

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：34431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350648

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮からの回復におけるリハビリテーション治療法の有効性および効率性研究

研究課題名(英文) The effectiveness and efficiency of rehabilitation in the process of recovery from disuse atrophy

研究代表者

廣島 玲子 (Hiroshima, Reiko)

関西福祉科学大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：40404777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は実験動物に廃用性筋萎縮を発症させ、萎縮し脆弱となった筋に再び体重負荷させる直前に抗炎症剤を注射した群としない自然治癒群を比較し、萎縮筋に起こる炎症の効果を検討した。両群のヒラメ筋におけるインターロイキン6(IL-6)とミオシン重鎖(MHC)のmRNA発現量をリアルタイムPCR法にて検証したところ、注射群で免疫細胞の遊走が抑制され、IL-6が減少した。また注射群ではMHC遅筋タイプの減少が緩和されたが、MHC速筋タイプは抗炎症剤による影響を認めなかった。これにはIL-6以外のサイトカイン関与が疑われた。本研究より回復過程初期における炎症抑制は回復を促す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study prepared the disuse atrophy in the experimental animals and examined the effect of inflammation on the process of recovery from atrophy as compared the group which received the injection of anti-inflammatory drug just before reloading on the atrophied muscle with the non-injection group. The real-time PCR analyzed the mRNA expression of interleukin 6 (IL-6) and myosin heavy chain (MHC) isoforms. The injection group showed decreased IL-6 mRNA expression, which the migration of immune cells might be inhibited by anti-inflammatory drug. MHC-slow type decreased less in the injection group, but MHC-fast type showed no effect. It could be caused by activation of the cytokines other than IL-6. The study suggested that inhibition of inflammation in the early stage might facilitate the process of recovery.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：廃用性筋萎縮 回復過程 インターロイキン6 (IL-6) ミオシン重鎖 (MHC)

1. 研究開始当初の背景

(1)長期臥床や一定期間のギプス固定など骨格筋にかかる重力や負荷が少ない状態が続くと廃用性筋萎縮が起こる。しかし、再体重負荷や運動などのリハビリテーションを行うことにより廃用性筋萎縮は可逆的な回復が可能であり、それゆえリハビリテーションが重要な位置を占める。臨床現場では、運動療法や物理療法などを実施し廃用性筋萎縮を改善すべく努力しているが、一旦筋萎縮を起した筋がどのような過程を経て回復するのか、回復にはどのような治療が効果的なのかなどの疑問は未だ明確かつ科学的根拠に基づいた統一見解に至っていない。

(2)我々は先行研究で実験動物を使用して廃用性筋萎縮モデルを作成し、筋萎縮からの回復過程を時間経過にそって検討し、以下の事が解った。 廃用性筋萎縮は穏やかに進行する。 廃用性筋萎縮を発症した筋は脆弱になり、自己体重を荷重するだけで筋に損傷や細胞破壊が起こってしまう。その後徐々に筋は回復する。特に先行研究では筋損傷や壊死は再体重負荷後 3 日目にピークを示し、7 日目にはすでに回復過程にあることが観察された。

(3)本研究では次の 3 種類のタンパク質に焦点を当てた。 筋損傷や細胞破壊などにより炎症反応がおこり、免疫細胞より分泌されるサイトカインの一種であるインターロイキン 6 (IL-6)。 筋の活動量に影響を受

けて変化するミオシン重鎖アイソフォーム (MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIb)。 細胞がストレス下に置かれたときに発現増加し筋の修復を促進する熱ショックタンパク質 70 (HSP70)。 これらタンパク質の遺伝子発現量が廃用性筋萎縮からの回復過程においてどのように変化をするかを検討することとした。

2. 研究の目的

(1)本研究は廃用性筋萎縮からの回復過程に注目し、早期回復段階で筋に何が起きているのかを遺伝子レベル、分子レベル、細胞レベルで検討する。

(2)回復過程において臨床現場で施行されているリハビリテーション治療方法を取り上げ、その有効性および効率性を科学的に検証する。

(3)具体的には、廃用性筋萎縮を発症した筋が損傷しそこから惹起される炎症反応は損傷をさらに重症化させるネガティブなものか、または回復へのきっかけや促進材料として必要不可欠なポジティブなものかを検討する。

3. 研究の方法

(1)本研究では実験動物として 11 週齢 Wistar 系雄ラット (体重 300g 前後) を使用した。10 週齢のラット購入後、関西福祉科学大学動物実験飼育室にてラット実験ケージ (276 × 445 × 204mm) 内で 1 週間個

別飼育し、環境（室温 24 度、湿度 50%、12 時間の明暗サイクル）に慣れさせた後、実験を開始した。実験期間中はケージ内にて標準ラット乾燥餌および水分をラットの自由摂取とした。

(2) 廃用性筋萎縮モデルの作成方法として、ラット右下肢にギプス固定を施した。具体的にはラットをエーテル麻酔薬吸入にて一時的に麻酔し、剃毛した右下肢にギプスを巻き足首（底屈 0~10 度内）・膝関節（屈曲 0~10 度内）を固定し、2 週間その状態でケージ内にて飼育し右ヒラメ筋に廃用性筋萎縮を発症させた。ギプス固定による足部の浮腫や壊死を防ぐため足趾は開放した。

(3) 研究デザインとして、2 週間右下肢にギプス固定を施したヒラメ筋をギプス群、同ラットのギプス固定のない左下肢ヒラメ筋をコントロール群、2 週間の右下肢ギプス開放直後に抗炎症剤を注射後 3 日（注射 3 日）群、注射後 7 日（注射 7 日）群、ギプス解放後薬剤注射なしで自然治癒 3 日（自然治癒 3 日）群、7 日（自然治癒 7 日）群の計 6 群を設定した。

(4) 廃用性筋萎縮を発症したヒラメ筋が再体重負荷により起こる筋損傷や炎症を抑えるため、注射群は 2 週間のギプス固定解放直後に右ヒラメ筋に抗炎症剤を注射し、3 日後および 7 日後にラットからヒラメ筋を摘出した。抗炎症剤にはデポ・メドロール水性懸濁注射液（ファイザー）0.3mg を使

用し、右ヒラメ筋起始部から筋腹部にかけて注入した。

(5) それぞれのラットは実験期間終了後、イソフル麻酔薬の吸入により全身麻酔を施し、ラットの体重測定後、ヒラメ筋を摘出し、ヒラメ筋湿重量を測定した。ヒラメ筋の一部を ISOGEN 試薬（ニッポンジーン）1.0ml 中に保存し、mRNA 分析を行った。ヒラメ筋摘出後ラットは全身麻酔にて安楽死させた。本研究は、関西福祉科学大学動物実験管理委員会において承認された動物実験である。（承認番号 15-01）

(6) リアルタイム PCR 法により、炎症時に免疫細胞より分泌されるサイトカインの 1 種であるインターロイキン 6（IL-6）、ミオシン重鎖アイソフォーム（MHC-I、MHC-IIa）、グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）の 4 種類の mRNA 発現量を分析した。具体的方法として、ISOGEN 液中のヒラメ筋をホモジナイズし、総 RNA を抽出し、SuperScript, VILO cDNA Synthesis Kit（インビトロジェン）を用いて cDNA を合成した。その後上記 4 種類に特異的なプライマーを用い、相当する mRNA に相補的な cDNA を増幅し、GAPDH をコントロールとして補正し分析を行った。

4. 研究成果

(1) 図 1 に、各群のヒラメ筋湿重量をラット体重で標準化した値（g/g）を示した。ギプ

ス群はコントロール群に比べ、ヒラメ筋湿重量が減少した。その後の回復過程では、自然治癒群は3日でさらに減少し、7日で若干増加したがコントロール群値よりは低かった。注射群は3日で増加しコントロール群以上の値を示したが、7日では再び減少した。

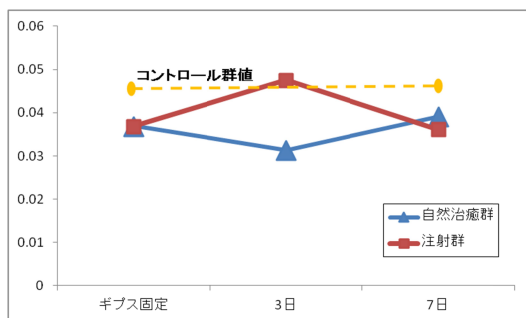


図1: ヒラメ筋湿重量/体重(g/g)

(2) 図2に、各群ヒラメ筋のIL-6のmRNA発現量を示した。ギプス群はコントロール群に比べ、IL-6発現量は著しく増加した。その後の回復過程では、両群ともに3日で減少したが、7日ではやや増加を示した。注射群は3日および7日で、自然治癒群より値が低かった。

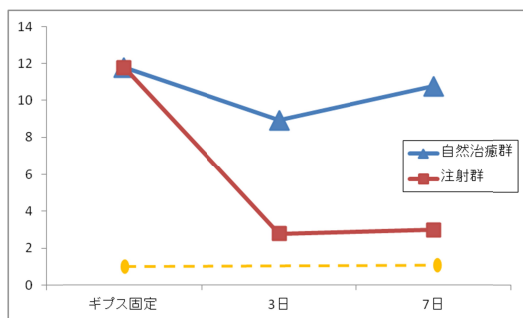


図2: IL-6 の mRNA 発現量

(3) 図3に、各群ヒラメ筋のMHC-I (遅筋タイプ)のmRNA発現量を示した。ギプス群はコントロール群に比べ MHC-I 発現量

は減少した。その後の回復過程では、両群ともに3日でさらに減少、7日では更なる減少を示した。注射群は自然治癒群より減少が緩和されていた。

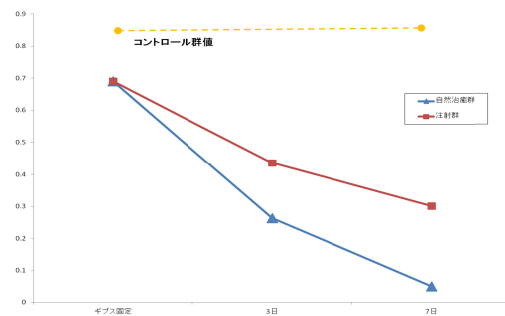


図3: MHC-I の mRNA 発現量

(4) 図4に、各群ヒラメ筋のMHC-IIa (速筋タイプ)のmRNA発現量を示した。ギプス群はコントロール群に比べ、MHC-IIa発現量は増加した。その後の回復過程では、両群ともに3日でさらに増加したが、7日では減少した。注射群は自然治癒群より値が高かった。

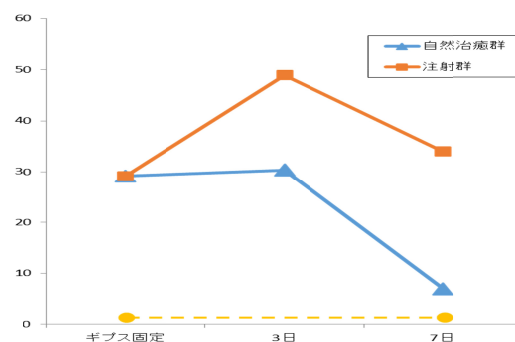


図4: MHC-IIa の mRNA 発現量

(5) 本研究ではヒラメ筋湿重量の減少 (筋萎縮)、IL-6の増加 (炎症反応)、MHC-Iの減少 (遅筋タイプ減少)、MHC-IIaの増加 (速筋タイプ増加) などの結果から、2

週間のギブス固定によりヒラメ筋に廃用性筋萎縮が発症されたことが確認された。

(6)廃用性筋萎縮により脆弱になったヒラメ筋に再び体重負荷させると、筋損傷が起こり、それによる炎症反応として免疫細胞より IL-1、IL-6、TNF- α （腫瘍壊死因子）など様々なタンパク質が分泌される。いずれも免疫系の調節、炎症反応の惹起、細胞の増殖・分化・細胞死の調整に関係すると報告される。本研究結果では IL-6 の mRNA 発現量は、自然治癒群に比べ注射群は著しく低かった。これは抗炎症剤注射により免疫細胞の遊走や IL-6 分泌が抑制されたためと考える。

(7)本研究結果では MHC-I および MHC-IIa の mRNA 発現量は MHC-I（遅筋タイプ）の減少、MHC-IIa（速筋タイプ）の増加という萎縮で見られる速筋化が確認された。MHC-I では注射群は自然治癒群より減少が少なく、抗炎症剤の注射により IL-6 等の分泌が抑えられ、ヒラメ筋の速筋化が緩和されたと考える。しかし、MHC-IIa では抗炎症剤注射により増加が抑制されるはずが本結果では認められなかった。これは、本研究では測定していない IL-6 以外の炎症性因子が影響している可能性がある。

(8)本研究結果より、廃用性筋萎縮からの回復過程初期においては、萎縮筋が起こす炎症を抑制することが回復をより促進する可能性が示唆された。

(9)本研究では、当初 MHC-IIb（速筋タイプ）や HSP70 の mRNA 発現量を検討する予定であったが、使用した特異的プライマーがうまく反応せず、今回は検討指標から除外した。

(10)今後の展望として、本研究結果を基にヒラメ筋免疫組織分析による損傷程度や炎症反応の確認、今回採用した指標（IL-6、MHC-I、MHC-IIa）のタンパク質レベルでの発現量分析および他の指標の採用（IL-1、MHC-IIb、HSP70 など）などを予定している。

(11)本研究で得られた成果は国内外の学会での発表や雑誌投稿を通して、廃用性筋萎縮からの回復過程に対するより深い理解を医療現場に啓蒙し、より効果的で効率的な治療方法の開発に寄与できると考える。

5. 主な発表論文など

[雑誌論文] なし

[学会発表]（計 9 件）

廣島玲子、「廃用性筋萎縮からの回復時に起る炎症についての検討」、第 51 回日本理学療法学会大会、2016-5-28、北海道札幌市

廣島玲子、「廃用性筋萎縮からの回復過程において抗炎症剤がミオシン重鎖 mRNA 発現量に与える影響」、第 6 回総合福祉科学学会、2016-3-2、大阪府柏原市

Mori Yoshiaki, 「Enhancement of myosin heavy chain class I (MHC I)

mRNA expression in C2C12 myocyte by multivalent cations」, 20th International Congress of World Muscle Society (WMS2015), 2015-9-30~10-4, Brighton (United Kingdom)

Hiroshima Reiko, 「 mRNA and protein analysis of MHC and HSP70 in rat soleus muscle recovering from disuse atrophy」, World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015, 2015-5-1~4, Singapore

Mori Yoshiaki, 「 Enhancement of myosin heavy chain class I (MHC I) mRNA expression in C2C12 myocyte by La3+」, 第 92 回日本性学会大会, 2015-3-21~23, 兵庫県神戸市

Mori Yoshiaki, 「 IL-6- and calcineurin-mediated but not IGF-1-mediated mechanisms contribute to the upregulation of MHC I and HSP70 mRNA levels in C2C12 cells」, 19th International Congress of World Muscle Society (WMS2014), 2014-10-7~11, Berlin (Germany)

森禎章, 「培養骨格筋細胞におけるミオシン重鎖タイプIの mRNA 発現量増加因子の検討」, 保健医療学学会第 5 回学術集会, 2014-11-30、大阪府大阪市

廣島玲子, 「筋萎縮からの回復において 3 種の治療法が筋タンパク質に与える影響」, 第 4 回総合福祉科学学会, 2014-3、大阪府柏原市

Hiroshima Reiko, 「 The effect of PT

interventions in the process of recovery from muscle atrophy」, WCPT-AWP & ACPT Congress 2013, 2013-9, 台湾台中市

[図書] なし

[産業財産権] なし

[その他] なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣島 玲子 (HIROSHIMA, Reiko)

関西福祉科学大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：40404777

(2)研究分担者

渡辺 正仁 (WATANABE, Masahito)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70084902

森 禎章 (MORI, Yoshiaki)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70268192

(3)研究協力者

山路 純子 (YAMAJI, Jumko)

関西福祉科学大学・健康福祉学部・准教授
研究者番号：40340559