

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11294

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Analysis of muscle injury recovery promotion mechanism by ultrasonic stimulation using muscle injury model mice

研究代表者

縣 信秀（Agata, Nobuhide）

常葉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：00549313

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）：超音波は筋損傷からの回復を促進する刺激として十分に期待されるが、科学的根拠が乏しい。筋再生は免疫細胞、筋衛星細胞、筋細胞の間での複雑なクロストークによって生じていることが明らかになっているが、超音波刺激との関係についてはわかっていない。そこで本研究では、マウスで筋損傷モデルを作製し、超音波刺激が筋衛星細胞、筋細胞、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メカニズムについて検証した。その結果、マウスで筋損傷モデルを作製することができた。さらに、超音波刺激により筋衛星細胞の増殖が促進されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋損傷に対する理学療法は経験則に基づいて行われていることが多い。一方、超音波治療は一般的な物理療法機器であり、多くの病院などに設置されている。よって、超音波刺激による筋損傷からの回復の分子メカニズムが明らかになれば、科学的根拠に基づく効果的・効率的な筋損傷に対する治療が、多くの医療現場で提供することができるようになる。本研究は、マウスの筋損傷モデルを作製し、それを用いて超音波刺激による筋損傷から回復促進の分子メカニズムを解明する試みであった。よって本研究の成果は、筋損傷に対する科学的根拠に基づく理学療法の開発に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：Ultrasound is expected to be a stimulus that promotes recovery from muscle injury, but the scientific evidence is lacking. It has been clarified that muscle regeneration is caused by complex crosstalk among immune cells, satellite cells, and muscle cells, but the relationship with ultrasound stimulation is unknown. Therefore, in this study, we created a muscle injury model in mice and verified the effects of ultrasonic stimulation on muscle satellite cells, muscle cells, and macrophages, and investigated the mechanism of promoting recovery from muscle injury. As a result, we were able to create a muscle injury model in mice. Furthermore, we found that ultrasound stimulation promoted the proliferation of muscle satellite cells.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋損傷 マウス 超音波刺激

1. 研究開始当初の背景

筋損傷が生じると患部に痛み、腫脹、機能障害が生じる。これらの症状が長期となれば廃用による全身的な機能不全へと繋がる。そのようなならないためにも、できるだけ早く筋損傷を回復させる必要がある。しかし、筋損傷に対する理学療法は、経験則に頼るところが多く、それらの効果の有無も科学的に証明されているわけではない。よって、筋損傷を早期に回復させる理学療法の開発やそのメカニズムを明らかにすることは、社会的に重要な課題である。

これまで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ているが、詳細な効果を検証した報告は少ない。近年の研究から、筋再生は免疫細胞、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。しかし、超音波刺激による筋損傷からの回復促進に、これらの細胞間 Cross-talk がどのように関わりあっているかはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子組み換えが行いやすいマウスで筋損傷モデルを作製し、超音波刺激が筋衛星細胞、筋細胞、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である。

そのために、以下の研究を行った。

遺伝子改変が行いやすいマウスで筋損傷モデルを作製する

筋衛星細胞の超音波刺激による細胞応答の解析

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

遺伝子改変が行いやすいマウスで筋損傷モデルを作製する

C57BL/6 雄性マウスを用いて、マウスの前脛骨筋に対して伸張性収縮 (Lengthening Contraction; LC)を行うことで筋損傷モデルマウスを作製した。イソフルランガス吸入麻酔 (濃度 1.5%, 大日本製薬) 下に左前脛骨筋に対して LC を加えた。LC は、その条件設定を正確に調整できる小動物用足関節運動装置 (NDH-1; Bio Research Center, Co., Ltd.) を用いて、角速度を 100, 200, 400, 800 にそれぞれ設定して加えた。マウスは側臥位で寝かせ、体幹と大腿部は装置の固定用ベッドに固定した。次にマウス外側からの観察で、腓骨外果から 2 mm 前方の位置に回転軸としてトルクセンサーの軸を合わせ、足部を足底板に固定した。そして、直径 3mm の表面電極を左下腿前外側面に貼り付け、電気刺激装置 (SEN-3301; Nihon Kohden Corp.) により定電圧の電気刺激 (electronic current 5 mA, stimulation frequency 100 Hz, duration 1 ms) を前脛骨筋に与えて収縮させた。電気刺激開始から 200 msec 後に装置のモーターが回転し、足関節を他動的に底屈方向へ運動させた。なお、LC 中の運動範囲を正確に測定できるように 3つの軸 (大腿軸: 第三転子と大腿外側顆を結ぶ線, 下腿軸: 腓骨頭と腓骨外果を結ぶ線, 足部軸: 第 5 中足骨に沿った線) を設定した。これらの軸を基本として、運動開始時の膝関節の成す角度は 90 deg, 足関節の成す背屈角度は 90 deg とし、そこから足関節を 90 deg 底屈させた。また、収縮回数は 10 回を 1 セットとして 5 セット行った。収縮と収縮の間は 10 sec 休憩させ、セット間は 60 sec 休憩させた。この運動中の足関節に加わるトルクは、トルクセンサーで測定した。

損傷前後の筋力を評価するために、伸張性収縮前と 48 時間後に等尺性収縮時の最大等尺性背屈トルクを測定した。また、組織損傷量を評価するために伸張性収縮 24 時間後に Evans Blue Dye (EBD) を腹腔内投与し、48 時間後に前脛骨筋を採取し、全筋線維数に対する EBD 陽性数の割合を算出した。

筋衛星細胞の超音波刺激による細胞応答の解析

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．

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

遺伝子改変が行いやすいマウスで筋損傷モデルを作製する

100 deg/sec で LC を行った筋では EBD 陽性筋線維は観察されず 200 deg/sec で 2.0 ± 0.5%，400 deg/sec では 10.5 ± 4.2%，800 deg/sec では 16.2 ± 7.5% が EBD 陽性筋線維であった (図 1)．また足関節最大等尺性背屈トルクの減少率は，100 deg/sec で 67.4 ± 6.4，200 deg/sec で 48.1 ± 11.1%，400 deg/sec では 34.2 ± 15.3%，800 deg/sec では 28.0 ± 13.2% であった (図 2)．

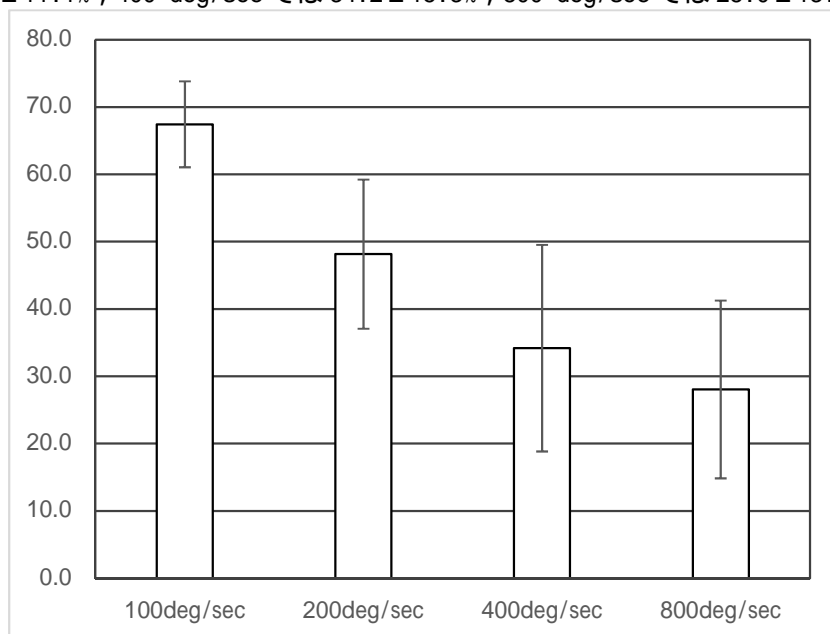


図 1．足関節最大等尺性背屈トルクの減少率 (2d/pre)

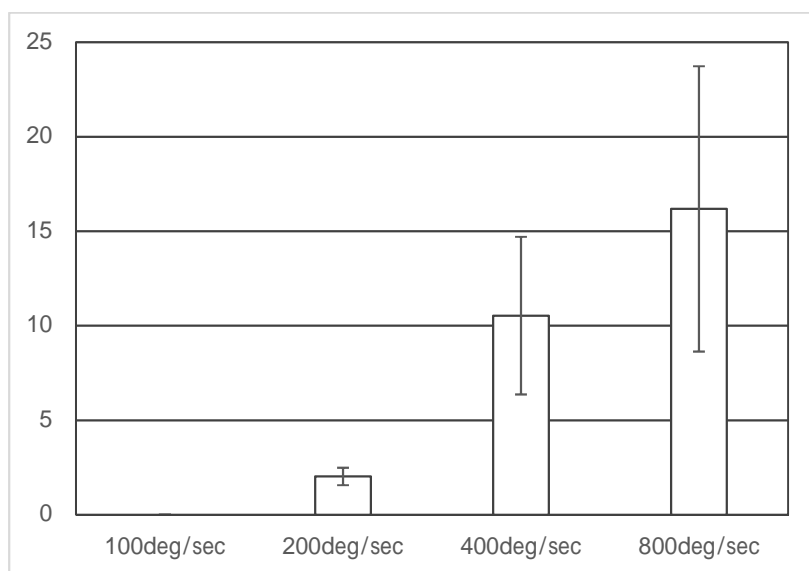


図 2．EBD 陽性筋線維/全筋線維

筋衛星細胞の超音波刺激による細胞応答の解析

刺激強度と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、異なる照射時間率(5%, 20%, 50% duty cycle)において、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5%の時には、すべての群において差がなかった(図3A)。

また、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3B)。

一方、照射時間率50%の時では、EdU陽性細胞数/総核数がnonUS群では12.5±2.8%, 0.1 W/cm²では16.2±2.0%, 0.5 W/cm²では17.3±1.9%, 1.0 W/cm²では18.8±1.5%であった。0.1 W/cm², 0.5 W/cm², 1.0 W/cm²では、nonUSに比べ有意に大きかった(図3C)。

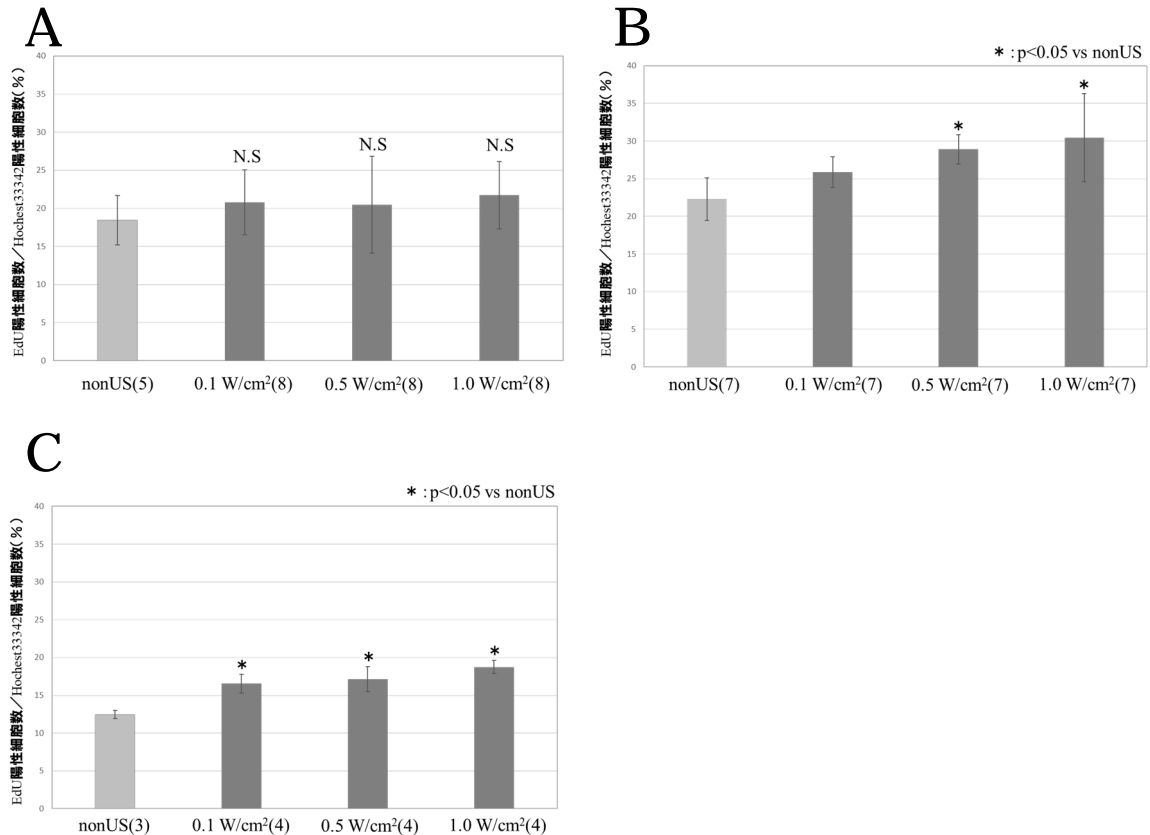


図3. 超音波刺激強度と筋衛星細胞の増殖率

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

800 deg/sec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、14日以降回復していった(図4)。

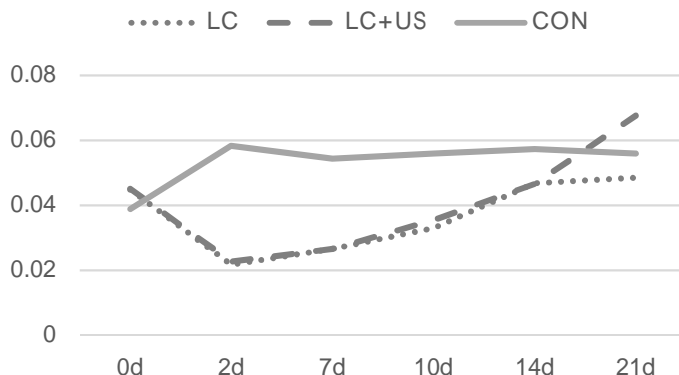


図4. 損傷筋に対する超音波刺激の効果

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 田村悠磨, 川島隆史, 紀瑞成, 縣信秀, 伊東佑太, 河上敬介
2. 発表標題 筋損傷後のリンパ管は毛細血管よりも早く変化する
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東 佑太, 吉岡 潔志, 田村 悠磨, 縣 信秀, 清島 大資, 河上 敬介
2. 発表標題 筋力トレーニングによる筋萎縮回復促進効果への筋衛星細胞取り込みの関与
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清島大資, 平田宏聡, 勝田紘基, 小林剛, 縣信秀, 伊東佑太, 木村菜穂子
2. 発表標題 培養筋管形成における -アクチニンの役割の検討
3. 学会等名 第2回日本物理療法研究会学術大会
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	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)	

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