

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：34431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K01488

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮からの回復でおこる炎症に対する効果的治療法開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of effective therapies for inflammation caused by recovery from disuse muscle atrophy

研究代表者

廣島 玲子 (Hiroshima, Reiko)

関西福祉科学大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：40404777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：医療現場では疾患や手術後の安静により廃用症候群が頻繁に発症し、リハビリテーション分野では廃用性筋萎縮の予防及び回復が重要となっている。本研究は実験動物を使用して廃用性筋萎縮を発症させ、その回復過程で抗炎症剤を注射した群と注射なしの自然治癒群を比較し、筋萎縮からの回復過程で起こる炎症の効果を検討した。指標として筋収縮の主要タンパク質ミオシン重鎖(MHC)と炎症性サイトカイン(IL-6)のmRNA発現量を検討した。注射群ではIL-6が減少し、免疫細胞の遊走が抑制された。MHCも注射群では遅筋タイプの減少が緩和され萎縮による速筋化が抑制されたが、速筋タイプでは抗炎症剤の影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療現場で患者が頻繁に発症する廃用性筋萎縮に対する予防や回復に対するリハビリテーションは重要な位置にある。しかし、一旦筋萎縮を発症した筋がどのような過程を経て回復するのか、回復にはどの治療法をどのように用いるのが最も効果的なのかなどの疑問に対しては、いまだ明確な答えは出しておらず、科学的根拠に基づいた統一見解は得られていない。本研究は臨床現場で廃用性筋萎縮を呈した患者に対して、より効果的で具体的な治療方法の提案へと発展できる可能性があり、廃用性筋萎縮からの回復において患者の移動能力や生活の質の向上へと直接結び付けることができ、真の意味でのリハビリテーションが確立できると考える。

研究成果の概要(英文)：Disuse syndrome frequently occurs in the medical field due to bedrest after illness or surgery, and prevention and recovery from disuse muscle atrophy are important in rehabilitation. In this study, we used experimental animals to induce disuse muscle atrophy and compared a group that received an anti-inflammatory drug injection during the recovery process with a group that recovered naturally without the injection, in order to examine the effect of inflammation that occurs during the recovery process from muscle atrophy. The mRNA expression of myosin heavy chain (MHC), a major protein in muscle contraction, and inflammatory cytokine (IL-6) were examined as study indicators. The injected group showed a decrease in IL-6, which means the migration of immune cells was suppressed. MHC slow type decreased in the injected group and the transformation to fast muscle type due to atrophy was suppressed, but the effect of the drug was not observed in MHC fast type.

研究分野：複合領域

キーワード：廃用性筋萎縮 回復過程 炎症反応 ミオシン重鎖アイソフォーム 炎症性サイトカイン リハビリテーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 医療の現場では、疾患や骨折、手術後の安静状態などによって長期臥床が続く、または一定期間のギプス固定などで骨格筋にかかる重力や負荷が少ない状況が継続すると、廃用症候群の一種である廃用性筋萎縮が頻繁に発症し、その予防やそこからの回復がリハビリテーション分野では常に医療従事者や患者にとって重要課題として挙げられる。

(2) しかし、廃用性筋萎縮の治療法は機能回復訓練、運動療法、物理療法などを可能な限り速やかに実施し筋萎縮からの回復を目指すべく努力をしているが、一旦筋萎縮を発症した筋がどのような過程を経て回復するのか、回復にはどの治療法をどのように用いるのが最も効果的なのかなどの疑問はいまだ明確かつ科学的根拠に基づいた統一見解は得られていないのが現実である。

(3) 我々は先行研究で実験動物を用いて廃用性筋萎縮モデルを作成し、筋萎縮からの回復過程を時間経過にそって検討した。まず、廃用性筋萎縮は穏やかに進行する。実験動物に廃用性筋萎縮を作成する期間を1週間、2週間、3週間と検討したところ、筋細胞では徐々に萎縮や炎症反応が進行した。廃用性筋萎縮を発症した筋は脆弱になり、自己体重を負荷するだけで筋が損傷や細胞破壊が起こってしまった。その後、筋は損傷を機に炎症反応を惹起し、それをきっかけとして徐々に回復していく。先行研究では筋損傷や筋細胞破壊は再体重負荷後3日目にピークを示し、7日目にはすでに回復過程にあることが観察された。

(4) 本研究では次の3種類のタンパク質に焦点を当てた。筋肉の収縮に重要なミオシンタンパク質、特に筋肉の活動量に影響を受けてそれぞれ収縮速度が異なるミオシン重鎖アイソフォーム(MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIb)の発現量変化の検討。筋損傷や筋細胞破壊などにより炎症反応が惹起され、免疫細胞より分泌される炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン6(IL-6)の発現量の検討。細胞がストレスにさらされたときに発現量が増加し、筋細胞の修復を促進する熱ショックタンパク質70(HSP70)の発現量の検討。これらタンパク質の遺伝子発現量(mRNA発現量)およびタンパク質発現量が廃用性筋萎縮からの回復過程においてどのように変化するかを総合的に検討することとした。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、骨格筋に発症した廃用性筋萎縮からの早期回復過程で筋にどのようなことが起こっているのか、特に筋萎縮発症の結果として二次的に起こる筋損傷からの炎症が及ぼす影響について遺伝子レベル、分子(タンパク質)レベル、細胞レベルで検討することを目的とした。

(2) 具体的には、廃用性筋萎縮を発症した筋が再体重負荷により筋損傷を起こし、そこより惹起される炎症反応は損傷をさらに重症化させるネガティブなものなのか、または回復へのきっかけや促進材料として必要不可欠なポジティブなものなのかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では実験動物として11週齢Wistar系雄ラット(体重300g前後)を使用した。10週齢のラット購入後、関西福祉科学大学動物実験飼育室にてラット実験ケージ(276×445×204mm)内で1週間個別飼育し、環境(室温24度、湿度50%、12時間の明暗サイクル)に慣れさせた後、実験を開始した。実験期間中はケージ内にて標準ラット乾燥餌および水分をラットの自由摂取とした。

(2) 廃用性筋萎縮モデルの作成方法として、ラット右下肢にギプス固定を施した。具体的には

ラットをエーテル麻酔薬吸入にて一時的に麻酔し、剃毛した右下肢にギプスを巻き足首（底屈0～10度内）・膝関節（屈曲0～10度内）を固定し、2週間その状態でケージ内にて飼育し右ヒラメ筋に廃用性筋萎縮を発症させた。ギプス固定による足部の浮腫や壊死を防ぐため足趾は開放した。

(3) 研究デザインとして、2週間右下肢にギプス固定を施したヒラメ筋をギプス群、同ラットのギプス固定のない左下肢ヒラメ筋をコントロール群、ギプスを2週間施したラットをさらに2週間の右下肢ギプス開放直後に抗炎症剤を注射後3日（注射3日）群、注射後7日（注射7日）群、ギプス解放後に抗炎症剤注射をしないで自然治癒を3日間させた（自然治癒3日）群、注射なし7日（自然治癒7日）群の計6群を設定した。

(4) 廃用性筋萎縮を発症したヒラメ筋が再体重負荷により起こる筋損傷や炎症を抑えるため、注射群は2週間のギプス固定解放直後に右ヒラメ筋に抗炎症剤を注射し、3日後および7日後にラットからヒラメ筋を摘出した。抗炎症剤にはデボ・メドロール水性懸濁注射液（ファイザー）0.3mgを使用し、右ヒラメ筋起始部から筋腹部にかけて注入した。

(5) それぞれのラットは実験期間終了後、イソフル麻酔薬の吸入により全身麻酔を施し、ラットの体重測定後、ヒラメ筋を摘出し、ヒラメ筋湿重量を測定した。ヒラメ筋の一部をISOGEN 試薬（ニッポンジーン）1.0ml中に保存し、mRNA分析を行った。ヒラメ筋摘出後ラットは全身麻酔にて安楽死させた。本研究は、関西福祉科学大学動物実験管理委員会において承認された動物実験である。（承認番号15-01）

(6) リアルタイムPCR法により、炎症時に免疫細胞より分泌されるサイトカインの1種であるインターロイキン6（IL-6）、ミオシン重鎖アイソフォーム（MHC-I、MHC-IIa）、グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）の4種類のmRNA発現量を分析した。具体的方法として、ISOGEN液中のヒラメ筋をホモジナイズし、総RNAを抽出し、SuperScript, VILO cDNA Synthesis Kit（インビトロジェン）を用いてcDNAを合成した。その後上記4種類に特異的なプライマーを用い、相当するmRNAに相補的なcDNAを増幅し、GAPDHをコントロールとして補正し分析を行った。

(7) 研究開始当初には上記以外にも、ヒラメ筋細胞の免疫組織化学的染色にて炎症状態の検討、インターロイキン6（IL-6）、ミオシン重鎖アイソフォーム（MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIb）のタンパク質レベルをWestern Blotting法にて発現量の検討、熱ショックたんぱく質70（HSP70）のmRNA発現量及びタンパク質発現量の検討、これらの実験及び分析予定であったが、コロナ禍の影響により実験が中止せざるを得ない状況となり、その後も実験再開が困難となったため、上記の分析は本研究では中止とした。

#### 4. 研究成果

(1) 各群のヒラメ筋湿重量をラット体重で標準化した値（g/g）を図1に示した。ギプス群はコントロール群に比べ、ヒラメ筋湿重量が減少した。これより2週間のギプス固定によりヒラメ筋に廃用性筋萎縮が発症したことが確認された。その後の回復過程では、自然治癒群は3日でさらに減少し、7日で若干増加したがコントロール群値よりは低かった。注射群は3日で増加しコントロール群以上の値を示したが、7日では再び減少した。注射3日群の増加はギプス固定除去後の再体重負荷により筋損傷が起こり炎症反応による免疫細胞の増加や損傷からくる腫脹により増加し7日にはそれらが落ち着いたと考える。しかし、自然治癒群では3日も7日も変化は小さく、なぜ注射群の変化が大きくなったのかは不明であるが抗炎症剤の影響のためより大きな変化が見られたと考える。

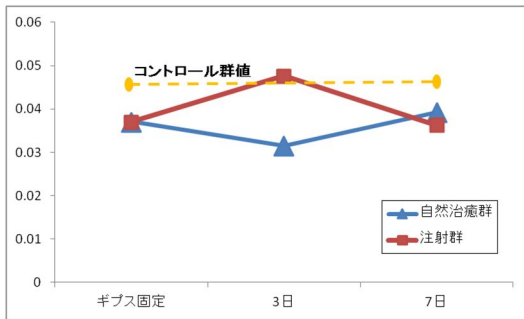


図1：ヒラメ筋湿重量/体重(g/g)

(2) 各群ヒラメ筋の IL-6 の mRNA 発現量を図2 に示した。ギプス群はコントロール群に比べ、IL-6 発現量は著しく増加した。これはギプス固定により廃用性筋萎縮が発症し、筋萎縮が進行する過程でも炎症が起こるため、炎症性サイトカインの IL-6 の発現量が増加するのは当然である。その後の回復過程では、両群ともに3日で減少したが、7日ではやや増加を示した。注射群は3日および7日で、自然治癒群より値が低かった。この注射群と自然治癒群の違いは、筋萎縮による炎症およびその後の再体重負荷による筋損傷による炎症が抗炎症剤により免疫細胞の遊走や炎症性サイトカインの分泌が抑制されたためと考える。

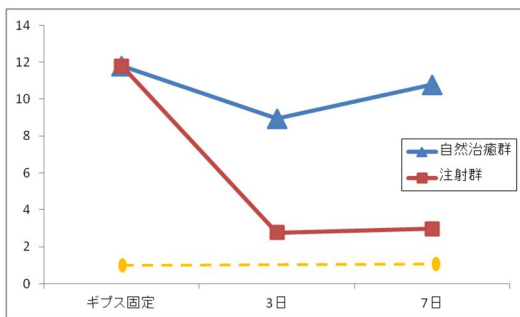


図2：IL-6 の mRNA 発現量

(3) 各群ヒラメ筋の MHC-I (遅筋タイプ) の mRNA 発現量を図3 に示した。ギプス群はコントロール群に比べ MHC-I 発現量は減少した。先行研究により筋萎縮が進行すると速筋化が起こり、ミオシン重鎖アイソフォームの遅筋タイプ MHC-I の発現量が減少し、他の速筋タイプのミオシン重鎖アイソフォームが増加することがわかっている。その後の回復過程では、両群ともに3日でさらに減少、7日では更なる減少を示した。これは萎縮や損傷による筋細胞破壊などが進み、ますます速筋化が進んだものと思われる。注射群は自然治癒群より減少が緩和されていた。抗炎症剤の影響により、速筋化が抑制されたと考える。

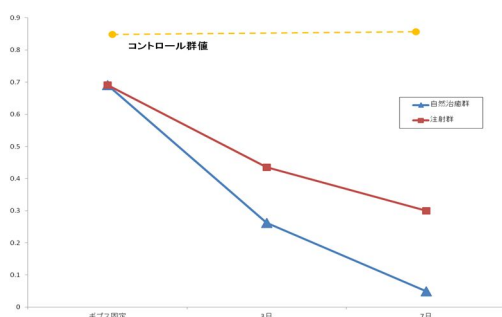


図3：MHC-I の mRNA 発現量

(4) 各群ヒラメ筋の MHC-IIa (速筋タイプ) mRNA 発現量を図4 に示した。ギプス群はコントロ

ール群に比べ、MHC-IIa 発現量は増加した。これは(3)で説明したように筋萎縮により速筋化が起こり、速筋タイプである MHC-IIa 発現量が増加した。その後の回復過程では、両群ともに3日でさらに増加したが、7日では減少した。注射群は自然治癒群より値が高かった。これは速筋タイプである MHC-IIa 発現量が抗炎症剤により増加し、自然治癒群と比べより速筋化が進んだということになるが、(3)の結果と矛盾する。速筋タイプには、MHC-IIa と MHC-IIb があり、MHC-IIa はより遅筋タイプに近く収縮速度が遅く、MHC-IIb はより収縮速度が速いアイソフォームである。よって、MHC-IIa だけを見たのでは遅筋タイプに移行しているのかより速筋タイプに移行しているのかが不明であり、MHC-IIb の発現量も検討すべきである。

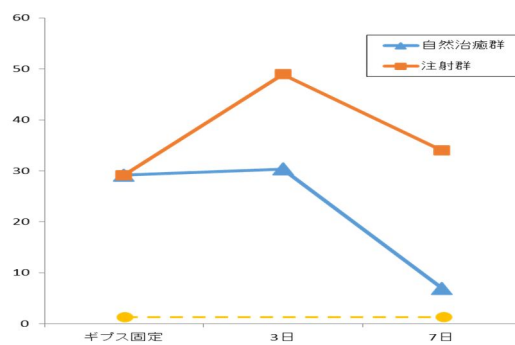


図4：MHC-IIa の mRNA 発現量

(5) 本研究結果より、廃用性筋萎縮からの回復過程初期においては、萎縮筋が起こす炎症を抑制することが回復をより促進する可能性が示唆された。

(6) 本研究では、当初 MHC-IIb (速筋タイプ) や HSP70 の mRNA 発現量を検討する予定であったが、使用した特異的プライマーがうまく反応せず、今回は検討指標から除外した。

(7) 今後の展望として、本研究結果を基に中止したヒラメ筋免疫組織分析により損傷程度や炎症反応の確認、今回採用した指標 (IL-6、MHC-I、MHC-IIa) のタンパク質レベルでの発現量分析および他の指標の採用 (IL-1、MHC-IIb、HSP70 など) などが推奨される。

(8) 本研究で得られた成果は国内外の学会での発表や雑誌投稿を通して、廃用性筋萎縮からの回復過程に対するより深い理解を医療現場に啓蒙し、より効果的で効率的な治療方法の開発に寄与できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Reiko Hiroshima, Junko Yamaji, Yoshiaki Mori
2. 発表標題 The mRNA study of MHC and IL-6 in rat soleus recovering from muscle atrophy
3. 学会等名 World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森禎章、山路純子、廣島玲子
2. 発表標題 CGRPはC2C12細胞におけるミオシン重鎖タイプ II のmRNA発現量をIL-6非依存的に増加させる
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山路純子、廣島玲子、森禎章
2. 発表標題 カルシトニン関連ペプチド(CGRP)のミオシン重鎖タイプII及びインターロイキン6mRNA発現への影響
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山路 純子 (田代純子)  (Yamaji Junko)  (40340559)	関西福祉科学大学・健康福祉学部・教授    (34431)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	森 禎章  (Mori Yoshiaki)  (70268192)	関西福祉科学大学・保健医療学部・名誉教授     (34431)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関