

令和 3 年 4 月 2 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10751

研究課題名（和文）COPD筋萎縮モデルマウスにおける肺組織や炎症から見た運動や電気刺激の効果

研究課題名（英文）The influence that the influence of the different exercise length, the neuromuscular electrical stimulation (NMES) in skeletal muscle, Vitamin C intake and exercise on alveolus and cytokine

研究代表者

丸岡 弘 (maruoka, hiroschi)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：80325985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：運動期間の違いや神経筋電気刺激(NMES)、ビタミンC(VC)摂取と運動が肺胞やサイトカインにおよぼす影響を検討した。運動期間の違いはTNF- α とCathepsin-Lに影響をおよぼすことが示された。また平均肺胞径やマクロファージでは運動有により減少が示された。NMESは肺においてIL-6、筋においてMuRF-1の有意な減少が示された。VC摂取有と運動有において肺はIL-4の増加とIL-6の減少、骨格筋ではDrp-1とIL-6、NRF-2の減少が認められた。このことから、運動やNMESなどは肺においてサイトカインや形態的な変化、骨格筋においてサイトカインに影響をおよぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、COPD筋萎縮モデルマウスを作製し、炎症や肺胞破壊の抑制、筋萎縮に対する介入として、運動や神経筋電気刺激、ビタミンC摂取の併用による検討を行った。本研究の学術的意義は、運動などが肺組織や炎症性サイトカインなどにおよぼす効果を組織学的観察と生化学的分析を用いて検証したことにある。その結果、運動などは、肺においてサイトカインやマクロファージ、肺胞の形態的な変化など、骨格筋においてサイトカインに影響をおよぼすことが明らかとなった。このことから、運動などは肺胞や炎症性サイトカインに影響をおよぼすことから、新たな治療効果を解明する知見に繋がり、基礎的データを呈示できる研究結果となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the influence of the differences in exercise duration, neuromuscular electrical stimulation (NMES) in skeletal muscle, Vitamin C (VC) intake and exercise on Alveolar and cytokines. The differences in the exercise duration also affected TNF- α and cathepsin-L expressions. Mean alveolar diameter and the number of macrophages decreased in the exercise group. The NMES results showed significant decreases in IL-6 levels in the lungs and MuRF-1 in the muscles. (3) The VC intake and exercise resulted in an increase in IL-4 and a decrease in IL-6 in the lungs and drops in Drp-1, IL-6, and NRF-2 levels in skeletal muscles. Moreover, a decrease in mean linear intercept was observed in the absence of VC intake and the presence of exercise. These results indicate the exercise and NMES, VC intake affect cytokines and cause morphological changes in the lungs and affect cytokines in the skeletal muscles.

研究分野：リハビリテーション科学関連

キーワード：COPD 運動 神経筋電気刺激 ビタミンC サイトカイン 肺胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)は肺の炎症が全身に波及する全身性炎症疾患である。COPD は肺胞破壊と共に Tumor Necrosis Factor- (TNF-)などの炎症性サイトカインや酸化ストレスが増加すると共に、骨格筋機能障害などの併存症との関連が指摘されている。併存症の管理は COPD の予後を改善する上で極めて重要であるが、未だ病態解明が不十分であり炎症などのメカニズムやそのコントロールが今後ますます重要視されている現状にある。運動と肺組織との関連において、COPD 疾患モデルに対する運動は肺組織に何かしらの作用をおよぼすと共に、そのメカニズムには炎症性サイトカインや酸化ストレス、血管内皮機能が関与する可能性が指摘されたが、炎症性サイトカイン等を軽減するための介入が検討されていない。また、運動とサイトカインとの関連において、運動は Interleukin-6(IL-6)や TNF-などの炎症性サイトカインに影響することが明らかであるが、運動期間により生体への影響が異なると共に、肺組織や酸化ストレスとの関連を検討した報告が極めて少ない。運動と骨格筋機能障害との関連において、運動や神経筋電気刺激は筋タンパク質分解系の活性化を抑制し、廃用性萎縮の進行を予防することが報告されているが、筋タンパク質分解と COPD の骨格筋機能障害の共通因子である炎症性サイトカインや酸化ストレスを軽減するための介入、ミトコンドリア機能への影響に関する報告が見られていない。このことから、本研究は COPD において炎症や肺胞破壊に対して根本的な治療がないことや、臨床上筋萎縮を伴うことが多く適切な運動療法の実施ができない現状を踏まえ、肺胞破壊の抑制、炎症や酸化ストレスの軽減、血管内皮機能や筋萎縮の改善などに対する介入として、運動と神経筋電気刺激(Neuromuscular electrical stimulation: NMES)、ビタミンC(VC)摂取による効果について着眼した。

2. 研究の目的

本研究は COPD の疾患モデルマウスに後肢懸垂を組み合わせた廃用性筋萎縮を作出し(COPD 筋萎縮モデルマウス)、(1) 運動期間の違いや(2) NMES、(3) VC 摂取、(4) 運動と VC 摂取の併用が肺組織や炎症などにおよぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 運動期間の違い: 対象は野生型マウス 28 匹を用い、運動の有無と期間の違い(4 週間、12 週間)により無作為に 4 群に区分した。全群は 12 から 14 週齢に COPD 疾患モデルの処理を施し、15 から 16 週齢に廃用性筋萎縮モデルを施し、COPD 筋萎縮モデルを作成した。その後、運動は 20 週齢(4W)あるいは 28 週齢(12W)まで実施した。分析はリアルタイム PCR 法により mRNA 発現量を、一般染色により組織像の形態的分析を、免疫染色によりマクロファージの発現量を、そしてスパイロメトリーなどの検討を行った。

(2) NMES: 対象は野生型マウス 20 匹を用い、コントロールと NMES の有無により無作為に 3 群に区分した。全群は 12 週齢から COPD 疾患モデルの処理、15 週齢から廃用性筋萎縮モデルを施し、COPD 筋萎縮モデルを作成した。その後、NMES は 28 週齢(12w)まで実施した。分析は研究(1)に準じて検討を行った。

(3) VC 摂取: 対象は VC 合成不全マウス 20 匹を用い、VC 摂取の有無により無作為に 4 群に区分した。全群は 8 から 10 週齢でタバコ溶液の投与を施し、COPD 疾患モデルを作成した。分析は研究(1)に準じて検討を行った。

(4) 運動と VC 摂取の併用: 対象は VC 合成不全マウス 20 匹を用い、VC 摂取と運動の有無によ

り無作為に4群に区分した。全群は8週齢からCOPD疾患モデルの処理、11週齢から廃用性筋萎縮モデルを施し、COPD筋萎縮モデルを作成した。その後、運動は13~20週齢(7週間:7w)まで実施した。分析は研究(1)に準じて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 運動期間の違い: 肺において Interleukin-13(IL-13)は運動有(4W)で減少、Interleukin-4(IL-4)とTNF- α が運動有(12W)で減少を示したのに対して、Cathepsin-Lでは運動無(12W)で増加を示した($p < 0.01 \sim 0.05$)。また、運動期間の違いはTNF- α とCathepsin-Lに影響をおよぼすことが示された(Fig.1)。平均肺胞径やマクロファージでは運動有により減少が示された($p < 0.01 \sim 0.05$)(Table 1)。このことから、運動期間の違いにより影響の程度や時期は異なるが、運動がCOPD筋萎縮モデルマウスの肺に対して有効であることが明らかとなった。

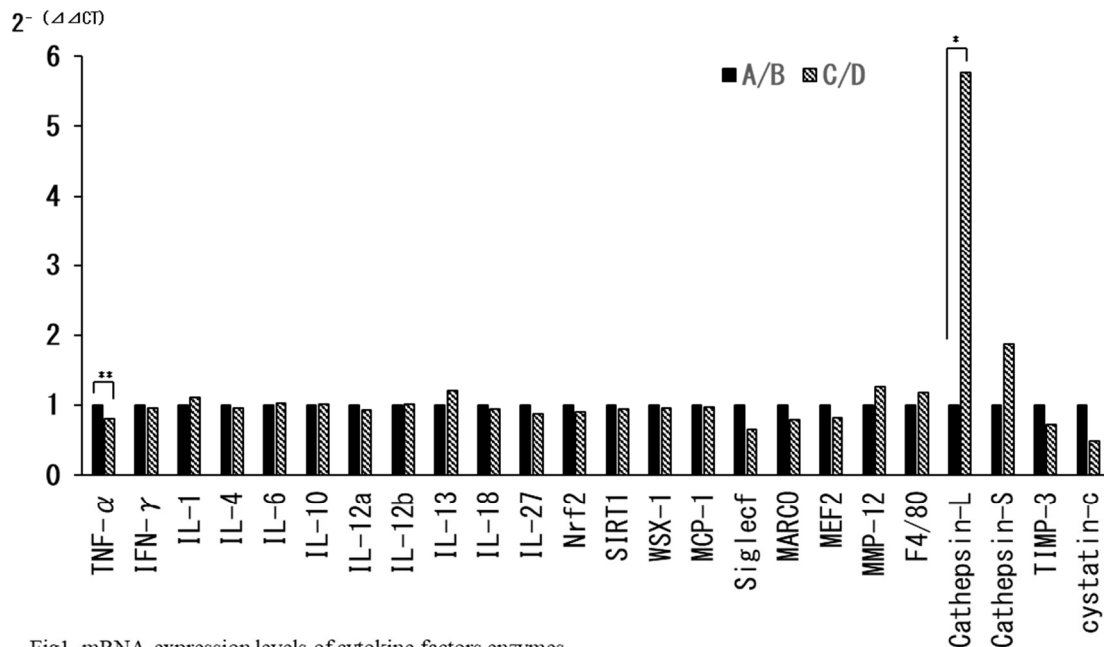


Fig1. mRNA expression levels of cytokine factors enzymes

The A group exercised for 4 weeks (five times a week); the B group did not exercise for 4 weeks; the C group exercised for 12 weeks (five times a week); the D group did not exercise for 12 weeks. A/B: Group A /Group B, C/D: Group C /Group D.

Table 1. Change in the mean linear intercept values and Immunol staining

Group	Mean linear intercept**	Immunol staining		
	(μm)	CD68(count)**	CD206(count)**	F4/80(count)**
A	42.3 \pm 36.0	5.2 \pm 0.3	10.5 \pm 0.8	11.0 \pm 0.3
B	50.6 \pm 46.8 ^{aa}	14.3 \pm 1.5 ^{aa}	23.8 \pm 2.4 ^{aa}	21.4 \pm 3.2
C	39.9 \pm 36.3 ^{bb}	11.7 \pm 0.9	15.4 \pm 0.4 ^b	8.2 \pm 0.8
D	47.4 \pm 42.9 ^{cc}	19.1 \pm 1.3 ^{aa,c}	27.9 \pm 1.7 ^{aa,cc}	18.6 \pm 4.9 ^{aa,cc}

Values are mean \pm SD. p Value by ANOVA test for the comparison between groups and Tukey test for the Mean linear intercept and Immunol staining.

**p < 0.01, a:p < 0.05 comparison A, aa:p < 0.01 comparison A, b:p < 0.05 comparison B, bb:p < 0.01 comparison B, c:p < 0.05 comparison C, cc:p < 0.01 comparison C.

(2) NMES: NMESは肺においてIL-6、筋においてMuscle RING finger protein-1(MuRF-1)の有意な減少が示された(いずれも $p < 0.05$)(Fig.2)。また、肺間質マクロファージマーカー(F4/80)やプロテアーゼマーカー(MMP-12)は有意な減少が示されたが(すべて $p < 0.01$)、平均肺胞径では変化を認めなかった。このことから、NMESはCOPD筋萎縮に対してサイトカインやマクロファージに影響をおよぼすが、肺の形態的な変化に影響をしないことが明らかとなった。

2^{-ΔΔct}

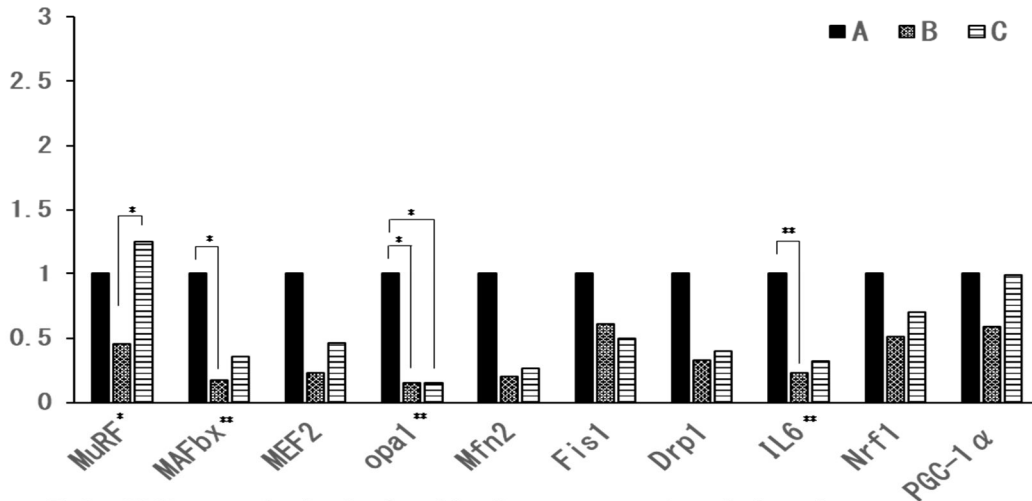


Fig2. mRNA expression levels of cytokine factors enzymes (muscle tissues)

Group A: Control (non-COPD, non-amyotrophy, non-NMES), Group B: COPD, amyotrophy with NMES, frequency of 3 times/week, a period of 12 weeks, Group C: COPD, amyotrophy without NMES, a period of 12 weeks.

(3) VC 摂取 : VC 摂取有において肺は IL-4 と IL-13 の増加、IL-6 と Interferon- (IFN-) などの減少、骨格筋では Dynamin related protein-1(Drp-1)の減少が認められた(Fig.3)。また平均肺胞径や肺胞マクロファージは VC 摂取有において低値を示した。一方、VC 摂取無において肺は IFN- などの多くの炎症性サイトカインなどで増加を認めた。このことから、VC 摂取有において肺は Th2 型へのシフトが示され炎症抑制と共に、形態的な変化が認められた。また、骨格筋ではミトコンドリア分裂のサイトカインの減少により、ミトコンドリアダイナミクスに影響をおよぼした。VC 摂取無において肺は IFN- などの多くの炎症性サイトカインなどで増加を認めたことから、VC 摂取有による免疫調節機能への影響の可能性が明らかとなった。

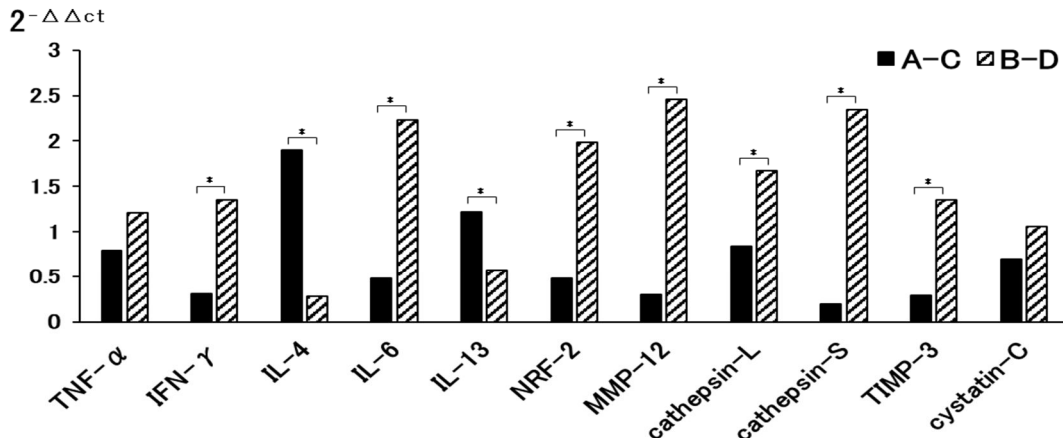


Fig3. mRNA expression levels of cytokine factors enzymes (Lung tissues)

Group A: COPD, amyotrophy with Vitamin C, Group B: COPD, amyotrophy with non-Vitamin C, Group C: Control (non-COPD, non-amyotrophy, Vitamin C), Group D: Control (non-COPD, non-amyotrophy, non-Vitamin C). A-C: A (Group A)-C (Group C), B-D: B (Group B)-D (Group D)

(4) 運動と VC 摂取の併用 : VC 摂取有と運動有において肺は IL-4 の増加と IL-6 の減少、骨格筋では Drp-1 と IL-6、Nuclear respiratory factor-2(NRF-2)の減少が認められた(Fig.4,5)。また、VC 摂取無と運動有では平均肺胞径の減少が認められた。このことから、VC 摂取有と運動有は肺において炎症性サイトカインと非炎症性サイトカインのバランスと共に、骨格筋において炎症性サイトカインや ROS の消去に作用するサイトカイン、Mitochondrial DNA(mtDNA)に影響をおよぼすことが明らかとなった。VC と運動は抗炎症作用を有することが明らかとなった。

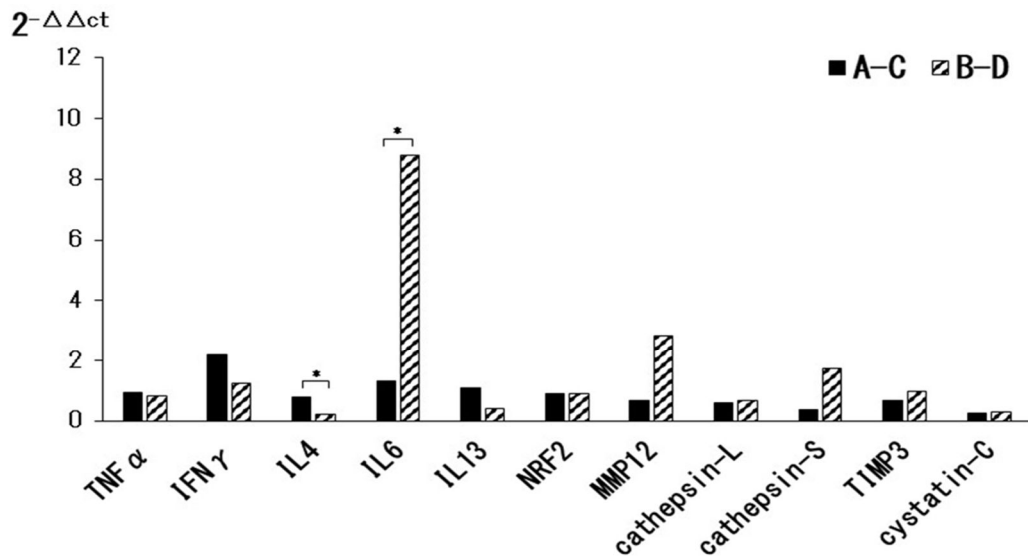


Fig. 4 mRNA expression levels of cytokines factors enzymes (lung tissues)

A (Group A): COPD/Amyotrophy/Intake vitamin C/Exercise, B (Group B): COPD/Amyotrophy/Non-vitamin C/Exercise, C (Group C): COPD/Amyotrophy/Intake vitamin C/Non-Exercise, D (Group D): COPD/Amyotrophy/Non-vitamin C/Non-Exercise (see the text in detail). A-C: A (Group A)-C (Group C), B-D: B (Group B)-D (Group D). *p<0.05

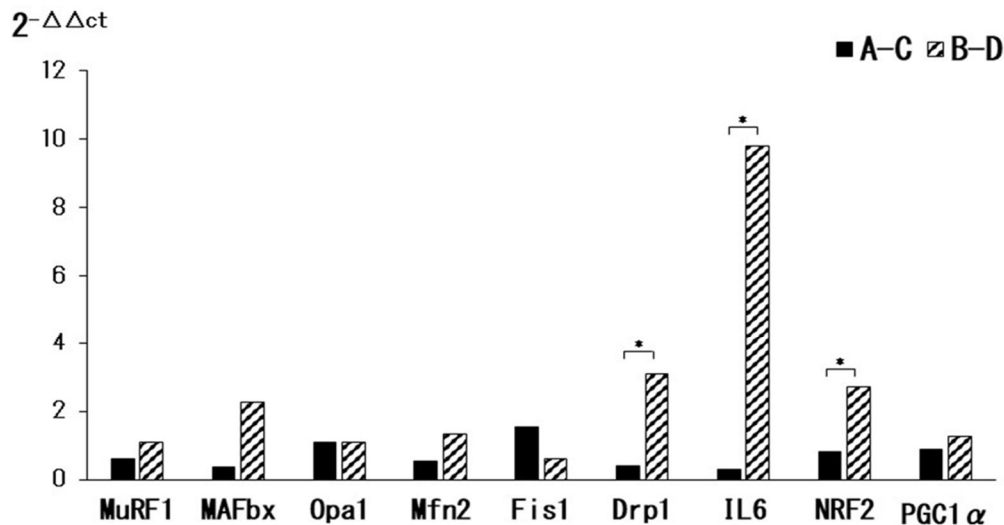


Fig. 5 mRNA expression levels of cytokines factors enzymes (muscle tissues)

A (Group A): COPD/Amyotrophy/Intake vitamin C/Exercise, B (Group B): COPD/Amyotrophy/Non-vitamin C/Exercise, C (Group C): COPD/Amyotrophy/Intake vitamin C/Non-Exercise, D (Group D): COPD/Amyotrophy/Non-vitamin C/Non-Exercise (see the text in detail). A-C: A (Group A)-C (Group C), B-D: B (Group B)-D (Group D). *p<0.05

以上のことから、COPD 筋萎縮モデルマウスに対する運動や NMES、運動と VC 摂取の併用はサイトカインやマクロファージに影響をおよぼし、免疫機能への作用が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maruoka H, Tanaka K, Zenda M, Ogawa A, Kido S, Inoue K	4. 巻 7
2. 論文標題 Effect of Exercise on Muscle Protein and Mitochondrial Function in Mice Model of Skeletal Muscle Atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Anal Bio-Sci	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maruoka H, Tanaka K, Takayanagi M, Zenda M, Ogawa A	4. 巻 51
2. 論文標題 The influence of the different exercise length on alveolar and cytokine-The analysis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and skeletal muscle atrophy model mice-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Physiol	6. 最初と最後の頁 23-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maruoka H, Tanaka K, Takayanagi M, Zenda M	4. 巻 33
2. 論文標題 Effects of neuromuscular electrical stimulation on pulmonary alveola and cytokines in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and skeletal muscle atrophy model mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Phys Ther Sci	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maruoka H, Tanaka K, Takayanagi M, Zenda M	4. 巻 51
2. 論文標題 The influence of the heat-not-burn cigarettes on alveolus and cytokine-The analysis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and skeletal muscle atrophy model mice-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Physiol	6. 最初と最後の頁 35-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maruoka H, Tanaka K, Takayanagi M, Zenda M, Ishigami A	4. 巻 7
2. 論文標題 Effect of Vitamin C and Exercise on Alveolus and Cytokine: Analysis of a Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Skeletal Muscle Atrophy Model in SMP30/GNL Knockout Mice-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Phys Med Rehabil Disabil	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24966/PMRD-8670/100063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Zenta M., Kiko R., Tsushima K., Hattori T., Kiyofuji K., Nishikawa T., Maruoka H., Kido S., Kakuda W.
2. 発表標題 Is swallowing function related to ADL level and spatial extent of life space in patients with respiratory failure?
3. 学会等名 13th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 善田督史、津島健司、角田亘、服部知洋、清藤晃司、吉原楓、森居健一、府川泰久、木戸聡史、丸岡弘
2. 発表標題 人工呼吸器管理下の患者における機械的咳介助 (Mechanical insufflation-
3. 学会等名 第6回呼吸ケア・リハビリテーション学会関東支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 善田督史、津島健司、角田亘、服部知洋、清藤晃司、小河裕樹、吉田誠也、府川泰久、木戸聡史、丸岡弘
2. 発表標題 急性呼吸不全患者における大腿四頭筋筋厚と日常生活動作の関連性
3. 学会等名 第38回関東甲信越ブロック理学療法士学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸岡弘、田中健一、高柳雅朗、善田督史、小川明宏、木戸聡史
2. 発表標題 運動期間の違いが肺胞やサイトカインにおよぼす影響 - COPD廃用モデルマウスによる検討 -
3. 学会等名 第56回日本臨床生理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸岡弘、金村尚彦、田中健一、林 弘之、善田督史、小川明宏、石神昭人
2. 発表標題 廃用性筋萎縮モデルマウスにおけるミトコンドリアから見た運動の影響
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2018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
連携研究者	田中 健一 (Tanaka Ken-ichi) (20281313)	埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授 (22401)	
連携研究者	石神 昭人 (Ishigami Akihito) (50270658)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御研究チーム 分子老化制御・研究部長 (82674)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------