

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：26861194

研究課題名(和文)炭酸ガス経皮吸収がラットの神経損傷修復に及ぼす効果について

研究課題名(英文)Transcutaneous Carbon Dioxide Application With Hydrogel Prevents Muscle Atrophy in a Rat Sciatic Nerve Crush Model

研究代表者

西本 華子(Nishimoto, Hanako)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30707154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経損傷を原因とする神経・筋肉機能回復過程に対して現段階においては確立された治療方法は見当たらない。炭酸ガス経皮吸収は、人工ボーア効果により、筋肉や骨、皮膚、血管などの組織修復へ有効な効果が期待されている。ラットを使用し、坐骨神経圧挫損傷モデルを採用、炭酸ガス経皮投与は、週5回、20分行った。損傷後2,4週の評価を行った。本実験において投与群は非投与群と比較して、行動学的、分子生物学的に、良好な結果が得られた。末梢神経損傷での神経・筋肉機能回復過程における筋萎縮を軽減させるために炭酸ガスを投与することは、有効な治療法である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The acceleration of nerve regeneration remains a clinical challenge. We previously demonstrated that transcutaneous CO₂ application using a novel hydrogel increases the oxygen concentration in local tissue via an “artificial Bohr effect” with the potential to prevent muscle atrophy. In this study, we investigated the effect of transcutaneous CO₂ administration on limb function after peripheral nerve injury in a rat sciatic nerve injury model. Rats were divided into a sham group, a control group or a CO₂ group. CO₂ was administered percutaneously for 20 min five times per week. In this study, good results were obtained in the CO₂ group compared with the control group from behavioral evaluation, nerve conduction study, analysis of messenger RNA (mRNA) expression, wet muscle weight and histological analysis. Transcutaneous CO₂ application has the therapeutic potential to accelerate the recovery of muscle atrophy in peripheral nerve injury.

研究分野：整形外科

キーワード：炭酸ガス経皮吸収 末梢神経損傷 人工ボーア効果 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷の修復には知覚と運動機能の回復が必要であるが、いまだに解決されていない課題が多い。特に神経原性の筋萎縮は神経損傷修復後にも不可逆性となり大きな機能障害を惹き起こす事がある。臨床的には神経損傷後の運動機能評価は筋量と筋力によってなされ、筋肉の回復が末梢神経再生研究の1つのエンドポイントとなりえる。しかしながら、神経損傷後の筋萎縮の予防という観点から検討を行った報告は少ない。

炭酸ガスは生体に経皮吸収させると、局所組織でのボーア効果を促進し、局所血流の改善という生理作用を有するとされている。

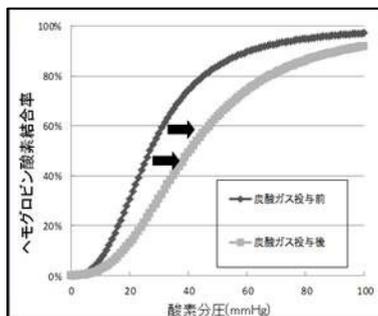


図1 炭酸ガスを投与したときの酸素解離曲線の右方シフト(ヒト)

我々はその投与方法に着目し、経皮的に炭酸ガスを吸収させるジェルと投与システムを開発してその局所での作用効率を高め、その効果について様々な報告を行ってきた。ラットの骨格筋(前脛骨筋)に対して、炭酸ガス経皮吸収を行うことで、PGC-1、SIRT-1、VEGFの発現上昇、ミトコンドリア量の増加が増えていることを報告した(引用文献)。この結果は、炭酸ガス経皮吸収が、萎縮した筋肉を回復させるのに役立つのではないかと示唆し、本研究の末梢神経損傷後の筋萎縮に対して効果があるのではないかと発想に至った。

2. 研究の目的

末梢神経再生研究においては、幹細胞、増殖因子、scaffoldを組み合わせた様々な試みがなされているが、再生神経の標的臓器である筋肉の萎縮の予防については報告が少な

い。炭酸ガス経皮吸収は、人工ボーア効果により赤血球の酸素解離を促し、すでに筋肉や骨、皮膚、血管などの組織修復へ有効な効果が期待されている。我々は炭酸ガス経皮吸収装置が局所血流を増加させ、人体におけるボーア効果、筋持久力の向上につながる事を証明してきた。そこで、本研究では炭酸ガス経皮吸収が末梢神経損傷での神経・筋肉機能回復過程において及ぼす効果について調べた。本研究の目的は炭酸ガス投与の筋萎縮予防効果とそのメカニズムを解明し、有効な治療法につながる可能性を追求する事であった。

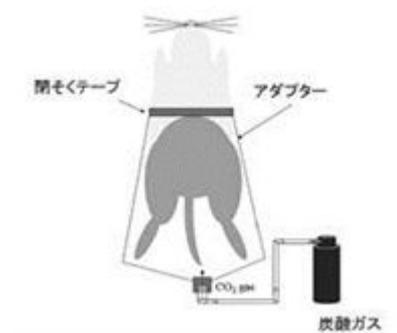
3. 研究の方法

(1)動物実験の方法

ラットは、1群12匹使用し、計36匹使用、3群(Sham群と炭酸ガス非投与群と炭酸ガス投与群)にわけるとする。

全身麻酔下にラット大腿背側に皮切を加え、坐骨神経まで展開したのみのものをSham群とする。その他の群のラットには更に坐骨神経に血管クリップを用いて圧挫損傷を加える。炭酸ガス投与群に対しての高濃度炭酸ガスの経皮投与方法は、具体的には、図2に示すように、患肢全体に吸収促進剤(以下、ジェル)を塗り、下腹部以下を密封袋にて密封しその中に100%の炭酸ガスを充満させ、20分間、週に5回投与した。炭酸ガス非投与群には患肢全体にジェルを塗り室内空気を充満させる事とした。術後2,4週に各々の群に対し評価を行った。

図2 ラットへの炭酸ガスの投与方法



(2)評価方法

評価は、行動学的評価、組織学的・免疫学的

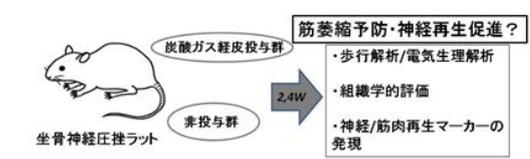
評価、生化学・分子生物学的評価の3つに分けて行った。

行動学的評価：行動モニタリングシステム（footprint）と筋電図を使用し運動機能を評価した。

組織・免疫学的評価：筋肉については前脛骨筋・ヒラメ筋に対してH-E染色を行い、萎縮の程度を評価し更に定量評価した。

生化学・分子生物学的評価：神経マーカーとして、neurotrophin 関連遺伝子を評価する。また筋の評価としては、Myogenin, MyoDをはじめとする筋の増強に関連する因子、PGC-1をはじめとした筋持久力に関連した遺伝子をReal-time PCR法にて評価した。

図3 評価方法



4. 研究成果

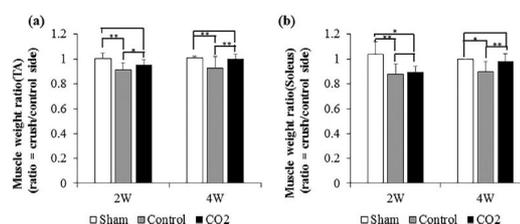
(1)行動学的評価

SFI (Sciatic Functional Index) スコアは、炭酸ガス非投与群と炭酸ガス投与群ともに全ての期間で徐々に良くなっていった。Sham群は全ての期間で有意に他の群よりScoreが良かった。炭酸ガス投与群は、炭酸ガス非投与群に比較して、有意にScoreが良かった(術後2週で $P < 0.01$ 、術後4週で $P < 0.01$)。

(2)筋湿重量

筋湿重量は両側の前脛骨筋とヒラメ筋をラットより採取し、患側の重量/健側の重量の比率で表した。前脛骨筋とヒラメ筋の比率は、炭酸ガス非投与群、炭酸ガス投与群ともに時間がたつにつれて上昇した。炭酸ガス投与群の比率は、炭酸ガス非投与群に比較して有意に大きく、更にSham群との有意差は見られなかった(図4)。

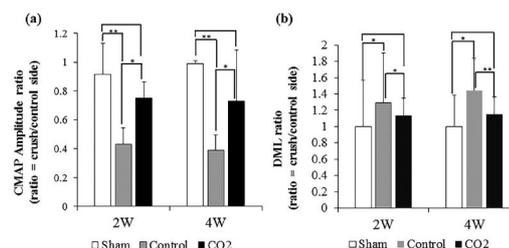
図4 筋湿重量



(3)Nerve conduction study (NCS)

坐骨神経を刺激し得られた複合筋活動電位と遠位運動潜時について患側/健側の比率で表した。複合筋活動電位は、術後のどの期間においても、炭酸ガス投与群は炭酸ガス非投与群に比較して有意に大きい比率が得られ、Sham群とは有意差が見られなかった。遠位運動潜時は、術後のどの期間において、炭酸ガス投与群は炭酸ガス非投与群に比較して有意に小さい比率が得られSham群とは有意差が見られなかった(図5)。

図5 Nerve Conduction Study

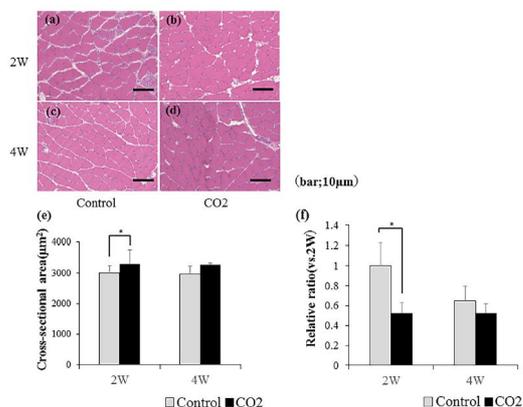


(4)組織学的評価 (H-E染色、ヒラメ筋)、定量評価

炭酸ガス非投与群のヒラメ筋線維は術後2週の時点において、直径が減少していた。術後4週では直径の減少は両群ともに見られなかった。

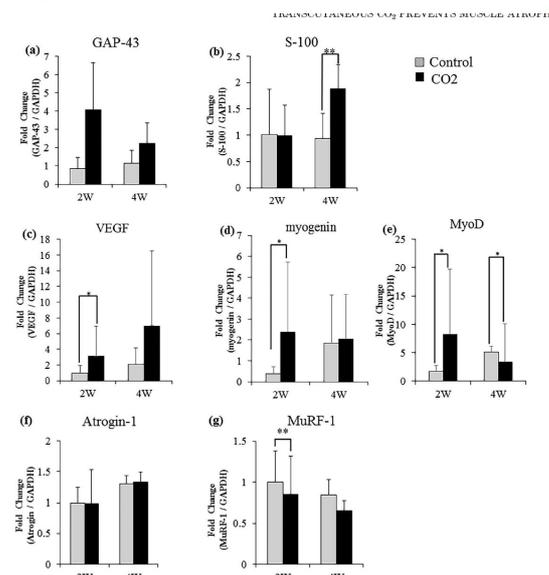
組織の定量的評価において、術後2週の断面積は、炭酸ガス非投与群は有意に小さかった。筋線維間の面積は、術後2週において炭酸ガス非投与群は有意に大きかった(図6)。

図6 組織学的評価、定量評価



(5) Real-Time PCR 解析

Real-Time PCR は、神経再生マーカーとして GAP-43 と S-100 について調べた。炭酸ガス投与群は、炭酸ガス非投与群と比較して、S-100は、術後4週において有意に発現が多かった。筋の血流、筋再生、および筋萎縮のマーカーとして、VEGF、myogenin、MyoD、Atrogin-1、MuRF-1を解析した。VEGF、myogeninは、術後2週で炭酸ガス投与群に有意に多く発現、MyoD は、全ての期間で炭酸ガス投与群に有意に多く発現した。MuRF-1は、術後2週で炭酸ガス投与群に少なく発現した。



(6)まとめ

以上の結果より、経皮的炭酸ガス投与によって神経原性の筋萎縮は、行動学的に良好であり、筋湿重量の減少が軽減された。神経伝導

検査としては、神経刺激による神経筋接合部位の筋肉量の減少は見られず、速度の遅延も抑制されていた。組織学的には、炭酸ガスを投与された群では、筋線維の直径の減少が抑えられ、結果生じる筋線維間の面積の増大が抑えられた。定量的にも同様の結果であり、特に術後2週で有意差が見られ筋萎縮が抑制された。Real-Time PCR 解析で、炭酸ガス投与群は、術後4週で神経の再生を示すマーカーの発現が多く見られた。炭酸ガス投与群は、血流が多く、筋再生を示す発現が多く見られた。更に、筋萎縮マーカーが術後4週で少なく見られた。以上より、経皮的炭酸ガス投与は、神経損傷後の筋萎縮・筋再生の治療に有効である可能性があるとの結論を得た。

<引用文献>

Oe K, Ueha T, Sakai Y, Niikura T, Lee SY, Koh A, Hasegawa T, Tanaka M, Miwa M, Kurosaka M. The effect of transcutaneous application of carbon dioxide (CO₂) on skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Apr 1;407(1):148-52

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 1 件)

Nishimoto H, Inui A, Ueha T, Inoue M, Akahane S, Harada R, Mifune Y, Kokubu T, Nishida K, Kuroda R, Sakai Y.

J Orthop Res. 査読有り、2017 Nov 28.
doi: 10.1002/jor.23817. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 7 件)

西本 華子, 乾 淳幸, 上羽 岳志ら
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会
2015年10月22日 ~ 2015年10月23日富山国際会議場

Nishimoto H, Inui A, Ueha T
62th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
2016年03月05日 ~ 2016年03月08日

Florida
乾 淳幸, 西本 華子, 植田 安洋ら
第59回日本手外科学会学術集会

2016年04月21日～2016年04月22日

広島国際 会議場

乾 淳幸,西本 華子,上羽 岳志ら

第89回日本整形外科学会学術総会

2016年05月12日～2016年05月15日

パシフィコ横浜

西本 華子,乾 淳幸,上羽 岳志ら

第53回日本リハビリテーション医学会学術
集会

2016年06月09日～2016年06月11日

国立京都国際会館 グランドプリンスホテル
京都

乾 淳幸、国分 毅、美船 泰、
第 27 回末梢神経学会学術集会

2016年08月26日～2016年08月27日

大阪国際会議場（大阪府大阪市）

乾 淳幸、西本 華子、美船 泰

The ORS 2017 Annual Meeting（国際学会）

2017年03月19日～2017年03月22日

San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 華子 (NISHIMOTO, Hanako)

神戸大学医学部附属病院医員

研究者番号：30701194

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()