

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01434

研究課題名(和文)筋萎縮に対する再荷重過程における微細筋損傷と酸化ストレスとの関連の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between microscopic damage to the muscle and oxidative stress during muscle atrophy and reloading.

研究代表者

廣瀬 昇 (HIROSE, NOBORU)

帝京科学大学・医療科学部・准教授

研究者番号：60460391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、筋萎縮および再荷重過程の微細筋損傷と酸化ストレスの変動について検証した。ギプス固定により廃用性筋萎縮を誘発し、その後、2週間の再荷重を実施した。再荷重直後に炎症細胞の浸潤を認め、微細な筋損傷が生じている可能性があった。実験期間中の酸化ストレス度は正常範囲内であったが、抗酸化力はギプス固定後2週間で臨床的境界線レベルまで低下し、再荷重1日後にはさらに減少し、その後、正常範囲内に回復する変動が認められた。廃用性筋萎縮および再荷重過程の酸化ストレス度および抗酸化能の変動は、リハビリテーションの臨床における筋萎縮の回復過程への理解に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：While several studies have reported the relationship between these markers and exercise, little is known about the dynamic nature of these markers during muscle atrophy and reloading. Therefore, we examined changes in oxidative stress and microscopic damage to the muscle during muscle atrophy and reloading. Muscle atrophy was induced in mice by casting the limb for 2 weeks. Mice were then subjected to reloading for 2 weeks. There was infiltration of inflammatory cells immediately after reloading and possibly microscopic damage to the muscle occurred. The degree of oxidative stress was within the normal range throughout the experimental period. The antioxidant potential decreased to the clinical borderline level 2 weeks after immobilization, further decreased after 1 day of reloading, and then recovered to within the normal range. Performing d-ROMs and BAP tests may contribute to the understanding to atrophic process of skeletal muscle in clinical practice of rehabilitation.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：筋萎縮 酸化ストレス 再荷重 微細筋損傷 抗酸化力

1. 研究開始当初の背景

リハビリテーション分野において、長期臥床により併発する廃用性筋萎縮への対策は超高齢社会を迎えた本邦にとって重要な課題のひとつである。実際の臨床場面では、廃用性筋萎縮に対する有効かつ効果的な治療は運動療法であり、発症早期から再荷重を含めた積極的な介入を推奨されている。

一般的な運動療法は骨格筋への機械的ストレスが加わるため、骨格筋の微細損傷が生じ筋萎縮を誘発し得るとも考えられているが、実際の運動療法の効果と適応は、いまだ経験則に伴って実施していることも多く、明確な運動療法の設定基準が定まっていない。

一方、タンパク質合成における酸化ストレスの影響は多く報告されている。しかし、筋萎縮および廃用性筋萎縮に対する再荷重に関連する酸化的ストレスマーカーの動態については、完全に理解はされていない¹⁾。そのため、運動療法の一端である再荷重過程に発生する微細筋損傷から酸化ストレスおよび抗酸化力の経過を理解することは、臨床的意義が高いと考えられる。加えて、骨格筋の筋萎縮に關与する因子の一つに酸化ストレスが指摘されているが、特に萎縮筋に着目し、筋内の酸化的ストレスがどのような影響を及ぼすのかについて、現在のところ、解明には至っていない。

2. 研究の目的

上記のように、骨格筋に対するリハビリテーション効果の検証するためには、筋萎縮モデルマウスの再荷重負荷など、微細筋損傷から酸化ストレス・抗酸化力の回復過程の経過を詳細に観察することが重要であると考えられる。また、筋萎縮モデルマウスに対する再荷重負荷の併用療法を実施し、筋萎縮に対する運動療法の効果と適応の評価・検証のために、酸化ストレスおよび抗酸化力を用いることで、新たなバイオマーカーとする可能性を検討することも重要である。加えて、筋萎縮モデルマウスの運動療法が遺伝子発現にどのように影響するか、その作用機序についても解明することも必要と考えられる。

そのため、本研究課題では、以下の2つについて、解明することを研究目的とする。

1. 廃用性萎縮筋に対する再荷重過程で生じる微細筋損傷と酸化ストレス、抗酸化力の変動を評価すること

2. 再荷重といった臨床に即した運動療法の負荷条件において、酸化ストレス、抗酸化力が運動負荷の変動を確認することで、新たなバイオマーカーとなり得るかについて検討すること

3. 研究の方法

(1) 廃用性筋萎縮モデルマウス作製

廃用性筋萎縮モデルマウスを作成するために、ギプス固定により筋萎縮を誘発した²⁾。

なお、筋萎縮は2週間の不動化で十分誘発されることは確認済みである。このため、筋萎縮誘発期間は2週間とした。

(2) 再荷重方法

ギプス固定による2週間の筋萎縮誘発後に、ギプスを除去し、筋萎縮誘発側の下肢を再接地させ通常飼育することで再荷重とした。再荷重期間は1日間および14日間とした。

(3) 採血方法

血液サンプルは、コントロール(Co)、ギプス固定(筋萎縮誘発)1、3、7、14日後(CI1, CI3, CI7, CI14)、再荷重 1、3、7、14日後(RL1, RL3, RL7, RL14)の各時点で採血し、4°Cにて遠心分離(3200rpm, 20分間)して血清を調製した。d-ROMsテスト、BAPテストはこれらの全ての時点を検体として用いた。

(4) 測定項目

1) 全身状態観察・体重

全身状態、特に筋萎縮誘発期間中はギプス固定による損傷、浮腫などが発生していないかについて観察した。また、体重は飼育期間中、各群に対して測定した。

2) 組織学的評価

ヘマトキシリン・エオジン染色(Hematoxylin-eosin stain: H&E染色)

筋萎縮の特徴である筋細胞の縮小や再荷重による筋損傷、筋再生の特徴である中心核、マクロファージや好中球などの炎症細胞浸潤、細胞質間の拡大の有無などを観察した。

筋断面積

筋線維の面積を分析するために、各群の腓腹筋における300本以上の筋線維の断面積を分析した。切片を抗ラミニン2ポリクローナル抗体(L9393, Sigma)で免疫染色し、蛍光顕微鏡(FSX100, オリンパス)にて撮影した。筋断面積(μm^2)をImageJソフトウェアを用いて計測した。

CD11b 免疫蛍光染色

CD11 抗原は単球/マクロファージ、ミクログリアに強く発現し、特にCD11bはマクロファージのマーカーとして、腓腹筋を一次抗体 rat-Anti-mouse CD11b mAb (M1/70) (550282, BD Pharmingen™)、二次抗体 anti-rat Alexa594 を用いて免疫染色を行った。染色後、マクロファージの浸潤の有無について観察した。

3) 酸化ストレスマーカー評価

酸化ストレス度と抗酸化力は、フリーラジカル解析装置(FREE carpe diem, ウィスマー)を用いて測定した。

酸化ストレス度測定(d-ROMsテスト)

酸化ストレス度は生体内の活性酸素やフリーラジカルを直接測定するのではなく、それらにより生じたヒドロペルオキシド(ROOH)濃度を計測し、生体内の酸化ストレス度の状

態を総合的に評価する d-ROMs テストを用いて評価した。

抗酸化力測定 (BAP テスト)

抗酸化力は、抗酸化物質が活性酸素やフリーラジカルに電子を与え、酸化反応を止める還元能力を計測し、抗酸化力を評価するため、BAP テストを用いて評価した。

潜在的抗酸化能 (BAP/d-ROM 比)

BAP/d-ROM 比にて、酸化ストレス度と抗酸化力の平衡を示すため、BAP test と d-ROMs test より測定された値より算出され、潜在的抗酸化能の大きさを評価した。

4) マイクロアレイ解析

骨格筋中の酸化ストレスに関わる遺伝子の発現量について、マイクロアレイ法を用いて解析した。Co、CI、RL1、RL14 の腓腹筋を単離し、筋から RNA を抽出し、cDNA の合成とラベリング、増幅を行った。次にハイブリダイゼーションを実施し、スキャニングを行うことにより mRNA の発現量を分析した。解析として、Co の発現量に対する CI、RL1、RL14 の発現量の変化の比を取り fold change (順に Co vs CI、Co vs RL1、Co vs RL14) として求めた。

4. 研究成果

(1) 全身状態観察・体重

CI では、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋のいずれの筋湿重量も、Co と比べ有意に低下し、特にヒラメ筋ではおよそ半減した。再荷重 1 日 (RL1) では、Co と比較して有意な回復はみられなかったが、再荷重 14 日 (RL14) では回復を示した。ヒラメ筋は、再荷重 14 日後 (RL14) には Co と同程度まで筋湿重量が改善した。すなわち、2 週間のギプス固定により筋萎縮が誘発され、再荷重後 2 週間で Co の筋湿重量に近いレベルにまで回復が認められた。

(2) 組織学的評価

1) H&E 染色

腓腹筋の H&E 染色の結果として、Co と比較して CI と RL1 の筋の萎縮が認められた。CI と RL1 を比較すると、再荷重 1 日で筋肥大はなく、筋萎縮の改善は明らかではなかった。また、マクロファージや好中球などの炎症細胞浸潤は明らかではなかった。一方、RL14 では、筋線維の大きさが回復しており、筋萎縮の改善が示唆された。H&E 染色の観察では、微細な筋の損傷は明確ではなかった。

2) 筋断面積

各群の腓腹筋の断面積の分布は、Co と比較して、CI および RL1 では筋断面積の小さい方への変移がみられた。対照的に、RL14 では筋線維の断面積は回復した。特に $1500 \mu\text{m}^2$ 以下の線維の比率が大きく低下し、全体的に $1500 \sim 3500 \mu\text{m}^2$ の大きさに回復した。

3) CD11b 免疫蛍光染色

腓腹筋の CD11b 免疫染色では、Co と比較し

て、CI と RL1 の筋により多くの陽性の所見がみられた。特 RL1 に最も多く認められた。陽性の部位は、筋細胞の外の間質部位と推測され、マクロファージや好中球などの炎症細胞浸潤を反映していると考えられた。このことから、再荷重直後の RL1 では炎症細胞の浸潤があり、微細な筋損傷が生じている可能性が示唆された。

(3) 酸化ストレスマーカー評価

1) 酸化ストレス度測定 (d-ROMs テスト)

酸化ストレス度は、実験期間を通して正常範囲内であった。また、各測定値は、変動はあるものの有意差は認められなかった。

2) 抗酸化力測定 (BAP テスト)

抗酸化能は、筋萎縮の誘発の CI14 に臨床境界レベルまで低下し、RL1 にさらに酸化力不足レベルまで低下した。その後、正常範囲内に回復した。

3) BAP/ d-ROM 比

BAP/ d-ROM 比は、CI14 および RL1 で Co と比較して有意な低下を示した。これらの期間では、潜在的抗酸化能が低下していることが示唆された。

(4) マイクロアレイ解析

各群における各酸化ストレス関連の遺伝子発現量として、腓腹筋を用いて骨格筋のマイクロアレイ法を実施し、Co の発現量に対する CI14、RL1、RL14 の遺伝子発現量の変化の比を fold change として求めた。筋萎縮誘発により、抗酸化物質である Gpx5 は CI と RL14 で発現量が減少し、Prdx1 は CI で発現量が増加した。Ncf1、Ncf2 は CI、RL1 にて発現量が増加した。Nox4 は CI で発現量が増加した。

以上より、廃用性筋萎縮に対し再荷重を行うと微細な筋損傷を生じてしまうが、その後マクロファージの動員などにより 2 週間程度で筋萎縮が改善することが示された。これは、再荷重程度の負荷でも微細な筋損傷は生じ得るが、その後筋再生が起こって筋萎縮は十分に改善することを示している。

このことは、臨床現場で廃用性筋萎縮に対しリハビリテーションを行う上で、積極的に再荷重刺激を与えることの理論的根拠になり得ると考えられた。再荷重初期は酸化ストレス状態であり、筋再生過程に酸化ストレスが関与していることが考えられ、d-ROMs テストと BAP テストが筋萎縮から再荷重過程において、酸化ストレス状態を把握することに有用であることが示唆された。

また、筋萎縮誘発において抗酸化物質であるグルタチオン系の遺伝子の発現量が減少し、それと同時に酸化ストレスの生成源に關与する Ncf1、Ncf2、Nox4 の遺伝子の発現量が増加し、さらに再荷重初期にも Ncf1、Ncf2 の遺伝子の発現量の増加がみられた。これらより、筋萎縮誘発や再荷重初期において、酸化ストレス関連遺伝子が変動することが示

された。

<引用文献>

1). Powers SK, Radak Z, Ji LL : Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. J Physiol, 2016, 594:5081-5092.

2). Aihara M, Hirose N, Katsuta W, Saito F, Hagiwara H. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. J Phys Ther Sci. 29, 2017, 1779-1783.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Katsuta W, Aihara M, Hirose N, Saito F, Hagiwara H. Changes in oxidative stress severity and antioxidant potential during muscle atrophy and reloading in mice. J. Phys Ther Sci. 査読有, 30, 2018, 42-46.

Aihara M, Hirose N, Katsuta W, Saito F, Hagiwara H. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. J Phys Ther Sci. 査読有, 29, 2017, 1779-1783.

〔学会発表〕(計16件)

勝田若奈, 相原正博, 廣瀬昇, 齋藤史明, 萩原宏毅. 廃用性筋萎縮と再荷重過程の酸化ストレス度および抗酸化力の変化. 第3回日本筋学会学術集会. 2017.

相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重が微細筋損傷および IL-6, IL-15 に与える影響. 第90回理学療法科学学会. 2017.

勝田若奈, 廣瀬昇, 相原正博, 齋藤史明, 萩原宏毅. ギプス固定と再荷重が酸化ストレス度および抗酸化力に及ぼす影響. 第90回理学療法科学学会. 2017.

相原正博, 勝田若奈, 廣瀬昇, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. 廃用性筋萎縮に対する再荷重の影響の検討 微細筋損傷と IL-6, IL-15 に着目して. 第52回日本理学療法学会. 2017.

勝田若奈, 廣瀬昇, 相原正博, 齋藤史明, 萩原宏毅. 筋萎縮後の再荷重による微細筋損傷と炎症性サイトカインや酸化ストレスマーカーとの関連. 第52回日本理学療法学会. 2017.

廣瀬昇. 慢性心不全の基本病態と治療戦略. 第4回山梨県内部障害研究会(招待講演). 2017.

相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重の過程における IL-6, IL-15 およびマイオカインの変動. 21th

International Meeting of Physical Therapy Science (国際学会). 2017.

相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重のプロセスにおけるサイトカインと酸化ストレスマーカーの動態. 第2回日本筋学会学術集会. 2016.

勝田若奈, 廣瀬昇, 相原正博, 齋藤史明, 萩原宏毅. ギプス固定と再荷重が骨格筋に及ぼす影響～筋病理、炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーの解析～. 第83回理学療法科学学会. 2016.

相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. マイオカイン IL-6, IL-15 の廃用性筋萎縮と再荷重の過程における変動. 第83回理学療法科学学会. 2016.

相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重のプロセスにおけるマイオカインの変動. 第51回日本理学療法学会. 2016.

廣瀬昇, 森優樹, 勝田若奈, 相原正博, 齋藤史明, 萩原宏毅. 廃用性筋萎縮誘発と再荷重のプロセスにおける炎症性サイトカインや酸化ストレスマーカーの動態. 第51回日本理学療法学会. 2016.

相原正博, 廣瀬昇, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. 新規筋萎縮誘発法であるベルク口法とギプス固定法との比較検討. 第2回日本基礎理学療法学会学術集会, 日本基礎理学療法学会第20回学術大会合同学会. 2015.

相原正博, 廣瀬昇, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. ギプス固定法に代わる新規筋萎縮誘発法の開発. 第1回日本筋学会学術集会. 2015.

相原正博, 廣瀬昇, 齋藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅. マウスにおける筋萎縮誘発方法の比較検討～ギプス固定法, 後肢懸垂法とプラスチックチューブ固定法との比較～. 第77回理学療法科学学会. 2015.

廣瀬昇, 相原正博, 齋藤史明, 萩原宏毅. 骨格筋萎縮に対するポリフェノールの長期的効果と作用機序の検討. 第77回理学療法科学学会. 2015.

〔図書〕(計1件)

有馬慶美編集, 廣瀬昇分担, 文光堂, 概説理学療法 第2版, 2015, 256.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

廣瀬 昇 (HIROSE, NOBORU)

帝京科学大学・医療科学部・准教授

研究者番号：60460391

(2)研究分担者

斉藤 史明 (SAITO, FUMIAKI)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40286993

萩原 宏毅 (HAGIWARA, HIROKI)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：80276732

〔その他の研究協力者〕