

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12612

研究課題名(和文) 活動および身体状態の違いが電気刺激によるサイトカイン発現に与える影響

研究課題名(英文) Influence of the activities and physical condition has on the cytokine expression by electrical stimulation

研究代表者

百田 貴洋 (MOMOTA, Takahiro)

藤田保健衛生大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：30597638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪液質患者に対する運動療法には多くの要因が影響する。運動が生体に与える影響を知るため、健常成人を対象に筋電気刺激を行い、唾液中サイトカインと身体機能・活動量との関連について比較検討した。今回、電気刺激後のサイトカイン分泌が唾液を試料として計測できる可能性があること、マイオカイン以外のケモカインなども電気刺激後に反応を認め、その影響も考える必要があること、電気刺激後のサイトカイン分泌が身体機能・活動量との間に相関を認めることが明らかとなった。今回の網羅的解析によって得られた結果から、特定のサイトカインをより定量性の高い計測法を用い、介入効果や臨床症状の変化と合わせ縦断的に検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：We gave electrical stimulation to the muscles in healthy subjects to know the effect of exercise in cachexia patients. The cytokines in saliva were measured to evaluate the relationship between physical function and activity. We found that secretion of cytokines after electrical stimulation can be measured by saliva. It had significant correlation between physical function and activity. In addition, chemokines except myokine act after electrical stimulation. From the results of these comprehensive analyses, certain cytokines should be measured by high quantitative properties and we have to check the effect of intervention and changes in clinical symptoms in longitudinal analyses.

研究分野：リハビリテーション治療学

キーワード：サイトカイン 電気刺激 悪液質

1. 研究開始当初の背景

悪液質は、IL-1, TNF- などの炎症性サイトカインによる異化亢進をもたらす代謝異常と食欲不振などによるエネルギー摂取量減少が複雑に関連して形成する栄養不良状態である。単純な飢餓と異なり十分な栄養投与を行っても改善が困難である。がん患者では高頻度に認められ、腫瘍由来サイトカインがもたらす悪液質により患者の活動性、生活の質を低下させ、予後に大きな影響を与える。近年、運動や筋の電気刺激により、筋から分泌される種々のサイトカインが確認されている。これらのサイトカインは、マイオカインと呼ばれ、その中には、炎症性サイトカインに対して抑制作用を持つサイトカインが含まれ、がん悪液質に対しての運動の改善効果が期待されている。しかし、悪液質患者では、不活動やサルコペニアなど多くの要因が影響する。マイオカインを含めたサイトカインの作用は、相互に複雑に影響し合うため、そのような環境下で筋が、運動や電気刺激に対してどのようなサイトカイン応答を生ずるか明らかでない。そこで健常人を対象に電気刺激によるマイオカインを含めたサイトカインを網羅的に探索し、BMI、体脂肪率や筋力、酸素摂取量、日常の活動量との関連を検討することで、悪液質患者への電気刺激療法導入の一助になると考えた。また、今回サイトカインの計測には唾液を使用するが、多くの先行研究では血清を使用している。非侵襲的に唾液から筋刺激に対するサイトカイン動態を確認することが可能であれば、患者介入時の負担の軽減にもつながるため、本分野での臨床、研究発展につながる可能性がある。

2. 研究の目的

ベルト電極式骨格筋電気刺激法 (Belt electrode Skeletal muscle Electrical Stimulation; B-SES) を用いて臀部、大腿、下腿に対し電気刺激を行い、唾液中のサイトカイン応答を網羅的に計測し、BMI、筋力、酸素摂取量、活動量との関連について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象及び方法

対象は、健常成人男性 5 名 (年齢 22 ± 2 歳、身長 170.5 ± 5.2cm、体重 62.5 ± 5.9kg) とした。被験者に 30 分間の安静をとらせ、ベルト電極式骨格筋電気刺激法 (Belt electrode Skeletal muscle Electrical Stimulation; B-SES) を装着し、各筋に電気刺激を実施した。刺激後は、120 分間安静にさせ、刺激前、刺激直後、刺激後 30、60、90、120 分後の計 6 回、唾液を採取した。その後、体重、身長、体脂肪および膝伸展筋力、安静時酸素摂取量、最高酸素摂取量 (Peak Vo2) を計測した。また、生活活動時計を用い計測日前日までの 3 日間の歩数を計測した。

(2) 使用機器および計測方法

電気刺激 (B-SES)

オートテンスプロリハビリユニット (ホーマイオン) を用いて、臀部、大腿、下腿に対し双極矩形波 20Hz の頻度で 3 秒間行い 2 秒休止するパターンで B-SES を 30 分間実施した。刺激強度は、被験者が不快に感じない最大強度とした。

サイトカイン計測

唾液は、サリソフト (SARSTED) を用いコットンを口の中に 90 秒間含み唾液を染み込ませ採取したのち、直ぐに冷凍保存した。唾液採取は上述の方法を用いて、被験者毎に 6 回行った。サイトカイン計測に際して常温に融解した唾液試料は希釈せず原液をメンブレン抗体アレイキット RayBio C-Series Human Cytokine Antibody Array C3 AAH-CYT-3 (RayBiotech) にて 40 種類のサイトカインの計測を行った (表 1)。

表1. 計測したサイトカイン一覧

IL-1 α	ICAM-1(CD54)
IL-1 β (ILF2)	TNF- α
IL-2	TNF- β
IL-3	TNF R II
IL-4	TNF R I
IL-6	TIMP-2
IL-6R	TGF- β 1
IL-7	RANTES(CCL5)
IL-8(CXCL8)	PDGF-BB
IL-10	MIP- δ (CCL15)
IL-11	MIP- β (CCL4)
IL-12 P70	MIP- α (CCL3)
IL-12 P40	MIG(CXCL9)
IL-13	MCP-2(CCL8)
IL-15	MCP-1
IL-16	M-CSF
IL-17A	GM-CSF
IFN- γ	G-CSF
IP-10(CXCL10)	Eotaxin-2(MIPF-2/CCL24)
I-309(TCA-3/CCL1)	Eotaxin-1(CCL11)

サイトカイン発現は、画像解析ソフト Image J(NIH) を用いてデンシトメトリー法により解析した。メンブレン角に用意された最大限に反応した状態を示す Positive Control Spots の反応を基準として 1 枚のメンブレン毎に各サイトカインの反応を正規化した (図 1)。

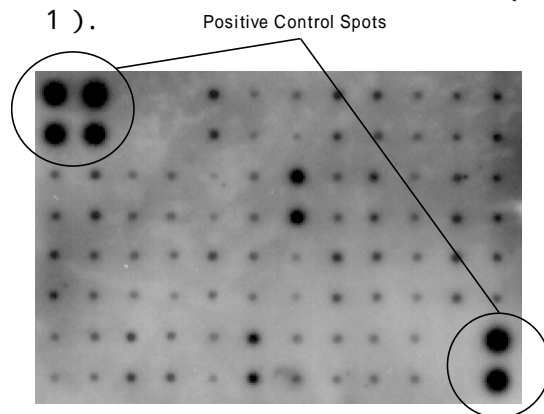


図1 感光させたメンブレン抗体アレイ

各サイトカインのドットを数値化し、安静時の各サイトカインを基準として経時的な変化を比較した。

体重、体脂肪率

体重、体脂肪率は体重体組成計 HBF-701 (オムロン) を用いて計測した。

膝伸展筋力

簡易筋力計ミュータス F-1(アニマ)を用い、座位にて等尺性最大筋力を計測した。

安静時酸素摂取量・最高酸素摂取量

酸素摂取量は、呼気ガス分析装置 AE-300SRD (ミナト医科学) を用い、安静時の酸素消費量と自転車エルゴメータに運動負荷試験を行い、最高酸素摂取量を計測した。

歩数

腕時計型活動時計 Charge HR (fitbit) を用い、サイトカイン計測前日までの3日間の歩数を計測し、1日あたりの平均歩数を算出した。

4. 研究成果

(1) 唾液を試料とするサイトカイン計測の可能性

本研究では、唾液中のサイトカインを計測した。被験者5名における安静時を1とした場合の各サイトカインの刺激後の経時変化の平均を表に示す(表2)。

表2. 電気刺激に対するサイトカイン応答

サイトカイン略称	安静時	電気刺激直後	電気刺激30分後	電気刺激60分後	電気刺激90分後	電気刺激120分後
IL-1 α	1.0	1.2	1.3	1.8	0.9	1.0
IL-1 β (ILF2)	1.0	1.2	1.1	1.2	1.4	1.3
IL-2	1.0	1.9	2.2	3.3	1.9	2.0
IL-3	1.0	1.2	2.1	2.1	2.1	1.5
IL-4	1.0	1.2	1.6	1.4	1.4	2.0
IL-6	1.0	0.9	2.0	1.0	0.7	1.2
IL-6R	1.0	1.1	1.0	1.0	1.3	1.1
IL-7	1.0	1.2	1.3	1.2	1.6	1.6
IL-8(CXCL8)	1.0	1.2	1.4	1.8	1.9	1.3
IL-10	1.0	1.2	1.4	1.4	1.8	1.7
IL-11	1.0	0.7	0.9	1.2	1.2	1.2
IL-12 P70	1.0	1.4	2.9	2.3	1.6	1.3
IL-12 P40	1.0	1.4	1.9	1.6	1.0	1.3
IL-13	1.0	4.9	4.2	16.0	6.2	6.1
IL-15	1.0	2.9	2.9	2.8	2.8	2.4
IL-16	1.0	0.9	1.0	1.7	1.8	1.4
IL-17A	1.0	1.1	1.6	1.4	2.3	1.2
IFN- γ	1.0	1.0	1.3	1.5	1.0	1.4
IP-10(CXCL10)	1.0	1.2	1.7	1.4	1.5	1.2
I-309(TCA-3/CCL1)	1.0	1.5	1.5	1.4	1.9	1.1
ICAM-1(CDS4)	1.0	1.2	1.3	1.8	1.4	1.1
TNF- α	1.0	1.7	2.0	2.4	2.1	1.7
TNF- β	1.0	1.6	1.7	2.4	1.8	1.5
TNF R1	1.0	1.7	1.9	2.7	3.4	2.3
TNF RII	1.0	1.6	1.4	1.4	1.6	1.8
TIMP-2	1.0	1.5	1.3	1.5	1.8	1.4
TGF- β 1	1.0	1.0	2.6	3.9	2.1	1.7
RANTES(CCL5)	1.0	2.7	3.2	6.2	3.3	2.5
PDGF-BB	1.0	2.5	1.5	1.4	3.2	2.5
MIP- β (CCL15)	1.0	1.0	1.4	2.7	0.8	0.9
MIP- β (CCL4)	1.0	1.5	2.3	1.9	1.7	1.5
MIP- α (CCL3)	1.0	0.9	2.2	1.9	2.0	2.0
MIG(CXCL9)	1.0	0.9	1.4	1.4	1.5	1.5
MCP-1	1.0	0.7	1.1	0.9	1.2	1.0
MCP-2(CCL8)	1.0	1.5	1.3	1.8	1.9	2.0
M-CSF	1.0	1.5	1.7	1.8	2.4	1.8
GM-CSF	1.0	0.9	1.4	1.7	1.7	1.4
GCSF	1.0	1.7	1.3	1.4	4.6	3.8
Eotaxin-1(CCL11)	1.0	0.9	1.2	1.4	1.6	1.2
Eotaxin-2(MIPF-2/CCL24)	1.0	1.0	1.7	2.5	2.1	1.7

n=5,平均

*Eotaxin-2刺激後30-120後間で有意に増加
(p=0.015;Repeated AVOVA,Bonferroni)

ほとんどのサイトカインにおいては経時的な有意差は認められなかった。しかし、日常生活による刺激ではなく、電気刺激に対するものと考えられる経時的な反応を示した。IL-6は、代表的なサイトカインであり、最初

に同定されたサイトカインでもある。運動や筋収縮に対してIL-6は最初に増加し、刺激終了後は速やかに減少する。IL-8, IL-10も運動に反応するサイトカインとして知られているが、緩やかに上昇する。本研究においてもIL-6は刺激後、速やかな上昇と下降を示し、IL-8, IL-10は緩やかに上昇を示した(図2)。

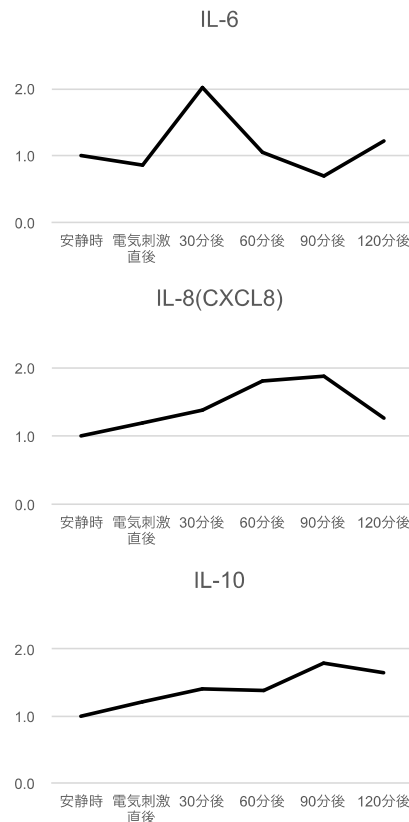


図2 IL-6, IL-8, IL-10における電気刺激に対する応答

これらのサイトカインが刺激された筋から分泌されたものか、何らかの物質による白血球の応答によるサイトカインか、またそれが唾液中に反映されたかどうかは不明であるが、少なくとも経時的な応答パターンをからは刺激に対して血清サイトカイン応答と類似しており、電気刺激や運動に対するサイトカイン応答について唾液による計測は可能であると考えられる。非侵襲的な試料として唾液からサイトカイン応答の確認が可能であれば、サイトカイン計測時の患者負担の軽減につながるため、本分野での臨床研究発展が期待出来る。ただし、先行研究においてIL-6発現量は、運動中にピークまで上昇し、運動直後より低下することが知られているが、本研究では、それが電気刺激の30分後にピークに達する。他のILに関して先行研究よりも30~60分の遅延が確認されるため、血清中のサイトカインが唾液中に反映されるまでのタイムラグがあることが推察され、それを想定する必要がある。また、血清中のサイトカインとは発現量も異なっており、これら

の点に関しては、今後、血清試料と唾液試料を同時に採取し比較するなどして検討する必要がある。

(2) マイオカイン以外のサイトカインおよびサイトカイン以外のケモカインの解析の必要性

今回の実験において Eotaxin-2 (別称: MPIF-2/CCL2) は、刺激後、有意に増加した。Eotaxin-2 は、アレルギー反応と関係の深いケモカインとして知られ、好酸球の遊走活性、活性酸素産生促進などの作用が報告されている。これまでマイオカインとしての報告や運動と直接関連した報告は少ないが、運動に伴い産生される IL-1 などにより産生が亢進され、IFN- γ により抑制されることが知られている。今回、Eotaxin-2 だけでなく、Eotaxin-1 (CCL11)、RANTES (CCL5) などのケモカインも刺激後、同様に上昇している。これらのケモカインも生体に影響を与えるため、今後の電気刺激の臨床応用について、筋が分泌するマイオカインの応答だけでなく、他のサイトカインの二次的な反応やマイオカイン以外のサイトカインの応答も想定し、追跡する必要がある。(3) サイトカインと生理機能の関係

安静時のサイトカイン発現量と身体機能・活動量

被験者 5 名の身体機能・活動量は、BMI 21.5 \pm 1、体脂肪率 16.7% \pm 4、膝伸展筋力 40.4kg \pm 7、歩数 13,395 歩/日 \pm 2384、安静時酸素摂取量 280.8ml/min \pm 22、最高酸素摂取量 2770.6 ml/min \pm 22 であった。安静時のサイトカイン発現量と身体機能・活動量について、有意な相関が認められたものを表に示す(表 3)。

表3 安静時のサイトカイン発現量と身体機能・活動量の相関

	正の相関	負の相関
BMI	IL-6	
	RANTES	
	PDGF-BB	
	I309	
膝伸展筋力	IL-11	
	Eotaxin-2	
	GCSF	
	MIG	
最高酸素摂取量	IL-8	
	TNFR II	
	Eotaxin2	
	GCSF	
	GMCSF	
	I309	

SPSS(ver.23) 使用し、Pearson 相関係数 5% 水準で有意 (両側) と認めたもののみ表記。

今回、安静時のサイトカイン発現量と身体機能・活動量の間で負の相関は認められなかった。安静時の IL-6 は、悪液質や肥満で、慢性的な高値を示し、活動量の向上やトレーニングにより低値となることが知られている。炎症性サイトカインとして知られている IL-6 であるが、筋由来の IL-6 は、TNF- α などの炎症性サイトカインを抑制することも報告されており、骨格筋インスリン抵抗性の

改善、悪液質のような全身性炎症の抑制などを介して運動時や安静時の代謝改善にも寄与する可能性がある。今回、正常範囲内での BMI とは、正の相関を示したが、筋力や活動量とは相関を認めなかった。抗炎症作用を持つ IL-11、G-CSF は、膝伸展筋力と相関があった。また、マラソンのような長時間の強い運動で増加することは知られる G-CSF と IL-8 は、膝伸展筋力や最高酸素摂取量と正の相関を認めた。運動に伴い上昇し抗炎症作用のあるサイトカインの安静時の発現量が身体機能・活動量と関係することは興味深く、悪液質の患者においても、運動やトレーニングに対するこれらのサイトカインの長期的および急性反応を臨床像と合わせ、追跡する意義は大きいと考える。上述の Eotaxin-2 についても、膝伸展筋力と最高酸素摂取量の両方に相関が認められた。その他のサイトカインも筋力や最高酸素摂取量との相関が認められ、運動との関連が示唆される。

電気刺激後の唾液中サイトカイン分泌と身体機能・活動量の関係

電気刺激後の唾液中サイトカイン分泌と身体機能・活動量について有意な相関が認められた(表 4)。先行研究では、トレーニングにより安静時の IL-6 は低下するのに対し、IL-6 のレセプター (IL6-R) は高くなることが知られている。

表 4. 電気刺激に対するサイトカイン応答と身体機能・活動量の相関

	正の相関	負の相関
BMI	IL-12 (P40)	IL-1 α
	GMCSF	IL-2
		MCP2
体脂肪	IL-7	MCP2
	MIP α	
膝伸展筋力	IL-6R	IL-1 β
	IL-11	IL-3
	MIP δ	IL-12 (P70)
		IL-16
		IL-17A
		IFN γ
安静時酸素摂取量	IL-1 β (IL-F2)	MIG
	IL-7	
	TNF α	
	TNFR2	
	MIP α	
最高酸素摂取量	IL-6	MCSF
	IL-10	
	TNF α	
	TNFR1	
	MIP β	
歩数/日		IL-6R
		IL-7
		IL-8
		TNF β
		TGF β 1
		MCSF
		ICAM1
	MIP α	

SPSS ver.23 使用し、Pearson 相関係数 5% 水準で有意 (両側) と認めたもののみ表記。

これは、より効率的に運動時の IL-6 の作用

を高めるためであると考えられている。今回、IL6-Rは、膝伸展筋力と正の相関を認めたと、活動量の指標とした歩数/日とは、負の相関を認めた。また、IL-6は最高酸素摂取量と正の相関を認めた。抗炎症性サイトカインであるIL-10も最高酸素摂取量と正の相関を認めるが、炎症性サイトカインであるTNF- α も同様に相関が認められる。これらの結果に関しては、今回、抗体メンブレンを用いての発現量の解析だけでは、定量性に限界があり、網羅的解析によって得られた結果から特定のマイオカイン(サイトカイン)やケモカインを選択し、ELISAやWestern Blot法を用いて解析することが必要である。いずれにせよ多くのサイトカイン応答が身体機能・活動量と関係している可能性がある。これらのサイトカインがどのように生体に影響し合うかは、個々のサイトカインの生理学的作用が必ずしも明確になっていないこともあり、単純に炎症性サイトカイン対抗炎症性サイトカインの構図で結論付けることは出来ない。縦断的にトレーニング効果や臨床像の変化と照らし合わせ、これらのサイトカインを検討していく必要があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百田貴洋 (MOMOTA TAKAHIRO)

藤田保健衛生大学・医療科学部・助教

研究者番号：30597638