

令和元年6月18日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16427

研究課題名(和文)筋性拘縮の発生に関わる分子機構解明と理学療法的予防対策の生物学的効果の検証

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism involved in the development of muscle contracture and verification of the biological effect of prevention strategy in physical therapy

研究代表者

本田 祐一郎 (HONDA, Yuichiro)

長崎大学・病院(医学系)・技術職員

研究者番号：40736344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋性拘縮の発生メカニズムにおいてマクロファージの集積は重要な事象であり、その詳細な分子機構については検討課題となっていた。そこで本研究ではこの課題を解明するために、不動化したラットヒラメ筋におけるマクロファージの集積に関する分子機構を検索した。結果、不動に伴う筋核のアポトーシスがマクロファージの集積の発端として重要な役割を担うことが明らかとなった。そして、この成果を基に筋性拘縮に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法(B-SES)を用いた強縮運動の生物学的効果を検証した結果、不動後早期からのB-SESによる強縮運動は線維化の発生を抑制し、筋性拘縮の発生予防対策として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、筋性拘縮の発生に直接的に関わる標的分子を探索した点にあり、メカニズムを踏まえた治療戦略の開発につながる基礎資料として重要と考えている。具体的には、本研究の成果によって筋線維萎縮が先行して生じることが筋性拘縮の発生の分子シグナリングに寄与していることが明らかになり、筋線維萎縮の予防が筋性拘縮の発生予防対策につながる可能性が見出された。加えて、臨床において筋線維萎縮の予防対策として活用されている電気刺激誘発性筋収縮運動は、筋性拘縮の発生予防対策としても有効であることが示唆される。つまり、本研究成果は理学療法のエビデンス構築に大きく貢献すると思われ、その意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Macrophage accumulation was regarded as an important lesion in the developmental mechanism of muscle contracture, the detailed molecular mechanism of macrophage accumulation had been unknown. In present study, we investigated the molecular mechanism of macrophage accumulation in immobilized rat soleus muscle. As results, our research revealed that myonuclear apoptosis played an important role as the trigger of macrophage accumulation in immobilized rat soleus muscle. Additionally, our study confirmed the biological effect of tetanus exercise by belt electrode-skeletal muscle electrical stimulation (B-SES) to muscle contracture. Resulting in, the tetanus exercise by B-SES suppressed the occurrence of muscle fibrosis, this intervention was effective prevention strategy to the development of muscle contracture.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋性拘縮 線維化 不動 マクロファージ 筋核 アポトーシス 筋収縮運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来とともに重篤な拘縮を抱えた障害高齢者が増加しており、その対策としての治療戦略開発のためにも拘縮の発生メカニズムの解明は喫緊の課題である。研究代表者らはこれまで拘縮の責任病巣の中心である骨格筋に着目し、その発生メカニズムに関わる分子機構の探索を試みてきた。その結果、骨格筋は1,2週という短期の不動に曝すだけで伸張性が低下し、関節運動制限の発生といった筋性拘縮が惹起されること、ならびにその発生メカニズムに関わる分子機構にはマクロファージの集積を発端とした interleukin (IL)-1 / transforming growth factor (TGF) - 1 シグナリングの賦活化が関与し、タイプ I・III コラーゲンの過剰増生といった線維化に発展することが明らかになった。つまり、これまでの結果から筋性拘縮の発生メカニズムに関わる分子機構においてマクロファージの集積は重要事象であると推測している。通常、骨格筋におけるマクロファージの集積は筋線維壊死後の不要となった細胞質領域の処理のために起こるが、筋性拘縮発生時では筋線維壊死などの病理学的変化は認められておらず、どのような機序を辿ってマクロファージが集積するのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果を基盤とし、不動に伴う骨格筋内のマクロファージの集積に関する詳細な分子機構を解明し、筋性拘縮の発生メカニズムを明らかにすることを第1の目的とした。加えて、第1の目的を明らかにした上で筋性拘縮の発生予防対策としての理学療法の治療戦略の生物学的効果を検証することを第2の目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題を明らかにするために2つの研究テーマを設けた上で実験を進めた。以下、実施した研究テーマ毎にその方法を述べる。

(1) 不動化した骨格筋におけるマクロファージ集積の分子機構の解明

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット20匹を使用し、これらを無処置の対照群(n=10)と両側足関節を最大底屈位とした状態(ヒラメ筋は弛緩位)でギプス包帯を用いて不動化する不動群(n=10)に分けた。なお、不動群の不動期間は1,2週間(各5匹)に設定し、対照群は各不動期間のラットと週齢を合わせるために9,10週齢(各5匹)まで通常飼育した。そして、各実験期間終了後は両側ヒラメ筋を採取し、筋核のアポトーシスの変化を検索するためのTUNEL染色を用いた解析、筋核数や筋線維横断面積、ひとつの筋核が制御する細胞質領域を示す筋核ドメイン、マクロファージの標識であるCD11b陽性細胞数の変化を検索するための免疫組織化学的解析、マクロファージの遊走因子である monocyte chemotactic protein (MCP) -1 やタイプ I・III コラーゲンの変化を検索するための分子生物学的解析に供した。

(2) 筋性拘縮の発生予防対策における理学療法治療戦略の生物学的効果の検証

「(1) 不動化した骨格筋におけるマクロファージ集積の分子機構の解明」の解析結果から、筋性拘縮の発生メカニズムには筋線維萎縮とその影響によるマクロファージの集積が先行して起こることが深く寄与することが明らかとなった。つまり、不動によって惹起される筋線維萎縮を可及的早期から予防することが筋性拘縮の発生予防対策につながる可能性があり、筋線維萎縮の予防対策として臨床で頻繁に適用されている高周波通電による骨格筋の強縮運動は有効性が高いと予想される。一方、近年では下肢の広範囲の骨格筋を同時に刺激できるベルト電極式骨格筋電気刺激法(belt electrode-skeletal muscle electrical stimulation; B-SES)が開発され、これは従来の単極電極による電気刺激療法よりも筋線維萎縮の予防効果が高いと報告されている。そこで本研究では、B-SESを用いた強縮運動が筋性拘縮の発生予防対策として有効かを検証した。

具体的な方法として、まず8週齢のWistar系雄性ラット18匹を用い、無処置の対照群(n=6)、ギプスを用いて両側足関節を最大底屈位で2週間不動化する不動群(n=6)、不動の過程で動物実験用B-SESを用い、後肢骨格筋に強縮を負荷するB-SES群(n=6)に振り分けた。そして、B-SES群の各ラットに対しては大腿近位部と下腿遠位部にB-SES電極を巻き、後肢骨格筋に強縮運動を誘発する目的で刺激周波数50Hz、パルス幅250µsec、刺激強度4.7mAの条件で、1日2回、1回あたり20分間(6日/週)、延べ2週間、電気刺激を行った。なお、本実験に先立ち正常ラットを用いて予備実験を行い、前記の条件で刺激強度を漸増させ、足関節中間位での底屈筋力を測定した。そして、筋線維萎縮の予防に効果的とされる最大筋力の60%の筋力を発揮する刺激強度(4.7mA)を求め、これを本実験の刺激強度に採用した(図1)。また、これと並行して刺激時間を決定するための予備実験も行った。結果、刺激開始後28分までは底屈筋力が最大筋力の60%を下回らな

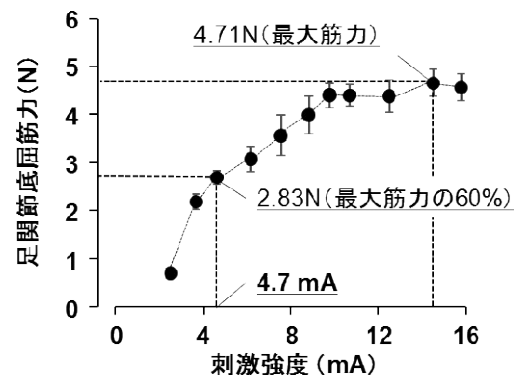


図1. 刺激強度の決定に係る予備実験

いことを確認し、刺激時間を 20 分に決定した(図 2)。実験期間終了後は両側ヒラメ筋を摘出し、右側試料は筋核数や筋線維横断面積、マクロファージの変化を検索するための免疫組織化学的解析に供し、左側試料は MCP-1 や IL-1 β 、TGF- β 、筋線維芽細胞のマーカである α -smooth muscle actin (SMA) の変化を検索するための分子生物学的解析とコラーゲン特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンの変化を検索するための生化学的解析に供した。

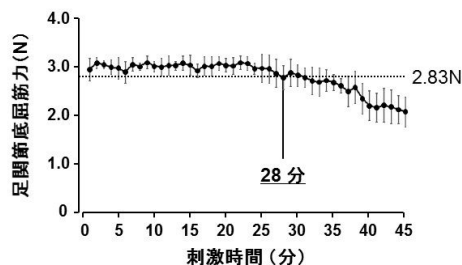


図 2. 刺激時間の決定に係る予備実験

4. 研究成果

(1) 不動化した骨格筋におけるマクロファージ集積の分子機構の解明

不動群の TUNEL 陽性細胞数は各不動期間とも対照群より有意に高値を示したが、不動期間の違いによる有意差は認められなかった。また、不動群の筋核数ならびに筋線維横断面積は各不動期間とも対照群より有意に低値を示し、筋線維横断面積においては不動 2 週が不動 1 週より有意に低値を示した。さらに、不動群の筋核ドメインは不動 1 週では対照群との有意差を認めず、不動 2 週で対照群より有意に低値を示した(図 3)。

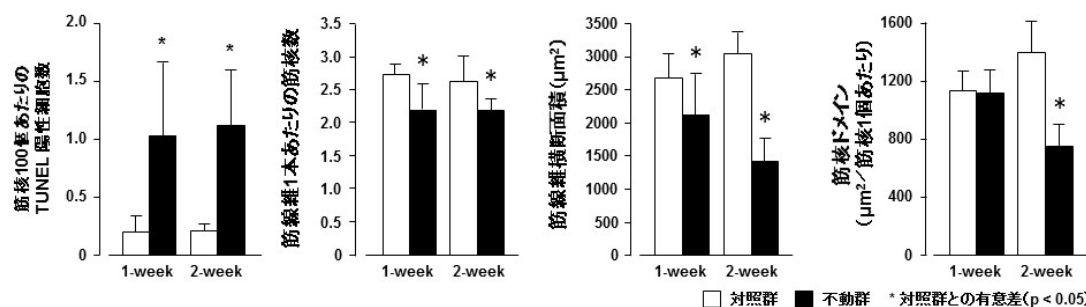


図 3. 不動に伴う TUNEL 陽性細胞数と筋核数、筋線維横断面積、筋核ドメインの変化

さらに、不動群の CD11b 陽性細胞数、MCP-1 ならびにタイプ I・III コラーゲンの mRNA 発現量は各不動期間とも対照群より有意に高値を示したが、不動期間の違いによる有意差は認められなかった(図 4)。

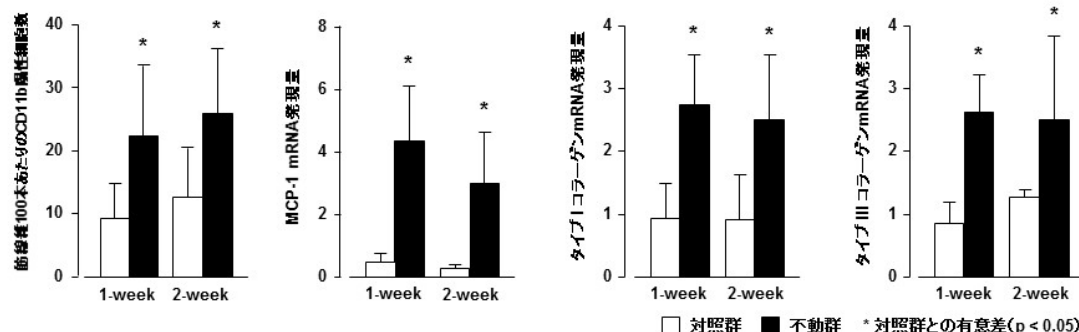


図 4. 不動に伴う CD11b 陽性細胞数と MCP-1、タイプ I・III コラーゲンの変化

以上の結果とこれまでの所属研究室の成果を踏まえると、1 週という短期の不動状態に曝された骨格筋では筋核のアポトーシスが誘導されることで筋核が減少し、このことが筋線維萎縮の発生に直接的に影響をおよぼしていると推察される。そして、マクロファージの集積はアポトーシスが生じた筋核に制御されていた細胞質領域の処理のために生じる事象と推測され、このことを発端として線維化関連分子が賦活化し、線維化、すなわち筋性拘縮が惹起されると推察される。

(2) 筋性拘縮の発生予防対策における理学療法治療戦略の生物学的効果の検証

B-SES 群の筋核数は不動群より有意に高値で、対照群との有意差を認めなかった。また、タイプ I・II 線維の筋線維横断面積は不動群と B-SES 群が対照群より有意に低値であったが、タイプ I 線維に関しては B-SES 群が不動群より有意に高値であった。また、B-SES 群のマクロファージ数や MCP-1 の mRNA 発現量は不動群よりも有意に低値で、対照群との有意差も認めなかった(図 5)。加えて、B-SES 群の IL-1 β 、TGF- β 1、 α -SMA それぞれの mRNA 発現量ならびにヒドロキシプロリン含有量は不動群よりも有意に低値で、対照群との有意差も認めなかった(図 6)。

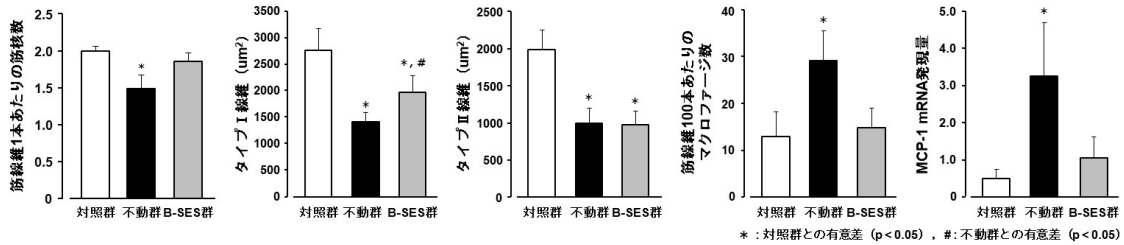


図5. 筋核数と筋線維横断面面積, マクロファージとMCP-1の変化

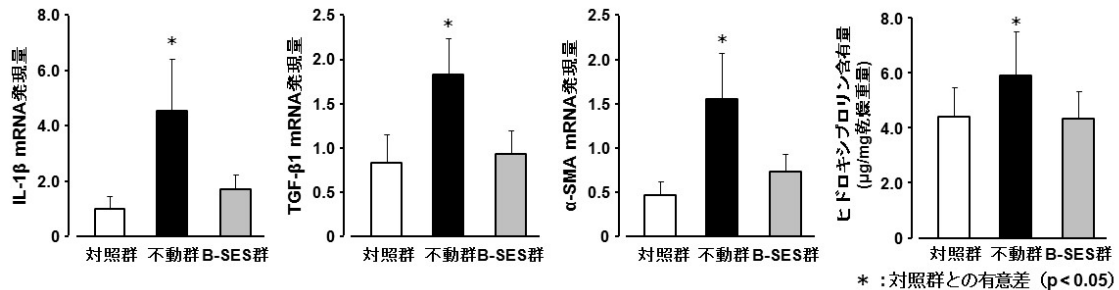


図6. IL-1βとTGF-β1, α-SMA, ヒドロキシプロリンの変化

以上の結果から、B-SESによる強縮運動を不動後早期から負荷すると、筋線維萎縮の進行抑制効果と線維化の発生抑制効果が認められることが明らかとなり、筋性拘縮の発生予防対策として有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Honda Y, Tanaka M, Tanaka N, Sasabe R, Goto K, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Relationship between extensibility and collagen expression in immobilized rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 査読有, 57(4):672-678, 2018. doi: 10.1002/mus.26011.
2. 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 関節可動域制限に対する基礎研究の動向と臨床への応用 - 筋性拘縮の発生機序の解明ならびにエビデンスに基づいた治療戦略の開発を目的とした基礎研究 -. *理学療法学*, 査読無, 45(4): 275-280, 2018.
3. 沖田 実, 本田祐一郎, 片岡英樹: 拘縮に対する物理療法の臨床実践. *理学療法*, 査読無, 35(7): 601-610, 2018.
4. Goto K, Sakamoto J, Nakano J, Kataoka H, Honda Y, Sasabe R, Origuchi T, Okita M: Development and progression of immobilization-induced skin fibrosis through overexpression of transforming growth factor- α 1 and hypoxic conditions in a rat knee joint contracture model. *Connect Tissue Res*, 査読有, 58(6):586-596, 2017. doi: 10.1080/03008207.2017.1284823.
5. Sasabe R, Sakamoto J, Goto K, Honda Y, Kataoka H, Nakano J, Origuchi T, Koji T, Okita M: Effects of joint immobilization on changes in myofibroblasts and collagen in the rat knee contracture model. *J Orthop Res*, 査読有, 35(9):1998-2006, 2017. doi: 10.1002/jor.23498.
6. Yoshimura A, Sakamoto J, Honda Y, Kataoka H, Nakano J, Okita M: Cyclic muscle twitch contraction inhibits immobilization-induced muscle contracture and fibrosis in rats. *Connect Tissue Res*, 査読有, 58(5):487-495, 2017. doi: 10.1080/03008207.2016.w2221257004.

〔学会発表〕(計15件)

1. 本田祐一郎, 梶原康宏, 田中なつみ, 石川空美子, 竹下いづみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動後早期からの筋収縮負荷は筋性拘縮の予防戦略として有効か? 動物実験用 B-SES を用いた検討. 第23回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018年.
2. 田中なつみ, 本田祐一郎, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動化によって生じる骨格筋内のマクロファージ集積の機序. 第23回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018年.
3. 梶原康宏, 片岡英樹, 本田祐一郎, 田中なつみ, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: HIF-1阻害薬投与と電気刺激による周期的な単収縮運動を併用した治療戦略がラットヒラメ筋の筋性拘縮におよぼす影響. 第23回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018年.
4. 本田祐一郎, 梶原康宏, 稲富裕也, 田中なつみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 近藤康隆, 縄田 厚, 沖田 実: B-SESによるラットヒラメ筋の筋性拘縮の進行抑制効果に関する検討. 第5回日本骨格筋電気刺激研究会学術集会, 2018年.

5. **Honda Y**, Tanaka N, Kajiwara Y, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Pathogenesis and molecular mechanism of muscle contracture in rat soleus muscles. 12th international society of physical and rehabilitation medicine world congress, Jul 8-12, 2018.
6. Tanaka N, **Honda Y**, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Mechanisms of macrophages accumulation in the process of immobilized-induced muscle contracture in rats. 12th international society of physical and rehabilitation medicine world congress, Jul 8-12, 2018.
7. Kajiwara Y, Kataoka H, **Honda Y**, Tanaka N, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Effect of hif-1a inhibitors for preventing the progress of muscle contracture in rat soleus muscles. 12th international society of physical and rehabilitation medicine world congress, Jul 8-12, 2018.
8. **本田祐一郎**, 田中なつみ, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 電気刺激誘発性筋収縮運動の収縮様式の違いが骨格筋の線維化におよぼす影響. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018 年.
9. 田中なつみ, **本田祐一郎**, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動化した骨格筋における線維化の発生メカニズム-マクロファージ集積機序の探索. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018 年.
10. 梶原康宏, 片岡英樹, **本田祐一郎**, 田中なつみ, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動に伴う骨格筋の線維化に対する HIF-1 阻害薬の効果. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018 年.
11. 田中なつみ, **本田祐一郎**, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 筋性拘縮の発生に関わる分子メカニズムの検討 - ラット足関節尖足拘縮モデルを用いて -. 第 1 回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会, 2017 年.
12. **本田祐一郎**, 松崎健一, 田中なつみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 電気刺激を用いた単収縮と強縮のコンビネーションプログラムが筋性拘縮と廃用性筋萎縮におよぼす影響. 第 52 回日本理学療法学術大会, 2017 年.
13. **本田祐一郎**, 田中なつみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 歩行運動は拘縮の予防対策として有効である 拘縮の実験動物モデルを用いた検討. 第 4 回全国介護・終末期リハ・ケア研究会研究大会, 2016 年.
14. **本田祐一郎**, 田中美帆, 佐々部陵, 後藤 響, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 骨格筋の不動化におけるコラーゲン動態が筋伸張性におよぼす影響. 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 2016 年.
15. **本田祐一郎**, 田中美帆, 佐々部陵, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動化したラットヒラメ筋における伸張性の変化とコラーゲンの動態との関連性. 第 51 回日本理学療法学術大会, 2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/index.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 沖田 実

ローマ字氏名: (OKITA, Minoru)

研究協力者氏名: 坂本 淳哉

ローマ字氏名: (SAKAMOTO, Jyunya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。