayashi, S. (2005) Protective effects of Ca(2+) handling drugs against abnormal Ca(2+) homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol* 70, 740-51.
- (8) Bertrand, B., Wakabayashi, S., Ikeda, T., Pouyssegur, J., and Shigekawa, M. (1994) The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem* 269, 13703-9.
- (9) Iwamoto, T., Pan, Y., Nakamura, T. Y., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (1998) Protein kinase C-dependent regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry* 37, 17230-8.

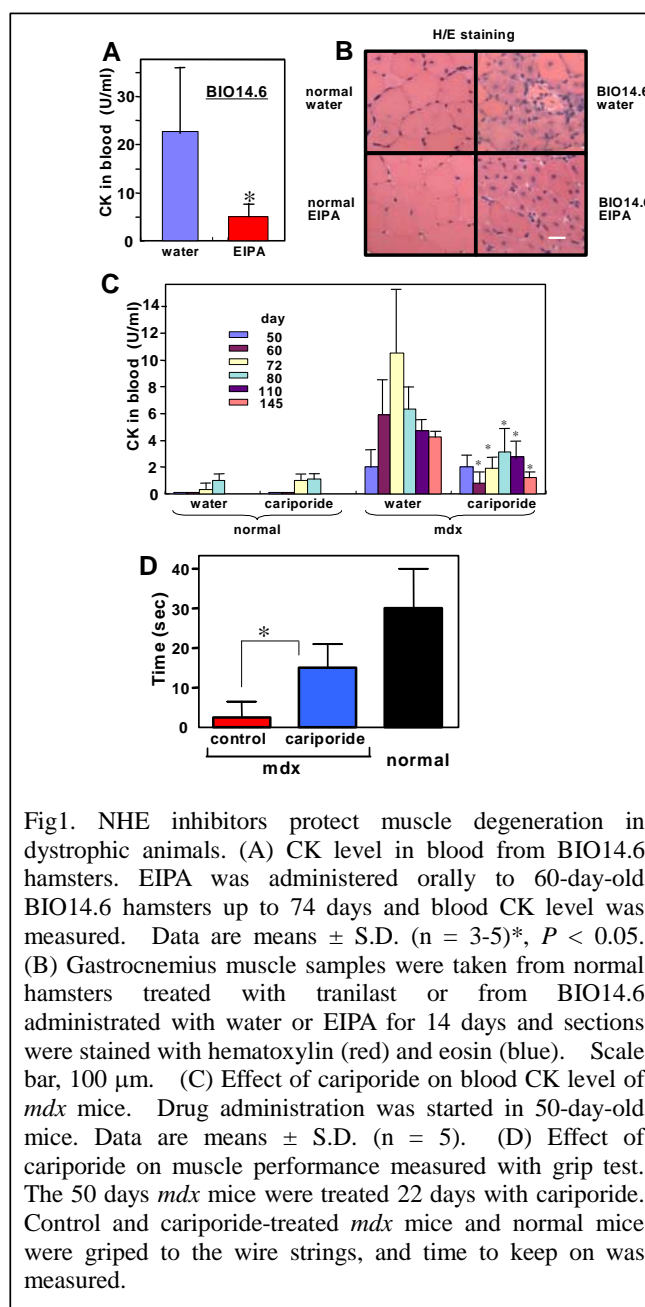


Fig1. NHE inhibitors protect muscle degeneration in dystrophic animals. (A) CK level in blood from BIO14.6 hamsters. EIPA was administered orally to 60-day-old BIO14.6 hamsters up to 74 days and blood CK level was measured. Data are means \pm S.D. (n = 3-5)*, $P < 0.05$. (B) Gastrocnemius muscle samples were taken from normal hamsters treated with tranilast or from BIO14.6 administrated with water or EIPA for 14 days and sections were stained with hematoxylin (red) and eosin (blue). Scale bar, 100 μ m. (C) Effect of cariporide on blood CK level of mdx mice. Drug administration was started in 50-day-old mice. Data are means \pm S.D. (n = 5). (D) Effect of cariporide on muscle performance measured with grip test. The 50 days mdx mice were treated 22 days with cariporide. Control and cariporide-treated mdx mice and normal mice were gripped to the wire strings, and time to keep on was measured.

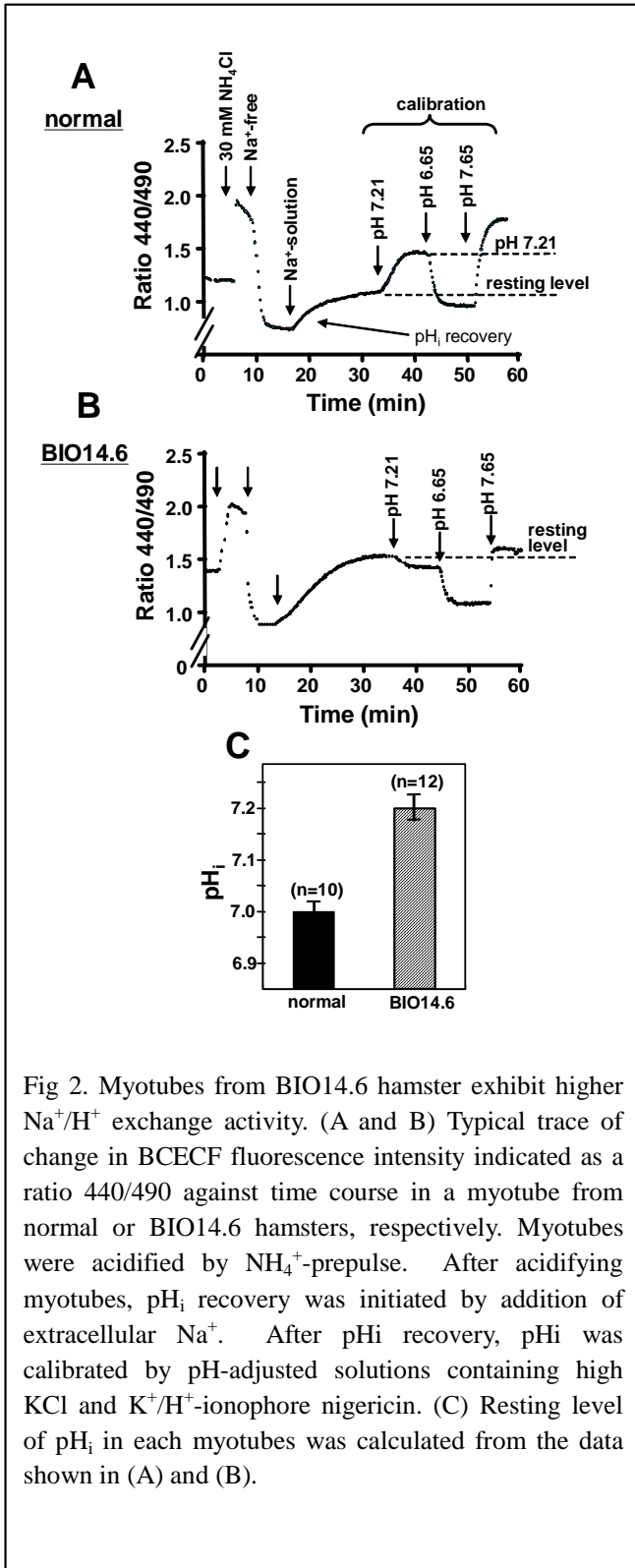


Fig 2. Myotubes from BIO14.6 hamster exhibit higher Na⁺/H⁺ exchange activity. (A and B) Typical trace of change in BCECF fluorescence intensity indicated as a ratio 440/490 against time course in a myotube from normal or BIO14.6 hamsters, respectively. Myotubes were acidified by NH₄⁺-prepulse. After acidifying myotubes, pH_i recovery was initiated by addition of extracellular Na⁺. After pH_i recovery, pH_i was calibrated by pH-adjusted solutions containing high KCl and K⁺/H⁺-ionophore nigericin. (C) Resting level of pH_i in each myotubes was calculated from the data shown in (A) and (B).

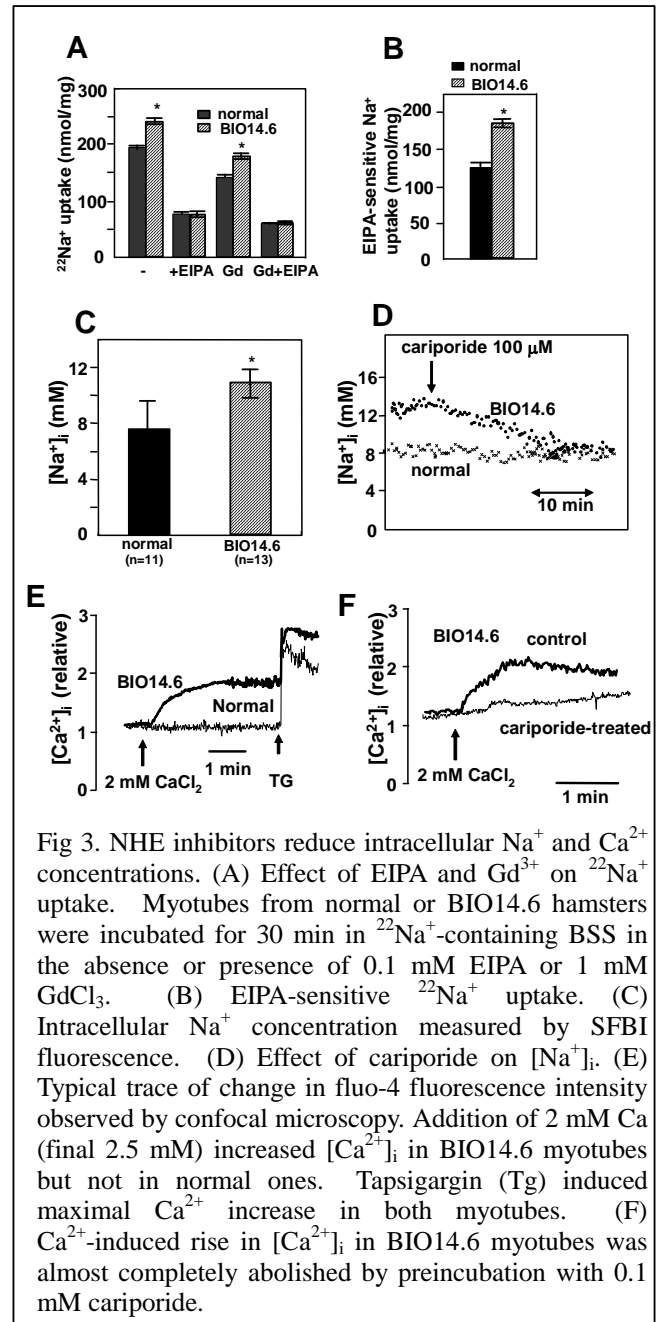


Fig 3. NHE inhibitors reduce intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. (A) Effect of EIPA and Gd³⁺ on ²²Na⁺ uptake. Myotubes from normal or BIO14.6 hamsters were incubated for 30 min in ²²Na⁺-containing BSS in the absence or presence of 0.1 mM EIPA or 1 mM GdCl₃. (B) EIPA-sensitive ²²Na⁺ uptake. (C) Intracellular Na⁺ concentration measured by SFBI fluorescence. (D) Effect of cariporide on [Na⁺]_i. (E) Typical trace of change in fluo-4 fluorescence intensity observed by confocal microscopy. Addition of 2 mM Ca (final 2.5 mM) increased [Ca²⁺]_i in BIO14.6 myotubes but not in normal ones. Tapsigargin (Tg) induced maximal Ca²⁺ increase in both myotubes. (F) Ca²⁺-induced rise in [Ca²⁺]_i in BIO14.6 myotubes was almost completely abolished by preincubation with 0.1 mM cariporide.

0539

Study on functional abnormality of Na⁺-driven ion exchangers in degenerative disease of skeletal and heart muscles

Shigeo Wakabayashi, Yuko Iwata
Department of Molecular Physiology
National Cardiovascular Center Research Institute

Summary

Deficiency of delta-sarcoglycan, a component of the dystrophin-glycoprotein complex, causes muscular dystrophy in BIO14.6 hamsters (BIO). Abnormal ion homeostasis has been suggested to be a prerequisite for muscle dysgenesis. In this study, we tried to identify ion transport pathways responsible for the Ca²⁺ and Na⁺ abnormality in myopathy using myotubes from normal and BIO. We found that the sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) was significantly activated in BIO myotubes, as evidenced by an alkaline shift of the intracellular pH (pH_i) dependence of NHE activity, enhanced ²²Na⁺ influx, and elevated pH_i and cytosolic Na⁺ concentration ([Na⁺]_i). In BIO myotubes, NHE was found to serve as the major Na⁺ influx pathway because the specific inhibitor cariporide markedly (65%) inhibited it. Interestingly, NHE inhibitor significantly reduced the intracellular Ca²⁺ rise and the stretch-induced creatine phosphokinase release in BIO myotubes and ameliorated the myopathic damage *in vivo*, indicating that inhibition of NHE protects the muscle cell injury. Elevation in [Na⁺]_i may contribute to abnormal Ca²⁺ homeostasis by influencing the Na⁺/Ca²⁺ exchange activity. These data suggest that Na⁺-dependent ion exchangers may play an important role in muscle degeneration.