

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K09267
研究課題名（和文）弾性線維に着目した凍結肩の病態解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Effects of elastic fiber on pathology of frozen shoulder

研究代表者
萩原 嘉廣（Hagiwara, Yoshihiro）
東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90436139
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：凍結肩の関節包の硬化メカニズムを弾性線維の合成に着目して解明を試みた。デコリン（コアタンパク質）は減少し、デコリン（糖鎖）は広域な分子量分布を示した。また、アグリカンはコントロールの腱板断裂群と比較して凍結肩で増加していた。デコリンの減少は線維化、炎症の亢進を促し、コラーゲン線維の不整、石灰化にも関与する。また、上部での糖鎖の広域な分子量分布は炎症、線維化の継続を、下部での糖鎖の高分子量でのまとまりを示し、組織として定常状態になった要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
激しい疼痛と関節可動域制限（関節拘縮）を主訴とする「凍結肩（五十肩）」は5%の有病率とされ、本邦では少なくとも600万人以上が罹患しているものと推定される。「凍結肩は自然に治る」という一般認識が浸透し、適切な治療が必要にも関わらず医療機関を受診していない可能性が高く、潜在的な患者は相当数存在するものと考えられる。関節可動域制限は患者本人の日常生活動作だけでなく、介護者の負担も増すため、超齢社会の本邦においては、その予防・治療法の開発は喫緊の課題である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was "A new treatment strategy for frozen shoulder regarding elastic fibers". Compared with the control group (Rotator cuff tears), the core protein of Decorin decreased, but the sugar chain of it indicated broad spectrum. Upper part of the joint capsule is now on the active phase, but lower part of it was in the silent phase.

研究分野：整形外科

キーワード：凍結肩 プロテオグリカン 弾性線維

1. 研究開始当初の背景

激的な疼痛と関節可動域制限(関節拘縮)を主訴とする「凍結肩(五肩)」は5%の有病率とされ(Sheridan MA, 2006)、本邦では少なくとも600万人以上が罹患しているものと推定される。「凍結肩は自然に治る」という一般認識が浸透し、適切な治療が必要にも関わらず医療機関を受診していない可能性が高く、潜在的な患者は相当数存在するものと考えられる(Shaffer B, 1992)。一方、関節可動域は加齢とともに減少することも知られている(渡辺英夫, 1979)。関節可動域制限は患者本人の日常生活動作だけでなく、介護者の負担も増すため、超高齢社会の本邦においては、その予防・治療法の開発は喫緊の課題である。

凍結肩の病因は関節包の変性と肥厚であるが、その病態は未だに不明であり、保存療法ではリハビリテーションを中心とした運動療法が、それに抵抗する場合は手術療法(授動術)が選択される。凍結肩の病態に関する研究では、関節包の炎症、線維化との報告がほとんどだが、我々はこれまで軟骨化生¹⁾、代謝異常²⁾、コラーゲンの架橋異常³⁾の関与を報告している。脊椎動物の組織に伸縮性(弾性)を与えているのは弾性線維であり、エラスチンがマイクロフィブリルに沈着し、リシルオキシダーゼによって架橋を受けることで生成される。加齢とともに劣化するだけでなく、各種の刺激によってマクロファージや好中球から誘導されるエラスターゼによって分解される。肺気腫、動脈瘤など様々な老化現象との関連が報告されている。一方、軟骨基質の構成成分であるプロテオグリカンは弾性線維の合成を抑制し(Ikeda, 2009)組織硬化に関与する。

これまで研究代表者らは、1)凍結肩のヒト関節包サンプルを用いた病態解明¹⁻³⁾、2)関節包の病態を反映した関節可動域計測法(肩甲骨を固定して肩甲上腕関節の可動域を計測)の提唱⁴⁾、3)これまでの術式では改善が得られなかった結帯動作(手を背中に回す)に対する新たな鏡視下手術方法の開発とその良好な臨床成績^{5,7)}、4)関節拘縮をともなう腱板断裂の関節包は、凍結肩と類似した病態であること(投稿中)を報告してきた。臨床データと関節包サンプルを結合したデータベースの構築を行うだけでなく、独自に開発したラット膝関節不動化モデルを用いた関節拘縮の研究も行っている。凍結肩に代表される関節拘縮は治療後の合併症としても頻繁に遭遇し、患者の社会復帰を遅らせるため、医療費抑制の観点からも早期の病態解明と予防・治療法の開発が望まれる。

関節可動域制限は関節包の変性・硬化が原因であり、その変化は不可逆的となり関節授動術が必要となる。研究代表者らは鏡視下授動術を行った凍結肩の関節包サンプルを用いた解析から、炎症・線維化以外に軟骨化生¹⁾、コラーゲンの架橋異常(カルボキシルメチルリジン)が重要な病態であることを報告した³⁾。また、線維化の主要な因子と考えられているI型コラーゲン、カルボキシルメチルリジンの免疫染色と組織の弾性を計測できる超音波顕微鏡の画像を比較すると、両者に明らかな相関関係はなく、他の因子の関与を強く疑ってきた。凍結肩では脂溶性のビタミンAの誘導体であるレチノイド代謝(間葉系幹細胞の軟骨分化を抑制)が低下しており、脂質代謝の低下も相まってビタミンAの貯蔵量が減少し、軟骨化生が引き起こされるものと推察し、研究を行った(基盤研究C)。研究代表者が行っている凍結肩と類似した病態を呈する腰部脊柱管狭窄症の黄色靭帯において、増加したプロテオグリカンによって弾性線維の合成が阻害され、硬化する可能性を報告している⁴⁾。そして凍結肩においても特徴的なグリコサミノグリカンの増減パターンを報告している投稿中。しかしながら、凍結肩において弾性線維の生合成がどのように阻害されているか、組織の硬化と関連するかは解明されていない。また、硬化した関節包が不足するタンパクを添加することによって弾性線維の生合成が促進され、軟化するかも不明である。研究代表者は既に凍結肩の「腱板疎部(RI)」, 前下上腕関節靭帯(IGHL)でエラスチンの遺伝子発現が減少していることを確認している。

2. 研究の目的

本研究の目的は「凍結肩の関節包の硬化メカニズムを弾性線維の生合成に着目して解明を試みるだけでなく、新たな治療方法を開発すること」である。これまで蓄積された臨床的および分子生物学的な知見を、弾性線維の生合成に着目して凍結肩の病態解明を試みる。また、各病態間の関連を明らかにするばかりでなく、新たな治療法を開発する先駆的な研究である。

3. 研究の方法

(1)ラット膝関節不動化モデルを用いて、弾性線維の生合成の低下を確認する

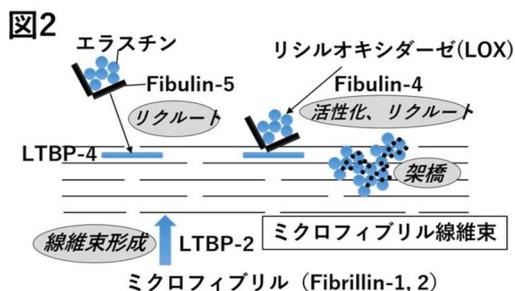
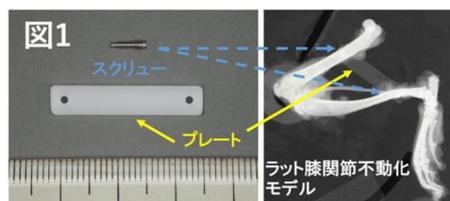
使用動物 12週齢オスSDラット(n=12匹/群)

方法 片側膝関節をプラスチックプレートとスクリューで150°屈曲位で固定(図1)

不動化期間 2、4、6、8週(本モデルでは4-6週で関節可動域が制限され、硬化する8)

評価項目 関節包を採取し、弾性線維の生合成に関わる遺伝子・タンパクの発現を定量PCRと免疫染色法で確認する。エラスターゼ、エラスチン、マイクロフィブリル(Fibrillin-1,2)とその線維束形成に必要なLTBP(Latent TGFβ-binding protein)-2、エラスチンをマイクロフィブリルまでリクルートするFubulin-5とその沈着に必要なLTBP-4、リシルオキシダーゼ(LOX)の活性化とエラスチンまでリクルートするFubulin-4について確認する(図2、Nakamura T, 2015)。また、超音波顕微鏡は東北大学医工学研究科(西條芳文教授)で開発され、音速がヤング率

の平方根に比例する公式に基づいてスライドガラス上の組織の音速を計測できる装置である(図3)。各タンパクの免疫染色と超音波顕微鏡の画像比較を行い、主成分分析で関節包の硬化と関連する因子を特定する1)。十分なタンパク量が採取できれば、Western-blotting (ELISA)を行い、定量化する。



$$c = \sqrt{\frac{E(1-\sigma)}{\rho(1-2\sigma)(1+\sigma)}}$$

c : sound speed
 E : Young's elastic modulus



図3 超音波顕微鏡

(2) ヒト関節包サンプルを用いて、弾性線維の生合成の低下とその原因を特定する

関節鏡視下授動術を要した凍結肩群と関節可動域制限のない腱板断裂の関節包(コントロール群)(上方: 腱板疎部[RI], 下方: 前上腕関節靭帯[IGHL])の遺伝子、タンパク発現を比較する。研究代表者が提唱した肩甲上腕関節のみの関節可動域計測においては、屈曲90度、外転90度、下垂位外旋20度未満の腱板断裂患者の関節包は凍結肩と類似した病態を示しており(投稿中)、関節可動域制限のある腱板断裂患者についても検討し、加齢性変化についても検証する。

対象: 凍結肩群: 30例, 腱板断裂群: 60例(関節可動域制限なし群: 30例, 関節可動域制限あり群: 30例。凍結肩の発症年齢を考慮し、腱板断裂群は40-65歳を対象とする)。RI, IGHLからそれぞれRNA, タンパク, 組織評価用に3つずつサンプルを採取する。

方法: 動物実験の結果を参考にしながら、弾性線維の生合成に関連する因子を定量PCR, Western blotting(ELISA)、免疫染色法を用いて解析を行う。また、臨床所見(関節可動域, 疼痛, 各スコア)との関連を検討する。

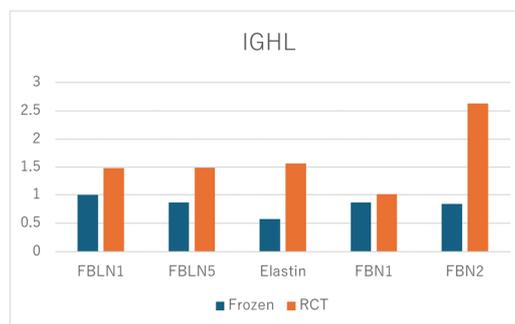
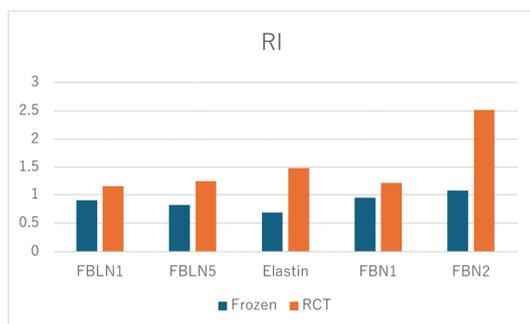
4. 研究成果

(1) ラット膝関節不動化モデルでの解析

弾性線維の生合成に関わる遺伝子、タンパクの発現に有意差は認められなかった。

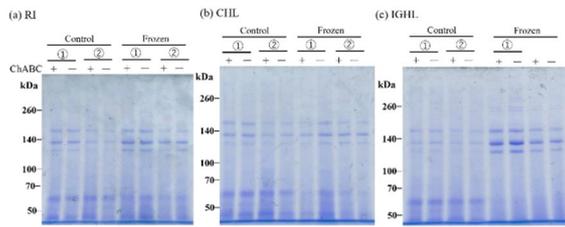
(2) ヒト関節包サンプルを用いての解析

遺伝子発現解析

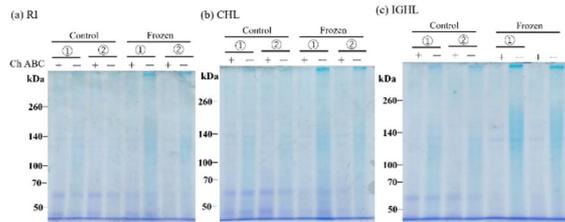


RI ではElastin, FBN2、IGHL ではElastin で腱板断裂群と比較して、凍結肩群で有意に減少していた。

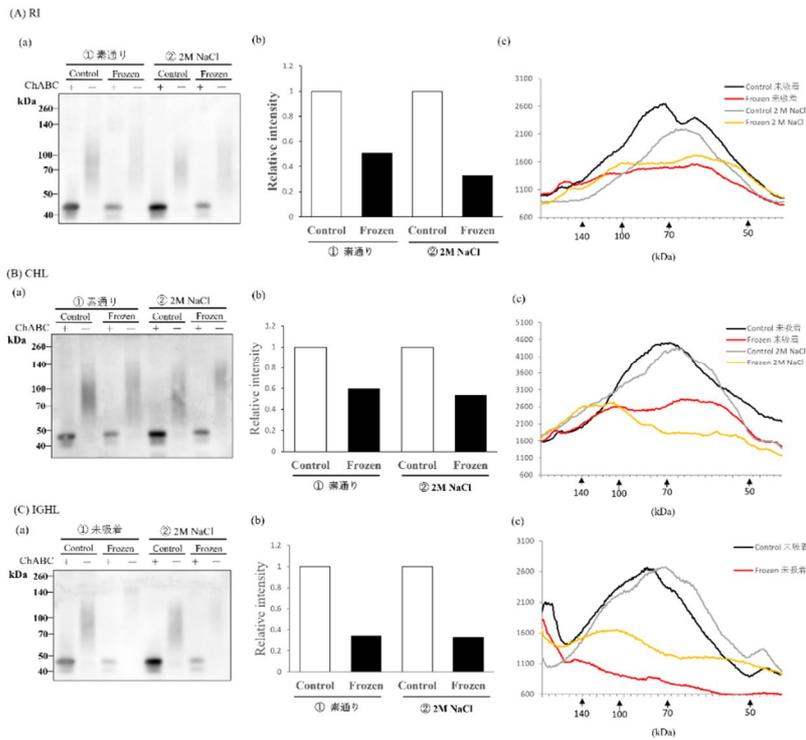
(A) CBB染色



(B) アルシアンブルー染色



SDS-PAGE パターン
(A)CBB 染色
(B)アルシアンブルー染色



抗デコリン抗体を用いたウエスタンブロット解析

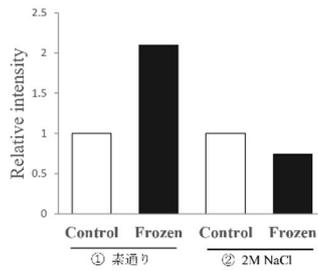
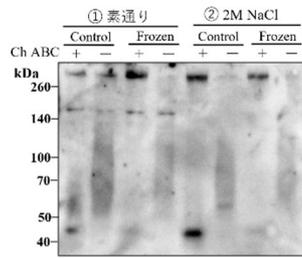
(a) 7.5%ゲルでのウエスタンブロットニング

(b) パネルaでのコンドロイチナーゼABC未消化について、各レーンごとの染色強度をImageJを用いて測定し、マーカーの分子量とともに示した。

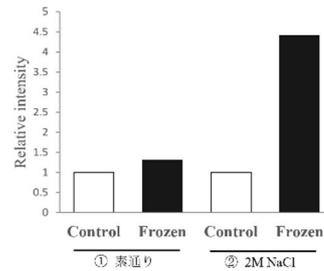
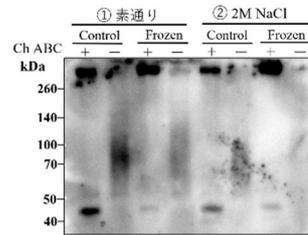
(c) パネルaでのコンドロイチナーゼABC消化について染色強度をImageJを用いて測定した。Controlの値を1とした時の相対強度を算出し、グラフに示した。

(A) Anti-C4S antibody (2B6)

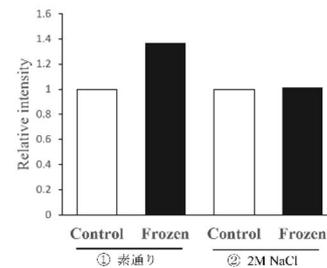
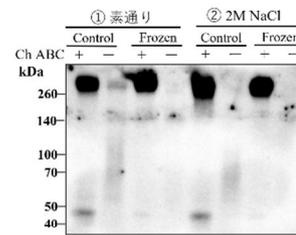
(a) RI



(b) CHL

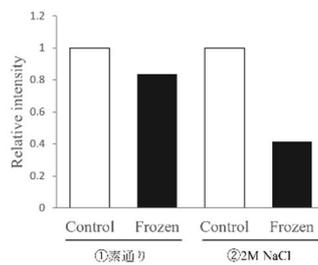
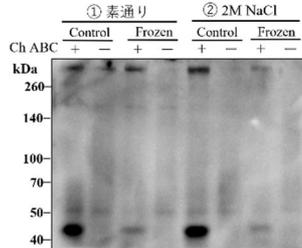


(c) IGHL

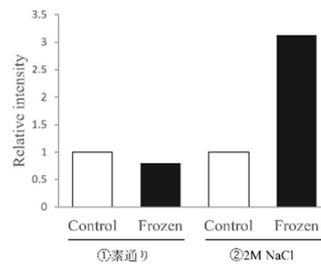
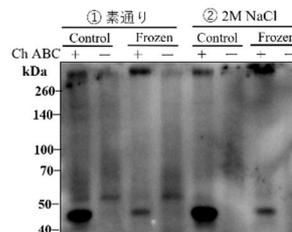


(B) Anti-C6S antibody (3B3)

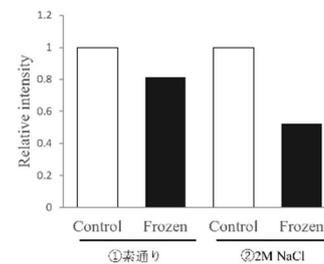
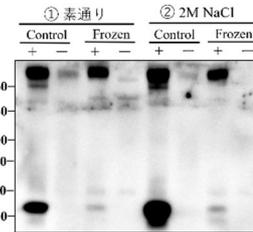
(a) RI



(b) CHL



(c) IGHL



抗アグリカン抗体を用いたウエスタンブロット解析

抗コンドロイチン硫酸抗体を用いたウエスタンブロット解析

(A)抗 C4S 抗体(B)抗 C6S 抗体

260 kDa 以上のバンド強度を ImageJ を用いて測定した。

Control との相対強度を算出し、グラフで示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 矢部 裕 (Yabe Yutaka) (00803016) | 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301) | |
| 研究分担者 | 土谷 昌広 (Tsuchiya Masahiro) (60372322) | 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|