

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25750202

研究課題名(和文)心疾患に伴う骨格筋の弱化予防に対する高気圧・高濃度酸素の効果検証と作用機序の解明

研究課題名(英文)Effect of hyperbaric oxygen on heart failure induced skeletal muscle atrophy

研究代表者

藤田 直人(Fujita, Naoto)

広島大学・医歯薬保健学研究院(保)・講師

研究者番号：90584178

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)：肺高血圧症及び右心不全における骨格筋の萎縮過程を確認した。右心不全の時期では、遅筋、速筋ともに、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・ライソソーム系によるタンパク分解の亢進と筋萎縮が生じた。一方、右心不全に至る前段階である肺高血圧症の時期では、遅筋、速筋ともに筋萎縮は生じなかったが、速筋においてのみ、タンパク分解の亢進が確認された。このタンパク分解の亢進は、病期の進行に伴う動脈血酸素飽和度の低下が出現する前から生じていた。また、動脈血酸素飽和度が低下した時点から高酸素を用いた介入を実施した場合、高酸素の有効性は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：The time course of major protein degradation pathways in skeletal muscle during right heart failure was investigated in this study. Skeletal muscle atrophy was detected in the stage of right heart failure, in both fast and slow muscle. Skeletal muscle atrophy was not detected in the stage of pulmonary arterial hypertension. Although there were no morphological changes in the skeletal muscle at this time point, ubiquitin-proteasome and macroautophagy-lysosome pathways were activated in the fast muscle of pulmonary arterial hypertension.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：筋萎縮 タンパク分解 心不全 肺高血圧症 遅筋と速筋

1. 研究開始当初の背景

心疾患患者は、心拍出量の低下による骨格筋への血流量減少によって運動耐容能が著しく低下している。加えて、各種の炎症性サイトカインによって骨格筋線維にアポトーシスが誘導され、骨格筋は萎縮し、運動耐容能は更に低下する。骨格筋の弱化によって心疾患患者の運動耐容能が低下した場合、身体活動量が減少し、骨格筋には不活動による萎縮が生じ、運動耐容能は更に低下するという悪循環が繰り返される(図1)。

心疾患でも認める筋萎縮や筋線維の代謝障害といった骨格筋の弱化は、筋収縮を伴う運動によって予防できることが知られている。しかし、運動耐容能が著しく低下した心疾患患者は、ランニングやスクワットのような全身性の能動的な運動を積極的に実施することが困難であり、運動と類似した効果を有する受動的な介入が求められる。

受動的な処置の一つである高気圧・高濃度酸素は、一般的には「酸素カプセル」として広く認知されており、血中のヘモグロビン結合型酸素だけでなく、溶解型酸素も増加させる作用がある。我々はこれまでに、2型糖尿病で生じる骨格筋の弱化が高気圧・高濃度酸素によって軽減することを確認している。2型糖尿病の骨格筋、及び心疾患の骨格筋では、共に、ミトコンドリア機能障害が生じる。2型糖尿病の骨格筋におけるミトコンドリア機能障害は高気圧・高濃度酸素によって軽減するため、心疾患でも同様の作用が期待される。また、高気圧・高濃度酸素は受動的な介入であるため、過度な心負荷を与えず、心疾患に伴う骨格筋の弱化予防に有効であると考えた。

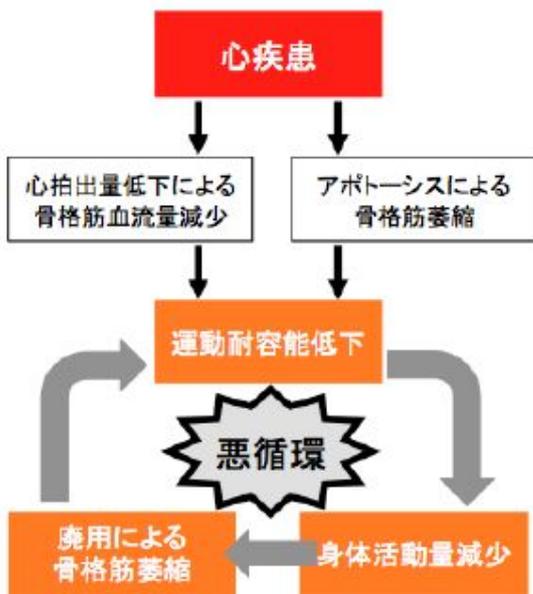


図1 心疾患における骨格筋弱化と運動耐容能低下の関係

2. 研究の目的

心疾患における骨格筋弱化の機序を確認

し、それらに対する高気圧・高濃度酸素の作用を確認することで、心疾患患者の運動耐容能低下に対する受動的な介入手段の開発へとつなげることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究は以下の順序で実施した。

(1) 高気圧・高濃度酸素が骨格筋の再生に及ぼす影響

Wistar 系雄性ラットの前脛骨筋に塩酸ブピカインを注入することで筋損傷を惹起した後、動物を高気圧条件(1.25気圧)で飼育する群と、通常気圧条件で飼育する群に区分し、高気圧・高濃度酸素が骨格筋の再生過程に及ぼす影響を検証した。

(2) 心不全誘導性骨格筋萎縮のタイムコースの確認

Wistar 系雄性ラットにモノクロタリンを腹腔内投与することで肺高血圧症、及び右心不全を惹起した。作製した心不全モデル動物の骨格筋を経日的にサンプリングし、筋萎縮とタンパク分解経路のタイムコースを確認した。

(3) 心不全に対する高酸素の影響

上述したモノクロタリン誘導性の右心不全モデルラットを用いて、高酸素の影響を検証した。モノクロタリンの腹腔内投与17日以降、動物を高酸素条件(酸素濃度約90%)で飼育する群と、通常酸素環境(酸素濃度約21%)で飼育する群に区分した。

4. 研究成果

(1) 高気圧・高濃度酸素が骨格筋の再生に及ぼす影響

再生の初期過程において、通常気圧条件で飼育した群に比べて高気圧条件で飼育した群は、活性化した筋衛星細胞数が有意に高値を示した(図2)。また、通常気圧条件で飼育した群に比べて高気圧条件で飼育した群は、筋線維の成熟が早期より生じた。これらの研究成果は関連学会、及び国際誌にて報告した。

(2) 心不全誘導性骨格筋萎縮のタイムコースの確認

モノクロタリンの腹腔内投与から14日後までは動物の体重が経日的に増加し続けたのに対して、モノクロタリン投与から14日以降は体重の増加が緩やかになり、モノクロタリン投与17~18日以降は体重が減少し続けた。なお、モノクロタリン投与14日後の時点では肺高血圧症が確認され、モノクロタリン投与21日後の時点では右心不全も併せて確認された。

モノクロタリン投与14日後の時点において(肺高血圧症の時期)、速筋と遅筋の両者共に、形態的な筋萎縮は認めなかった(図3)。

しかし、同時点において、筋萎縮は認めないものの、速筋においてのみ、ユビキチン・プロテアソーム系のマーカーである Atrogin-1 と MuRF-1、及びオートファジー・ライソソーム系のマーカーである LC3 と p62 の過剰発現を認めた(図4)。モノクロタリン投与 21 日後の時点において(右心不全の時期)、速筋と遅筋の両者共に、形態的な筋萎縮とユビキチン・プロテアソーム系、及びオートファジー・ライソソーム系を通じたタンパク分解の亢進を認めた。これらの結果は、筋萎縮は心不全の時期に顕著になるが、各種のカスケードを通じたタンパク分解は筋萎縮に先行して生じ、特に速筋においてその傾向が強いことを示唆している。これらの研究成果は関連学会、及び国際誌にて報告した。

(3) 心不全に対する高酸素の影響

モノクロタリン投与 16 日以降、動脈血酸素飽和度は大幅に低下した(図5)よって、この時点から動物を高酸素条件(酸素濃度約 90%)で飼育する群と、通常酸素環境(酸素濃度約 21%)で飼育する群に区分した。なお、高酸素条件で飼育した動物の動脈血酸素飽和度は、高酸素処置中は対照群と同程度に回復することを確認した。しかし、高酸素処置を開始したにも関わらず、通常酸素環境で飼育した群に比べて、高酸素条件で飼育した群の生存率は大幅に低下した。この高酸素がもたらした負の作用は現在解析中であり、国際誌にて報告する準備中である。

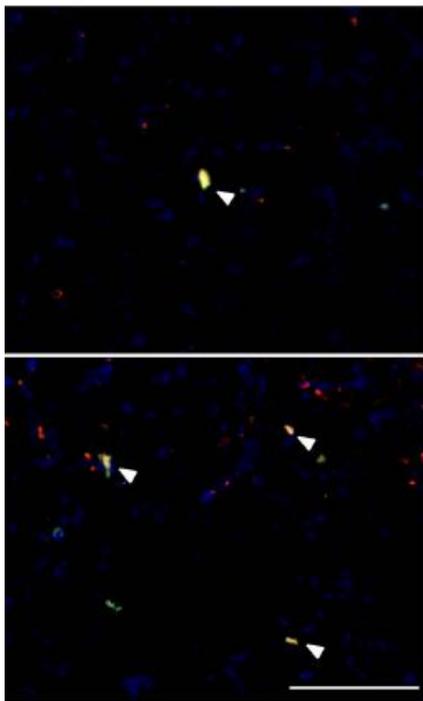


図2 筋損傷後の再生の初期過程における筋衛星細胞の活性化
損傷 7 日後において、通常気圧条件で飼育した群(上)と比べて高気圧条件で飼育した群(下)では、活性化した筋衛星細胞数(矢頭)が数多く確認された。

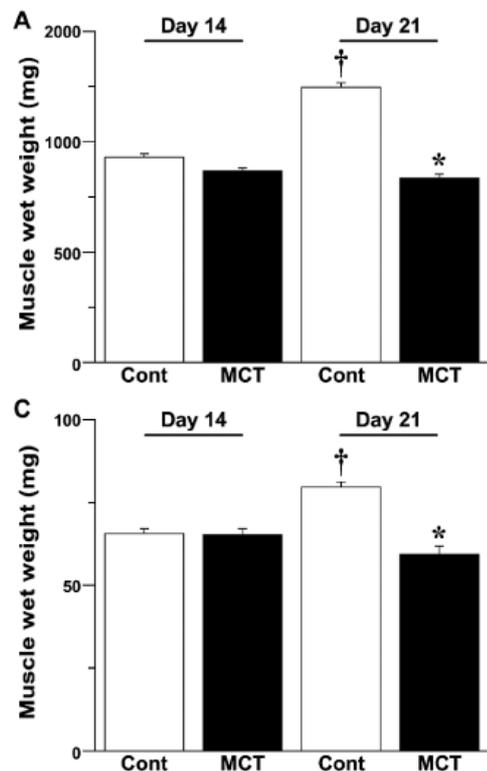


図3 心疾患における骨格筋重量の変化
モノクロタリン(MCT)投与 14 日後、速筋(上)、遅筋(下)共に、筋重量は対照群(Cont)と同程度であった。

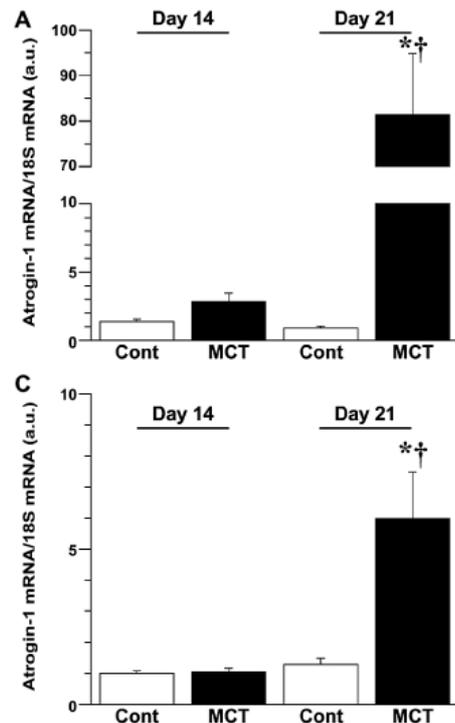


図4 心疾患の骨格筋におけるユビキチン・プロテアソーム系の活性化
モノクロタリン(MCT)投与 14 日後、速筋(上)では Atrogin-1 の発現が増加しているが、遅筋(下)の場合は対照群(Cont)と同程度の発現量であった。

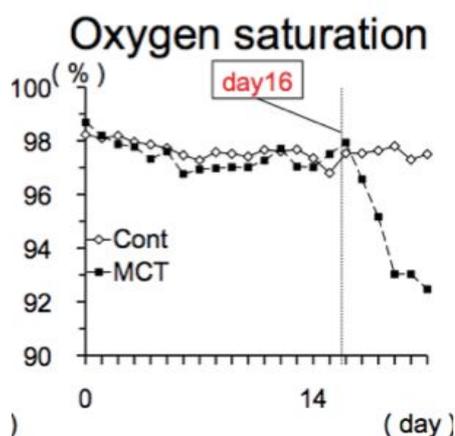


図5 モノクロタリン投与後の動脈血酸素飽和度の変化
モノクロタリン (MCT) 投与 16 日以降、動脈血酸素飽和度は大幅に低下した。

(4) 今後の展望

高気圧・高濃度酸素は、骨格筋における損傷後の再生を早期化させた。一方、高気圧・高濃度酸素は心疾患の生存率を低下させた。高気圧・高濃度酸素が負に作用した原因として、呼吸器に対する高度の酸素負荷が肺高血圧症に関わる病態を助長した可能性を考えており、現在、肺と心臓のサンプルを解析中である。

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2件)

1. Fujita N, Fujino H, Sakamoto H, Takegaki J, Deie M. Time course of ubiquitin-proteasome and macroautophagy-lysosome pathways in skeletal muscle in rats with heart failure. *Biomed Res* 36: 383-92. 2015. 査読有り
DOI: 10.2220/biomedres.36.383.

2. Fujita N, Ono M, Tomioka T, Deie M. Effects of hyperbaric oxygen at 1.25 atmospheres absolute with normal air on macrophage number and infiltration during rat skeletal muscle regeneration. *PLoS One* 9: e115685. 2014. 査読有り
DOI: 10.1371/journal.pone.0115685. eCollection 2014.

[学会発表](計7件)

1. 藤田直人, 山崎菜月, 江藤佳那子, 今北英高, 藤野英己, 出家正隆. モノクロタリン誘導性右心不全ラットの骨格筋におけるユビキチン・プロテアソーム系ならびにオートファジー・ライソソーム系の経時的変化. 第 51 回日本理学療法学会大会. 2016 年 5 月 27 日~29 日 (札幌)

2. 江藤佳那子, 山崎菜月, 藤田直人, 出家正

隆. 運動の時間配分の違いが骨格筋のミトコンドリア新生に及ぼす影響. 第 27 回広島スポーツ医学研究会. 2016 年 2 月 7 日 (広島)

3. 藤田直人, 藤野英己, 坂本裕規, 竹垣淳也, 出家正隆. モノクロタリン誘導性右心不全ラットの骨格筋におけるタンパク質分解系の経時的変化. 第 70 回日本体力医学会大会. 2015 年 9 月 18 日~20 日 (和歌山)

4. 藤田直人, 小野美遥, 富岡智香, 出家正隆. 軽度な高気圧環境が骨格筋再生におけるマクロファージ動態に及ぼす影響. 第 120 回日本解剖学会第 92 回日本生理学会大会. 2015 年 3 月 21 日~23 日 (神戸)

5. 藤田直人, 小野美遥, 富岡智香, 出家正隆. 1.25 気圧環境が骨格筋再生における M1 及び M2 マクロファージ動態に及ぼす影響. 第 69 回日本体力医学会大会. 2014 年 9 月 19 日~21 日 (長崎)

6. 小野美遥, 藤田直人, 富岡智香, 出家正隆. 1.25 気圧による高気圧高濃度酸素療法が骨格筋再生におけるマクロファージ動態に及ぼす影響. 第 49 回日本理学療法学会大会. 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日 (横浜)

7. 富岡智香, 藤田直人, 小野美遥, 出家正隆. 1.25 気圧による高気圧高濃度酸素療法が骨格筋の TCA 回路にもたらす即時的な影響. 第 49 回日本理学療法学会大会. 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日 (横浜)

[その他]

ホームページ等

(1) 広島大学研究者総覧

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.5e006975e285125d520e17560c007669.html>

(2) 研究室のホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/deielab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直人 (FUJITA NAOTO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師
研究者番号: 90584178