

## アイシングに伴う骨格筋再生の阻害は 筋代謝機能をも低下させてしまうのか？

金 沢 大 学 芝 口 翼  
(共同研究者) 同 増 田 和 実  
同 小 間 陸 嗣

### **Does Icing Therapy Decrease Both Regenerative and Metabolic Capacities Following Skeletal Muscle Injury?**

by

Tsubasa Shibaguchi, Kazumi Masuda, Rikuhide Koma  
*Kanazawa University*

#### ABSTRACT

Effects of icing treatment following skeletal muscle injury on mitochondrial biogenesis, pain marker, and fibrosis were investigated in male Wistar rats. We also examined the countermeasure for offsetting the negative impact of icing treatment. At 28 days after muscle injury, fibrotic area was increased and protein level of Voltage-dependent anion-selective channel 1 was decreased when an icing treatment (ice pack, 0°C for 20 min) was applied immediately following the injury. The icing treatment reduced mRNA expression levels of pain markers (bradykinin B2 receptor and microsomal prostaglandin E synthase 1) at 1 day after the injury. On the other hand, the icing-related promotion of fibrosis was significantly attenuated when intermittent heat stress was combined, especially from 1-day after the injury (42°C for 30 min on every other day until 14 days after the injury). Therefore, these results suggest that an icing treatment immediately after skeletal muscle injury attenuates muscle pain at early phase following the injury but impairs both muscle qualitative and mitochondrial recoveries

during the regeneration. Our findings also indicate that the negative impact of icing treatment on fibrosis could be rescued when hyperthermia is combined within 1-day after the injury.

#### キーワード

筋再生, ミトコンドリア, 筋痛, 線維化, アイシング

#### Keyword

Muscle regeneration, Mitochondria, Muscle pain, Fibrosis, Icing

#### 要 旨

本研究では、筋損傷後のアイシング処置がミトコンドリアや痛み因子、線維化へ及ぼす影響を明らかにするとともに、アイシングの負の側面を相殺し得る介入法についてラットを対象に検討した。筋損傷後の単回のアイシング処置は、損傷28日後の線維化面積を増加させ、VDAC1タンパク質発現量を低下させた。痛み関連因子(BKB<sub>2</sub>RとmPGES-1)の損傷1日後のmRNA発現量は、アイシング処置によって減少した。一方、アイシング処置後に間欠的な温熱刺激を併用すると、特に損傷1日後から併用した条件で線維化が無処置と同程度まで軽減された。以上の結果から、筋損傷後のアイシング処置は単回であっても受傷後早期の筋痛を軽減できるが、その後の再生過程で筋の線維化を促進するだけでなく、ミトコンドリア量の回復も妨げることが示唆された。また、アイシング処置の線維化亢進作用は、アイシング後1日以内から温熱療法を併用することで相殺できることが示された。

#### 緒 言

骨格筋損傷は筋挫傷や肉離れなどによって生じ、スポーツ現場では高頻度に発生する外傷の一つである。しかしながら、その損傷の程度によっては治癒までに数ヵ月を要する場合がある。治癒

期間には身体活動量が低下することから、治癒期間の延長や筋の再生不全はさらなる筋機能の低下を招くだけでなく、昨今問題視されるメタボリックシンドロームやロコモティブシンドロームの誘導因子にもなり得る。したがって、損傷後の筋再生を促進して治癒期間を短縮させる方策の確立は、アスリートの早期現場復帰や競技力向上はもとより、一般人の健康の維持・増進の観点からも我が国における喫緊の課題であると言える。

スポーツの現場では、筋損傷を含むスポーツ外傷が発生した場合、急性期の応急処置としてアイシングが推奨されている。アイシング処置によって炎症・疼痛が抑えられ、正常な組織の二次的損傷を防ぐことによって、その後の組織再生が促進されると長年考えられてきた<sup>1,2)</sup>。一方、近年、アイシング処置が筋再生に対して必ずしも正の効果をもたらすわけではないことが明らかとなりつつある。筋損傷直後に単回・短時間(20分間)でもアイシング処置を行うと、再生筋線維の成長抑制や線維化の助長、筋線維組成の正常な分布への回復遅延といった筋の再生不全が生じることが報告されている<sup>3-5)</sup>。しかしながら、損傷した骨格筋に対するアイシング処置の生理作用については未だ不明な点が多い。

骨格筋が損傷すると、特にその程度が重度の場合にはエネルギー代謝の要であるミトコンドリアの量や機能も低下する<sup>6)</sup>。また、筋再生過程にお

いてミトコンドリアの生合成やマイトファジーを阻害すると、筋線維の修復や再生筋線維の成長が抑制され、線維化も助長されることが報告されている<sup>7,8)</sup>。したがって、筋損傷後のアイシング処置がもたらす筋再生不全の背景に、ミトコンドリア機能の破綻（生合成や代謝機能の低下）が関与している可能性は十分に考えられるが、このような観点からアイシングの生理作用を直接的に検証した報告はない。また、疼痛緩和ケアとしてアイシング処置が有効であることは事実であるが、そのメカニズムは必ずしも明らかでなく、この利点を生かしてアイシング処置の負の側面を相殺し得る具体的な方策も未だ確立されていない。

そこで、本研究では、アイシング処置がもたらす筋再生不全の背景にミトコンドリア機能の破綻の可能性を仮定するとともに、痛みへの影響を明らかにするため、生化学的・分子生物学的に検討した（実験1）。また、筋再生を促す方策として温熱刺激の有効性が報告されていることから<sup>4,5,9)</sup>、アイシング処置と温熱刺激の併用条件によって温熱刺激がアイシングによる筋再生不全を抑制する介入法となり得るかについても検討した（実験2）。

## 1. 方法

### 1.1 実験動物

実験動物には10週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~60%、12時間の明暗サイクルに設定した動物飼育室で飼育し、標準固形飼料（MF、オリエンタル酵母）と水を自由摂取させた。なお、本実験は、金沢大学動物実験規則および日本生理学会の制定した生理学領域における実験動物に関する基本指針に従い、金沢大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

### 1.2 実験デザイン

実験1では、ラットの体重が等しくなるよう損

傷（IN）群と損傷+アイシング（ICE）群の2群に分けた（各12匹）。池崎ら<sup>10)</sup>の方法に基づき、両群のラットの両側足底筋に対して麻酔下で0.5%塩酸プピバカインを筋注し、筋損傷を惹起させた。ICE群には筋損傷手術終了直後の1回のみ、 $0^{\circ}\text{C}$ のアイスパックを両後肢に当てるアイシング処置を20分間行った。また、10週齢の無処置の個体をBaseline用のコントロール（Con）群とした（6匹）。

実験2では、ラットの体重が等しくなるようIN群とICE群、損傷+アイシング+温熱刺激（IH）群の3群に分け、IH群をさらに損傷1日後（IHd1）と2日後（IHd2）から温熱刺激を開始する2群に分けた（各群7匹）。Shibaguchiら<sup>4)</sup>の方法に基づき、全群のラット両側ヒラメ筋に対して麻酔下で0.5%塩酸プピバカインを筋注し、筋損傷を惹起させた。ICE群とIH群へのアイシング処置は、実験1と同様の方法で実施した。また、IH群には、覚醒下での温水浴（ $42^{\circ}\text{C}$ 、30分）を損傷1日後または2日後から隔日に、最大2週間施した。

### 1.3 サンプルング

実験1では損傷1日後と28日後に足底筋を、実験2では損傷28日後にヒラメ筋を麻酔下で摘出し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で素早く凍結させた後、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 1.4 ウエスタンブロット法

凍結した足底筋サンプルの一部を、ピーズ式破砕機（BMS）を用いてPhosphatase/Protease Inhibitor Cocktail（ナカライテスク）が添加されたRIPA lysis bufferでホモジナイズし、14,000 gで遠心して得られた上清を全画分として回収した。得られた全画分のタンパク質濃度をProtein Assay Kit（Bio-Rad）を用いたBradford法によって測定し、各サンプルのタンパク質濃度が均一となるように2Xおよび1X SDS Sample bufferで調整した

表1 プライマー配列一覧

Gene	Forward primer	Reverse primer
BKB <sub>2</sub> R	GAGCTTGAAGCATCCTAGGGAAT	CGCTTATGCCGTGAGACAAGA
COX-2	TGTACAAGCAGTGGCAAAGG	TAGCATCTGGACGAGGCTTT
mPGES-1	ACTGCAGGAGTGACCCAGAT	TGGGTCCCAGGAATGAGTAG
GAPDH	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	CGATACGGCCAAATCCGTTC

BKB<sub>2</sub>R: Bradykinin B2 receptor, COX-2: Cyclooxygenase-2; mPGES-1: Microsomal prostaglandin E synthase 1, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

後、全てのサンプルを95℃で5分間加熱した。

調整済みのサンプル（タンパク質量：5 μg）を10%のSDS-PAGEゲルで電気泳動・分離した。泳動後、セミドライプロッティング装置（ATTO）を用いてゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜（Merck Millipore）にタンパク質を転写した。転写後のPVDF膜を Bullet Blocking One for Western Blotting（ナカライテスク）で5分間ブロッキングし、その後5%ウシ血清アルブミンを含む Tris-buffered saline containing 0.1% tween 20 (TBST) で希釈した抗 Voltage-dependent anion-selective channel 1 抗体 (55259-1-AP, Proteintech) と4℃で一晩反応させた。その後、5% Bullet Blocking One for Western Blotting を含む TBST で希釈した抗 Rabbit IgG-HRP 抗体 (GE Healthcare) と室温で1時間反応させ、化学発光試薬 (EzWestLumi plus, ATTO) を用いて目的のタンパク質のシグナルを検出した。検出したシグナルの強度は Image J (NIH) を用いて定量化し、Con群の平均値に対する相対値で示した。

#### 1. 5 リアルタイムRT-PCR法

凍結した足底筋サンプルの一部から、ReliaPrep miRNA Cell and Tissue Miniprep System (Promega) を用いて全RNAを抽出した。抽出したRNAサンプルは、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いてcDNAに逆転写し、THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いてPCRを行った。各遺伝子の増幅は、表1で示したプライマーを用いて実施した。内在性コントロールとして Glyceraldehyde-

3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、GAPDHに対する各遺伝子のmRNA発現レベルの相対発現量を算出し、Con群の平均値に対する相対値で示した。

#### 1. 6 組織染色法

凍結したヒラメ筋サンプルから厚さ8 μmの凍結切片を作成し、4% PFA/リン酸緩衝液（ナカライテスク）で固定処理した。流水水洗後、シリウスレッドを含むワンギーソン液（武藤化学）で切片を染色した。染色後、切片を超純水で洗浄し、70%エタノールで分別、100%エタノールで脱水、キシレンで透徹した後、封入剤（武藤化学）で切片を封入した。顕微鏡（CKX41, オリンパス）と顕微鏡用デジタルカメラ（DP71, オリンパス）を用い、1切片当たり5ヶ所を重複しないよう倍率200倍で撮影し、画像統合ソフトウェア（DP Controller, オリンパス）でコンピュータに画像を取り込んだ。染色画像1視野の全面積当たりのコラーゲン染色部（赤色）の面積の相対値を Image J で定量化し、1個体のコラーゲン線維面積は5視野の相対値の平均値として算出した。

#### 1. 7 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。実験1の検証では、対応のないt検定を用いてIN群とICE群の平均値の差の検定を行った。また、実験2の検証では、一元配置分散分析を行い、多重比較検定はTukey-Kramer法を用いた。有意水準はP < 0.05とした。

## 2. 結果

### 2.1 筋損傷後のアイシング処置がミトコンドリア量に及ぼす影響

ミトコンドリア量の指標として、損傷28日後の足底筋の Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1) タンパク質発現量をウエスタンブロット法で検討した。その結果、VDAC1発現量はIN群と比較してICE群で有意に低い値を示した(図1,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 筋損傷後のアイシング処置が痛み関連因子に及ぼす影響

図2に筋痛の発生に関連する Bradykinin B2 receptor ( $BKB_2R$ ) と Cyclooxygenase-2 (COX-2), Microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1) の mRNA 発現量の変化を示した。損傷1日後の足底筋の  $BKB_2R$  mRNA 発現量はIN群と比較してICE群で有意に低い値であった ( $P < 0.05$ )。また, mPGES-1 mRNA 発現量も  $BKB_2R$  の場合と同様に, IN群の値がICE群よりも低値を示す傾向にあった ( $P = 0.055$ )。一方, COX-2 mRNA 発現量にはIN群とICE群の間に統計的な差異は認めら

れなかった。

### 2.3 筋損傷後のアイシング処置と開始時期の異なる間欠的な温熱刺激の併用処置が線維化に及ぼす影響

図3に線維化の指標であるコラーゲン線維面積の変化を示した。損傷28日後のヒラメ筋のコラーゲン線維面積は, IN群よりもICE群で有意に高

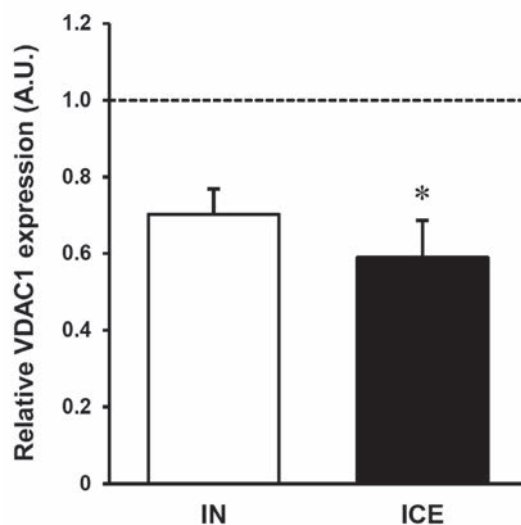


図1 筋損傷後のアイシング処置による損傷28日後のミトコンドリア量の変化 (n = 6/群)  
破線は Baselineを表す \* :  $P < 0.05$  vs ICE群

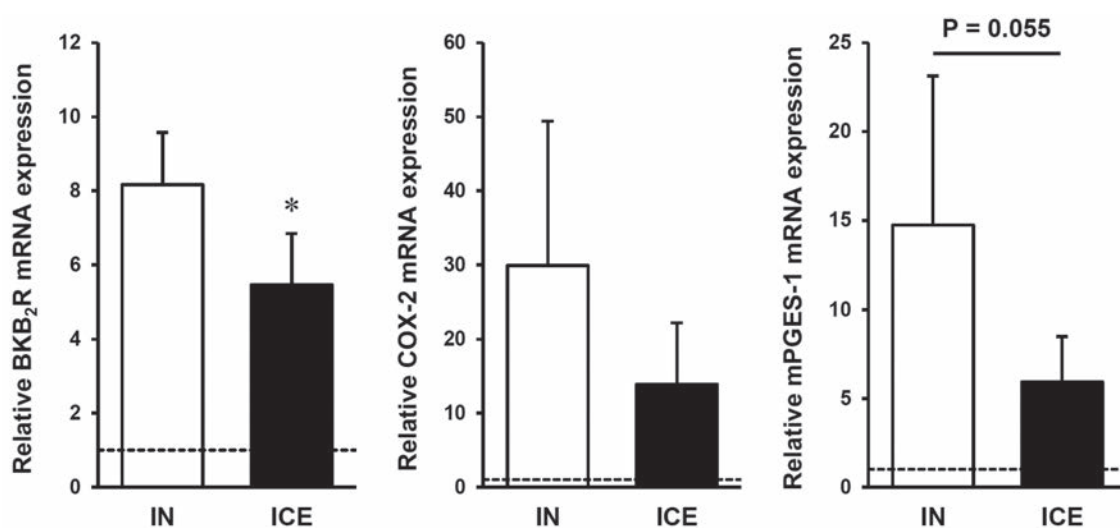


図2 筋損傷後のアイシング処置による損傷1日後の痛み関連因子mRNA発現量の変化 (n = 5/群)  
破線は Baselineを表す \* :  $P < 0.05$  vs ICE群

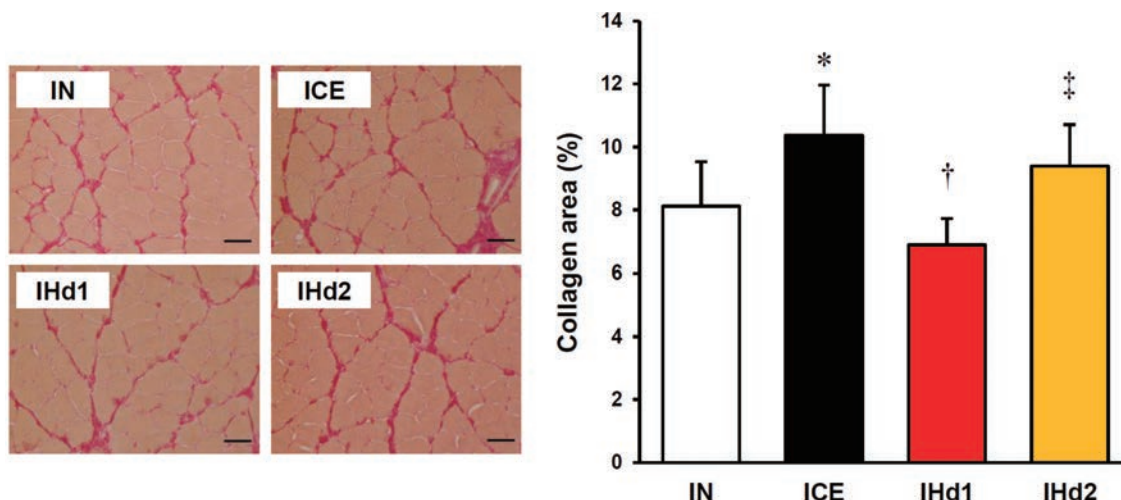


図3 筋損傷後のアイシング処置と開始時期の異なる間欠的な温熱刺激の併用処置による損傷28日後のコラーゲン線維面積の変化 (n = 7/群)

赤: コラーゲン線維, 黄: 筋線維, Scale bars = 50  $\mu$ m \* : P < 0.05 vs IN群, † : P < 0.05 vs ICE群, ‡ : P < 0.05 vs IHd1群

い値を示した (P < 0.05). 筋損傷後のアイシング処置と損傷1日後から間欠的な温熱刺激を併用したIHd1群では, コラーゲン線維面積の値がICE群よりも有意に低く (P < 0.05), IN群の値とほぼ同程度であった. 一方, 間欠的な温熱刺激の併用を損傷2日後から開始したIHd2群では, コラーゲン線維面積の値がIN群との間に統計的な差異は認められなかったものの, IHd1群の値よりも有意に高い値を示した (P < 0.05)

### 3. 考 察

ミトコンドリアは筋代謝の要となるオルガネラであり, かつ細胞機能の恒常性と密接に関係しているため, その量や機能の低下, 変異は筋萎縮やミオパチー等の骨格筋機能不全を引き起こす<sup>11, 12)</sup>. 骨格筋が損傷すると, 特にその程度が大きいほど一時的にミトコンドリアの量・機能が著しく低下する<sup>6, 7)</sup>. したがって, 競技復帰や健康の維持・増進の観点から, 筋損傷後の再生過程では筋線維の再生のみならず, ミトコンドリアの量や機能の回復も促進させて, 筋機能や筋代謝を素早く元のレベル, あるいはそれ以上に回復させるこ

とが求められる. 本研究では, 足底筋の損傷直後にアイシングを行うと, ミトコンドリア量の指標であるVDAC1発現量が損傷28日後に有意に低下した (図1). また, 筋種は異なるが, 損傷後にアイシングを施したヒラメ筋では損傷28日後のコラーゲン線維面積が有意に増加した (図3). 筋損傷後のアイシング処置は遅筋・速筋を問わず線維化を助長することが報告されている<sup>3, 4)</sup>. したがって, 上記の結果は, 筋損傷後の応急処置としてのアイシングは再生筋の線維化を亢進するのみならず, ミトコンドリア量の回復も遅延化させ, 筋機能と筋代謝の回復両方を妨げる可能性を示している. 本研究ではアイシング処置によって再生筋のミトコンドリア量の回復が遅延化する機序やこの現象と線維化との関連性を直接的に明らかにすることはできなかった. これまで, 筋再生過程におけるミトコンドリア生合成やマイトファジーを抑制すると, 筋線維の再生抑制・線維化の助長が生じることが報告されている<sup>7, 8)</sup>. したがって, 今後はアイシング処置がミトコンドリア量の回復に及ぼす影響をより経時的に確認するとともに, ミトコンドリア生合成やマイトファジー関連因子

等への影響について検討する必要がある。

骨格筋損傷を含む急性外傷の応急処置としてアイシングに疼痛緩和作用があることは広く知られているものの、その分子機序は必ずしも明らかでない。本研究では、我々の先行研究を基に<sup>10)</sup>、急性炎症に伴う筋痛の誘発に関与する分子として知られるBradykininの受容体の一つであるBKB<sub>2</sub>R<sup>13)</sup>、Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)の産生に関与するCOX-2<sup>14)</sup>とmPGES-1<sup>15)</sup>のmRNA発現量を検討した。その結果、足底筋損傷後のアイシング処置によって損傷1日後のCOX-2 mRNA発現量は有意に変化しなかったものの、BKB<sub>2</sub>R mRNA発現量は有意に低下した(図2)。また、mPGES-1 mRNA発現量も低下傾向にあった。このことは、筋損傷後の単回・短時間(20分)のアイシング処置でもBKB<sub>2</sub>R発現とmPGES-1を介したPGE<sub>2</sub>産生が抑制され、受傷後早期の筋痛が軽減される可能性を示している。一方、PGE<sub>2</sub>は筋再生に必須の筋サテライト細胞の正の調節因子としても知られており<sup>16)</sup>、筋の再生過程でPGE<sub>2</sub>シグナル伝達を阻害すると筋線維の再生不全や線維化の亢進が生じることが報告されている<sup>16,17)</sup>。したがって、本研究のアイシング処置によって生じた線維化の亢進とミトコンドリア量回復の遅延に、受傷後早期のmPGES-1を介したPGE<sub>2</sub>産生の減少が関与しているかもしれない。この点については推測の域を出ないため、今後その機序を含め詳細に検討する必要がある。

筋損傷後の再生過程で炎症反応(マクロファージの浸潤)や筋サテライト細胞の動員が抑制されると筋線維の再生不全が生じ、線維化も亢進する<sup>18,19)</sup>。筋損傷後のアイシング処置は損傷部位へのマクロファージの浸潤と筋サテライト細胞の増殖・分化を遅延化させるが<sup>3)</sup>、一方で受傷直後の温熱刺激はこれらの応答を促進することが報告されている<sup>9)</sup>。したがって、アイシング処置によって炎症・再生応答が遅延化したとしても、その後

温熱刺激を併用するタイミングによってそれらを正規化できるのではないかと考えた。そこで、本研究では、間欠的な温熱刺激の併用開始時期の違いが線維化に及ぼす影響についても検討した。その結果、IHd1群とIHd2群ともに線維化の程度が軽減されていたが、IHd1群の方がICE群とIHd2群よりも線維化面積が有意に小さく、IN群と同程度の値であった。このことは、筋損傷後にアイシング処置を行ったとしても、速やかに(損傷後1日以内)温熱療法の併用を開始することによって、アイシング処置による線維化の亢進を抑制できることを示す。しかしながら、その分子機序は不明であるため、今後さらなる検討が必要である。

#### 4. 結 論

本研究では、筋損傷受傷直後にアイシング処置を単回・短時間(20分間)行っただけでも受傷後早期の筋痛を軽減できるが、その後の再生過程における筋の質的な回復と筋代謝の要であるミトコンドリア量の回復の両方を妨げることが示唆された。また、アイシング後の併用処置としての温熱療法は、筋損傷後少なくとも1日以内から併用開始することで、アイシングの負の側面(線維化の亢進)を相殺できる介入法となり得ることが示された。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、実験・分析の実施にご協力頂きました金沢大学人間科学系・技術補佐員 伊藤仁美氏、山田理恵氏に深く感謝致します。

#### 文 献

- 1) Knight K.L. Cryotherapy in sport injury management, Human Kinetics, Champaign (1995)
- 2) Merrick M.A. Secondary injury after

- musculoskeletal trauma: a review and update, *J. Athl. Train.*, **37**: 209-217 (2002)
- 3) Takagi R., Fujita N., Arakawa T., Kawada S., Ishii N., Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats, *J. Appl. Physiol.* (1985), **110**: 382-388 (2011)
  - 4) Shibaguchi T., Sugiura T., Fujitsu T., Nomura T., Yoshihara T., Naito H., Yoshioka T., Ogura A., Ohira Y. Effects of icing or heat stress on the induction of fibrosis and/or regeneration of injured rat soleus muscle, *J. Physiol. Sci.*, **66**: 345-357 (2016)
  - 5) Shibaguchi T., Hoshi M., Yoshihara T., Naito H., Goto K., Yoshioka T., Sugiura T. Impact of different temperature stimuli on the expression of myosin heavy chain isoforms during recovery from bupivacaine-induced muscle injury in rats, *J. Appl. Physiol.* (1985), **127**: 178-189 (2019)
  - 6) Nichenko A.S., Southern W.M., Tehrani K.F., Qualls A.E., Flemington A.B., Mercer G.H., Yin A., Mortensen L.J., Yin H., Call J.A. Mitochondrial-specific autophagy linked to mitochondrial dysfunction following traumatic freeze injury in mice, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **318**: C242-C252 (2020)
  - 7) Wagatsuma A., Kotake N., Yamada S. Muscle regeneration occurs to coincide with mitochondrial biogenesis, *Mol. Cell. Biochem.*, **349**: 139-147 (2011)
  - 8) Esteca M.V., Severino M.B., Silvestre J.G., Palmeira Dos Santos G., Tamborlin L., Luchessi A.D., Moriscot A.S., Gustafsson A.B., Baptista I.L. Loss of Parkin Results in Altered Muscle Stem Cell Differentiation during Regeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**: 8007 (2020)
  - 9) Takeuchi K., Hatade T., Wakamiya S., Fujita N., Arakawa T., Miki A. Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats, *Acta. Histochem.*, **116**: 327-334 (2014)
  - 10) 池崎和海, 芝口翼, 杉浦崇夫, 宮田浩文. アイシング処置がラット損傷筋の回復過程に及ぼす影響, *体力科学*, **66**: 345-354 (2017)
  - 11) Vafai S.B., Mootha V.K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle, *Nature*, **491**: 374-383 (2012)
  - 12) Powers S.K., Wiggs M.P., Duarte J.A., Zergeroglu A.M., Demirel H.A. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **303**: E31-E39 (2012)
  - 13) Meotti F.C., Campos R., da Silva K., Paszcuk A.F., Costa R., Calixto J.B. Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B (1) and B (2) receptors and intracellular kinase pathways, *Br. J. Pharmacol.*, **166**: 1127-1139 (2012)
  - 14) Prisk V., Huard J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation, *Histol. Histopathol.*, **18**: 1243-1256 (2003)
  - 15) Samuelsson B., Morgenstern R., Jakobsson P.J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target, *Pharmacol. Rev.*, **59**: 207-224 (2007)
  - 16) Ho A.T.V., Palla A.R., Blake M.R., Yucel N.D., Wang Y.X., Magnusson K.E.G., Holbrook C.A., Kraft P.E., Delp S.L., Blau H.M. Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**: 6675-6684 (2017)
  - 17) Shen W., Prisk V., Li Y., Foster W., Huard J. Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2alpha, *J. Appl. Physiol.* (1985), **101**: 1215-1221, (2006)
  - 18) Segawa M., Fukada S., Yamamoto Y., Yahagi H., Kanematsu M., Sato M., Ito T., Uezumi A., Hayashi S., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., Tsujikawa K., Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis, *Exp. Cell Res.*, **314**: 3232-3244 (2008)
  - 19) von Maltzahn J., Jones A.E., Parks R.J., Rudnicki M.A. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**: 16474-16479 (2013)