

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01535

研究課題名(和文)超音波による筋損傷からの回復促進メカニズムの解明

研究課題名(英文)The recovery facilitatory effect for muscle injury by ultrasound

研究代表者

縣 信秀 (AGATA, Nobuhide)

常葉大学・保健医療学部・講師

研究者番号：00549313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋損傷を早期に回復させることはリハビリテーションにとって重要な課題である。超音波は筋損傷からの回復を促進させるツールとして十分に期待されるが、科学的根拠が乏しい。そこで、筋損傷からの回復のメカニズムを明らかにする必要がある。本研究では、筋衛星細胞の増殖を促進する超音波刺激の最適条件を検討し、HGFの関与について検証した。また、遺伝子改変が行いやすいマウスの筋損傷モデルの作製を試みた。その結果、超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果を、刺激強度が高く、照射時間率が大きい方が筋衛星細胞の増殖促進効果が高い傾向がみられた。また、筋損傷モデルマウスを作製することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで理学療法では、筋損傷に対してはRICEに基づいた処置を行うのがほとんどであった。また、超音波刺激の使用や処方に関しても、科学的根拠が乏しいため、セラピスト個人の経験に基づいて行われている。筋損傷からの回復を促進する超音波刺激の最適条件が明らかになれば、効果的・効率的な筋損傷に対する新しい治療法の開発へと繋がる。また、超音波刺激による筋損傷からの回復促進のメカニズムが明らかになれば理学療法学だけではなく、スポーツや運動による筋損傷を扱う体育科学へも貢献することができる。本研究の成果は、その礎となるものだと考える。

研究成果の概要(英文)：Recovery of muscle damage is an important issue for rehabilitation. Ultrasound is a promising tool for facilitating recovery from muscle damage, but its scientific basis is poor. Therefore, it is necessary to clarify the mechanism of recovery from muscle damage. In this study, we examined the optimal conditions of ultrasonic stimulation to facilitate the proliferation of muscle satellite cells and verified the involvement of HGF. We also attempted to construct a mouse muscle damage model. As a result, the effect of ultrasonic stimulation on the growth facilitation of muscle satellite cells tended to be higher as the stimulation intensity was higher and the irradiation time rate was higher. In addition, we were able to construct a muscle damage model mouse.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋損傷 超音波

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋損傷を受けた理学療法対象者が、早期にADL能力を獲得するためには、できるだけ早く筋、損傷を回復させる必要がある。これまでに、超音波の非温熱作用には、皮膚潰瘍、腱損傷、骨折に対して治癒促進効果があると実験系モデル研究で報告されている。この治癒促進効果は、超音波の非温熱作用によるマクロファージの反応性の増強、血流量の増加、細胞の増殖、タンパク質の合成促進が要因だといわれている。これらの変化は組織回復に不可欠な要因であるため、超音波の筋損傷治療への応用も十分に期待されるが、詳細な効果を検証した報告はない。そこで我々は、遠心性収縮による前脛骨筋の筋損傷モデルラットを用いて、損傷2時間後に10分間の超音波を1度だけ行うと組織学的、機能的に筋損傷からの回復を促進することを明らかにした。また、この効果は超音波により筋衛星細胞の増殖が促進したと考えた。そこで、マウス長趾伸筋から採取した筋衛星細胞に超音波を与えると、増殖が促進されることがわかった。しかし、超音波による筋損傷からの回復促進や、筋衛星細胞の増殖促進のメカニズムについては不明である。

超音波の非温熱作用が細胞に与える刺激として、微小流、キャピテーションなどによる機械刺激がある。機械刺激は、骨格筋の恒常性維持に重要な役割を果たしているといわれている。近年Michelle Rozoらは、機械刺激の受容器と考えられているインテグリンを介した細胞内情報伝達経路が、筋衛星細胞の細胞周期を制御していると報告している。このことから、超音波による筋衛星細胞の増殖は、超音波による機械刺激がインテグリンを活性化させ、細胞増殖に関わる細胞内情報伝達経路を促進していることが考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス筋衛星細胞の初代培養を用いて、超音波による機械刺激が筋衛星細胞の増殖を促進すること、そのメカニズムにインテグリンを介する細胞内情報伝達経路が関与していることを明らかにし、超音波による筋損傷からの回復促進のメカニズムを明らかにすることである。そのために、以下の3つの研究を行った。

- (1) 筋衛星細胞の増殖を促進する超音波刺激の最適条件の検証
- (2) 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖にHGFが関与しているかどうかの検証
- (3) 遺伝子改変が行いやすいマウスでの筋損傷モデルの作製

### 3. 研究の方法

#### (1) 筋衛星細胞の増殖を促進する超音波刺激の最適条件

C57BL/6Jマウスの長趾伸筋をコラゲナーゼ溶液に90分間浸した後、培地中で筋線維をほぐし、単一筋線維のみを採取し、トリプシンによって筋衛星細胞を剥離し、ディッシュに播種した。播種後4日間は、増殖培地にて培養した。播種4日目にトリプシン処理によって剥離し、細胞数 $1.0 \times 10^5$ で再播種した。再播種から2日目にコンディション培地に交換し、2時間後に細胞増殖マーカーであるEdU (10 $\mu$ M)を添加し、超音波治療器(UST-750,伊藤超短波)を用いて、37に設定したインキュベーター内で、ゲルを塗布したプローブ(直径1.8cm)の上にディッシュを乗せて固定し、10分間の超音波刺激を加えた。刺激強度の違いによる超音波刺激の効果を調べるために、刺激強度を0.1, 0.5, 1.0 W/cm<sup>2</sup>であたえる3群を作製した。照射時間率は20%, 周波数は3 MHzとした。また、照射時間率の違いによる超音波刺激の効果を調べるために、照射時間率を10%, 30%, 50%の3群を作製した。刺激強度は0.5 W/cm<sup>2</sup>, 周波数は3 MHzとした。超音波刺激4時間後に、4%PFAで細胞を固定し、EdU染色と核染色を行った。すべての核とEdU陽性細胞数をカウントし、すべての核に対するEdU陽性細胞数の割合を算出し増殖率とした。

#### (2) 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖にHGFが関与しているかどうかの検証

C57BL/6Jマウスの長趾伸筋をコラゲナーゼ溶液に90分間浸した後、培地中で筋線維をほぐし、単一筋線維のみを採取し、トリプシンによって筋衛星細胞を剥離し、ディッシュに播種した。播種後4日間は、増殖培地にて培養した。播種4日目にトリプシン処理によって剥離し、細胞数 $1.0 \times 10^5$ で再播種した。再播種から2日目に無血清培地に交換したのちに、筋衛星細胞に超音波刺激を与え、ELISA法を用いて培地中に分泌されたHGF量を測定した。

#### (3) 遺伝子改変が行いやすいマウスでの筋損傷モデルの作製

10週齢のC57BL/6J雄性マウスを用いた。小動物用足関節運動装置と電気刺激装置を用いて、イソフルランガス吸入麻酔下にてマウス足関節背屈筋群に、角速度200, 400, 800°/秒で伸張性収縮を行った。伸張性収縮時の足関節運動範囲は90°(背屈30°~底屈60°), 運動回数は50回(10回×5セット)とした。また、筋力の評価として、伸張性収縮を実施する前、伸張性収縮48時間後に、マウス下腿前面に経皮的に電気刺激を与えて、マウス足関節背屈筋群の最大等尺性背屈トルクを測定した。伸張性収縮実施前の最大等尺性背屈トルク値に対する、伸張性収縮48時間後の最大等尺性背屈トルク値の割合を算出し、トルク減少率とした。筋損傷の組織学的評価として、伸張性収縮24時間後にEvans Blue Dye (EBD)を腹腔内投与し、伸張性収縮48時間後に前脛骨筋を採取した。採取した筋を急速凍結し、凍結横断切片を作製した。さらに、Lamininの免疫蛍光染色を行い、筋腹横断面で観察される全筋線維数に対するEBD陽性筋線維数の割合を算出し、筋損傷量の組織学的評価とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 筋衛星細胞の増殖を促進する超音波刺激の最適条件

刺激強度の違いによる超音波刺激の効果を調べるために、超音波刺激を与えない群 (nonUS 群), 0.1 W/cm<sup>2</sup> の刺激強度, 0.5 W/cm<sup>2</sup> の刺激強度, 1.0 W/cm<sup>2</sup> の刺激強度の超音波刺激を与える群に分け, それぞれ超音波刺激後の EdU 陽性細胞数/総核数の割合を算出した. その結果, 照射時間率 20% の時では, EdU 陽性細胞数/総核数が nonUS 群では 22.3 ± 2.8%, 0.1 W/cm<sup>2</sup> では 25.9 ± 2.0%, 0.5 W/cm<sup>2</sup> では 28.9 ± 1.9%, 1.0 W/cm<sup>2</sup> では 30.4 ± 5.9% であった. 0.5 W/cm<sup>2</sup>, 1.0 W/cm<sup>2</sup> では, nonUS に比べ有意に大きかった (図 1A).

超音波刺激を与えない群 (nonUS 群), 10% の照射時間率, 30% の照射時間率, 50% の照射時間率の超音波刺激を与える群に分け, それぞれ超音波刺激後の EdU 陽性細胞数/総核数の割合を算出した. その結果, nonUS 群では 19.2 ± 2.5%, 10% の照射時間率では 20.0 ± 0.8%, 30% の照射時間率では 24.2 ± 3.3%, 50% の照射時間率では 26.3 ± 1.7% であった. 50% の照射時間率で超音波刺激を行った群では nonUS 群に比べ有意に大きかった (図 1B).

よって, 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果を, 刺激強度や照射時間率の大きさと比較すると, より刺激強度が高く, 照射時間率の大きい方が筋衛星細胞の増殖促進効果が高い傾向がみられた.

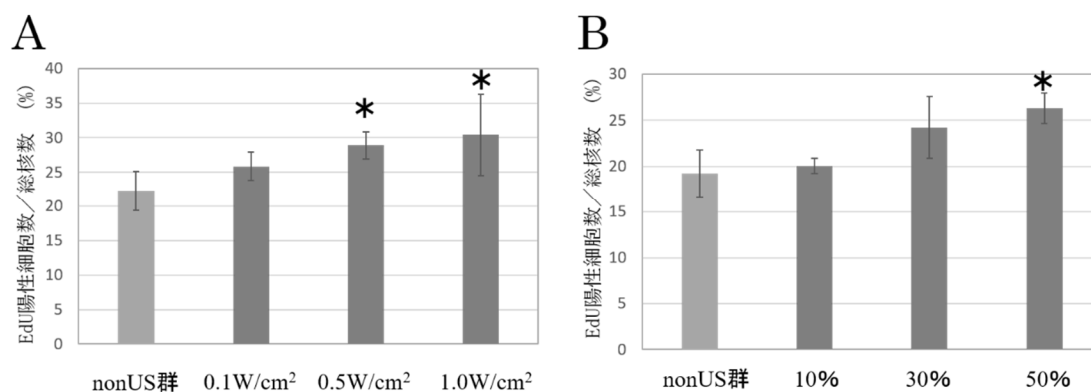


図 1. 超音波刺激の刺激強度, 照射時間率の違いによる筋衛星細胞の増殖率

A のグラフは, 異なる刺激強度で超音波刺激を行ったときの筋衛星細胞の増殖率を示す. B のグラフは, 異なる照射時間率で超音波刺激を行った時の筋衛星細胞の増殖率を示す. 数値は平均 ± 標準偏差で示す.

\* p < 0.05 vs nonUS 群

##### (2) 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖に HGF が関与しているかどうかの検証

超音波刺激によって培地に含まれる HGF の増加はみられなかった.

##### (3) 遺伝子改変が行いやすいマウスでの筋損傷モデルの作製

筋腹横断面で観察される全筋線維数に対する EBD 陽性筋線維数の割合は, 角速度 100°/秒で LC を行った筋が 0%, 200°/秒が 2.0 ± 0.5%, 400°/秒が 10.5 ± 4.2%, 800°/秒が 16.2 ± 7.5% だった. 一方, トルク減少率は, 角速度 100°/秒で LC を行った筋が 67.4 ± 6.4%, 200°/秒が 48.1 ± 11.1%, 400°/秒が 34.2 ± 15.3%, 800°/秒が 28.0 ± 13.2% だった. マウス前脛骨筋に対する LC では, 角速度の大きさに伴い, 損傷筋線維数が増加することが分かった. ただ, ラット足関節背屈筋群に対する角速度 200°/秒の LC では, EBD 陽性筋線維数の割合が約 15% であったのに対し, マウスを用いた本研究におけるその割合は, 約 2% であったことから, 動物種により筋損傷量が異なることが考えられた. また, 最大等尺性収縮トルクにおいて, 角速度や損傷量との関係性が見いだせなかった. 今後, トルク測定時の条件や精度を精査し, 理学療法効果を検証するのに適した筋損傷モデルマウスを作製できる条件を, さらに検証していく必要がある.

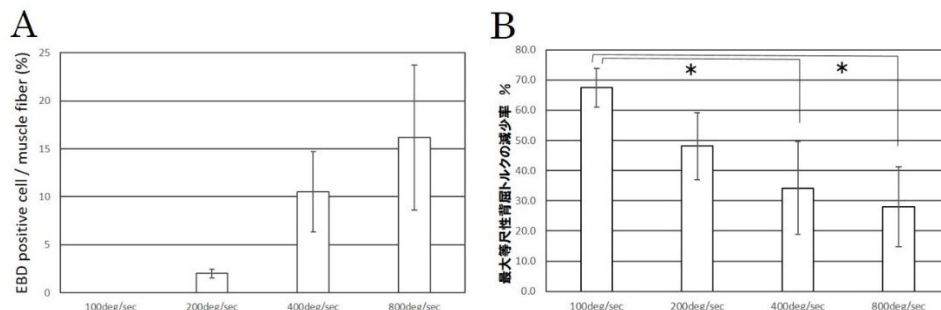


図 2. 伸張性収縮の角速度と筋損傷量, 筋力低下

A のグラフは, 異なる角速度で伸張性収縮を行ったときの筋損傷量を示す. B のグラフは, 異なる角速度で伸張性収縮を行った時の筋力低下を示す. 数値は平均 ± 標準偏差で示す.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 縣 信秀, 清島 大資, 伊東 佑太	4. 巻 第10巻
2. 論文標題 超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果 - 超音波刺激条件による効果の違い -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 常葉大学保健医療学部紀要	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 清島 大資, 縣 信秀	4. 巻 第9号
2. 論文標題 超音波照射による培養骨格筋細胞の肥大効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 愛知医療学院短期大学紀要	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 清島 大資, 縣 信秀	4. 巻 第9号
2. 論文標題 超音波照射による培養骨格筋細胞の肥大に自己分泌/傍分泌が関与する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 愛知医療学院短期大学紀要	6. 最初と最後の頁 24-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川島 隆史, 紀 瑞成, 縣 信秀, 伊東 佑太, 笹井 宣昌, 濱田 文彦, 河上 敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮が骨格筋内リンパ管分布に与える影響
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saho Morishita, Kazuya Hokamura, Akira Yoshikawa, Nobuhide Agata, Kazuo Umemura, Yoshihiro Tsutsui, Tatsuro Kumada
2. 発表標題 Effect of different exercises on the differentiation of neural stem cells and motor recovery in rats with motor cortex infarction
3. 学会等名 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 縣 信秀, 森 友洋, 清島 大資, 伊東 佑太, 木村 菜穂子, 河上敬介
2. 発表標題 マウス足関節背屈筋群の伸張性収縮による筋損傷モデルの開発
3. 学会等名 コ・メディカル形態機能学会第18回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 縣 信秀, 清島 大資, 伊東 佑太, 木村 菜穂子, 宮津 真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 異なる超音波刺激条件による筋衛星細胞の増殖促進効果
3. 学会等名 第27回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 縣 信秀, 森 友洋, 清島 大資, 伊東 佑太, 木村 菜穂子, 宮津 真寿美, 河上敬介
2. 発表標題 マウス足関節背屈筋群の伸張性収縮による筋損傷量は角速度に依存する
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019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	伊東 佑太  (ITOH Yuta)  (30454383)	名古屋学院大学・リハビリテーション学部・准教授   (33912)	
研究 分担者	清島 大資  (KIYOSHIMA Daisuke)  (80756370)	愛知医療学院短期大学・理学療法専攻・准教授   (43949)	