

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10756

研究課題名（和文）低出力超音波療法が筋再生に及ぼす影響とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Effect of low-intensity ultrasound therapy on muscle regeneration and elucidation of mechanisms of ultrasound therapy.

研究代表者

坂本 美喜（Sakamoto, Miki）

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40365177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋は再生可能な組織であるが、重度な筋損傷をうけると再生が遅延し運動機能が低下する。低出力超音波療法（LIPUS）は、機械的刺激を加えることにより創傷治癒促進を図る治療法である。筋損傷に対しては実施条件が様々であるが、一定の効果が示されていない。そこで本研究では、筋損傷に対するLIPUSの有効性について、動物を用いて検討した。LIPUS照射条件は、先行研究より高く設定した。その結果、損傷7日後のLIPUS照射群で筋横断面積が大きくなる傾向が見られた。さらに機械的刺激に関与するシグナル伝達分子についても解析したが、LIPUSの有無で差が見られず、作用機序について明らかにできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋損傷は、スポーツ外傷や外科的手術後等、多くの疾患に共通する傷害である。骨格筋は、再生能力を有するが重度な損傷では再生が遅れ、筋内に癒痕組織が残存して運動機能の低下に繋がることから、筋再生を促進する治療が必要となる。本研究では、低出力超音波療法の効果について明らかな所見は示せなかったが、形態的变化が生じる傾向があった。低出力超音波療法は、我々理学療法士が臨床において実施可能な治療であり、使用方法も簡便である。また治療に伴う副作用や合併症もきわめて少ない。今後、適切な実施方法や有効性が示すことが出来れば、薬物療法が困難な対象者も含めて幅広い症例に適用できる治療として、発展するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle has regeneration ability, but when severe muscle damage occurs, regeneration is delayed and decreased motor function. Therefore, minimizing the extent of injury and promoting muscle regeneration is necessary to restore muscle function. Low-intensity ultrasound therapy (LIPUS) is a therapeutic method that applies mechanical stimulation to promote wound healing. There are various LIPUS exposure conditions for muscle damage, however, no consensus has been reached regarding its efficacy, and the mechanism behind the effect of LIPUS. Based on these findings, in order to verify the effectiveness of LIPUS on muscle injury using animal model. Regarding LIPUS exposure condition, we set that it was higher than previous studies. Experiment showed cross-sectional area tended to increase at 7 days after injury with LIPUS exposure. However, it seems that LIPUS exposure does not affect for signal transduction. The mechanisms of behind effect of LIPUS remains unclear.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：リハビリテーション 物理療法 筋再生

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は再生能力を有するが、重度な損傷を受けると再生が遅延し筋内に癒痕組織が残存する。癒痕組織の残存は運動機能の低下につながるため、筋再生を促進して早期治癒を図ることが重要である。低出力パルス超音波療法 (low-intensity pulsed ultrasound: LIPUS) は、超音波により発生する機械的な刺激を組織 (細胞) に加えることで、種々の成長因子の増加やシグナル伝達系の活性化を促し、治癒促進を図る治療法である。臨床では骨折や腱損傷に対して積極的に使用されている。一方、筋損傷に対する LIPUS の効果検証は、組織学的・生理学的評価を主体に行われているが、照射条件も様々であり、また有効とする報告と無効とする報告が混在する。また作用機序についても不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

(1)照射条件の設定と筋再生促進効果の検証：筋損傷に対する LIPUS 照射は、照射条件が統一されておらず、このことが LIPUS の効果に相違がでる要因として指摘されている。超音波は、タンパク質を多く含む組織においてその吸収率が高く、水分を多く含む組織での吸収率は低いという特性をもつ。筋は骨や腱に比較し水分を多く含むため、我々は先行研究よりも LIPUS の照射強度を高く設定し、筋再生の促進効果を検証した。

(2)作用機序の解明：LIPUS 照射の効果を検討するうえで、その作用機序の解明も重要である。LIPUS 照射の作用機序に関する研究は、細胞を用いた実験が主体であり、生体を用いた研究はほとんど行われていない。LIPUS は機械的刺激であることから、今回の研究では機械的刺激において活性化されるシグナル伝達系に着目した。軟骨細胞や滑膜細胞を用いた実験では、インテグリンや接着斑キナーゼ (FAK) を介して、PI3K-Akt 経路や MAPK 経路が活性化されたことが報告されていたことから、骨格筋においても、LIPUS 照射により PI3K-Akt 経路が活性化されるかどうかを検証した。また、損傷部位で増殖した細胞が、筋へと分化しているのかどうか、筋分化マーカーを用いて調査した。

LIPUS は、我々理学療法士が臨床において実施可能な治療であり、使用方法も簡便である。また治療に伴う副作用や合併症もきわめて少ない。LIPUS の有効性や作用機序について明らかにすることが出来れば、将来、新たな治療法として、多くの症例に対して適用できるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)実験動物：実験動物は、12 週齢の ICR 系雌マウスとし、筋損傷のみを与えた群 (non-LIPUS 群) と筋損傷後に LIPUS を照射した群 (LIPUS 群) の 2 群に分けた。筋損傷は、麻酔下にて左前脛骨筋にカルジオトキシン (100uI ; 10 μM) を注射針で注入して作成した。

(2)LIPUS 条件：超音波照射には、超音波治療器 (US-750, 伊藤超短波) を用いた。照射条件は、条件 A として周波数 3MHz, 強度 0.5W/cm², 照射時間率 50%, および照射時間 10 分に設定し、条件 B として周波数 1MHz, 強度 0.6W/cm², 照射時間率 50%, および照射時間 5 分とした。筋損傷後 2 時間経過後に 1 回目の照射を行い、損傷後 24 時間に 2 回目の照射を実施した。その後も 24 時間毎に 1 回/日、筋採取の前日まで毎日照射した。なお、non-LIPUS 群には照射量を 0 にして、同様の操作を行った。

(3)解析方法：横断面積の解析は、損傷後 7 日で検討した。採取筋は凍結固定を行ったのち厚さ 10 μm の横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色および免疫組織化学染色 (抗デスミン抗体) を実施した。そしてデスミン陽性で筋中央に核のある再生筋線維について、横断面積を測定した。シグナル伝達系に関する解析は、損傷後 3 日と 5 日の筋において実施した。Akt, mTOR, p70S6K のリン酸化比を、Western blotting 法を用いて測定した。統計学的解析には、対応のない t 検定を用い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

本実験では、カルジオトキシン注入による筋損傷モデルを作成し、LIPUS の筋損傷に対する治癒促進効果を調査した。

(1)照射条件の確認

照射条件は、条件 A として周波数 3MHz, 強度 0.5W/cm², 照射時間率 50%, 照射時間 10 分に設定し、条件 B は周波数 1MHz, 強度 0.6W/cm², 照射時間率 50%, 照射時間 5 分に設定した。超音波療法は、照射量が高い場合、生体内で熱が発生し、機械的刺激ではなく温熱刺激となる。そのため、条件 A, B ともに照射部位の筋温の上昇がないかを確認した。その結果、両条件とも筋温の上昇は 1 以内であり、機械的刺激のみを与えることが出来ることを確認した。

(2)筋横断面積への影響

まず照射量の多い条件 A にて実施した。損傷 7 日後で観察した結果、LIPUS 群において non-LIPUS 群よりも筋横断面積が大きくなる傾向が見られたが有意差はなかった (p=0.06)。損傷 14 日においても LIPUS 照射の有無による差はみられなかった (p=0.17)。条件 B では、筋損傷 7 日のみ解析を実施したが、LIPUS の影響は認められなかった (p=0.4) (図 1)。これらの結果から、有意差は認められないものの、エネルギー照射量の多い条件のほうが LIPUS の効果が得られる可能性が示唆された。

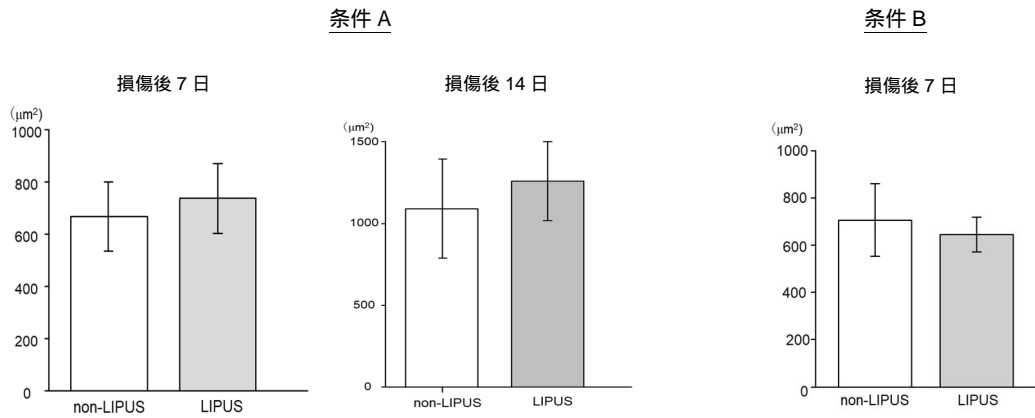


図 1. LIPUS の有無による筋横断面積の比較

(3)筋分化マーカー (myogenin) の発現

筋再生の促進効果について、筋分化マーカーである myogenin の発現から検証した。損傷 3 日後では non-LIPUS 群に比較して LIPUS 群での発現は 1.4 倍と高くなったが有意差は認めなかった。5 日後では 0.9 倍になっており、3 日・5 日のどちらの時期も LIPUS による影響は明らかではなかった(図 2)。

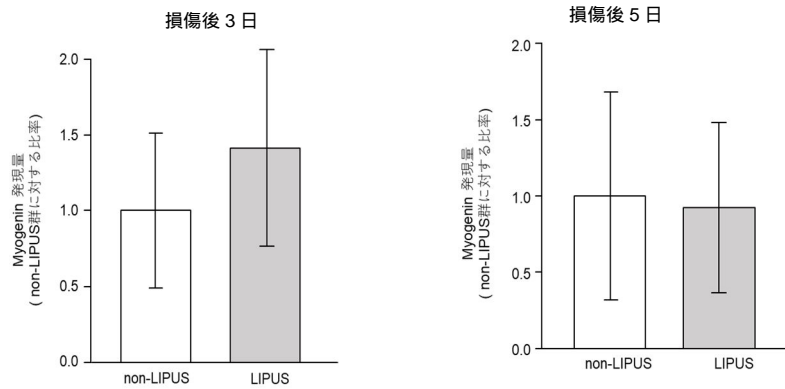


図 2. LIPUS の有無による myogenin 発現の比較

(4)筋肥大に関するシグナル伝達経路の解析：

損傷後 3 日と 5 日において、タンパク質合成に関与するシグナル伝達因子(Akt, mTOR, p70S6K)を解析した。損傷後 3 日、5 日ともに、LIPUS 群と non-LIPUS 群では有意な差は認められなかった(図 3、4)。

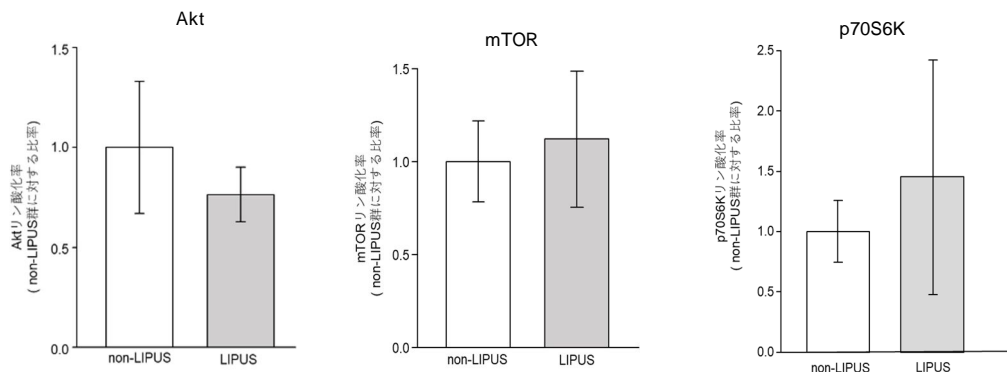


図 3. LIPUS の有無による Akt, mTOR, および p70S6K リン酸化率の比較 (損傷後 3 日)

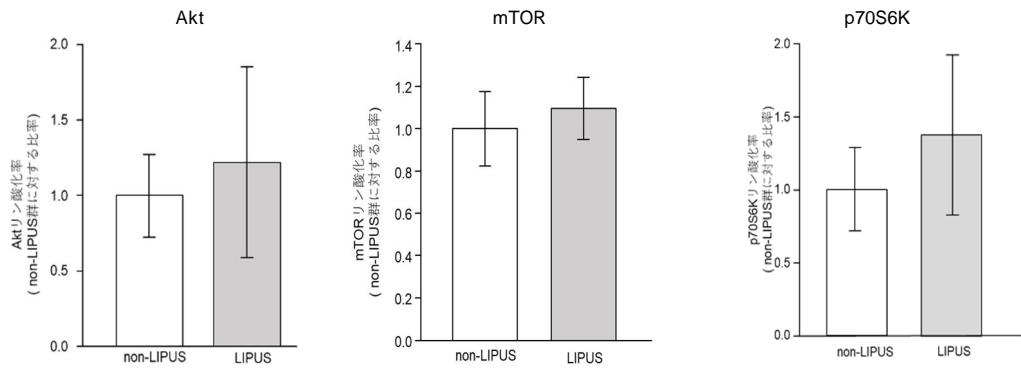


図 4. LIPUS の有無による Akt, mTOR, および p70S6K リン酸化率の比較 (損傷後 5 日)

筋横断面積の解析結果から、LIPUS 照射量が高いほうが筋再生を促進する効果を得やすい傾向がみられた。シグナル伝達系に関する解析では LIPUS の有無で有意差がなく、作用機序について明らかにできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sakamoto M | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Effect of Physical agents on muscle healing with a focus on animal model research | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Phys Ther Res | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1298/ptr.R0011 | 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4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sakamoto M, Nakamura A, Yona M, Muro M, Tadano C, Matsunaga A, |
| 2. 発表標題 The effects of low-intensity pulsed ultrasound exposure on the Akt/mTOR signaling pathway after cardiotoxin-induced muscle injury in a mouse model. |
| 3. 学会等名 The 24th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sakamoto M, Onaga N, Yona M, Muro M, Tadano C |
| 2. 発表標題 Effects of long-term low intensity exercise on oxidative capacity in aged rat muscles. |
| 3. 学会等名 The 23th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sakamoto M, Nakamura A, Yona M, Muro M, Tadano C, Matsunaga A |
| 2. 発表標題 The effects of low-intensity pulsed ultrasound exposure on the Akt/mTOR signaling pathway after cardiotoxin-induced muscle injury in a mouse model. |
| 3. 学会等名 The 24th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 坂本美喜 |
| 2. 発表標題 物理的刺激と筋再生の関連 |
| 3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022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 | 只野 ちがや (Tadano Chigaya) (40261094) | 東邦大学・医学部・講師 (32661) | |

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 |
|---------|---------|