

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17703

研究課題名（和文）超音波照射による筋肥大効果の仕組みを解明し、廃用性筋萎縮予防の可能性を探る。

研究課題名（英文）Elucidating the mechanism of the muscle hypertrophy effect of ultrasound and exploring the possibility of preventing disuse muscle atrophy

研究代表者

清島 大資 (KIYOSHIMA, Daisuke)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80756370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：超音波療法は骨折部位の治癒促進などに用いられているが、筋萎縮への効果は不明な点が多い。我々は、この超音波刺激に筋細胞から分化誘導した筋管を肥大させる作用があることを見出し、廃用性筋萎縮の予防に超音波療法も活用できる可能性があると考えた。本研究では、まず超音波刺激に対する培養筋管への筋肥大効果の最適条件を検討した。次に、培養期間の違いによる筋肥大効果への影響を検討した。その結果、超音波の刺激強度や照射時間率が高いほど培養筋管の肥大効果が高い傾向がみられた。また、筋肥大効果は培養期間が長くなると認められなかった。この筋肥大には自己分泌/傍分泌機構が関係していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで超音波療法は骨折部位の治癒促進などに用いられてきたが、超音波刺激の使用や処方に関しての科学的根拠が乏しいため、個人の経験に基づいて行われてきた。特に筋に対する超音波刺激の報告はほとんどなかった。本研究は超音波の生体組織への作用の科学的な理解につながり、超音波照射の筋肥大効果が確認され、その仕組みが明らかになれば、廃用性筋萎縮予防の糸口が得られるだけでなく、老化や寝たきりで生じる諸症候の新規治療法の発見にもつながる可能性がある。本研究の成果は、その礎となるものだと考える。

研究成果の概要（英文）：Ultrasound has been used to promote healing of fracture sites, but its effect on muscle atrophy remains unclear. We found that ultrasound stimulation can hypertrophy myotubes differentiated from myotubes, suggesting that ultrasound stimulation may be used to prevent disuse muscle atrophy. In this study, we first examined the optimal conditions for the hypertrophic effect of ultrasound stimulation on cultured myotubes. Next, we examined the effect of different incubation periods on the muscle hypertrophy effect. As a result, the hypertrophic effect of cultured myotubes tended to be higher when the intensity of ultrasound stimulation and the irradiation time rate were higher. The hypertrophic effect was not observed when the incubation period became longer. The autocrine/paracrine mechanism was found to be involved in this muscle hypertrophy.

研究分野：理学療法学

キーワード：超音波 培養筋管 筋肥大

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者や障害者が健康で自立した生活を送るためには、疾患の二次的障害として引き起こされる廃用性筋萎縮を予防・軽減する必要がある。廃用性筋萎縮は、微小重力環境に長時間おかれた宇宙飛行士や寝たきりに見られ、筋肉を長期間使わないことで起こる。その原因の一つとしてメカニカルストレス負荷の欠落が考えられおり、実際、メカニカルストレスの強制的な負荷が筋萎縮の症状を緩和することはよく知られている。臨床現場でも筋力トレーニングや電気刺激療法、伸張位保持などが廃用性筋萎縮の予防・リハビリに用いられているが、いずれも処置時間がある程度長く確保する必要がある。また、その効果も十分なものではない。一方、超音波療法は、現場において骨折部位の治癒促進、筋萎縮の緩和を含む様々な治療に使われているが、廃用性筋萎縮の予防・治療にはほとんど用いられていない。超音波の成体に対する作用としては、作用部位を温める温熱効果とキャピテーションを含む非温熱効果が知られている。この非温熱効果により、超音波は皮膚や腱などの軟部組織に対してメカニカルストレスを負荷し、治癒促進効果を持つと報告されている。超音波の筋への応用も十分に期待されるが、メカニカルストレスとしての効果に注目して詳細を検証した報告はない。我々は、分化過程の培養骨格筋細胞に対して 10 分間の低強度超音波照射 (1 回/日、 0.5 W/cm^2) により、分化誘導した筋管が肥大することを見出してきた (図 1)。この超音波による筋管肥大のメカニズムの解明が進めば、廃用性筋萎縮の予防等に対する超音波療法の開発につながる可能性がある。上記実験では、超音波の作用した対象としては、骨格筋細胞全体を用いていたので、筋芽細胞の他に筋衛星細胞や筋間質の間葉系前駆細胞も含まれる。筋肥大には、様々な仕組みが考えられており、超音波が筋細胞や筋管に直接作用する場合の他に、筋衛星細胞を活性化し培養骨格筋細胞由来の筋管の肥大を生じた可能性もある。また、最近、骨格筋の機能・恒常性の制御に働いていることが明らかになってきた筋間質の間葉系前駆細胞を介している可能性もある。これらの作用機序の解明が待たれている状況である。

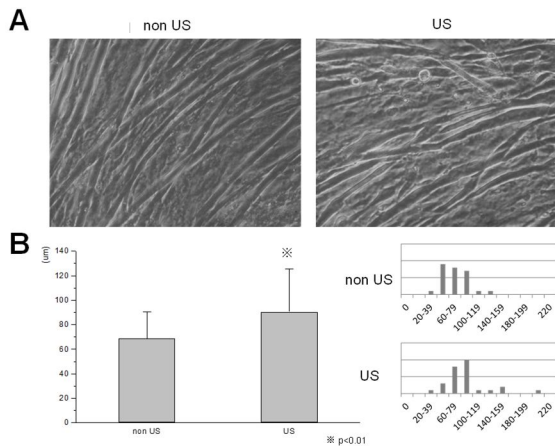


図 1. 超音波刺激により筋管は肥大する

A は、位相差顕微鏡観察像。左はコントロール、右は超音波 (US) 照射 24 時間後。B は、各条件での筋管細胞の横径を測定結果。超音波照射 24 時間後、コントロールに比べ有意に肥大していた。
; p<0.01

2. 研究の目的

本研究の目的は、廃用性筋萎縮の新規予防・軽減治療方法の開発の可能性を探るため、培養骨格筋細胞に対する超音波の非温熱効果、特にメカニカルストレスに着目し、培養骨格筋細胞より分化した筋管に対する超音波照射の肥大化作用の機序の解明と、超音波照射の筋組織に対する in vivo における効果の検証を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 超音波刺激に対する培養筋管への筋肥大効果の最適条件

C57BL/6J マウスの長趾伸筋をコラゲナーゼ溶液に 90 分間浸した後、培地中で筋線維をほぐし単一筋線維のみを採取し、トリプシンによって筋衛星細胞を剥離し、マトリゲルをコーティングした培養皿に播種した (1.5×10^2 個 / 35mm 培養皿)。播種後 3 日間は増殖培地にて増殖させたのち、分化培地に交換して 3 日間培養し、筋衛星細胞の 7~8 割を筋管に分化させた。その後、超音波刺激をしない群 (以下 nonUS 群) と 10 分間の超音波刺激をする群 (以下 US 群) に分けた。さらに US 群は、超音波の刺激強度を 0.1, 0.5, 1.0 W/cm^2 で与える群 (周波数 3MHz, 照射時間率 50%), 照射時間率を 10%, 20%, 50% で与える群 (周波数 3MHz, 強度 0.5 W/cm^2) に分けた。超音波は、超音波治療器 (UST-770, 伊藤超短波) を用いて、プローブ (直径 1.8cm) 上にゲルを塗布し細胞を培養したディッシュを乗せて行った。超音波刺激 24 時間後に両群を位相差顕微鏡 (IMT-2; OLYMPUS) で観察し、デジタルカメラ (E-PL3; OLYMPUS) にて撮影した。取得した画像は ImageJ を用いて、筋管の横径を測定した。

(2) 培養期間の違いによる筋肥大効果への影響

上記と同じ方法で採取した筋衛星細胞を培養皿へ播種し、播種後 3 日間は増殖培地にて増殖させたのち、分化培地に交換して 3 日間培養する群と分化培地にて 17 日間培養する群に分けた。それぞれの群は、さらに NS 群と US 群に分けた。なお、超音波の照射条件は周波数 3MHz, 強度

0.5W/cm², 照射時間率 50%とした。超音波照射 24 時間後に両群を位相差顕微鏡 (IMT-2; OLYMPUS) で観察し、デジタルカメラ (E-PL3; OLYMPUS) にて撮影した。取得した画像は ImageJ を使用して、筋管の横径を測定した。なお、培養期間中、培地は 48 ~ 72 時間おきに交換した。

(3) 筋管に対する超音波刺激の肥大化作用の機序

培養 6 日の筋管を nonUS 群 US 群に分けた。超音波照射 24 時間後、US 群の培養上清を超音波照射していない筋管細胞へ投与した (以下 US 培地投与群)。NS 群はシェアストレスの影響を考慮し、分化培地を投与した。NS 群、US 群ともに培地投与 24 時間後、位相差顕微鏡 (IMT-2; OLYMPUS) の上で細胞をデジタルカメラ (E-PL3; OLYMPUS) にて撮影した。取得した画像は ImageJ を使用して、筋管細胞の横径を測定した。

4. 研究成果

(1) 超音波刺激に対する培養筋管への筋肥大効果の最適条件

超音波刺激強度の違いを調べた結果、筋管の横径が nonUS 群では $80.20 \pm 24.86 \mu\text{m}$ 、0.1 W/cm² では $65.74 \pm 24.90 \mu\text{m}$ 、0.5 W/cm² では $90.33 \pm 35.38 \mu\text{m}$ 、1.0 W/cm² では $107.19 \pm 31.56 \mu\text{m}$ であった。0.5 W/cm²、1.0 W/cm² では nonUS 群に比べ有意に増大した (図 2A)。一方、照射時間率の違いを調べた結果、10%の照射時間率では $87.67 \pm 23.64 \mu\text{m}$ 、20%の照射時間率では $97.74 \pm 30.28 \mu\text{m}$ 、50%の照射時間率では $94.96 \pm 22.83 \mu\text{m}$ であった。20%、50%の照射時間率では nonUS 群に比べ有意に増大した (図 2B)。

超音波刺激に対する培養筋管への筋肥大効果を、超音波の刺激強度や照射時間率の大きさを比較すると、本研究の条件の範囲内では刺激強度や照射時間率が高いほど効果が高い傾向がみられた。

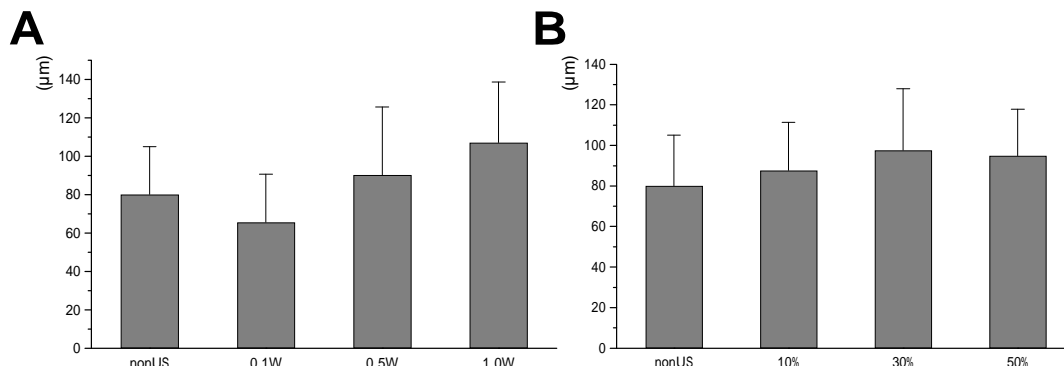


図 2. 超音波刺激強度や照射時間率の違いによる筋管の横径

A のグラフは、異なる刺激強度で超音波刺激を行った時の筋管の横径を示す。B のグラフは、異なる照射時間率で超音波刺激を行った時の筋管の横径を示す。 ; p<0.01 vs nonUS 群

(2) 培養期間の違いによる筋肥大効果への影響

分化培地にて 3 日間培養した筋管の横径は、nonUS 群が $84.12 \pm 0.57 \mu\text{m}$ 、US 群が $95.08 \pm 1.75 \mu\text{m}$ であり、US 群が nonUS 群に比べ有意に増大した。分化培地にて 17 日間培養した筋管では、nonUS 群が $39.03 \pm 3.03 \mu\text{m}$ 、US 群が $37.87 \pm 4.64 \mu\text{m}$ であり、有意な差は認められなかった。しかし、別途、筋衛星細胞を補充し、再度超音波刺激を行うと、筋管は肥大した。以上のことから、筋管の肥大には筋衛星細胞が関与している可能性があると考えられた。培養期間による違いは、筋管の周囲環境の違いがある。長期培養した筋管では周囲に繊維芽細胞が多く、筋衛星細胞や筋芽細胞はほとんど観察されなかった。よって、筋管の肥大には未分化な

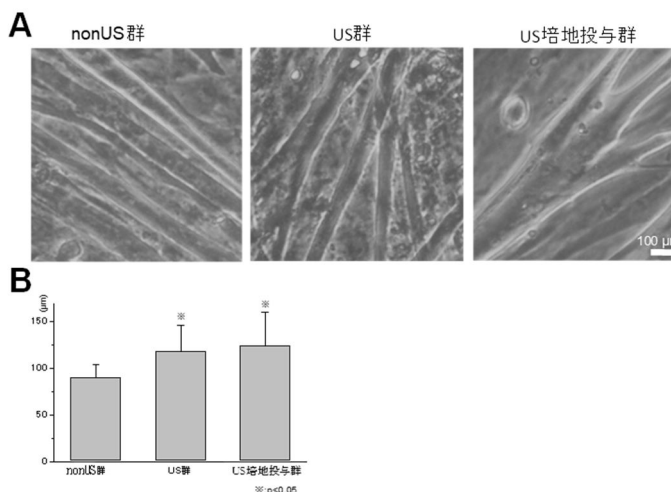


図 3. 超音波刺激後の培養上清を投与すると筋管は肥大する

A は分化培地にて 6 日間培養後に超音波を照射しない NS 群、超音波照射 24 時間後の US 群、US 培地投与群の位相差顕微鏡像を示す。B は NS 群、US 群、US 培地投与群の計測した筋管細胞の横径の平均を示す。 ; p<0.05 vs nonUS 群

筋衛星細胞や筋芽細胞が必要であると考えられた。

(3) 筋管に対する超音波照射の肥大化作用の機序

nonUS 群の筋管の横径は、 $90.10 \pm 13.22 \mu\text{m}$ 、US 群が $117.90 \pm 27.72 \mu\text{m}$ 、US 培地投与群が $123.46 \pm 36.21 \mu\text{m}$ であった。筋管細胞の横径は US 群、US 培地投与群が NS 群に比べ有意に増大した(図 3)。よって、超音波刺激によるメカニカルストレスにより成長因子やサイトカイン等の因子が自己分泌/傍分泌機構が働き、タンパク質合成促進や筋衛星細胞の増殖と分化を促進したため、筋管細胞が肥大したと考えられた。

これまでの結果から、培養骨格筋細胞より分化した筋管に対する超音波照射の肥大化作用の機序の一部を明らかにすることが出来た。今後さらに筋肥大の分子メカニズムに迫ることができれば、廃用性筋萎縮予防の糸口が得られるだけではなく、老化や長期臥床で生じる諸症候の新規治療法の発見にもつながる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 清島大資, 縣信秀	4. 巻 9
2. 論文標題 超音波照射による培養骨格筋細胞の肥大に自己分泌/傍分泌が関与する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 愛知医療学院短期大学紀要	6. 最初と最後の頁 24-28
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 清島大資, 縣信秀	4. 巻 9
2. 論文標題 超音波照射による培養骨格筋細胞の肥大効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 愛知医療学院短期大学紀要	6. 最初と最後の頁 18-23
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 Kiyoshima Daisuke, Tatsumi Hitoshi, Hirata Hiroaki, Sokabe Masahiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Tensile Loads on Tethered Actin Filaments Induce Accumulation of Cell Adhesion-Associated Proteins in Vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 7443-7451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.8b02076	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 縣信秀, 清島大資, 伊東佑太	4. 巻 10
2. 論文標題 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果 超音波刺激条件による効果の違い	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 常葉大学紀要	6. 最初と最後の頁 1-6
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 清島大資
2. 発表標題 固定したアクチンフィラメントへの引張り負荷がin vitroでの細胞接着関連タンパク質の集積を誘導する-細胞接着構造の力依存的発達過程を再構成する試み-
3. 学会等名 第25回基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 笹井宣昌, 清島大資, 濱田文彦, 河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮時の骨格筋内リンパ管数の変化とリンパ管新生因子の関係
3. 学会等名 第25回基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清島大資, 縣信秀, 伊東佑太, 木村菜穂子, 小林剛, 宮津真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 超音波刺激が筋管の肥大へ与える影響 様々な超音波刺激条件に着目して
3. 学会等名 第27回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 縣信秀, 清島大資, 伊東佑太, 木村菜穂子, 宮津真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 異なる超音波刺激条件による筋衛星細胞の増殖促進効果
3. 学会等名 第27回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清島大資, 縣信秀, 伊東佑太, 木村菜穂子, 小林剛, 宮津真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 培養筋管に対する超音波刺激の肥大効果 刺激強度や照射時間率が筋肥大効果へ与える影響
3. 学会等名 第24回基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 縣信秀, 森友洋, 清島大資, 伊東佑太, 木村菜穂子, 宮津真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 マウス足関節背屈筋群の伸張性収縮による筋損傷量は角速度に依存する
3. 学会等名 第24回基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清島大資, 辰巳仁史, 平田宏聡, 曾我部正博
2. 発表標題 固定アクチン線維への引張り負荷により細胞接着関連分子が <i>in vitro</i> で集積する - 細胞接着構造の力依存的発達過程を再構成する試み -
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清島大資, 縣信秀, 小林剛, 宮津真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 培養筋管に対する超音波刺激の肥大効果 刺激前の分化培地培養期間の違いによる筋肥大効果の違い
3. 学会等名 第23回基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 縣信秀, 清島大資, 宮津真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果 超音波刺激条件による効果の違い
3. 学会等名 第23回基礎理学療法学会学術大会
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	小林 剛 (KOBAYASHI Takeshi) (40402565)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
連携研究者	縣 信秀 (AGATA Nobuhide) (00549313)	常葉大学・保健医療学部・准教授 (33801)	
連携研究者	伊東 佑太 (ITO H Yuta) (30454383)	名古屋学院大学・リハビリテーション学部・准教授 (33912)	

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