

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12584

研究課題名(和文) 抗炎症・抗酸化物質と超音波エネルギーの相乗効果に着目した筋萎縮予防法の創成

研究課題名(英文) Development of therapeutic regimens against muscle atrophy using anti-inflammatory compounds, antioxidants and ultrasound irradiation

研究代表者

前重 伯壮 (Maeshige, Noriaki)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：90617838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症や癌性カヘキシーで生じる炎症性筋萎縮に対する抗炎症・抗酸化物質、超音波照射の抑制効果を検証し、消耗状態の患者に適用できる非侵襲的な治療手段の確立を目指した。炎症刺激物質であるリポポリサッカライドの添加によって筋管細胞の萎縮が惹起された。短鎖脂肪酸の酪酸、 $\omega$ -3系多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、カルテノイドのアスタキサンチンが炎症性筋萎縮を有意に抑制した。脂肪酸においては、高濃度添加によって筋萎縮が増悪し、適切な用量管理の必要性が示唆された。低強度超音波による炎症性筋萎縮の抑制効果、および酪酸のヒストンアセチル化作用に対する超音波照射の促進効果が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the inhibitory effects of anti-inflammatory compounds, antioxidants, and ultrasound irradiation on inflammation-induced skeletal muscle atrophy in order to develop non-invasive therapy against the muscle atrophy in severe patients. Lipopolysaccharide induced myotube atrophy, and this muscle atrophy was inhibited by the administration of butyrate of short chain fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, or astaxanthin of carotenoid. High concentration of fatty acids deteriorated the muscle atrophy, suggesting the importance of dose-control upon administrating them. Low-intensity ultrasound inhibited the muscle atrophy and promoted the histone acetylation by butyrate.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：超音波 短鎖脂肪酸 多価不飽和脂肪酸 筋萎縮

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症や外科的侵襲および癌性カヘキシーでは炎症性サイトカインの血中濃度上昇により骨格筋の異化が亢進する。骨格筋萎縮の抑制には荷重負荷や電気刺激による骨格筋収縮が効果的である。一方、筋収縮はエネルギーを必要とし、また、電気刺激や荷重負荷は消耗状態にある患者に苦痛を与えうる。そのため、筋収縮に依存しない筋萎縮抑制方法の確立が侵襲下および消耗状態の患者のリハビリテーションに求められる。超音波は、サイトカイン刺激による炎症反応を抑制することが報告されており、その抗炎症作用が示唆されているが、骨格筋萎縮予防手段の確立には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究は癌性カヘキシーや敗血症、外科侵襲後の患者のリハビリテーションのために、苦痛を伴わない筋萎縮抑制方法を開発することを目的とした。具体的には、超音波療法および抗炎症および抗酸化物質による炎症反応抑制による筋萎縮抑制効果、およびそれらの併用の可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

#### ・炎症刺激モデルの確立

グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) は敗血症の増悪因子であり、炎症性サイトカインを顕著に上昇させる炎症刺激物質である。本研究では LPS による炎症刺激モデルを採用した。

・短鎖脂肪酸の効果検証：短鎖脂肪酸の中でも生理活性の高い酪酸の筋萎縮予防効果を検証した。

#### ・-3系多価不飽和脂肪酸の効果検証

-3 多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) およびエイコサペンタエン酸 (EPA) が抗炎症作用を示すことが報告されているため、これらの筋萎縮抑制作用を検証した。

#### ・カルテノイドの効果検証

カルテノイドの中でも、アスタキサンチンが強い抗酸化作用を発揮することが報告されているため、この筋萎縮抑制効果を検証した。

#### ・超音波照射の効果検証

すでに確立している超音波照射の実験系にて、炎症による筋萎縮に対する超音波療法の予防効果を検証した。周波数 3MHz、照射時間率 20%、照射時間 30 秒の超音波照射条件とした。

#### ・抗炎症・抗酸化物質と超音波療法の併用効果の検証

抗炎症・抗酸化物質を培養液に添加した状態で超音波を照射し、抗炎症・抗酸化物質の作用に対する促進効果を検証した。

### 4. 研究成果

#### ・LPS による筋萎縮の惹起

1  $\mu\text{g/ml}$  の LPS 添加および 24 時間の培養によって、筋管細胞が萎縮 (細胞径、筋原線維蛋白量、ミオシン重鎖タンパク量の減少) することが確認され、炎症性筋萎縮モデルが確立した。

・短鎖脂肪酸による炎症性筋萎縮抑制効果  
低濃度の酪酸 (1mM) の添加によって炎症性筋萎縮が有意に抑制されることが確認された。また、それと同時に筋管細胞においてヒストンのアセチル化の増加が確認され、酪酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としての作用が効果の機序として示唆された。一方、高濃度の酪酸 (4mM) の添加は筋萎縮を促進させることがわかった。

#### ・-3系多価不飽和脂肪酸による炎症性筋萎縮抑制効果

25  $\mu\text{M}$  および 50  $\mu\text{M}$  の DHA および EPA 添加によって炎症性筋萎縮が有意に抑制されることが確認された。一方、100  $\mu\text{M}$  の高濃度添加では、筋萎縮が促進されることがわかった。

#### ・アスタキサンチンによる炎症性筋萎縮抑制効果

50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$  の内、100  $\mu\text{M}$  の添加によって炎症性筋萎縮が最も抑制されることが明らかになった。また、LPS による酸化ストレスの上昇が、アスタキサンチンの添加によって有意に抑制されたため、抗酸化作用が筋萎縮抑制の機序として示唆された。

・超音波の炎症性筋萎縮抑制効果と併用効果  
0.5 ~ 1.5  $\text{W/cm}^2$  の強度を検討し、0.5  $\text{W/cm}^2$  の照射によって炎症性筋萎縮が強く抑制されることが明らかになった。また、LPS 刺激による p38 MAP キナーゼのリン酸化亢進が超音波刺激によって抑制されていることが確認され、超音波刺激による筋萎縮抑制効果の機序が示唆された。1mM の酪酸添加中に細胞に超音波照射を行うことによって、酪酸によるヒストンのアセチル化が有意に促進されることが明らかになり、超音波刺激が酪酸の生理作用を高めることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Noriaki Maeshige, Yuka Koga, Masayuki Tanaka, Michiko Aoyama-Ishikawa, Makoto Miyoshi, Makoto Usami, Hidemi Fujino. Low-Intensity Ultrasound Enhances Histone Acetylation and Inhibition of IL-6 mRNA Expression by Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate in Fibroblasts.

Journal of Ultrasound in Medicine, 査読有, Vol. 36, No. 5, 2017, pp.879-885

Noriaki Maeshige, Kazuhiro Torii, Hiroto Tabuchi, Midori Imai, Mikiko Uemura, Michiko Aoyama-Ishikawa, Makoto Miyoshi, Hidemi Fujino, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Inhibitory effects of short-chain fatty acids and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on pro-fibrotic factors in dermal fibroblasts. Eplasty, 査読有, in press

Kazuhiro Torii, Noriaki Maeshige, Michiko Aoyama-Ishikawa, Makoto Miyoshi, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Combination therapy with butyrate and docosahexaenoic acid for keloid fibrogenesis: an in vitro study. Anais Brasileiros de Dermatologia, 査読有, Vol. 92, No. 2, 2017, pp.184-190

Yuka Koga, Noriaki Maeshige, Hiroto Tabuchi, Mikiko Uemura, Michiko Aoyama-Ishikawa, Makoto Miyoshi, Chikako Katakami, Makoto Usami. Suppression of fibrosis in human pterygium fibroblasts by butyrate and phenylbutyrate. International Journal of Ophthalmology, 査読有, Vol. 10, No. 9, 2017, pp.1337-1343

Toshiyuki Maezawa, Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Noriaki Maeshige, Hiroyo Kondo, Akihiko Ishihara, Hidemi Fujino. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress. The Journal of Physiological Sciences, 査読有, Vol. 67, No. 5, 2017, pp.603-611

Motoki Kai, Makoto Miyoshi, Mayu Fujiwara, Yuya Nishiyama, Taketo Inoue, Noriaki Maeshige, Yasuhiro Hamada, Makoto Usami. A lard-rich high-fat diet increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in endotoxemic rats. Journal of surgical research, 査読有, Vol. 212, 2017, pp.22-32

Mikiko Uemura, Noriaki Maeshige, Akane Ochi, Yuka Koga, Michiko Aoyama-Ishikawa, Hayato Yamashita, Makoto Miyoshi, Taketo Inoue, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Butyrate/DHA induce apoptosis and regulate apoptosis-related factors in keloid fibroblasts. Wound Repair and Regeneration, 査読無, Vol. 24, No. 4, 2016, pp.A36

Yuka Koga, Noriaki Maeshige, Mikiko Uemura,

Akane Ochi, Michiko Aoyama-Ishikawa, Makoto Miyoshi, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Anti-inflammatory and antifibrogenic effects of butyrate/DHA on lipopolysaccharide stimulated dermal fibroblasts. Wound Repair and Regeneration, 査読無, Vol 24, No. 4, 2016, pp.A36

〔学会発表〕(計 10 件)  
西田 裕一、C2C12 筋管細胞を用いたエンドトキシン誘発性筋萎縮に対する  $\omega$ -3 系多価不飽和脂肪酸の予防効果、第 52 回日本理学療法学会、2017

上野 瑞季、悪液質に伴う筋萎縮に対するパルス超音波が炎症性サイトカイン発現及び MAP キナーゼに与える効果、第 52 回日本理学療法学会、2017

Mizuki Ueno, Pulsed ultrasound stimulation prevents bacteria lipopolysaccharide-induced muscle wasting myotubes, Experimental Biology 2016, 2016

前重 伯壮、酪酸によるヒストンアセチル化および IL-6 mRNA 発現抑制に対する低出力超音波の促進効果、第 24 回日本物理療法学会、2016

Noriaki Maeshige, Low-intensity ultrasound enhances histone acetylation and improves anti-inflammatory effects by short chain fatty acid treatments in human dermal fibroblasts, Experimental Biology 2015, 2015

Makoto Miyoshi, Oral tributyrin attenuates lipopolysaccharide-induced intestinal injury especially in jejunum and ileum via down regulation of toll like receptor 4, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015

Yuya Nishiyama, Skeletal muscle atrophy is induced at early phase in endotoxemic rats and oral administration of tributyrin attenuates the atrophy, The 37th congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition, 2015

上野 瑞季、C2C12 筋管細胞を用いた悪液質性筋萎縮に対するパルス超音波の予防効果と至適出力強度の検討、第 50 回日本理学療法学会、2015

上野 瑞季、リポポリサッカライド誘導性の筋萎縮に対する低強度パルス超音波の予防効果、第 23 回日本物理療法学会、2015

2015

三好 真琴、エンドトキシシンショックの病態における早期の筋萎縮と tributyrin 経口投与による抑制効果、第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2015

〔図書〕(計 2 件)

前重 伯壮、他、文光堂、実学としての理学療法概観 物理療法学、2015、442 (118-113)

前重 伯壮、他、文光堂、理学療法を活かす褥瘡ケア 超音波療法/座位姿勢/その他の姿勢・動作/移乗動作/運動療法・物理療法による褥瘡予防/褥瘡を悪化させない運動療法、2016、153 (49-55、68-87、93-99)

〔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 1 件)

発明の名称：  
発明者：出願番号：特願 2012-034793 登録番号：

名称：皮膚線維化抑制剤  
発明者：宇佐美 眞、前重 伯壮、鳥井 一宏、寺師 浩人、濱田 康弘  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許第 5928787 号  
取得年月日：平成 28 年 5 月 13 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前重 伯壮 (MAESHIGE, Noriaki)  
神戸大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：90617838

### (2) 研究分担者

三好 真琴 (MIYOSHI, Makoto)  
神戸大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：50433389

### (3) 連携研究者

藤野 英己 (FUJINO, Hidemi)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：20278998

金指 美帆 (KANAZASHI, Miho)  
神戸大学・大学院保健学研究科・研究員  
研究者番号：10734527

石川 倫子 (ISHIKAWA, Michiko)  
神戸大学・大学院保健学研究科・研究員  
研究者番号：40566121

宇佐美 眞 (USAMI, Makoto)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：00193855

### (4) 研究協力者

西田 裕一 (NISHIDA, Yuichi)  
谷川 隼人 (TANIGAWA, Hayato)  
鳥井 一宏 (TORII, Kazuhiro)  
田淵 寛人 (TABUCHI, Hiroto)  
古賀 由華 (KOGA, Yuka)  
越智 茜 (OCHI, Akane)  
植村 弥希子 (UEMURA, Mikiko)  
上野 瑞季 (UENO, Mizuki)