

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33918

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700567

研究課題名(和文) 運動制限を有する患者に対するストレッチと熱刺激を併用した筋萎縮治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment strategy against skeletal muscle atrophy using combination of stretching and heat stimulation for patients with limited mobility

研究代表者

土田 和可子 (TSUCHIDA, Wakako)

日本福祉大学・健康科学部・助教

研究者番号：90610014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養細胞とモデル動物を用いて、ストレッチと熱刺激の併用が廃用性筋萎縮の進行過程や回復過程に及ぼす影響を検討した。その結果、熱刺激はタンパク質分解系を制御する転写因子の活性化を抑制し、筋萎縮の進行を抑制する可能性が示唆された。また、ストレッチはタンパク質合成系のシグナル伝達分子を活性化させ、筋萎縮の回復を促進する可能性が示唆された。したがって、タンパク質分解を抑制する熱刺激とタンパク質合成を促進するストレッチを併用した治療戦略は、運動制限を有する患者の廃用性筋萎縮に対して有効に作用すると推察される。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the effects of combination of stretching and heat stimulation on the progression and recovery of skeletal muscle atrophy in vitro and vivo. The results demonstrate that heat stimulation can prevent the progression of skeletal muscle atrophy, and this effect is linked to the suppression of protein catabolic signaling activities. The study also suggests that stretching improves recovery of skeletal muscle after disuse atrophy, possibly through the activation of anabolic signaling pathways. Hence, the combination of the heat stimulation and stretching may be effective in both inhibiting protein degradation and stimulating protein synthesis in skeletal muscle atrophy for patients with limited mobility.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮 ストレッチ 熱刺激 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮（以下、筋萎縮）は、安静臥床や骨折後のギプス固定、あるいは微小重力環境の暴露、老化に伴う退行性変化などによって引き起こされ、その発生メカニズムは筋細胞を構成する様々なタンパク質（以下、筋構成タンパク質）の合成抑制と分解亢進である。つまり、筋萎縮を予防・治療するためには骨格筋に対する負荷量や活動量を増加させ、筋構成タンパク質の合成を促すことにより、筋組織を構成する個々の筋細胞の肥大と新たな筋細胞の形成による筋肥大が必要であり、リハビリテーション医療の現場において最も効果的な方法は、レジスタンス運動やトレッドミル走行といった積極的な身体運動といわれている。

しかしながら、超高齢社会を迎えた今日、寝たきり患者や慢性的な運動不足者、あるいは意識混濁状態や重度障害などのために、運動を十分に行えない人々が多く存在する。さらに、糖尿病性合併症や心血管系合併症などの臓器障害により、運動制限を有する患者も多く認められ、これらの人々への運動処方、サルコペニア対策が直面している大きな課題の一つとなっている。したがって、重力環境下において積極的な身体運動が行えない患者を対象にした場合においても、優れた運動効果をもたらすことができる、他の方法論の早期開発が求められている。

リハビリテーション医療の現場においてストレッチは、治療手段の一つとして関節可動域の改善や疼痛の緩和などを目的に施行される。この手法は、骨格筋や関節構成体全体に対して、他動的に張力刺激（メカニカルストレス）を加えることができ、寝たきり患者や意識混濁状態、重度障害などにより自発的に関節運動を行うことが困難な患者であっても施行可能である。また、このようなストレッチによってもたらされるメカニカルストレスは、筋構成タンパク質の合成を促進し、筋細胞を肥大させることが明らかにされており、廃用性筋萎縮の予防や治療を目的とした応用が試みられている。例えば、Agataらは、坐骨神経を切除した除神経ラットを用い、1日15分間（毎日）、麻酔下で徒手的に足関節背屈位5秒間と中間位5秒間を繰り返す間欠的ストレッチを2週間にわたって行った結果、除神経によるヒラメ筋の萎縮が抑制できたと報告しており（Muscle Nerve 39: 456-462, 2009）、自身の予備実験においても、細胞周辺の栄養やホルモン状態を制御できる培養骨格筋細胞に間欠的ストレッチを加えると、筋細胞の肥大が生じることを確認している。これらのことは、動物・培養細胞実験の結果ではあるものの、ストレッチのようなメカニカルストレスでも廃用性筋萎縮を予防・治療できる可能性を示しており、前述のような臨床応用に向けた科学的エビデンスの構築につながるものと考えられる。ただ、廃用症候群やサルコペニアの進行過程では、

酸化ストレスによる活性酸素種の産生増大とそれに関連したタンパク質分解酵素の活性化が認められている。酸化ストレスに曝された萎縮筋は、筋構成タンパク質（特に、もっとも大量に含まれるアクチンやミオシンのような収縮タンパク質）の分解が亢進されるためそれ自体が極めて脆弱で、ストレッチによって筋線維損傷の発生を招く危険性がある。事実、ストレッチの強度や頻度などの条件によっては筋線維損傷を惹起する可能性があること（Stauber WT, et al.: Eur J Appl Physiol 88: 94-99, 2002）や、筋萎縮進行を助長する可能性もあること（Gomes AR, et al.: Braz J Med Biol Res 37: 1473-1480, 2004）が指摘されている。したがって、筋萎縮に対するストレッチの効果を安全かつ効果的に発揮させ得るには、酸化ストレスによる悪影響を排除する方法論を検討する必要があり、これには熱刺激を併用した手段が有効ではないかと考えている。

この点に関して Selsby らは、分子シャペロン機能や損傷タンパク質の修復機能を有する heat shock protein（以下、Hsp）72 に着目し、以下の実験結果を報告している。すなわち、ラットの足関節を最大底屈位で8日間不動化（ギプス固定）する過程で、約41の全身温熱暴露を30分間、1回/2日の頻度で行うと、ヒラメ筋内のHsp72が温熱暴露を行わない群より増加し、不動による筋細胞内の酸化ストレスの発生を抑えるとともに、筋重量の減少も有意に抑制できたとしている（Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289: R134-R139, 2005）。

したがって、これらの知見を参考にすると、廃用性筋萎縮を予防または治療するには、ストレッチと熱刺激を併用した方法が有効である可能性が高く、ストレッチと熱刺激をそれぞれ単独で使用するよりも、それらを併用して行うことでより効果的で効率的な予防・治療効果を得ることが期待できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、メカニカルストレスや熱などの物理的刺激に対する筋細胞応答に着目し、ストレッチまたは熱刺激が筋萎縮の進行過程や回復過程に及ぼす影響とその作用機序の解明を行い、臨床応用に向けた科学的エビデンスを集積するとともに、ストレッチと熱刺激を併用した治療戦略が、より効果的かつ効率的に作用するのではないかと考えた仮説を培養骨格筋細胞と筋萎縮モデル動物を用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋萎縮の進行過程に対する熱刺激の効果検証

対象と実験プロトコル

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株（C2C12細胞）を培養・増殖させ、筋管細胞

に分化させたものを用いた。実験群としては、1)通常培養を行った対照群、2)細胞内のタンパク質分解を亢進する合成グルココルチコイド (dexamethasone: 以下, Dex) を培地に投与することで萎縮を誘導した Dex 群、3)熱刺激 (41 °C, 60 分間の温熱暴露) を行い、その 6 時間後に Dex を培地に投与した H+Dex 群の 3 群を設けた。

組織病理学的検索

熱刺激終了直後を基準 (0 時間) として、30 時間後の筋管細胞を撮像し、画像解析ソフトウェアを用いて細胞直径を計測・比較することで筋萎縮の評価を行った。

生化学的・分子生物学的検索

熱刺激終了直後を基準 (0 時間) として、18 または 30 時間後に筋管細胞を回収し、Western blot 法を用いて、ストレスタンパク質 (Hsp72 及び Hsp25/27) の発現量とタンパク質分解系を制御する転写因子 (FOXO3a 及び NF- κ B) のリン酸化量を定量した。

(2)筋萎縮の回復過程に対するストレッチの効果検証

対象と実験プロトコル

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を培養・増殖させ、筋管細胞に分化させたものと、生後 8 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。

筋管細胞を対象とした実験では、1)通常培養を行った対照群、2)ストレッチ (頻度 1/6 Hz、伸張率 115% のメカニカルストレス負荷) を行った S 群、3)細胞表面接着分子の一種であるインテグリン α 1 β 3 の阻害薬 (echistatin) を培地に投与した Ech 群、4)echistatin を培地に投与してストレッチを行った Ech+S 群、5)タンパク質合成系を制御する mTORC1 の阻害薬 (rapamycin) を培地に投与した Rap 群、6)rapamycin を培地に投与してストレッチを行った Rap+S 群の 6 群を設けた。

ラットを対象とした実験では、1)通常飼育を行った対照群、2)足関節最大底屈位で 4 週間ギプス固定することで筋萎縮を誘導した Im 群、3)筋萎縮を誘導した後、通常飼育を行った Im+NS 群、4)筋萎縮を誘導した後、ストレッチを行った Im+S 群の 4 群を設けた。なお、ストレッチには小動物用他動運動機器を用い、足関節最大背屈角度から底屈方向に 40° の可動範囲で、4 秒に 1 回のサイクルの足関節底背屈運動によるヒラメ筋の伸張を、1 日 30 分間、週 6 回の頻度で行った。

組織病理学的検索

筋管細胞を対象とした実験では、ストレッチ開始直後を基準 (0 時間) として、72 時間後の筋管細胞を撮像し、画像解析ソフトウェアを用いて細胞直径を計測・比較することで筋肥大の評価を行った。

ラットを対象とした実験では、ストレッチ開始日 (ギプス固定除去日) を基準 (1 日) として、7 または 14 日後にヒラメ筋の ATPase 染色像を撮像し、画像解析ソフトウェアを用いて筋線維横断面積を計測・比較することで筋肥大の評価を行った。

生化学的・分子生物学的検索

筋管細胞を対象とした実験では、ストレッチ開始直後を基準 (0 時間) として、1 時間後に筋管細胞を回収し、Western blot 法を用いて、タンパク質合成系の細胞内シグナル伝達分子 (p70S6K, ERK1/2, p38MAPK) のリン酸化量を定量した。

ラットを対象とした実験では、ストレッチ開始日 (ギプス固定除去日) を基準 (0 日) として、0, 1, 3, 5, 7 日後にヒラメ筋を採取し、Western blot 法を用いて、Hsp72 発現量を定量した。

(3)統計処理

全ての値は平均 \pm 標準偏差で表記した。各群間の比較には、一元配置分散分析を用いた。分散分析により有意差を認められた場合は多重比較検定に Scheffe 法を適用し、各群間及び各検索時期の有意差を判定した。なお、全ての統計手法とも有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

(1)筋萎縮の進行過程に対する熱刺激の効果検証

熱刺激による筋管細胞の直径の変化

Dex 群の筋管細胞の直径は、対照群及び H+Dex 群と比較して有意に低値を示したが、H+Dex 群のそれは対照群と比較して有意差を認めなかった。

熱刺激による筋管細胞内の Hsp72 及び Hsp25/27 発現量の変化

H+Dex 群の Hsp72 発現量は、対照群及び Dex 群と比較して、熱刺激終了から 18, 30 時間後で有意に高値を示した。一方、Dex 群の Hsp72 発現量は、対照群と比較して有意差を認めなかった。

同様に、H+Dex 群の Hsp25/27 発現量は、対照群及び Dex 群と比較して、熱刺激終了から 18, 30 時間後で有意に高値を示したが、Dex 群のそれは対照群と比較して有意差を認めなかった。

熱刺激による筋管細胞内の FOXO3a 及び NF- κ B のリン酸化量の変化

Dex 群の FOXO3a のリン酸化量は、対照群及び H+Dex 群と比較して、熱刺激終了から 18 後で有意に低値を示したが、H+Dex 群のそれは対照群と比較して有意差を認めなかった。

Dex 群の NF- κ B のリン酸化量は、対照群及び H+Dex 群と比較して、熱刺激終了から 18 後で有意に高値を示したが、H+Dex 群のそれは対照群と有意差を認めなかった。

上記 ~ の研究結果をまとめると、熱刺激はタンパク質の分解亢進が主たる要因である筋萎縮の進行を十分に抑制できることが示唆された。さらに、その作用機序の一つとして、Hsp72 や Hsp25/27 発現量の増加を介した FOXO3a と NF- κ B の活性化抑制が関与している可能性が窺えた。

(2)筋萎縮の回復過程に対するストレッチの効果検証

ストレッチによる筋管細胞の直径の変化
S 群の筋管細胞の直径は、対照群、Ech 群、Ech+S 群、Rap 群、Rap+S 群と比較して有意に高値を示した。

ストレッチによる筋管細胞内の p70S6K、ERK1/2、p38MAPK のリン酸化量の変化

S 群の p70S6K のリン酸化量は、対照群、Ech 群、Ech+S 群、Rap 群、Rap+S 群と比較して有意に高値を示した。また、Ech 群、Rap 群、Rap+S 群の p70S6K のリン酸化量は、対照群と比較して有意に低値を示した。

S 群、Rap+S 群、Ech+S 群の ERK1/2 のリン酸化量は、対照群、Ech 群、Rap 群と比較して有意に高値を示した。

S 群、Rap+S 群の p38MAPK のリン酸化量は、対照群、Ech 群、Ech+S 群、Rap 群と比較して有意に高値を示した。

ストレッチによるラットヒメラ筋の筋線維横断面積の変化

Im 群の筋線維横断面積は、タイプ 1 線維ともに、対照群と比較して有意に低値を示した。

ストレッチ開始日（ギプス固定除去日）から 7 日後の Im+NS 群と Im+S 群の筋線維横断面積は、タイプ 1 線維ともに Im 群より有意に高値を示した。一方、Im+NS 群と Im+S 群を比較すると、タイプ 2 線維では有意差を認めなかったが、タイプ 1 線維では Im+S 群が Im+NS 群より有意に高値を示した。

ストレッチ開始日（ギプス固定除去日）から 14 日後の Im+NS 群と Im+S 群の筋線維横断面積を比較すると、タイプ 1 線維ともに Im+S 群が Im+NS 群より有意に高値を示した。

ストレッチによるラットヒメラ筋内の Hsp72 発現量の変化

Im 群の Hsp72 発現量は、対照群と比較して有意差を認めなかった。

Im+NS 群の Hsp72 発現量は、対照群及び Im 群と比較して、ストレッチ開始日（ギプス固定除去日）から 5 日後以降で有意に高値を示した。

一方、Im+S 群の Hsp72 発現量は、対照群及び Im 群と比較して、ストレッチ開始日（ギプス固定除去日）以降も有意な変化なく、各検索日で Im+NS 群と Im+S 群の Hsp72 発現

量を比較しても有意差を認めなかった。

上記 ~ の研究結果をまとめると、従来の報告と同様に、ストレッチはタンパク質合成系の細胞内シグナル伝達分子を活性化させ、筋肥大を引き起こすことが示唆された。さらに、その作用機序の一つとして、インテグリン α 1 または α 3 を介したメカニカルストレスの受容が関与している可能性が窺えた。

また、上記 ~ の研究結果をまとめると、ストレッチは筋肥大を促すことでギプス固定によって生じた筋萎縮の回復を促進するが、その作用機序に Hsp72 が関与している可能性は低いことが窺えた。そのため、今後は他の因子の関連について検討する必要がある。

以上のことから、本研究の結果に基づくと、タンパク質分解を抑制する熱刺激とタンパク質合成を促進するストレッチを併用した治療戦略は、運動制限を有する患者の廃用性筋萎縮に対して有効に作用すると推察される。しかし、本研究は熱刺激で誘導した Hsp72 の萎縮予防効果を検討したものであり、温熱の種類や方法を検証したものではない。今後、筋萎縮に対する予防・治療アプローチとして臨床へ応用していくには、効果的かつ適切な温熱の種類、方法、時間、頻度、強度など、多くの課題について検討していく必要がある。また、ストレッチによる萎縮回復促進効果の詳細な作用機序については明らかではなく、加えて、その伸張サイクルや時間、頻度、強度などについても今後検討の余地があると思われる。これらの基礎研究を通して得られる知見は、将来、エビデンスに基づく新たな廃用性筋萎縮の予防・治療法の開発に繋がると思われる。

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 4 件）

Matsuo S, Suzuki S, Iwata M, Banno Y, Asai Y, Tsuchida W, Inoue T. Acute effects of different stretching durations on passive torque, mobility, and isometric muscle force. J Strength Cond Res 27(12): 3367-3376, 2013. (査読有)

DOI: 10.1519/JSC.0b013e318290c26f.

Tsuchida W, Nakagawa K, Kawahara Y, Yuge L. Influence of dual-task performance on muscle and brain activity. Int J Rehabil Res 36(2): 127-133, 2013. (査読有)

DOI: 10.1097/MRR.0b013e32835acfb8.

岩田全広, 西浜かすり, 土田和可子, 鈴木重行. 電気刺激による培養骨格筋細胞

の肥大効果. 日本福祉大学健康科学論集 16, 1-7, 2013. (査読有)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009573838>

土田和可子, 岩田全広, 鈴木重行, 坂野裕洋, 井上貴行, 松尾真吾, 浅井友詞. 温熱刺激による筋萎縮の進行抑制効果の検討 - グルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行抑制効果と熱ショックタンパク質発現との関連性から -. 理学療法 29(7): 795-802, 2012. (査読有)

<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ai0rgryh&vo=29&nu=7>

[学会発表](計6件)

岩田全広, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行. メカニカルストレスによる骨格筋肥大がインテグリンを介して誘導される可能性. 第68回日本体力医学会大会, 2013年9月22日, 日本教育会館・学術総合センター・共立講堂(東京都)

伊藤健太, 松尾真吾, 波多野元貴, 土田和可子, 鈴木重行, 岩田全広. 静的ストレッチングによる即時的な筋血流量増加効果の持続時間について. 第68回日本体力医学会大会, 2013年9月22日, 日本教育会館・学術総合センター・共立講堂(東京都)

Iwata M, Tsuchida W, Yuminamochi R, Banno Y, Inoue T, Fujiwara M, Hayashi K, Matsuo S, Asai Y, Suzuki S. Mechanical stretching increases glucose transport into skeletal myocytes in culture by mechanism other than via adenosine triphosphate. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, 2013年6月23-28日, Honokuni Toyohashi Art Center (Japan)

土田和可子, 弓納持里奈, 坂野裕洋, 井上貴行, 松尾真吾, 藤原光宏, 鈴木重行, 岩田全広. 温熱刺激によるグルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行抑制とFOXO3aおよびNF- κ B活性化の関連性. 第17回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2013年3月16日, 愛知学院大学楠元キャンパス(愛知県)

岩田全広, 弓納持里奈, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行. 熱ストレスによるデキサメタゾン誘導性筋萎縮の進行抑制におけるNF- κ Bの関与. 第67回日本体力医学会, 2012年9月14日, 長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県)

長谷紀志, 岩田全広, 土田和可子, 鈴木重行. 機械的ストレスによって誘導される骨格筋肥大はインテグリン 1/3阻害薬により抑制される. 第47回日本理学療法学術大会, 2012年5月27日, 神

戸ポートピアホテル(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田 和可子 (TSUCHIDA, Wakako)
日本福祉大学・健康科学部・助教

研究者番号: 90610014