

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：43949

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11431

研究課題名(和文)超音波刺激による筋損傷からの回復促進にマクロファージは必要か？

研究課題名(英文)Are Macrophages Necessary for Promoting Recovery from Ultrasound-Stimulated Muscle Damage?

研究代表者

木村 菜穂子(KIMURA, Nahoko)

愛知医療学院短期大学・理学療法学専攻・講師

研究者番号：00544751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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、超音波刺激によって筋衛星細胞が増殖されるかどうか、超音波によってマクロファージから分泌が促進される因子で筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証した。また、筋損傷モデルマウスを用いて、超音波刺激による筋損傷からの回復促進効果を検討した。その結果、超音波刺激による筋衛星細胞の増殖促進効果がみられたものの、マクロファージから分泌促進される因子の同定はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超音波刺激によって筋損傷からの回復が促進することは、いくつか報告されている。しかし、その分子メカニズムまで迫ったものはない。また、多くは筋衛星細胞の活性化に着目しており、マクロファージに着目しているものも少ない。一方、マクロファージの機能については、貪食作用のみではなく、他の細胞を活性化するなどの免疫学的微小環境を調節するという新しい知見が多く報告されている。本研究は、超音波刺激による筋損傷からの回復促進にマクロファージが関与しているのか、またその分子メカニズムを解明する試みであった。本研究の成果は、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と考える。

研究成果の概要(英文)：Early recovery of muscle damage is an important task for rehabilitation. Ultrasound is fully expected as a tool to promote recovery from muscle damage, but it has little scientific basis. Therefore, it is necessary to clarify the mechanism of recovery from muscle damage. In this study, we examined whether the proliferation of muscle satellite cells is promoted by ultrasonic stimulation, and whether the factors that promote secretion from macrophages by ultrasonic waves promote the proliferation of muscle satellite cells. We also investigated the effect of promoting recovery from muscle damage caused by ultrasonic stimulation using muscle damage model mice. As a result, although the proliferation promoting effect of muscle satellite cells by ultrasonic stimulation was observed, the factor that promotes secretion from macrophages could not be identified.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋損傷 超音波 マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超音波刺激によって筋損傷からの回復は促進される。しかし、その効果の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

筋損傷を受けた患者が、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。これまでに実験系モデル研究で、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によるものだと言われている。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少ない。そこで我々は、遠心性収縮による筋損傷モデルラットを用いて、損傷 2 時間後に 10 分間の超音波刺激を 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。一方、近年の研究から、筋再生は炎症性細胞、筋衛星細胞、筋細胞の間での複雑な **cross-talk** によって生じていることが明らかになってきている。筋損傷の初期において、マクロファージや好中球による貪食作用は周知のことであるが、一部のマクロファージは、筋前駆細胞の供給や筋衛星細胞の活性化に寄与するケモカインやサイトカインを分泌する抗炎症性マクロファージへ分化する。以上のことからマクロファージは、筋再生に重要な役割を担っていると考えられ、超音波刺激がマクロファージを活性化するかどうかは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、筋衛星細胞、マクロファージの初代培養細胞を用いて、超音波刺激がマクロファージに及ぼす影響を検証し、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を目的とした。そのために、以下の 3 つの研究を行った。

- (1) 超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証する。
- (2) 超音波刺激によってマクロファージから分泌が促進される因子で筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証する。
- (3) 筋損傷モデルマウスを用いた超音波刺激による筋損傷からの回復促進メカニズムの解析

3. 研究の方法

- (1) 超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証する。

C57BL/6J 雄性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 1.0×10^5 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** ($10 \mu\text{M}$) 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/cm²** 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/cm²**、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) 超音波刺激によってマクロファージから分泌が促進される因子で筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証する。

C57BL/6J 雄性マウスの腹腔から、腹腔マクロファージを回収した。マウス腹腔内にマクロファージ誘因物質 (チオグリコレート培地) を投与し、3 日間飼育した。頸椎脱臼後、腹腔内に **5ml** の **PBS** を注入し、腹部をマッサージし、**PBS** を回収した。回収した細胞懸濁液を遠心し、ペレットをディッシュに播種し、腹腔マクロファージを培養した。培養したマクロファージに対して、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。超音波刺激を加えた培地を用いて、**ELISA** 法により **HGF** の測定を行った。

- (3) 筋損傷モデルマウスを用いた超音波刺激による筋損傷からの回復促進メカニズムの解析

8 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 **800** °/秒で伸張性収縮を行い、前脛骨筋の筋損傷モデルを作製した。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 150 回とした。伸張性収縮 2 時間後に下腿前面に対して超音波治療器 (UST-750, 伊藤超短波) を用いて, 刺激強度 0.5 W/cm², 照射時間率 50%, 周波数 3MHz, 10 分間の超音波刺激を行った。筋損傷からの回復の評価として, 筋力を測定した。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, 筋力とした。

4. 研究成果

(1) 超音波刺激によって筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証する。

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/cm² の刺激強度, 0.5 W/cm² の刺激強度, 1.0 W/cm² 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/cm² では 25.9 ± 2.0%, 0.5 W/cm² では 28.9 ± 1.9%, 1.0 W/cm² では 30.4 ± 5.9% であった。0.5 W/cm², 1.0 W/cm² 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。

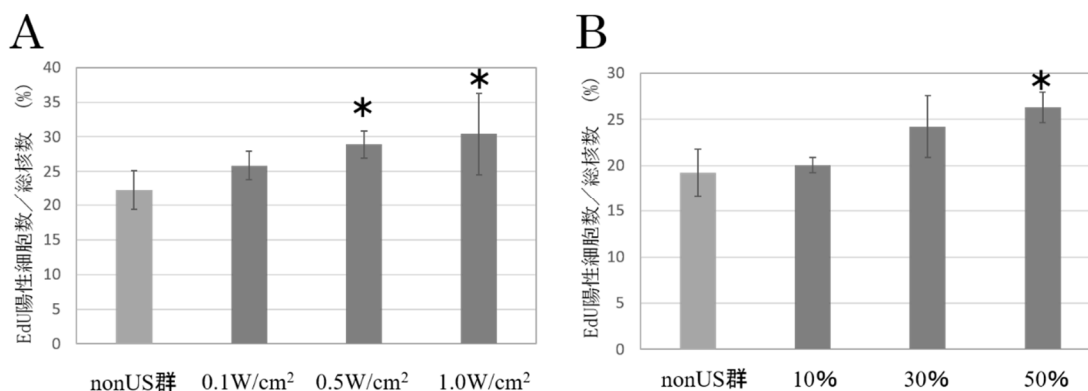


図 1. 超音波刺激の刺激強度, 照射時間率の違いによる筋衛星細胞の増殖率

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) 超音波刺激によってマクロファージから分泌が促進される因子で筋衛星細胞の増殖が促進されるかどうかを検証する。

培養したマクロファージに超音波刺激を行い, その培地に分泌される因子を同定するために, ELISA 法により HGF の検出を行ったが, HGF の増加は観察されなかった。

(3) 筋損傷モデルマウスを用いた超音波刺激による筋損傷からの回復促進メカニズムの解析

まず, 伸張性収縮による筋損傷モデルマウスの作製を試みた。伸張性収縮の角速度と筋損傷量, 筋力低下の関係性を明らかにするために, 角速度 200, 400, 800°/秒で伸張性収縮を行った。その結果, 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 (図 2)。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。

次に, 800°/秒で伸張性収縮を行った筋損傷モデルマウスに対して, 超音波刺激を行い, 経時的に足関節の最大等尺性背屈トルクを測定した。その結果, LC 群, LC+US 群ともに伸張刺激 2 日 ~ 10 日後までは CON 群に比べ低い値を示していたが, 徐々に回復していった (図 3)。しかし, まだ比較する数が少ないため, さらに検証していく必要があると考える。

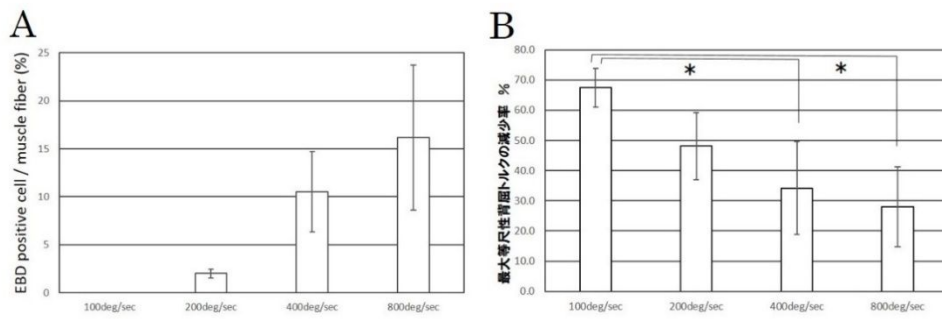


図 2 . 伸張性収縮の角速度と筋損傷量，筋力低下
A のグラフは，異なる角速度で伸張性収縮を行ったときの筋損傷量を示す . **B** のグラフは，異なる角速度で伸張性収縮を行った時の筋力低下を示す . 数値は平均 ± 標準偏差で示す .

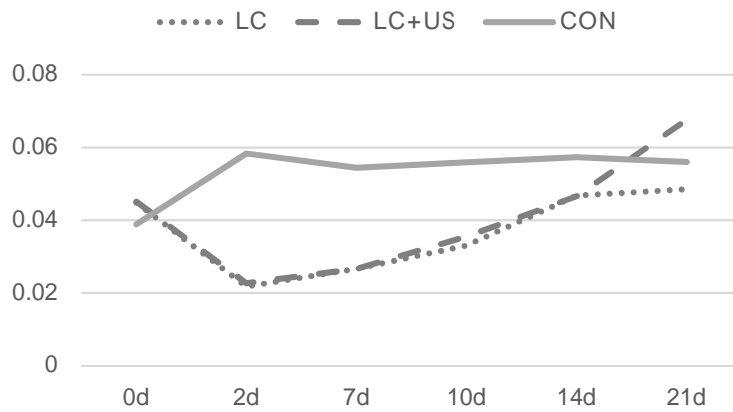


図 3 . 損傷筋に対する超音波刺激の効果-筋力-
 グラフは，伸張性収縮後に超音波刺激を与えた時の足関節の最大等尺性背屈トルクを示す .

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 0件）

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回学術大会
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	縣 信秀 (AGATA Nobuhide) (00549313)	常葉大学・保健医療学部・准教授 (33801)	

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	清島 大資 (KIYOSHIMA Daisuke) (80756370)	東海大学・医学部・講師 (32644)	

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