

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16611

研究課題名(和文)高気圧酸素治療における血管新生増生の真実を探る

研究課題名(英文) Investigation of the truth of angiogenesis by hyperbaric oxygen treatment after muscle contusion

研究代表者

山本 尚輝 (Yamamoto, Naoki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60808046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高気圧酸素治療(HBO)は溶解型酸素濃度を上昇させるため、それに伴う活性酸素種(ROS)、一酸化窒素(NO)の増加は、分子メカニズムを知るうえで重要である。本研究の目的は、HBOがNOの増加を介して血管新生を促進し、骨格筋圧座損傷ラットの血管新生・筋再生を促進しうるか調査することである。その結果 HBOは、損傷1日以内にNO、低酸素誘導因子(HIF)1、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)を増加させ、損傷7日後までに血管新生・筋再生を促進した。したがって、HBOは、急性骨格筋圧座損傷後、NO増加を介して血管新生と筋再生を促進する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

本研究により急性期骨格筋圧座損傷後、HBOがNOの増加によってHIF1 安定化、VEGF、bFGF等細胞増殖を促進する因子を上方制御し、血管新生・筋再生過程を促進することを経時的過程の上で明確にし、NO阻害が再生過程自体を阻害しないことから一過性のROS増加であるHBOは血管新生・筋再生に有用であることが明らかとなった。また本研究により早期のHBOが有用であることも示唆され、この結果が有効なHBO治療プログラムの開発の一助となりえると考えられ、骨格筋圧座損傷に対するHBOの基礎的エビデンスを確立したとともに交通外傷やスポーツ関連外傷からの早期社会・競技復帰を図る上で有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hyperbaric oxygen (HBO) treatment promotes early recovery from muscle injury. Reactive oxygen species (ROS) upregulation is a key mechanism of HBO. Nitric oxide (NO), a type of ROS, generally stabilizes hypoxia-inducible factor (HIF) 1 and stimulates secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) from endothelial cells and macrophages, which then induces angiogenesis. The purpose of the present study was to investigate whether HBO could promote angiogenesis via induction of NO and induce muscle regeneration in contused rat skeletal muscles. HBO significantly increased NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, VEGF, and bFGF levels and stabilized HIF1 within 1 day. HBO promoted blood vessel formation at 7 days and muscle healing at 7 days after contusion. HBO thus promoted angiogenesis and muscle regeneration mainly through generation of NO in the early phase after muscle contusion injury.

研究分野：整形外科

キーワード：高気圧酸素治療 筋肉 血管新生 筋再生 圧挫損傷 一酸化窒素 VEGF 筋張力

## 1.研究開始当初の背景

筋挫傷は一般的なスポーツ外傷であるが、回復に必要な栄養や酸素、様々な因子の不足をもたらす血管損傷をも引き起こす。そのため、筋損傷後に血管新生が遅れ組織の線維化が進むと、筋線維の再生が不十分となり、機能回復が妨げられることとなる。不十分な機能回復は、交通外傷やスポーツ関連外傷からの早期社会・競技復帰の阻害因子となり得る。そのため軟部組織損傷からの1日も早い回復は、患者の早期社会復帰・アスリートの早期競技復帰を目指す現場からスポーツ医学に求められているニーズである。軟部組織損傷からの回復を促進する治療の一つとして高気圧酸素治療(HBO)が近年着目されている。HBOは2絶対気圧(ATA)以上の高気圧環境下で100%酸素を呼吸することで血液中の溶解型酸素濃度を上昇させ、局所低酸素改善、治癒促進、殺菌作用増強、生体ガス圧縮効果等様々な効果をもたらす治療であり、安全性が高く低侵襲である。HBOは臨床において、スポーツ関連軟部損傷や筋損傷後の腫脹や疼痛を軽減させ、治癒を促進し、競技復帰期間を短縮すると報告されている。しかし、その作用機序の解明はいまだ不十分である。我々は骨格筋圧挫損傷ラットモデルを作成し、急性骨格筋圧挫損傷後、HBOが腫脹を軽減し筋再生を促進することを報告してきた。一方で、HBOは末梢循環障害において血管新生促進作用を有し、また血管新生は筋再生に必須であると報告されていることから、今回我々は血管新生を介して筋再生に至るプロセスにおいて、HBOが与える影響に着目した。HBOは活性酸素種(ROS)や一酸化窒素(NO)の一過性の増加により様々な治療効果をもたらすとされる。ROSやNOの一過性の増加は低酸素誘導因子(HIF)1の安定化を促進し、血管新生促進因子である血管内皮増殖因子(VEGF)・塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)・肝細胞増殖因子(HGF)・アンギオポイエチン2等の産生を増加させ、血管新生を促進する報告されている。しかし急性期骨格筋圧挫損傷後にHBOが上記の因子に作用し血管新生・筋再生を促進していることを経時的に捉えた報告は認めない。

## 2.研究の目的

急性期骨格筋圧挫損傷においてHBOがROSやNOの増加を介して、血管新生促進因子を活性化し、血管新生を促進することで筋再生を促進するという仮説をたてこれを検証すること。

### <方法>

骨格筋圧挫損傷モデルラットはDrop mass methodを用いて作成し、損傷後HBO群とNon-treatment(NT)群に無作為に振り分け、HBO群は2.5ATA、120分の酸素吸入で1日1回、週5回のHBOを施行した。またROSとNOの関与を明らかにするためROS、NO産生とともに阻害するN-アセチル-L-システイン(NAC)とNOを産生する一酸化窒素合成酵素(NOS)のみ阻害するニトロ-L-アルギニンメチルエステル(LNAME)をHBO施行前30分に損傷前日から連日投与したNAC+HBO群,LNAME+HBO群を作成し、HBOの効果に与え

る影響を調査した。評価方法として、NO の最終代謝産物である NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は専用キットを用いて定量し、HIF1 $\alpha$ ・bFGF・VEGF・HGF・アンジオポイエチン 2 蛋白量は ELISA 法にて定量的に測定した。HIF1 $\alpha$  においては PCR 法にて mRNA を定量した。活性化した血管内皮細胞数を血管内皮細胞特異的な Tie2 受容体と、静止期以外の細胞核を染める Ki67 を用いて免疫染色し顕微鏡下にカウントし定量した。新生血管は血管特異的なトマトレクチンと基底膜を表すラミニンで免疫染色し、過去の報告に則り、未熟血管・成熟血管数を同様に定量した。筋再生においては、筋衛星細胞の増殖を筋衛星細胞特異的な Pax7 と Ki67 を用いて同様に定量した。再生過程にある筋線維は eMHC とラミニンを用いて同様に定量し、HE 染色で中心に核を持つ線維を再生筋線維と定義し、再生筋線維の横断面積(CSA)と筋線維数を定量した。一方、筋の運動機能評価として脛骨神経刺激による腓腹筋の引っ張り応力を測定した。損傷 7 日後に瞬発力を示す twitch force と持続力を示す tetanic force を測定し、患側の値を健側の値で割った患健比を算出し比較した。

#### 4.研究成果

(1) 通常 HIF1 $\alpha$  蛋白は一定量産生されているが、プロリン水酸化酵素(PHD)により分解され安定化しない。HBO 群において NT 群と比較して NO<sub>3</sub><sup>-</sup>や HIF1 $\alpha$  蛋白量は損傷 2 時間後から 6 時間後まで有意に増加していたが、HIF1 $\alpha$  の mRNA は HBO 群で増加を認めなかった。そのため HBO は HIF1 $\alpha$  産生を促進したのではなく、PHD による蛋白分解を抑制したと考えられた。また NAC、LNAME 投与後に HBO を施行した NAC+HBO, LNAME+HBO 群において HBO 施行にもかかわらず HIF1 $\alpha$  蛋白増加が抑制されたため、HIF1 $\alpha$  安定化に共通して阻害される NO が重要であることが明らかとなった。

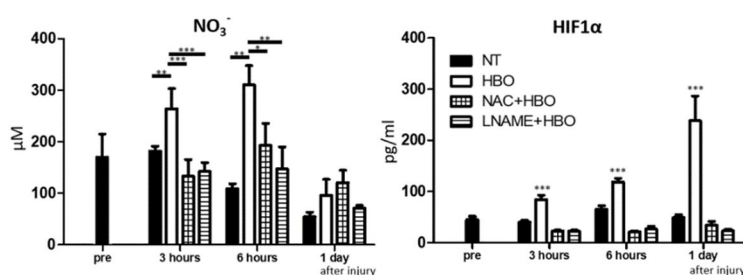


図 1:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HIF1 $\alpha$  蛋白量

(2)血管新生関連因子において、VEGF 蛋白量は損傷 3 時間後、bFGF 蛋白量は損傷 6 時間後に有意に増加していたが、HGF 蛋白量とアンジオポイエチン 2 蛋白量は有意な増加を認めなかった。

また NAC+HBO 群、LNAME+HBO 群において、VEGF・bFGF の増加は抑制された。

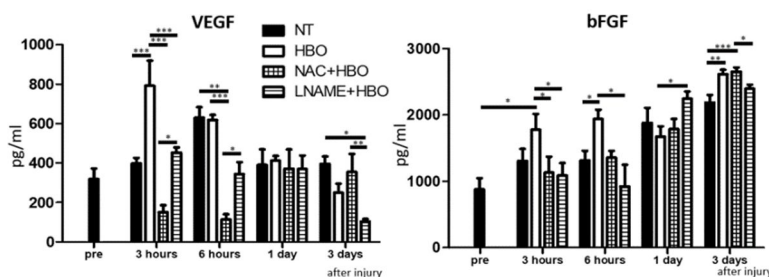


図 2:VEGF,bFGF 蛋白量

(3)増殖期の血管内皮細胞数は損傷 1 日後に、未熟血管新生は損傷 3 日後、成熟血管新生は損傷 3~7 日後に HBO 群で有意に増加していた。さらに NAC+HBO 群、LNAME+HBO 群において、VEGF・bFGF の増加は抑制され、増殖期血管内皮細胞数、未熟・成熟血管数の増加はともに抑制された。よって共通する NO を介してさせ、血管新生を促進することが明らかとなった。

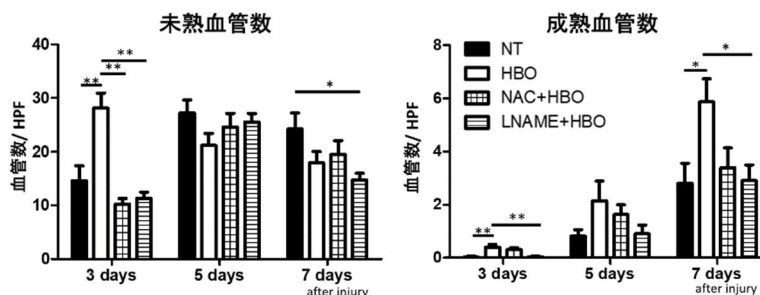


図 3:未熟・成熟血管新生

(3)筋再生においても、NAC + HBO 群、LNAME+HBO 群において HBO 群における増殖期の筋衛星細胞数の増加、損傷 5 日後の再生筋線維数と CSA、損傷 7 日後の筋張力の促進効果が抑制された。血管新生は筋再生に必須であるため HBO は NO を介して血管新生・筋再生を促進することが明らかとなった。

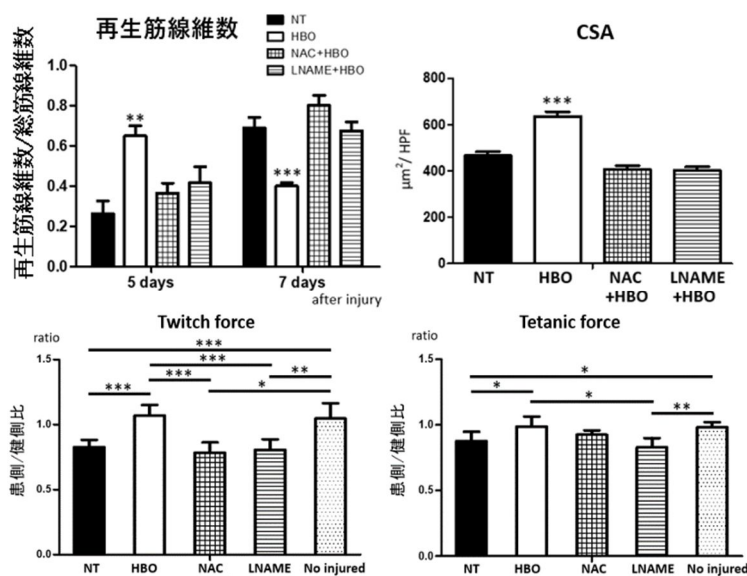


図 4:損傷 5 日後の再生筋線維数/CSA, 損傷 7 日後の筋張力

(4)最後に NT 群に NAC,LNAME を投与した群を作成し、阻害剤自体が筋再生に与える影響を検証したが、NO<sub>3</sub>-量は抑制されたが血管新生・筋再生は阻害されなかった。そのため NO 増加が HBO の血管新生・筋再生促進効果に貢献していることが示唆された。

以上により急性期骨格筋圧挫損傷後、HBO は NO を増加させ、HIF1 の安定化や VEGF と bFGF の増加を促進することで、血管内皮細胞の増殖、未熟・成熟血管新生を促進し筋再生を促進することが明らかとなった。また HBO 群における NO<sub>3</sub>・HIF1 ・VEGF・bFGF の増加は、損傷 6 時間後までに認められており、早期に誘導される因子に HBO が影響を与えていることが明らかとなった。そのため臨床的には早期 HBO の導入が有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Naoki Yamamoto, Takuya Oyaizu, Mitsuhiro Enomoto, Masaki Horie, Masato Yuasa, Atsushi Okawa, Kazuyoshi Yagishita	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-020-59615-x	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 急性骨格筋圧挫損傷後HBOが一酸化窒素の増加を介して血管新生・筋再生を促進する。
3. 学会等名 第10回高気圧酸素スポーツ医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 骨格筋圧挫損傷急性期において高気圧高酸素環境は低酸素誘導因子の増加を介して筋新生に至る過程を促進する。
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 骨格筋圧挫損傷急性期において早期の高気圧高酸素治療は筋再生促進に有用である。
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Naoki Yamamoto, Takuya Oyaizu, Mitsuhiro Enomoto, Yasushi Kojima, Kazuyoshi Yagishita, Atsushi Okawa
2. 発表標題	Hyperbaric Oxygen treatment promotes muscle regeneration via angiogenesis by triggering increased RNS in acute skeletal muscle injury
3. 学会等名	The 52th Undersea & Hyperbaric Medical Society Annual scientific meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Naoki Yamamoto, Takuya Oyaizu, Mitsuhiro Enomoto, Yasushi Kojima, Kazuyoshi Yagishita, Atsushi Okawa
2. 発表標題	Hyperbaric oxygen therapy promotes muscle regeneration via angiogenesis by reactive nitrogen species in muscle contusion injury of rat.
3. 学会等名	The 4th conference of Asia-pasific Undersea and Hyperbaric Medical Society in Nakatsu-City 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題	骨格筋圧挫損傷急性期においてHBOは活性窒素種を介して筋内血管新生・筋再生を促進する
3. 学会等名	第16回日本臨床高気圧酸素・潜水医学会 第54回日本高気圧環境・潜水医学会 合同学術集会2019
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題	骨格筋圧挫損傷後に高気圧酸素治療が筋力回復与える影響
3. 学会等名	第68回東日本整形災害外科学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 急性骨格筋圧挫損傷後、高気圧酸素治療は血管新生を促進する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 骨格筋圧挫損傷急性期において早期の高気圧酸素治療は筋再生促進に有用である
3. 学会等名 第45 日本整形外科スポーツ医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 大原敏之, 塩田 幹夫, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 骨格筋圧挫損傷後は高気圧酸素治療の早期適応が有用である
3. 学会等名 第9回高気圧酸素スポーツ医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 高田亮平, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 骨格筋圧挫損傷急性期においてHBOは活性酸素種を介して筋内血管新生・筋再生を促進する
3. 学会等名 第54回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Naoki Yamamoto, Takuya Oyaizu, Mitsuhiro Enomoto, Yasushi Kojima, Kazuyoshi Yagishita, Atsushi Okawa
2. 発表標題 A hyperbaric, high-oxygen environment promotes injured rat muscle recovery by angiogenesis through reactive nitrogen species.
3. 学会等名 The 51th Undersea & Hyperbaric Medical Society Annual scientific meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江正樹, 高田亮平, 大川淳, 柳下 和慶.
2. 発表標題 急性骨格筋圧挫損傷後の筋張力回復に対する高気圧酸素治療の至適条件の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------