

2019年1月8日

博士学位論文審査報告書

大学名	早稲田大学
研究科名	スポーツ科学研究科
申請者氏名	齋藤 久美子
学位の種類	博士（スポーツ科学）
論文題目	The beneficial effects of mechanical stress on disuse-induced skeletal muscle atrophy and inflammation 不動による骨格筋の萎縮・炎症に対するメカニカルストレスの改善効果
論文審査員	主査 早稲田大学教授 鈴木 克彦 博士（医学）（弘前大学） 副査 早稲田大学教授 彼末 一之 工学博士、医学博士（大阪大学） 副査 早稲田大学教授 樋口 満 教育学博士（東京大学）

神経障害や外傷により長期臥床や運動不足、ギプス固定等の状態が継続すると、身体不活動に伴って骨格筋に萎縮と炎症が生じることが報告されている。この萎縮と炎症が骨格筋の疼痛や筋力低下を誘発することで、ふらつきや関節可動域の減少を引き起こし、転倒の危険を高める。そして、骨折、関節痛、炎症性疾患等の二次障害につながる。超高齢社会を迎え、要介護者や要支援者の増加をくい止めるためにも、不活動に伴う骨格筋の萎縮・炎症を抑制することは、喫緊の課題となっている。

現在、筋萎縮と炎症を抑制するために推奨されているのは適度な運動であるが、運動がどうして筋萎縮・炎症の抑制効果をもたらすのか、その作用メカニズムが未解明なため、運動療法として確立していないのが現状である。また、運動機能が障害された人にとって、身体活動には困難が伴う。そこで本博士論文では、運動機能が障害された状態でも施術可能なマッサージに着目し、運動とマッサージに共通する「メカニカルストレスの負荷」という観点から不活動性の筋萎縮・炎症の予防効果について研究した。

本論文は第1章から第6章で構成されており、各章の内容は以下の通りである。

第1章の研究の背景については、不活動性の萎縮・炎症の機序と、炎症調節の役割を担うマクロファージの機能、そしてマッサージに関する先行研究の知見を整理している。骨格筋の活動が低下すると萎縮が生じることは、ヒトでも実験動物でも確認されている。筋萎縮は、筋タンパクの合成と分解のバランスが分解優位に傾いた結果生じるが、身体不活動時の筋タンパク分解経路では、ユビキチン-プロテアソーム経路が最も重要な働

きをしていることが示唆されている。ユビキチン-プロテアソーム経路は、標的としたタンパク質を特異的に分解することができる経路であり、その標的には筋タンパク合成系に属する MyoD、炎症の調節に重要な役割を果たす NF- κ B が含まれている。筋活動が低下すると、ユビキチン-プロテアソーム経路の筋タンパク分解酵素の発現が高まり、それが運動の強度や期間に依存することから、身体不活動とユビキチン-プロテアソーム経路の関係が示唆されてきた。

近年、萎縮した筋には、同時に炎症が生じていることが明らかになり、萎縮に対する炎症の関与が注目されている。炎症は、急性炎症と慢性炎症を区別する考えが提唱されており、激運動や外傷などが誘発する急性炎症は、生理的な炎症とされ筋組織は完全に修復される。しかし、長期にわたる身体不活動が誘発する慢性炎症は、線維化などの異常な修復を誘導することで不可逆性の機能障害をもたらす。不活動性の筋萎縮と慢性炎症の関係は、どちらが原因か結果か、もしくは独立した系であるかは解明されていない。

そして炎症の調節には免疫系の細胞であるマクロファージが重要な役割を果たしており、炎症の発生から終息までの各ステージの調整を担う。マクロファージは、自然免疫系の主要細胞として病原体や死細胞などを貪食することはこれまで認識されてきた。しかし貪食に加えて、生物の発生段階やホメオスタシスの維持に至るまでマクロファージが関与することが明らかになり、その多機能性に注目が集まっている。現在でも未解明の機能を発揮する可能性を秘めていることから、新しい治療のターゲットとなりうるとして研究が進んでいる。

マッサージは、「健康増進や不調改善を目的として、規則的な圧力や叩打をもって身体に与えられる機械的操作」と定義され、その目的は血流改善、疼痛緩和、筋機能改善、自律神経調節と多岐にわたる。近年、激運動後の筋損傷に対して、マッサージが炎症性物質の産生を抑制することが報告されたが、そのメカニズムは未だ解明されていない。そこで、これらの既存の研究から課題点を指摘し、本論文の目的を提示した。

第2章では、不活動性の筋萎縮と炎症に対して、マッサージを模した反復性圧迫(LCC)は萎縮・炎症抑制効果をもたらすか、また、LCCが負荷された時どんな細胞が影響を受けるかを検討した。身体不活動モデルとして、マウスの体幹と後肢を固定して後肢の運動を制限したところ、腓腹筋において3日目に炎症誘導物質(MCP-1)の発現が増加し、7日目には筋線維断面積(CSA)の縮小・筋機能の低下・マクロファージ数の増加・マクロファージによる炎症性物質(TNF- α)産生の増加が認められ、炎症および萎縮が誘発されていた。そこで、体幹と後肢の固定翌日から1日30分、7日間、LCCを下腿に負荷したところ、腓腹筋においてMCP-1の増加抑制・CSAの縮小抑制・筋機能の低下抑制・マクロファージの浸潤抑制およびTNF- α の増加抑制が認められ、LCCの炎症・萎縮抑制

効果が明らかになった。この内容は、2017年 日本補完代替医療学会にて演題発表を行った。

次に血中の貪食細胞を枯渇させる薬剤をマウスに投与し、筋組織におけるマクロファージの浸潤を抑制すると、体幹と後肢を固定して後肢の運動を制限しても、MCP-1 産生の増加が起らず、CSA の縮小・マクロファージ数の増加・TNF- α の増加も認められなかった。そのため、LCC を負荷してもその影響が消失した。この結果から、マクロファージが身体不活動時の炎症と萎縮を誘導したこと、マクロファージが LCC を感受すると炎症誘導反応が抑制され、炎症と萎縮が抑制されることが明らかとなった。この内容は、2018年 早稲田大学スポーツ科学学術院 SGU 国際フォーラムにてポスター発表を行った。

第3章では、LCC を負荷した腓腹筋内でどんな現象が生じているかを解明する実験を行った。LCC が萎縮筋において炎症と萎縮を抑制することが確かめられたので、次に LCC の作用因子を同定することを目標とした。腓腹筋内へ造影剤を注入後、1 回目の μ CT 撮影を行った。そして LCC を下腿に 5 秒間負荷し、その後 2 回目の μ CT 撮影を行い、2 枚の撮像を比較した。造影剤の広がりの違いを解析したところ、LCC によって造影剤の動きが筋の長軸方向に促進されることが明らかとなり、LCC は間質液の流れを促進したことが明らかとなった。

第4章では、第3章で LCC によって間質液の流れが促進されたことを受け、間質液の流れによって生じるシェアストレス（メカニカルストレス）が LCC の作用因子ではないかという仮説を立て、それを検証する目的で細胞実験を行った。マウスの腹腔内から炎症性マクロファージを採取し、ディッシュに接着させた。そのディッシュにチャンバーを装着しホースをつないで循環系を作り、ポンプで培養液を循環させシェアストレスを 1 Hz で 30 分間負荷したところ、MCP-1 の発現抑制が認められ、細胞に対するシェアストレス（メカニカルストレス）の炎症抑制作用が確認できた。

第5章では、第2章から第4章までで得られた実験結果を総括した。身体不活動が骨格筋に炎症と萎縮を誘導するが、萎縮筋に外部からメカニカルストレスを負荷することでその炎症と萎縮が抑制された。さらにその時、免疫系に属するマクロファージの炎症誘導反応が抑制されていた。そこで、筋内へのマクロファージの浸潤を抑制すると、身体不活動状態でも炎症・萎縮が生じず、その結果メカニカルストレスの炎症・萎縮抑制効果が消失した。そして、LCC を負荷した時、筋内で間質液流が促進されており、間質液流の変化で生じるシェアストレス（メカニカルストレス）を細胞実験でマクロファージに負荷すると、炎症誘導物質の発生を抑制することができた。これらの結果から、身体活動が減少すると、骨格筋内の間質液が貯留し、間質細胞へかかるメカニカルストレスが減少する。その結果、炎症を誘導するシグナルが発生し、炎症が生じるとともに筋

萎縮が進行する。身体活動が減少したときに外部からメカニカルストレスを負荷すると、間質液の流れを助け、間質細胞に負荷されるメカニカルストレスを維持することで、炎症誘導反応を抑制し、炎症・萎縮を抑制するのではないかという考察が得られた。第2章から第5章までの研究は、Clinical Science に論文が掲載された。

第6章では、結語として、本博士論文の研究からの今後の展望を述べた。本博士論文では、萎縮筋に対するマッサージの作用因子は、間質液流の促進によるメカニカルストレスであり、骨格筋に負荷されるメカニカルストレスは筋組織の炎症と萎縮を抑制する、という結論を得た。また、そのメカニズムにマクロファージが関わる可能性を見出した。しかし、間質に存在する他の細胞の働きは未解明であるため、他の細胞がこのメカニズムの主要な役割を担うという可能性を棄却できない。そこで今後は解析対象を広げてマクロファージ以外の細胞の機能も解析し、マッサージの作用メカニズムをさらに明確にする研究が求められると考えられる。

運動やマッサージに共通するメカニカルストレスという要素に着目し、その筋萎縮・炎症抑制効果を明らかにしたこと、また、メカニカルストレスを感受する責任細胞の特定には至らなかったが、その候補としてマクロファージの機能を明らかにしたことは、マッサージとともに運動の効果にも科学的な裏付けをもたらし、治療法として確立する基盤となる意義のある研究と評価できる。

上記のような評価を得て、本審査委員会は、斎藤久美子氏の学位申請論文が博士（スポーツ科学）の学位を授与するに十分値するものと認める。

本学位論文に関連した学術誌掲載学術論文は以下の通りであり、第2章から第4章までで述べられた実験結果が該当している。

1. Kumiko Saitou, Masakuni Tokunaga, Daisuke Yoshino, Naoyoshi Sakitani, Takahiro Maekawa, Youngjae Ryu, Motoshi Nagao, Hideki Nakamoto, Taku Saito, Noriaki Kawanishi, Katsuhiko Suzuki, Toru Ogata, Michiru Makuuchi, Atsushi Takashima, Keisuke Sawada, Shunsuke Kawamura, Koichi Nakazato, Karina Kouzaki, Ichiro Harada, Yoshinori Ichihara, Yasuhiro Sawada. (2018) Local cyclical compression modulates macrophage function in situ and alleviates immobilization-induced muscle atrophy. Clinical Science. 132(19):2147-2161

以 上