



# Transcutaneous carbon dioxide application inhibits muscle atrophy after fracture in rats

Inoue, Miho

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7554号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007554>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Transcutaneous carbon dioxide application inhibits muscle atrophy after fracture in rats

炭酸ガス経皮吸収はラット骨折モデルにおいて  
骨折後の筋萎縮を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
整形外科科学  
(指導教員：黒田 良祐 教授)

井上 美帆

#### 【目的】

骨折後やその加療のための不動により、四肢の筋萎縮が生じることは臨床的にしばしば経験する。特に下肢の筋萎縮は日常生活へのスムーズな復帰を困難にし、Quality of life の低下を招く。しかしながら、骨折後の筋萎縮に対する研究は少なく、治療法はいまだ確立していないのが現状である。我々はこれまでに、炭酸ガス（CO<sub>2</sub>）経皮吸収システムを開発し、CO<sub>2</sub>経皮投与が血流促進や血管新生を促し、筋持久力の増大や筋損傷モデルでの治癒を促進することを証明した。そこで本研究では、骨折後の筋萎縮に対する CO<sub>2</sub> 経皮吸収の影響を検討し、CO<sub>2</sub> 経皮吸収が骨折後の筋萎縮を抑制しうるか否かを検討することとした。

#### 【方法】

30 匹の Sprague-Dawley 系ラットを使用した。右大腿骨に径 1.2mm の Kirschner wire を逆行性に挿入した後、重錘落下により骨折させ骨折モデルを作成した。うち 6 匹は骨折作成直後に安楽死させた (0 日)。残りの 24 匹は無作為に 2 群に分け、炭酸ガス群と対照群とした。炭酸ガス群には下肢に週 5 回、20 分間の炭酸ガス経皮吸収を行った。炭酸ガス経皮吸収は、以前我々が開発した方法通り、ラットの下肢を剃毛した後ハイドロゲルを塗布し、下半身にアダプターを装着し、その中に 100%CO<sub>2</sub> を送気する方法を用いた。コントロール群では CO<sub>2</sub> の代わりに空気を充填した。骨折後 14 日、21 日で両群からそれぞれ 6 匹ずつ安楽死させた。いずれも安楽死直後にラットのヒラメ筋を採取し、筋湿重量を測定し、Hematoxylin-Eosin 染色、ATPase 染色で組織学的評価を行い、筋線維横断面積と筋線維のタイプの比率を計測した。筋合成に関わる因子である PGC1- $\alpha$ 、IGF-1、血管新生に関与する VEGF、筋萎縮に関わる因子である Atrogin-1、FOXO-1 の免疫染色による評価を行った。さらに、Real-time PCR 法によりこれらの因子を経時的に定量した。また、血管新生の評価として血管内皮細胞を Isolectin B4 で蛍光染色し評価を行った。

#### 【結果】

骨折後 14 日、21 日で、ヒラメ筋の筋湿重量は炭酸ガス群で上昇し、両群間で有意差を認めた。また、組織学的検討において、筋線維の断面積は骨折後 14 日以降、両群で減少したが、その程度は炭酸ガス群で軽減していた。ATPase 染色では、骨折直後では□型線維がほとんどであったのに対し、骨折後 14 日、21 日では□A、□B 線維の割合が増加し、炭酸ガス群では□、□A 型線維の割合が対照群と比較し有意に高く、□B 線維の割合は有意に低かった。Real-time PCR による解析では、PGC-1 $\alpha$ 、VEGF、IGF-1 の mRNA が骨折後 21 日でピークとなり、対照群と比較し炭酸ガス群で有意に高値であった。FOXO-1 は骨折後 14 日の対照群で増加したのに対し、炭酸ガス群では低下した。Atrogin-1 は両群において時間経過に伴い減少した。これらの因子に置ける骨折後 21 日の免疫染色では PGC-1 $\alpha$ 、VEGF、IGF-1 は炭酸ガス群で陽性部位がより多く観察され、FOXO-1、Atrogin-1 は対照群でより多く観察された。Isolectin B4 による染色では骨折後 21 日で炭酸ガス群では対照群に対し有意に多く血管新生が確認され Real-time PCR における VEGF が増加した結果を裏付ける結果となった。

#### 【考察】

筋萎縮により、筋線維はⅡ型線維からⅡA、ⅡB へのタイプ変化や横断面積の減少が起こることが知られている。今回の研究の結果、骨折後に筋萎縮が起こること、そしてその萎縮の程度は炭酸ガス経皮吸収により抑制されうることが明らかとなった。さらに、筋合成のプロセスの中で、IGF 発現により FOXO-1 を介し Atrogin-1 の発現が抑制される経路が近年報告されており、今回の実験から、炭酸ガス経皮投与により IGF-1 の発現が促進され筋萎縮が抑制されたのではないかと考えられる。また、PGC-1 $\alpha$  は血管新生やミトコンドリアの生合成等種々の過程を誘導するが、その作用の一つとして IGF-1 の発現を促進することも明らかとなっており、今回の筋萎縮抑制に関わる経路として、これらが作用したと考えられる。また、不動後の筋萎縮では筋周囲の毛細血管数や VEGF の発現が低下することが知られており、炭酸ガス群でヒラメ筋での VEGF の発現が促進され、より多くの血管新生が観察されたことは、筋萎縮に抵抗する因子となったことが考えられた。炭酸ガス経皮吸収は過去の研究より、局所の血流増加や細胞内の低 pH を誘導し、人工的に Bohr 効果を引き起こすことが明らかとなっており、さらに、低 pH の環境が VEGF の発現を誘導することが報告されている。局所の血流増加や血管新生の促進も、炭酸ガス経皮吸収が筋萎縮を抑制するメカニズムの一つとなることが示唆された。炭酸ガス経皮吸収は骨折後の筋萎縮に対する治療手段となることが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2899号	氏 名	井上 美帆
論文題目 Title of Dissertation	Transcutaneous carbon dioxide application inhibits muscle atrophy after fracture in rats 炭酸ガス経皮吸収はラット骨折モデルにおいて骨折後の筋萎縮を抑制する		
審査委員 Examiner	主 査 西 嶋 一 Chief Examiner 副 査 森 信 曉 雄 Vice-examiner 副 査 小 谷 康 治 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景と目的】 骨折後は不動状態で加療するため、四肢筋肉の萎縮が生じる。特に下肢の筋萎縮は日常生活へのスムーズな復帰を困難にし、Quality of life の低下を招く。しかし、骨折後の筋萎縮発症機序に関する研究は少なく、治療法も確立していない。我々はこれまでに、炭酸ガス（CO<sub>2</sub>）経皮吸収システムを開発し、CO<sub>2</sub> 経皮投与が血流促進や 血管新生を促し、筋持久力の増大や筋損傷モデルでの治療を促進することを証明した。そこで本研究では、骨折後の筋萎縮に対する CO<sub>2</sub> 経皮吸収の影響を検討し、CO<sub>2</sub> 経皮吸収が骨折後の筋萎縮を抑制しうるか検討した。

【方法】 30 匹の Sprague-Dawley 系ラットを使用した。右大腿骨に径 1.2mm の Kirschner wire を逆行性に挿入した後、重錘落下により骨折させ骨折モデルを作成した。うち 6 匹は骨折作成直後に安楽死させた（0 日）。残りの 24 匹は無作為に 2 群に分け、炭酸ガス群と対照群とした。炭酸ガス群には下肢に週 5 回、20 分間の炭酸ガス経皮吸収を行った。炭酸ガス経皮吸収は、以前我々が開発した方法通り、ラットの下肢を剃毛した後ハイドロゲルを塗布し、下半身にアダプターを装着し、その中に 100%CO<sub>2</sub> を送気する方法を用いた。コントロール群では CO<sub>2</sub> の代わりに空気を充填した。骨折後 14 日、21 日で 両群からそれぞれ 6 匹ずつ安楽死させた。いずれも安楽死直後にラットのヒラメ筋を採取し、筋 湿重量を測定し、Hematoxylin-Eosin 染色、ATPase 染色で組織学的評価を行い、筋線維横断面積と 筋線維のタイプの比率を計測した。筋合成に関わる因子である PGC1- $\alpha$ 、IGF-1、血管新生に関与する VEGF、筋萎縮に関わる因子である Atrogin-1、FOXO-1 の免疫染色による評価を行った。さらに、Real-time PCR 法によりこれらの因子を経時的に定量した。また、血管新生の評価として血管内皮細胞を Isolectin B4 で蛍光染色し評価を行った。

【結果】骨折後 14 日、21 日で、ヒラメ筋の筋湿重量は対照群と比較して炭酸ガス群で有意に多かった。また、組織学的検討において、筋線維の断面積は骨折後 14 日以降、両群で減少したが、その程度は炭酸ガス群が軽度であった。ATPase 染色では、骨折直後では I 型線維がほとんどであったのに対し、骨折後 14 日、21 日では IIA、IIB 線維の割合が増加し、炭酸ガス群では、I、IIA 型線維の割合が対照群と比較し有意に高く、IIB 線維の割合は有意に低かった。Real-time PCR による解析では、PGC-1  $\alpha$ 、VEGF、IGF-1 の mRNA が骨折後 21 日でピークとなり、対照群と比較し炭酸ガス群で有意に高値であった。FOXO-1 は骨折後 14 日の対照群で増加したのに対し、炭酸ガス群では低下した。Atrogin-1 は両群において時間経過に伴い減少した。これらの因子に置ける骨折後 21 日の免疫染色では PGC-1  $\alpha$ 、VEGF、IGF-1 は炭酸ガス群で陽性部位がより広範囲に観察され、FOXO-1、Atrogin1 は対照群でより広範囲に観察された。Isolectin B4 による染色では骨折後 21 日で炭酸ガス群では対照群に対し有意に多く血管新生が確認され Real-time PCR における VEGF が増加した結果を裏付ける結果となった。

【考察】筋萎縮により、筋線維は型線維から IIA、IIB へのタイプ変化や横断面積の減少が起こることが知られている。今回の研究の結果、骨折後に筋萎縮が起こること、そしてその萎縮の程度は炭酸ガス経皮吸収により抑制されることが明確化した。近年筋合成系分子の IGF 発現により FOXO-1 を介し Atrogin-1 の発現が抑制される経路が報告されており、今回の実験から、炭酸ガス経皮投与により IGF-1 の発現が促進され筋萎縮が抑制されたのではないかと考えられた。

また、PGC-1 $\alpha$ は血管新生やミトコンドリアの生合成等種々の過程を誘導するが、その作用の一つとして IGF-1 の発現を促進することも明らかとなっており今回の筋萎縮抑制に関わる経路として、こちらにも関与したと考えられた。また、不動後の筋萎縮では筋周囲の毛細血管数や VEGF の発現が低下することが知られており、炭酸ガス群でヒラメ筋内の VEGF の発現が促進され、より多くの血管新生が観察されたことは、筋萎縮に抵抗する因子となったと推測された。炭酸 ガス経皮吸収は過去の研究より、局所の血流増加や細胞内の低 pH を誘導し、人工的に Bohr 効果を引き起こすことが明らかとなっており、さらに、低 pH の環境が VEGF の発現を誘導することも報告されている。局所の血流増加や血管新生の促進も、炭酸ガス経皮吸収が筋萎縮を抑制するメカニズムの一つとなることが示唆された。炭酸ガス経皮吸収は骨折後の筋萎縮に対する治療手段となることが期待される。

本研究は CO<sub>2</sub> 経皮投与点による骨折後筋萎縮予防に働く関連分子を明らかにした研究で、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。