

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300200

研究課題名（和文） 関節周囲組織の網羅解析から拘縮の発生メカニズムとリハビリテーションの効果を探る

研究課題名（英文） Investigation for the mechanism of joint contracture and the effect of rehabilitation based on comprehensive analysis concerning surrounding tissue of joint

研究代表者

沖田 実 (OKITA MINORU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50244091

研究成果の概要（和文）：本研究では、ギプス等による関節の不動によって発生する拘縮と呼ばれる機能障害の発生メカニズムを明らかにする目的で、ラットの実験モデルから得た骨格筋、関節包、皮膚といった関節周囲組織を組織学的・免疫組織学的・分子生物学的検索に供し、網羅的に解析した。結果、骨格筋由来の拘縮には TGF- $\beta$  と呼ばれるサイトカインシグナルが活性化し、線維芽細胞の亜型である筋線維芽細胞への分化が促され、タイプ I・III コラーゲンが増加するといった線維化の発生が関与し、この線維化は機械的刺激の減少によって進展する可能性があることが示唆された。また、不動によって関節包においては滑膜に、皮膚においては皮下組織に顕著な線維化が発生・進行することが明らかとなり、これらの組織に由来する拘縮の発生メカニズムに関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Clinically, the contracture that is one of the functional disorders is often caused by immobilization of a joint with a plastic cast etc, however, this mechanism is not yet clear. The objective of this study is to clarify the mechanism of contracture based on comprehensive analysis concerning surrounding tissue of joint in experimental animal model. Our results suggest that the molecular mechanism of immobilization-induced muscle fibrosis relate the cytokine signal by TGF- $\beta$  is activated, the differentiation from the fibroblast to myofibroblast is accelerated, and the type I and III collagen increase. Additionally, the immobilization-induced muscle fibrosis may progress by a decrease in mechanical stimulation. Immobilization of the joint causes the fibrosis of the synovial membrane and the tissue under the skin. There is an important relation in the mechanism because the contracture progresses by these changes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：障害学・拘縮・骨格筋・皮膚・関節包・コラーゲン・線維化・TGF- $\beta$ ・筋線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定、あるいは痛みや麻痺などによる関節の不動は拘縮と呼ばれる関節運動制限を惹起するが、医療技術や介護施策が進んでいる今日でも臨床症例の多くに拘縮が頻発している事実がある。この背景には、高齢化の進展という生物学的影響に加え、拘縮の発生メカニズムの解明と効果的な治療法の開発の立ち遅れが大きく影響している。

拘縮の動物モデルや実際の症例の生体試料の検索に基づく先行研究の結果を整理すると、コラーゲンの増生やその密生化、線維芽細胞の増殖などといった線維化の発生が関節周囲組織のすべてにみられる共通した病態であると推測できる。しかし、先行研究のすべてはある組織、例えば関節包のみに焦点をあてた検索であり、同一の動物モデルの関節周囲組織を網羅的に解析した報告はない。また、拘縮の進行に伴って関節周囲の各組織における線維化の病態がどのような推移をたどるのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、同一の動物モデルの関節周囲組織を組織学的・免疫組織学的・分子生物学的検索に供し、その網羅的・縦断的解析を行い、拘縮の発生・進行に関与する分子メカニズムを明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

本研究課題の目的を明らかにするためには、いくつかの研究テーマを設けた上で実験を進める方が妥当と考えられた。以下、実施した研究テーマ毎にその方法を述べる。

### (1) 不動に伴う骨格筋の線維化の推移の検討

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット50匹で、これらを無作為に25匹ずつ無処置の対照群と両側足関節を最大底屈位で不動化し、尖足拘縮を惹起する不動群に振り分けた。不動期間は1・2・4・8・12週間（各5匹）とし、対照群は各不動期間のラットと週齢を合致させるため9・10・12・16・20週齢時まで通常飼育した（各5匹）。そして、各不動期間終了後はヒラメ筋を検索材料に供し、筋内膜と筋周膜におけるタイプI・IIIコラーゲンの動態変化を蛍光免疫染色ならびにその染色像の発光輝度の画像解析に基づく半定量分析から検討した。

### (2) 不動に伴う骨格筋の線維化の分子メカニズムの検討

先行研究によれば、肺や肝臓の線維化はマクロファージなどから発現するTGF- $\beta$ と呼

ばれるサイトカインが線維芽細胞を刺激することで、その亜型である筋線維芽細胞への分化が促され、その結果、コラーゲンの増生が進行するといった分子メカニズムが明らかになっている。そこで、本研究テーマではこの分子メカニズムが拘縮の発生・進行に伴う骨格筋の線維化の際にも成り立つか否かを検討した。

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット50匹で、その群分けや不動期間などは前述の(1)の研究テーマの実験と同様であり、各不動期間終了後はヒラメ筋を検索材料に供した。そして、RT-PCR法にてTGF- $\beta$ 、筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ -SMAならびにタイプI・IIIコラーゲンについてmRNAレベルにおける動態変化を検討した。

### (3) 不動に伴う骨格筋の線維化の分子メカニズムにおける機械的刺激の関与の検討

先行研究によれば、前述の分子メカニズムによって肺の線維化が惹起され、肺そのものの伸縮性が低下すると線維化はさらに進行するといわれている。つまり、肺そのものへの機械的刺激の減少が線維化の進行に重要な役割があるといえる。一方、不動化された骨格筋は筋活動が減少するとともに、それ自体の長さ変化が生じないことから、機械的刺激が減少した状態にあると考えられ、このことが線維化の進行に影響している可能性がある。そこで、本研究テーマでは磁気刺激装置を用いて不動化した状態のまま骨格筋の単収縮を誘発することで機械的刺激を負荷し、関節可動域制限や線維化の発生状況によらず影響を検討した。

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット16匹で、これらを4週間通常飼育する対照群(n=5)、両側足関節を最大底屈位で4週間不動化する不動群(n=5)、4週間の不動期間中に周期的に脊髄前角細胞を磁気刺激し、ヒラメ筋に単収縮を誘発することで機械的刺激を負荷する刺激群(n=6)に振り分けた。そして、4週間の実験期間終了後に麻酔下で両側足関節の背屈可動域(ROM)を測定し、その後、ヒラメ筋を検索材料に供し、RT-PCR法にて $\alpha$ -SMAとタイプI・IIIコラーゲンのmRNAレベルでの動態変化を検討した。

### (4) 不動に伴う関節包ならびに皮膚の線維化の推移の検討

平成21年度に数回にわたる予備実験を実施し、前述のラット尖足拘縮モデルにおける関節包の検索を進めたが、足関節組織では検索に耐え得るだけの試料採取が困難であることが判明した。そこで、先行研究を参考に膝関節を屈曲位で不動化した拘縮モデルを

作製し、不動に伴う関節包ならびに皮膚の線維化の推移を検討した。

実験動物は12週齢のWistar系雄性ラット36匹で、これらを一匹ずつ無処置の対照群と両側の股関節を軽度屈曲位、膝関節を最大屈曲位で不動化し、拘縮を惹起させる不動群に振り分けた。不動期間は1・2・4週間（各6匹）とし、対照群は各不動期間のラットと週齢を合致させるため13・14・16週齢時まで通常飼育した（各6匹）。そして、各不動期間終了後は膝関節後面の皮膚と膝関節を一塊として採取し、組織学的検索に供するとともに、各組織の画像解析に基づく半定量分析を通して、線維化の発生・進行状況を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 不動に伴う骨格筋の線維化の推移

筋内膜においてはすべての不動期間でタイプI・IIIコラーゲンの増加を認め、しかもタイプIコラーゲンにおいては不動4週まで不動期間の延長に伴う増加が認められた（図1a）。筋周膜においてもすべての不動期間でタイプI・IIIコラーゲンの増加を認めたが、不動期間による違いは認められなかった（図1b）。

以上の結果から、1週間という短期の不動で骨格筋の線維化が惹起されるが、これは筋内膜・筋周膜におけるタイプI・IIIコラーゲンの増加によるものと考えられた。また、正常な骨格筋の場合、筋周膜に比べ筋内膜はタイプIIIコラーゲンの構成比が高く、伸張性・柔軟性に富むといわれている。つまり、筋内膜のタイプIコラーゲンが不動期間の延長に伴って増加するという結果は骨格筋由来の拘縮の進行に関連した知見と推察された。

##### (2) 不動に伴う骨格筋の線維化の分子メカニズム

検索したすべての分子のmRNA発現量は不動1週より対照群に比べ有意な増加が認められ（図2a-d）、さらに、タイプIコラーゲンにおいては不動4週まで不動期間の延長に伴う増加が認められた（図2a）。

以上の結果から、骨格筋が不動化されるとTGF- $\beta$ のサイトカインシグナルが活性化し、線維芽細胞の亜型である筋線維芽細胞への分化が促され、その結果としてタイプI・IIIコラーゲンが増加するといった分子メカニズムが成り立つ可能性が示唆され、ある程度は骨格筋由来の拘縮の発生メカニズムの解明が進展したと考えられる。ただ、(1)の成果でも示したようにタイプIコラーゲンに限っては不動4週まで不動期間の延長に伴う増加が認められており、このメカニズム解明が今後の検討課題となった。

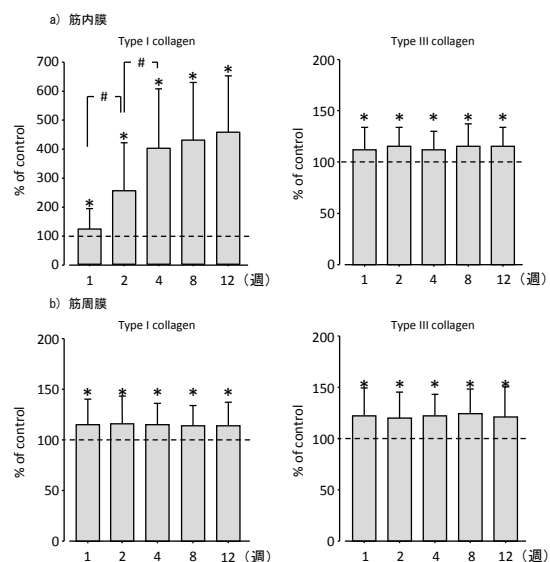


図1. 筋内膜、筋周膜におけるタイプI・IIIコラーゲンの変化

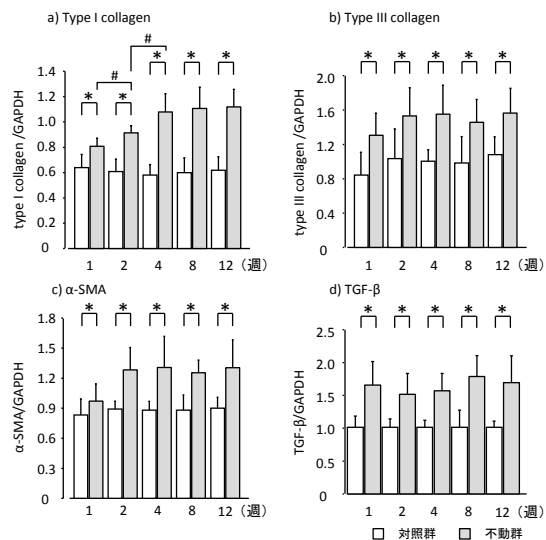


図2. 各分子のmRNAの変化

##### (3) 不動に伴う線維化の分子メカニズムにおける機械的刺激の関与

ROMは不動群、刺激群とも対照群に比べ有意に低値であったが、刺激群は不動群より有意に高値を示した（図3a）。各分子のmRNA発現量をみると、 $\alpha$ -SMAとタイプIコラーゲンは不動群、刺激群とも対照群に比べ有意に高値であったが、刺激群は不動群より有意に低値を示した（図3b,c）。また、タイプIIIコラーゲンは不動群が対照群や刺激群より有意に高値で、対照群と刺激群には有意差を認めなかった（図3d）。

以上の結果から、不動の過程で骨格筋に周期的な単収縮を誘発し、機械的刺激を負荷すると線維化ならびに拘縮の発生を軽減できることが明らかとなり、このことは不動によって惹起される骨格筋の線維化の分子メカ

ニズムに機械的刺激の減少が関与していることを示唆している。

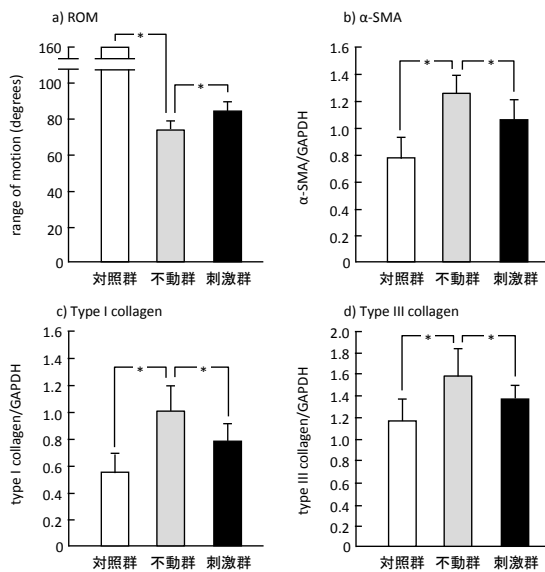


図 3. ROM ならびに各分子の mRNA の変化

(4) 不動に伴う関節包ならびに皮膚の線維化の推移

① 関節包の線維化の推移

検鏡結果として、後方関節包の滑膜において不動 1 週よりコラーゲンの増生が認められた。そこで、同部位の 40 倍の検鏡像に縦・横 50 $\mu$ m 間隔で格子線を描き、コラーゲン線維上に存在する格子線の交点の総数を算出し、コラーゲン線維の量的変化を半定量化した。その結果、各不動期間とも不動群は対照群より有意に高値で、不動群内では不動 4 週は不動 1・2 週より有意に高値であった。次に、後方関節包の滑膜におけるコラーゲン線維の密生化の状況を検討した。検鏡結果としては不動 1 週ではコラーゲン線維の密生化は明らかでなかったが、不動 2・4 週は顕著であった。そこで、同部位の 400 倍の検鏡像を用いて単位面積あたりのコラーゲン線維の占有率を算出し、コラーゲン線維の密生化の状況を半定量化した。その結果、不動 1 週は対照群と有意差を認めなかったが、不動 2・4 週は対照群より有意に高値を示し、不動群内では不動 2・4 週は不動 1 週より有意に高値であった。

以上の結果から、今回の拘縮モデルにおいては後方関節包の滑膜において線維化が発生するということができ、その推移としては 1 週間という短期の不動でコラーゲン線維が増生し、これは不動期間の延長に伴って顕著になると推察される。加えて、不動 2 週以降はコラーゲン線維の密生化も生じ、線維化が進行する可能性が高いといえる。

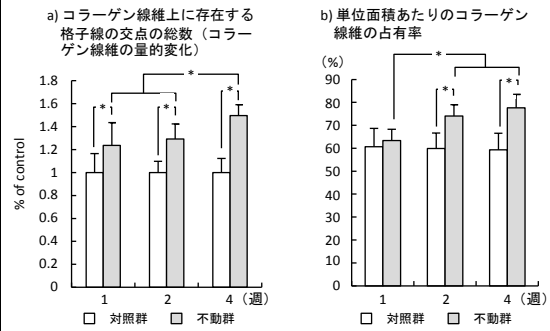


図 4. 後方関節包の滑膜における線維化の発生状況

② 皮膚の線維化の推移

検鏡結果として、対照群では線維性結合組織からなる真皮と脂肪細胞からなる皮下組織が観察されるのに対し、不動群では皮下組織の脂肪細胞が減少し、線維性結合組織が増加しており、特に不動 2・4 週では脂肪細胞が消失し、線維性結合組織に置換されている像も観察された。次に画像解析の結果として、真皮から皮下組織における脂肪細胞が占める割合は各不動期間とも不動群は対照群に比べ有意に低値を示し、不動期間で比較すると不動 1 週に比べ不動 2・4 週は有意に低値で、不動 2 週と不動 4 週の間には有意差を認めなかった。一方、線維性結合組織の占める割合は各不動期間とも不動群は対照群に比べ有意に高値を示し、不動期間で比較すると不動 1 週に比べ不動 4 週は高値を示した。

以上の結果から、不動によって真皮から皮下組織の脂肪細胞が減少し、線維性結合組織が増加するといった皮膚の線維化が惹起されることが明らかとなり、これは不動期間の延長に伴って進行するといえる。つまり、このような皮膚の変化も拘縮の病態の一つと考えることができ、リハビリテーションの治療ターゲットとして重要であることが示唆された。

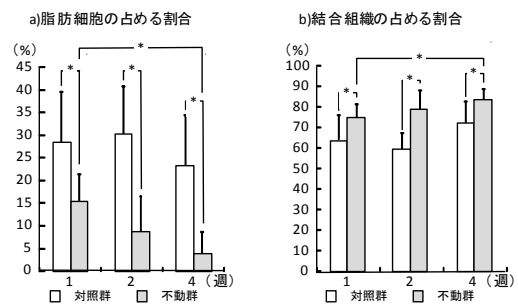


図 5. 皮膚における線維化の発生状況

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 沖田 実, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 佐々部陵, 後藤 響: 関節可動域制限の発生メカニズム. 理学療法 29: 9-16, 2012 (査読無).
- ② 沖田 実, 坂本淳哉, 中野治郎, 近藤康隆, 横山真吾, 本田祐一郎: 骨格筋の変化からみた拘縮の病態と物理的刺激の影響. 日本整形外科学会雑誌 85: 420-425, 2011 (査読有).
- ③ Origuchi T, Sakai T, Sakamoto J, Nakano J, Okita M, Yoshimura T, Eguchi K, Kawakami A: Effects of continuous passive motion on the expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in rat immobilized muscles. Health Science Research 23: 1-6, 2011 (査読有).  
[http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/25627/1/hokenn23\\_2\\_1.pdf](http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/25627/1/hokenn23_2_1.pdf)
- ④ 沖田 実, 中野治郎, 坂本淳哉, 横山真吾, 近藤康隆, 本田祐一郎, 濱上陽平: 痛みと拘縮—骨格筋の変化からみた拘縮の病態—. 日本運動器疼痛研究会誌 2: 31-38, 2010 (査読有).
- ⑤ 近藤康隆, 坂本淳哉, 片岡英樹, 沖田 実: セラピューティック・ストレッチングによる組織変化—骨格筋の変化に由来した拘縮の病態に対して—. 理学療法 27: 973-982, 2010 (査読無).
- ⑥ Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T: Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. Ultrasound Med Biol 35: 237-244, 2009 (査読有),  
<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/20787>
- ⑦ Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Nakano J, Kato K, Yoshimura T, Izumi S, Komori T, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K: Immobilization-induced cartilage degeneration mediated through expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and chondromodulin-I. Connect Tissue Res 50: 37-45, 2009 (査読有).
- ⑧ 友利幸之介, 小砂哲太郎, 古関友美, 中野

治郎, 沖田 実: 不動がラットヒラメ筋におけるタイプ I・III コラーゲン mRNA の発現量におよぼす影響. 日本作業療法研究学雑誌 12: 11-15, 2009 (査読有).

[学会発表] (計 17 件)

- ① 沖田 実: 運動機能障害に対する温水浴の効果—Heat shock protein 70 の作用に着目して—. 第 76 回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会, 霧島, 2011.5.13-14.
- ② 坂本淳哉, 後藤 響, 近藤康隆, 本田祐一郎, 片岡英樹, 濱上陽平, 横山真吾, 中野治郎, 沖田 実: 不動による関節包の線維化の発生状況ならびに筋線維芽細胞の変化. 第 46 回日本理学療法学会学術大会, 宮崎, 2011.5.27-29.
- ③ 本田祐一郎, 近藤康隆, 横山真吾, 濱上陽平, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動期間の延長に伴うラットヒラメ筋の筋周膜ならびに筋内膜におけるタイプ I・III コラーゲンの変化. 第 46 回日本理学療法学会学術大会, 宮崎, 2011.5.27-29.
- ④ 沖田 実: 関節可動域制限の発生メカニズムとその対処. 第 46 回日本理学療法士協会全国学術研修大会, 甲府, 2011.10.6-7.
- ⑤ 横山真吾, 本田祐一郎, 近藤康隆, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実, 吉村俊朗: 不動によるラットヒラメ筋のコラーゲンタイプの変化が足関節可動域に与える影響. 第 45 回日本理学療法学会学術大会, 岐阜, 2010.5.27-29.
- ⑥ 本田祐一郎, 近藤康隆, 横山真吾, 濱上陽平, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動期間の延長に伴うラットヒラメ筋の筋内膜におけるタイプ I・III コラーゲンの変化. 第 45 回日本理学療法学会学術大会, 岐阜, 2010.5.27-29.
- ⑦ 坂本淳哉, 中野治郎, 片岡英樹, 折口智樹, 吉村俊朗, 沖田 実: 不動に伴うラット関節軟骨基質の変化, ならびに持続的他動運動の影響. 第 42 回日本結合組織学会学術大会・第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 秋田, 2010.8.19-20.
- ⑧ 本田祐一郎, 近藤康隆, 横山真吾, 濱上陽平, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動期間の延長に伴うラットヒラメ筋の筋内膜におけるタイプ I・III コラーゲンの変化. 第 42 回日本結合組織学会学術大会・第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 秋田, 2010.8.19-20.
- ⑨ 本田祐一郎, 中村雅俊, 近藤康隆, 横山真吾, 中野治郎, 沖田 実: 短期の不動がラットヒラメ筋内のコラーゲンにおよぼす影響—コラーゲン含有量とタイプの変化—. 第 14 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会, 東京, 2009.5.27.

- ⑩ 沖田 実: 筋性拘縮の病態と物理的刺激の効果—動物実験からの検証—. 第 44 回日本理学療法学会, 東京, 2009.5.28-30.
- ⑪ 片岡英樹, 近藤康隆, 中野治郎, 坂本淳哉, 西川正悟, 吉田奈央, 折口智樹, 吉村俊朗, 沖田 実: 不動後のラットヒラメ筋におけるタイチンの発現量の変化. 日本理学療法学会, 東京, 2009.5.28-30.
- ⑫ 近藤康隆, 吉田佳弘, 横山真吾, 片岡英樹, 坂本淳哉, 吉田奈央, 森本陽介, 中野治郎, 沖田 実: 温熱療法と伸張運動の併用が不動終了後の関節可動域の回復状況とラットヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網におよぼす影響. 第 44 回日本理学療法学会, 東京, 2009.5.28-30.
- ⑬ 坂本淳哉, 坂井孝行, 折口智樹, 中野治郎, 片岡英樹, 西川正悟, 近藤康隆, 横山真吾, 江口勝美, 沖田 実: 不動に伴うラット軟骨基質の変化, ならびに持続的他動運動の影響. 第 44 回日本理学療法学会, 東京, 2009.5.28-30.
- ⑭ 沖田 実: ストレッチと拘縮改善. 第 44 回日本理学療法士協会全国学術研修大会, 四日市, 2009.10.2-3.
- ⑮ 沖田 実: 骨格筋の変化からみた拘縮の病態と物理的刺激の影響. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 横浜, 2009.11.5-6.
- ⑯ 沖田 実: 痛みと拘縮. 第 2 回日本運動器疼痛研究会, 東京, 2009.11.7.
- ⑰ 沖田 実: 骨格筋の変化からみた関節可動域制限の病態. 第 13 回山梨県理学療法士会学術集会, 甲府, 2009.12.13.

[図書] (計 3 件)

- ① 松原貴子, 沖田 実, 森岡 周: Pain Rehabilitation—ペインリハビリテーション, 三輪書店, 2011, 総ページ数 411.
- ② 沖田 実, 松原貴子, 森岡 周 (編): 機能障害科学入門, 九州神稜文庫, 2010, 総ページ数 386.
- ③ 沖田 実 (編): 物理療法第 2 版, 神陵文庫, 2009, 総ページ数 365.

[その他]

ホームページ等

[http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic\\_pt/](http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沖田 実 (OKITA MINORU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 50244091

### (2) 研究分担者

折口智樹 (ORIGUCHI TOMOKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 90295105

中野治郎 (NAKANO JIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 20380834

(H21, 23)

坂本淳哉 (SAKAMOTO JYUNYA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 20584080

(H22)

### (3) 連携研究者

坂本淳哉 (SAKAMOTO JYUNYA)

長崎大学病院・リハビリテーション部・理学療法士

研究者番号 20584080

(H23)