

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07895

研究課題名(和文) 高齢心不全患者に和温療法を用いた認知機能・筋力改善効果と分子的機序の解明

研究課題名(英文) Effects and Molecular Mechanisms of WAON Therapy on Cognitive Function and Muscle Strength Improvement in Elderly Heart Failure Patients

研究代表者

豊田 茂 (Toyoda, Shigeru)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：80332998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢心不全患者に対し和温療法の効果を検討した。その結果認知機能の改善を認め、筋力・身体機能については、左右膝伸展筋力、SPPBが有意に増加・改善した。SF36では、活力、日常役割機能(精神)、精神的側面が有意に改善した。基礎的検討では、温熱刺激が骨格筋に及ぼす効果を培養マウス骨格筋芽細胞を用いて検討した。速筋のマーカであるMyh1、2、4と遅筋のマーカであるMyh7、12、13はいずれも増大した。また温熱刺激をラットに負荷すると筋重量と筋線維径の増大を認めた。以上より高齢心不全患者における和温療法が認知機能の改善および筋力維持に有用であることが臨床的および基礎的な点から明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は高齢化により慢性心不全患者・認知症患者が増加している。高齢心不全患者は安静、環境変化等により認知症状・筋力低下が容易に出現しやすい。そして認知障害・筋力低下が心不全の予後を悪化させ悪循環となっている。

本研究結果より、高齢心不全患者に対し和温療法を入院早期から施行することで認知症悪化予防効果、筋力維持効果が期待でき、悪循環を断ち切ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of a WAON therapy on elderly patients with heart failure were examined. The results showed improvement in cognitive function. In terms of muscle strength and physical function, right and left knee extension muscle strength and SPPB were significantly increased and improved, and in SF36, vitality, daily role function (mental), and mental aspect were significantly improved. In the basic study, the effects of thermal stimulation on skeletal muscle were examined using cultured mouse skeletal myoblasts. Myh1, 2, and 4, which are markers of fast-twitch muscle, and Myh7, 12, and 13, which are markers of slow-twitch muscle, were all increased. In addition, thermal stimulation increased muscle weight and myofiber diameter in rats. These results indicate that the use of WAON therapy in elderly heart failure patients is effective in improving cognitive function and maintaining muscle strength, from both clinical and basic perspectives.

研究分野：循環器内科学

キーワード：和温療法 高齢心不全 認知機能 フレイル 温熱刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化により慢性心不全患者・認知症が今後増加する。高齢心不全患者は安静、環境変化等により認知症状・筋力低下が容易に出現しやすい。そして認知障害・筋力低下が心不全の予後を悪化させ、介護度が高くなり自宅へ帰れず転院し病院を渡り歩く悪循環となっている。高齢心不全入院患者に対し、和温療法を入院早期から施行することで心機能および脳血流さらにフレイルを改善せしめ、認知症発症予防・筋力維持、さらには介護度改善による自宅退院により転院への悪循環を改善できる。さらにin vitroでの細胞レベル、in vivoでの実験的な筋萎縮モデルを用いて、温熱刺激による骨格筋に対する筋肥大効果の分子的機序の解明を試みる。

2. 研究の目的

本研究では当施設における急性心不全および慢性心不全の急性増悪にて入院した患者に対し、和温療法器を用いた和温療法を施行し、心機能および心筋、酸化ストレス、炎症、交感神経等各血液バイオマーカー、脳血流SPECT、認知機能検査、またフレイル評価として握力、歩行速度、筋量、Barthel Indexを和温療法前後で施行し、高齢者心不全患者に対する和温療法の脳血流・認知機能・フレイル改善効果およびその病態を解明する。

基礎研究は、in vitroでの細胞レベル、さらに、in vivoでの実験的な筋萎縮モデルを用いて、温熱刺激による骨格筋に対する筋肥大効果の分子的機序の解明を試みる。

3. 研究の方法

本研究では当施設における急性心不全および慢性心不全の急性増悪にて入院した患者に対し、和温療法器を用いた和温療法を急性期離脱後1回/日計10-20回施行し、心機能および心筋、酸化ストレス、炎症、交感神経等各血液バイオマーカー、脳血流SPECT、認知機能検査、またフレイル評価として握力、歩行速度、筋量、Barthel Indexを和温療法前後で施行し、高齢者心不全患者に対する和温療法の脳血流・認知機能・フレイル改善効果およびその病態を解明する。

基礎研究は、ラットの実験的なin vivo筋萎縮モデル(不活動モデルとしてマウスの神経を切除した除神経、廃用モデル)を用いて、物理的刺激(温熱負荷)の筋萎縮に対する有用性及び分子的機序につき検討する。筋萎縮モデルラットを、それぞれ2群に分け、温熱療法下トレーニングの筋萎縮改善効果につき検討する。筋肥大:筋重量を測定 筋組織の蛋白、mRNAなどの遺伝子解析などを実施:ウエスタンブロッティング, Real-time RT-PCRなど:とくに、HSP蛋白質、筋萎縮に関連の深いことが報告されているMuRF1とatrogen-1その他についても詳細に検討する 線維の染色、免疫染色、サテライト細胞(幹細胞染色)他: Myosin ATPase染色, 免疫組織染色(抗MHC-f抗体、抗MHC-s抗体)により、遅筋・速筋の染色、筋線維タイプを判別し、筋線維タイプの短径と構成比率を検討し、物理的刺激によるタイプI線(遅筋線維), タイプII線維(速筋線維)に及ぼす影響などについても検討する。温熱刺激による筋肥大、筋萎縮と関連するシグナル伝達系に及ぼす影響についても、骨格筋C2C12細胞を用いてin vitroで検討する。温熱刺激において、Heat shock蛋白、nitricoxide (NO)をはじめ、多くの遺伝子の転写と翻訳が増加する。そこで、マウス骨格筋由来筋芽細胞(C2C12細胞)を用いて、温熱刺激による筋肥大と関連するシグナル伝達系に及ぼす影響についても検討する。細胞は、マウス骨格筋由来筋芽細胞(C2C12細胞、Myoblast)を用い、タイプIコラーゲンがコーティングされた細胞培養プレートを用い、C2C12細胞を増殖培地にて3日間培養し、サブコンプレントに達した後、細胞の分化培地に交換して培養することで筋管細胞(Myotube)に分化させ実験する。低酸素環境あるいは37-

42 の温熱刺激を与えて検討する。病的筋萎縮モデルは、細胞をTNF あるいはステロイドの処置により実施し、温熱刺激の効果、および分子的機序を解明する。

4 . 研究成果

基礎的検討

温熱刺激が骨格筋に及ぼす効果に関して、培養マウス骨格筋芽細胞を用いて検討した。C2C12 骨格筋芽細胞に 42 の温熱刺激を 1 時間負荷した後に 37 インキュベーター内で 24 時間培養後リアルタイム PCR を用いて mRNA の発現変化を定量した (N=5)。温熱刺激群では、速筋のマーカである Myh1 (type 2x)、Myh2 (type 2a)、Myh4 (type 2b)、と遅筋のマーカである Myh7 (type 1)、MyI2、MyI3 はいずれも増大した。速筋のマーカである MyI1 は変化しなかった。次に DNA アレイを用いて網羅的な mRNA の発現変化を検討した (N=4)。温熱刺激により 38 遺伝子が 1.5 倍以上増大し、59 遺伝子が 2/3 以下に減少した。この中には 12 種類の転写因子があり、神経細胞の増殖や分化に関与する転写因子も含まれていた。さらには質量分析計で網羅的に蛋白の発現変化を同様に検討した。同定できた 640 種類の蛋白のうち、温熱刺激により 114 蛋白が 1.5 倍以上増大し、143 蛋白が 2/3 以下に減少した。DAVID を用いたパイオインフォマティクスでは、細胞外のエクソゾームに関連する蛋白が温熱刺激に関連していた。このことは、温熱刺激により骨格筋芽細胞の分化が促進されることを意味し、その機序としてエクソゾームを介したパラクラインあるいはオートクライン効果が示唆された。

温熱刺激を 1 回 20 分、計 7 回負荷すると筋重量と筋線維径の増大を認めることなど報告した。マイクロアレイによる遺伝子解析では、KEGG pathway では、ECM-receptor interaction、Focal adhesion などに関連する Col1a1、Col1a2 などの遺伝子の発現が低下していた。さらに、神経を切除した除神経モデルを用いて、温熱刺激の効果につき検討した。Wistar 系雄性ラットを用いて、坐骨神経切除により廃用モデルを作成モデルで、実験開始 2 週間後にヒラメ筋を採取し、凍結切片を作成した。除神経群の筋線維断面積は、偽手術群に比べ、有意に小さかった(p<0.01)。

慢性的な温熱刺激プロトコールと骨格筋適応の関係性

温熱刺激は温度感受性チャネル(TRPV1)を活性化させ、骨格筋細胞内へカルシウムイオン(Ca²⁺)を流入させる。Ca²⁺はタンパク合成経路を活性化させるシグナル伝達物質の役割を有する。この結果は TRPV1 が筋萎縮の治療において新たな標的となり得ることを示唆している。温熱刺激による TRPV1 を介した細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)の増加と骨格筋肥大の応答は、熱刺激時間に依存するという仮説を検証した。Wistar 系雄性ラットのヒラメ筋 (SOL) を麻酔下で露出させ、Ca²⁺感受性蛍光指示薬を導入後、温熱刺激負荷中の[Ca²⁺]_iを in vivo 環境下で 60 分間測定した (Heat 群)。対照群は筋温を 30 に維持し測定を行った (CONT 群)。ラットの右後肢に温熱刺激を 1 回 20 分または 60 分、2 日に 1 回の頻度で計 7 回負荷し、最終負荷から 24 時後に SOL を摘出し筋湿重量を測定した。また、一過性温熱刺激負荷時 (20 分または 60 分) のタンパク合成・分解経路を Western Blot により定量した。CONT 群は観察中有意な[Ca²⁺]_i変動を認めなかった一方で、Heat 群の[Ca²⁺]_iは初期値と比較し 5 分以降で有意に増加し (20 分後: 51.9 ± 1.2%), 60 分の時点で筋の浮腫を認めた。筋湿重量は 20 分負荷では対照脚と比較し有意に増加したのに対して (11 ± 2%, P < 0.05), 60 分負荷では減少傾向であった。また、S6 のリン酸化は対照脚と比較して 20 分及び 60 分で同様に増加し、Calpain1 の活性化はいずれの群も認め

なかった。温熱刺激負荷の時間経過による $[Ca^{2+}]_i$ 動態の違いが骨格筋の温熱刺激に対する適応を変化させることが示唆された。

臨床的検討

最終的な登録症例は36例であった。そのうち脳梗塞既往による除外1件、1例は本人拒否にて中止、1例は出血性疾患がその後判明したため中止とした。計33例で解析を行った。まず今回我々が施行した高齢心不全患者に対する和温療法 1回/日、計10回施行するプロトコールにおいて、血圧低下やふらつき等の自覚症状や転倒等の有害事象は認めなかった。和温療法前後におけるSPECTによる脳血流評価では、平均脳血流量は有意な変化は認められなかった(各領域における検討は現在解析継続している)。血液検査ではBDNF(脳神経成長由来因子)は有意な変化は認めなかったが、血清amyloid precursor proteinと酸化ストレスの指標であるdROMにおいて和温療法前後で有意な改善が認められた。認知機能の指標としてMMSEおよびMoCA-Jを検討した。MMSEは有意ではなかったが、 $p=0.056$ と改善傾向を認めた(これは今回の対象患者で比較的認知機能が保持された症例が多いことおよび症例数によると考える)。MoCA-Jは有意に点数が改善した。筋力・身体機能については、握力、大腿筋厚、骨格筋指数(骨格筋量)、パーセルインデックスには有意な差は認めなかったが、左右膝伸展筋力(体重比含む)、Short Physical Performance Batteryは和温療法後で有意に増加・改善した。SF-36では、活力、日常役割機能(精神)、精神的側面のサマリースコアが有意に改善した。

結論として、高齢心不全患者における和温療法は安全に施行でき、認知機能の改善および筋力維持に有用であることが明らかとなった。

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 0件）

1. 著者名 Ikegami Ryo, Eshima Hiroaki, Nakajima Toshiaki, Toyoda Shigeru, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 320
2. 論文標題 Type I diabetes suppresses intracellular calcium ion increase normally evoked by heat stress in rat skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R384 ~ R392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpregu.00168.2020	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池上諒, 中島敬明, 豊田茂, 狩野豊
2. 発表標題 慢性的な温熱刺激プロトコールと骨格筋適応の関係性
3. 学会等名 第 77 回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022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	鄭 忠和 (Tei Chuwa) (10163891)	獨協医科大学・医学部・特任教授 (32203)	
研究分担者	小尾 正太郎 (Obi Shotaro) (10734452)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	井上 晃男 (Inoue Teruo) (20168454)	獨協医科大学・医学部・特任教授 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	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	安田 智洋 (Yasuda Tomohiro) (20549604)	聖隷クリストファー大学・看護学部・教授 (33804)	
研究分担者	中島 敏明 (Nakajima Toshiaki) (50227790)	獨協医科大学・医学部・特任教授 (32203)	
研究分担者	有川 拓男 (Arikawa Takuo) (90285817)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	狩野 豊 (Kano Yutaka) (90293133)	電気通信大学・大学院情報理工学研究所・教授 (12612)	

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