

令和 元年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0131

研究課題名（和文）改良型機械的人工換気システムを用いた横隔膜の筋萎縮回復メカニズムの解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of improved mechanical ventilation model for recovery(Fostering Joint International Research)

研究代表者

関根 紀子 (Ichinoseki-Sekine, Noriko)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員准教授

研究者番号：10393175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,300,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は当初の計画を変更し、心筋や下肢骨格筋においてミトコンドリア機能を保護する可能性が示されている硫化物の投与が、横隔膜機能不全へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。ラットに生理食塩水または硫化物を投与し、12時間の自発呼吸または人工呼吸を行った。その結果、人工呼吸器使用直前の硫化物単回投与により、横隔膜萎縮および機能不全が抑制され、ミトコンドリア呼吸機能が維持されるとともに活性酸素種産生が抑制されることを示した。しかしながら、Calpain, Caspase-3およびCARS2に有意な変化が見られたもののそのメカニズムを解明するには至らず、今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主な呼吸筋である横隔膜は、人工呼吸器の装着などにより自発的な収縮を軽減すると、わずか半日で急激な萎縮と機能不全を示す。呼吸筋の機能低下は易疲労感や生活活動量の低下をもたらすことから、横隔膜の機能を維持/回復する方法の開発が課題となっている。本研究では、心筋や下肢骨格筋においてミトコンドリア機能を保護する可能性が示されている硫化物の投与が、横隔膜機能不全へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。その結果、人工呼吸器使用直前の単回投与により、横隔膜萎縮および機能不全が抑制されることを示した。本研究の成果は、横隔膜機能保護の新たな取り組みにつながることで期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the hypothesis that H₂S preconditioning will protect the diaphragm against ventilator-induced diaphragm dysfunction (VIDD). Rats were randomly assigned to one of four groups: 1) 12 h spontaneous breathing (SB) with saline (SB-SALINE); 2) SB with Na₂S as a H₂S donor (SB-H₂S); 3) 12 h of mechanical ventilation (MV) with saline (MV-SALINE); 4) MV with Na₂S (MV-H₂S). Compared to both SB-SALINE and SB-H₂S, MV resulted in significant diaphragm atrophy and contractile dysfunction. Importantly, treatment with Na₂S prior to MV protected the diaphragm against VIDD. Further, 12 h of MV resulted in increased mitochondrial uncoupling as evidenced by a significant decrease in the mitochondrial respiratory control ratio in mitochondria isolated from the diaphragm of MV-SALINE animals. Importantly treatment with H₂S protected diaphragmatic mitochondria against MV-induced uncoupling. Our findings support the hypothesis that H₂S preconditioning protects the diaphragm against VIDD.

研究分野：運動生理学

キーワード：筋萎縮 横隔膜 ミトコンドリア 機械的人工換気 硫化物

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、運動刺激に対して筋肥大や筋力向上などの適応を示す一方で、不活動には筋萎縮（廃用性筋萎縮）や筋力低下を示す。一般に、骨格筋から連想されるのは腕や脚の筋肉であることが多いが、呼吸筋も同じく骨格筋である。主な呼吸筋である横隔膜は、人工呼吸器の装着などにより自発的な収縮を軽減すると、12時間で20%程度も萎縮し機能不全を呈する。これは、他の骨格筋では1週間程度を要する大きな変化が横隔膜ではわずか半日で起こることを意味する。呼吸筋の機能低下は易疲労感や生活活動量の低下をもたらすことから、呼吸筋機能の維持・向上は腕や脚の筋肉と同様に重要であり、人工呼吸器装着後の呼吸機能の維持・回復が課題となっている。

申請者はこれまで、ラット横隔膜萎縮モデルを用い、横隔膜筋萎縮メカニズムをいくつか明らかにしてきた。しかしながら、従来のラット横隔膜萎縮モデルは萎縮実験後の生存が困難であるため、横隔膜の廃用性萎縮メカニズムは徐々に明らかになりつつあるものの、その後の回復過程は不明であった。そこで、基課題として、横隔膜の廃用性萎縮からの回復メカニズムを実験的に明らかにし、効果的な回復法の確立を目指す研究に取り組み、さらに、横隔膜筋萎縮サンプルの分析とそのメカニズムの解釈に関する部分を発展させることを目的として、本研究分野の第一人者であるフロリダ大学 Scott K Powers 教授と共同研究を実施するに至った。我が国において横隔膜筋萎縮研究に取り組んでいるのは申請者らのみであり、研究を進めるにあたり、海外の研究者との情報交換は必須である。四肢骨格筋とは異なる特徴が多い横隔膜研究遂行のため、世界で最も活発に横隔膜萎縮研究を推し進めているフロリダ大学に蓄積された様々な工夫やノウハウを学ぶことは本研究を進める上で非常に大きな意義を持つ。

2. 研究の目的

本国際共同研究は、基課題で取り組む内容のうち、横隔膜萎縮筋サンプルの分析とそのメカニズムの解釈に関する部分を発展させることを目的とする。基課題の研究内容は、改良型モデルを構築し萎縮からの回復期に焦点をあてたものであり、基課題で構築したモデルを用いて、近年注目されているミトコンドリア機能不全に着目した分析を行うことで、萎縮からの回復メカニズムの解明を大きく発展させることが期待できると考えた。

しかしながら、共同研究先で回復期に焦点を当てた改良型モデルを用いるのが困難であったため、横隔膜の萎縮過程におけるミトコンドリア機能の関与へ対象を切り替え、心筋や下肢骨格筋においてミトコンドリア機能を保護する可能性が示されている硫化物の投与が、横隔膜機能不全へ及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究に取り組むこととした。

3. 研究の方法

(1) 横隔膜萎縮実験（図1）

4ヶ月齢の Sprague-Dawley 雌性ラットを、自発呼吸群+生理食塩水 (SB-SALINE)、自発呼吸+硫化物 (SB-H₂S)、人工呼吸群+生理食塩水 (MV-SALINE)、人工呼吸+硫化物 (MV-H₂S) の4群に分け、麻酔下で気管切開後に挿管し、自発呼吸もしくは小動物用ベンチレータを用いた人工呼吸を行った。また、頸静脈に麻酔維持用の、頸動脈に血ガス測定および血圧モニタ用のカテーテルを留置するとともに、心電図と直腸温をモニタし、バイタルの維持に努めた。なお、気管挿管直後に生理食塩水または硫化物 (Na₂S, 50μM/kg) を腹腔内投与した。

(2) 横隔膜収縮能評価

酸素化した Krebs 溶液内で電気刺激 (1, 15, 30, 60, 100, 160Hz) を行い、横隔膜の収縮能力を評価した。なお数値は横断面積で標準化した。

(3) ミトコンドリア呼吸機能評価

先行研究に従って横隔膜ミトコンドリアを抽出し、液相酸素測定システムを用いてミトコンドリア呼吸比 (RCR, state3/state4) を測定した。

(4) 活性酸素種産生評価

ミトコンドリア抽出サンプルを用いて、分光蛍光光度計による活性酸素種 (H₂O₂) 産生評価を行った。

(5) 横隔膜萎縮評価

横隔膜の凍結組織切片 (10μm) を免疫組織化学法により多重染色し、筋線維タイプ (Type I, Type IIa, Type IIx) ごとの筋線維横断面積を測定した。

(6) タンパク質発現評価

ウェスタンブロット法を用いてタンパク質分解系および硫化物代謝経路のタンパク質発現量を解析した。

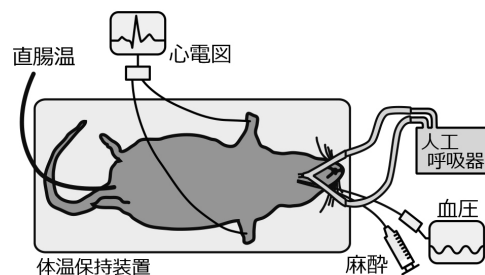


図1. 横隔膜萎縮実験

4. 研究成果

骨格筋に対して硫化物を投与した例はこれまでほとんど報告されていないことや、硫化物は血管拡張能を持ち血圧を低下させることから、効果的な硫化物投与量および投与のタイミングを検討するための予備実験を行った。その結果、最小投与回数である横隔膜萎縮実験直前の単回投与により十分な横隔膜への保護作用が認められたため、最もシンプルな単回投与を採用して研究を進めることとした。

本研究は、硫化物の投与が横隔膜萎縮および機能不全を抑制することを初めて示したものであり、単回投与で大きな抑制効果があったことは驚くべきことである。しかしながら、そのメカニズムを解明するには至っておらず、引き続き研究を続けていきたいと考えている。

(1) 横隔膜萎縮および機能不全に対する硫化物の効果

先行研究と同様に、12時間の人工呼吸器使用により横隔膜は20%程度減少したが、硫化物の単回投与により萎縮はほぼ完全に抑制された(図2)。収縮特性では完全な保護効果は示されなかったものの、硫化物の投与により横隔膜の機能不全はほぼ抑制された(図3)。

(2) ミトコンドリア機能に対する硫化物の効果

先行研究と同様に、12時間の人工呼吸器使用によりミトコンドリア呼吸比は低下したが、硫化物の投与によりミトコンドリア呼吸比はほぼ完全に保護される結果となった(図4)。活性酸素種産生能も、先行研究と同様に人工呼吸器使用で増加したが、硫化物の投与により抑制された。

(3) タンパク質発現に対する硫化物の効果

タンパク質分解経路で主要な役割を果たす calpain および caspase-3 の発現量は、人工呼吸器使用により増加したが、その増加は硫化物の投与により抑制された。一方で、4-hydroxynoneal (4-HNE) の発現量に大きな差は見られず、結果が一致しなかった。硫化物代謝経路に關与する CysteinyI-TRNA Synthetase 2 (CARS2) の発現量は人工呼吸器使用で低下したが、その低下は硫化物の投与により自発呼吸群と同程度に維持された。しかしながら、MPST など他の硫化物代謝経路に關与するタンパク質に差は見られなかった。そのため、硫化物の投与による横隔膜の保護メカニズムについては、今後更なる研究が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) Hinkley JM, Morton AB, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AM, Smuder AJ. Exercise Training Prevents Doxorubicin-induced Mitochondrial Dysfunction of the Liver. Med Sci Sports Exerc. 2019 Jun;51(6):1106-1115. doi: 10.1249/MSS.0000000000001887. 査読有
- (2) Morton AB, Smuder AJ, Wiggs MP, Hall SE, Ahn B, Hinkley JM, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AM, Ozdemir M, Yoshihara T, Wawrzyniak NR, Powers SK. Increased SOD2 in the diaphragm contributes to exercise-induced protection against

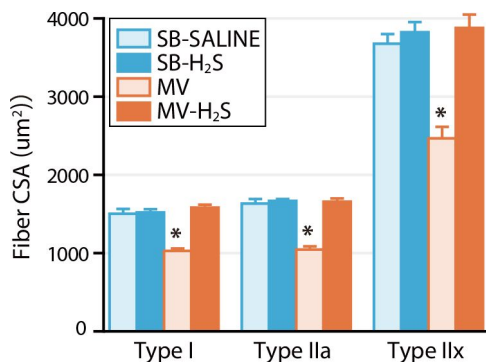


図2. 筋線維横断面積

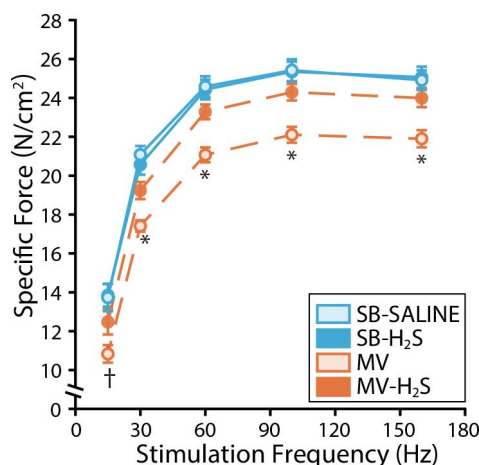


図3. 横隔膜収縮能

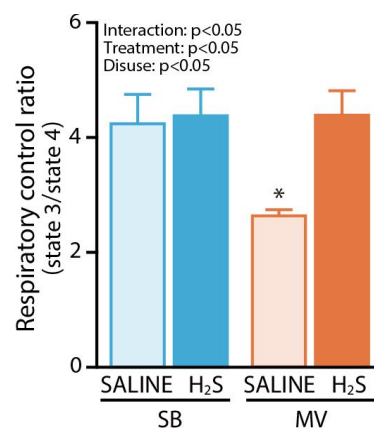


図4. ミトコンドリア呼吸機能

ventilator-induced diaphragm dysfunction. Redox Biol. 2019 Jan;20:402-413. doi: 10.1016/j.redox.2018.10.005. 査読有

- (3) Morton AB, Mor Huertas A, Hinkley JM, Ichinoseki-Sekine N, Christou DD, Smuder AJ. Mitochondrial accumulation of doxorubicin in cardiac and diaphragm muscle following exercise preconditioning. Mitochondrion. 2019 Mar;45:52-62. doi: 10.1016/j.mito.2018.02.005. 査読有

[学会発表](計 5 件)

- (1) Ichinoseki-Sekine N, Morton AB, Smuder AJ, Hinkley JM, Powers SK. Hydrogen sulfide prevents mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy and dysfunction. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, San Diego, CA, USA, 2018.9.8.
- (4) Smuder AJ, Morton AB, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AMor, Hinkley JM. Endurance Exercise Training Prevents Doxorubicin-induced Mitochondrial Dysfunction of the Liver. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, San Diego, CA, USA, 2018.9.8.
- (5) Ichinoseki-Sekine N, Tsuzuki T, Hinkley JM, Yoshihara T, Kobayashi H, Powers SK, Naito N. Treadmill exercise training protect against metabolic dysfunction and diaphragm weakness in obese diabetic rats. Experimental Biology 2018, San Diego, CA, USA, 2018.4.22.
- (6) Morton AB, Smuder AJ, Hyatt HW, Hinkley JM, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AM, Powers SK. Overexpression of SOD2 in the Diaphragm Provides Partial Protection Against Ventilator-Induced Diaphragm Atrophy and Contractile Dysfunction. Experimental Biology 2018, San Diego, CA, USA, 2018.4.22.
- (7) Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Tsuzuki T, Morton A, Hinkley MJ, Powers SK, Naito H. Intermittent spontaneous breathing prevents mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy and dysfunction. Experimental Biology 2017. Chicago, IL, USA, 2017.4.26.

6 . 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名 : Scott K Powers

ローマ字氏名 : Scott K Powers

所属研究機関名 : University of Florida

部局名 : Department of Applied Physiology and Kinesiology

職名 : 教授

研究協力者氏名 : Ashley J Smuder

ローマ字氏名 : Ashley J Smuder

所属研究機関名 : University of Florida

部局名 : Department of Applied Physiology and Kinesiology

職名 : 助教

[その他の研究協力者]

研究協力者氏名 : 内藤 久士

ローマ字氏名 : Hisashi Naito

研究協力者氏名 : 吉原 利典

ローマ字氏名 : Toshinori Yoshihara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。