

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12934

研究課題名(和文)超音波照射による筋肥大・萎縮抑制を促す機能性栄養素の筋内運搬システムの構築

研究課題名(英文) Effects of pulsed ultrasound irradiation on muscle atrophy and transportation of nutrients into myotubes

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではパルス超音波の悪液質性筋萎縮の抑制や機能性栄養素を筋細胞内へ運搬できるかを検証した。パルス超音波照射は悪液質性筋萎縮で上昇したp38 MAPKのリン酸化、TNF- $\alpha$ 及びAtrogin-1 mRNA発現量を抑制し、インテグリンシグナルの増加が観察され、筋管細胞径、筋原線維タンパク質量、MHCの減少を予防した。また、IRAK4リン酸化には影響を及ぼさず、その下流のシグナルであるp38 MAPKリン酸化及びTNF- $\alpha$  mRNA発現の亢進を抑制する結果を得た。一方、機能性栄養素の筋細胞内へ運搬は観察されなかった。パルス超音波照射は悪液質性の筋萎縮を予防できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

照射部位の局所的な効果に限定されるが、パルス超音波は悪液質性筋萎縮を予防できることを示すことができた。また、インテグリン経路の活性化やP38MAPKの抑制を介することも明らかにできた。運動等とは異なり、負担をかけることなく、悪液質性筋萎縮を予防することができる意義は大きいと考える。一方、悪液質性筋萎縮は広範囲に生じるために広範囲を照射する方法や技術開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The preventive effects of pulsed ultrasound irradiation on cachectic muscle atrophy and transportation of nutrients into myotube were investigated. The pulsed ultrasound irradiation attenuated the muscle atrophy under cachectic condition through the inhibition of p38 MAPK phosphorylation. In addition, the ultrasound irradiation could increase the phosphorylated integrin/FAK and inhibit an increase the expression levels of TNF- $\alpha$  and atrogin-1 mRNA without an increase in the phosphorylated IRAK4, whereas the ultrasound irradiation could not facilitate the transportation of nutrients into myotube. These results suggested that pulsed ultrasound irradiation might be a preventive intervention against cachectic muscle atrophy.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：超音波 骨格筋 栄養素 萎縮

### 1. 研究開始当初の背景

心不全等の慢性疾患やガン末期に生じる悪液質はエネルギー増大、糖新生、ユビキチンプロテアソーム経路の活性等で、骨格筋収縮蛋白質の異化が促進し、著明な筋量の減少を生じる。また、栄養補給では悪液質を改善できないことから、栄養不良の上流に炎症性サイトカインや腫瘍由来物質の産生が要因として存在することも考慮する必要がある。一方、骨格筋量の減少を抑制し、筋肥大を促すには、運動は有効な手段となるが、悪液質状況下ではエネルギー増大、糖新生は、さらなる筋蛋白質の異化を促進することが知られている。また、筋細胞内の蛋白質同化を促すアミノ酸の輸送が制限され、エネルギー代謝の増大は AMPK の活性を促し、一方では mTOR の活性を抑制する。このため、炎症性サイトカインによるアミノ酸輸送制限やユビキチンプロテアソームによる収縮蛋白質異化を抑制する治療手段が必要と考えた。そこで、細胞ソノフォレーシスやソノポレーション等の分子透過性促進や抗炎症作用をもつ超音波照射による抗炎症に着目する発想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、超音波による細胞膜の透過性亢進や抗炎症作用を応用し、悪液質による筋萎縮を抑制することや筋萎縮の予防する機能性栄養素を効果的に筋細胞内へ運搬できるかを検証することを目的にした。慢性疾患やガンによる悪液質では炎症性サイトカインや特異的物質の産生により、筋蛋白質の著明な減少に伴う筋萎縮の促進やアミノ酸プールの不均衡が惹起される。そこで、超音波照射により骨格筋の炎症を抑制し、筋萎縮を予防できるか、また、細胞内へのアミノ酸輸送やアミノ酸トランスポータ発現を誘導できるかどうかを検証することを目的にした。

### 3. 研究の方法

#### 1. 細胞培養

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を 60 mm 培養皿に播種し、DMEM 溶液に 10% FBS、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 mg/mL) を加え、増殖をさせた。細胞密度が 90% に達したところで、培養液を 2% Horse Serum を加えた分化培地へ交換し、筋管細胞への分化誘導を行った。7-9 日間の分化誘導後、位相差顕微鏡 (PSM-1120, Nikon) を用いて筋管細胞への分化を確認した上で実験に用いた。悪液質性筋萎縮を惹起するために、LPS を培地中に 1  $\mu$ g/mL で添加した。

#### 2. 超音波照射

超音波照射には、ビーム不均等率が 3.2、有効照射面積が 6.0 cm<sup>2</sup> の超音波治療器 (イトー US-750, 伊藤超短波社) を使用し、周波数 3 MHz、照射時間率 20% のパルス超音波を用いた。超音波照射直前に培地を交換し、ゴム板の上にカップリングゲル (Aquasonic 100, Parker 社) を塗り、その上に培養皿を配置し、UV 及び 70% エタノールで滅菌したプローブを培地に浸して、超音波照射を行った。悪液質性筋萎縮に対する至適出力強度を決定するために、持続時間を 30 秒間とし、0.5 W/cm<sup>2</sup>、1.0 W/cm<sup>2</sup>、1.5 W/cm<sup>2</sup> の出力強度においてパルス超音波照射を行い、その直後に LPS を添加し、24 時間後の筋管細胞径、筋原線維タンパク質量、細胞生存率・増殖能を測定した。また、各条件の出力強度のパルス超音波照射が LPS 非刺激下の筋管細胞に及ぼす影響についても検証した。この結果、20% パルスモードで低強度である 0.5 W/cm<sup>2</sup> が最も高い効果が得られることから本研究での刺激強度を 0.5 W/cm<sup>2</sup> とした。また、超音波刺激時にロイシンを添加して、相加的な効果が観察されるかも検証した。

### 4. 研究成果

パルス超音波照射はインテグリンを介して、p38MAPK リン酸化を抑制し、Atrogin-1 や TNF $\alpha$  の発現を減少させ、その結果、筋萎縮できるのではないかと仮説をたてた。そこで、筋芽細胞 C2C12 を分化させた筋管細胞に LPS 添加をさせた炎症性萎縮モデルを用いて、パルス超音波刺激の効果を検証した。

まず、超音波照射の強度を設定するための実験を実施し、20% パルスモードで 0.5 W/cm<sup>2</sup> の強度条件時に効果が高いことが認められ、本条件を超音波照射条件にした (図 1)。

次に LPS による炎症性筋萎縮モデルで超音波照射の効果と作用機序について検討をした。悪液質性筋萎縮に対して超音波照射群 (LPS+US) では筋管細胞径の減少を抑制した (図 2)。また、筋原線維タンパク質量も悪液質性筋萎縮により減少し、超音波照射群では減少が抑制された (図 3)。さらにミオシン

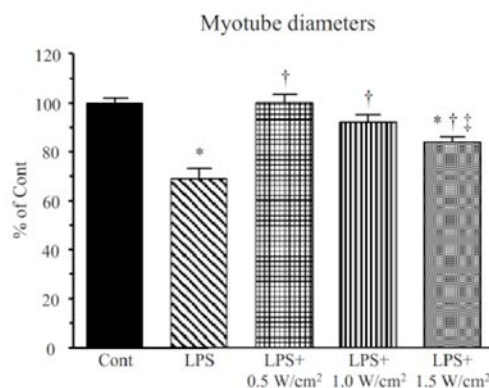


図 1 超音波照射強度による効果の相違

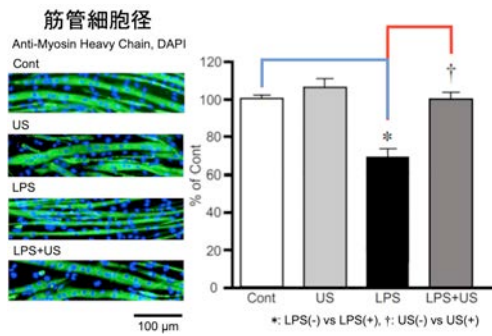


図 2. 超音波照射による筋管径減少の抑制効果

重鎖タンパク質量の減少が減衰された。

また、超音波照射ではインテグリン/focal adhesion kinase (FAK) シグナル (FAK リン酸化の増加) の増加が観察され (図 4 A, B)、P38MAPK リン酸化が減少 (図 5 C, D) し、TNF $\alpha$  も低下した (図 6 A)。さらに骨格筋特有のユビキチンリガーゼである Atrogin-1 の増加を減衰させた (図 6 B)。

一方、超音波照射は IRAK4 のリン酸化に影響を与えなかった (図 5 A, B)。

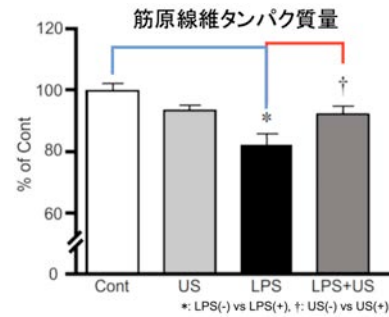


図 3. 超音波照射による筋原線維タンパク質量の抑制効果

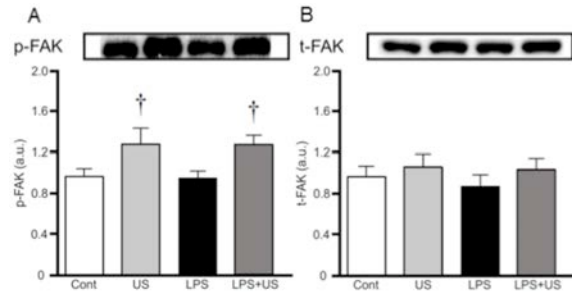


図 4. 超音波照射による FAK に対する効果

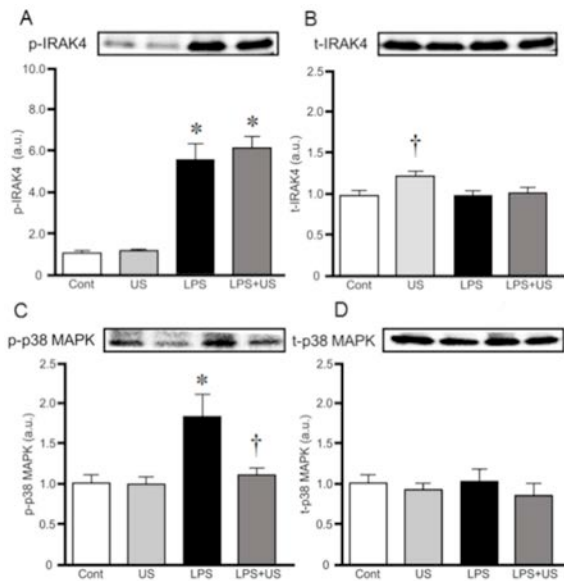


図 5. 超音波照射による IRAK, p38MAPK に対する効果

本研究の結果から超音波照射は悪液質性筋萎縮の治療の補助手段として用いることが可能であるが、ロイシン添加による相加的な効果は観察されないために栄養状態の有無に関わらず、超音波照射は悪液質性筋萎縮の治療の一つとして選択できるものと結論づけられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 25 件)

1. Tanaka M, Tanaka K, Tategaki J, and Fujino H. Preventive effects of kilohertz frequency electrical stimulation on sepsis-induced muscle atrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 16, 152-160. 2016.
2. Tanaka K, Tanaka M, Takegaki J, and Fujino H. Preventive effects of electrical stimulation on inflammation-induced muscle mitochondrial dysfunction. *Acta Histochem* 118, 464-470, 2016. doi: 10.1016/j.acthis.2016.04.011.
3. Sakita M, Murakami S, and Fujino H. Age-related morphological regression of myelinated fibers and capillary architecture of distal peripheral nerves in rats. *BMC Neurosci.* 17(1): 39.

図 6. 超音波照射による TNF $\alpha$ , Atrogin1 に対する効果

響を与えなかった (図 5 A, B)。

これらの研究結果より超音波照射は P38MAPK の活性化を抑制することで、骨格筋萎縮を予防することが可能であると考えられる。超音波照射は悪液質性筋萎縮の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。

一方、ロイシン添加による悪液質性筋萎縮の抑制に対して、相加的な促進効果は観察されなかった。

2016. doi: 10.1186/s12868-016-0277-4.

4. Kameyama K, Tsutou A, and [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* 28, 1312-1317, 2016. doi: 10.1589/jpts.28.1312.
5. Uchida K, Tanaka M, Kondo H, Ishihara A, and [Fujino H](#). L-arginine supplementation attenuates capillary regression without increasing integrated succinate dehydrogenase activity and VEGF expression in skeletal muscle during hindlimb unloading. *General Physiology and Biophysics*35(4): 425-432, 2016. DOI: 10.4149/gpb\_2016016
6. Maeshige N, Koga Y, Tanaka M, Aoyama-Ishikawa M, Miyoshi M, Usami M, and Fujino H. Low-Intensity Ultrasound Enhances Histone Acetylation and Inhibition of IL-6 mRNA Expression by Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate in Fibroblasts. *J Ultrasoun Med*, 2017.2. 36(5):879-885. doi: 10.7863/ultra.16.04020..
7. Maezawa T, Tanaka M, Kanazashi M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, and Fujino H. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress. *J Physiol Sci*67(5): 603-611. 2017. DOI:10.1007/s12576-016-0492-x
8. Hirayama Y, Nakanishi R, Tategaki A, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. *Enterococcus faecium* strain R30 increases red blood cell velocity and prevents capillary regression in the soleus of hindlimb unloaded rats via the eNOS/VEGF pathway. *Microcirculation* 24(4). e12356, 2017 doi: 10.1111/micc.12356.
9. Nakanishi R, Hirayama Y, Tanaka M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Nucleoprotein supplementation enhances the recovery of rat soleus mass with reloading after hindlimb unloading-induced atrophy via myonuclei accretion and increased protein synthesis. *Nutr Res* 36(12):1335-1344, 2016. doi: 10.1016/j.nutres.2016.10.007.
10. Hirayama Y, Nakanishi R, Maeshige N, Fujino H. Preventive effects of nucleoprotein supplementation combined with intermittent loading on capillary regression induced by hindlimb unloading in rat soleus muscle. *Physiological Reports* 5(4). pii: e13134, 2017. doi: 10.14814/phy2.13134.
11. Matsumoto T, Tanaka M, Nakanishi R, Takuwa M, Hirabayashi T, Ono K, Ikeji T, Maeshige N, Sakai Y, Akisue T, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Transcutaneous carbon dioxide attenuates impaired oxidative capacity in skeletal muscle in hyperglycemia. *General Physiology and Biophysics*. *in press*. Accepted December 19, 2018
12. Tanaka M, Sugimoto K, Fujimoto T, Xie K, Takahashi T, Akasaka H, Kurinami H, Yasunobe Y, Matsumoto T, Fujino H, Rakugi H. Preventive effects of low-intensity exercise on cancer cachexia-induced muscle atrophy. *FASEB J* 27: fj201802430R, 2019. doi: 10.1096/fj.201802430R.
13. Maeshige N, Torii K, Tabuchi H, Imai M, Koga Y, Uemura M, Aoyama-Ishikawa M, Miyoshi M, Fujino H, Terashi H, Usami M. Inhibitory Effects of Short-Chain Fatty Acids and  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids on Profibrotic Factors in Dermal Fibroblasts. *Eplasty*. 1; 19:e4. eCollection 2019.
14. Matsumoto T, Tanaka M, Ikeji T, Maeshige N, Sakai Y, Akisue T, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Application of transcutaneous carbon dioxide improves capillary regression of skeletal muscle in hyperglycemia. *J Physiol Sci* 69(2): 317-326, 2019. doi: 10.1007/s12576-018-0648-y.
15. Tanaka M, Kanazashi M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Protective effects of Brazilian propolis supplementation on capillary regression in the soleus muscle of hindlimb-unloaded rats. *J Physiol Sci* 69(2):223-233, 2019. doi: 10.1007/s12576-018-0639-z.
16. Tanaka M, Morifuji T, Yoshikawa M, Nakanishi R, Fujino H. Effects of combined treatment with blood flow restriction and low-intensity electrical stimulation on diabetes mellitus-associated muscle atrophy in rats. *J Diabetes* 11(4):326-334, 2019. doi: 10.1111/1753-0407.12857.
17. Sakita M, Murakami S, Fujino H, Hayashi S, Kameyama K, Saito T, Kumagai S. Remodeling of myelinated fibers and internal capillaries in distal peripheral nerves following aerobic exercise in aged rats. *J Appl Physiol* (1985) 125(4): 1051-1061, 2018. doi: 10.1152/japplphysiol.00257.2018.
18. Al-Nassan S, Fujino H. Exercise preconditioning attenuates atrophic mediators and preserves muscle mass in acute sepsis. *Gen Physiol Biophys* 37(4): 433-441, 2018. doi: 10.4149/gpb\_2018001.
19. Moriguchi M, Maeshige N, Ueno M, Yoshikawa Y, Terashi H, Fujino H. Modulation of plantar pressure and gastrocnemius activity during gait using electrical stimulation of the tibialis anterior in healthy adults. *PLoS One*13(5): e0195309, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0195309.
20. Fujita N, Aono S, Karasaki K, Sera F, Kurose T, Fujino H, Urakawa S. Changes in lipid

- metabolism and capillary density of the skeletal muscle following low-intensity exercise training in a rat model of obesity with hyperinsulinemia. PLoS One 13(5): e 0196895, 2018.  
doi: 10.1371/journal.pone.0196895.
21. Nagatomo F, Takemura A, Roy RR, Fujino H, Kondo H, Ishihara A. Mild hyperbaric oxygen inhibits the growth-related decline in skeletal muscle oxidative capacity and prevents hyperglycemia in rats with type 2 diabetes mellitus. J Diabetes 10(9): 753-763, 2018.  
doi: 10.1111/1753-0407.12666.
22. 藤野英己. 骨格筋の毛細血管からみた運動の役割. 体育の科学 68 (9), 649-653. 2018.
23. 上野瑞季, 田中雅侑, 平山佑介, 金指美帆, 松本智博, 前重伯壮, 藤野 英己. 心不全による骨格筋の毛細血管退行に対するレーザー照射の治療効果. 物理療法科学 25: 50-56, 2018.
24. 中西亮介, 平山佑介, 田中稔, 小野紘平, 池治拓也, 前重伯壮, 藤野英己. 廃用性筋萎縮に対する電気刺激とパルス磁気刺激の比較検証. 物理療法科学 25: 57-62, 2018.
25. 田中雅侑, 前重伯壮, 金指美帆, 中西亮介, 藤野英己. モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットのヒラメ筋におけるミトコンドリア機能障害と毛細血管退行に対する中周波電気刺激の介入効果, 物理療法科学 25: 42-49, 2018.

[学会発表] (計 74 件)

1. Ueno M, Maeshige N, Hirayama N, Nakanishi R, Yoshikawa M, Fujino H. Pulsed Ultrasound Stimulation Prevents Bacteria Lipopoly-saccharide-Induced Muscle Wasting Myotubes. Experimental Biology 2016 (San Diego), 2016.4.2-4.6.
2. Nakanishi R, Hirayama Y, Ueno M, Yoshikawa M, Maeshige N, Fujino H. Nucleoprotein Enriched Diet Prevents Disuse Induced Muscle Atrophy in Soleus Muscle of Rats. Experimental Biology 2016 (San Diego), 2016.4.2-4.6.
3. Hirayama Y, Nakanishi R, Ueno M, Yoshikawa M, Tategaki A, Maeshige N, Fujino H. Enterococcus Faecium Strain R30 Prevents Capillary Regression though Increasing Red Blood Cell Velocity in Rat Soleus Muscle under Disuse Condition. Experimental Biology 2016 (San Diego), 2016.4.2-4.6.
4. 上野瑞季, 前重伯壮, 平山佑介, 藤野英己. パルス超音波が悪液質性筋萎縮における p38 MAPK のリン酸化に及ぼす影響. 第 51 回日本理学療法学会大会 (札幌). 2016/5/27-29
5. Fujino H, Kondo H, Kanazashi M, Tanaka M, Ishihara A. Dietary astaxanthin supplementation improves walking performance and blood lactate level after walking test in community-dwelling elderly individuals. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, Boston, June 1-4, 2016.
6. Kondo H, Fujino H, Kanazashi M, Tanaka M, Ishihara A. Propolis supplementation prevents capillary regression and endothelial cell death via inhibiting thrombospondin-1 activation in atrophied muscle. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, Boston, June 1-4, 2016.
7. 上野瑞季, 前重伯壮, 平山佑介, 石原昭彦, 近藤浩代, 藤野英己. パルス超音波照射が悪液質性筋萎縮に於ける p38MAPK のリン酸化に及ぼす抑制効果. 第 71 回日本体力医学会大会 (盛岡). 2016/9/23-25
8. Fujino H, Kondo H, Matsumoto T, Ono K, Ikeji T, Takuwa M, Hirabayashi T, Ishihara A. Preventive effects of capillary regression on Brazilian honeybee propolis in disused skeletal muscle of rats. Experimental Biology (San Diego), April 21-25, 2018.
9. Takuwa M, Matsumoto T, Hirabayashi T, Ikeji T, Ono K, Honda S, Yamamoto A, Maeshige N, Kondo H, Fujino H. Responses of Muscle Satellite Cells to Lemon Myrtle Supplementation Combined with Electrical Stimulation in Disuse-induced Skeletal Muscle Atrophy. Experimental Biology (San Diego) April 21-25, 2018.
10. Hirabayashi T, Tanaka T, Matsumoto T, Ikeji T, Ono K, Takuwa M, Maeshige N, Kondo H, Fujino H. Preventive effects of medium-chain triglycerides supplementation on the dysfunction of mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle under cachectic condition. Experimental Biology (San Diego) April 21-25, 2018.
11. Ikeji T, Hirayama Y, Matsumoto T, Ono K, Takuwa M, Hirabayashi T, Takegaki A, Maeshige N, Kondo H, Fujino H. Protective effects of Enterococcus faecium strain R30 on transformation of slow to fast fiber under inactive condition. Experimental Biology (San Diego) April 21-25, 2018.
12. Ono K, Nakanishi R, Matsumoto R, Takuwa M, Hirabayashi T, Ikeji T, Tanaka M, Maeshige N, Kondo H, Fujino H. A comparison of protective effects between electrical and pulsed-magnetic stimulation in the deep layer of skeletal muscles under disuse condition. Experimental Biology (San Diego) April 21-25, 2018.
13. Tanaka M, Matsumoto T, Sugimoto K, Fujino H. Fiber-type specificity of cancer

cachexia-induced muscle wasting is phosphorylated p70S6K-dependent. Experimental Biology (San Diego) April 21-25, 2018.

14. Fujino H, Kondo H, Kanazashi M, Tanaka M, Ishihara A. Honeybee products attenuate capillary regression in skeletal muscle under disuse condition. ACSM conference on Integrative biology of exercise, 2018.9.5-8. San Diego.

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：石原昭彦

ローマ字氏名：Akihiko Ishihara

所属研究機関名：京都大学

部局名：人間環境学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：90184548

研究分担者氏名：近藤浩代

ローマ字氏名：Hiroyo Kondo

所属研究機関名：名古屋女子大学

部局名：家政学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：50333183

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。