

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：34534

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500481

研究課題名（和文）刺激量・時間・タイミング 機械刺激が筋萎縮を抑える効果は何によって高まるか？

研究課題名（英文）Relationship between stretching frequency and reduction in denervation-induced muscle atrophy

研究代表者

曾我 浩之（HIROYUKI SOGA）

近大姫路大学・看護学部・教授

研究者番号：20282121

研究成果の概要（和文）：

萎縮軽減に効果的な繰り返し伸長刺激の周波数を明らかにするために、坐骨神経を切除したラットのヒラメ筋に対して異なる周波数の伸長刺激を1日15分間、2週間与えた後、筋線維横断面積を比較した。その結果、5秒間伸長刺激を加え5秒間弛緩させる繰り返し伸長刺激が最も筋萎縮を軽減させることが判明した。また、本周波数の繰り返し伸長刺激は、他の周波数に比べて、筋肥大に関わるシグナルの活性が有意に高いことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In order to determine the effect of repetitive stretching frequency on atrophy reduction, the cross-sectional areas (CSA) of denervated rat soleus muscles were compared after being stretched on different frequency. Equal amounts of stimulus (defined as the product of the strength and time of the stretch) were applied to each group. Different frequency of stretch-induced stimulations were applied by stretches of varied durations: 1 (1-s group), 5 (5-s group), 25 (25-s group), or 450-sec (450-s group). CSA of the 5-s group was significantly greater than those of the other three groups. The Akt activation of the soleus muscle was significantly greater in the 5-s group than the non-stretch group. It was initially believed that Akt activation might reduce muscle atrophy, but no differences were observed between the 1-, 25-, 450-s, and non-stretch group in terms of Akt activation of the soleus muscle. In the 1-s group, extent of muscle atrophy reduction was less than the 5-s group. This is because the higher frequency of stimulation was excessive, and the activation factor that is involved in the protein degradation process was shown to be elevated. This study shows that the amount of muscle atrophy reduction may depend on the frequency of the stretch stimulation. Reductions in atrophy may be achieved by applying stretch stimulations of a certain frequency, and this effect decreases as the frequency increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：理学療法学、ラット、伸長刺激、筋萎縮、Akt

## 1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定、末梢神経障害などにより不活動状態に置かれた骨格筋は萎縮する。筋萎縮を軽減させる方法として、理学療法では負荷運動、電気刺激が用いられるが、ストレッチングなどにより筋に伸張刺激を加えることでも、萎縮を軽減させることが出来る。伸張刺激による筋萎縮軽減効果の多くは、持続的な伸張刺激を用いて検証されてきたが、近年では、間欠的な伸張刺激による効果も報告されている。しかし先行研究では萎縮モデルや伸張方法などが異なっており、持続的な伸張刺激と間欠的な伸張刺激とで、どちらの方が効果があるか、またどのくらいの周波数で行う間欠的な伸張刺激が効果的なのかは分かっていない。

機械刺激による筋萎縮軽減や筋肥大の効果は、1973年 Williams らが報告して以来、たくさんの報告がある。その多くが、筋が伸張位になるような肢位でテープやギプスで固定し、持続的に筋に機械刺激を加えた時の効果を示した報告である。しかし、これまでのギプスやテーピングを用いた刺激方法では、筋に加えられている刺激（刺激量、周波数、波形）を定量的に加えることができず、どのような機械刺激が筋萎縮軽減に最適なのかを明らかにできない。

これを明らかにするためには、骨格筋に対して定量的な機械刺激を加えることができる装置の開発が必要である。これまでに、骨格筋に対する周期的な機械刺激が筋萎縮を軽減することを明らかにした。また、この機械刺激による筋萎縮軽減には、筋タンパク質合成経路である Akt/mTOR/p70S6K 経路が関与している可能性を示した。一方、筋萎縮を誘導する因子として atrogenin や, MuRF family が同定されているが、この因子の活性と機械刺激との関連は明らかにされていない。筋萎縮軽減に最適な機械刺激を多方面から客観的に明らかにするためには、このような分子レベルでのメカニズムを明らかにし、それを指標として評価する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、どのような機械刺激の刺激条件（周波数に着目）が、筋タンパク質の合成と分解に関わる情報伝達分子を活性化させるのかを明らかにし、その活性を指標とし、筋萎縮軽減に最適な機械刺激条件を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ラットの坐骨神経を切除した後肢筋の萎縮モデルを作製した。除神経翌日から13日間毎日、小動物用足関節運動装置を用いて、同じ強度で周波数が異なる他動的間欠的足

関節背屈運動を行い、ヒラメ筋に伸張刺激を加えた。加える伸張刺激の周波数は、足関節背屈運動中のヒラメ筋伸張位、中間位を保持する時間を群毎に変えることにより設定した。除神経14日後にヒラメ筋を採取後、筋横断切片を作製し、筋線維横断面積を測定した。また伸張刺激の刺激周波数と萎縮軽減に関与する細胞内シグナル活性の関係を調べる為、除神経7日後に各周波数の伸張刺激を加えた後にヒラメ筋を採取し電気泳動法及び、ウェスタン・ブロット法を用いて Akt の活性を評価した。

### 伸張刺激の刺激周波数と筋線維横断面積の関係 対象

対象は8週齢の Wistar 系雄性ラット (45匹) の左ヒラメ筋とした。全てのラットに対し、イソフルランガス麻酔下 (イソフル、大日本住友製薬 濃度 1.5%) にて左殿部を切開し、坐骨神経を 2 cm 切除した後肢筋の萎縮モデルを作製した。

### 他動的な足関節背屈運動の方法

伸張刺激を加える群のラットには、坐骨神経を切除した翌日から13日間、小動物用足関節運動装置を用いて一定トルクの間欠的な足関節背屈運動を1日1回行った。この足関節背屈運動は以下のように行った。まず、イソフルランガス麻酔下にて、小動物用足関節運動装置にラットを設置した。背屈運動の開始肢位は、膝関節 90° (大腿骨と脛骨の成す角度が 90°)、足関節 0° (脛骨と第5中足骨の成す角度が 90°) とした。開始肢位設定後、ラットの左足関節を底屈方向に加わるトルクが 8 mN·m に達するまで、角速度約 45 deg/s で背屈させた。8 mN·m にて、次に述べる、群毎に設定した一定時間保持した。その後、足関節を角速度約 45 deg/s で底屈させ、トルクが 0 mN·m に達した後、その角度で背屈保持時と同じ時間保持した。この運動を群毎に定めた一定時間に繰り返すことで、ヒラメ筋に繰り返し伸張刺激を加えた。

加える伸張刺激の周波数を変えることにより以下のような4群を作製した。最も伸張刺激周波数が低い群は、最初の足関節背屈後、トルク 8 mN·m にて450秒間保持した (450秒群, n=9)。その他の3群は保持時間を25秒 (25秒群, n=9)、5秒 (5秒群, n=9)、1秒 (1秒群, n=9) と設定した。なお本研究では、足関節背屈運動時のトルクと時間の積を刺激量と定義し、全伸張群に同等の刺激量を加えられるように、1日1回、足関節背屈運動を実施する時間を群毎に決め、450秒群は453秒、25秒群は825秒、5秒群は900秒、1秒群は1120秒とした。またこれら4群とは

別に、除神経翌日から13日間1日1回、イソフルラン麻酔を投与するのみで伸張刺激を加えない対照群を作製した（非伸張群, n=9）。

#### 試料作製及び筋線維横断面積測定

実験開始14日後、左ヒラメ筋を採取し80℃下で保存した。各試料は、クライオスタット（Leica, CM 1510）を用いて8μm厚の横断切片を作製し、H-E染色を施し、筋線維横断面積とした。

#### 伸張刺激の刺激周波数と筋萎縮軽減に関与する細胞内シグナル活性の関係 対象

8週齢のWistar系雄性ラット（45匹）の坐骨神経を切除した7日後に、小動物用足関節運動装置を用いてヒラメ筋に対し、1秒群、5秒群、25秒群、450秒群と同様の伸張刺激をそれぞれ加えた（各n=9）。伸張刺激開始15分後、全ラットのヒラメ筋を採取した。非伸張群は、伸張刺激を加えずに麻酔開始15分後にヒラメ筋を採取した（n=9）。

採取したヒラメ筋を、瞬間凍結させた後、細かく碎き、extraction buffer（20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1% sodium dodecylsulfate: SDS, 25 mM NaF, 1 mM sodium metavanadate, aprotinin 10 μg/ml, pepstatin 5mM, PMSF）を加え、クラッシュアイス上でホモジナイザー（Polytron）を用いてホモジナイズした。その後、遠心分離機を用いて15000 rpm, 4℃の条件下で20分間遠心分離を行い、上清液を回収した。その後、micro BCATM protein assay（Pierce）を用いて、buffer内のタンパク量を測定した。測定した値を参考に、buffer中のタンパク濃度を一定にした。その後、2×SDS sample buffer（125 mM Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue）を加え、60℃で約10分間incubationした。調整したサンプルは、測定まで-20℃で保存した。サンプルは、SDS-PAGE（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis）を用い、タンパク質を分離した。total-Akt, phospho-Aktの測定には10%polyacrylamide gelを用いた。

#### ウェスタン・ブロット法

10%polyacrylamide gelに分離されたタンパク質をウェスタン・ブロット法を用いてpolyvinylidene difluoride（PVDF）膜（Millipore Co.）に転写した。タンパク質を転写したPVDF膜を、ブロッキングバッファー[5% skim milk in phosphate buffered saline（PBS）]に1時間浸し、ブロッキングを行なった。その後、anti-Akt（total-Akt, Cell Signaling Technology Inc.）,

anti-phospho-Akt, ser473（Cell Signaling Technology Inc.）に対する一次抗体を4℃で一晩反応させ、続いて二次抗体であるgoat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate（IgG-AP, Bio-Rad Laboratories Inc.）を1時間、室温にて反応させた。なお、手順の間にPVDF膜をPBSで適時洗浄した。反応した抗体をalkaline phosphatase conjugate substrate kit（AP-substrate kit, Bio-Rad Laboratories Inc.）を用いて発色させ、スキャナー（PM-890A, Epson）を用いてPVDF膜の画像を読み込んだ。PVDF膜画像上に反応している抗体の発色の強さをImageJを用いて測定した。測定した発色の強さをを用いて、total-Aktに対するphospho-Aktの割合（phospho-Akt/total-Akt）を算出してAktの活性化の指標とし、非伸張群を1としたときの相対値で示した。

#### 統計処理

各群の比較には、一元配置分散分析を用いた。一元配置分散分析で有意差が認められた場合には、Tukeyの方法を用いて多重比較検定を行なった。なお、いずれの統計手法とも有意水準は5%未満とした。

#### 4. 研究成果

##### 伸張刺激の刺激周波数と筋線維横断面積の関係

除神経ヒラメ筋に対し、周波数の異なる伸張刺激を13日間加えた。実験終了後、ヒラメ筋を採取し筋線維横断面積を測定した。13日間伸張刺激を加えなかった非伸張群の筋線維横断面積は818±121 μm<sup>2</sup>であった。450秒群と25秒群の筋線維横断面積はそれぞれ799±91 μm<sup>2</sup>, 749±85 μm<sup>2</sup>であり、非伸張群と有意な違いはなかった。5秒群は1043±118 μm<sup>2</sup>であり、非伸張群、25秒群、450秒群に比べ有意に大きかった。一方、最も周波数が高い1秒群の筋線維横断面積は895±101 μm<sup>2</sup>であり、25秒群に比べ有意に大きかったものの、5秒群に比べ有意に小さい値であった。

##### 伸張刺激の刺激周波数と筋肥大に関与する細胞内シグナル活性の関係

除神経術を施した7日後のヒラメ筋に対し、周波数の異なる伸張刺激を加え刺激開始15分後に筋を採取、筋肥大に関与すると考えられる細胞内シグナル分子の一つであるAktの活性（phospho-Akt/total-Akt）を調べた。非伸張群のphospho-Akt/total-Aktの平均値を1としたときの450秒群、25秒群のphospho-Akt/total-Aktはそれぞれ1.3倍、1.5倍と非伸張群に比べ高い値を示したものの、有意な違いはなかった。5秒群は、1.7

倍と非伸張群に比べ有意に高い値を示した。しかし5秒群よりも周波数の高い1秒群では、phospho-Akt/total-Aktは1.4倍であり、非伸張群に対し有意な違いはなかった。

そこで本研究では、筋に対して一定の刺激を加えることが可能な小動物用足関節運動装置を用いて、筋に加える刺激量（伸張刺激の強度と時間の積）を統一し、萎縮筋に対して、周波数が異なる伸張刺激を加えた時の筋線維横断面積を比較した。除神経ラットのヒラメ筋に対し、除神経翌日から13日間毎日伸張刺激を加えた。伸張刺激の強度は全群同じとし、足関節背屈運動中のヒラメ筋伸張位を保持する時間を1, 5, 25, 450秒とすることで、加える伸張刺激の周波数が異なる1秒群, 5秒群, 25秒群, 450秒群を作製した。除神経14日後にヒラメ筋を採取、筋線維横断面積を測定した。その結果、450秒群, 25秒群の筋線維横断面積は非伸張群と違いはなかったが、周波数の高い5秒群はそれら3群に比べ有意に大きかった。ところが更に周波数の高い1秒群は、5秒群に比べ有意に小さかった。

一方、骨格筋では恒常的にタンパク質の合成と分解が行われており、筋萎縮時には合成の抑制や分解の促進が起こっていると考えられる。よって筋萎縮を軽減するには筋構成タンパク質の合成の促進、もしくは分解の抑制が必要である。タンパク質の合成に関与するシグナルの中で重要だと考えられている一つにAkt/mTOR/p70s6k(4EBP-1)経路がある。この経路の活性が伸張刺激による筋萎縮軽減に必須であるとの報告もある。そこで周波数の異なる伸張刺激を加えたときの、Aktの活性を比較した。除神経ラットのヒラメ筋に対し、除神経7日後に1秒群, 5秒群, 25秒群, 450秒群に加えたのと同じ周波数の伸張刺激を加えた。そして刺激開始15分後にヒラメ筋を採取、電気泳動法及びウェスタン・ブロット法によりAktの活性を調べた。その結果、伸張位にて5秒保持する伸張刺激を加えた群のAkt活性は非伸張群比べ高い値を示した。このAkt活性の上昇により、5秒群は筋萎縮軽減効果が得られたのではないかと考える。また450秒, 25秒, 1秒保持の伸張刺激を加えた群のAkt活性は非伸張群と有意な違いはなかった。今後の検証が必要ではあるが、5秒群より高い周波数の1秒群で効果が減少したのは、筋に刺激が加わる回数が過剰になり、タンパク分解に関与する因子の活性が高まったのではないかと考える。以上のことより、伸張刺激による筋萎縮軽減効果は、加える伸張刺激の周波数によって異なり、ある周波数帯の伸張刺激で効果が得られ、それ以上高い周波数では効果が減少する

ことが判明した。この結果は、人を対象として伸張刺激による筋萎縮軽減効果を検証する際に、伸張刺激の周波数に着目し検証することの重要性を示すものであると考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

- ①村田菜緒子、吉岡潔志、伊東佑太、平野孝行、河上敬介、マウスの非観血的な足関節底屈トルク測定装置の開発、第11回コ・メディカル形態機能学会学術集会、2012年9月22日、東京
- ②伊東佑太、藤田佳菜子、縣信秀、宮津真寿美、平野孝行、河上敬介、筋力増強運動による萎縮筋の筋線維核数増加の時期や量、第47回日本理学療法学会学術大会、2012年5月26日、神戸
- ③Agata N., Kataoka A., Inoue-Miyazu M., Hayakawa K., Kawakami K., Influence of duration and frequency at suppressive effect of repetitive stretching on muscle, World Confederation for Physical Therapy, 2011.6.23, Amsterdam Holland.
- ④鈴木惇也、縣信秀、宮津真寿美、曾我浩之、河上敬介、除神経に対する伸張刺激の萎縮軽減効果は刺激周波数によって異なる、第46回日本理学療法学会学術大会、2011年5月28日、宮崎
- ⑤鈴木惇也、縣信秀、宮津真寿美、曾我浩之、河上敬介、伸張刺激の周波数と筋萎縮軽減効果の関係、第18回日本物理療法学会学術大会、2010年10月17日、東京
- ⑥鈴木惇也、縣信秀、宮津真寿美、曾我浩之、河上敬介、伸張刺激の周波数によって異なる除神経筋の萎縮軽減効果、第9回コ・メディカル形態機能学会学術集会、2010年9月11日、新潟

[その他]

河上研究室ホームページ

<http://www.kmnu.matrix.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾我 浩之 (HIROYUKI SOGA)  
近大姫路大学・看護学部・教授  
研究者番号：20282121

### (2) 研究分担者

河上 敬介 (KEISUKE KAWAKAMI)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：60195047

(3) 連携研究者  
なし