

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560261

研究課題名(和文) 癌性カヘキシーに対する炎症性サイトカイン抑制を促す物理療法の治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategies of physiotherapy equipment for cachexia through inhibiting proinflammatory cytokine

研究代表者

藤野 英己 (Fujino, hidemi)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：20278998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：カヘキシーモデル動物に対する電気刺激で筋重量減少の抑制効果が得られた。血清中TNF- α は電気刺激で変化を認めなかったが、骨格筋でのTNF- α 発現は減衰した。ミオスタチン、atrogin-1、ユビキチン化タンパク質の発現が電気刺激で減少し、Akt-1、FoxO-3aの減少も抑制した。代謝に関与するコハク酸脱水素酵素やクエン酸シンターゼ、PGC-1 α は、電気刺激で増加した。一方、p38リン酸化はカヘキシーにより増加し、電気刺激で増加を抑制した。これらの結果から電気刺激は骨格筋の萎縮を予防することが可能であり、カヘキシー治療の補助手段として用いることが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study sought to evaluate the effect of electrical stimulation (ES) by using kilohertz frequency on muscle atrophy and oxidative metabolism impairment induced by cachexia. Cachexia induced increased plasma levels of inflammatory cytokines, significant muscle mass loss, decreased fiber cross-sectional area, and an up-regulation of atrogin-1 and ubiquitinated proteins in the skeletal muscle. In addition, Cachexia decreased succinate dehydrogenase (SDH) and citrate synthase (CS) activity, PGC-1 α expression, and increased the phosphorylation of p38 MAPK. ES attenuated the sepsis-induced loss of muscle mass and decreased muscle fiber cross-sectional area, as well as attenuated the atrogin-1 and ubiquitinated protein up-regulation. ES also attenuated the changes in SDH and CS activities, p38 MAPK, and PGC-1 α . These results suggest that ES could prevent muscle atrophy and decrement in muscle oxidative metabolism induced by pro-inflammatory cytokines in cachexia.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：カヘキシー 電気刺激 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

癌に伴うカヘキシーは進行性の異化亢進にともなう全身性機能低下であり、癌患者の50%にみられる症状である。カヘキシー状態は細胞レベルでの代謝異常を生じ、骨格筋では収縮タンパク質を減少させる。このため、筋横断面積が縮小し、筋力や筋持久力の低下を惹起させ、廃用症候群をきたしやすい (Tisdale, 2000)。また、この機序には、いくつかのサイトカインが関与するが、主に筋タンパク質の異化作用を促進するサイトカインとして TNF- α (腫瘍壊死因子) が知られている。この TNF- α は、異化反応、特にユビキチンプロテアソームの活動を惹起するリガンドとして作用していることが知られている。一方、癌に対する治療的リハビリテーションは、確立した状態でなく、科学的なエビデンスを示す報告は散見される程度で一定した見解も得られていない状態にある。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物的手法により癌性カヘキシーに伴う骨格筋の筋萎縮を捉え、レギュレータとなる主要因子であるサイトカインや筋特異的なプロテアソーム系の発現について検証する。また、治療対策として経皮的電気刺激を用いた効果についても検証を行い、カヘキシーに対する物理療法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リポ多糖 (LPS) 誘導カヘキシーモデルを使用した実験を実施した。LPS 腹腔内投与後に発症するカヘキシーモデルマウスを使用して、カヘキシー発症による筋萎縮を検討する。特に投与量や継続的な変化を検証した。

(2) カヘキシーモデルに対する中周波電気刺激の効果を検証した。LPS 誘導カヘキシーに対する予防に適正な刺激条件を検討する。特に電気刺激強度による予防効果を検証した。

(3) 本研究では、中周波による電気刺激を使用して、筋収縮を誘導した。収縮の程度は筋収縮によって発生する力をロードセルにて計測した。カヘキシーマウスにおける中周波電気刺激による効果を判断するための測定内容は、下記に示すとおりである。

①組織化学的検証 (CSA)、②ユビキチン化タンパク質の定量、③筋特異的ユビキチンプロテアソーム遺伝子発現、④サイトカイン・(TNF- α) の定量、④代謝状態 (SDH, CS 活性) や代謝に関連する因子 (PGC-1 α , p38MAPKリン酸化) を測定した。

これらを総合して効果の有無を検証した。

4. 研究成果

カヘキシーモデルマウスにおいて電気刺激を実施し、筋湿重量減少の抑制効果が得ら

れた。また、筋骨格筋線維の横断面積は遅筋線維及び速筋線維共に有意に高値 (20%~32%) を示し、電気刺激によりカヘキシー性筋萎縮の予防効果が認められた (図1)。炎症性サイトカインは電気刺激で血清中

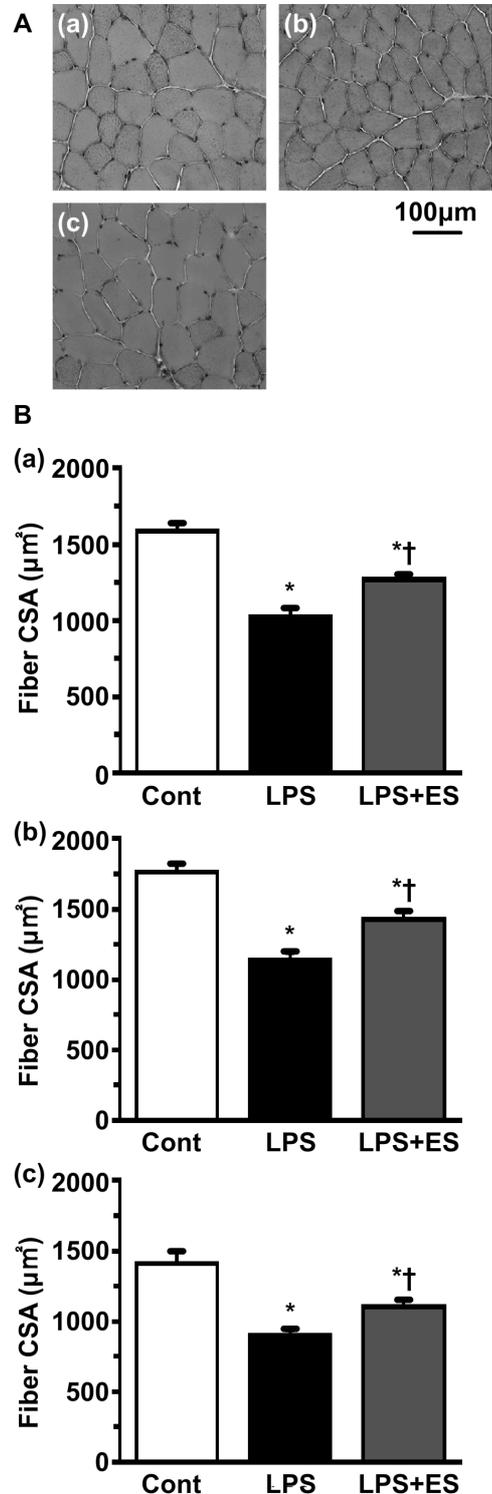


図1. 筋線維横断面積 (CSA)

A : (a)Control (Cont); (b) Cachexia (LPS); (c)LPS+ electrical stimulation (ES). B. CSA of whole (superficial + deep) muscle fibers (a), superficial (b), and deep layer (c) in the tibialis anterior muscle.

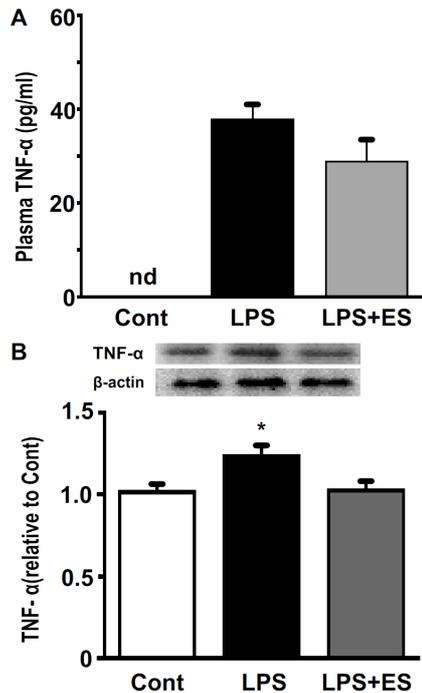


図2. 血清 TNF- α (A)・筋 TNF- α (B)

TNF- α では変化を認められなかったが、骨格筋での TNF- α は減衰した (図2)。

また、ミオスタチン、atrogin-1、ユビキチン化タンパク質の発現が電気刺激で減少し (図3)、Akt-1, Fox0-3a は電気刺激により減少を抑制した (図3)。

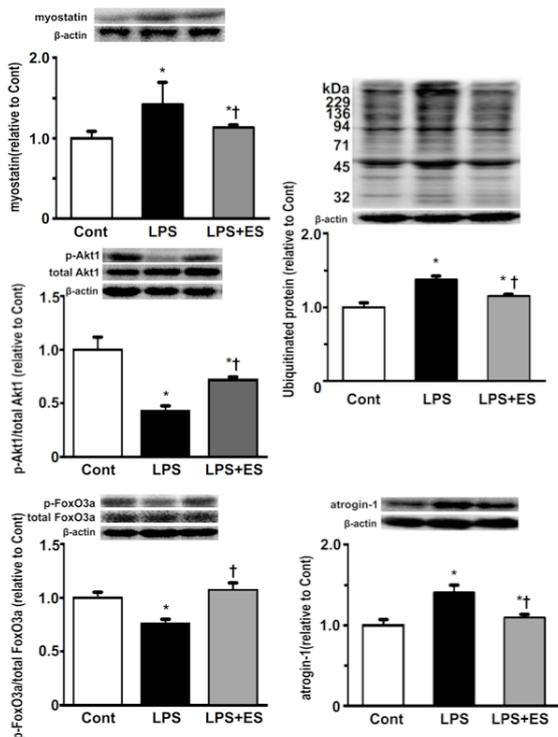


図3. ミオスタチン, atrogin-1、ユビキチン化タンパク質, Akt-1, Fox0-3a

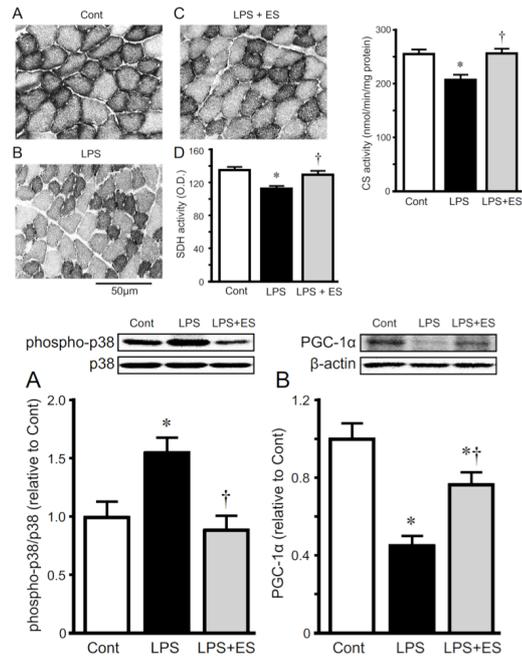


図4. コハク酸脱水素酵素 (SDH), クエン酸シターゼ (CS), p38 リン酸化

また、骨格筋の代謝に關与するコハク酸脱水素酵素やクエン酸シターゼはカヘキシーにより低下したが、電気刺激で増加を示した。ミトコンドリア新生に關与する PGC-1 α も同様にカヘキシーにより低下したが、電気刺激で増加を示した。一方、p38 リン酸化はカヘキシーにより増加し、電気刺激で増加を抑制した (図4)。

これらの研究結果より低周波電気刺激は骨格筋の萎縮を予防することが可能であり、患者への負担も少ないことからカヘキシー治療の補助手段として用いることが可能であると結論づけられる。一方、低周波電気刺激を実施した部位では萎縮の予防効果あったが、血清中の炎症性サイトカインを減少させるまで至らないことから、低周波電気刺激の効果は治療部位のみに限定されると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 31 件)

(1) Tanaka K, Tanaka M, Takegaki J, Fujino H. Preventive effects of electrical stimulation on inflammation-induced muscle mitochondrial dysfunction. *Acta Histochem*, 査読有, 2016, *in press*, doi: 10.1016/j.acthis.2016.04.011.

(2) Tanaka M, Tanaka K, Takegaki J, Fujino H. Preventive effects of kilohertz frequency electrical stimulation on sepsis-induced muscle atrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 査読有, 2016, *in press*.

- (3) Tanaka M, Nakanishi R, Murakami S, Fujita N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Effectiveness of daily eccentric contractions induced via kilohertz frequency transcutaneous electrical stimulation on muscle atrophy. *Acta Histochem*, 査読有, 118, 56-62, 2016. doi: 10.1016/j.acthis.2015.11.007.
- (4) Uchida K, Tanaka M, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. L-arginine supplementation attenuates capillary regression without increasing integrated succinate dehydrogenase activity and VEGF expression in skeletal muscle during hindlimb unloading. *Gen Physiol Biophys*, 査読有, 2016, *in press*.
- (5) Kameyama K, Tsutou Fujino H. The relationship between health-related quality of life and higher-level functional capacity in elderly women with mild cognitive impairment. *J Phys Ther Sci*, 査読有, 28, 1312-1317, 2016. doi: 10.1589/jpts.28.1312.
- (6) Tanaka M, Kanazashi M, Maezawa T, Kondo H, Fujino H. Abnormalities in three-dimensional capillary architecture and imbalance between vascular endothelial growth factor-A and thrombospondin-1 in soleus muscle of ovariectomized rat. *Acta Histochem*, 査読有, 117, 605-611, 2015. doi: 10.1016/j.acthis.2015.06.001
- (7) Ishihara A, Nagatomo F, Terada M, Fujino H, Kondo H, Ishioka N. Effects of microgravity on the mouse triceps brachii muscle. *Muscle Nerve*, 査読有, 52, 63-68, 2015. doi: 10.1002/mus.24491.
- (8) Fujita N, Fujino H, Sakamoto H, Takegaki J, Deie M. Time course of ubiquitin-proteasome and macroautophagy-lysosome pathways in skeletal muscle in rats with heart failure. *Biomed Res*, 査読有, 36, 383-392, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.383.
- (9) Kondo H, Fujino H, Murakami S, Tanaka M, Kanazashi M, Nagatomo F, Ishihara A, Roy RR. Low-intensity running exercise enhances the capillary volume and pro-angiogenic factors in the soleus muscle of type 2 diabetic rats. *Muscle Nerve*, 査読有, 51, 391-399, 2015. doi: 10.1002/mus.24316.
- (10) Matsumoto A, Fujita N, Arakawa T, Fujino H, Miki A. Influence of electrical stimulation on calpain and ubiquitin-proteasome systems in the denervated and unloaded rat tibialis anterior muscles. *Acta histochemica*, 査読有, 116, 2014. doi: 10.1016/j.acthis.2014.03.006.
- (11) Sakita M, Murakami S, Fujino H. The morphological changes in the capillary architecture of the tibial nerve associated with spontaneous aging and aerobic exercise intervention during aging in rats. *J Phys Ther Sci*, 査読有, 26, 263-267, 2014. doi: 10.1589/jpts.26.263.
- (12) Kanazawa Y, Maekawa K, Okumura Y, Fujita N, Fujino H. Preventive effect of nucleoprotein on hindlimb unloading-induced capillary regression in rat soleus muscle. *Biotech Histochem*, 査読有, 89, 220-227, 2014. doi: 10.1113/expphysiol.2014.079988.
- (13) Tillakaratne N, Duru P, Fujino H, Zhong H, Xiao M, Edgerton V. R, Roy R, R. Identification of interneurons activated at different inclines during treadmill locomotion in adult rats. *J Neurosci Res*, 査読有, 92, 1714-1722, 2014. doi: 10.1002/jnr.23437.
- (14) Kanazashi M, Tanaka M, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Amelioration of capillary regression and atrophy of the soleus muscle in hindlimb unloaded rats by astaxanthin supplementation and intermittent loading. *Exp Physiol*, 査読有, 99, 1065-1077, 2014. doi: 10.1113/expphysiol.2014.079988.
- (15) Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H. Exposure to mild hyperbaric oxygen increases blood flow and resting energy expenditure but not oxidative stress. *J Sci Res Reports 3*: 1886-1896, 2014.
- (16) Kondo H, Fujino H, Nagatomo F, Ishihara A. Influence of estrogen receptor α polymorphisms on bone density in response to habitual exercise in Japanese postmenopausal women. *ScientificWorldJournal*, 査読有, 2014, 2014:593927. 7 pages. 2014. doi: 10.1155/2014/593927.
- (17) Tanaka M, Hirayama Y, Fujita N, Fujino H. Electrical stimulation using sine waveform prevents unloading-induced muscle atrophy in the deep calf muscles of rat. *Acta Histochem*, 査読有, 116, 1192-1198, 2014. doi: 10.1016/j.acthis.2014.06.009.
- (18) Fujino H, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A. Capillary growth and regression in skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med*, 査読有, 5, 483-491, 2014.
- (19) Kanazashi M, Okumura Y, Al-Nassan S, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Protective effects of astaxanthin on capillary regression in atrophied soleus muscle of rats. *Acta Physiol*, 査読有, 207, 405-415, 2013. doi: 10.1111/apha.12018.
- (20) Okumura Y, Kanazashi M, Kanazawa Y, Fujita N, Kondo H, Fujino H. Differential effects of astaxanthin on oxidative key enzyme and capillarization in the deep and superficial layers of unloading-induced atrophied muscle. *J Phys Ther Sci*, 査読有, 25, 349-353, 2013.
- (21) Tanaka M, Hirayama Y, Fujita N, Fujino H. Comparison of premodulated interferential and pulsed current electrical stimulation in prevention of deep muscle atrophy in rats. *J Mol Histol* 44, 203-211, 2013. doi:

10.1007/s10735-012-9473-4.

(22) Sawa R, Doi T, Misu S, Tsutsumimoto K, Fujino H, Ono R. Decreased skin temperature of the foot increases gait variability in healthy young adults. *Gait Posture*, 査読有, 38, 518-522, 2013. doi: 10.1016/j.gaitpost.2013.01.019.

(23) Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ohira Y. Decreased succinate dehydrogenase activity of gamma and alpha motoneurons in mouse spinal cords following 13 weeks of exposure to microgravity. *Neurochem Res*, 査読有, 38, 2160-2167, 2013. doi: 10.1007/s11064-013-1124-y.

[学会発表] (計 103 件)

1) Tanaka K, Tanaka M, Takegaki J, Fujino H. Preventive effects of electrical stimulation on cachexia-induced muscle mitochondrial dysfunction. *Experimental Biology*, 2015. 3.28-4.1, Boston (アメリカ)

2) Tanaka M, Tanaka K, Takegaki J, Fujino H. Preventive effects of middle frequency electrical stimulation on cachexia-induced muscle atrophy. *Experimental Biology*, 2015. 3.28-4.1, Boston (アメリカ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-fujino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 英己 (FUJINO, Hidemi)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20278998

(2) 研究分担者

石原 昭彦 (ISHIHARA, Akihiko)

京都大学・大学院人間・環境学研究科
・教授

研究者番号：90184548

近藤 浩代 (KONDO, Hiroyo)

名古屋女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：50333183

村上 慎一郎 (MURAKAMI, Shinichiro)

姫路獨協大学・医療保健学部・教授

研究者番号：30454763

(H25-H26 研究分担者として参画)