

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11238

研究課題名(和文) マクロファージの生体内・生体外動態解析による筋再生に有用な寒冷・温熱療法の探索

研究課題名(英文) Icing or thermal stimuli for skeletal muscle regeneration via macrophage dynamics in vivo, in vitro

研究代表者

荒川 高光 (Takamitsu, Arakawa)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：90437442

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)：挫滅損傷で使用していた従来の500g重錘付き鉗子を250gに変えたところ、筋損傷の程度を限局することに成功した。本モデルを「軽度筋損傷モデル」とし、本モデルにおいて損傷後のアイシングの影響を見た。「軽度筋損傷モデル」に対しアイシングを施したところ、再生筋線維の横断面積が増加し、アイシングによって筋再生を促進できていると明らかになった。本成果は、動物実験においてアイシングが筋再生を促進できることを示した初めての研究成果である。さらに、「軽度筋損傷モデル」を用いアイシングプロトコルの影響を見たところ、アイシングを最も多く実施した9回実施群において筋再生が促進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「軽度筋損傷モデル」におけるアイシングで筋再生が促進したという成果は、動物実験においてアイシングが筋再生を促進できることを示した初めての研究成果である。本成果は共同通信から「アイシング、軽いけがに有効 重いと回復障害、神戸大」という記事して取り上げられ、各新聞がそれを取り上げ、高く評価された。またアイシングによって筋再生を促進できるモデルにおいて、アイシングプロトコルによって筋再生が影響されていたことも初めて示すことができ、今後の応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Previous studies performing the injury method used a weight of 500 g. Crushing of the muscle using a weight of 500 g induced necrosis in 20.9% ± 1.4% of myofibers. A weight of 250 g to crush the muscle led to more limited muscle damage, causing necrosis in only 4.0% ± 0.5% of myofibers. We named this model the “mild injury” model. Icing after muscle injury in this model resulted in an enlarged size of regenerating myofibers compared with those in untreated animals. This is believed to be the first study in the world to show the benefits of icing on muscle repair. In addition, using this ‘mild injury’ model, we examined the effect of icing protocol on skeletal muscle regeneration. In 9 times applying icing group, regenerating myofibers showed a significant increase.

研究分野：理学療法学

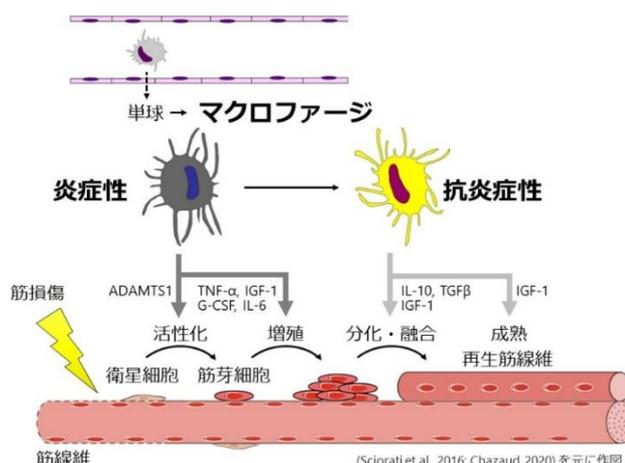
キーワード：骨格筋 マクロファージ アイシング 再生 動物実験

1. 研究開始当初の背景

(1) 激しい運動や外傷によって起こる骨格筋損傷の急性期の対処は、スポーツ選手の選手生命を大きく左右するため重要な措置である (Warren et al., 2017; Greising et al., 2019)。骨格筋損傷に対し、患部への寒冷療法 (アイシング) が広く行われている。しかしながら、骨格筋損傷に対するアイシングを動物実験で検証した研究は非常に乏しく、治療効果や、筋再生を促進、阻害するメカニズムも十分に解明されていない。骨格筋損傷後急性期に起こる炎症は、発赤、腫脹、疼痛の発現とともに熱感を生じさせるため、アイシングはその熱を奪うことにより炎症を抑制させているのではないかと考えられる。炎症の抑制によって疼痛が減弱されれば、損傷後のパフォーマンスに良い影響を及ぼす可能性はある。事実、骨格筋損傷後のアイシングは疼痛を減弱できているようである。しかしながら近年、**骨格筋損傷急性期に起こる炎症は、筋再生において重要なプロセスであることが明らかになってきている** (e.g., Chazaud, 2016)。われわれの動物実験において、骨格筋挫滅損傷急性期の寒冷刺激を実施したところ、損傷後急性期の炎症を抑制することはできたが、損傷筋の再生過程が遅延し、筋再生を阻害していたことが明らかになった (Takagi et al., 2011; Miyakawa et al., 2020)。しかしながら、アイシングの刺激時間は現在臨床で行われている平均的なものを用いたものの、本実験で用いたプロトコルがどのように筋再生に影響していたのか、は未だ未解明のままである。

(2) 骨格筋損傷後のアイシングは、その**プロトコルが定まっていないため、プロトコルの違いによって、筋再生にどのような影響が出るのかまだわかっていない**。臨床現場でも、使用器具、開始時期、刺激時間、回数など様々であり (Bleakly et al., 2004)、有効なプロトコルは経験によって定められている状態と考えられる。動物実験で筋損傷後のアイシングの効果を見ているものにおいても、アイシングの方法は研究によって異なっているため (e.g., Takagi et al., 2011; Ramos et al., 2016)、アイシングのもたらす影響がアイシングのプロトコルによってどのように変わってしまうのかは明らかになっていない。

(3) 骨格筋損傷直後に与える温度刺激は、筋再生の最初期としての筋の壊死過程に影響している可能性が高い。よって**筋損傷の程度が変われば、温度刺激による効果も変わると考えられる**。本探索によって、従来のアイシングと同等のプロトコルであっても、筋再生を促進できる状況が作り出せる可能性が高い。



(4) 骨格筋再生時において**マクロファージは、炎症性から抗炎症性へと表現型を転換し、それぞれが筋再生に対し重要な役割を果たしている** (図1: Sciorati et al., 2016; Chazaud, 2020)。すなわち、筋損傷後のアイシングによる筋再生の阻害、遅延は、炎症性・抗炎症性マクロファージの筋再生を調節する機能と何らかの関係性があると考えられる。

論文

- 1) Warren et al. Sports Med. 2017 47(1): 41-59.
- 2) Greising et al. Tissue Eng Part B Rev. 2019 25(6): 510-525.
- 3) Chazaud. Immunol Cell Biol. 2016 94(2):140-5.
- 4) Takagi et al. J Appl Physiol (1985). 2011 110(2):382-8.
- 5) Miyakawa et al. Acta Histochem. 2020 122(3): 151511.
- 6) Bleakley et al. Am J Sports Med. 2004; 32(1): 251-61.
- 7) Ramos et al. Sci Rep. 2016; 6:18525.
- 8) Sciorati et al. Cell Death Differ. 2016 23(6): 927-37.
- 9) Chazaud. Trends Immunol. 2020 41(6):481-492.

2. 研究の目的

(1) 骨格筋損傷直後に与える温度刺激は筋の壊死過程に影響している可能性が高いため、筋損傷の程度を変えることによって、温度刺激による効果が変わると想定される。よって**本研究の第1の目的は、臨床で寒冷・温熱刺激が有用となる筋損傷程度を探索すること**である。そのために以下のことを明らかにしたいと考えた。

- ①温度刺激によって筋再生を促進できる筋損傷程度が存在するか否かを探索すること
- ②温度刺激によって筋再生が阻害できる筋損傷程度が判明した場合、その際のマクロファージ動態を解明すること

(2) 本研究の第2の目的は、骨格筋再生にとって有効な、損傷直後のアイシングプロトコルを解明することである。マクロファージの再生関連機能を温度刺激によって最適化・早期化することができるのではないかと考え、臨床で有用となる寒冷・温熱刺激条件を決定するために、以下のことを明らかにしたいと考えた。

- ①筋再生にとって有用なアイシングプロトコルを解明すること
- ②マクロファージによるサイトカインの分泌を、アイシングプロトコルによってどのように変えることができるのか、を探索すること

3. 研究の方法

(1) 目的1の探索のために、従来の筋損傷よりも損傷程度を小さくした、比較的軽度な挫滅損傷を実施した。

対象：8～10週齢 Wistar 系ラット、雄 (180～200g)

挫滅方法：長趾伸筋を露出させ、250g 重錘付き鉗子で圧挫損傷を加える。(補：従来の圧挫は 500g 重錘つき鉗子で行っていた)。

アイシング：先行研究で動物実験に実施していた方法と同様のアイシングを行った。具体的にはポリエチレンバッグにクラッシュアイスを入れ、30 分間のアイシングを 90 分間隔で 3 回行い、それを損傷直後から損傷 2 日後まで 3 日間繰り返した (計 9 回のアイシング)。

採取スケジュール：損傷後 1、2、3、5、7、14 日後に動物から長趾伸筋を採取した。

解析項目：10 μ m 厚の凍結切片を作成し、H-E 染色を施すほか、免疫組織化学を実施し、マクロファージの分類とその分布を解析した。また筋をホモジナイズして Western blotting にて iNOS 蛋白発現量を測定した。(補：iNOS 蛋白は炎症性マクロファージが主に出す一酸化窒素合成酵素であり、合成された一酸化窒素は筋を傷害させる)

統計解析：二元配置分散分析、Student の t 検定を実施。有意水準は 5%未満とした。

(2) 目的2を遂行するため、(1)で実施したものと同一筋損傷を用い、アイシングプロトコルを変えて筋再生程度の変化、およびマクロファージの動態を解析した。

対象：8～10週齢 Wistar 系ラット、雄 (180～200g)

挫滅方法：(1)と同様。すなわち長趾伸筋を露出させ、250g 重錘付き鉗子で圧挫損傷を加える。

アイシング：(1)と同様のアイシングを行うが、プロトコルによって 3 群に分類した。具体的にはポリエチレンバッグにクラッシュアイスを入れ、30 分間のアイシングを 90 分間隔で 3 回行い、それを損傷直後から損傷 2 日後まで 3 日間繰り返す、計 9 回のアイシングを行う群をまず設定し、さらに損傷直後に 1 回 30 分のアイシングを初回のみ行った群 (アイシング 1 回)、1 回 30 分間のアイシングを損傷直後から損傷 2 日後まで 3 回繰り返した群 (アイシング 3 回) の 3 群を、麻酔のみとした対象群と比較した。

採取スケジュール：損傷後 1、3、5、7、14 日後に動物から長趾伸筋を採取した。

解析項目：10 μ m 厚の凍結切片を作成し、H-E 染色を施すほか、免疫組織化学を実施し、マクロファージの分布と、再生初期の筋線維の動態を解析した。

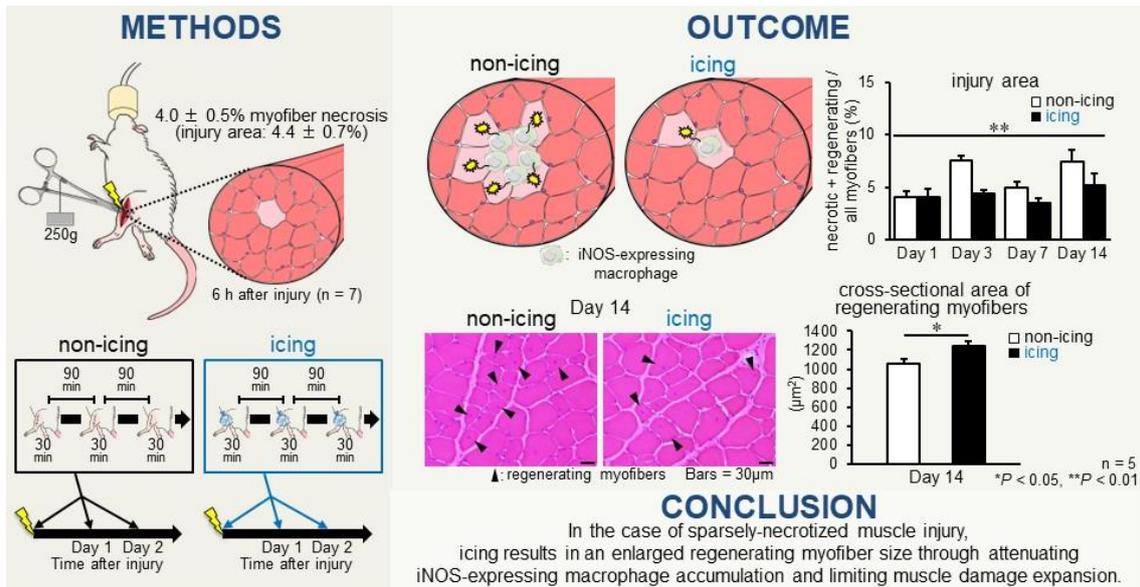
統計解析：二元配置分散分析、Dunn-Bonferroni 検定を実施。有意水準は 5%未満とした。

上記研究は神戸大学の動物実験に関する指針に従い、動物実験委員会の許可を得た上で実施した (承認番号: P200906)。

4. 研究成果

(1) 挫滅損傷で使用していた従来の 500g 重錘付き鉗子を 250g に変えたところ、筋損傷の程度を限局することに成功した。500g 重錘で圧挫したとき、損傷後 6 時間において全筋線維数に対する壊死筋線維数の割合は 20.92 \pm 1.4% (n=5) であったのに対し、250g 重錘での圧挫では 4.0 \pm 0.5% (n=7) となった。激しいスポーツ活動で起こる筋損傷の程度は多くても数%と報告されているため、従来の筋損傷はスポーツ現場で応用するには損傷程度が重度すぎた可能性がある。今回、損傷程度を 4%に限定できたため、本モデルを「軽度筋損傷モデル」としたい。本モデルにおいて損傷後のアイシングの影響を見た。

「軽度筋損傷モデル」に対しアイシングを施したところ、再生筋線維の横断面積が増加し、アイシングによって筋再生を促進できていると明らかになった。また、アイシングによって iNOS 陽性マクロファージの集積を抑制し、筋全体の iNOS 発現を抑制、損傷の拡大範囲を抑制することができた。iNOS 陽性マクロファージは炎症急性期に集積し、壊死細胞の貪食に関与していると考えられるため、炎症性マクロファージとほぼ同等の動態を記している。また、アイシングによって M2 マクロファージの割合が増加したことも明らかになった。M2 マクロファージは免疫組織化学で同定したものであるが、iNOS 陽性マクロファージの集積の後に損傷部に集積するという動態から、抗炎症性マクロファージと同等であろう。その後、活性化衛星細胞の損傷部のへの集積が、アイシングによって早期化したことも明らかとなった(下図)。



本成果は、動物実験においてアイシングが筋再生を促進できることを示した初めての研究成果である。本成果を大学からプレスリリースした「軽微な筋損傷に対するアイシングは筋損傷後の再生を促進する： https://www.kobe-u.ac.jp/ja/news/article/2023_03_22_02/」。それをもとに共同通信から「アイシング、軽いけがに有効 重いと回復阻害、神戸大」として取り上げられ、各新聞がそれを取り上げた。

論文

1) Nagata I, Kawashima M, Miyazaki A, Miyoshi M, Sakuraya T, Sonomura T, Oyanagi E, Yano H, Arakawa T. Icing after skeletal muscle injury with necrosis in a small fraction of myofibers limits inducible nitric oxide synthase-expressing macrophage invasion and facilitates muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2023 324(4):R574-R588. doi: 10.1152/ajpregu.00258.2022.

学会発表

- 1) 長田樹, 川島将人, 宮崎安奈, 荒川高光. 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは細胞傷害性を持つマクロファージの集積を減少させ筋再生を早期化する. 第 26 回日本基礎理学療法学会学術大会 2021 年 10 月 23 日
- 2) 長田樹, 川島将人, 宮崎安奈, 荒川高光. 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは筋再生を早期化できるか?. 第 76 回日本体力医学会大会 2021 年 9 月 17 日
- 3) 長田樹, 川島将人, 倉内摩美, 荒川高光. 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは筋再生を早期化する. 第 77 回日本体力医学会大会 2022 年 9 月 21 日
- 4) 長田樹, 川島将人, 倉内摩美, 荒川高光. 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは筋損傷の拡大を抑制し筋再生を促進する. 第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2023 年 3 月 18 日

講演

- 1) 荒川高光. アイシング. Jリーグトレーナー研修会 2024 年 1 月 6 日
- 2) 荒川高光. そのアイシング、誰にでもやってもいいのですか? アイシングの正しい処方箋. 公益社団法人 大阪府柔道整復師会 第 15 回 大阪学術大会 2023 年 10 月 1 日

(2) 「軽度筋損傷モデル」を用い、アイシングプロトコルを変えることで、その筋再生に与える影響を見た。アイシングは最も多く実施した群、9 回実施した群において筋再生が促進していた。

マクロファージの集積は対照群と比べ、アイシングの実施回数が増えるほどマクロファージの集積が有意に少ないことが判明した。また、アイシングを 9 回実施した群は損傷 5 日後において残存している壊死筋線維が少ない傾向があった。また、幼弱な筋線維はアイシングを 9 回実施した群で多い傾向にあった。

本成果はアイシングによって筋再生を促進できるモデルにおいて、**アイシングプロトコルによって筋再生が影響されていたことを示す初めての成果である。**本成果は学会発表を行った上で現在論文投稿中である。本成果はアイシングを行うとしてもどの状況でどの程度したら良いのかを示すために重要な一歩であると考えられる。

学会発表

- 1) 川島 将人, 倉内 摩美, 長田 樹, 荒川 高光. 軽微な骨格筋損傷後のアイシング回数・期間の違いがマクロファージの集積と筋再生に与える影響. 第 37 回日本体力医学会近畿地方会 2023 年 3 月 11 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nagata Itsuki, Kawashima Masato, Miyazaki Anna, Miyoshi Makoto, Sakuraya Tohma, Sonomura Takahiro, Oyanagi Eri, Yano Hiromi, Arakawa Takamitsu	4. 巻 324
2. 論文標題 Icing after skeletal muscle injury with necrosis in a small fraction of myofibers limits inducible nitric oxide synthase-expressing macrophage invasion and facilitates muscle regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R574 ~ R588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00258.2022	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 Miyazaki Anna, Kawashima Masato, Nagata Itsuki, Miyoshi Makoto, Miyakawa Motoi, Sugiyama Megumi, Sakuraya Tohma, Sonomura Takahiro, Arakawa Takamitsu	4. 巻 159
2. 論文標題 Icing after skeletal muscle injury decreases M1 macrophage accumulation and TNF- expression during the early phase of muscle regeneration in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 77 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-022-02143-8	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 Kawashima M, Iguchi S, Fujita N, Miki A, Arakawa T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Structural Changes in Skeletal Muscle Fibers after Icing or Heating on Downhill Running in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E48-E54
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 Kawashima Masato, Kawanishi Noriaki, Tominaga Takaki, Suzuki Katsuhiko, Miyazaki Anna, Nagata Itsuki, Miyoshi Makoto, Miyakawa Motoi, Sakuraya Tohma, Sonomura Takahiro, Arakawa Takamitsu	4. 巻 130
2. 論文標題 Icing after eccentric contraction-induced muscle damage perturbs the disappearance of necrotic muscle fibers and phenotypic dynamics of macrophages in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 1410 ~ 1420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.01069.2020	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 長田樹, 川島将人, 倉内摩美, 荒川高光
2. 発表標題 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは筋損傷の拡大を抑制し筋再生を促進する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川島将人, 長田樹, 青木孝文, 濱田大幹, 渡邊知央, 小柳えり, 荒川高光, 矢野博巳
2. 発表標題 骨格筋損傷後のアイシングがマクロファージ遊走因子の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田樹, 川島将人, 倉内摩美, 荒川高光
2. 発表標題 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは筋再生を早期化する
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田樹, 川島将人, 宮崎安奈, 荒川高光
2. 発表標題 軽微な骨格筋損傷後のアイシングは筋再生を早期化できるか？
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎安奈 , 川島将人 , 長田樹 , 荒川高光
2. 発表標題 重い骨格筋損傷に対するアイシングは炎症性マクロファージの集積を減少させ、筋再生を遅延させる
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体構造学研究室 http://www2.kobe-u.ac.jp/~arakawa/index.html

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
研究協力者	矢野 博己 (Yano Hiromi) (20248272)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授 (35309)	
研究協力者	小柳 えり (Oyanagi Eri) (50804647)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師 (35309)	

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
---------	---------