

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700781

研究課題名(和文) 機械的人工換気システムを用いた横隔膜の筋萎縮メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy

研究代表者

関根 紀子 (Ichinoseki-Sekine, Noriko)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員准教授

研究者番号：10393175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：械的人工換気システムによるラット横隔膜萎縮モデルを用いて、横隔膜の筋萎縮メカニズムを明らかにするとともに、温熱負荷が横隔膜萎縮に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。Wistar系ラットを対象に12時間の機械的人工換気を行い、組織化学および生化学的分析を行った。また、摘出筋の張力測定を行った。温熱負荷は人工換気24時間前に1時間実施した。その結果、機械的人工換気により横隔膜が15%程度萎縮するが、温熱負荷によりその萎縮が軽減されることが示された。熱ショックタンパク質発現量の増加やアポトーシス系の関与が考えられた。一方、温熱負荷は筋張力の低下を抑制しないことが示された。

研究成果の概要(英文)：Mechanical ventilation (MV) is used clinically to provide sufficient alveolar ventilation in patient. However, prolonged MV is associated with the development of respiratory muscle weakness. We hypothesized that exposure to heat stress would increase diaphragm expression of heat shock protein 72 (HSP72) and that this treatment would protect against MV-induced diaphragmatic atrophy. Adult male Wistar rats were randomly assigned to one of four groups: control group with no MV; 12-h controlled MV group; 1-h whole-body heat stress; or 1-h whole-body heat stress 24 h prior to 12-h controlled MV. Compared to control animals, diaphragmatic HSP72 significantly induced by heat stress. Prolonged MV resulted in significant atrophy in the costal diaphragm, however, heat stress attenuated this effect. In contrast, heat stress did not protect against MV-induced diaphragm contractile dysfunction. This heat stress-induced protection may be linked to increased expression of HSP72 in the diaphragm.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：横隔膜 筋萎縮 機械的人工換気 温熱負荷 筋張力 熱ショックタンパク質

1. 研究開始当初の背景

不活動などによる筋萎縮のメカニズムを解明し、効果的な萎縮予防やトレーニング法の開発を目指した研究がこれまで広く行われてきた。四肢骨格筋の萎縮は抗重力筋であるヒラメ筋でその程度が大きいことから、ヒラメ筋を主に構成する遅筋線維の萎縮については研究が進んでいるが、速筋線維の廃用性筋萎縮については不明な点が多いのが現状である。

四肢骨格筋と同様、健康で活動的に過ごすために重要な筋である横隔膜は、主に速筋線維で構成される骨格筋である。横隔膜は生命維持のため常に活動している筋であるが、人工呼吸器の装着などによりその活動を軽減すると、急激な萎縮を呈す。そのため、医療現場において、人工呼吸器の装着期間の決定は難しい課題となっている。しかしながら、横隔膜の萎縮は主に速筋線維で起こるため、遅筋線維で盛んに行われてきたこれまでの筋萎縮の予防・軽減についての研究成果をそのまま応用することはできない。

申請者らはこれまで、四肢骨格筋で見られる遅筋線維の萎縮メカニズムや、萎縮予防法としての温熱負荷について多くの知見を得てきたが、それらが横隔膜で起こる速筋線維の萎縮と同じか否は不明である。さらに、横隔膜の萎縮からの回復過程について取り組んだ実験室的研究はこれまでなされておらず、本研究は世界的にも新しい取り組みといえる。

2. 研究の目的

機械的人工換気システムによるラット横隔膜萎縮モデルを用いて、横隔膜の筋萎縮メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、既に下肢骨格筋における萎縮予防法として上げられている温熱負荷が、横隔膜萎縮に及ぼす影響についても明らかにする。さらに、萎縮からの回復過程についても検討を加えるため、改良型横隔膜萎縮モデルの開発に着手する。横隔膜の萎縮からの回復過程について取り組んだ実験室的研究はこれまでなされておらず、本研究は世界的にも新しい取り組みといえる。

3. 研究の方法

本研究は、以下の3つのテーマに焦点を絞って取り組んだ。

(1) 人工換気と横隔膜萎縮

Wistar 系雄性ラットをコントロール群 (CON, n=8) または機械的人工換気群 (CMV, n=8) の2群に無作為に分け、麻酔下にて気管切開後に人工呼吸器を用いた12時間の人工換気を行い、横隔膜萎縮筋を作成した。人工換気中は、カテーテルを介して頸部静脈より麻酔を維持し、頸部動脈より血圧および血ガスのモニタすることで、生体内の環境を適切にコントロールした。その後横隔膜を摘出し、液体窒素にて凍結した後-80℃にて保存した。

横隔膜サンプルより横断切片を作成し、免疫組織化学法にて筋線維タイプごとの萎縮の評価を行った。さらに、生化学的分析として SDS-PAGE による電気泳動分離を行い、主に分解系シグナル伝達経路について分析を行った。

(2) 温熱負荷と横隔膜萎縮との関連性

チャンバーを用いてラットの全身を加温し、一過性の温熱負荷の影響を調べた。Wistar 系雄性ラットをコントロール (CON, n=9)、熱ストレス負荷 (HS, n=10)、人工換気 (CMV, n=10)、熱ストレス負荷+人工換気 (HSMV, n=9) の4群に分けた。HS および HSMV 群には 41℃ で 60 分の温熱負荷を、CMV および HSMV 群には 12 時間の機械的人工換気を行った (HSMV 群は熱ストレス負荷から 24 時間後に実施)。さらに、人工換気前に 3 回 (1 日おき) 温熱負荷を行い、複数回の温熱負荷が横隔膜萎縮へ及ぼす影響について調べた。

人工換気や温熱負荷が筋機能へ及ぼす影響を明らかにするため、摘出筋の張力測定を行った。また、テーマ(1)同様に組織化学的および生化学的分析を行った。

(3) 横隔膜萎縮からの回復メカニズムの解明のためのモデル作成

器官切開を伴わない人工換気システムとして、経口の気管挿管法を選択し、従来の方法との比較を試みた。なお、本テーマは研究期間内に完結していない。

4. 研究成果

(1) 人工換気と横隔膜萎縮

12 時間の機械的人工換気により横隔膜の断面積が 15% 程度減少し、それは主に Type IIb/dx 線維の面積の減少によって引き起こされることが示された。一方、筋線維組成にはコントロール群と機械的人工換気群との間に有意な差はみられなかった (図 1)。

Caspase-3 および 7 発現量は人工換気後に 6~7 倍増加し、カテプシン L は 2 倍程度増加した (p<0.05)。さらに、αアクチニンアイソフォームの発現レベルを比較したところ、コントロール群と機械的人工換気群との間に有意な差はみられな

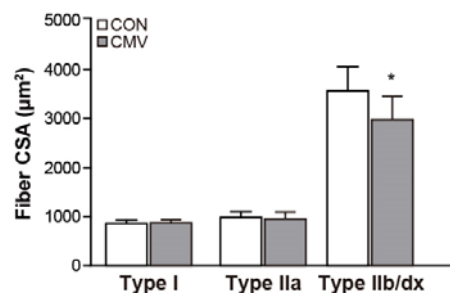


図 1. 筋線維横断面積

かった。これは、ヒラメ筋などの廃用性萎縮と異なり、横隔膜の萎縮では筋線維組成のタイプシフトが起こらないためだと考えられた。

これらの結果から、横隔膜萎縮に関与する筋タンパク質分解経路の分析項目がある程度絞られ、メカニズムの解明について新たな知見を得ることができた。筋萎縮と直接の関係はないが、横隔膜の α アクチニンアイソフォームに関してはこれまで報告されておらず、新たな知見を示すことができた。

(2) 温熱負荷と横隔膜萎縮との関連性

テーマ(1)の結果と同様に、12時間の機械的人工換気により横隔膜の断面積の減少は有意に減少した ($p<0.05$)。しかしながら、CON と HSMV 群との間に有意な差は見られず、一過性の温熱負荷により筋線維の萎縮は有意に軽減した (図 2)。筋線維組成に人工換気または温熱負荷の影響は見られなかった。

温熱負荷を施すことにより、熱ショックタンパク質は有意に増加した (図 2, $p<0.05$)。72kDa の熱ショックタンパク質は、ヒラメ筋の廃用性筋萎縮において萎縮抑制効果があるとされている。速筋線維では温熱負荷に対する熱ショックタンパク質の応答は小さいとの報告があるが、本研究で用いた一過性温熱負荷は、速筋

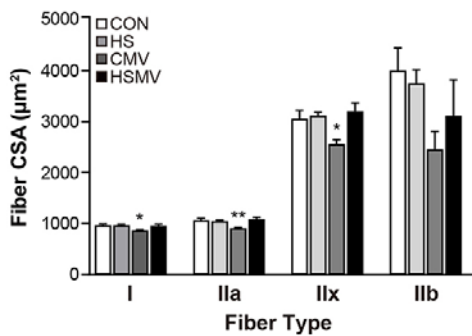


図 2. 筋線維横断面積

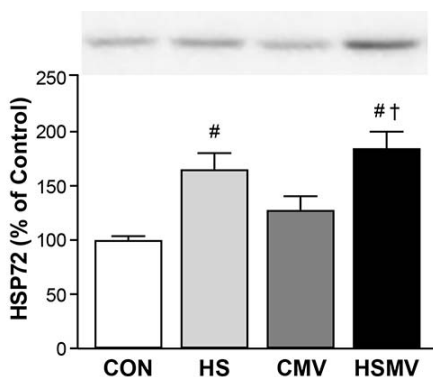


図 3. 熱ショックタンパク質 72 発現量

線維が有意である横隔膜において、熱ショックタンパク質を誘導できることが確認できた。

アポトーシスに関する活性型カスパーゼ 3 発現量は人工換気により有意に増加したが ($p<0.05$)、温熱負荷によりその増加が抑制される傾向が示された (図 4)。一方で、活性型カルパイン 1 やユビキチン化タンパク質の発現量に、群間で有意な差はみられなかった。以上のことから、温熱負荷による横隔膜萎縮の抑制には、カスパーゼを中心としたアポトーシス経路が関与しているものと考えられる。しかしながら、カルパイン 1 の応答など先行研究とは異なる結果も示されていることから、更なる分析が必要なものと考えられる。

人工換気により横隔膜筋張力が大きく低下することが既に報告されており、本研究においても先行研究と同様の変化が示された (図 5)。一過性の温熱負荷は HSMV 群で横隔膜萎縮を抑制したが、筋張力においてはその低下を抑制することはできなかった。筋量が維持できているにも関わらず収縮力が低下した理由は現在不明だが、温熱負荷 36 時間後では電気刺激に十分応答できない可能性などが上げられる。今後更なる検討が必要である。

さらに、人工換気前に 3 回の温熱負荷

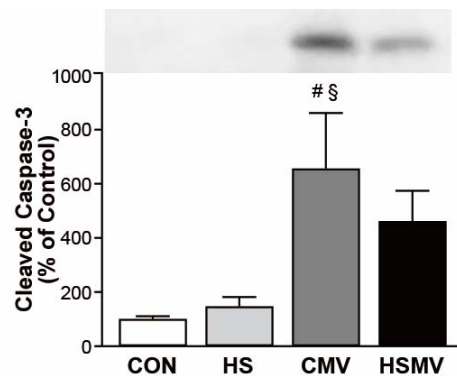


図 4. 活性型カスパーゼ 3 発現量

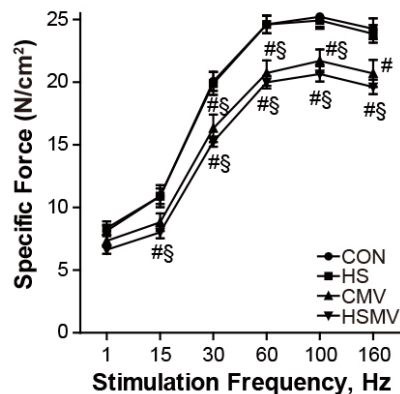


図 5. 筋張力

を施し、同様の分析を試みたが、その結果は一過性の温熱負荷と同様であった。つまり、複数回の温熱負荷であっても張力低下の抑制効果は示されなかった。しかしながら、一過性にせよ複数回にせよ、温熱負荷は横隔膜萎縮を抑制し、筋量を維持する効果があることが示された。これらのことは、温熱負荷が人工換気後のリハビリテーションをスムーズにする可能性があることを示しており、今後に期待が持てる結果であると考えられる。本結果は現在学術誌に投稿中である。

(3) 横隔膜萎縮からの回復メカニズムの解明のためのモデル作成

人工換気後の回復期について分析するため、これまで用いていた器官切開を伴わない新たな人工換気システムの開発に着手した。様々な方法があるが、人工換気中のバイタルサイン維持の容易さなどを考慮し、本研究では経口挿管による方法を選択した。ラットの場合バルーンを用いて挿入管を気管内に固定するのが困難であるため、皮膚の切開のみを行い気管と挿入管を糸で固定することとした。

さらに、頸部静脈から滴下している麻酔は、下肢静脈を用いることで静脈の結紮を回避した。人工換気中のバイタルサイン管理で最も重要となる血ガスについては、挿入管から呼気を採取して分析し、血ガスとの関係を明らかにすることで代替パラメータとすべくデータを蓄積している。また、血ガス同様重要なパラメータである血圧については、非侵襲的動物用血圧測定器を用いる予定である。これにより、頸動脈の結紮を回避できる見込みである。

本テーマは今後の研究に向けた発展的研究であり、新たな人工換気システムを構築するための試験的な取り組みである。新たなモデルを完成することはできなかったが、今後のシステム構築の方向性を固めることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Kakigi R, Ogura Y, Sugiura T, Naito H. Fiber-type specific expression of α -actinin isoforms in rat skeletal muscle, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 419(2), 2012, 401-404

[学会発表] (計 12 件)

- ① 吉原利典, 数回の熱ストレス負荷は機械的人工換気に誘発される横隔膜の収縮機能低下を軽減させる, 第 68 回日本体力医学会大会, 2013 年 9 月 23 日, 東京

- ② Yoshihara T, Repeated Heat Treatment Attenuates the Rat Diaphragmatic Contractile Dysfunction Induced by Mechanical Ventilation, 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, 2013 年 6 月 27 日, Toyohashi, Japan
- ③ Ichinoseki-Sekine N, Effects of heat stress on mechanical ventilation-induced atrophy in rat diaphragm, *Experimental Biology* 2013, 2013 年 4 月 24 日, Boston, USA
- ④ Ichinoseki-Sekine N, Rapid atrophy of fast fibers – mechanical ventilation induced diaphragmatic atrophy, 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 27 日, 東京
- ⑤ Ichinoseki-Sekine N, Effects of heat stress on diaphragmatic atrophy induced by 12 h mechanical ventilation in rat, 2012 APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise-VI, 2012 年 10 月 11 日, Denver, USA
- ⑥ 吉原利典, 熱ストレス負荷が機械的人工換気に誘発される横隔膜の萎縮に及ぼす影響, 第 66 回日本体力医学会大会, 2012 年 9 月 14 日, 岐阜
- ⑦ 関根紀子, 一過性の熱ストレス負荷がラット横隔膜萎縮筋へ及ぼす形態的・機能的影響, 第 66 回日本体力医学会大会, 2012 年 9 月 14 日, 岐阜
- ⑧ Ichinoseki-Sekine N, Expression of alpha-actinin-3 protein of hybrid I/IIa fibers in rat skeletal muscle, 15th International Biochemistry of Exercise Conference, 2012 年 6 月 19 日, Stockholm, Sweden
- ⑨ 関根紀子, ラット横隔膜における α アクチニン 3 タンパク質の筋線維特異的発現, 第 66 回日本体力医学会大会, 2011 年 9 月 17 日, 下関
- ⑩ 関根紀子, 12 時間の機械的人工換気がラット横隔膜における α アクチニン 3 タンパク質の筋線維特異的発現に及ぼす影響, 第 19 回日本運動生理学会大会, 2011 年 8 月 26 日, 徳島
- ⑪ Ichinoseki-Sekine N, Effects of 12-h mechanical ventilation on fibre-specific expression of alpha-actinin-3 protein in rat diaphragm, 16th annual congress of the European College of Sport Science, 2011 年 7 月 8 日, Liverpool, UK
- ⑫ Ichinoseki-Sekine N, Fiber-specific expression of alpha-actinin-3 protein in rat diaphragm, *Experimental Biology* 2011, 2011 年 4 月 13 日, Washington DC, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

関根 紀子 (ICHINOSEKI-SEKINE, Noriko)
順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員准教授
研究者番号：10393175

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：