

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）  
大学院医療福祉研究科博士課程

廃用性筋萎縮の病態と再荷重の過程における  
骨格筋再構築と筋内血管の新生

2019 年度

保健医療学専攻・理学療法学分野・基礎理学療法学領域  
学籍番号：17S3002 氏名：相原 正博  
研究指導教員：丸山 仁司教授  
副研究指導教員：堀本 ゆかり教授

# 廃用性筋萎縮の病態と再荷重の過程における骨格筋再構築と筋内血管の新生

相原 正博 著

## 要旨

**【目的】** 廃用性筋萎縮から再荷重の過程におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) および筋内血管の動態を検討する。

**【方法】** 9 週齢のマウス (C57BL6) を、コントロール群 (Co 群 : n=7), ギプス固定群 (CI 群 : n=7), 再荷重 1 日群 (RL1 群 : n=7), 再荷重 14 日群 (RL14 群 : n=7) に分けた。各群の組織学的解析を行い、次いで MMPs の遺伝子発現解析, 血中濃度測定を実施した。さらに, 筋内血管の評価を, 組織学的解析や血管内皮増殖因子 (VEGF) および関連遺伝子の発現解析や血中濃度測定にて実施した。

**【結果】** 廃用性筋萎縮から再荷重の過程において, MMPs は骨格筋と血清において異なる動態でダイナミックに変動することが明らかになった。MMP-2, 9 と関連する遺伝子を STRING にて検索すると, VEGF が強く関連していた。また, エンリッチメント解析の結果から, この過程で血管新生の調節や形成, 発達に関わる遺伝子が段階的に変動していることが示された。そこで, 筋内血管を評価したところ, この過程で筋内血管の減少と新生という大きな変化が起こっていることが分かった。

**【結論】** MMPs は臨床でよくみられる廃用性筋萎縮に関する病態においても重要な役割を果たし, VEGF を介した筋内血管新生に関与する可能性が示唆された。

キーワード

廃用性筋萎縮, ギプス固定, 再荷重, マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs), 血管新生, 血管内皮増殖因子 (VEGF)

# Skeletal muscle remodeling and angiogenesis of intramuscular blood vessels in the process of disuse muscle atrophy and reloading

Aihara Masahiro

## Abstract

[Purpose] In this study, we examined the dynamics of MMPs and intramuscular blood vessels in the process of disuse atrophy and reloading.

[Method] 9-week-old male C57BL6 mice were divided into 4 groups: a control (Co) group, a 2-week cast immobilization (CI) group, reloaded one day after casting (RL 1) group and reloaded 14 days after casting (RL 14) group. After the experiment period, muscles were removed and the histological analysis were carried out. Then, gene expression and blood concentrations of MMPs and related molecules in each group were analyzed. In addition, we evaluated intramuscular blood vessels by histological analysis, gene expression analysis and blood concentration measurement of VEGF (vascular endothelial growth factor) and related genes.

[Results] MMP-2 and MMP-9 were shown respective dynamic change in skeletal muscle and serum during muscle atrophy and reloading. It was suggested that VEGF is strongly related with both MMP-2 and MMP-9 by searching STRING database. The results of enrichment analysis showed that genes involved in the regulation, formation, and development of angiogenesis are gradually changing during disuse muscle atrophy to reloading. Then, we evaluated intramuscular blood vessels, we found that there was a major change which the decrease and angiogenesis of intramuscular blood vessels during this process.

[Conclusion] MMPs are suggested to play an important role in the pathophysiology of disuse muscle atrophy, which is common in clinical practice, and may be involved in intramuscular angiogenesis via VEGF.

## Keywords

disuse muscle atrophy, cast immobilization, reloading, matrix metalloproteases (MMPs), angiogenesis, VEGF (vascular endothelial growth factor)

## 略語・用語集

MuRF-1 : Muscle RING-Finger Protein-1

atrogin-1

IGF-1 : Insulin-like growth factors

Matrix metalloproteases (MMPs) : マトリックスメタロプロテアーゼ

Cast Immobilization : ギプス固定による不働化

Reloading : 再荷重

Hematoxylin-eosin stain : ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E 染色)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) : 血管内皮増殖因子

# 目次

## 第1章 はじめに

1-1 理学療法の現状	1 頁
1-2 廃用性筋萎縮について	1 頁
1-3 廃用性筋萎縮に対する基礎的知見について	2 頁
1-4 廃用性筋萎縮に対する介入	2 頁
1-5 廃用性筋萎縮の病態と MMP	3 頁
1-6 筋内血管について	4 頁
1-7 目的と意義	6 頁
1-8 本研究の仮説	7 頁

## 第2章 方法

2-1 対象	8 頁
2-2 廃用性筋萎縮の誘発方法	9 頁
2-3 再荷重方法	10 頁
2-4 測定・解析頁目	10 頁
2-4-1 体重, 筋湿重量, 組織学的評価	10 頁
2-4-2 血清の調製	11 頁
2-4-3 筋損傷の評価	11 頁
2-4-4 血中の MMPs 測定	11 頁
2-4-5 骨格筋中の遺伝子発現量と関連する遺伝子群の解析	12 頁
2-4-6 免疫蛍光染色	12 頁
2-4-7 筋内血管の評価	13 頁
2-5 統計学的解析	13 頁
2-6 倫理的配慮	13 頁



5-1 結論 .....	32 頁
第 6 章 謝辞	
6-1 謝辞 .....	33 頁
引用文献 .....	34 頁
添付資料 .....	37 頁
3 年間の研究業績（学術論文，学会発表，研究助成） .....	50 頁



# 第1章 はじめに

## 1-1 理学療法の現状

理学療法の対象は、中枢神経系や整形外科系、内部障害など多岐に渡る。様々な疾患がある一方で、理学療法士の実態調査では、筋力低下や関節可動域制限の機能障害が理学療法の対象の上位に位置していた<sup>1)</sup>。このことから明らかなように、骨格筋を対象とした理学療法は疾患に関わらず頻繁に行われている。現在のわが国では超高齢社会を迎えており、65歳以上の高齢者人口が3515万人を超え<sup>2)</sup>、理学療法の対象は今後も機能面の低下を呈する高齢者であることが予測される。そのため、高齢者における骨格筋の機能を詳細に理解することが今後ますます重要になると考えられる。しかし、現在の理学療法では、指標となる評価項目が少なく、臨床経験に頼らざるを得ない状況もある。状況に応じた最適な理学療法を実施するには、科学的根拠に基づいた理学療法を理解する必要がある。

## 1-2 廃用性筋萎縮について

骨格筋の機能障害の一つに廃用性筋萎縮が挙げられる。廃用性筋萎縮は、外傷などの骨折に対する治療であるギプス固定<sup>3)</sup>などの不活動によって生じ、寝たきりの原因にもなる。超高齢社会であるわが国では、廃用性筋萎縮に対する理学療法の対策は喫緊の課題であると考えられる。廃用性筋萎縮の評価は、握力や筋力検査、筋量の測定によって行われる。これらによって大まかな機能評価は可能であるが、詳細な病態の理解や理学療法の適応を判断することは困難である。そのため、廃用性筋萎縮の病態理解のために、筋萎縮誘発モデルマウスを用いた基礎的な検討研究が多くなされている。廃用性筋萎縮の誘発には、後肢・尾部懸垂<sup>4)5)</sup>やギプス固定<sup>6)7)</sup>、ワイヤー<sup>8)</sup>、マジックテープ（ベルクロ）<sup>9)</sup>などによって行われる。これらの誘発方法によって廃用性筋萎縮のメカニズムが検討可能になった。

### 1-3 廃用性筋萎縮のメカニズムについて

骨格筋は、筋構成タンパク質の合成と分解が行われ均衡が保たれている。骨格筋が萎縮する場合、筋構成タンパク質の分解が合成能を上回ることで萎縮が生じる。タンパク質の分解は、カテプシン群のリソソーム経路、カルパインによるカルシウム依存性経路、ユビキチン-プロテアソーム系が挙げられる。ユビキチン-プロテアソーム系は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) という酵素が分解されるべきタンパク質に結合し標識される (ユビキチン化)。ユビキチン化されたタンパク質は、タンパク質分解酵素であるプロテアソームによって認識・分解が行われる。先行研究において、非荷重によってユビキチン-プロテアソーム系が筋萎縮で重要な働きをしているとされている<sup>10)</sup>。筋萎縮に関わるユビキチンリガーゼは、MuRF-1 (Muscle RING-Finger Protein-1) や atrogin-1 であることが明らかになっている<sup>11)</sup>。

タンパク質の分解を亢進させる要因は、骨格筋の成長に関わる IGF-1 抵抗性の惹起や酸化ストレスによる筋萎縮誘発関連因子発現の刺激などが挙げられる。IGF-1 は成長因子の一種で細胞膜に存在する IGF-1 受容体に結合することで、シグナル伝達が起こり、タンパク質の合成が促進される。しかし、不活動によって IGF-1 抵抗性が促進し筋肥大に関わる Akt/mTOR 経路が阻害される。これによって、ユビキチンリガーゼである MuRF-1 や atrogin-1 の発現が誘発され、タンパク質の分解が亢進される<sup>12)</sup>。酸化ストレスはタンパク質や脂質、糖質などが酸化した結果、生体にとって有害な状態となる。これを相殺するために抗酸化力が働き均衡を保っている。しかし、廃用性筋萎縮によって抗酸化力が低下し、酸化ストレスへの抵抗性が低下する報告もある<sup>13)</sup>。このように、廃用性筋萎縮を誘発する要因は様々であり、明確な原因は明らかとなっていない。

### 1-4 廃用性筋萎縮に対する介入

これまでに、廃用性筋萎縮に対する機械刺激による介入の検討が数多く報告されている。動物

実験では、廃用性筋萎縮予防として温熱刺激の効果を検討した報告<sup>14)</sup>や、他動的筋伸張刺激の効果を検討した報告<sup>13)</sup>や、持続的伸張刺激による下腿の筋萎縮の回復を検討した報告<sup>16)</sup>がある。伸張刺激は筋萎縮の進行を抑制するとされ、臨床においてもベッドサイドで実施が可能である。しかし、伸張刺激のみで寝たきりや筋萎縮の改善を図るのは困難である。

早期リハビリテーションの臨床において、離床させる運動療法の一つに荷重がある<sup>17)</sup>。通常、ヒトは重力に対する抗重力活動があり、頸部筋や脊柱起立筋、大腿二頭筋、ヒラメ筋は主要姿勢筋とも呼ばれ、姿勢制御に関わっている<sup>18)</sup>。ラットのヒラメ筋では、2週間の非荷重にて筋湿重量は半減する。また、非荷重によって、骨格筋は萎縮を生ずるのみならず、機能も低下する。このため、寝たきりから早期離床（荷重）させることが重要である。荷重は、下腿後面筋を伸張させ、筋収縮を得ることができる。しかし、介入時期や介入効果判定の客観的指標となるものは確立されていない。

## 1-5 廃用性筋萎縮の病態と MMP

骨格筋細胞はコラーゲン線維や筋鞘と呼ばれる細胞膜に覆われ、細胞膜と筋線維と結合するジストロフィンなどによって細胞形態を維持している。これらの細胞を安定化させるタンパク質が分解されると骨格筋細胞の形態を維持出来なくなる。骨格筋細胞の形成と維持に関与する因子の1つとして、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteases : 以下 MMPs) がある。

MMPs は、細胞外マトリックスを加水分解するタンパク分解酵素の総称である。現在までに MMPs には 20 を越える種類があることが知られている (表 1<sup>19)</sup>)。MMPs の主な機能としては、細胞外基質やコラーゲンなどを分解し細胞の再構築 (リモデリング) に関与していると考えられている。MMPs は組織の損傷や炎症といった病態に応じて発現量が変化する。つまり、何かしらの病態に応じて反応を示し、サイトカインや成長因子、ホルモンなどによって制御される。骨格筋に関しては、筋の壊死・再生が顕著である筋ジストロフィーなどの筋疾患において、発現が増加することが報告されている。また、関節リウマチや癌細胞の浸潤においても関与する。MMPs

の中でも主要なものが MMP-2 及び MMP-9 である。これらは、MMPs の中でゼラチナーゼ群に分類され、基底膜などのコラーゲンを分解する<sup>20)</sup>。その結果、組織は原型を維持することが困難となり破壊される。MMP-2 及び MMP-9 は、筋ジストロフィーなどの筋疾患で骨格筋の再構築に影響を及ぼすことが分かっている<sup>21)22)</sup>。廃用性筋萎縮の病態や運動介入した際にも骨格筋の再構築が生じている可能性が示唆される。しかし、廃用性筋萎縮の病態における MMPs の動態はこれまで詳細な検討はなされていない。

表 1 MMPs の分類<sup>19)</sup>

Subgroups	MMP	Synonyms	Matrix substrates	proMMP and others
Collagenases	MMP-1	interstitial collagenase	collagens (I, II, III, IIV, and X), gelatin, aggrecan	proMMP-2, 9
	MMP-8	neutrophil collagenase		
	MMP-13	collagenase 3		
Gelatinases	MMP-2	gelatinase A, 72 kD type IV collagenase	collagens (IV, V, VII, X and XIV), gelatin, elastin, aggrecan, fibronectin	proMMP-1, 9, 13
	MMP-9	gelatinase B, 92 kD type IV collagenase		
Stromelysins	MMP-3	stromelysin 1, progelatinase	collagen X, gelatin	proMMP-1, 7, 8, 9, 13 proMMP-1, 8, 9 proMMP-1
	MMP-10	stromelysin 2		
	MMP-11	stromelysin 3		
	MMP-12	macrophage elastase, metalloelastase		
Membrane-type MMPs (MT-MMPs)	MMP-14	MT1-MMP	collagens (I, II and III), gelatin, fibronectin, laminin, proteoglycans	proMMP-2, 13
	MMP-15	MT2-MMP	collagens (I, II and III), fibronectin, aggrecan	proMMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	collagen III, gelatin, fibronectin	proMMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	gelatin, fibronectin	
	MMP-24	MT5-MMP		
	MMP-25	Leukolysin	gelatin, fibronectin, laminin-1	
Matrilysins	MMP-7	matrilysin	collagen (IV, X), aggrecan, elastin, entactin, fibronectin, gelatin, laminin	proMMP-1, 9, FasL, proHB-EGF
	MMP-26	matrilysin-2, endometase	collagen IV, gelatin, beta-casein, fibrinogen, fibronectin, vitronectin	proMMP-9

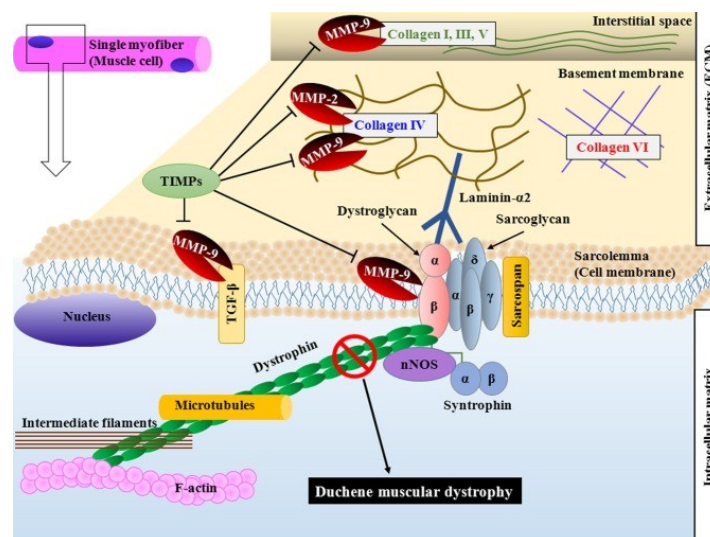


図 1 骨格筋における MMPs の作用<sup>20)</sup>

## 1-6 筋内血管について

MMPs は細胞外基質やコラーゲンを分解する酵素であるとともに、腫瘍細胞において血管増殖にも関与することが明らかになっている<sup>23)</sup>。血管内皮細胞から分泌された MMPs が血管の基底膜を分解し、血管透過性を高めることも報告されている。このように、MMPs は組織の再構築のみならず、血管形成にも関与していることが考えられる。

血管の形成には①血管新生 (Angiogenesis)、②動脈形成 (Arteriogenesis)、③脈管形成 (Vasculogenesis) の3つの機序が存在するとされている (図 1<sup>24)</sup>)。

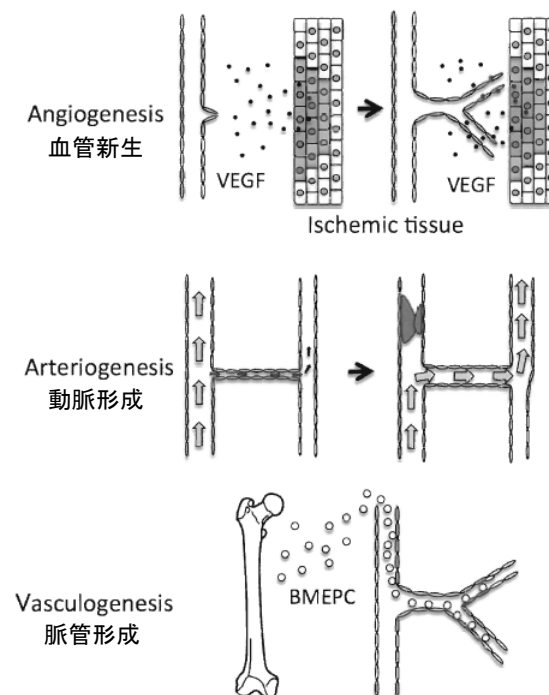


図 2 血管形成の機序 (循環系の基礎と臨床 (2) 血管新生より、一部改変)

血管形成に関わる因子として、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor : VEGF) が知られている。VEGF は、血管内皮細胞の増殖・遊走の誘導、管腔形成の促進、凝固・線溶系因子及び細胞接着因子の発現を誘導することが報告されている。そのため、VEGF は血管形成におけるバイオマーカーとみなされている。また、VEGF は血管新生から動脈形成、脈管形成の全般に関与している。血管新生は既に存在する血管から新たな血管が形成される過程のこと

を指し、脈管形成は胎児の時期から血管が形成される過程を意味している。本研究では、図 2<sup>25)</sup>の血管新生に着目し検討を行うこととした。

最近、廃用性筋萎縮を誘発すると骨格筋中の毛細血管数が減少すると報告され、骨格筋中の循環動態の変化が筋萎縮に影響を与える可能性が示唆された<sup>26)</sup>。しかし、廃用性筋萎縮と再荷重の過程における筋内血管の詳細な動態は解明されていない。

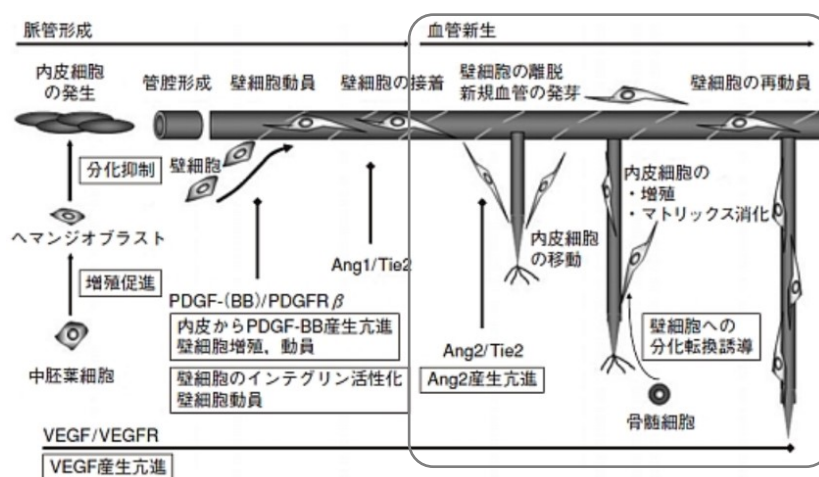


図 3 血管形成のメカニズム（レニン・アンジオテンシン系のすべてより、一部改変）

枠内：本研究で着眼している血管新生のメカニズム

### 1-7 目的と意義

超高齢社会であるわが国にとって、身近でよく見られる廃用性筋萎縮の病態理解及び介入時の生体反応を理解することは重要であり、リハビリテーションのエビデンスを高めることに繋がると考えられる。介入時の生体反応を理解することで、介入時のリスク管理や理学療法プログラムを立案する上で裏付けが可能になると考える。そのため、本研究では、廃用性筋萎縮から再荷重の過程における MMPs の動態をより詳細に検討するとともに、これに伴って骨格筋内でどのような変化が起きているのか検討することを目的とした。

## 1-8 本研究の仮説

廃用性筋萎縮の誘発によって骨格筋の萎縮が進行するが、この筋萎縮に伴って筋内血管の減少が生じると考えられる。この過程に、MMPs (MMP-2 や MMP-9) が関与していると推測した。また、その後再荷重を実施することで骨格筋の肥大が促されるが、この過程で骨格筋細胞の再構築が生じ、ここでも MMPs が重要な役割を果たすと推測した。そして、この MMPs と連動して筋内血管の新生が生じると仮説を立てた。

## 第 2 章 方法

### 2-1 対象

本研究では、MMPs の動態をより詳細に検討するとともに、これに伴って骨格筋内でどのような変化が起きているのか検討することを目的とした。そのために、ギプス固定法による筋萎縮誘発モデルマウスを用いた。近交系実験用マウス C57BL/6 のオス (9 週齢) を、通常飼育を行うコントロール群 (Control:Co 群)、ギプス固定を用いた廃用性筋萎縮モデルのギプス固定群 (Cast Immobilization:CI 群)、筋萎縮誘発後に再荷重を 1 日間実施した群 (Reloading for 1 day:RL1 群)、筋萎縮誘発後に再荷重を 14 日間実施した群 (Reloading for 14 day:RL14 群) の 4 群に割り付けた (各 7 匹)。また、炎症の有無など比較するため、*mdx* マウス (ジストロフィン欠損型) を用いた。

### 2-2 廃用性筋萎縮の誘発方法

筋萎縮モデルマウスを作成するにあたり、以下の手順でギプス固定を行って筋萎縮を誘発した (図 3)。まず、マウスを徒手にて保定し、左後肢の膝関節伸展、足関節底屈位にて保持する (図 3A)。次いで、予め用意していたサージカルテープ (非伸縮性) を後肢の近位部から巻き始め、足部中央部まで仮固定した (図 3B)。足部は、浮腫等の循環障害の有無を確認できるように露出した。仮固定により後肢の不動化を確認した後、キャストリングテープ (3M Scotchcast Plus-J®) を 0.5cm 幅で 15cm 程度切除したものを水に浸け、仮固定同様に近位部よりサージカルテープ上に巻き付けていった (図 3C)。キャストリングテープの硬化完了を確認し (図 3D)、マウスをケージ内に戻した (図 3E)。さらに、不動化した後肢が荷重していないかを確認した。ギプス固定群のマウスは、飼育期間中前肢と対側後肢を用いて自由に餌や水が摂取できるようにした。先行研究にて筋萎縮は 2 週間の不動化で十分誘発されることが示されているため<sup>9)</sup>、筋萎縮誘発期間



は 2 週間とした。筋萎縮誘発期間中に足部の浮腫等の循環障害や、ギプス固定の緩み、損傷が生じた際は巻き直しを行った。

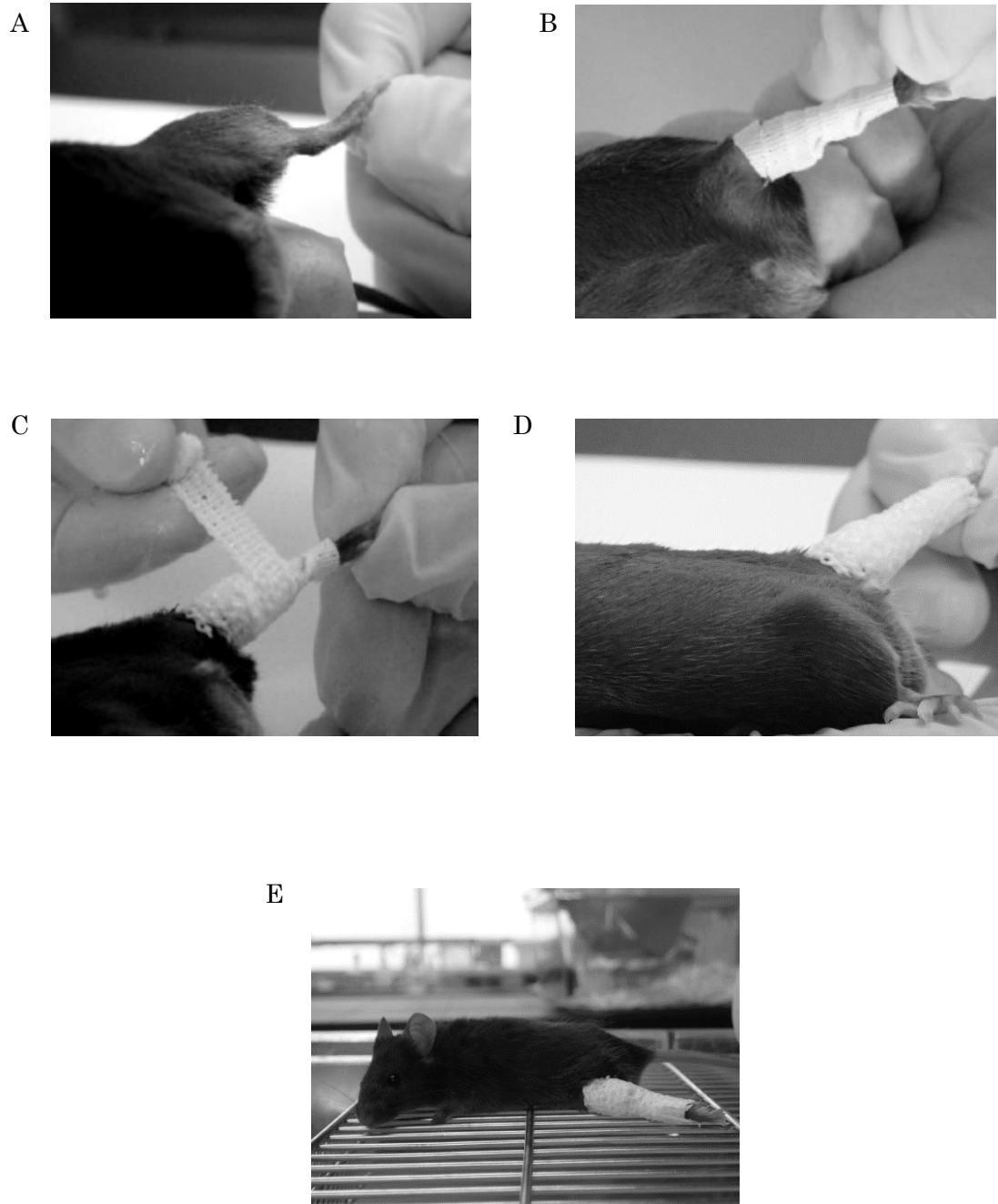


図 4 ギプス固定を用いた廃用性筋萎縮誘発手順

### 2-3 再荷重方法

ギプス固定による 2 週間の筋萎縮誘発後にギプス固定を除去し、ケージ内を通常飼育することで再荷重とした。ギプス固定を実施していた後肢の運動は制限が無いこととした。なお、再荷重期間は 1 日間及び 14 日間とした。

### 2-4 測定・解析頁目

今回の実験において、各群に以下の評価を実施した。

#### 2-4-1 体重，筋湿重量，組織学的評価

体重は、それぞれの処置及び介入が終了した時点で計測を行った。骨格筋の筋萎縮・改善の評価を行うため、骨格筋の筋湿重量及びヘマトキシリン・エオジン染色 (Hematoxylin-eosin stain: H&E 染色) によって形態学的に観察を行った。筋湿重量の測定は、実験期間終了後にマウスをイソフルラン吸入下にて安楽死させ、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋の 3 筋を摘出した。摘出した筋の筋湿重量をそれぞれ測定し、各群の 3 筋の形態学的変化を観察するために、写真撮影を行った。その後、コルク片にカバーガラスを立てたものに垂直に乗せ、コンパウンドにて筋をコルク片上に固定した。次いで、コルク片ごと液体窒素で間接的に冷却したイソペンタン内で攪拌しながら凍結を行った。凍結完了後は、イソペンタンの蒸発が完了した後に $-20^{\circ}\text{C}$ にて冷凍保存した。筋凍結切片の作成にはクライオスタット (Leica 社製, Cryostat) を $-20\sim-25^{\circ}\text{C}$ 程度に設定し使い、凍結した骨格筋を $10\mu\text{m}$ の厚さで筋切片を作成し、スライドガラス上に配置した。

骨格筋の組織学的評価は、H&E 染色を用いて実施した。骨格筋に異常があると、中心核や筋細胞の大小不同、壊死線維の存在、マクロファージや好中球などの炎症細胞浸潤、細胞質間の拡大などが観察される。中心核は、筋線維の再生変化を意味している。壊死線維が存在する場合に

は、筋細胞質の溶解により H&E 染色時に薄いピンク色となり、マクロファージが侵入する。本研究では、筋萎縮の特徴である筋細胞の縮小や、再荷重による筋損傷、筋再生の特徴である中心核、マクロファージや好中球などの炎症細胞浸潤、細胞質間の拡大の有無などに特に注目して観察した。

#### 2-4-3 血清の調製

血液サンプルは、各群とも筋生検時に全採血にて腹大静脈より採取し、Thermo Fisher 社製の Sorvall™Legend™Micro 17R を用いて 4℃にて遠心分離（3200rpm，20 分間）し血清を得た。

#### 2-4-4 筋損傷の評価

今回の実験において、廃用性筋萎縮の病態と再荷重による骨格筋の評価を行うため、処置による筋損傷が生じていないことが前提となる。そのため、各実験群において筋損傷の有無を確認することが必要である。筋損傷が生じると炎症が起き、骨格筋細胞の周囲にマクロファージや好中球などの炎症細胞の浸潤が観察出来る。今回は、炎症細胞であるマクロファージを組織学的に観察し、炎症の有無を評価した。マクロファージの染色には、CD11b 抗体（BD Pharmingen™，Catalog No. 550282）を用いて免疫蛍光染色を実施した。また、血清を用い筋損傷のマーカーである CK 値（外部受託：Trans Genic）を測定した。

#### 2-4-5 血中の MMPs 測定

MMP-2，MMP-9 の血中濃度を測定するために、血清調製後マルチプレックスサスペンションアレイ解析（外部受託：Filgen，R&D Systems 製 Luminex Assay）にて測定した。

#### 2-4-6 骨格筋中の遺伝子発現量と関連する遺伝子群の解析

タンパク質の異化・同化は遺伝子の発現によって調節される。本研究における廃用性筋萎縮から再荷重の過程における骨格筋の病態メカニズムを理解するため、遺伝子の発現量をマイクロアレイ法にて網羅的に解析した。まず、Co 群、CI 群、RL1 群、RL14 群の腓腹筋を単離し、筋から RNA を抽出し、cDNA の合成とラベリング、増幅を行った。次に、ハイブリダイゼーションを実施し、スキャニングを行うことにより mRNA の発現量を分析した。解析として、Co 群の発現量に対する CI 群、RL 群の発現量の変化の比を取り、fold change として求めた。また、タンパク質間相互作用のデータベースである STRING (<https://string-db.org>) から MMP-2, MMP-9 に関連の深い遺伝子のネットワーク図を取得した (functional protein association networks)。さらに、マイクロアレイで解析した全ての遺伝子の中で、どの機能的グループに属する遺伝子群が大きく変動したかをみるため、DAVID Bioinformatics (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いて functional annotation 解析及び Heat map 解析 (Metascape) を実施した。

#### 2-4-7 免疫蛍光染色

骨格筋中の MMP-2, MMP-9 の発現量を観察するため、免疫蛍光染色にて MMP-2 及び MMP-9 を染色し、観察した。凍結切片を PBS で 30 分間洗浄した後、ホルマリン溶液に 5 分間留置し骨格筋細胞の固定を行った。次に、M.O.M. mouse Ig Blocking Reagent を用いて特異的な染色がされないよう、室温で 1 時間留置、PBS にて洗浄した。1 次抗体は抗 MMP-2 抗体 (R&D, AF1488)、抗 MMP-9 抗体 (R&D, AF909) を用いて室温で 30 分間インキュベートした。その後 PBS (0.1% Triton X) にて 5 分間 3 回で洗浄した。2 次抗体を用いて室温 30 分間インキュベートし、PBS (0.1% Triton X) にて 5 分間 3 回で洗浄した。最後に -20°C のメタノールに 3 分間浸け固定した。染色後、ボックスタイプの蛍光顕微鏡 FSX100 (Olympus) を用いて組織の特定成分 (MMP-2, MMP-9) を蛍光でラベル化し、可視化した。

#### 2-4-8 筋内血管の評価

筋内血管の評価は、alkaline phosphatase 染色（AP 染色）及び免疫蛍光染色（CD31）を用いた。AP 染色は毛細血管を観察するため、CD31 は血管内皮細胞を形態学的に評価するために使用した。また、血管新生に関わる因子を遺伝学的解析、マルチプレックスサスペンションアレイ解析にて検討した。MMPs と同様に、VEGF に関連する遺伝子群を STRING データベースから抽出し、遺伝子発現量を解析した。

#### 2-5 統計解析

統計解析は、各群間の各測定結果で一元配置分散分析を行った後、Bonferroni 法の多重比較検定を用いて比較した。検定において有意水準は 5%とした。

#### 2-6 倫理審査

研究を実施するにあたり、国際医療福祉大学（第 18021 号）及び帝京科学大学動物委員会の承認を得て（承認番号 17C059, 18C052）実験を行った。また動物の扱いに際しては、動物実験のガイドラインに則して研究を実施した。

## 第3章 結果

### 3-1 各群における体重

体重はそれぞれの処置及び介入が終了した時点で計測を行った。各群の体重を表2に示す。各群間で有意な差を認めなかった。

表2 各群における体重

	Co 群 <sup>1</sup>	CI 群 <sup>2</sup>	RL1 群 <sup>3</sup>	RL14 群 <sup>4</sup>
体重:g	25.3±0.9	25.4±2.5	26.3±0.6	26.3±1.0

All values are given as mean ± SD. No significant difference between all groups

<sup>1</sup> コントロール群 (Control:Co 群, n=7), <sup>2</sup> ギプス固定群 (Cast Immobilization:CI 群, n=7), <sup>3</sup> 再荷重1日群 (Reloading for 1 day:RL1 群, n=7), <sup>4</sup> 再荷重14日群 (Reloading for 14 day:RL14 群, n=7)

### 3-2 各群における筋湿重量の比較と組織学的評価

各実験期間終了後の筋湿重量の結果を示す(表3)。前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋全てにおいてCo群と比較するとCI群、RL1群で有意に低値を示した。CI群とRL1群の間には有意差は認められず、1日間の再荷重では筋萎縮の改善は認められなかった。ヒラメ筋においては、RL1群と比較してRL14群で有意に高値を示し、Co群に近いレベルまで改善された。

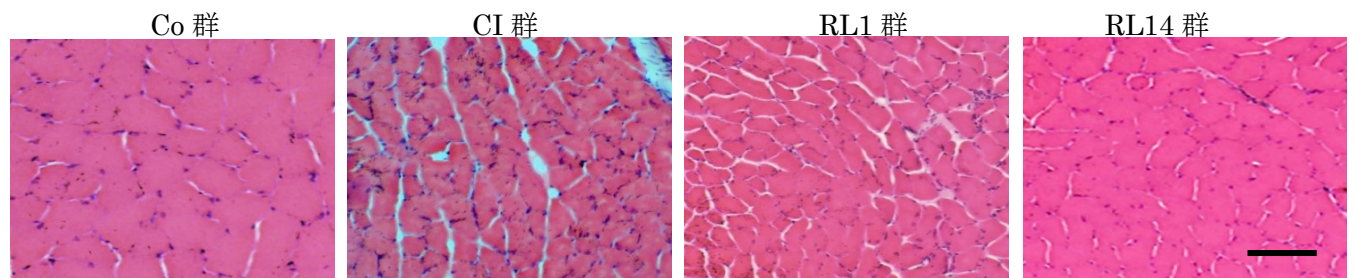
腓腹筋のH&E染色の結果、Co群と比較してCI群では骨格筋の萎縮が観察された(図5)。CI群とRL群を比較すると、再荷重1日間では筋の肥大は認められず、筋萎縮の改善は明らかではなかった。RL14群では、骨格筋の筋線維径は拡大しており、筋萎縮の改善がみられた。また、筋核は筋細胞周辺に存在し、再生を示す中心核や筋細胞の大小不同、壊死線維などの病的な所見は観察されなかった。

表3 各群における筋湿重量

		Co群	CI群	RL1群	RL14群
前脛骨筋	筋湿重量 : mg	63.5 ± 13.7	50.5 ± 7.3*	44.7 ± 9.6*	46.5 ± 4.9*
腓腹筋	筋湿重量 : mg	151.1 ± 11.5	112.4 ± 11.0*	107.0 ± 14.9*	130.4 ± 10.4*
ヒラメ筋	筋湿重量 : mg	8.3 ± 1.8	5.2 ± 1.0*	4.9 ± 1.4*	7.6 ± 1.4**

All values are given as mean ± SD. \* vs. Co群 (p < 0.05), \*\* vs. RL1 (p < 0.05)

No significant difference between other groups



対象筋：腓腹筋，週齢：14週齢，bar：100μm

図5 腓腹筋のH&E染色

### 3-3 処置による筋損傷の有無について

今回、筋萎縮モデルマウスの作成にギプス固定を用いている。実験中の処置によって炎症や筋損傷が生じていないか確認するために CD11b 染色（マクロファージの染色）及び CK 値の測定を行った。骨格筋の壊死や再生が著明である筋ジストロフィーの *mdx* モデルマウスでは、マクロファージが染色され、骨格筋中で炎症が生じていることが示唆される（図 6:*mdx*）。一方、Co 群、CI 群、RL1 群、RL14 群では、明らかな染色は認められなかった。また、筋損傷の指標となる CK 値においても、*mdx* マウスでは高値であった一方、今回検討を行った群では異常値は認められなかった（表 4）。以上より、実験の処置による筋損傷を示す所見は認められなかった。

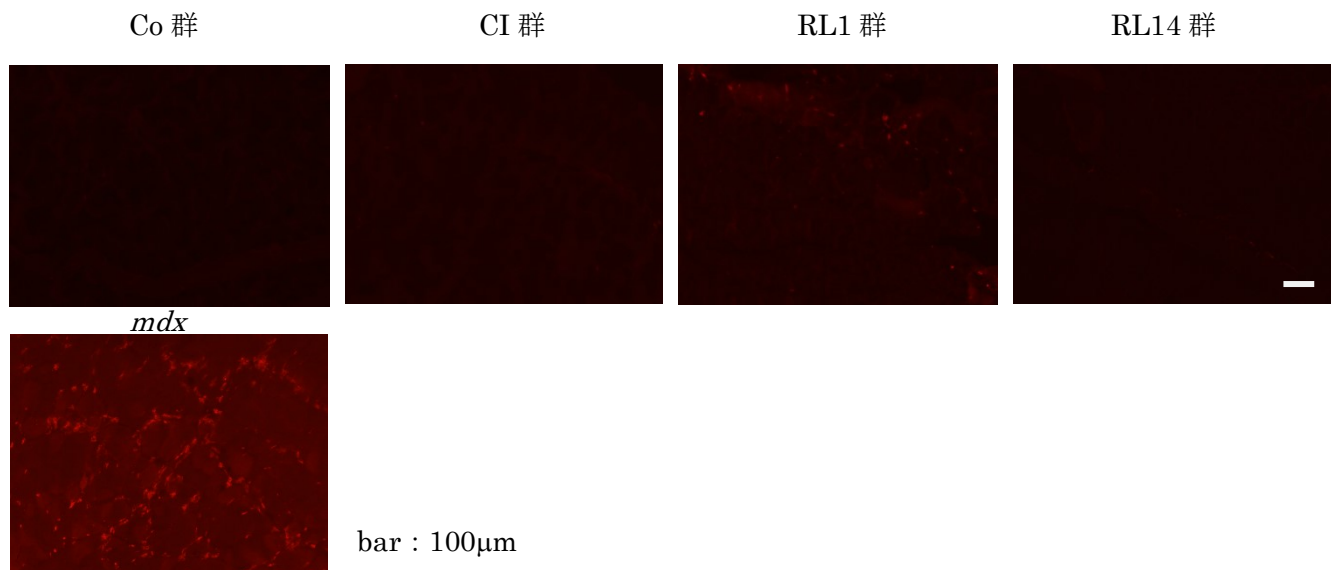


図 6 各群における処置による筋損傷評価

表 4 各群における CK 値

	Co 群	CI 群	RL1 群	RL14 群	<i>mdx</i>
CK 値 : IU/L	28.7	41	34.7	30.3	771



### 3-4 MMP-2 及び MMP-9 の評価

#### 3-4-1 血液中の MMP-2, MMP-9 の動態

MMP-2 及び MMP-9 の血中濃度の結果を表 5 に示す。MMP-2 は Co 群と比較して CI 群で有意に減少していた。一方、MMP-9 は、CI 群は全群と比較して有意に高値を示しており、筋萎縮の誘発に伴って増加した。更に荷重をすることで、血中濃度が速やかに減少する傾向が認められた。廃用性筋萎縮の病態と再荷重の過程において、MMPs が大きく変動していることが明らかとなった。

表 5 MMP-2 及び MMP-9 の各群における血中濃度

	Co 群	CI 群	RL1 群	RL14 群
MMP-2 : ng/mL	693.8 ± 12.5	570.0 ± 27.2*	637.0 ± 25.4	615.4 ± 9.2
MMP-9 : ng/mL	1.0 ± 0.2**	5.5 ± 2.4	1.7 ± 0.2**	1.2 ± 0.2**

All values are given as mean ± SD. \* vs. Co 群 (p < 0.05), \*\* vs. CI 群 (p < 0.05)

No significant difference between other groups

### 3-4-2 骨格筋中の MMP-2, MMP-9 の発現

骨格筋中の MMP-2 及び MMP-9 の免疫蛍光染色の結果を図 7 に示す。筋ジストロフィーのモデルマウスである *mdx* マウスでは, MMP-2, MMP-9 とも強い染色像 (緑色の染色像) が観察された (図 7 : *mdx*)。今回の検討では, MMP-2 では RL1 群, MMP-9 では RL14 群で染色像が明らかであった。再荷重の期間によって, MMP-2 と MMP-9 で異なる挙動が認められた。

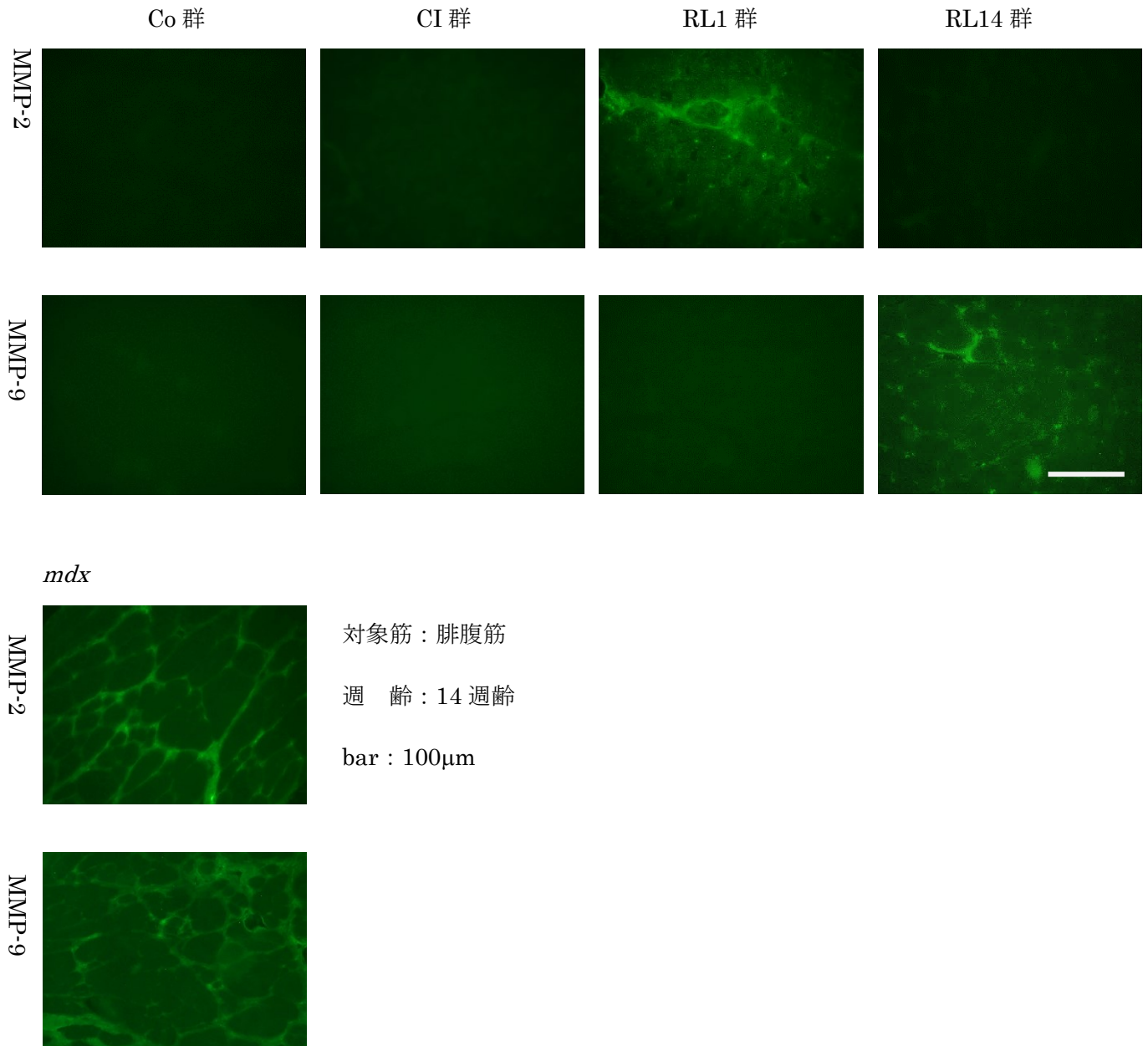


図 7 各群における MMP-2 及び MMP-9 の免疫蛍光染色

### 3-4-2 骨格筋中の MMP-2, MMP-9 の遺伝子発現量

マイクロアレイ解析にて各群における骨格筋中の遺伝子発現量を網羅的に解析した。Co 群の発現量に対する CI 群, RL1 群, RL14 群の遺伝子発現量の変化の比を **fold change** として求め, MMPs についての発現量の変化を表 6 にまとめた。Co 群と比較して 1.5 倍以上は赤で示しており, 遺伝子発現量が増加したことを意味している。MMP-2 は Co 群と比較して, CI 群で 1.84 倍, RL1 群で 2.59 倍に遺伝子発現量が増加し, MMP-9 では RL14 群で 2.23 倍遺伝子発現量が増加した。骨格筋中の MMP-2, MMP-9 の発現は, マイクロアレイ解析と免疫蛍光染色とで近似した動態を示した。また, MMP-2 と MMP-9 で発現する時期が異なっていることが明らかとなった。

表 6 各群における遺伝子発現量

Name	Gene Name	Fold Change (Co vs CI)	Fold Change (Co vs RL1)	Fold Change (Co vs RL14)
MMP-2	Mmp2	1.84	2.59	0.71
MMP-9	Mmp9	1.12	0.96	2.23

### 3-4-3 MMP-2, MMP-9 に関連する遺伝子の解析 : Functional protein association networks

MMP-2, MMP-9 に関連の強い遺伝子の情報を STRING (<http://string-db.org/>)の functional protein association networks データベースより取得し、それらの遺伝子の fold change を解析した。その結果, MMP-2, MMP-9 とも, 血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : 以下 VEGF) が強く関連していることが明らかになった (図 8)。VEGF の fold change をみたところ, Co 群と比較して CI 群で 1.62 倍, RL14 群で 3.26 倍の遺伝子発現量の増加が認められた (表 7)。

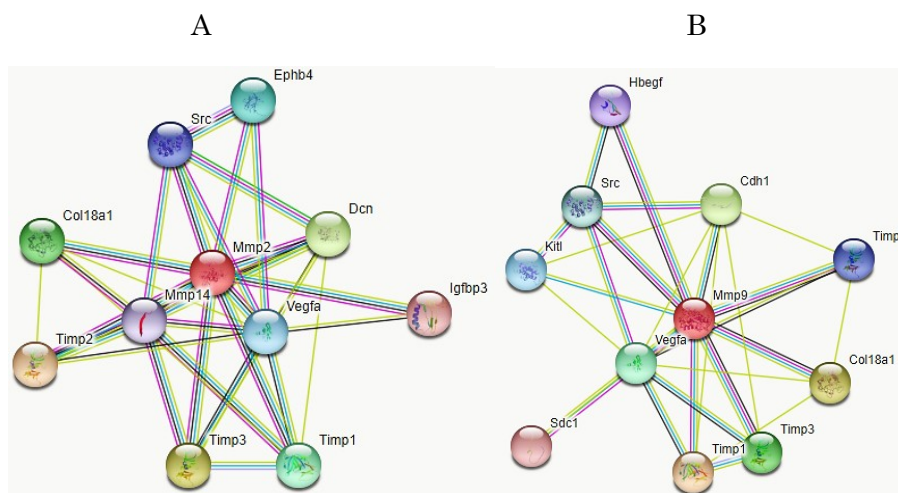


図 8 MMP-2 (A), MMP-9 (B) と関連する遺伝子

表 7 MMP-2, MMP-9 と関連する遺伝子の発現量

Name	Gene Name	Fold Change (Co vs CI)	Fold Change (Co vs RL1)	Fold Change (Co vs RL14)
VEGF	Vegfa	1.62	0.77	3.26

### 3-4-4 Heat map 解析

マイクロアレイ解析の結果から、fold change が 2 倍以上、1/2 倍以下に変動した遺伝子を抽出し、どのような遺伝子群が変動を示したかを可視化するため、Metascape を用いて Heat map を作成した (図 9)。これは遺伝子の機能的グループを示し、遺伝子発現の高いところが濃く、遺伝子発現の低いところが薄く示されている。廃用性筋萎縮から再荷重の過程で血管新生の調節や形成、発達に関わる遺伝子が段階的に変動していることが示された。RL14 群では、CI 群や RL1 群よりも遺伝子発現が低いことが示されていることから、Co 群と同程度となっていることが明らかとなった。筋萎縮を誘発すると炎症や免疫の生体反応が生じ、再荷重を行うと速やかに骨格筋を構成する要素が改善し始めることが示唆された。これらに加えて、血管形成に関わる遺伝子群も変動していることが明らかになった。

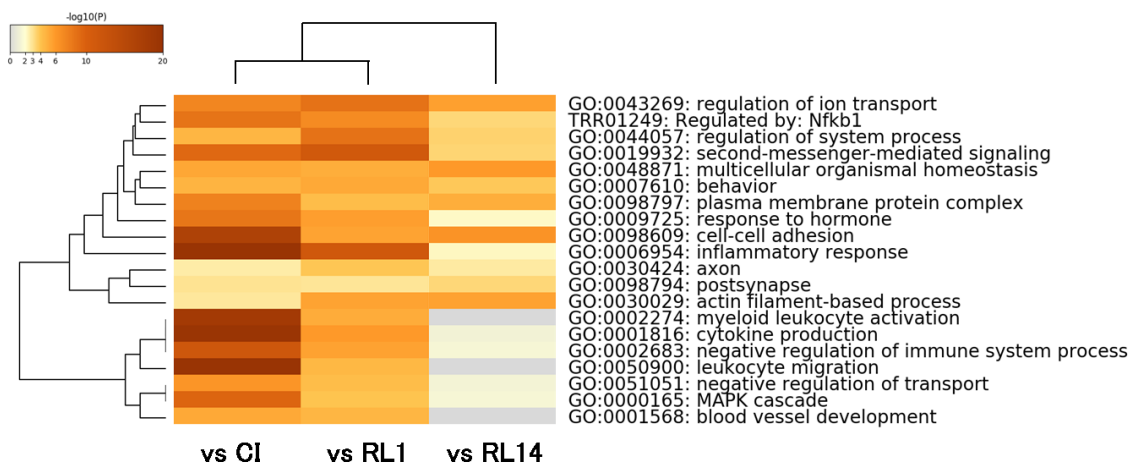


図 9 Heat map による機能的な遺伝子グループの可視化

### 3-4-5 骨格筋中における Functional annotation 解析

Heat map で使用したデータを用いて、血管に関係する遺伝子のグループを抽出して Functional annotation 解析を行った。その結果、筋萎縮誘発時には、血管新生に関わる遺伝子群が、RL1 群では血管新生及び血管形成調節に関わる機能的グループ (Co 群 vs RL1 群) が増加した。RL14 群では血管の発達に関わる機能的グループ (Co 群 vs RL14 群) が増加した (表 8)。以上のことから、筋萎縮から再荷重の過程において、筋内血管も順序立てて大きく変動していることが示唆された。

表 8 血管に係る各群の遺伝子の機能的グループ

Co群 vs CI群			Co群 vs RL1群			Co群 vs RL14群		
Term	Count	P-value	Term	Count	P-value	Term	Count	P-value
<b>positive regulation of angiogenesis</b>	23	p<0.05	<b>positive regulation of angiogenesis</b>	22	p<0.05	<b>blood vessel development</b>	12	p<0.05
<b>angiogenesis</b>	29	p<0.05	<b>angiogenesis</b>	32	p<0.05			
			<b>Angiogenesis</b>	19	p<0.05			
			<b>sprouting angiogenesis</b>	7	p<0.05			
			<b>negative regulation of blood vessel endothelial cell migration</b>	5	p<0.05			
			<b>blood vessel morphogenesis</b>	7	p<0.05			
			<b>angiogenesis involved in coronary vascular morphogenesis</b>	3	p<0.05			

Term : 血管に関係する機能的グループ名, Count : 変動を示した遺伝子数

### 3-5 筋内血管の評価

#### 3-5-1 VEGF, VEGF R2 の血中濃度の測定

VEGF, VEGF R2 の血中濃度の測定を表 9 に示す. VEGF は RL1 群で最も高値を示し, 再荷重開始時に VEGF の分泌量が増加した. VEGF R2 は VEGF 受容体であり, 脈管形成に重要な因子とされている. Co 群と比較して RL1 群及び RL14 群で有意に高値を示していた.

表 9 VEGF 及び VEGF R2 の各群における血中濃度

	Co 群	CI 群	RL1 群	RL14 群
VEGF : ng/mL	15.7 ±0.3	16.2±0.1	18.4 ±0.7*	16.7 ±1.9
VEGF R2 : ng/mL	58976.3 ±2346.6	64158.4±2672.7	70950.0 ±4224.0*	72486.0 ±1829.0*

All values are given as mean ± SD. \* vs. Co 群 (p < 0.05)

No significant difference between other groups

### 3-5-2 筋内血管の観察：AP 染色

これまで結果から、廃用性筋萎縮の病態や再荷重の介入過程において血管新生が関与していることが示唆された。そこで、毛細血管を観察することが可能な AP 染色を行った。組織像と毛細血管数の定量化を表 10 に示す。Co 群と比較して、CI 群で有意に筋内血管数が減少し、RL1 群においても筋内血管数に変化はみられなかった。RL14 群となると CI 群及び RL1 群と比べ有意に筋内血管数が増加しており、Co 群と同程度まで毛細血管数が改善した。筋内血管は筋萎縮と同時に減少し、再荷重を継続することで筋内血管数は増加することが明らかとなった。

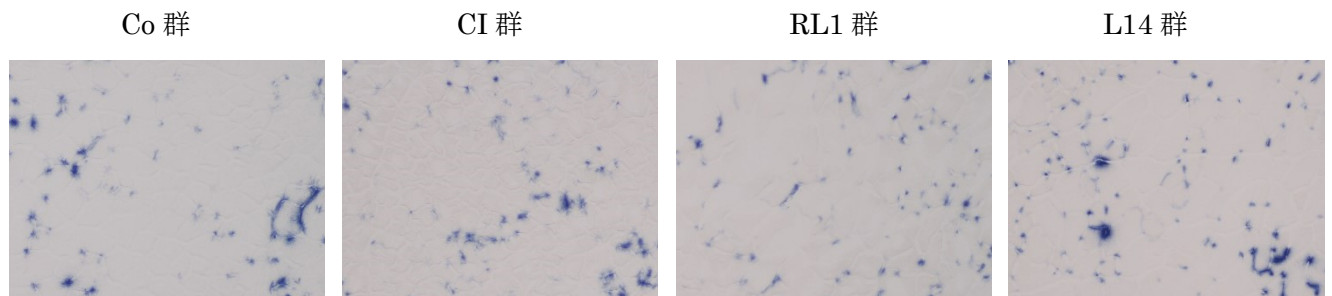


図 10 AP 染色による筋内血管の染色像

表 10 各群における筋内血管数

	Co 群	CI 群	RL1 群	RL14 群
毛細血管数：count	183.0 ± 29.7	120.0 ± 18.0*	99.3 ± 16.6*	222.3 ± 49.0**#

All values are given as mean ± SD. \* vs. Co 群 (p < 0.05), \*\* vs. RL1 群 (p < 0.05), # vs. CI 群 (p < 0.05)

No significant difference between other groups



### 3-5-3 骨格筋中の血管内皮細胞：CD31 の免疫蛍光染色

血管内皮細胞のマーカーである CD31 の免疫蛍光染色の結果を表 11 に示す。Co 群と比較して筋萎縮を誘発すると有意に減少し，再荷重を行うと CD31 の発現量が有意に上昇することが明らかとなった。AP 染色と同様に，廃用性筋萎縮から再荷重の過程で血管内皮細胞も連動して変化することが明らかになった。

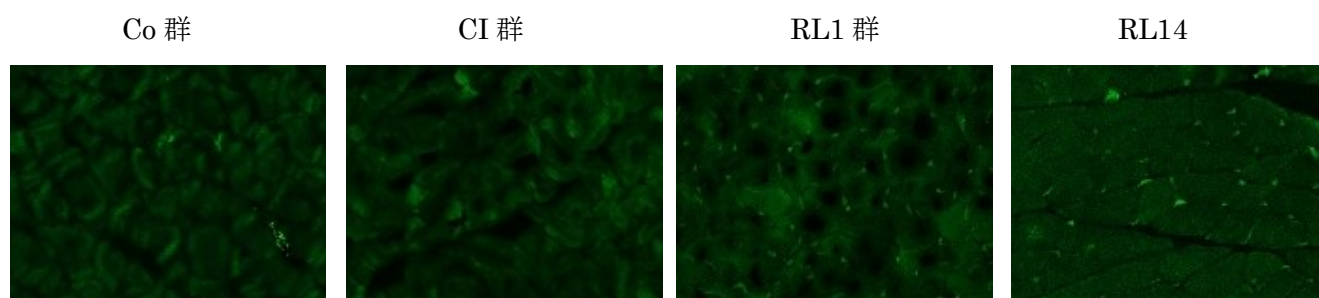


図 11 CD31 の免疫蛍光染色像

表 11 骨格筋内における血管内皮細胞数

	Co 群	CI 群	RL1 群	RL14 群
CD31 : count	102.3 ±28.6	34.7±10.1*	138 ±15.7	146.7 ±17.2

All values are given as mean ± SD. \* vs. Co 群, RL1 群, RL14 群 (p < 0.05)

No significant difference between other groups

### 3-5-4 VEGFに関連する遺伝子の解析：Functional protein association networks

VEGFに関連の深い遺伝子の functional protein association networks の情報を STRING のデータベースより取得し (図 9), それらの遺伝子の fold change を解析した (表 12). Co 群と比較して 1.5 倍以上に遺伝子発現量が増加した場合は赤で示し, 0.7 倍以下に遺伝子発現量が減少した場合は青で示した. その結果, 関連する遺伝子として血管新生に関わる VEGF R2 が変動していることが示された. Fold change の結果から骨格筋中の VEGF は CI 群 (1.62 倍) 及び RL14 群 (3.26 倍) で遺伝子発現量が増加し, VEGF R2 は Co 群と比較して CI 群で 0.61 倍, RL1 群で 0.43 倍に遺伝子発現量が減少した. マルチプレックスサスペンションアレイ解析による血中 VEGF, VEGFR2 とは動態は異なるが, 遺伝子発現も大きく変動することが明らかになった.

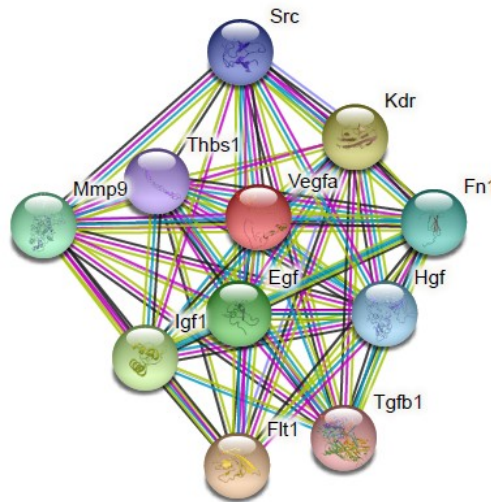


図 12 VEGF と関連する遺伝子

表 12 VEGF と関連する遺伝子

Name	Gene Name	Fold Change (Co vs CI)	Fold Change (Co vs RL1)	Fold Change (Co vs RL14)
VEGF	Vegfa	1.62	0.77	3.26
VEGF R2	Kdr	0.61	0.43	0.84

## 第4章 考察

### 4-1 結果のまとめ

今回は、MMPsの動態をより詳細に検討するとともに、これに伴って骨格筋内でどのような変化が起きているのか検討することを目的とした。筋湿重量は、Co群と比較してCI群で有意に減少した。RL1群では筋萎縮の改善は認められなかったが、RL14群のヒラメ筋では有意に筋湿重量が増加した。腓腹筋の免疫染色では、MMP-2はRL1群で、MMP-9はRL14群で強い染色がみられ異なった時期に発現した。骨格筋中のMMP-2は、RL1群で遺伝子発現量が増加した。一方MMP-9は、RL14群で遺伝子発現量が増加した。血液中のMMP-2は有意な変動は認められなかったが、MMP-9はCI群で有意に上昇し、RL1群で低値を示した。STRINGのデータベースからMMP-2、9と関連する遺伝子を検索したところ、両者とも血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF）が強く関連していることが明らかとなった。そこで、VEGFの遺伝子発現の変動をみたところ、RL1群で発現量が減少し、RL14群で発現量が増加していた。

### 4-2 廃用性筋萎縮の病態と再荷重における骨格筋の再構築について

筋湿重量は、Co群と比較してCI群で有意に減少した。RL1群では筋萎縮の改善は認められなかったが、RL14群のヒラメ筋ではRL1群と比較して有意に筋湿重量が増加した。この結果は先行研究<sup>27)</sup>と同様な結果となった。マウスの廃用性筋萎縮誘発の処置による影響を確認するために筋損傷の評価を行ったが、マクロファージ（CD11b）の浸潤やCK値の血中濃度は上昇を認めず、筋損傷は生じていないことが確認された。このことから、本実験で用いた廃用性筋萎縮モデルマウスはより臨床上で観察される病態に近いと考える。

マルチプレックスサスペンションアレイ解析の結果では、血液中のMMP-2は有意な変動は認められず、MMP-9においてCI群で有意に上昇し、RL1群で低値を示した。一方で、腓腹筋の免

疫蛍光染色では、MMP-2は RL1 群で、MMP-9は RL14 群で強い染色がみられた。また、骨格筋中の MMP-2 は、RL1 群で遺伝子発現量が増加し、MMP-9 は RL14 群で遺伝子発現量が増加した。以上のことから、ゼラチナーゼ群に属する MMP-2 と MMP-9 は廃用性筋萎縮の病態から再荷重の過程において大きく変動し、これらのプロセスに重要な役割を果たしていることが示唆された。また、MMP-2 と MMP-9 とで挙動が異なることも明らかになった。今回の検討によって、MMP-2 の遺伝子発現量が CI 群と RL1 群で増加していることがマイクロアレイ解析で明らかとなった。抵抗運動による介入において、ヒトでは MMP-2 の発現は増加せず、MMP-9 が運動後 3 時間で上昇することや<sup>28)</sup>、ラットでは電気刺激による等尺性収縮を行った直後で MMP-2、MMP-9 の発現が認められたと報告している<sup>29)</sup>。筋損傷した際の MMP-2 及び MMP-9 の経時的変動を検討した報告では、MMP-2 や MMP-9 が筋細胞の異化・同化に作用し、骨格筋の再構成に関与していると報告されている<sup>22) 30)</sup>。筋湿重量の結果から、CI 群及び RL1 群で筋湿重量が有意に低値を示し、RL14 群でヒラメ筋は Co 群と同程度まで改善が認められていた。このことから、MMP-2 は骨格筋の萎縮に関与し、MMP-9 は骨格筋の再構成に関与することが推察され、MMP-2 及び MMP-9 はイベントの時期に応じて変動し骨格筋に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

今回の実験では、2 週間以上の MMP-2、MMP-9 の変動を検討していないため、明確なことは述べられないが、MMP-2 は運動開始早期、MMP-9 はそれより後の段階で発現し、骨格筋に何かしらの影響を及ぼしていることが推測された。したがって、MMP-2 及び MMP-9 に関連する遺伝子群を解析することとした。

#### 4-3 MMP-2, MMP-9 と筋内血管の関連について

STRING のデータベースから MMP-2、MMP-9 と関連する遺伝子を検索したところ、両者とも VEGF が強く関連しており、CI 群と RL14 群で遺伝子発現量が増加、RL1 群で発現量が減少した結果が得られた。病態に応じて VEGF も変動を示していた。エンリッチメント解析 (Heat map

解析, Functional annotation 解析) の結果では, 廃用性筋萎縮から再荷重の過程で血管新生の調節や形成, 発達に関わる遺伝子が段階的に変動していることが示された. また, 血液中の VEGF は RL1 群で高値を示し, 血管の発達に関わる VEGF R2 は RL1 群, RL14 群で高値を示していた. 筋内血管の組織解析の結果から, 毛細血管及び血管内皮細胞が CI 群で減少し, 再荷重によって増加した. MMP-2 のノックダウンを *in vitro* で行うと血管新生が促され, MMP-2 の発現が増加することで血管新生が促進され, 筋線維の成熟に関与することも報告<sup>30)</sup>されている. また, VEGF は組織が低酸素状態に陥ると VEGF の発現が増加すると報告<sup>32)</sup>がある. 以上のことから, ギプス固定による不動化によって筋組織が低酸素状態に陥り, 骨格筋細胞内の血管生存維持のために MMP-2 及び VEGF の発現が増加したと考えられた. しかし, VEGF の受容体である VEGF R2 は減少していた為, 血管新生のプロセスが機能せず筋萎縮が進行していたと考えられた.

再荷重を行った直後では, 廃用性筋萎縮が誘発された病態と同様であるが, 再荷重を継続することによって廃用性筋萎縮から再荷重の過程で血管新生の調節や形成, 発達に関わる遺伝子が段階的に変動していることが明らかとなった. 運動介入後の解析では, 有酸素運動後に血管新生プロセスに重要である VEGF の SAT mRNA 発現が増加するとの報告<sup>32)</sup>がある. 本研究によって長期間の再荷重によっても VEGF の発現が増加し, 筋内血管数が Co 群と同程度まで改善することが明らかとなったことにより, 再荷重といった介入においても血管新生のプロセスが働き, 遺伝子発現量の増加及び毛細血管数の増加が生じたと考えられる. また, RL14 群のヒラメ筋で筋湿重量の増加, MMP-9 の発現増加が認められた. MMP-9 は運動直後や持久運動後に発現が増加する報告<sup>34)</sup>があり, MMP-9 は骨格筋の再構成を主体とした役割を担っていたと示唆された. この変化がどのような機序で起こるのかは不明であるが, 廃用性筋萎縮を誘発した際, ギプス固定によって不動化されているため, 筋収縮に伴う筋ポンプ作用が不足し血液循環量が減少した可能性も考えられる. すなわち, 不動化によって酸素供給が不足し, 骨格筋の萎縮が進行したことが推測されるこの変化の発症機序については, 今後さらなる検討が必要だと考えられる.

#### 4-4 臨床場面での応用

本研究の実験結果より、廃用性筋萎縮に対する病態理解及び介入時には骨格筋の構成体のみならず、筋肉血管への配慮も必要になることが明らかとなった。現在、人口の高齢化に伴い動脈硬化や下肢深部静脈血栓症などの疾患が増加しているため、血管超音波検査が普及している。血管超音波検査の検査方法にはカラードプラ法とパルスドプラ法が行える<sup>35)</sup>。今後、ヒトの筋萎縮の病態においても血管超音波の評価が一般化すれば、今回の基礎研究の知見を臨床で検証することが可能になると期待される。

#### 4-5 本研究の限界

本研究では、廃用性筋萎縮に対して1日間、2週間の再荷重による介入を行った。より臨床で行われているようなストレッチングや筋力増強訓練などの介入を行えていない。また、今回使用した動物は、健常若年者に相当するため、高齢者・疾患のモデルマウスで同様な結果が得られるか不明である。更に骨格筋中のタンパク質量定量化による筋萎縮の病態や再荷重効果についての評価も示していない。これらは、今後取り組むべき課題と考えている。

#### 4-6 今後の展望

本研究を通して、マウスの廃用性筋萎縮から再荷重の過程で、骨格筋の構築に関わる MMP がダイナミックに変動することが明らかになった。さらに、この過程で筋肉血管の減少と新生の大きな変化が起こることを見出した。

今後、血中・骨格筋中の遺伝子、タンパクレベルでの評価や、Pathway 解析などの、さらなる検討を進めていきたい。また、対象を高年齢マウスや疾患のモデルマウスにすることや、解析する対象筋をヒラメ筋や大腿四頭筋などに拡張筋線維タイプ別の検討も引き続き分析を行ってい

きたい。また、筋内血管の循環動態を評価したい。

これからも、筋萎縮の病態や介入効果を評価するバイオマーカーの探索を継続して行う計画である。それによって、理学療法の対象となる症例に則した病態や介入の効果判定の基礎的知見を得ることを目指したい。

## 第 5 章 結論

今回の検討により，廃用性筋萎縮の病態や再荷重の過程で，骨格筋の再構築に関与する MMP-2, MMP-9 が大きく変動して，筋内血管新生や形成，発達が生じていることが明らかとなった．廃用性筋萎縮の進行中は骨格筋の構築に関わる MMPs が大きく変動するのと同時に，筋内血管の新生が抑制されることが示された．一方で，荷重を再開すると筋内血管の新生や形成，発達に関わる遺伝子群が段階的に変動した．廃用による筋萎縮とその治療的再荷重という日常の臨床でよくみられる状況においても，骨格筋の再構築が生じ，筋内血管の活発な変動が起こることが明らかになった．



## 第 6 章 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり，多くのご支援とご指導を賜りました。

研究報告会から論文作成まで道筋をご指導頂いた，指導教官である丸山仁司先生，堀本ゆかり先生に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，日々の実験での実験機器の取り扱いから，データの取り扱い，学会発表まで多岐にわたりご指導いただいた，帝京科学大学医療科学部理学療法学科の廣瀬昇先生，萩原宏毅先生に深謝いたします。

動物実験を行うに際して，飼育方法や実験手法などご指導頂いた，帝京科学大学生命環境学部アニマルサイエンス学科の近藤保彦先生およびバイオサイエンス学科の小川智史先生に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) 仙波浩幸,青木菜摘,久留利菜.理学療法士 実態調査報告 -2010年1月実施-. 理学療法学 2010;37:188-217
- 2) 内閣府.平成28年版高齢者白書 第1節高齢化の状況 1 高齢化の現状と将来像.  
[http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2016/zenbun/pdf/1s1s\\_1.pdf](http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2016/zenbun/pdf/1s1s_1.pdf) 2016.12.9
- 3) 内田監修.標準整形外科学.第11版.東京:医学書院,2011:684-708
- 4) 山崎俊明,立野勝彦,灰田信英ら.運動負荷時間の違いがラット廃用性筋萎縮の回復過程に及ぼす影響.理学療法学 1998,25(6):381-387
- 5) Yamazaki T. Influence of Hindlimb Unweighting and Intermittent Weight Bearing on Dynamics of Nuclei in Rat Soleus Muscle. J Jpn Phys Ther Assoc. 2003; 6(1): 1-8
- 6) 榊間春利,甲斐悟,小澤淳也ら.ギプス固定によるラット下腿の萎縮と回復.理学療法学 2000;27(5):174-179
- 7) 辻本尚弥,鈴木英樹.ラット後肢骨格筋に対するギプス固定解除の影響. 久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要 2015;22(1):11-21
- 8) Onda A. Kono H. Jiao Q. New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. Muscle Nerve. 2016;54(4):788-791
- 9) Masahiro A. Noboru H. Wakana K. et al. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. J Phys Ther Sci. 2017;29(10): 1779-1783
- 10) Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, et al. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. FASEB J. 2001;15:1279
- 11) Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. Science. 2001;294:1704-1708
- 12) 山下結衣,越智ありさ,河野尚平ら.寝たきり患者の筋萎縮に対する栄養学的アプローチ.化学と

生物 2012;50(5):357-362

- 13) Katsuta W, Aihara M, Hirose N. et al. Changes in oxidative stress severity and antioxidant potential during muscle atrophy and reloading in mice. *J. Phys. Ther. Sci.* 2018;30(1):42-46
- 14) 坂口顕,沖貞明,金井秀作ら.廃用性筋萎縮予防としての温熱療法の効果—ラット足関節固定モデルを用いたトレッドミル走行との併用効果の検討—.理学療法科学 2008;23(1):23-27
- 15) 坂口顕,沖貞明,金井秀作ら.不動によるラット骨格筋の廃用性筋萎縮に対する持続的伸張運動と間歇的伸張運動の影響.理学療法科学 2007;34(3):88-94
- 16) 山口倫加,山崎俊明,塩本祥子.ラットヒラメ筋の廃用性萎縮に及ぼすストレッチ日内頻度の影響.石川県理学療法学雑誌 2003;3(1):3-7
- 17) 細田多穂,柳澤健編集.理学療法ハンドブック第3巻疾患別・理学療法基本プログラム.東京:協同医書出版社 2013:3-33
- 18) 中村隆一,斎藤宏,長崎浩.基礎運動学第6版.東京,医歯薬出版株式会社.2015:226-246
- 19) 井伊正則, 山本博幸, 今井浩三. マトリックスメタロプロテアーゼの構造, 機能, 活性化機構と最近のトピックス-マトリライシンを中心に-. *J Electrophoresis.* 2003;47:111-116
- 20) Ogura Y, Marjan M, Sato S, et al. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:1-11
- 21) Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, et al. Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *HUMAN MOLECULAR GENETICS.* 2011;20(9):1787-17992
- 22) Sonia K, Chantal L, Michele D, et al. Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Regenerating Skeletal Muscle: A Study in Experimentally Injured and Mdx Muscles. *Developmental Biology.* 1999;205(1):158-170
- 23) Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, et al. Reduced Angiogenesis and Tumor Progression in Gelatinase A-deficient Mice. *Cancer Research.* 1998;58:1048-1051

- 24) 槍澤大樹, 菅野仁. 循環系の基礎と臨床 (2) 血管新生. 東女医大誌. 2017;87:5-12
- 25) 小室一成. 医学のあゆみ レニン・アンジオテンシン系のすべて. 東京:医歯薬出版株式会社  
2009;228(5):452-457
- 26) 藤野英己, 上月久治, 武田功ら. 廃用性筋萎縮における毛細血管リモデリングと血管増殖因子の抑制. 理学療法科学 2008;23(2):203-208
- 27) 山崎俊明, 灰田信英, 立野勝彦. 荷重日内頻度がラットヒラメ筋の廃用性萎縮予防に及ぼす影響. 理学療法ジャーナル 1996;30:53-57
- 28) Patel SH, D'Lugos AC, Eldon ER, et al. Impact of acetaminophen consumption and resistance exercise on extracellular matrix gene expression in human skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2017;313(1):R44-R50
- 29) Ogasawara R, Nakazato K, Sato K, et al. Resistance exercise increases active MMP and  $\beta$ 1-integrin protein expression in skeletal muscle. Physiol Rep. 2014;20;2(11)
- 30) Malgorzata Z, Edyta B, Marta S, et al. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. 2008;52:307-314
- 31) Tang H, He Y, Li L, et al. Exosomal MMP2 derived from mature osteoblasts promotes angiogenesis of endothelial cells via VEGF/Erk1/2 signaling pathway. Exp Cell Res. 2019;15:383(2):
- 32) Ohno H, Shirato K, Sakurai T, et al. Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. J Phys Fitness Sports Med. 2012;1(1): 5-16
- 33) Douglas W, Lisa M, Jeffrey F. Aerobic Exercise Elevates Markers of Angiogenesis and Macrophage IL-6 Gene Expression in the Subcutaneous Adipose Tissue of Overweight-To-Obese Adults. J Appl Physiol. 2017;123 (5):1150-1159
- 34) Rullman E, Rundqvist H, Wagsater D, et al. A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 2007;102:2346-2351
- 35) 榛沢和彦. 下肢静脈エコーの実際. 血栓止血誌. 2008;19(1):39-44

## 添付資料

▶ ヘマトキシリン・エオジン染色 (Hematoxylin-eosin stain : H&E 染色)

H&E 染色に用いるハリス・ヘマトキシリン (武藤化学, 500ml, No.2002-2) を濾紙 (Filter Paper 2 DVANTEC 90mm) を用いて濾過し, 0.5%エオジン Y (武藤化学, 500ml, No.32081) に酢酸 (Wako, 3L, Code, 017-00251) を 1 滴/10ml 加えた. 初めに, ハリス・ヘマトキシリンに切片が付着しているスライドガラスを 2 分間付け, 流水にて洗浄する. 次に, エオジン Y に 2 分間付け, 再度流水にて洗浄を行う. その後, エタノールを用いて組織中の水分をアルコールと置き換える. そして, キシレンを加えることで, アルコールをキシレンに置き換え, 組織は透徹され, 検鏡に適した標本となる.

➤ H&E 染色

準備

- ・ヘマトキシリン＝「New ヘマトキシリン液 TypeM」 (武藤化学, 500ml, No. 2002-2)
- ・エオシン＝0.5% エオシン Y 「New エオシン液 TypeM」 (武藤化学, 500ml, No. 3208-1)

サンプル

- (1) Co vs Ex14 (2018/11/16): Co<sup>⑱</sup> Ex14<sup>⑱</sup>
- (2) RL14 vs Ex14 (2018/11/16) : RL14<sup>⑬</sup> Ex14<sup>⑳</sup>

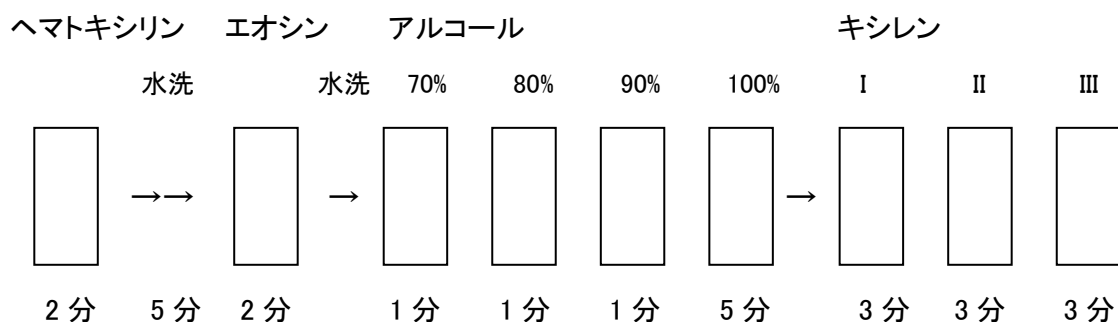
プロトコール

0. ハリス・ヘマトキシリンを濾紙で濾過する.

エオジン Y に 1 滴/10ml の割合で酢酸を加える.

1. ハリス・ヘマトキシリン 2 分
2. 流水で洗う 5 分以上 裏面に流水をかけながら. 余分な水分を拭く
3. エオシン Y 2 分.
4. 流水で洗う 洗ったらすみやかに余分な水分を拭く
5. 脱水: 低濃度のアルコール槽から段階的に純アルコールの槽に移すことにより, 組織中の水分をアルコールと置き換える.  
70%エタノール 1 分→80%エタノール 1 分→90%エタノール 1 分→100%エタノール 5 分
6. 透徹: 脱水後, 組織中のアルコールをキシレンに置き換えるために行う. この操作により組織は透明になり, 検鏡に適した標本となる.  
キシレン I 3 分→キシレン II 3 分→キシレン III 3 分
7. マウント  
MOUNT-QUICK を用いる.

<全体の流れ>



- クライオスタット (Cryostat MICROM HM560)



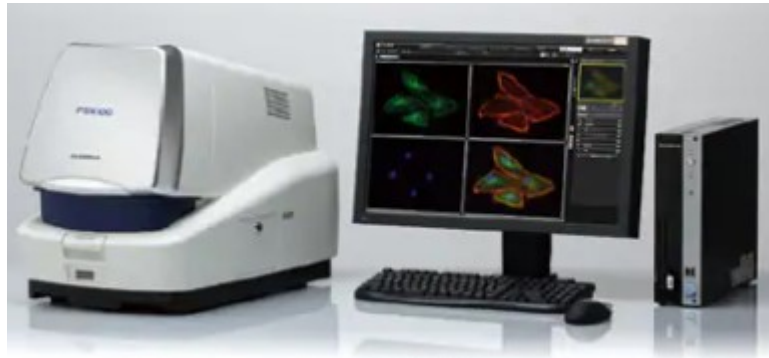
添付図 1 Cryostat MICROM HM560

- 冷却機能付き遠心機 Sorvall™ Legend™ Micro 17R (Thermo Fisher)



添付図 2 Sorvall™ Legend™ Micro 17R (Thermo Fisher)

➤ 免疫蛍光染色画像の取得



添付図 3



## ➤ Immunostaining for MMP-2, MMP-2

### Protocol

リンス Rinse in PBS 30'

固定 Fix 5' in 1% ホルマリン液 (fresh)

Rinse 3X 5' each in PBS

Block Block in M.O.M. mouse Ig Blocking Reagent 1hr RT (apply 20–40 $\mu$ l/well)

Wash 2X 2' each in PBS

Incubate 5' in M.O.M. Diluent

1<sup>st</sup> Antibody anti-MMP-2 pAb (R&D) in M.O.M. Diluent 1:40

anti-MMP-9 pAb (R&D) in M.O.M. Diluent 1:40

Incubate 30' RT

Wash 3X 5' each in PBS with 0.1% Triton X

2<sup>ndary</sup> Antibody anti-goat Alexa488 in M.O.M. Diluent 1:250

Incubate 30' RT

Wash 3X 5' each in PBS with 0.1% Triton X

メタノール固定 MetOH 3' -20°C

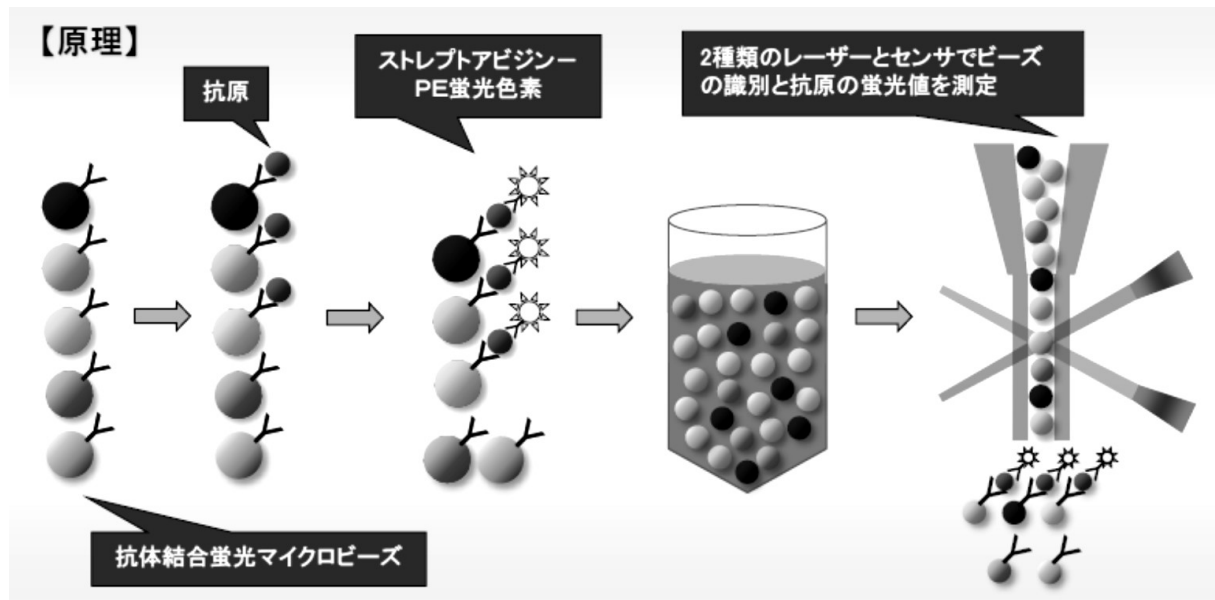
### Mount

1 drop/well ProLong Diamond Antifade Mount (with DAPI)

マニキュアで周囲をシールする

## マルチプレックスサスペンションアレイ解析

マルチプレックスサスペンションアレイ解析は、抗原抗体反応を用いた解析方法である。解析システムはターゲットとなる抗原に蛍光色素が着色されている Luminex® ビーズを反応させ、血清中のサイトカインやケモカインなどの蛍光量を測定する。



添付図4 マルチプレックス解析方法

➤ マイクロアレイ法

RNA 抽出

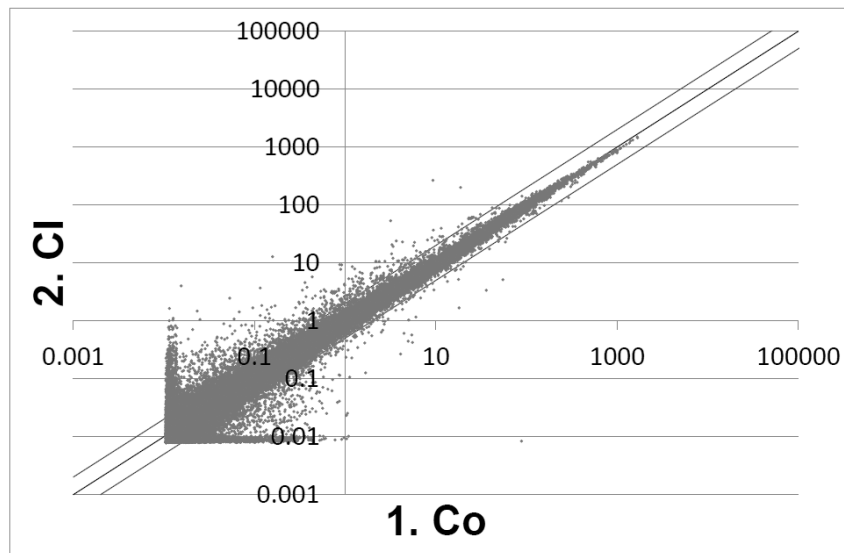
RNeasy Mini Kit, QIAGEN を使用し RNA 抽出を行った.

- ① QIAzol を添加し, ホモジナイズした.
- ② 室温で 5 分間静置した.
- ③ クロロホルムを加えて混合し, 室温で 2 分間静置した.
- ④ 12,000 xg で 15 分間遠心して, 上清を新しいチューブに回収した.
- ⑤ 等量の 70%エタノールを添加し, 十分に混和した.
- ⑥ Column にアプライし, 12,000×g で 1 分間遠心した.
- ⑦ 350μL の RW1 Buffer を加え, 12,000×g で 1 分間遠心した.
- ⑧ RNase-Free DNase をシリカゲルメンブレンにピペットで添加し, 室温で 15 分インキュベーションした.
- ⑨ 350μL の RW1 Buffer を加え, 12,000×g で 1 分間遠心した.
- ⑩ 500μL の RPE Buffer を加え, 12,000×g で 1 分間遠心した.
- ⑪ 500μL の RPE Buffer を加え, 12,000×g で 1 分間遠心した.
- ⑫ カラムを新しいコレクションチューブに移し, 15,000rpm で 3 分間遠心した.
- ⑬ カラムを新しい 1.5mL のチューブに移した.
- ⑭ 30μL の Nuclease Free water を加え, 1 分間静置した.
- ⑮ 12,000×g で 1 分遠心し, 溶出した.

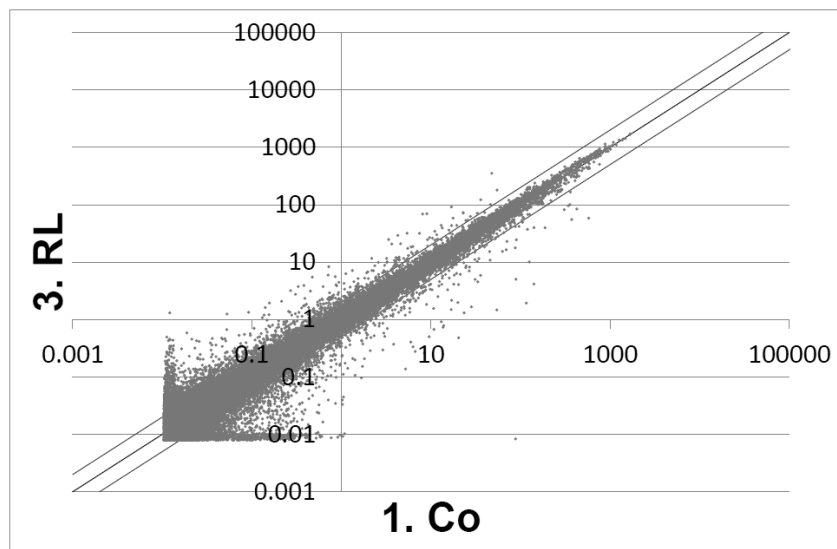
➤ スキャッタープロット

マイクロアレイ法によって、作成されるデータであり、2本の赤線より逸脱したものが、遺伝子発現量において増減したことを示している。赤線内に留まっている遺伝子は、群間において変動が2倍以内で、発現に大きな差が生じていないこととなる。解析した全62,976遺伝子のうち、2倍以上の変動を示した遺伝子は、筋萎縮誘発 (Co vs 2. CI, 図 19-A) で2,814遺伝子、再荷重 (Co vs 3. RL, 図 19-B) で2,851遺伝子であった。以上から、筋萎縮誘発、再荷重いずれの過程でも、多くの遺伝子の発現が変動したことが明らかになった。

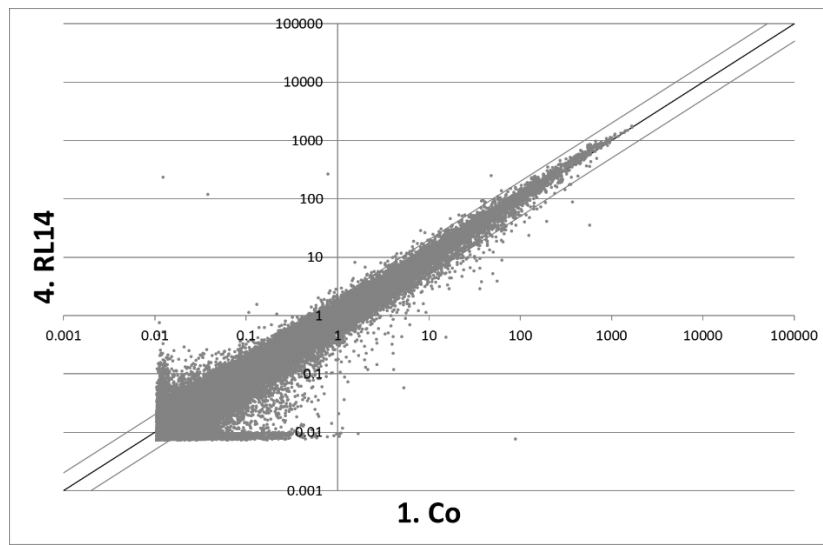
A



B



C



添付図 5 スキャッタープロット (A : Co vs CI, B : Co vs RL, C : Co vs RL14)

➤ MMP-2, MMP-9 以外の MMPs の遺伝子発現量

GeneName	SystematicName	FoldChange Co vs CI	FoldChange Co vs RL	FoldChange Co vs RL14
Imp2l	ENSMUST00000140790	0.83444934	0.77205205	0.857334592
Mmp10	NM_019471	1.08683927	1.113255778	0.727088358
Mmp11	NM_008606	1.568802178	1.52634107	1.266195664
Mmp12	NM_008605	2.552546778	0.969168016	0.716933296
Mmp12	NM_008605	0.750136995	0.760865314	0.705217607
Mmp12	NM_008605	0.759655491	0.76060799	0.70787474
Mmp13	NM_008607	67.41833813	43.93086801	0.716228335
Mmp14	NM_008608	2.132764689	2.099392767	1.536352004
Mmp15	NM_008609	0.952008659	0.826849176	0.993788119
Mmp16	NM_019724	0.754915305	0.754717954	0.69418784
Mmp16	ENSMUST00000133416	0.757462095	0.764083971	0.745680335
Mmp16	NM_019724	0.561316549	0.867089548	0.751351293
Mmp17	NM_011846	0.716792327	1.107450411	0.666858465
Mmp17	ENSMUST00000031390	0.497490713	0.783528143	0.801523708
Mmp19	NM_021412	1.999202915	1.696473483	1.184560069
Mmp19	NM_021412	3.288162048	2.956689817	1.400014142
Mmp1a	NM_032006	0.754339878	0.764424011	3.259853884
Mmp1b	NM_032007	0.75698625	0.757456372	0.709633489
Mmp1b	NM_032007	0.75834808	0.762426252	0.691974846
Mmp20	NM_013903	0.762591048	8.361045765	0.724664688
Mmp21	NM_152944	0.755986145	0.755692862	0.692756093

Mmp23	NM_011985	1.482024913	1.749506713	1.105246526
Mmp24	NM_010808	1.074849226	2.042637788	1.698293726
Mmp25	NM_001033339	0.777665154	0.758742155	0.702799271
Mmp27	NM_001030289	2.388903372	2.655044976	1.77756609
Mmp28	NM_172797	0.890536964	1.343380507	0.538826593
Mmp28	NM_080453	0.765650822	0.764101395	0.727857786
Mmp3	NM_010809	46.29380368	23.66925414	2.731166372
Mmp7	NM_010810	0.750947471	0.75973095	0.715348171
Mmp7	ENSMUST00000018767	0.763883005	0.782346705	0.677601043
Mmp8	NM_008611	0.999064066	0.964918903	0.27714873

➤ VEGF に関連するその他の遺伝子発現量

VEGF R1	Flt1	0.98	0.70	0.91
TSP-1	Thbs1	1.39	0.37	0.61
LGF-1	Igf1	0.79	0.88	0.44
TGF-β1	Tgfb1	2.43	2.12	0.73
FN1	Fn1	1.67	1.61	1.48

➤ Functional protein association networks

ある特定の遺伝子に機能的に関連の深い遺伝子のネットワークの情報は、STRING のデータベース (<http://string-db.org/>) より取得した。

The screenshot shows the STRING database search interface. At the top, there is a navigation bar with 'Version: 10.0', 'LOGIN', and 'REGISTER'. Below this is the STRING logo and a search bar. The main content area is titled 'SEARCH' and contains a form for 'Single Protein by Name / Identifier'. The form has two input fields: 'Protein Name' (with examples #1, #2, #3) and 'Organism' (set to 'auto-detect'). A 'SEARCH' button is located at the bottom of the form.

添付図 6 STRING データベースの検索画面



➤ Functional Annotation 解析

マイクロアレイ法にて解析したすべての遺伝子の中で、どの機能的グループに属する遺伝子群が大きく変動したかをみる方法. DAVID Bioinformatics Resources 6.8 のホームページ (<https://david.ncifcrf.gov/>) より解析を実施した.

DAVID Bioinformatics Resources 6.8  
National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH

Home Start Analysis Shortcuts to DAVID Tools Technical Center Downloads & APIs Term of Service Why DAVID? About Us

\*\*\* Welcome to DAVID 6.8 with updated Knowledgebase ([more info](#)). \*\*\*  
\*\*\* If you are looking for DAVID 6.7, please visit our [development site](#). \*\*\*

Shortcuts to DAVID Tools

Functional Annotation  
Gene-annotation enrichment analysis, functional annotation clustering, BioCarta & KEGG pathway mapping, gene-disease association, homologue match, ID translation, literature match and [more](#)

Gene Functional Classification  
Provide a rapid means to reduce large lists of genes into functionally related groups of genes to help unravel the biological content captured by high throughput technologies. [More](#)

Gene ID Conversion  
Convert list of gene ID/accessions to others of your choice with the most comprehensive gene ID mapping repository. The ambiguous accessions in the list can also be determined semi-automatically. [More](#)

Gene Name Batch Viewer  
Display gene names for a given gene list; Search functionally related genes within your list or not in your list; Deep links to enriched detailed information. [More](#)

Recommending: A [paper](#) published in *Nature Protocols* describes step-by-step procedure to use DAVID!

Welcome to DAVID 6.8  
2003 - 2016

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 comprises a full [Knowledgebase update to the sixth version](#) of our original web-accessible programs. DAVID now provides a comprehensive set of functional annotation tools for investigators to understand biological meaning behind large list of genes. For any given gene list, DAVID tools are able to:

- Identify enriched biological themes, particularly GO terms
- Discover enriched functional-related gene groups
- Cluster redundant annotation terms
- Visualize genes on BioCarta & KEGG pathway maps
- Display related many-genes-to-many-terms on 2-D view.
- Search for other functionally related genes not in the list
- List interacting proteins
- Explore gene names in batch

What's Important in DAVID?

- [New requirement to cite DAVID](#)
- [IDs of Affy Exon and Gene arrays supported](#)
- [Novel Classification Algorithms](#)
- [Pre-built Affymetrix and Illumina backgrounds](#)
- [User's customized gene background](#)
- [Enhanced calculating speed](#)

Statistics of DAVID

DAVID Bioinformatic Resources Citations

Year	Citations
2003	~100
2004	~200
2005	~300
2006	~400
2007	~500
2008	~600
2009	~700
2010	~800
2011	~900
2012	~1000
2013	~1100
2014	~1200
2015	~1300
2016	~1400

添付図 7 DAVID Functional Annotation Bioinformatics 画面

### 3年間の研究業績

#### 学術論文（査読あり）

- 1) Katsuta W, Aihara M, Hirose N. et al. Changes in oxidative stress severity and antioxidant potential during muscle atrophy and reloading in mice. *J. Phys. Ther. Sci.* 30(1):42-46, 2018
- 2) Aihara M, Hirose N, Katsuta W, et al. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. *J. Phys. Ther. Sci.* 29(10):1779-1783, 2017

#### 学会発表

- 1) 不活動が脳由来神経栄養因子 BDNF に与える影響の検討（日本筋学会第 5 回学術集会）
- 2) 廃用性筋萎縮と再荷重の過程における骨格筋内 MMPs の動態と筋内血管への影響（第 104 回理学療法科学学会学術大会）
- 3) 廃用性筋萎縮と再荷重の過程におけるマトリックスメタロプロテアーゼとマイオカインの変動（第 23 回日本基礎理学療法学会）
- 4) 廃用性筋萎縮に対する運動介入が脳由来神経栄養因子 BDNF に与える影響の基礎的検討（第 5 回日本サルコペニア・フレイル学会大会）
- 5) マトリックスメタロプロテアーゼの廃用性筋萎縮と再荷重過程における動態（日本筋学会第 4 回学術集会）
- 6) 廃用性筋萎縮モデルマウスにおけるマイオカインとマトリックスメタロプロテアーゼの変動（第 97 回理学療法科学学会学術大会）
- 7) ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重が微細筋損傷および IL - 6,IL - 15 に与える影響（第 90 回理学療法科学学会学術大会）
- 8) 廃用性筋萎縮に対する再荷重の影響の検討—微細筋損傷と IL - 6,IL - 15 に着目して—（第 52 回日本理学療法学会学術集会）

#### 研究助成

- 1) 平成 30 年度理学療法にかかわる研究助成（研究テーマ：不活動が脳に与える影響の基礎的検討－脳由来神経栄養因子 BDNF に着目して－）