

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 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590653

研究課題名（和文） 鍼刺激による骨格筋幹細胞の増殖誘導を利用した治療法の開発

研究課題名（英文） Development of therapeutic method which is based on acupuncture induced proliferation of skeletal muscle stem cells

研究代表者

高岡 裕 (TAKAOKA YUTAKA)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20332281

研究成果の概要（和文）：鍼通電刺激による骨格筋幹細胞の増殖誘導を利用した治療法の研究に取り組んだ。骨格筋幹細胞増殖に有効な刺激条件は、30 Hz 迄の低周波鍼通電刺激や中周波（混合波）やフェムト秒レーザー照射だった。フェムト秒レーザーや鍼通電では殆ど細胞損傷を生じなかった。次に、廃用性筋萎縮マウスモデルでの解析で、鍼通電による筋萎縮抑制が可能な事、遺伝子発現の変化とミオスタチンのタンパク質量の低下を見出し、AKT/mTOR/FOXO シグナル伝達系の関与も示唆された。また、鍼通電は筋量の維持に加え、収縮力も維持可能なことも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We studied therapeutic method utilizing electro-acupuncture which induces proliferation of skeletal muscle stem cells. Our results showed that effective stimulation condition for the proliferation of skeletal muscle stem cells was electro-acupuncture of the low-frequency up to 30 Hz, that of mixed mid-frequency and the femtosecond laser radiation. We found no cell damages after the stimulation of such electro-acupuncture and the femtosecond laser. Our analysis of the model mouse of disuse muscle atrophy showed that the electro-acupuncture could inhibit muscle atrophy, changed gene expressions, reduced protein abundance of myostatin and the correlation of AKT/mTOR/FOXO signaling was suggested. The result of our experiment also showed that the electro-acupuncture could maintain not only the muscle mass but the contractile force of muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学、鍼灸、遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

本研究は、研究代表者の臨床経験とこれま

での研究成果を基に着想された。具体的には、(1) ギランバレー症候群の患者の鍼治療時に、鍼通電治療側で骨格筋肥大(修復・再生)の亢進を経験した(高岡、全日本鍼灸学会雑誌 57、2007)。そこで、鍼通電刺激後のマウス骨格筋で網羅的に遺伝子発現を解析したところ、鍼通電刺激がミオスタチン遺伝子の発現を抑制することを発見した(Takaoka et al, *Physiol Genomics* 3, 2007)。また、(2) 通電しない鍼刺激でも同様のミオスタチン遺伝子の著しい発現抑制を生じる(未発表データ)。ミオスタチンは骨格筋幹細胞(衛星細胞)の増殖停止の機能を有し、その作用低下により筋肥大(骨格筋幹細胞の増殖)が生じる(*N Engl J Med.* 351(10), 1030-1, 2004)。実際、鍼通電刺激を4週間毎日反復すると、ミオスタチン遺伝子発現が著しく低下し骨格筋幹細胞が増殖を開始した。これらの結果から、鍼通電刺激がミオスタチン遺伝子発現を抑制して骨格筋幹細胞の増殖が生じ、筋萎縮の予防やリハビリテーション効果が期待された。このうち鍼通電刺激の筋萎縮の予防効果を廃用性筋萎縮マウスモデルで解析したところ、(3) ミオスタチン遺伝子発現の抑制と共に筋萎縮が抑止されていた(Takaoka et al, Nova Science Publishers, NY, 2008)。以上の研究成果を基盤として、鍼治療の骨格筋幹細胞への増殖効果に基づく医療利用法の開発を着想した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、鍼刺激による骨格筋幹細胞の増殖効果を医療へ利用する治療法の研究開発と分子メカニズムの解明である。病態モデルマウスへの鍼治療による前臨床研究として、骨格筋の幹細胞を効果的に増殖させる鍼通電刺激条件の解明、病態モデルマウスを用いた鍼治療の解析系の確立と評価を行う。加えて、フェムト秒レーザー鍼についても同様に解析する。

3. 研究の方法

まず、骨格筋の幹細胞を効果的に増殖させる鍼通電刺激条件を明らかにし、その条件での廃用性筋萎縮マウスモデルへの鍼通電治療を行い、治療効果を解明可能な解析系を確立する。

次に、決定した骨格筋幹細胞を最も効果的に増殖させる鍼通電刺激周波数での鍼通電治療の骨格筋萎縮抑制効果と筋の収縮力の関係を、モデルマウスを用いた動物実験により解析する。そして、リアルタイムPCRによるミオスタチンの評価系に加えて、ウエスタンブロッティングによる評価系を確立する。最後に、ユビキチンリガーゼ遺伝子のリアルタイムPCR解析を行うと共に、確立したウエスタンブロッティングでもミオスタチン

を解析する。加えてウエスタンブロッティングによるシグナル伝達系解析を可能にすべく、評価系確立に取り組む。また、フェムト秒レーザー鍼の効果も解析する。

4. 研究成果

まず骨格筋幹細胞を最も効果的に増殖させる条件をリアルタイムPCR解析法によるミオスタチン遺伝子発現の変化を指標に、正常マウス下腿三頭筋で解析し、低周波では10 Hzから30 Hzの間が効果的であることを見出した。更に、中周波の混合波もフェムト秒レーザー照射も、同様に有効だった。血清中のクレアチンキナーゼ測定の結果から、単刺では骨格筋の微細な損傷を生じるが、フェムト秒レーザー照射では損傷を生じず、鍼通電の場合も殆ど損傷を生じないことが示された。

次に、後肢懸垂により筋萎縮を生じさせた廃用性筋萎縮マウスモデルに対して、反復鍼通電刺激群と無刺激群の2群間比較で、筋萎縮抑制効果を遺伝子発現解析、筋線維径と相対筋量を指標として解析した。筋線維径と相対筋量の解析から、鍼通電刺激で筋萎縮が抑制されていた。また、ミオスタチンをリアルタイムPCR解析した結果、鍼通電刺激でミオスタチンのmRNA量が減少していた。鍼通電した試料のウエスタンブロッティング解析は、現在取り組んでいるところである。フェムト秒レーザー刺激の効果をリアルタイムPCRおよびウエスタンブロッティング解析した結果、mRNA量とタンパク質量が低下していた。なお、このフェムト秒レーザー鍼については2012年12月27日に米国特許と国内特許が成立した(No. US8, 317, 847 B2 および特許第5164080号)。さらに、筋萎縮を制御しているユビキチンリガーゼであるMuRF-1、MAFbx、Cbl-bを対象に行ったリアルタイムPCR解析により、AKT/mTOR/FOXOシグナル伝達系の関与が考えられた。また日本温泉気候物理医学会雑誌74巻2号に掲載された本研究成果の一つである原著論文は、2012年6月8日に第17回日本温泉気候物理医学会優秀論文賞を受賞した。

最後に、このマウスモデルを用いて、①隔日反復の刺激条件で4週間刺激した“後肢懸垂/鍼通電刺激”群、②後肢懸垂のみで鍼通電刺激しなかった“後肢懸垂/無刺激”群、③後肢懸垂と鍼通電刺激の両方を行わなかった“野生型/無刺激”群の3群で、鍼通電刺激が廃用性骨格筋萎縮を抑制した際の骨格筋の収縮力について解析した。その結果、廃用性骨格筋萎縮条件下で鍼通電刺激は筋量の維持に有効なことが改めて示され、“後肢懸垂/鍼通電刺激”群と“野生型/無刺激”の収縮力は同等であった。このことから、鍼通電刺激された骨格筋は筋量が維持されただけでなく、骨格筋の機能である収縮力も維

持されることが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Yoichiro Hosokawa, Mika Ohta, Akihiko Ito, Yutaka Takaoka, Photomechanical ablation of biological tissue induced by focused femtosecond laser and its application for acupuncture, *Applied Physics A*, 査読有, 2013, 110, 613-616
- ② Rusdy Ghazali Malueka, Yutaka Takaoka, Mariko Yagi, Hiroyuki Awano, Tomoko Lee, Ery Kus Dwianingsih, Atsushi Nishida, Yasuhiro Takeshima, Masafumi Matsuo, Categorization of 77 dystrophin exons into 5 groups by a decision tree using indexes of splicing regulatory factors as decision markers, *BMC Genetics*, 査読有, 2012, 13(23), doi:10.1186/1471-2156-13-23
- ③ Yusuke Nagara, Man Hagiya, Naoya Hatano, Eugene Futai, Satoshi Suo, Yutaka Takaoka, Yoshinori Murakami, Akihiko Ito, Shoichi Ishiura, Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by γ -secretase complex, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 2012, 417(1), 462-467
- ④ 三浦研爾、菅野亜紀、長野 仁、山瀬健治、大田美香、小田 剛、後藤修司、西尾久英、松尾雅文、前田英一、西本 隆、高岡 裕、オントロジーによる漢方概念の研究、漢方と最新治療、査読有、2011、20(2)、161-167
- ⑤ 池宗佐知子、大田美香、鈴木茂久、町田正直、武政 徹、高岡 裕、宮本俊和、後肢懸垂により引き起される筋萎縮の回復過程における鍼通電刺激の効果、全日本鍼灸学会雑誌、査読有、60(4)、2010、707-715
- ⑥ 高岡 裕、鍼の治効機序研究の新展開、医道の日本、査読無、69(11)、2010、81-85
- ⑦ 長野 仁、高岡 裕：小児鍼の起源について -小児鍼師の誕生とその歴史的背景-、日本医史学雑誌、査読有、2010、56(3)、387-414
- ⑧ 池宗佐知子、大田美香、宮本俊和、高岡 裕、鍼通電刺激が廃用性の骨格筋萎縮を抑制する分子メカニズム、日本温泉気候物理医学会雑誌、査読有、2011、74(2)、103-111
- ⑨ Aki Sugano, Mika Ohta, Tsuyoshi Oda, Kenji Miura, Shuji Goto, Masako Matsuura, Eiichi Maeda, Toshiko Ohshima, Yuji Matsumoto, Yutaka Takaoka, eBraille: A web based translation program for Japanese text to Braille, *Internet Research*, 査読

有, 2010, 20(5), 582-592

[学会発表] (計 24 件)

- ① 高岡 裕 (招待講演)、二次性サルコペニアへの鍼通電治療：遺伝子発現とシグナル伝達系からの分子エビデンス【発表確定】、第 64 回日本東洋医学会学術総会、2013 年 6 月 1 日、城山観光ホテル (鹿児島県)
- ② 大田美香 (招待講演)、鍼刺激で発見したマウス Aig11 遺伝子とそのタンパク質の生化学/生物物理【発表確定】、第 64 回日本東洋医学会学術総会、2013 年 6 月 1 日、城山観光ホテル (鹿児島県)
- ③ 大田美香、鍼通電刺激の基礎研究で発見した Aig11 タンパク質の機能解析、平成 24 年度日本東洋医学会関西支部例会、2012 年 10 月 28 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ④ 小田剛、視覚障害者用の鍼灸教材へのオントロジー利用とその有用性、平成 24 年度日本東洋医学会関西支部例会、2012 年 10 月 28 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ⑤ 高岡 裕 (招待講演)、オントロジーの漢方研究への応用、第 63 回日本東洋医学会学術総会 ワークショップ・チャレンジ漢方 1 -臨床総論-、2012 年 7 月 1 日、国立京都国際会議場 (京都府)
- ⑥ 高岡 裕 (招待講演)、トランスレーショナルな研究の実践から伝統医学領域研究の革新へ、柔道整復基礎医科学シンポジウム 2012、2012 年 6 月 17 日、帝京平成大学池袋キャンパス本館 (東京都)
- ⑦ 三浦研爾、伝統医学領域の用語標準化に向けたオントロジー構築、第 31 回医療情報学連合大会 (第 12 回日本医療情報学会学術大会)、2011 年 11 月 21 日、鹿児島市民文化ホール (鹿児島県)
- ⑧ 高岡 裕 (招待講演)、分子シミュレーション解析の生命医学研究への利用、第 199 回 熊本大学生命資源研究・支援センターセミナー、2011 年 11 月 18 日、熊本大学生命資源研究・支援センター (熊本県)
- ⑨ 三浦研爾、東医 Braille、漢方文献向けの自動点字翻訳プログラム、平成 23 年度日本東洋医学会関西支部例会、2011 年 10 月 30 日、大阪国際交流センター (大阪府)
- ⑩ 高岡 裕、Serendipity 発掘と獲得の戦略、第 4 回バイオナノシステムズ研究会、2011 年 8 月 6 日、神戸大学医学部神緑会館 (兵庫県)
- ⑪ 高岡 裕、筋萎縮モデルマウスの筋張力への鍼通電刺激の影響、第 62 回日本東洋医学会学術総会、2011 年 6 月 12 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑫ 小田 剛、中周波/低周波から成る混合波による経皮的電気刺激の骨格筋への影響、第 62 回日本東洋医学会学術総会、2011 年 6

月 12 日、札幌コンベンションセンター（北海道）

⑬ 三浦研爾、オントロジーによる日本漢方と中医学の比較、第 62 回日本東洋医学会学術総会、2011 年 6 月 12 日、札幌コンベンションセンター（北海道）

⑭ 高雄由美子、抑肝散が有効であった難治性疼痛 9 症例の検討、第 62 回日本東洋医学会学術総会、2011 年 6 月 11 日、札幌コンベンションセンター（北海道）

⑮ 高岡 裕（招待講演）、フェムト秒レーザー照射の保健医療分野への応用 & 計算機による模倣技術、第 10 回次世代医療システム産業化フォーラム 2011、2011 年 3 月 17 日、神戸商工会議所（兵庫県）

⑯ 三浦研爾、Aig11 タンパク質のバイオインフォマティクス解析、第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学会合同年会、2010 年 12 月 9 日、神戸国際会議場（兵庫県）

⑰ 三浦研爾、東洋医学理論研究へのオントロジー解析利用の可能性、平成 22 年度日本東洋医学会関西支部例会、2010 年 10 月 24 日、兵庫県医師会館、（兵庫県）

⑱ Yutaka Takaoka, Bioinformatics analysis of Aig11 protein, CBI 学会 2010 年大会、2010 年 9 月 15 日～17 日、学術総合センター、一橋記念講堂（東京都）

⑲ 高岡 裕（招待講演）、個別化医療とゲノム、第 4 回ケア・ワークモデル研究会 学術総会／第 8 回透析患者の補完・代替医療研究会 九州支部研究会、2010 年 8 月 29 日、福岡大学 A 棟（福岡県）

⑳ 大田美香、鍼通電刺激による筋萎縮抑止の分子メカニズム、第 59 回全日本鍼灸学会学術大会、2010 年 6 月 12 日、グランキューブ大阪（大阪府）

㉑ 山瀬健治、東洋医学理論構造は多層階層グラフモデルに類似する、第 59 回全日本鍼灸学会学術大会、2010 年 6 月 12 日、グランキューブ大阪（大阪府）

㉒ 高岡 裕、鍼通電刺激による筋萎縮抑止の分子メカニズム、第 61 回日本東洋医学会学術大会、2010 年 6 月 5 日、名古屋国際会議場（愛知県）

㉓ 小田 剛、経穴データベース ADSS の WHO 標準への対応と経穴定義の変化、第 61 回日本東洋医学会学術大会、2010 年 6 月 5 日、名古屋国際会議場（愛知県）

㉔ 三浦研爾、東洋医学理論構造は多層階層グラフモデルに類似する、第 61 回日本東洋医学会学術大会、2010 年 6 月 5 日、名古屋国際会議場（愛知県）

〔図書〕（計 2 件）

① Yutaka Takaoka, Mika Ohta, Aki Sugano, Akihiko Ito, Yoichiroh Hosokawa, New Technology: Femtosecond laser may be used

for future Acupuncture therapy, Acupuncture in Modern Medicine (Lucy L. Chen and Tsung O. Cheng), 221-231, InTech Publishers, Croatia February 2013, 査読有, 分担執筆

② Yutaka Takaoka, Mika Ohta, Aki Sugano, Molecular Evidence: EA may inhibit the Muscle Atrophy, Acupuncture - Clinical Practice, Particular Techniques and Special Issues (Marcelo Saad), 43-58, InTech Publishers, Croatia 2011, 査読有, 分担執筆

〔産業財産権〕

○取得状況（計 2 件）

名称：生体刺激装置、遺伝子制御装置および筋肉関連疾患治療装置

発明者：細川陽一郎、他

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 5164080 号

取得年月日：24 年 12 月 28 日

国内外の別：国内

名称：生体刺激装置、遺伝子制御装置および筋肉関連疾患治療装置

発明者：Yoichiroh Hosokawa et al.

権利者：同上

種類：特許

番号：No. US8,317,847 B2

取得年月日：24 年 12 月 27 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ

<http://suzume.med.kobe-u.ac.jp/theme3.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岡 裕 (TAKAOKA YUTAKA)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20332281

(2) 研究分担者

一瀬 晃洋 (ICHINOSE AKIHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：90362780

(H23 から研究期間終了まで)

(3) 連携研究者

大田 美香 (OHTA MIKA)

神戸大学・医学部附属病院・学術推進研究員

研究者番号：20274706

(4) 研究協力者

細川 陽一郎 (HOSOKAWA YOICHIROH)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・特任准教授
研究者番号：20448088

伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：80273647

菅野 亜紀 (SUGANO AKI)
神戸大学大学院・医学研究科・特命助教
研究者番号：20457039

高雄 由美子 (TAKAO YUMIKO)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60243309

池宗 佐知子 (IKEMUNE SACHIKO)
帝京平成大学・ヒューマンケア学部・助教

宮本 俊和 (MIYAMOTO TOSHIKAZU)
筑波大学・理療科教員養成施設・教授
研究者番号：40200208