

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：33604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560367

研究課題名(和文) アクセラレーション刺激による筋損傷治癒促進効果の検証

研究課題名(英文) Effects of whole body vibration on muscle regeneration after injury

研究代表者

河野 史倫 (Kawano, Fuminori)

松本大学・健康科学研究科・准教授

研究者番号：90346156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋へのメカニカルストレスは筋肥大や筋細胞の増殖には有効な刺激であるものの、損傷筋への負荷は更なる損傷を引き起こすリスクとなる可能性がある。そこで本研究では、全身振動による加速度変化が筋損傷からの治癒を改善することができるのか検討を行った。成熟ラットのヒラメ筋にカルジオトキシンを注入し、14日目までの期間、全身振動による介入を行った。その結果、介入群では7日目にはPax7陽性の筋衛星細胞数が増加し、14日目ではジストロフィンが周辺局在する成熟筋線維のサイズ増加が認められた。以上から、アクセラレーション刺激はサテライト細胞の増加を誘発することで筋再生の立ち上がりを早めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Most of sports activity-related injury accompany with skeletal muscle injury. However, the effective therapeutic theory is not developed. Although mechanical stress is a known anabolic stimulation, mechanical overload leads to a risk inducing further damage to the injured muscle. Therefore, we investigated the effects of whole body vibration (WBV), which enhances the acceleration level, on the regeneration of injured muscle in the present study. Adult rats with the cardiotoxin-induced muscular injury on left soleus muscles were given WBV from 3th to 13th day after the injury. Soleus muscles were sampled on day 7 and 14 from both WBV and non-WBV rats. Pax7-positive satellite cells increased in WBV rats on day 7. On day 14, cross-sectional area of fibers with peripheral localization of dystrophin was greater in WBV than that of non-WBV rats. These results suggested that WBV promoted the onset of muscle regeneration via the enhanced recruitment of satellite cells after injury.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：アクセラレーション刺激 筋損傷 筋再生

1. 研究開始当初の背景

スポーツ障害による運動機能の低下は、スポーツパフォーマンスに影響を与えるだけでなく、アスリートにおいては選手生命にも関わる。プロアスリートのように試合やトレーニングを高強度且つ継続して実施する選手においては、慢性的なスポーツ障害を抱えたままスポーツ活動を続行するケースが頻発しているのも現状である。多くのスポーツ障害は、プレー中の過負荷やオーバーユース、接触などによって引き起こされる。このようなスポーツ障害の多くは肉離れや筋断裂、筋挫傷のような骨格筋損傷を伴うが、筋損傷に対する効果的な処置は今のところ確立されておらず、ほとんどの場合で自然治癒に頼らざるを得ない。スポーツ障害後の早期復帰や治療期間の脱トレーニングによる影響を回避するためにも、筋損傷への効果的な治療方法が求められる。

骨格筋が損傷を受けた場合、損傷部位の壊死および炎症が誘発され、筋線維の新生により再生が起こる。ラットやマウスの骨格筋に薬理的損傷を与えた場合、受傷後 1~3 日間は筋線維の壊死ならびに炎症反応による壊死筋線維の破壊が引き起こされる(文献 1)。炎症後期には筋芽細胞の増殖が起こり、筋管への分化を経て筋線維に成熟する。このような筋発生過程において筋芽細胞の増殖は、再生速度や効率を決定する非常に重要な因子となることが知られている。筋系細胞の増殖抑制因子であるミオスタチンを欠損した骨格筋は、筋芽細胞の増殖が異常に亢進し、発生的に筋肥大を起こす(文献 2)。また、後天的に衛星細胞を欠損させたマウスの骨格筋では、損傷後の筋再生が起こらないという先行研究結果(文献 3)からも、筋再生における筋芽細胞の役割が明らかである。しかし、生体内において筋芽細胞の増殖を刺激する方法は明らかにされていない。本研究では、加速度変化によるメカニカルストレス(アクセラレーション刺激)が筋再生にどのような効果を果たすのか、また効果的なタ

イミングや刺激量の検討を行う。

2. 研究の目的

メカニカルストレスは細胞の諸機能に影響を与える刺激である。例えば、筋芽細胞では、伸展刺激などによるメカニカルストレスの負荷が筋肥大を促進する刺激になることが *in vitro* で明らかにされている(文献 4)。特に、静的な伸展よりも繰り返しの伸縮に対しより強い応答を示すことから、相対的なメカニカルストレスレベルの変化が重要な生理刺激になると考えられてきた。このようなメカニカルストレスを損傷筋に与えることで再生を助長することができるのであろうが、損傷筋へのメカニカルストレスは更なる損傷を誘発する可能性もあるため、実際の臨床応用には適さない。全身振動を与えた場合の加速度変化による刺激(アクセラレーション刺激)は、重力と同様のパラメータの刺激であるが、重力のようにコンスタントな荷重ではなく、加速度変化は細胞や分子の質量により力学的負荷を発生させる。そこで本研究では、高頻度(30Hz)のアクセラレーション刺激が、筋再生にどのような効果をもたらすのか検討した。

3. 研究の方法

8 週齢のウィスターハノーバー雄ラットを介入群と非介入群に分けた。両群の左ヒラメ筋にカルジオトキシン(CTX)を注入し、筋損傷を誘発した。介入群では、1日10分間約1.5-Gのアクセラレーション刺激を30Hzの頻度で損傷後3日目から毎日与えた。非介入群は通常飼育とした。ヒラメ筋のサンプリングは損傷7日目と14日目に行い、それぞれにおいて最後のアクセラレーション刺激は前日に行った。摘出したヒラメ筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し、マイナス20℃に保たれたマイクロトーム内で凍結切片を作成した。これらの切片にHE染色ならびに免疫組織化学染色を施し、筋分化マーカー(Pax7、myogenin、ジス

トロフィン、新生児型ミオシン重鎖)とラミニンをラベルし、筋分化レベルならびに筋線維サイズを評価した。

4. 研究成果

通常筋再生においては、損傷初期に炎症に伴う筋重量増加が認められた後、7日目では筋重量の顕著に低下し、14日目では正常までは達しないものの重量増加する。アクセラレーション刺激による介入を行った筋は、非介入群に比べ重量増加する傾向があったものの有意差は認められなかった(図1)。7日目では、未熟な筋細胞が多く見られるものの、サイズは小さく、間質にも単核細胞が多く観察された(図2)。

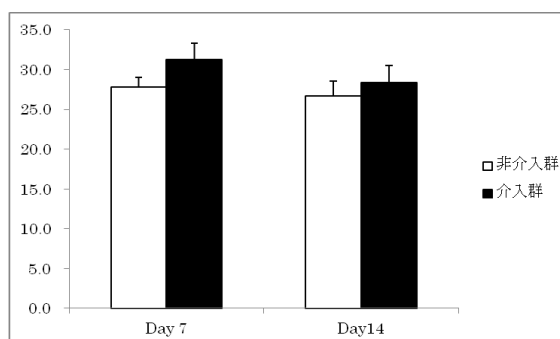


図1: 体重あたりの相対筋重量の変化。

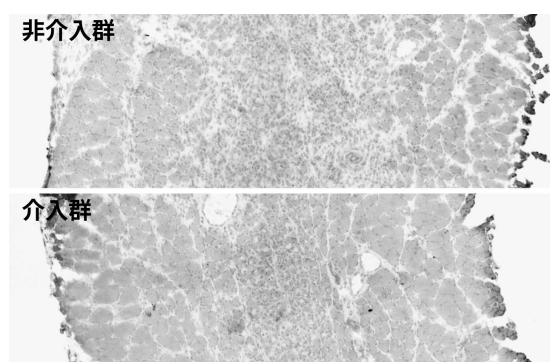


図2: CTX注入後7日目のHE染色像。特に筋中心部で未熟な筋線維が多く分布するが、介入群の筋ではこれらの筋線維のサイズが大きい。

ジストロフィンが細胞周辺に局在する成熟した筋線維の数は、介入群で顕著に多く、ラミニンでラベルされる基底膜内に新生児型ミオシン重鎖でラベルされる

エリアも非介入群に比べ多く認められた。14日目には、両群とも中心核を保有する筋線維の顕著な出現が認められ、筋束の形成も全体的に観察された。介入の有無によって組織像には大きな差はなかったものの、個々の筋線維サイズは介入群で有意に増大した。筋サテライト細胞のマーカである Pax7 陽性の細胞数は、7日目では介入群において増加したが、14日目では介入による差は見られなかった。筋管のマーカである myogenin は、7日目、14日目ともに介入の影響を受けなかった。以上の結果から、アクセラレーション刺激はサテライト細胞の増加を誘発することで筋再生の立ち上がりを早めることが示唆された。アクセラレーション刺激がどのようなメカニズムでサテライト細胞を増加させるのか、更なる研究が必要である。

引用文献

1. Fujita et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody (MR16-1) promotes muscle regeneration via modulation of gene expression in infiltrated macrophages. *BBA* 1840: 3170-80, 2014.
2. Lee SJ and McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS* 98: 9306-11, 2001.
3. McCarthy et al. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* 138: 3657-66, 2011.
4. Nakai et al. Mechanical stretch activates signaling events for protein translation initiation and elongation in C2C12 myoblasts. *Mol Cells* 30: 513-8, 2010.

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)

[学会発表](計 4件)

1. 河野史倫、花井達広、武靖浩、馬込卓弥、中田研。骨格筋再生における問題

点と全身振動介入によるアプローチ。
第 2 回パワープレート情報交換会
(2015 年 11 月、東京都)

2. 河野史倫、小野悠介、藤田諒、中田研、大平充宣、中井直也。再生におけるエピゲノム変化が過負荷による肥大応答性に及ぼす影響。第 70 回日本体力医学会大会(2015 年 9 月、和歌山県)。
3. 河野史倫、小野悠介、藤田諒、長谷川俊介、中田研、大平充宣、中井直也。胎児筋核の喪失が骨格筋のエピゲノムおよび遺伝子制御に及ぼす影響。第 3 回骨格筋生物学研究会(2015 年 3 月、宮城県)。
4. 河野史倫、内田良平、上田譲、中井直也、中田研。骨・筋の再生過程における全身振動の介入効果検討。第 1 回パワープレート情報交換会(2014 年 6 月、東京都)。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 史倫 (KAWANO, Fuminori)
松本大学・健康科学研究科・准教授
研究者番号： 90346156

(2)研究分担者

中田 研 (NAKATA, Ken)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 00283747

(3)連携研究者

なし