

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01511

研究課題名(和文)筋浮腫の治療戦略を探る-リンパ管形成とそのメカニズムより

研究課題名(英文)Exploration of treatment strategies for muscle edema: lymphangiogenesis and its mechanism

研究代表者

紀 瑞成 (Ji, Rui-Cheng)

大分大学・福祉健康科学部・准教授

研究者番号：60305034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、尾部懸垂(TS)によるマウス筋萎縮モデルを用いて、下腿筋力・筋線維横断面積(CSA)・リンパ管数・リンパ管新生因子などを解析し、萎縮筋に対する運動刺激がリンパ管の形態応答に及ぼす影響およびそのメカニズムを検証した。リンパ管の総数および筋線維あたりのリンパ管数はTS 4週間に有意な低値を示した。さらに、リンパ管内皮細胞増殖因子であるVEGF-C/-Dとそれらの受容体VEGFR-3などの発現は筋萎縮により変化することが示唆された。なお、最大等尺性収縮時の足関節底屈トルク値はTS 2週間および4週間に減少したが、低周波電気刺激によるCSAの増加が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期臥床や外科術後の固定等による不動状態は、筋萎縮とともに筋浮腫を引き起こす。萎縮筋の代謝産物などを含む組織液の回収には、リンパ管をはじめ、筋ポンプ作用に代表される力学刺激が重要と考えられる。本研究は精度の高い運動負荷量設定を可能にした装置を用い、運動量と効果と生化学的結果との関連性の検証を可能にし、科学的根拠に基づく適切な理学療法の解明が可能となった。特に、萎縮筋におけるリンパ管系の分布・構造・機能的応答を明らかにし、その治療戦略の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the muscle atrophy mouse model induced by tail suspension (TS) was used to analyze the leg muscle strength and cross-sectional area (CSA), the number of lymphatic vessels, and lymphangiogenic factors. The effect and mechanism were evaluated on the morphological response of lymphatic vessels to exercise stimulation for atrophied muscles. The total number of lymphatic vessels, and the number of lymphatic vessels per muscle fiber were significantly lower in TS group for 4 weeks. The expression of VEGF-C/-D, and VEGFR-3 was also found to be changed in atrophied muscles. The ankle plantar flexion torque during maximum isometric contraction was decreased at 2 and 4 weeks in TS groups, however, CSA was increased due to low-frequency electrical muscle stimulation.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮 筋浮腫 リンパ管内皮細胞 内皮細胞増殖因子(VEGF-C/-D) リンパ管新生 低周波電気刺激  
免疫組織化学染色 分子生物学

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

整形外科術後の固定や長期臥床等による不動状態は、筋萎縮 (muscle atrophy) とともに筋浮腫 (myoedema) を引き起こす。一般的に、浮腫は組織液が皮下組織に停滞して発生する病態である。これに加えて、不動状態の萎縮筋では筋線維が細くなり、筋線維間質が増加し、組織液の停滞状態が起こっており、これを筋浮腫と呼ぶ。この筋浮腫は、関節の可動域制限や日常生活動作 (ADL) の低下をきたしやすく、その治療や予防は理学療法にとって重要な課題である。一方、リンパ管系 (lymphatic system) は、身体の様々な部位に存在し、生体の恒常性の維持に深く関わっている。筋線維間質の組織液の回収は、他の組織と同様に血管系還流に加えリンパ管が重要な役割を担っている。特に筋萎縮の代謝産物やタンパク質などを含む組織液の回収には、筋ポンプ作用に代表される力学刺激が重要と考えられ、理学療法においても、不動予防や不動からの回復を目的としたストレッチング、低周波電気刺激による筋収縮運動が行われる。筋浮腫は不動によるリンパ管系の何らかの機能低下が原因と考えられるが、骨格筋におけるリンパ管に関する研究は血管に比べて立ち後れていたため、その治療戦略はもとより、病態像やそのメカニズムすら不明な点が多い。

近年、リンパ浮腫における内皮細胞増殖因子 (VEGF-C) や低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) などの遺伝子治療は、リンパ管機能の活性化を促進することが判明してきた。これまで我々は、皮膚の創傷治癒・リンパ管腫などのリンパ管関連疾患動物モデルを作製し、LYVE-1、podoplanin 等のリンパ管内皮細胞の特異的分子マーカーを用いて、光学・電子顕微鏡レベルでのリンパ管の組織学的解析を行った (Ji et al., 2004; 2010)。また、分子生物学的手法を用いた遺伝子発現の評価で、リンパ管の形態・機能的変化との関連性の一部を明らかにしてきた (Ji et al., 2007; 2014)。さらに、研究分担者はこれまで、マウスに対して、足関節の底屈トルクを測定しながら下腿後面に電気刺激を与え、0.1 mN $\cdot$ m の精度で、定トルク性の繰り返し等尺性収縮運動を行わせる装置を開発した。本装置を用いて、筋萎縮モデルに対する筋萎縮回復促進効果のある運動負荷量と、そのメカニズムの一端を明らかにしてきた (Itoh et al., 2017)。よって、この筋萎縮に対する回復促進モデルを用いることにより、これまでほとんどわかっていない、筋萎縮におけるリンパ管系の応答とその治療戦略を解明することができると考えられる。

### 2. 研究の目的

リンパ管は、様々な器官で、癌や炎症などの病態に応答した分布や役割を持つと言われる。しかし、廃用性筋萎縮のような骨格筋疾患におけるリンパ管の分布や役割については不明である。本研究の目的は、尾部懸垂 (tail suspension, TS) によるばらつきの少ないマウス廃用性筋萎縮モデルを作製し、筋萎縮と筋内リンパ管系分布との関連性を検証し、低周波電気刺激によるリンパ管の形態応答や最適な運動刺激方法を明らかにするとともに、そのメカニズムを検証することである。具体的には、1) 筋萎縮期間の違いによる筋力・筋線維横断面積 (CSA)・単位面積あたりのリンパ管数の変化について明らかにする。2) 定量的運動負荷装置を用いて、萎縮筋に対する運動刺激がリンパ管の形態応答に及ぼす影響とそのメカニズムを検証する。3) 筋萎縮からの回復促進のための最適な運動刺激方法を探る。

### 3. 研究の方法

対象を 11~12 週齢の雄マウス (C57BL/6J) とした。TS を 2 週間および 4 週間行う実験群 (TS 2 週間、TS 4 週間)、TS 4 週間後筋力トレーニング (training, TR) を 1 週間行う実験群 (TS 4 週間-TR 1 週間) および普通飼育の対照群 (Con) を設けた。組織学的検証用の標本として足関節底屈筋群 (ヒラメ筋、腓腹筋) 心筋、小腸を採取し、Cryostat (Leica, CM1860 UV) にて凍結切片 (8~10  $\mu$ m) を作製した。筋線維数および筋 CSA を測定するために、Hematoxylin-Eosin (HE) 染

色を行い、リンパ管および毛細血管の分布や数、構造などの変化を検証するために、リンパ管内皮細胞マーカー (LYVE-1 抗体)、血管内皮細胞マーカー (CD31 抗体) を用いた二重免疫染色を施した。各群の筋 CSA と、単位面積当たりのリンパ管および毛細血管の数を Image J を用いて定量解析した。また、Western blotting 法により、リンパ管新生因子 (VEGF-C/-D) とそれらの受容体 VEGFR-3 や、毛細血管およびリンパ管新生の抑制因子 (Endostatin) などのタンパク質発現量を調べた。さらに、VEGF-C/-D、VEGFR-3 mRNA の発現解析のために、SuperScript™ VILO™ MasterMix を用いて cDNA を作成し、PowerUp SYBR green Master Mix を用いて PCR を行った。一方、定量的な運動負荷装置を用いて、最大等尺性収縮時の足関節底屈トルクを測定した。マウスを麻酔下で足関節底屈筋群に定電圧 (50 V) の刺激 (電流 5.0 mA、周波数 100 Hz) を与え、刺激回数を 3~4 回とし、そのうちの足関節底屈最大発揮トルク (mN・m) を計測した。また、運動刺激による萎縮筋の CSA などの回復促進効果については、筋力 TR の負荷を最大筋力の約 40% の負荷で 1 日 1 セット 50 回、7 日間与えた。マウス群間の統計的な有意差検定は、ANOVA (一元配置分散分析) と Student-t 検定を行い、有意水準を 0.05 未満とした。

#### 4. 研究成果

リンパ管系は骨格筋組織の恒常性維持に重要な役割を担っている。当研究グループでは、廃用性筋萎縮時、および筋力 TR による筋萎縮からの回復促進応答に筋内リンパ管分布の変化とそのメカニズムの解明に取り組んでいる。

(1) 筋微小循環系における毛細リンパ管と毛細血管の役割を知るために、不動による筋萎縮と遅筋であるヒラメ筋のリンパ管系分布との関係を注目した。筋萎縮モデルにおけるヒラメ筋の CSA は TS 2 週間、4 週間ともに対照群に対し 30% 程度減少し、有意に低値を示したが ( $P < 0.05$ )、筋線維数には有意な差が無かった。また、リンパ管内皮細胞特異的マーカー LYVE-1 および Podoplanin や、血管内皮細胞マーカー CD31 などに加え免疫組織学的観察には、毛細リンパ管・毛細血管の分布や大きさ、密度などを検証することができた。TS 2 週間の筋萎縮に伴い、ヒラメ筋の単位面積あたりの LYVE-1 陽性リンパ管数は有意に増加した ( $P < 0.05$ ) が、TS 4 週間にはリンパ管の総数および筋線維あたりのリンパ管数は有意に低下した ( $P < 0.05$ )。対照群と比べて、CD31 陽性毛細血管の総数および筋線維あたりの毛細血管数は、TS 2 週間、4 週間ともに有意に減少した ( $P < 0.05$ )。リンパ管の分布変化については毛細血管の密度の増加に対し、リンパ管の密度は大きな変化が認められなかった。特に、筋萎縮 4 週目頃リンパ管の数が減らし、毛細血管の減少より遅れることが判明した。

一方、TS 4 週間の腓腹筋では、大きな集合リンパ管は筋外膜に多く存在した (図 1)。また、毛細リンパ管の数は毛細血管よりかなり少なかったが、筋周膜に集中して分布する傾向が認められた。しかし、筋内膜にある毛細リンパ管については、対照群と比較してリンパ管面積が減少することが分かった (図 2、 $P < 0.05$ )。

さらに、TS が他の器官に影響を及ぼすかどうかを知るために、心臓および小腸の組織内リンパ管の分布変化を観察した。心筋線維間および線維束間の結合組織には毛細リンパ管が幅広く存在することが分かった。特に左心室にはより多くのリンパ管が認められた。小腸における粘膜下層と漿膜のリンパ管と交通し、筋層間に数多く分布することが分かった。TS 4 週間のモデルでは、対照群と比較して心臓リンパ管の面積が減少したが、小腸リンパ管の面積が増加した (図 2、 $P < 0.05$ )。また、心臓リンパ管の数および面積割合 (率) が TS 4 週間で減ることが分かった (図 2、 $P < 0.05$ )。

(2) 廃用性萎縮筋における CSA の減少と機能の低下との関連性を調べるために、最大等尺性収縮時の足関節底屈トルクを評価した。TS 2 週間と 4 週間の最大トルクには有意な差はなかったが、対照群と比べて有意な低下が認められた ( $P < 0.05$ )。その結果、筋萎縮過程による CSA の

減少は筋力に大きく影響を与えることが分かった。また、萎縮筋の筋力 TR による回復促進の効果を検討するために、足関節の底屈筋群に低周波電気刺激による等尺性収縮運動を施行した。TS 4 週間後 1 週間筋力 TR を行い結果、運動刺激量（強度、時間、期間）を中心に調整し、筋線維 CSA の増加が観察され、一定の回復促進効果があると分かった。

(3) 筋萎縮モデルに対するリンパ管の増殖応答が低下する可能性があることから、リンパ管の新生因子として重要と考えられている VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 のタンパク質、mRNA の解析を行った。それに合わせて、血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害する Endostatin の関与を検討した。Western Blotting 法によるタンパク質発現の分析では、Endostatin は TS 2 週間、4 週間ともに増加する傾向であり、筋内リンパ管数の減少に關与する可能性が示唆された。また、対照群に比べて TS 2 週間において VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 に有意な変化は認められなかったが、TS 4 週間においては VEGFR-3 の検出量が 2 倍ほどに増加したことが分かった ( $P<0.05$ )。一方、リアルタイム PCR による解析では、対照群と比べて TS 2 週間において VEGF-C/-D、VEGFR-3 の mRNA 発現量の変化が認められなかった。また、TS 4 週間においては VEGF-C、VEGF-D の発現量が有意に減少することが分かったが ( $P<0.05$ ) VEGFR-3 の変化が認められなかった。TS による筋萎縮の進行に伴い、リンパ管内皮細胞増殖因子などの発現は萎縮筋の組織液や代謝産物など回収に反応したと考えられる。しかし、運動療法による筋萎縮回復領域のリンパ管新生に及ぼす影響や、萎縮筋に最適な運動刺激方法を解明するためには、免疫電子顕微鏡を用い、リンパ管内皮細胞間の接合や細胞内小器官などの検証が不可欠となっている。さらに、それらのメカニズムに関して、他の病理組織と同様に VEGF-C などの発現増加や VEGF-C/-D/VEGFR-3 シグナルの活性化による現象かどうかを検証する必要があると思われる。

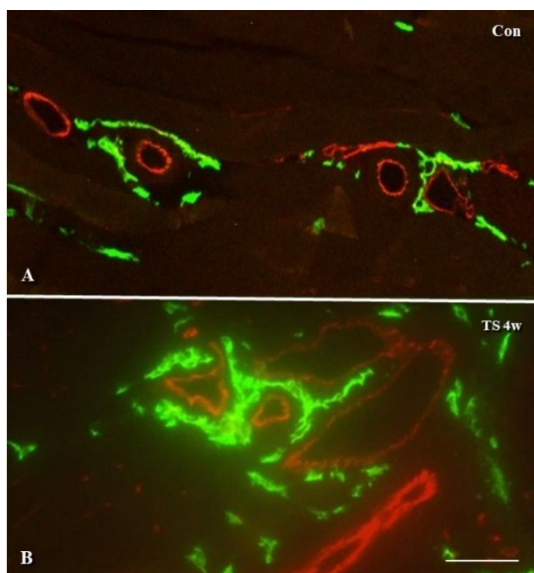


Fig. 1 The relationship between collecting lymphatics (LYVE-1, green) and blood vessels (CD31, red) can be clearly identified by immunofluorescent staining in perimysial connective tissues of the gastrocnemius muscles. In comparison with the normal control group (A, Con), the number of lymphatic vessels in the interstitial space seems increased after 4-week tail suspension (B, TS 4w).

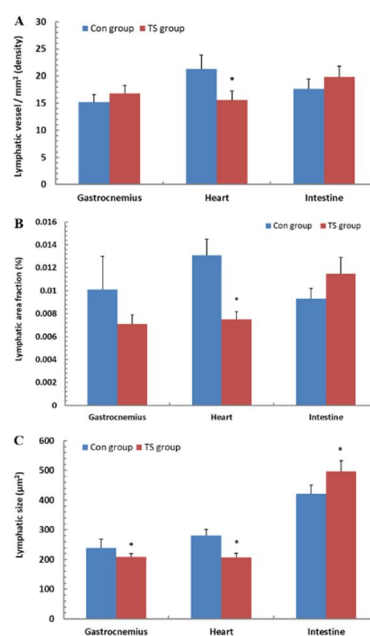


Fig. 2 The indexes of lymphatic vessel density (LVD) (A, the number of lymphatic vessels / mm<sup>2</sup>), lymphatic area fraction (B, %) and lymphatic size (area) (C, µm<sup>2</sup>) are shown in different patterns in the gastrocnemius muscle, myocardium, and small intestine. TS, tail suspension for 4 weeks; Con, control. \* $P<0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugata H, Yagi K, Yazawa S, Nagase Y, Tsuruta K, Ikeda T, Nojima I, Hara M, Matsushita K, Kawakami K, Kawakami K.	4. 巻 210
2. 論文標題 Role of beta-band resting-state functional connectivity as a predictor of motor learning ability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroimage.	6. 最初と最後の頁 116562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroimage.2020.116562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liang Q, Zhang L, Wood RW, Ji RC, Boyce BF, Schwarz EM, Wang Y, Xing L.	4. 巻 189 (12)
2. 論文標題 Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Related B Regulates Lymphatic Endothelial Cells during Vessel Maturation and Is Required for Lymphatic Vessel Function in Adult Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 2516-2530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tashiro N, Sugata H, Ikeda T, Matsushita K, Hara M, Kawakami K, Kawakami K, Fujiki M.	4. 巻 9 (5)
2. 論文標題 Effect of individual food preferences on oscillatory brain activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Behav.	6. 最初と最後の頁 e01262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/brb3.1262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ji RC	4. 巻 211
2. 論文標題 Recent advances and new insights into muscular lymphangiogenesis in health and disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 261-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2018.09.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ji RC, Eshita Y, Kobayashi T, Hidano S, Kamiyama N, Onishi Y	4. 巻 35(8)
2. 論文標題 Role of simvastatin in tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Metastasis	6. 最初と最後の頁 785-796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10585-018-9940-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onishi Y, Eshita Y, Ji RC, Kobayashi T, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Kubota N	4. 巻 10(9)
2. 論文標題 A robust control system for targeting melanoma by a supermolecular DDMC/paclitaxel complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Integr Biol (Camb)	6. 最初と最後の頁 549-554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ib00071a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onishi Y, Eshita Y, Ji RC, Kobayashi T, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Kubota N	4. 巻 23(8)
2. 論文標題 Supermolecular drug challenge to overcome drug resistance in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Discov Today	6. 最初と最後の頁 1556-1563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.drudis.2018.05.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Tomohiro, Agata Nobuhide, Itoh Yuta, Inoue-Miyazu Masumi, Mizumura Kazue, Sokabe Masahiro, Taguchi Toru, Kawakami Keisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Post-injury stretch promotes recovery in a rat model of muscle damage induced by lengthening contractions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-017-0553-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rui-Cheng Ji, Takafumi Kawashima, Keisuke Kawakami
2. 発表標題 Lymphatic distribution and lymphangiogenesis in muscular tissues
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会、山口
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rui-Cheng Ji, Takafumi Kawashima, Keisuke Kawakami
2. 発表標題 Comparison of lymphatic indexes in melanoma mouse models
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 笹井宣昌, 濱田文彦, 河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮時のマウスヒラメ筋内リンパ管の分布変化について
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会総会、東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 笹井宣昌, 濱田文彦, 河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に伴い骨格筋内リンパ管数は減少する
3. 学会等名 第23回日本基礎理学療法学会学術大会、京都
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 笹井宣昌, 濱田文彦, 河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮が骨格筋内リンパ管分布に与える影響
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会、岡山
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紀瑞成
2. 発表標題 The potential role of simvastatin in tumor lymphangiogenesis
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉政一、紀瑞成、董曉敏、伊奈啓輔、藤倉義久
2. 発表標題 腸間膜脂肪の新規な臓器特性：臨床応用を目指した皮下脂肪との機能差の解明
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹中菜々、伊東佑太、河上敬介、櫻井英俊
2. 発表標題 細胞移植治療後のデュシェンヌ型筋ジストロフィー症モデルマウスに対する等尺性収縮トレーニングは、移植による治療効果を促進する
3. 学会等名 第52回日本理学療法学術大会、千葉
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 千葉政一、永田英由美、董曉敏、酒井久美子、紀瑞成、伊奈啓輔、藤倉義久
2. 発表標題 腸間膜脂肪組織と皮下脂肪組織の決定的機能差
3. 学会等名 第73回日本解剖学会 九州支部学術集会、福岡
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河上 敬介  (Kawakami Keisuke)  (60195047)	大分大学・福祉健康科学部・教授    (17501)	