

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350620

研究課題名(和文) 実験的筋損傷後の筋再生過程における低出力パルス超音波療法の影響

研究課題名(英文) Effect of low-intensity pulsed ultrasound on skeletal muscle regeneration after damage in a mouse model

研究代表者

坂本 美喜 (SAKAMOTO, Miki)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40365177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋再生過程における低出力パルス超音波の影響について調査した。実験にはICR系雌マウスを用い、無処置群、筋損傷(LIPUS-)群、筋損傷+超音波照射(LIPUS+)群の3群に分けた。筋は、損傷後3日、5日、7日、14日、21日に採取した。平均筋横断面積(損傷7、14、21日後)は、LIPUSの有無による差は見られなかったが、LIPUS+群では横断面積の大きい筋線維の割合は増加した。Western blotting解析では、p70S6Kのリン酸化がLIPUS+群においてLIPUS-群よりも有意に増加していた。以上より、LIPUS照射により筋再生は促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the effects of Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the regenerative process of damaged muscle in a mouse model. Female ICR mice (12-week-old) were divided into the control group, muscle injury group (LIPUS-) and LIPUS exposure after muscle injury (LIPUS+) group. To induce muscle injury, cardiotoxin was injected into the left tibialis anterior (TA) muscle. TA muscles were excised at 3, 5, 7, 14, and 21 days after injury. In the results, there was no significant difference in the mean fiber cross-sectional area (CSA) between the LIPUS- group and the LIPUS+ group. However, the number of larger myofibers tended to increase in the LIPUS+ group compared with the LIPUS- group at 7, 14, and 21 days post-injury. The expression of p-p70S6K and the phosphorylation ratio of p70S6K were significantly higher in the LIPUS+ group compared with the LIPUS- group at 5 days post-injury. These results suggest that LIPUS promotes skeletal muscle regeneration.

研究分野：総合領域

キーワード：筋損傷 低出力パルス超音波療法 筋再生

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は再生能を有する組織であるが、重度な筋損傷を受けた場合には再生が遅延し、筋内に癒痕組織が残存する。筋内の癒痕組織の増加は、筋力低下や筋伸張性の低下の原因にもなることから、筋再生を促進することは筋機能を保つうえで非常に重要である。

創傷治癒促進を目的とした治療法の1つに、低出力パルス超音波(LIPUS)照射がある。臨床では骨折治療に応用されており、また靭帯・腱損傷に対するLIPUS照射は、腱の治癒を促進し力学的強度も高まったとする先行研究が多い。

筋損傷に対してもLIPUS適用が試みられているが、筋損傷に対する効果は、有効とする報告と無効とする報告が混在し、未だ一致した見解が得られていない。その要因として損傷モデルの相違やLIPUS照射条件の相違が考えられる。実際に骨折治療については照射条件が示されているが、筋損傷に対する至適照射条件は様々である。筋組織は、骨や軟骨・腱に比較して水分を多く含む組織であるため、照射された超音波エネルギーを吸収しにくいという性質を持つ。従って、骨折や腱損傷で用いられているLIPUS照射条件が適さない可能性もある。

## 2. 研究の目的

我々は、筋組織の特性を考慮し、骨折や腱損傷に適応するLIPUS照射強度よりも高めて、動物モデルを用いた実験を実施し、LIPUSの筋損傷に対する有効性を検討することを目的とした。

LIPUSが筋再生過程に及ぼす影響を検討するためには、再現性が高く、筋全体に損傷が生じるモデルを用いる必要がある。筋損傷モデルには、挫滅創、切創、薬剤注入による損傷、凍傷、および遠心性筋収縮による損傷などがある。薬剤注入による筋損傷モデルは、比較的再現性が得られやすく、筋全体を損傷させることが可能で、骨格筋の再生機構を調査する研究に多く用いられている。そこで、我々は本研究を実施するにあたり、薬剤注入による筋損傷モデルを用いた。

## 3. 研究の方法

- (1)実験動物：実験動物は、12週齢のICR系雌マウス(体重:  $33.1 \pm 2.7g$ )とし、無処置(control)群(n=2)、筋損傷(LIPUS-)群(n=39)、および筋損傷+超音波照射(LIPUS+)群(n=44)の3群に分けた。
- (2)筋損傷モデルの作成：左前脛骨筋にカルジオトキシン( $100\mu l$ ;  $10\mu M$ )を、30Gの注射針で注入して筋損傷モデルを作成した。
- (3)低出力超音波照射条件：超音波照射には、超音波治療器(US-750、伊藤超短波)を用いた。照射条件は、周波数3MHz、強度 $0.5W/cm^2$ 、照射時間率50%、および

照射時間10分に設定し、筋損傷後2時間経過後に1回目の照射を行い、その後麻酔下にて、筋損傷後2時間経過時に1回目の照射を行い、照射2回目より1回/日、筋採取の前日(最長損傷後6日)まで毎日照射した。なお、LIPUS-群には周波数、強度、および照射時間率を0にして同様の操作を行った。

## (4)筋の採取

損傷後3日(LIPUS-群:n=6, LIPUS+群:n=8), 5日(LIPUS-群:n=6, LIPUS+群:n=7), 7日(LIPUS-群:n=14, LIPUS+群:n=15), 14日(LIPUS-群:n=6, LIPUS+群:n=7), および21日(LIPUS-群:n=7, LIPUS+群:n=7)に左前脛骨筋を採取した。採取筋は凍結固定を行った。

## (5)組織学的解析

損傷後7日, 14日, および21日の筋組織所見の観察と筋線維横断面積測定を行った。染色はヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学染色法(抗デスミン抗体)を用いた。中心核線維を持つデスミン陽性の筋線維を再生線維とし、各切片から200本以上の再生筋線維を測定した。測定はImage Jを用いた。

## (6) Western blotting法による解析

損傷後3日と5日の筋におけるAkt, リン酸化Akt, p70S6K, およびリン酸化p70S6K発現量を、Western blotting法を用いて測定し、それぞれcontrol群に対する比を算出した。また、p-Akt発現量をAkt発現量で除した値, p-p70S6K発現量をp70S6K発現量で除した値をそれぞれ、Aktリン酸化比, p70S6Kリン酸化比とした。

統計学的解析には、対応のないt検定またはMann-Whitney検定を用い、有意水準は5%とした。

## 4. 研究成果

### (1)組織所見

正常な筋線維は細胞質の周辺に核を持つ多角形を呈した筋線維であった。損傷後3日の筋組織では、壊死した筋線維が見られ、間質には多くの単核細胞が浸潤していた。損傷後5日には、中心核を持ち丸みを帯びた形の再生筋線維が観察された。損傷後7日には、間質に浸潤していた単核細胞が減少し、複数の中心核を持つ再生筋線維がみられ、再生筋線維は損傷後5日よりも肥大していた。損傷後14日には再生筋線維はさらに肥大して多角形を呈してきており、拡大した間質は縮小していった。損傷後21日には、間質の単核細胞はほとんど観察されず、正常な筋線維と同じように多角形を呈した筋線維が多くみられたが、中心核は残存したままであった。LIPUS-群とLIPUS+群ともに、同様の所見がみられ、両群間で組織所見の変化に大きな差は

認められなかった。

## (2) 筋線維横断面積

損傷後 7 日において、筋線維横断面積の平均値の比較では、LIPUS-群と LIPUS+群との間に有意な差は認められなかった ( $674.9 \pm 149.2 \mu\text{m}^2$ ,  $789.5 \pm 185.2 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0.08$ )。損傷後 14 日と 21 日においても同様に、筋線維横断面積の平均値の比較では、両群間に有意な差は認められなかった (14 日:  $1194.0 \pm 258.6 \mu\text{m}^2$ ,  $1281.4 \pm 283.8 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0.57$ , 21 日:  $1732.8 \pm 301.1 \mu\text{m}^2$ ,  $1882.2 \pm 435.4 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0.48$ )。

筋線維の横断面積をヒストグラムから見ると、LIPUS+群において横断面積の大きい線維の割合が高かった。損傷後 14 日、21 日においても同様に、大きな線維の割合は LIPUS-群よりも LIPUS+群の方が高い傾向が見られた (図 1 a, b, c)。

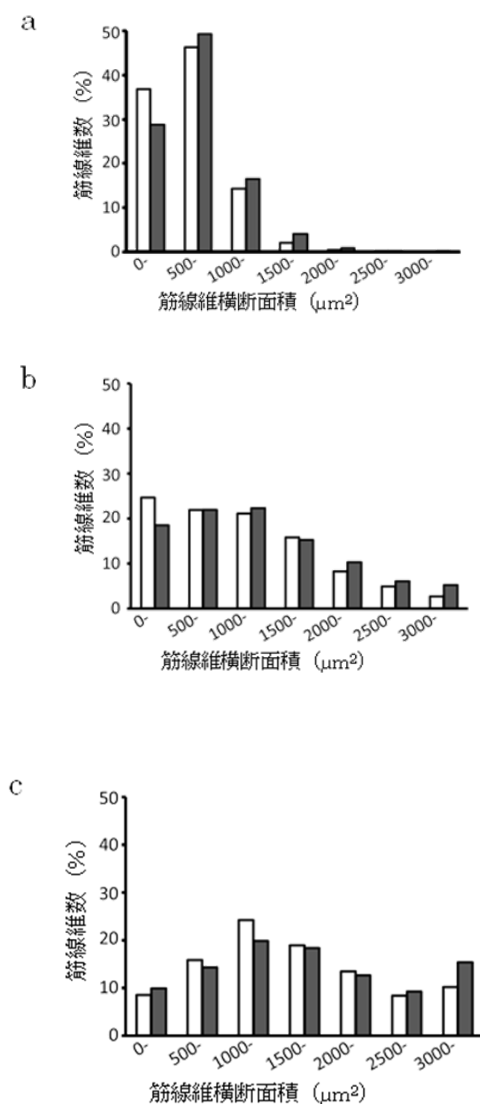


図 1 : 筋線維横断面積による筋線維数の分布  
: LIPUS-群、 : LIPUS+群

## (3) ウェスタンブロッティング解析

Akt 発現量, p-Akt 発現量, および Akt リン酸化比

損傷後 3 日において、Akt 発現量, p-Akt 発現量, および Akt リン酸化比の比較では、LIPUS-群と LIPUS+群との間に有意な差は認められなかった (Akt 発現量 (LIPUS-, LIPUS+):  $3.91 \pm 1.53$ ,  $3.92 \pm 0.97$ , p-Akt 発現量:  $3.91 \pm 1.81$ ,  $3.29 \pm 1.03$ , Akt リン酸化比:  $1.08 \pm 0.63$ ,  $0.89 \pm 0.37$ )。

損傷後 5 日においても、Akt 発現量, p-Akt 発現量, および Akt リン酸化比の比較では、両群間に有意な差は認められなかった (Akt 発現量:  $5.16 \pm 0.81$ ,  $5.85 \pm 1.20$ , p-Akt 発現量:  $8.13 \pm 4.48$ ,  $9.55 \pm 4.68$ , Akt リン酸化比:  $1.56 \pm 0.84$ ,  $1.63 \pm 0.80$ )。

p70S6K 発現量, p-p70S6K 発現量, および p70S6K リン酸化比

損傷後 3 日において、p70S6K 発現量, p-p70S6K 発現量, および p70S6K リン酸化比の比較では、LIPUS-群と LIPUS+群との間に有意な差は認められなかった (p70S6K 発現量 (LIPUS-, LIPUS+):  $0.44 \pm 0.12$ ,  $0.34 \pm 0.10$ , p-p70S6K 発現量:  $4.23 \pm 1.51$ ,  $4.03 \pm 2.26$ , p70S6K リン酸化比:  $10.23 \pm 4.41$ ,  $12.97 \pm 8.91$ )。

損傷後 5 日において、p70S6K 発現量の比較では、両群間に差は認められなかった ( $0.54 \pm 0.11$ ,  $0.56 \pm 0.06$ )。しかし、p-p70S6K 発現量と p70S6K リン酸化比の比較では LIPUS-群と比べて LIPUS+群のほうが有意に高値を示した (p-p70S6K 発現量:  $3.24 \pm 0.75$ ,  $7.09 \pm 3.77$ ,  $p<0.05$ , p70S6K リン酸化比:  $6.00 \pm 1.00$ ,  $12.47 \pm 6.21$ )。

本実験では、カルジオトキシン注入による筋損傷モデルを作成し、LIPUS の筋損傷に対する治癒促進効果を調査した。

筋線維横断面積による比較では、LIPUS 照射による有意な筋線維の肥大は、損傷後 7 日、14 日、および 21 日どの時点においても認められなかった。しかし、LIPUS 照射群では筋横断面積の大きい線維が多い傾向がみられ、LIPUS 照射により筋再生過程が促進される可能性が認められた。

ウェスタンブロッティング解析では、損傷後 5 日において、タンパク質合成に参与するシグナル伝達因子である p70S6K のリン酸化が、LIPUS-群よりも LIPUS+群で高かった。このことから、LIPUS 照射によりタンパク質合成が促進されたことが示唆された。機械的刺激により p70S6K を活性化させるシグナル伝達経路の一つとして、PI3K/Akt 経路の関与が先行研究で報告されている。しかし、本研究では Akt のリン酸化は LIPUS の有無による差がなく、本研究でみられた p70S6K の活性化は、PI3K/Akt 経路とは別の経路が関与するものと推測された。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

Sakamoto M, Nakamura A, Shimose R, Yona M, Muro M, Tadano C. Effects of low-intensity pulsed ultrasound exposure on skeletal muscle regeneration after damage in aged mouse model. The 20 Annual Congress of the European College of Sport Science. スウェーデン ,マルメ ,2015年6月25日発表 .

Nakamura A, Sakamoto M, Moriya C, Matsunaga A. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on skeletal muscle cross-sectional area after cardiotoxin-induced damage in a mouse model. The 20 Annual Congress of the European College of Sport Science . スウェーデン ,マルメ ,2015年6月25日発表 .

Nakamura A, Sakamoto M, Moriya C, Matsunaga A. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on skeletal muscle regeneration after cardiotoxin-induced damage in a mouse model. World Confederation for Physical Therapy Congress 2015. シンガポール ,サンテック ,2015年5月2日発表 .

堀内龍信、平口貴寛、高橋邦和、坂本美喜 : 筋損傷後の筋再生過程における低出力超音波照射の影響, 第21回日本物理療学会学術大会、神奈川県横須賀市(神奈川県立保健福祉大学) 2013年10月20日発表

Sakamoto M, Horiuchi T, Hiraguchi T, Tadano C, Takahira N. Effects of low-intensity pulsed ultrasound exposure on skeletal muscle regeneration after cardiotoxin-induced damage in the mouse model. The 18 Annual Congress of the European College of Sport Science, スペイン ,バルセロナ ,2013年6月28日発表 .

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

坂本 美喜 (SAKAMOTO, Miki)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号 : 40365177

### (2)研究分担者

只野 ちがや (TADANO, Chigaya)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号 : 40261094