

## 【 総 説 】

# 骨格筋圧挫損傷後急性期において高気圧酸素治療によりもたらされる血管新生・筋再生促進メカニズム

山本尚輝<sup>1,2)</sup>, 小柳津卓哉<sup>1,3)</sup>, 榎本光裕<sup>1)</sup>, 堀江正樹<sup>2)</sup>, 大川淳<sup>1)</sup>, 柳下和慶<sup>2,4)</sup>東京医科歯科大学医学部附属病院 整形外科<sup>1)</sup>東京医科歯科大学医学部附属病院 高気圧治療部<sup>2)</sup>済生会川口総合病院 整形外科<sup>3)</sup>東京医科歯科大学 スポーツ医歯学診療センター<sup>4)</sup>

キーワード

一酸化窒素、低酸素誘導因子 1  $\alpha$ 、筋衛星細胞、マクロファージ、筋張力

## 【Review】

## Mechanism of promoting angiogenesis and muscle regeneration induced by hyperbaric oxygen treatment at the acute phase after skeletal muscle contusion injury.

Naoki Yamamoto<sup>1,2)</sup>, Takuya Oyaizu<sup>1,3)</sup>, Mitsuhiro Enomoto<sup>1)</sup>, Masaki Horie<sup>2)</sup>, Atsushi Okawa<sup>1)</sup>, Kazuyoshi Yagishita<sup>2,4)</sup>

1) Department of Orthopaedic Surgery, Tokyo Medical and Dental University

2) Hyperbaric Medical Center, Medical Hospital, Tokyo Medical and Dental University

3) Department of Orthopaedic Surgery, Saiseikai Kawaguchi General Hospital

4) Clinical Center for Sports Medicine and Sports Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

keywords

Nitric oxide, Hypoxia Inducible Factor 1  $\alpha$ , satellite cell, macrophage, muscle tensile strength.

## 【はじめに】

打撲による筋挫傷は、スポーツ関連外傷において最も一般的な損傷である<sup>1)</sup>。これらは通常、RICE (休息、アイシング、圧迫、拳上) と短期間の固定によって保存的に治療される<sup>2)</sup>。しかし重症例では、急性および慢性疼痛の残存や筋再生が遅れることによる線維化が進み、運動機能障害が引き起こされることがあり<sup>3,4)</sup>、スポーツ競技や日常生活動作に支障をきたすことがある。そのため筋肉挫傷は一般的なスポーツ外傷でありながらアスリートが選手生命を絶たれるような深刻な事態にもなりうる疾患であるといえる。筋挫傷からの1日でも早い競技復帰はスポーツ選手にとって非常に重要であり、現場からのニーズも高い。

筋挫傷に対する治療戦略の一つとして、近年高気

圧酸素治療 (HBO) が注目されている。臨床においては HBO が外傷後の腫脹・疼痛を軽減させ<sup>5,6)</sup>、筋再生を促進し<sup>7)</sup>、競技復帰期間を短縮する<sup>8)</sup>ことは報告されている一方、HBO が骨格筋障害後の治癒を促進する分子的メカニズムは確立されておらず、そのため臨床的治療として認識が薄いのが現状である。

そのため我々はラットの下腿底屈筋群に Drop mass method という 25cm の高さから 640g の重りを落下させる方法<sup>9)</sup> で骨格筋圧挫損傷モデルを作成し、2.5ATA、120 分の HBO を週 5 回施行した群 (HBO 群) と施行しない群 (対照群) に分け比較検討することで、骨格筋圧挫損傷後に HBO が血管新生ならびに筋再生を促進するメカニズムを明らかにしてきた。

本稿では、骨格筋圧挫損傷ラットモデルを通して、

HBOが骨格筋圧挫傷後の血管新生・筋再生過程を促進する分子メカニズムを解説したい。

## 1. HBOと筋再生，筋張力の回復

圧挫損傷後の骨格筋治癒過程は1) 変性および炎症，2) 筋再生，3) 筋線維形成の3つからなり<sup>2, 3)</sup>，これらの各段階のすべてにおいて，細胞への栄養と代謝産物の輸送のための適切な血液の供給が骨格筋の機能回復には重要である<sup>6)</sup>。筋損傷後，筋線維は変性・壊死し，その周囲にマクロファージが損傷1日以内に浸潤し始めることで炎症が惹起される<sup>2, 10)</sup>。その後，骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞が活性化し自己増殖・分化することで筋再生は進行していく<sup>11-13)</sup>。その結果，好塩基性細胞質と中心核を示す再生筋線維が損傷3日後から増え始め<sup>10, 14)</sup>，損傷7日後に再生筋線維数がピークを迎える<sup>15, 16)</sup>。その後，再生筋線維の成熟に伴い断面積が拡大し，核が中心から辺縁に移動することで筋再生は完了する<sup>10)</sup>(**図1**)。しかし，筋再生が遅延する場合，過剰なコラーゲン沈着に伴う筋肉の再生障害等が起き，運動機能障害が残存すると言われている<sup>17)</sup>。

骨格筋圧挫損傷後にHBOを施行することで中心核をもつ再生筋線維数と横断面積，成熟筋線維数，筋張力の改善が促進するかどうかを調査した。筋線維についてはHE染色，再生筋線維を示すeMHCと細胞壁を示すラミニンの免疫共染色で評価した。筋張力は脛骨神経を刺激した際の腓腹筋の最大筋張力を計測し患健比を計算し比較した。その結果，HBOを施行した群では，再生筋線維数，成熟筋線維数のピークは対照群と比較して2日早まり，筋張力は損傷7日後に対照群より有意に改善した。また損傷5日後に筋線維の断面積はHBO群で有意に大きかった<sup>16)</sup>。HBOを施行することで骨格筋線維，筋張力の回復が早ま

り，筋再生が促進されたことが明らかとなった。

## 2. HBOと筋内酸素濃度，一酸化窒素増加

HBOが再生筋線維，筋張力回復を促進することが明らかとなった。そのため，HBOが筋再生を促進させる分子メカニズムを解説していきたい。

### A. 筋内酸素濃度はHBO施行後から回復

筋圧挫損傷後，増加した細胞内液貯留および増大した内圧に起因する局所循環障害の結果，浮腫および組織低酸素症が生じる<sup>18, 19)</sup>。損傷筋が酸素欠乏に陥ると，ATP産生のためには嫌氣的解糖系のみ機能となり，ATP産生が低下し，膜イオンチャネル機能不全および細胞ホメオスタシスの不全が生じ，二次骨格筋線維壊死につながる<sup>20, 21)</sup>。従って，酸素供給は，損傷筋の二次的な損傷を防止することが期待される。

HBOは血液中の溶存酸素量を増加させることで，細胞レベルでの酸素量を増加させることができる。また酸素は血液だけでなく，高濃度の酸素に到達する間質組織からの拡散によっても運ばれる<sup>5, 22, 23)</sup>。これらの作用機序により，HBOは血流が減少した損傷部位への酸素供給を可能とする。この現象が骨格筋圧挫損傷モデルにおいても発生しているかを確認した。

骨格筋圧挫損傷後，腓腹筋に針状酸素電極を挿入し組織内酸素濃度を直接測定した。損傷後の骨格筋の組織酸素濃度は定常状態の45mmHgから約10mmHg程度まで減少し，30時間かけて回復した。一方，骨格筋損傷後にHBOを施行すると，1回のHBO施行後から低酸素症が劇的に改善し，HBO後も損傷前の骨格筋内酸素濃度と有意差のない酸素濃度が持続された<sup>15)</sup>(**図2**)。HBOは筋損傷後の低酸素状態を改善し，HBO後も損傷前の骨格筋内酸素濃度が持続されることが明らかとなった。

### B. HBO後一酸化窒素濃度が上昇

損傷筋内の酸素濃度を上昇させることで二次的に引き起こされる分子メカニズムを示す。HBOは，その酸素濃度上昇作用に伴い，主にスーパーオキシド( $O_2^-$ )，過酸化水素( $H_2O_2$ )，一酸化窒素(NO)，およびペルオキシ亜硝酸( $ONOO^-$ )<sup>24, 25)</sup>で構成される活性酸

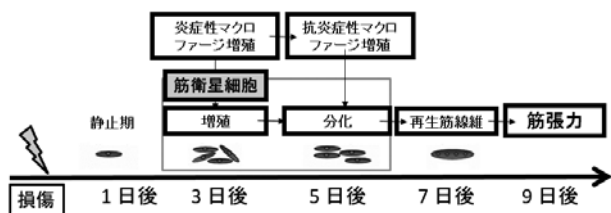


図1：骨格筋圧挫損傷後の筋再生過程

素種 (ROS) のレベルを一時的に増加させる。ROS, NOは高い濃度では酸化障害によるDNA 損傷等引き起こし有害であると考えられているが、一過性の上昇においては組織保護的なさまざまな成長因子, サイトカイン, およびホルモンのシグナル伝達カスケードを誘発し<sup>24-26)</sup>, コラーゲン合成<sup>27)</sup>, 衛星細胞<sup>28)</sup>などの細胞の増殖, および血管新生<sup>29)</sup>を促進する。

また, NO 産生にはNO 合成酵素 (NO synthase; NOS) が必要である。NOSには血管内皮由来の内皮型 (endothelial NOS; eNOS), マクロファージ由来の誘導型 (inducible NOS; iNOS), 神経由来の神経型 (neuronal NOS; nNOS) に分類される。NOSの活動は損傷後早期に増加し, 数日間高レベルの活動が持続すると言われ, HBOは3タイプのNOSを全て活性化することができる<sup>23)</sup>。HBOがROSおよびNOを介して与える影響を考察するため, 我々は先行研究に則り<sup>30)</sup>, 前日から連日ROS 阻害剤 (N-アセチルシステイン; NAC) または3タイプ全てのNOS 阻害剤 (ニトロ-L-アルギニンメチルエステル; LNAME) を投与し, ラット骨格筋圧挫損傷モデルにおけるHBOの有効性を検討した。アウトカムとして, 再生筋線維数や横断面積, 筋張力を測定し, ROSまたはNOが筋損傷後の筋再生に必要などうかを調査した。HBO施行

群では筋再生や筋張力の回復が促進されたが, HBO 施行群にNAC, LNAMEを投与するとHBOの筋再生促進効果は共に阻害された。この結果から, 両阻害剤に共通しているNOがHBOの筋再生促進効果に関与していると考えられた<sup>16)</sup>。次に, 実際に骨格筋圧挫損傷後における筋内NOの動態を調査するため, 最終代謝産物であるNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を測定した。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の生成は, HBO群で損傷後3, 6時間後に有意に増加しており<sup>16)</sup>, HBOが筋損傷後に損傷筋内のNOを一過性に上昇させることが明らかとなった。HBOが損傷骨格筋内のNOを増加させることで, 筋再生を促進していることが示された。

### 3. HBOと筋衛星細胞, マクロファージ

筋再生の中核となる筋原幹細胞である筋衛星細胞を中心にHBOが筋再生を促進するまでの過程を見ていきたい。

#### A. HBOによるHIF1αとIL-6の上昇

筋衛星細胞の増殖, 分化を促進する他の因子として, 低酸素で反応し細胞増殖を活性化させる低酸素誘導因子 (HIF) 1αが挙げられる<sup>26)</sup>。しかしながら, 高酸素状態であるHBO下でもHIF1αは増加する<sup>22, 23, 31)</sup>。正常酸素条件下では, HIF1αのmRNA発現は維持されるが, 分解酵素であるプロリルヒドロキシラーゼ (PHD) による急速な分解により, HIF1αタンパク質レベルは低く保たれている<sup>23)</sup>。しかしHBOはPHD活性を低下させるため<sup>22, 23)</sup>, 分解から免れたHIF1αの安定化が促進すると報告されている<sup>22, 23, 31)</sup>。骨格筋圧挫損傷後においてもHBOにより損傷筋内のHIF1αの安定化が促進されるかどうか調査した。HBO施行によりHIF1αのmRNAレベルは変化しなかったが, 細胞質内のHIF1αタンパク質量は, 挫傷後3・6時間・1日後に有意に増加した。この増加は前述のNAC, LNAME阻害剤投与群 (NO阻害群) においてはHBOを施行しているにもかかわらず抑制された<sup>16)</sup>。mRNAレベルの増加を伴わないHIF1αタンパク質量の増加はHIF1αが安定化されたこと意味しており, HBOによる組織内NOの増加が損傷後の初期段階で損傷筋内のHIF1αを安定化させたこ

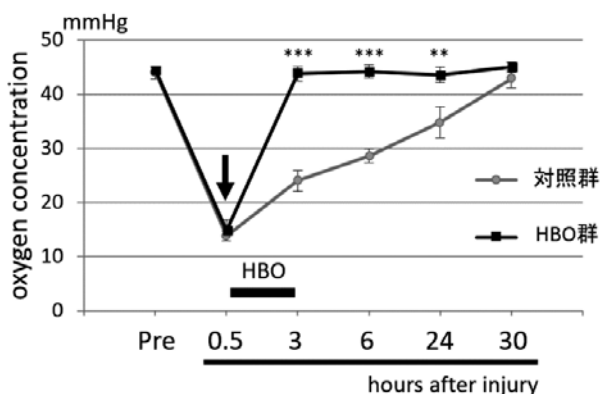


図2：骨格筋圧挫損傷後の損傷筋内酸素濃度の推移

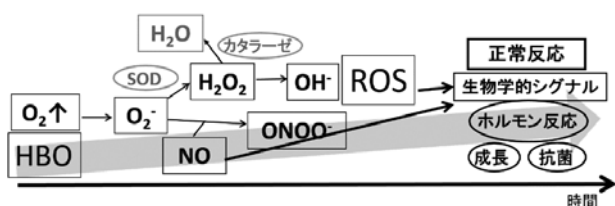


図3：HBO後のROS, NOの増加経路

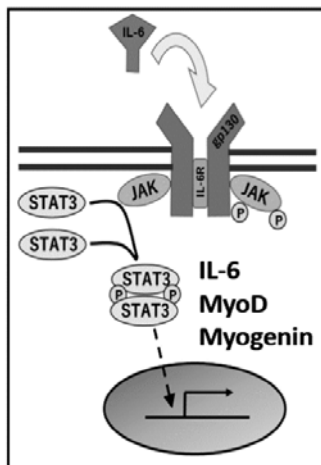


図4：IL-6/STAT3経路

とが明らかとなった。

一方、骨格筋損傷の急性期において炎症性サイトカインIL-6はMyokineとして知られており、骨格筋より産生され、骨格筋再生に寄与することが知られている。IL-6はSignal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)をリン酸化し、リン酸化されたSTAT3は、細胞質内から核内へ移行し<sup>32)</sup>、IL-10などの抗炎症性サイトカインを発現するとともに、MyoDやmyogeninなどの筋分化遺伝子を発現させる<sup>33, 34)</sup>(図4)。IL-6/STAT3経路は炎症反応の沈静化とともに、筋衛星細胞を分化させ、筋再生を促進する<sup>33, 34)</sup>。骨格筋圧挫損傷後におけるHBOの介入がIL-6/STAT3 pathwayに与える影響を評価した。

IL-6蛋白量のピークは対照群で損傷6時間後であったのに対し、HBO群では損傷3時間後であった。また細胞質内のSTAT3のリン酸化を反映するphosphate / total STAT3比は損傷3時間後においてHBO群で高かったが、total STAT3は損傷3時間・6時間後においてHBO群で低下していた。Total STAT3の減少はIL-6誘導性STAT3の細胞質から核への移行を反映している可能性が高い<sup>35)</sup>ため、HBOはIL-6/STAT3 pathwayを活性化することが示された。

## B. 筋衛星細胞，マクロファージ

筋衛星細胞は休止状態で転写因子Pax7を発現し、活性化され自己増殖すると筋原性調節因子MyoDが

誘導されてPax7と同時発現し増殖期となる。引き続き分化期においては、Pax7はダウンレギュレーションされ、MyoDは筋芽細胞系列へのさらなる分化を刺激する<sup>2,3,10, 14-16, 24, 33, 36)</sup>。骨格筋圧挫損傷後においてHBOが筋衛星細胞の増殖・分化に与える影響をPax7, MyoDを免疫染色し、Pax7, MyoD陽性細胞数をカウントして定量した。その結果、対照群と比較してHBO群において筋衛星細胞の自己増殖は損傷1・3日後に、分化は損傷3日後に有意に増加しており、筋衛星細胞の増殖・分化過程は促進された<sup>15)</sup>。よって、HBOが骨格筋圧挫損傷の急性期において筋衛星細胞の増殖・分化を促進することが確認された。

一方、損傷に伴い損傷筋内へ誘導される反応として、マクロファージの損傷筋への浸潤が挙げられる。血管内を循環する単球および損傷により動員された骨髄由来の単球は、筋肉傷害後、損傷組織に侵入し、炎症促進性マクロファージ(M1)に分化する。これらのM1細胞は、筋衛星細胞の増殖を刺激し、局所炎症を軽減し筋芽細胞の融合と筋線維の再生に寄与する抗炎症M2マクロファージ(M2)に分化する<sup>37, 38)</sup>。組織常在マクロファージも存在し、増殖を促進して分化・再生を促進するM2として働くようにすることによって筋損傷からの回復に重要な役割を果たす<sup>39, 40)</sup>。HBO施行に伴う、一連の動態を確認するため、血中炎症細胞と損傷部のM1, M2の動態を調査した。動脈血を採取し、炎症細胞マーカーであるCD11b陽性細胞とマクロファージマーカーであるCD68陽性細胞をflow cytometryで評価した。また、損傷筋においてはCD68に加え、M2を示すCD206で免疫染色を行い共陽性の細胞数をカウントした(n=5)。その結果、血中CD11b陽性細胞は損傷6・24時間でHBO群が有意に低かった。血中CD68陽性細胞の減少は両群で認められたが、対照群では損傷24時間後が、HBO群では損傷6時間後が最も低く、HBOは血中CD11b陽性炎症性細胞を抑制し、血中CD68陽性細胞の減少を促進させた。損傷筋内においては対照群と比較してHBO群ではCD68陽性細胞数が損傷1・3日後、CD206陽性細胞数が損傷3・5日後で増加しており対照群と比較して2日早く増加した<sup>15)</sup>。血液中のCD68陽性細胞の早期の減少と、損傷筋内のCD68陽性細胞

胞とCD206陽性細胞の早期の増加から、HBOは損傷6・24時間後のマクロファージの血管から組織への浸潤を促進したと推察された。またNAC,LNAME阻害剤投与群では、HBOを施行しているにもかかわらず、HBOのマクロファージ、筋衛星細胞増殖促進効果は抑制されたため<sup>16)</sup>、骨格筋圧挫損傷後においてHBOはNOの増加により炎症反応・抗炎症応答への移行およびその後の筋再生過程を促進することが示された。

骨格筋圧挫損傷後HBOはHIF1 $\alpha$ 安定化を促進するとともにIL-6/STAT3経路を活性化し、マクロファージの血管から組織への浸潤を促進し、損傷1.3日後のM1マクロファージと筋衛星細胞の増殖、損傷3・5日後のM2マクロファージの増加や筋衛星細胞の分化を促進し、損傷5日後の再生筋線維数とCSA、損傷7日後の筋張力回復を促進することが明らかとなった(図5)。

#### 4. HBOと血管新生

骨格筋圧挫損傷後、損傷筋内では筋線維の直接損傷に加えて、直達外力により血管の途絶が引き起こされる<sup>41, 42)</sup>。血管途絶による急性虚血は、筋肉の新陳代謝を悪化させ、二次性壊死につながる<sup>43)</sup>。また血行が改善した骨格筋は、血行改善に乏しい筋肉よりも筋再生が優れていると報告されており<sup>44)</sup>、血管修復が遅延すると、血液供給の減少し、軟部組織や筋肉の再生が遅延し、線維化を進めてしまう可能性がある<sup>45)</sup>。また分子レベルでは、虚血は前述のMyoDの分解を加速することによって、筋芽細胞の増殖と分化の両方を部分的に阻害する<sup>46)</sup>。さらに重要なことに、筋

肉は血管新生因子の主要な供給源であり、血管新生因子の産生増加は、骨格筋再生に対しポジティブフィードバックを形成すると言われており<sup>47, 48)</sup>、筋損傷後の血管形成は筋肉再生に不可欠であるとも言われている<sup>2, 7)</sup>。これらのことから筋再生と血管新生は深く関連していると考えられている。以前よりHBOは血管新生を促進するとされており、末梢循環障害疾患に対して有用であるという報告も多く、臨床的に糖尿病性壊死や難治性皮膚潰瘍などが保険適応となっている<sup>23, 28, 49)</sup>。ここでは骨格筋圧挫損傷後におけるHBOの血管新生促進作用について示していく。

#### A. 血管新生関連因子

血管新生の分子メカニズムは、筋損傷後、血管新生関連因子の中で、血管内皮増殖因子(VEGF)<sup>22, 50-52)</sup>、線維芽細胞成長因子(bFGF)<sup>5, 22, 53)</sup>、肝細胞成長因子(HGF)<sup>5, 54)</sup>、およびアンジオポエチン2<sup>22, 55)</sup>の産生が増加し、内皮細胞の移動と増殖が活性化され、血管新生が促進される<sup>56)</sup>。HBOが損傷後にこれらの血管新生因子の産生を増加させるという報告は多く、虚血性筋損傷において、HBOがbFGFやHGFの産生を増加させ血管新生を促進しているという報告を認める<sup>43)</sup>。またHBOで増加するNOはbFGF、アンジオポエチン2産生を増加させ<sup>11)</sup>、内皮細胞の増殖を促進する<sup>57)</sup>。またVEGF産生にはNOが必要だが、HBOは正常組織と低酸素組織との間の酸素分圧勾配を増加させることでNO生成に必要な酸素を提供できる<sup>58)</sup>。さらに、HBOはNO増加によりHIF1の安定化を促進する<sup>22, 23, 26, 58)</sup>が、HIF1 $\alpha$ の安定化はVEGF産生を増加させ、血管新生促進に寄与することが報告されてい

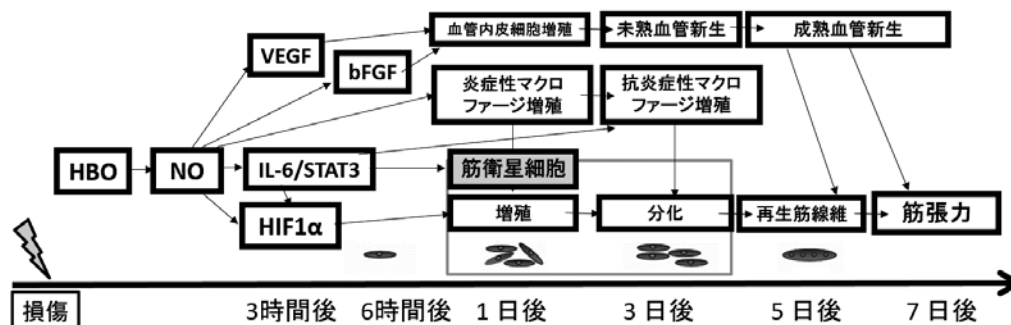


図5：骨格筋圧挫損傷後HBOがもたらす血管新生・筋再生促進効果

る<sup>22, 23)</sup>。またVEGFレベルの回復は、骨格筋損傷後の毛細血管形成と骨格筋再生の動的プロセスに寄与する報告もあり<sup>59)</sup>、VEGF増加を阻害すると血管新生、筋再生が阻害されることから<sup>60)</sup>、VEGFは血管新生に重要な因子であると考えられている。

骨格筋圧挫損傷後においてHBOがこれらの血管新生因子の増加に与える影響を定量するために損傷筋内のVEGF, bFGF, HGF, アンジオポエチン2蛋白質量を評価した。その結果HBO群において損傷後3時間後のVEGF, 損傷6時間後のbFGF蛋白質量が増加したが、HGF, アンジオポエチン2蛋白質量は増加を認めなかった<sup>16)</sup>。HGF, アンジオポエチン2は基本的に血管内皮細胞で産生されるが<sup>61, 62)</sup>、VEGF, bFGFはマクロファージや血管内皮細胞で産生分泌されると言われている<sup>63)</sup>。そのためHBOによるマクロファージの増加が、VEGF, bFGFの増加に関与していると考えられる。またNAC, LNAME阻害剤投与によりHBOのVEGF, bFGFの産生増加作用は抑制された<sup>16)</sup>。したがって、骨格筋圧挫損傷後、HBOはNOの増加によってマクロファージを誘導しVEGF, bFGF産生を増加させたと考えられた。

## B. 腫脹軽減

骨格筋傷害後の急性炎症期においては、炎症性サイトカインの産生、好中球の動員、および血管透過性亢進が起こる<sup>64, 65)</sup>。そして増加した細胞内液貯留の増加や組織内圧上昇に起因する局所循環機能障害の結果、浮腫および組織低酸素を生じる<sup>18, 19)</sup>。また組織低酸素となると、嫌氣的解糖によりATPが産生されるためATP産生量は減少する。すると膜イオンチャネル機能不全および細胞ホメオスタシスの不全が生じる<sup>20, 21)</sup>。そのため、HBOによる組織内への酸素供給と抗炎症作用は、細胞外液蓄積や血管透過性を減少させることにつながると考えられる<sup>15)</sup>。骨格筋圧挫損傷でHBOが損傷部腫脹に与える影響を調査するため、 $\mu$ CTで患側後肢の体積を測定し腫脹を定量した。また、アルブミン結合色素エバンスブルーを血管内に注入し、損傷筋内に漏出したアルブミンのエバンスブルー吸光度を測定することで血管透過性を評価した。その結果、対照群と比較してHBO群において損傷6時

間、1・3日後の患側後肢体積が減少し、損傷1日後の血管透過性の亢進が改善していた<sup>15)</sup>。よって骨格筋圧挫損傷後、HBOは血管透過性を早期に改善し、腫脹を軽減させることが明らかとなった。

## C. 血管内皮細胞、血管新生

血管損傷後、血管新生因子によって内皮細胞増殖が刺激された後、基底膜は破壊され、損傷後3日後に内皮細胞増殖はピークを迎える<sup>66, 67)</sup>。この内皮細胞増殖によって基底膜をもたない未熟血管が非常に多く増生され、損傷5日後にピークを迎える<sup>66, 67)</sup>。その後、過増殖分の未熟血管が間引き調整されたのち、基底膜が再形成され、基底膜を持つ成熟血管となり損傷7~14日後に成熟血管新生が完了する<sup>15, 68)</sup>。骨格筋圧挫損傷後、HBOが血管内皮細胞の増殖、未熟・成熟血管新生に与える影響を血管内皮細胞は血管内皮細胞を示すTie2と静止期以外を示すKi67の免疫染色により、また未熟・成熟血管は基底膜を示すラミニンと血管を示すトマトレクチンの免疫染色により細胞数をカウントし調査した。その結果、HBO群では、内皮細胞増殖は損傷後1日後にピークを迎え、未熟血管新生は損傷3日後、成熟血管新生は損傷7日後にピークを迎え、損傷9日後に対照群とHBO群の成熟血管数が同等になった<sup>16)</sup>。したがって、骨格筋圧挫損傷後、HBOは血管新生関連因子の増加により内皮細胞増殖を刺激することで血管新生を促進するが、再生後の成熟血管数を過多とすることはないことが明らかとなった。さらにNAC, LNAME阻害剤を投与するとHBOの血管内皮細胞増殖や血管新生促進効果は抑制された<sup>16)</sup>。したがって、骨格筋圧挫損傷後、HBOはNO増加により損傷3時間後のVEGF, 損傷6時間後のbFGF蛋白質量を増加し、損傷1日後の血管内皮細胞の増殖、損傷3日後の未熟血管新生、損傷5・7日後の成熟血管新生を促進することが示された(図5)。

## 5. 今後の展望

上述の結果から、骨格筋圧挫損傷後にHBOを施行するで、NOを介してIL-6, HIF1 $\alpha$ , VEGF, bFGF等の因子を増加させることが可能となる。各因子の上昇は筋再生・血管新生を促進することとなり、筋張力

を早期に回復することができる。これらの因子は損傷後早期に反応するため、早期に施行するHBOが重要であると考えられた。

損傷直後にHBOを1回施行した場合、HBOを損傷直後から5回連日施行した群(1回/日)と同等の筋再生、筋張力回復を示したが、損傷3日後にHBOを1回施行した場合は対照群と同等であった<sup>16)</sup>。そのためHBOを1回でも、損傷後早期に施行することが、血管新生・筋再生促進に重要であると考えられた。臨床における「早期」が損傷後どの程度まで許容されるかは臨床研究による証明が必要となる。また現実的に、早期に1回HBOを施行できない場合、HBOを複数回施行することで同様の効果を期待できる可能性も研究対象とするべきであろう。

これらの研究を進め、HBO治療に最適なプロトコルを作成し、臨床現場にFeed backすることで早期治療ができる体制を確立することができれば、アスリートの早期競技復帰をサポートすることが可能となるとともに、一般的な外傷に伴う骨格筋損傷に対する治療法ともなり得ると考える。

#### おわりに

骨格筋圧挫損傷後、HBOはNOを増加させることで血管新生・筋再生を促進することを分子メカニズムに焦点を当てながら説明した。骨格筋圧挫損傷に対しHBOが有用性に対しての報告は多いが、基礎研究等のエビデンスに乏しいのが現状である。今後、基礎研究の継続とともにRCT等の臨床研究を積み重ね、基礎・臨床エビデンスを確立することが求められている。

#### 参考文献

- 1) Garrett WE: Muscle strain injuries. *Am J Sports Med* 1996; 24(6): 2-8.
- 2) Smith C, Kruger MJ, Smith, RM, Myburgh KH: The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury: Illuminating Complexities. *Sports Med* 2008; 38(11): 947-969.
- 3) Souza J, Gottfried C: Muscle injury: Review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol* 2013; 23: 1253-1260.
- 4) Delos D, Maak TG, Rodeo SA: Muscle injuries in athletes: enhancing recovery through scientific understanding and novel therapies. *Sports Health* 2013; 5: 346-352.
- 5) Bennet HM, Kertesz T, Perleth M, Yeung P, Lehm JP: Hyperbaric oxygen for idiopathic sudden sensorineural hearing loss and tinnitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 17: 10.
- 6) Ishii Y, Deie M, Adachi N, et al: Hyperbaric Oxygen as an Adjuvant for Athletes. *Sports Med* 2005; 35(9): 739-746.
- 7) Yagishita K, Oyaizu T, Enomoto M, et al: The Effects of Hyperbaric Oxygen Therapy on Reduction of Edema and Pain in Athletes With Ankle Sprain in the Acute Phase: A Pilot Study. *Sport Exerc Med Open J* 2017; 10-16.
- 8) Yagishita K, Enomoto M, Takazawa Y et al: Effects of hyperbaric oxygen therapy on recovery acceleration in Japanese professional or semi-professional rugby players with grade 2 medial collateral ligament injury of the knee: A comparative non-randomized study. *UHM J* 2019; 46(5): 647-654.
- 9) Kami K, Masuhara M, Kashiba H. et al: Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25(7): 832-840.
- 10) Takeuchi K, Hatade T, Wakamiya S, et al: Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. *Acta Histochemica* 2014; 116: 327-334.
- 11) Shi X, Garry DJ: Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 2006; 20: 1692-1708.
- 12) Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, et al: Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 2003; 14: 261-271.
- 13) Srikuea R, Pholpramool C, Kitiyanant Y, et al:

- Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37(11): 1078-1086.
- 14) Takagi R, Fujita N, Arakawa T, et al: Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. In *J Appl Physiol United States* 2011; 110: 382-388.
  - 15) Oyaizu T, Enomoto M, Yagishita K. et al: Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Scientific Reports* 2018; 8(1):1288, <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19670-x>.
  - 16) Yamamoto N, Oyaizu T, Yagishita K. et al: VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Scientific Reports* 2020; 10: 2744, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59615-x>.
  - 17) Bray RC, Leonard CA, Salo PT: Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J Orthop Res* 2003; 21(6): 1118-1123.
  - 18) Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H: Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014; 3: 337-345.
  - 19) Tidball JG: Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 345-353.
  - 20) Eltzschig HK, Carmeliet P: Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med* 2011; 364: 656-65.
  - 21) Merrick MA: Secondary injury after musculoskeletal trauma: a review and update. *J Athl Train* 2002; 37: 209-217.
  - 22) Stephen, RT: Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009; 106(3): 988-995.
  - 23) Katina MF, Stephen RT: Hyperbaric Oxygen, Vasculogenic Stem Cells, and Wound Healing. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(11): 1634-1647.
  - 24) Emmeran LM, Vincent P, Gaëtan J, et al: Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration. *Antioxid Redox Signal* 2017; 27(5): 276-310.
  - 25) Maulik, N: Redox signaling and angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4(5): 805-815.
  - 26) Semenza GL: HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(6): 167-171.
  - 27) Ishii Y, Miyanaga Y, Shimojo H, et al: Effect of hyperbaric oxygen on procollagen on messenger RNA level and collagen synthesis in the healing of rat tendon laceration. *Tissue Eng* 1999; 5(3): 279-286.
  - 28) Stephen RT: Hyperbaric oxygen - its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127(1): 131-141.
  - 29) Heng MC, Harker J, Csathy G, et al: Angiogenesis in necrotic ulcers treated with hyperbaric oxygen. *Ostomy Wound Manage* 2000; 46(9): 18-28, 30-32.
  - 30) Horie M, Warabi E, Komine S, et al: Cytoprotective Role of Nrf2 in Electrical Pulse Stimulated C2C12 Myotube. *PLoS One* 2015; 10(12): e0144835.
  - 31) Vivekananda GS, Lind F, Botusan IR. et al: Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. *Wound Rep Reg* 2015; 23: 98-103.
  - 32) Zhang C, Li Y, Wu Y, et al: Interleukin-6/Signal Transducer and Activator of Transcription 3(STAT3) Pathway Is Essential for Macrophage Infiltration and Myoblast Proliferation during Muscle Regeneration. *J Biol Chem* 2013; 288: 1489-1499.
  - 33) Munoz-Canoves P, Scheele C, Pedersen B, Serrano A: Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS journal* 2013; 280: 4131-4148.
  - 34) Hoene M, Runge H, Haring HU, Schleicher ED, Weigert C: Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: 128-136.
  - 35) Ndubuisi M, Guo G, Fried V, Etlinger J, Sehgal P: Cellular Physiology of STAT3: Where's the Cytoplasmic Monomer? *J Biol Chem* 1999; 274: 25499-25509.
  - 36) Horie M, Enomoto M, Yagishita K, et al: Enhancement of satellite cell differentiation and functional recovery in injured skeletal muscle by hyperbaric oxygen treatment. *J Appl Physiol* 2014; 116: 149-155.
  - 37) Arnold L, Henry A, Poron F, et al: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007; 204: 1057-1069.
  - 38) Sakaguchi S, Shono J, Suzuki T, et al: Implication of anti-inflammatory macrophages in regenerative myoneuritegenesis: promotion of myoblast migration and neural chemorepellent semaphorin 3A expression in injured muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 54:



- 272-285.
- 39) Tidball JG, Villalta SA: Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: 1173-1187.
- 40) Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P: Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ* 2016; 23: 927-937.
- 41) Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM: The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med* 1999; 27(1): 2-9.
- 42) Nathan C, Cunningham-Bussel A: Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(5): 349-361.
- 43) Asano T, Kaneko E, Shinozaki S, et al: Hyperbaric Oxygen Induces Basic Fibroblast Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor Expression, and Enhances Blood Perfusion and Muscle Regeneration in Mouse Ischemic Hind Limbs. *Circ J* 2007; 71(3): 405-411.
- 44) Bray RC, Leonard CA, Salo PT: Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J Orthop Res* 2003; 21(6): 1118-1123.
- 45) Cristina B, Hannah S, Frank BL et al: Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *PNAS* 2010; 107(8): 3287-3292.
- 46) Di Carlo A, De Mori R, Martelli F, et al: Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degeneration. *J Biol Chem* 2004; 279: 16332-16338.
- 47) Takahashi A, Kureishi Y, Yang J, et al. Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4803-4814.
- 48) Neuhaus P, Oustanina S, Loch T, et al: Reduced mobility of fibroblast growth factor (FGF)-deficient myoblasts might contribute to dystrophic changes in the musculature of FGF2/FGF6/mdx triple-mutant mice. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 6037-6048.
- 49) Marx RE, Ehler WJ, Tayapongsak P, Pierce LW: Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. *Am J Surg* 1990; 160(5): 519-524.
- 50) Hsu SL, Yin TC, Shao PL, et al: Hyperbaric oxygen facilitates the effect of endothelial progenitor cell therapy on improving outcome of rat critical limb ischemia. *Am J Transl Res* 2019; 11(4):1948-1964.
- 51) Lee YS, Jang HS, Kim JM, et al: Adenoviral-mediated delivery of early growth response factor-1 gene increases tissue perfusion in a murine model of hind limb ischemia. *Mol Ther* 2005; 12: 328 - 336.
- 52) Santiago FS, Lowe H, Day FL, Chesterman CN, Khachigian LM: Early Growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol* 1999; 154: 937-944.
- 53) Murakami M, Nguyen LT, Zhuang ZW, et al: The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 2008; 118: 3355-3366.
- 54) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL et al: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251: 802-804.
- 55) Marie PS, Roselyne T, Jacques P: The Angiotensin-2 Gene of Endothelial Cells is Up-Regulated in Hypoxia by a HIF Binding Site Located in Its First Intron and by the Central Factors GATA-2 and Ets-1. *Physiol* 2008; 217: 809-818.
- 56) Flantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA: Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 2005; 96(1): 15-26.
- 57) Ziche M, Parenti A, Ledda F, et al: Nitric Oxide Promotes Proliferation and Plasminogen Activator Production by Coronary Venular Endothelium Through Endogenous bFGF. *Circ Res* 1997; 80(6): 845-852.
- 58) Buckley CJ, Jeffrey SC: Hyperbaric, Angiogenesis. *Statpearls* 2018.
- 59) Phillips GD, Schilb LA, Fiegel VD et al: An angiogenic extract from skeletal muscle stimulates monocyte and endothelial cell chemotaxis in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197(4): 458-464.
- 60) Oscar O, Sun D, Reyes-Reyna SM, et al: Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2<sup>-/-</sup> mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(2): 651-661.
- 61) Ohnishi H, Mizuno S, Oka K, Nakamura T: Physiological Roles and Therapeutic Implications of Hepatocyte Growth Factor for Angiogenesis. *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis* 2013; 22: 413-443.
- 62) Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al: Isolation of angiotensin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning". *Cell* 1996; 87

- (7): 1161-1169.
- 63) Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, et al: Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 55(3): 410-22, 65.
- 64) Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M: Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 366-378.
- 65) Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN, Klip A: Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304: 453-65.
- 66) Morikawa S, Ezaki T: Imaging and Quantification of Plasma Leakage from Microvessels by Using Intravital Lectin Injection. *Microscopy* 2011; 46(3): 195-200.
- 67) Richrd LB, Melissa AM, Danielle RM, Theo H, Scott RW: Griffonia simplicifolia isolectin B4 identifies a specific subpopulation of angiogenic blood vessels following contusive spinal cord injury in the adult mouse. *J Comp Neurol* 2008; 507(1): 1031-1052.
- 68) Latroche C, Gitiaux C, Chretien F, et al: Skeletal Muscle Microvasculature: A Highly Dynamic Lifeline. *Physiology (Bethesda)* 2015; 30(6): 417-427.