

Original Article

ギプス固定による筋の不動と運動による肝細胞増殖因子の筋肉中と血漿中の変動について

岡崎英人,¹ 別府秀彦,² 水谷兼明,² 園田 茂^{1,2}¹ 藤田保健衛生大学医学部リハビリテーション医学II講座² 藤田記念七栗研究所

要旨

Okazaki H, Beppu H, Mizutani K, Sonoda S. Changes muscle and plasma hepatocyte growth factor levels under casting immobilization. *Jpn J Compr Rehabil Sci* 2013; 4: 84-87.

【目的】肝細胞増殖因子（HGF）は筋細胞の増殖に関わる因子であるが、筋肉内の変動と血液中的の変動の関係は不明である。今回下肢萎縮ラットを用いて運動が筋肉中と血液中の HGF にどう影響するのかを検討した。

【方法】30匹の雌の Sprague-Dawley ラットを用いた。15匹は14日間の左下肢ギプス固定を行い（CAS）もう15匹はコントロール（CNT）として通常活動させた。ギプス除去後、訓練前群（PE）、7日間通常活動を行う群（NA）と20度傾斜トレッドミル運動15m/minを1日30分7日間行う群（TR）とに分けた。CNTも同様に3群に分けた。それぞれの群の体重あたりの左ヒラメ筋重量、血漿 HGF、左ヒラメ筋 HGF を測定し、多重比較で差を検討した。

【結果】筋重量では CAS-PE が全ての CNT より有意に低く、筋肉中の HGF レベルでは CAS-TR が CAS-PE と CAS-NA より有意に高値を示した。血漿中の HGF レベルでは有意差を認めなかった。

【結語】筋肉中の HGF は相対的に強度の強い運動負荷で発現しその動態は筋肉中に限定される。

キーワード：萎縮、運動負荷、肝細胞増殖因子

著者連絡先：岡崎英人
藤田保健衛生大学医学部リハビリテーション医学II講座
〒514-1295 三重県津市大鳥町424-1
E-mail: hideto@fujita-hu.ac.jp
2013年12月3日受理

利益相反：本研究は営利的な企業・団体からの財政的支援を受けていない。

謝辞：本研究は平成23年度藤田学園教員研究助成費により実施されたものである。

はじめに

評価は治療方針を決定するための重要な判断材料である。リハビリテーションでは筋力値や日常生活動作などの評価が使われるが、これらの評価のみでは適切な訓練量を決定するのは困難な事がある。そのため客観的に評価できる訓練量決定に関連する因子があれば、臨床場面で大変有用なものになる。

近年、骨格筋の肥大に様々なサイトカインの関与が報告されている [1]。さらに、これらのサイトカインの標的としてサテライト細胞が注目されている [2]。サテライト細胞は筋線維の細胞外マトリックスに存在する幹細胞である。サテライト細胞は通常静止状態にあり、サテライト細胞は活性化された後、損傷部位へ移動し、分化増殖し、融合し肥大を引き起こす [3]。insulin-like growth factor や fibroblast growth factor はサテライト細胞を活性化せず [4]、肝細胞増殖因子（HGF）がサテライト細胞を活性化する唯一の成長因子と考えられている [3]。HGF の発現は筋損傷や訓練で増加し [5]、また機械的にサテライト細胞を刺激すると一酸化窒素を介し HGF が放出され、pH に依存してサテライト細胞を活性化することも報告されている [6]。このサテライト細胞は細胞内に HGF の mRNA が存在し、HGF 中和抗体を加えると培養中のサテライト細胞の増殖が減少することから、サテライト細胞は分泌した HGF を自身に作用させる自己自律分泌型の細胞と考えられている [7]。筋の不動や訓練による HGF の変化を測定した報告はまだ少ない。Tanaka らは、2週間のヒラメ筋萎縮後のラットで萎縮筋への負荷後に筋肉中の HGF が増加したと報告しており [8]、筋の活動状態が筋肉中の HGF レベルに影響を与えていると考えられる。一方、血液中の HGF に関しては O'REILLY らは健常成人に対し、膝伸展の等加速度運動を行い運動4時間後の血清 HGF が訓練前より有意に上昇していたと報告している [9]。筋肉中の HGF の測定は筋肉の採取が必要である。そのため筋肉中の HGF の変動が血中 HGF 値に反映すれば訓練の指標として活用できであろうが、この点に関する報告は我々の知る限りなされていない。今回後肢ギプス固定ラットを用いて萎縮後の運動が筋肉中と血液中の HGF レベルにどう影響するのかを検討した。

方法

実験動物

本研究は藤田保健衛生大学動物実験委員会の承認を得て行った。30匹の雌のSprague-Dawleyラット（平均体重 275 ± 25.6 g, 15週齢）を用いた。15匹はコントロール群（CNT）とし15匹はギプス群（CAS）とした。コントロール群は個々にゲージ内で飼育された。ギプス群はネブタールで麻酔した後、熱可塑性素材で左後肢にギプスを装着し、コントロール群と同様の環境で飼育された。固定時の肢位は膝90度屈曲位、足関節屈曲0度とした。14日後、麻酔処置後にギプスを除去し、訓練前群（PE）としてCNTの5匹とCASの5匹は体重を測定した後、ヘパリン採血管を用いて全血液を心臓より採取し、ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋を採取した。腓腹筋と足底筋は剥離時に筋を損傷することがあり、本研究ではヒラメ筋のみを使用した。ヒラメ筋は湿重量を測定した後、マイクロチューブにいれ、液体窒素で凍結した。そして、凍結されたヒラメ筋は解析まで -80 度で保存した。血液は3,000 rpmで20分間遠心分離を行い、遠心分離後、血漿を採取し解析まで -80 度で保存した。他のラットは、通常活動群（NA）と訓練群（TR）の二つのグループに分けた。NAのラットは個々にゲージで飼育され、TRのラットは20度の登り傾斜のトレッドミル上を15 m毎分の速度で毎日30分間走行させた。トレッドミルの運動量は本研究の前に同週齢の他のラットを用いて、運動を完遂できる設定を複数回試し決定した。ギプス除去後7日後、全てのラットの全血液とヒラメ筋を採取した。CNT-NA、CNT-TRとCAS-NAのそれぞれ1匹は後肢に傷が有り解析から除外した。

HGFの測定

25 mlのHGF臓器抽出液に0.5 mlのプロテアーゼ阻害カクテルを混和した。ヒラメ筋に混和液を添加しマイクロホモジナイザー（Physcotron NS-310E-NS4, NITI-ON, Chiba, Japan）を使用してホモジナイズした。ホモジナイズされた抽出液を 4.4°C 、15,000 rpmで30分間遠心分離を行い、遠心分離後、中間層を抽出した。血漿と抽出液のHGFをラットHGF ELISA system (Institute of Immunology, Tokyo, Japan)を用いて測定した。

統計処理

ヒラメ筋の湿重量は体重で除した数値を使用した。ギプスと訓練の効果による筋重量、HGFレベルの差を検定するためボンフェローニ法による多重比較を行った。血漿と筋肉中のHGFの関連を調べるため散布図を作成し、相関係数を算出した。有意水準は5%とした。

結果

筋重量ではCAS-PEがCNT-PE, CNT-NA, CNT-TRより有意に低かった。CAS-NAはCNT-NAよりも低く、CAS-TRはCNT-TRよりも低い傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった。CAS-TRはCAS-NAより高く、CAS-NAはCAS-PEより高かった

が統計学的な有意差は認められなかった（図1）。筋肉中のHGFレベルでは、CAS-TRがCAS-PEとCAS-NAより有意に高値を示した。CAS-PEはCNT-PEより低かったが統計学的有意差は認めなかった（図2）。他の組み合わせは有意差を認めなかった。血漿中のHGFレベルでは、全ての群の間で有意差を全く認めなかった（図3）。血漿中と筋肉中のHGFの相関係数

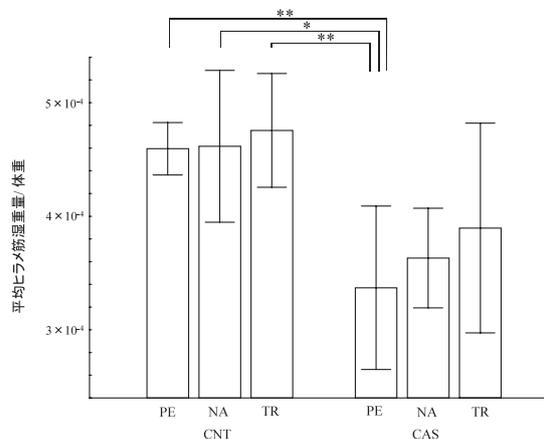


図1. 各群の平均ヒラメ筋湿重量/体重の比較。エラーバー：95%信頼区間，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

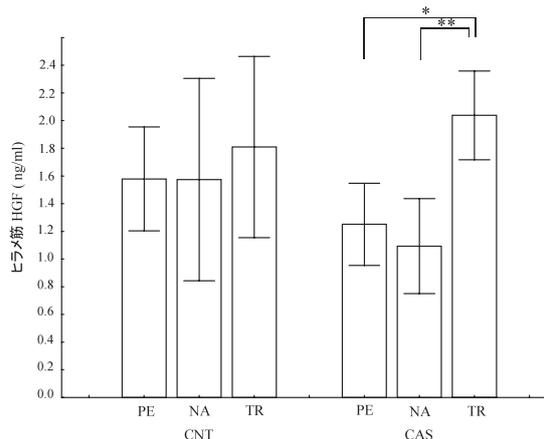


図2. 各群の平均ヒラメ筋 HGF 値の比較。エラーバー：95%信頼区間，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

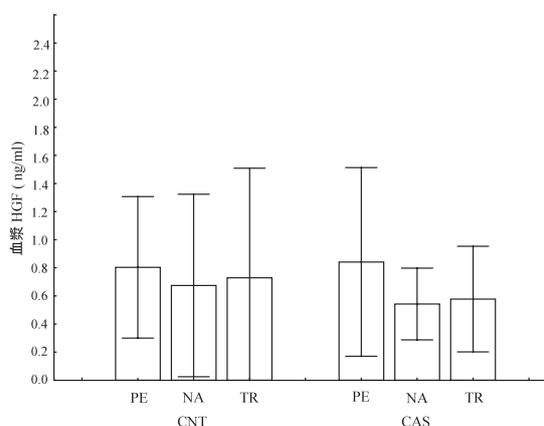


図3. 各群の平均血漿 HGF 値の比較。エラーバー：95%信頼区間，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

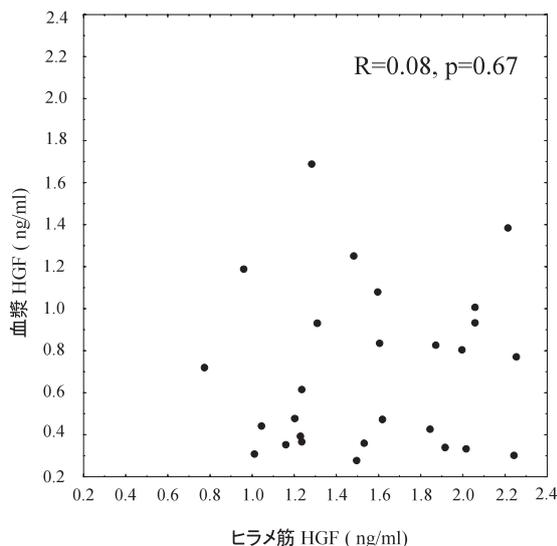


図4. 血漿 HGF- ヒラメ筋 HGF の散布図と相関係数.

は有意な相関を示さず、散布図でも一定の傾向を認めなかった (図4).

考察

今回、筋肉中の HGF の有意な変動は萎縮させた群だけに認められ、筋肉中の HGF 値の変動と血液中的の変動に関係性が認められなかった。この解釈としては同じ負荷を与えても萎縮した筋と萎縮していない筋によって反応が異なること、また筋肉中から HGF が血液中へわずかしか移行しない可能性が考えられる。

今回、萎縮させる方法として、固定肢位をヒラメ筋が伸張した肢位で固定を行った。固定肢位についてはラットのヒラメ筋のサルコメア数の減少は短縮した肢位での固定でも伸張された肢位での固定でも同様と報告されている [10]。また萎縮させた筋では有意に重量が減少しているため、今回の固定方法は問題ないと考えられる。ギプス群では運動負荷の違いによる筋重量の有意差は認めなかったが、TR の筋重量が PE より増加しており、コントロール群の TR とギプス群の TR にも有意な差がなかった。今回の検討では萎縮からの回復過程にあるヒラメ筋を検討したと考えられる。

筋肉内の HGF は筋損傷やサテライト細胞の機械的な刺激で増加し、サテライト細胞を活性化する [5, 6]。またサテライト細胞は細胞外マトリックスに存在するので、サテライト細胞は骨格筋の活動で刺激されると考えられる。本研究では二つの異なる負荷をコントロール群とギプス群に対して行ったが、ギプス群にのみ有意差が得られた。これは萎縮した筋は運動によって筋損傷を受けやすく、その結果 HGF が有意に変化したと考えられる。筋損傷はトレーニングにより生じる [11]。ラットでは、登り傾斜でのトレッドミル運動でヒラメ筋が損傷すると報告されている [12]。この報告では、登り傾斜で毎分 17 m の速度で 90 分間のトレーニングを行っており、我々の方法より強い負荷がかかっている。そのため、コントロール群は筋損傷が少なかった、または無かったと考えられる。一方ギプス群の萎縮したヒラメ筋はコントロール群の萎

縮していないヒラメ筋より相対的に強い負荷がかかり、筋損傷がコントロール群のヒラメ筋より多かったと考えられる。そのため、コントロール群では HGF の変化がなく、ギプス群の萎縮したヒラメ筋では筋損傷と、筋線維への相対的な強い負荷がかかり有意な HGF 上昇をもたらしたのだろう。

今回の研究では運動による筋損傷が筋肉内の HGF の変動に大きく関与していると考えられる。強度の強い運動による筋損傷は筋力の低下や関節可動域の低下をもたらす [13]。このような過度の運動は危険な運動となる。今回のトレッドミル運動でギプス群の多くのラットが運動を完遂出来ない場合、運動強度が強すぎるために筋力低下を来していることが想定される。しかし今回全てのラットは、トレッドミル運動を 7 日間完遂した。したがって、萎縮した筋への運動負荷は筋損傷を与えるが過度な運動ではなかったと考えて良いだろう。

一方、ギプス固定による筋の不動は筋肉中 HGF に有意な変動を与えなかった。先行研究でもラットのヒラメ筋の萎縮は筋内の HGF の有意な減少を示していないが、本研究と先行研究ともに減少傾向にある [8]。筋萎縮後のラットでは、サテライト細胞の減少を引き起こすと報告されている [14]。その為、サテライト細胞の減少と筋活動の低下が HGF の減少に関与した可能性が考えられる。

今回、血漿中 HGF 値と筋肉中 HGF 値とに有意な関係を認めなかった。筋損傷によって筋由来タンパクである乳酸脱水素酵素 (LDH) が血液中で増加することが知られている [15]。分子量は LDH が約 140 kDa、そして HGF が約 90 kDa [3] であり、HGF の分子量が大きく筋肉内に留まるとは考えにくい。HGF の大部分は、機械的刺激を受けていないときにはサテライト細胞表面に存在することが確認されている [6]。これは受容体に結合しなかった HGF が細胞表面に結合しプールされていると考えられる。O'REILLY らの報告では運動後 4 時間後は HGF 値が有意に上昇しているが、24 時間後、72 時間後は低下してきており変化は一時的である [9]。従って、今回の結果は運動により HGF の放出が促され、一部は血液中にも漏出するが、多くは HGF の受容体や受容体以外の細胞表面に結合し、結果として血液中的の HGF に大きな変動を与えないと考えられるだろう。

今回の検討では、各群の数が少なく、また組織学的な確認もしていない為、今後数を増やし、さらに強度の強い運動負荷を加えた群を追加し組織学的検討も含め検討する予定である。

以上より、筋肉内の HGF は相対的に強度の強い負荷や筋損傷で発現されるが、血液中では変化が得られず、筋肉内の多くの HGF の動態は筋肉内に限られ、訓練量決定因子にはなり得ないと考えられた。

文献

1. Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res* 2010; 24: 2857-72.
2. Anderson JE, Wozniak AC. Satellite cell activation on fibers: Modeling events in vivo-an invited review. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 300-10.

3. Tatsumi R. Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim Sci J* 2010; 81: 11–20.
4. Bischoff R. Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Dev Biol* 1986; 115: 129–39.
5. Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: Nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 1859–74
6. Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of ph and nitric oxide. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 2909–18.
7. Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE. Hgf is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 2000; 23: 239–45.
8. Tanaka S, Tachino K, Kawahara E, Tanaka J, Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor in mouse soleus muscle increases with reloading after unloading. *J Phys Ther Sci.* 2006; 18: 33–41.
9. O'Reilly C, McKay B, Phillips S, Tarnopolsky M, Parise G. Hepatocyte growth factor (hgf) and the satellite cell response following muscle lengthening contractions in humans. *Muscle Nerve* 2008; 38: 1434–42.
10. Williams PE, Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. *J Cell Sci* 1971; 9: 751–67.
11. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: Fact or fiction? *Acta Physiol Scand.* 2001; 171: 233–9.
12. Komulainen J, Kytölä J, Vihko V. Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2299–304.
13. Howell JN, Chila AG, Ford G, David D, Gates T. An electromyographic study of elbow motion during postexercise muscle soreness. *J Appl Physiol* 1985; 58: 1713–18.
14. Wanek LJ, Snow MH. Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. *Anat Rec* 2000; 258: 176–85.
15. Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med* 1999; 27: 43–59.