

令和元年6月9日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01523

研究課題名(和文)新規筋萎縮誘発法を用いたストレッチングとレスベラトロール内服の併用効果の検討

研究課題名(英文) Evaluation of combined effect of stretching and resveratrol oral administration by using new muscle atrophy induction method

研究代表者

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

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)：私たちは本研究課題で、独自に開発した新規筋萎縮誘発法の有用性を明らかにした。また、野生型 C57BL6マウスに対してギプス固定法にて筋萎縮を誘発し、その後再荷重を行うプロセスにおいて、酸化ストレス、マイオカイン、マトリックスメタロプロテアーゼなどの多くのファクターが変動することを見出した。さらに、筋萎縮誘発モデルマウスに対して、ストレッチングおよびレスベラトロールの投与を実施し、その併用効果を検討した。その結果、併用群と対照群では体重と骨格筋湿重量に関して明白な差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期間の不動による廃用性筋萎縮はADL(日常生活動作)の大きな低下を引き起こすが、臨床的に効果的な介入方法は確立されていない。今回筋萎縮誘発モデルマウスに対して、ストレッチングおよびレスベラトロールの投与を実施しその併用効果を検討したが、表現型に明白な効果は認められなかった。一方、筋萎縮から再荷重のプロセスにおいて、酸化ストレス度マーカー、マイオカイン、マトリックスメタロプロテアーゼの中に大きな変動を示すものがあることを見出した。この知見は、今後の病態の理解や治療法の開発の手がかりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we clarified the usefulness of our new and original method for inducing muscle atrophy. In addition, we found that many factors related to oxidative stress, myokine, and matrix metalloproteinase show dynamic change in the process of muscle atrophy and reloading. Furthermore, we examined the effect of stretching and resveratrol administration combined therapy to muscle atrophy-induced model mice. As a result, no clear difference was found for body weight and skeletal muscle wet weight between the combined therapy group and the control group.

研究分野：筋生物学

キーワード：筋萎縮 ストレッチング レスベラトロール 酸化ストレス マイオカイン マトリックスメタロプロテアーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 長期間にわたるギプス固定などの不動によって、廃用性の筋萎縮が生じる。このため、筋力低下や筋拘縮により柔軟性が制限され、ADLの低下を引き起こす。臨床的には、その改善のためにストレッチングが行われているが、効果的な介入方法は確立されていない。私たちは前課題で、ポリフェノール的一种レスベラトロールが、先天性筋ジストロフィーモデルマウスに対して筋線維化を改善することにより筋萎縮、筋力低下を改善させることを見出した。

(2) 今回、その病態に線維化が関係しているとされる廃用性筋萎縮に着目した。レスベラトロールが先天性筋ジストロフィーの慢性の筋線維化を改善するのであれば、同様に線維化を改善することにより廃用性筋萎縮も改善できるのではないかと考えた。さらに、臨床で廃用性筋萎縮や線維化の防止のため日常的に実施されているストレッチングを組み合わせることで、その相乗効果でより高い効果が得られるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下の2つを解明することを研究目的とした。

(1) 独自に開発したマジックテープを用いた方法（ベルクロ法）で筋萎縮を誘発し、その効果を従来から筋萎縮誘発法として使用されているギプス固定法と比較検討する。

(2) 筋萎縮モデルマウスを用いて、筋萎縮から再荷重の過程でどのような病態が関与しているか、特に筋萎縮、筋線維化に関係するファクターに注目して明らかにする。さらに、ストレッチングとレスベラトロール内服併用療法を実施し、その効果を病態に注目して検討する。

3. 研究の方法

(1) 9週齢の野生型 C57BL6 マウスに対して、独自に開発したマジックテープを用いた方法（ベルクロ法）で筋萎縮を誘発し、その効果を従来から筋萎縮誘発法として使用されているギプス固定法と比較検討した。筋萎縮誘発は、膝関節伸展、足関節底屈位にて実施し、2週間の固定期間を設けた。マウスは、前肢と一側後肢を用いてケージ内を移動し、餌と水は自由に摂取できるようにした。飼育中にベルクロ法やギプス固定法による浮腫や緩みが生じた際には、その都度巻き直しを行った。

(2) 9週齢の野生型 C57BL6 マウスを使用し、コントロール群（Co群）、ギプス固定群（CI群）、再荷重1日群（RL1群）、再荷重14日群（RL14群）に分けた。2週間の固定期間後、ギプス包帯を除去し、再荷重を1日間、14日間行った。実験期間終了後に、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋を単離した。筋湿重量計測を実施し、凍結横断切片を作成した。HE染色、免疫染色にて組織学的解析を実施した。

(3) 各群のマウスより採血し血清を調製し、酸化ストレスに関するマーカー（酸化ストレス度、抗酸化力）を測定した。

(4) 各群の骨格筋中の遺伝子発現量を、マイクロアレイ法にて網羅的に解析した。また、血清中のマイオカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ（Matrix metalloproteases: MMPs）の濃度をマルチプレックスサスペンションアレイ解析にて定量化した。

(5) ギプス固定後に、ストレッチング（徒手的に20分間週2回実施）およびレスベラトロール（4g/kg食餌中に混ぜる）投与を2週間実施した（併用群）。実験期間終了後に骨格筋を単離し、RL14群を対照としてその効果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型 C57BL6 マウスに対してベルクロ法で筋萎縮を誘発し、その効果を従来から筋萎縮誘発法として使用されているギプス固定法と比較検討を行った（図1）。骨格筋重量と筋線維径分布の解析から、ベルクロ法はギプス固定法と近似した筋萎縮がみられた。一方、ギプス固定に比較して、ベルクロ法で皮膚損傷や浮腫の出現頻度は有意に減少した。新規ベルクロ法は、従来のギプス固定法を代替しうる有効な筋萎縮誘発法であることが明らかになった（発表論文④）。

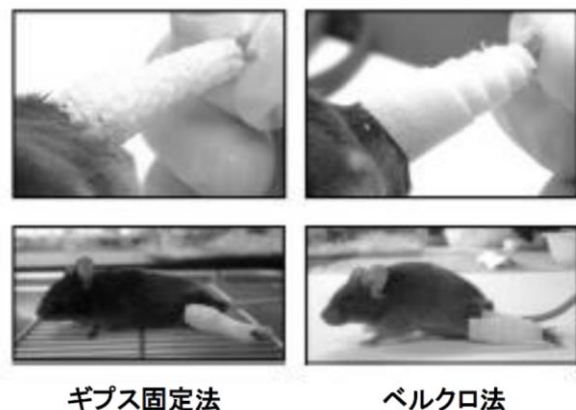


図1 筋萎縮誘発法

(2) 野生型 C57BL6 マウスに対して筋萎縮を誘発しその後再荷重を行うプロセスにおける、酸化ストレスに関するマーカーの変化を検討した。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。(発表論文②)

(3) 筋萎縮と再荷重の過程におけるマイオカイン IL-6 と IL-15 の変動を検討した。骨格筋のマイクロアレイ法では、Co 群と比較して CI 群で IL-6 が約 20 倍に発現が上昇し、IL-15 は RL1 群で 0.5 倍に発現量が減少していた。血清での IL-6、IL-15 は Co 群、RL1 群、CI 群の順に高値を示した。

(4) 筋萎縮と再荷重の過程における MMPs の変動を検討した。腓腹筋の免疫染色では、MMP-2 は RL1 群で、MMP-9 は RL14 群で強い染色がみられた (図 2)。骨格筋中の MMP-2 は、RL1 群で遺伝子発現量が増加した。一方 MMP-9 は、L14 群で遺伝子発現量が増加した。骨格筋中の MMPs は、MMP-2、9 のみならず、MMP-3、13、14 も大きな変動を示した。血液中の MMP-2 は有意な変動は認められなかったが、MMP-9 は CI 群で有意に上昇し、RL1 群で低値を示した (図 3)。

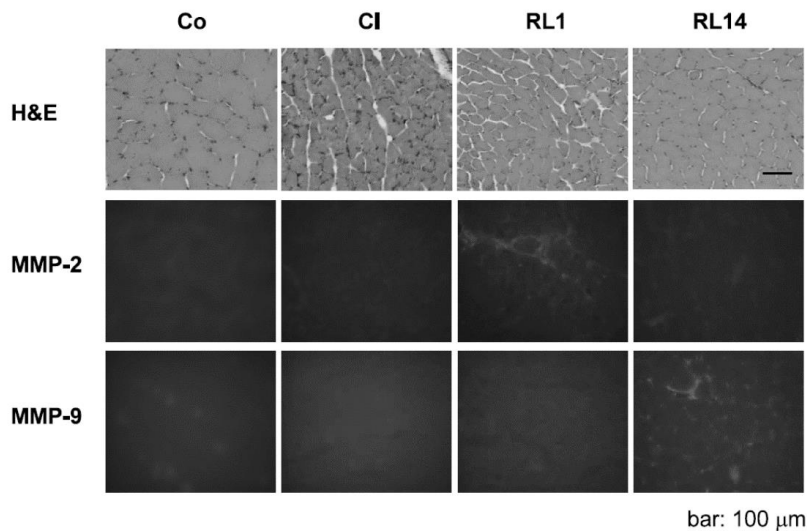


図 2 MMPs の免疫染色

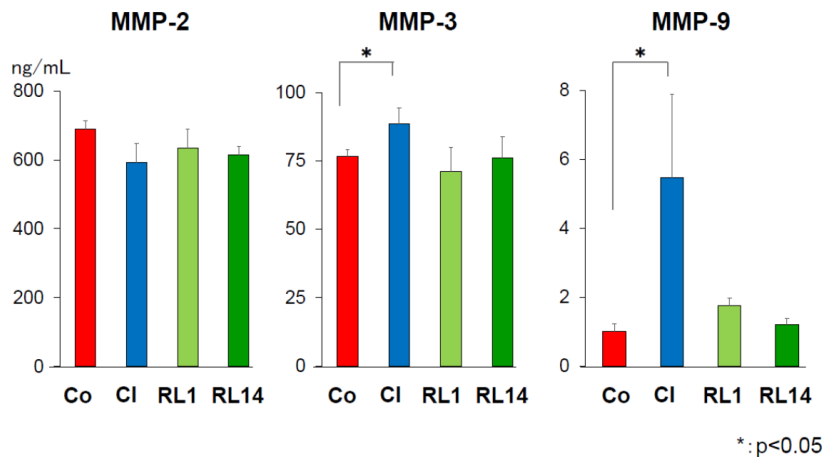


図 3 MMPs の血中濃度

(5) 筋萎縮誘発モデルマウスに対して、ストレッチングおよびレスベラトロールの投与を実施し (併用群)、RL14 群を対照としてその効果を検討した。その結果、併用群と対照群では、体重と骨格筋湿重量に関して明らかな有意な差はみられなかった。

(6) 成果の位置づけとインパクト、今後の展望

これらの結果とまとめると、

① 独自に開発したバルクロ法で筋萎縮を誘発し、その効果を従来から筋萎縮誘発法として使用されているギプス固定法と比較検討を行った。その結果、この新規筋萎縮誘発法は、従来のギプス固定法を代替しうる有効な筋萎縮誘発法であることが明らかになった。

② 筋萎縮と再荷重の過程において、酸化ストレスに関するマーカー、マイオカイン、MMPs な

ど多くのファクターが、骨格筋と血清において異なる動態で大きな変動を示すことが明らかになった。

③ 廃用性筋萎縮誘発モデルにストレッチングとレスベラトロール併用療法を実施したところ、体重や骨格筋湿重量などの表現型には明白な差はみられなかった。

新規筋萎縮誘発法のベルクロ法は、簡便で繰り返し実施しやすい利点があり、今後の筋萎縮モデルに対する治療的介入の研究の有用なツールになることが期待される。

従来、筋ジストロフィーなどの骨格筋に大きな障害をきたす筋疾患では、壊死再生という病態に関連して酸化ストレス、マイオカイン、MMPsなどが重要な役割を果たすことが知られていた(文献①)。今回の結果から、これらのファクターが臨床的に頻度の高い廃用性筋萎縮の病態にも何らかの重要な役割を果たしていることが示唆され、病態のメカニズムの理解の手がかりになると考える。

ストレッチングとレスベラトロール併用療法で、体重や骨格筋湿重量などの表現型には明白な効果はみられなかった。一方で、上述のように筋萎縮と再荷重の過程において、酸化ストレスマーカー、マイオカイン、MMPsなどは大きく変動している。併用療法はこれらの動態に改善効果をもたらしている可能性があり、現在詳細な検討を進めている。また、本研究では介入期間が2週間であったが、十分な効果を得るには期間が短かったことも考えられる。今後、さらに介入期間や方法を最適化することを目指したい。

<引用文献>

① Ogura Y, Tajrish MM, Sato S, Hindi SM, Kumar A. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol.* 2, 2014, 1-11

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Ohsawa Y, [Hagiwara H](#), Nishimatsu SI, Hirakawa A, Kamimura N, Ohtsubo H, Fukai Y, Murakami T, Koga Y, Goto YI, Ohta S, Sunada Y, KN01 Study Group. Taurine supplementation for prevention of stroke-like episodes in MELAS: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 査読有. 90, 2018, 529-36. doi: 10.1136/jnnp-2018-317964
- ② 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. *Journal of Physical Therapy Science.* 査読有. 30(1), 2018, 42-46. doi.org/10.1589/jpts.30.42
- ③ Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, [Hagiwara H](#), Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y. Cleavage of beta-dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle without MMP-2 and MMP-9. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有. 492(2), 2017, 199-205. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.048
- ④ [Aihara M](#), [Hirose N](#), Katsuta W, [Saito F](#), Maruyama H, [Hagiwara H](#). A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. *Journal of Physical Therapy Science.* 査読有. 29(10), 2017, 1779-1783. doi:10.1589/jpts.29.1779
- ⑤ Huang S, [Hagiwara H](#), Shimizu T, Wang W: Pax3 preserves myoblasts undifferentiated by suppressing MyoD and enhancing cell cycle regulators. *Int J Clin Exp Pathol.* 査読有. 10(3), 2017, 3043-3051

[学会発表] (計 15 件)

- ① [相原正博](#), [斉藤史明](#), 丸山仁司, [萩原宏毅](#). 廃用性筋萎縮と再荷重の過程におけるマトリックスメタロプロテアーゼとマイオカインの変動. 第23回日本基礎理学療法学会学術大会. 2018年12月16日
- ② [相原正博](#), [斉藤史明](#), 丸山仁司, [萩原宏毅](#). 廃用性筋萎縮と再荷重プロセスにおけるマトリックスメタロプロテアーゼの変動. 第5回日本サルコペニアフレイル学会. 2018年11月10日
- ③ [相原正博](#), [廣瀬昇](#), [斉藤史明](#), 丸山仁司, [萩原宏毅](#). マトリックスメタロプロテアーゼの廃用性筋萎縮と再荷重過程における動態. 第4回日本筋学会学術集会. 2018年8月10日
- ④ [相原正博](#), [斉藤史明](#), 丸山仁司, [萩原宏毅](#). 廃用性筋萎縮モデルマウスにおけるマイオカインとマトリックスメタロプロテアーゼの変動. 第97回理学療法科学学会学術大会. 2018年6月23日
- ⑤ [斉藤史明](#), [萩原宏毅](#), 真先敏弘, 池田美樹, 松村喜一郎. 遺伝性筋疾患の病態解析と遺伝子/蛋白質治療に関する研究(筋強直性ジストロフィーに対するゲノム編集治療). 平成29年度「西野班」班会議. 2017年12月4日
- ⑥ [Hagiwara H](#), [Aihara M](#), Katsuta W, [Hirose N](#), Masaki T, Matsumura K, Sonoo M, [Saito F](#). Changes in myokines IL6 and IL15 in serum and muscle during muscle atrophy and

reloading in the mouse disuse model. XXIII World Congress of Neurology. 2017年9月17日

- ⑦ 勝田若奈, 廣瀬昇, 相原正博, 斉藤史明, 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年8月4日
- ⑧ 相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 斉藤史明, 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学術大会. 2017年6月24日
- ⑨ 勝田若奈, 廣瀬昇, 相原正博, 斉藤史明, 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学術大会. 2017年6月24日
- ⑩ 相原正博, 勝田若奈, 廣瀬昇, 斉藤史明, 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回日本理学療法学術大会. 2017年5月13日
- ⑪ 勝田若奈, 廣瀬昇, 相原正博, 斉藤史明, 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回日本理学療法学術大会. 2017年5月14日
- ⑫ 相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 斉藤史明, 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年8月6日
- ⑬ 相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 斉藤史明, 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学術大会. 2016年6月25日
- ⑭ 相原正博, 勝田若奈, 森優樹, 廣瀬昇, 斉藤史明, 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回日本理学療法学術大会. 2016年5月28日
- ⑮ Hagiwara H, Aihara M, Hirose N, Ohkuma H, Masaki T, Matsumura K, Sonoo M, Saito F. Dynamics of myokines in the process of muscle atrophy and reloading in the mouse disuse model. 第57回日本神経学会学術大会. 2016年5月20日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

帝京科学大学 教員詳細 萩原宏毅

<http://www.ntu.ac.jp/research/kyoin/iryu/pt/hagiwara.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：斉藤 史明

ローマ字氏名：(SAITO, Fumiaki)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：40286993

研究分担者氏名：廣瀬 昇

ローマ字氏名：(HIROSE, Noboru)

所属研究機関名：帝京科学大学

部局名：医療科学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：60460391

研究分担者氏名：相原 正博
ローマ字氏名：(AIHARA, Masahiro)
所属研究機関名：帝京科学大学
部局名：医療科学部
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：90736472

(2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。