

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34448

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590906

研究課題名(和文) 転写因子HIF-1を軸とした関節拘縮分子メカニズムの解明：新規分子治療剤開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms that the axis of the HIF-1 in the joint contracture: the development of new molecular therapeutic formulation

研究代表者

川畑 浩久 (KAWAHATA, Hirohisa)

森ノ宮医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：30454680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節拘縮の病態についての組織学的な報告は散見されるものの、分子レベルでの検討はほとんど行われていない。そこで関節不動化モデル動物をもちいて組織学的に検討したところ、関節可動域制限の進展に伴い、滑膜の線維化も進展していくこと、またこの際低酸素状態で発現が上昇するHIF1- の転写活性や線維化関連因子の発現が著しく上昇することが明らかとなった。さらにdecoy核酸医薬をもちいてHIF1- 活性を抑制したところ、線維化関連因子の発現、関節拘縮の進展が明らかに抑制された。以上のことからHIF1- を中心とした線維化関連因子の発現が、関節拘縮の病態進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although limited range of motion (ROM) by joint contracture occurred in joint immobilized treatment, its molecular mechanism is not fully clarified. In this study we investigated its histological and molecular mechanism. In a animal model ROM of an immobilized knee was decreased with time followed by capsule fibrosis. In addition, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) was activated and CTGF and VEGF was up-regulated in both mRNA and protein levels after immobilization. Of importance, intra-articular transfection of ribbon-type decoy oligonucleotides (ODN) for HIF-1 in the animal model resulted in attenuation of increased expressions of CTGF and VEGF followed by synovial thickening and restricted ROM. This study suggested the important role of HIF-1 in the pathogenesis of immobilization-induced joint contracture, and provides the possibility of the molecular treatment for joint contracture using practical methodology before the intervention of physical therapy.

研究分野：実験病理学

キーワード：関節拘縮 滑膜 線維化 HIF-1 デコイ核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

関節拘縮は、関節可動性再獲得までに長期間を要し、関節の潤滑な動きを再現することは極めて困難であり少なからず障害を残すため Activity of Daily life (ADL) の低下に大きく関与しており、社会的にも大きな課題である。にもかかわらず、関節拘縮病態についてはこれまでに病理学的検討がほとんどであり、詳細なメカニズムは未だ明らかとは言えず、病態発生・進展に関する分子メカニズムの検討はほとんど報告がない。関節拘縮に対しては理学療法のみ依存し、関節可動域改善のみを追い求めているのが現状であるが、メカニズムが明らかでないことは理学療法自体の妥当性・有用性の根拠を曖昧にしている。

## 2. 研究の目的

本研究は関節拘縮における関節構成体の病理学的変化を捉えることで、適切な理学療法治療指針を示すことを目的とし、関節不動化モデル動物について組織学的かつ分子生物学的手法をもちいて検討する。さらに本研究では関節拘縮に対する核酸医薬をもちいた新規治療法の開発を行うことを目的とし、関節局所の低酸素(Hypoxia)状態に着目し、Hypoxiaにより活性化される転写因子 HIF-1 を軸とした各種線維化関連因子の分子発現動態を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

### (1) 関節不動化モデル動物の開発

ICR マウス 10 週齢雄の後肢一侧の膝関節を完全屈曲位(屈曲 135°)とし、アルフェンスシーネおよびテーピングを用いて非観血的に固定を行い、関節拘縮を発生させ、固定 1、2、3 週後に関節可動域を測定した。

### (2) 関節拘縮における組織学的解析ならびに分子動態の解析

一定期間固定した後、膝関節内の関節構成体の病的変化を解析するため、ヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学的染色(CTGF、VEGF)を行い、光学顕微鏡下にて観察した。また滑膜における種々の分子動態を解析するために、Real time-PCR 法(CTGF、VEGF)、ELISA 法(HIF-1)を行った。

### (3) 関節不動化モデル動物に対するデコイ核酸医薬を用いた治療介入

関節不動化モデルラットの膝関節に対し、HIF-1 に対するデコイ核酸医薬をあらかじめ注入し、固定 1、2 週後に関節可動域の測定ならびに遺伝子発現の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 関節不動化モデル動物の開発

関節を固定し不動化することで、膝関節の伸展可動域は 1 週後より徐々に減少し、3 週後には顕著に制限されていた(図 1)。

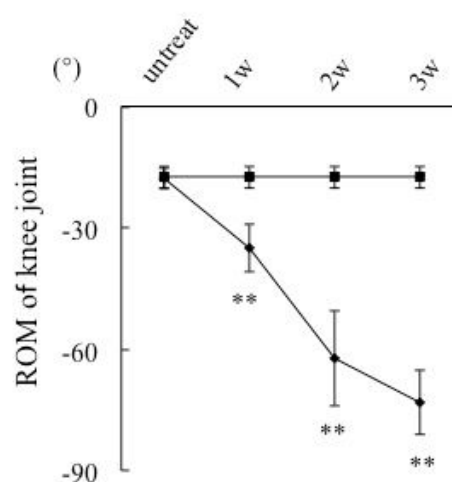


図 1

また可動域制限がどの組織によって生じているのかを確認するために筋を切除したところ、1 週固定後では可動域は改善したが、2 週固定後では改善がみられなかったことから

固定期間が長期化すると、拘縮の責任病巣は関節包・滑膜にあることが確認できた。

(2) 関節拘縮における組織学的解析ならびに分子動態の解析

HE 染色において、固定 1 週後より滑膜内皮は肥厚し、線維性滑膜において線維性組織の増生が認められ、また増生した線維性組織内には新生血管も認められた。さらに固定期間が延長されることにより、著しい滑膜の肥厚ならびに線維化の進展を認めた。(図 2)

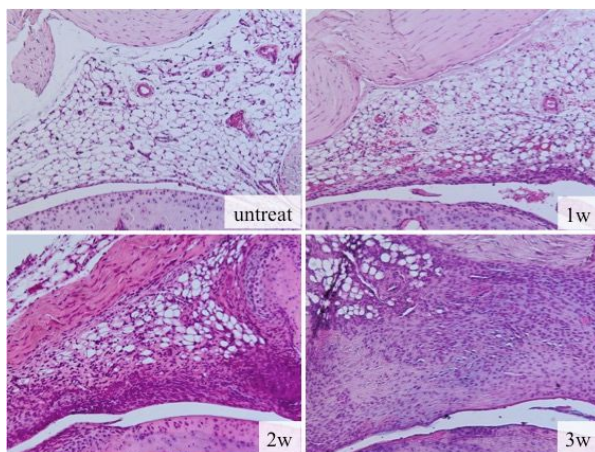


図 2

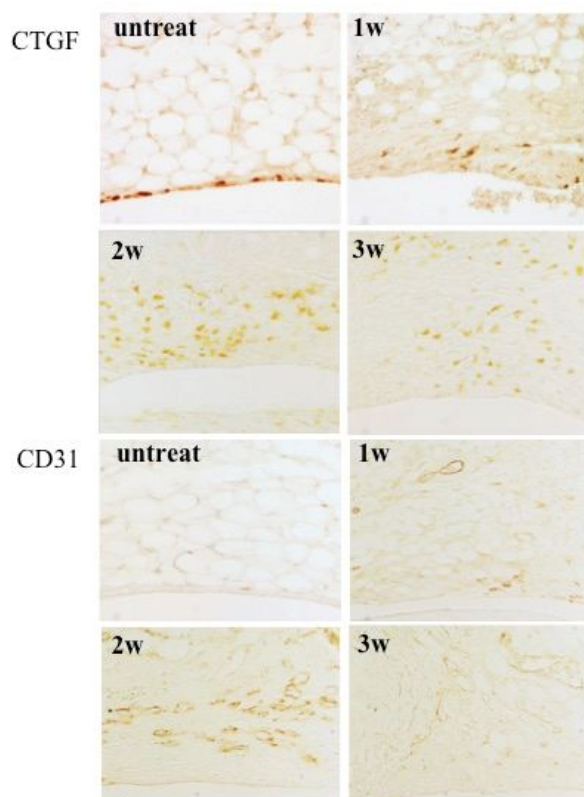


図 3

また線維化誘導因子である CTGF について免疫組織化学的染色で確認したところ、正常滑膜組織では滑膜内皮のみに発現していた。しかし固定 2 週後には肥厚している滑膜組織内の線維芽細胞様細胞に発現がみられ、滑膜の肥厚・線維化の進展に伴い、滑膜深層部へ広く分布していたことから、滑膜組織の線維化に CTGF が強く関与していることが示唆された(図 3)。あわせて血管内皮細胞のマーカーとされている CD31 についても検討したところ、正常滑膜ではほぼ発現がみられなかったが、滑膜の線維化に伴い増生した滑膜組織内に発現細胞が認められたことから、線維化を生じた滑膜内に新生血管が形成されていることが示唆された(図 3)。

またこのような組織学的変化に従い、CTGF や VEGF の遺伝子およびタンパクの発現は上昇していた。さらにこれらの遺伝子発現を誘導する HIF-1 の転写活性は、関節固定後早期に著しく上昇していた(図 4)。

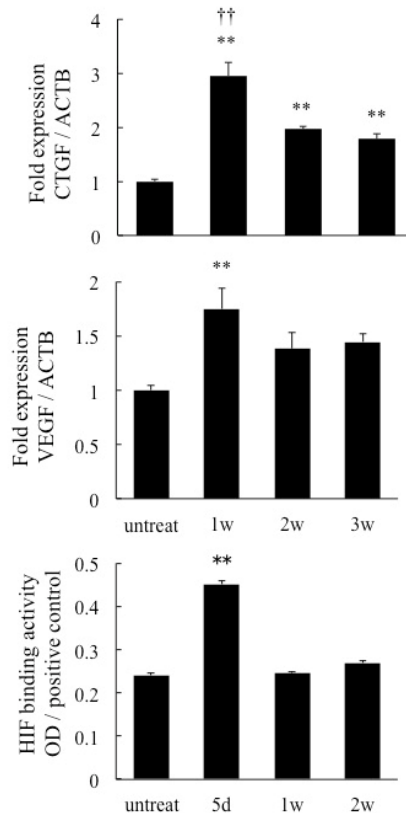


図 4

(3) 関節不動化モデル動物に対するデコイ核酸医薬を用いた治療介入

HIF-1 に対するデコイ核酸医薬をあらかじめ関節内に注入することにより、関節可動域制限は有意に抑制され、CTGF や VEGF の遺伝子発現も有意に抑制されていた(図 5、6)。

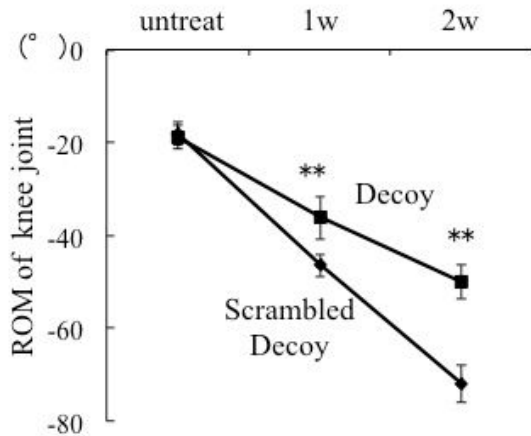


図 5

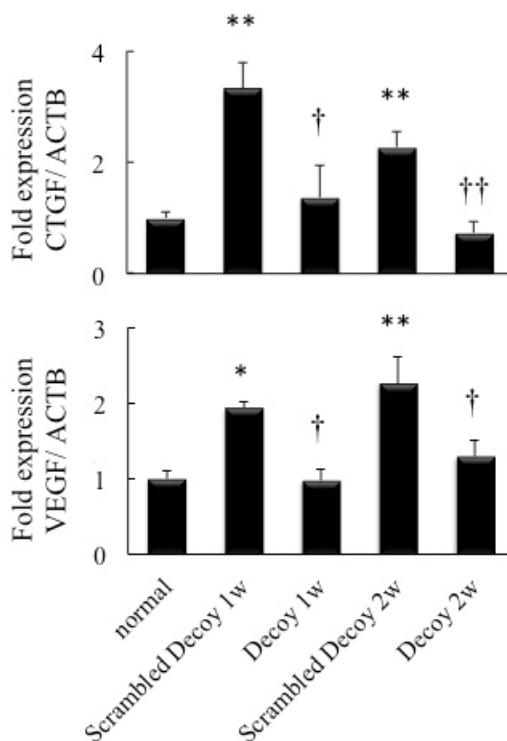


図 6

このことより HIF-1 を軸とした各種線維化関連因子の分子は関節拘縮の病態を進展させる key molecule であり、HIF-1 の活性抑制は関

節拘縮の新たな治療法として有効であることが示唆された。

### 5 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

外林大輔,川畑浩久,吉川徹,穴田夏希,細田明菜,根來信也,青木元邦: 関節拘縮における滑膜の分子生物学的変化と LIPUS による治療介入の検討. 兵庫学術誌 39 号. 87-94. 2013. 査読無.

外林大輔,川畑浩久,吉川徹,穴田夏希,根來信也: 関節拘縮における滑膜の分子生物学的変化の検討. 兵庫学術誌 38 号. 117-123. 2012. 査読無.

〔学会発表〕(計 4 件)

青木元邦. 関節拘縮の分子メカニズム解明と新規分子治療剤の開発. 第 14 回日本抗加齢医学会総会. 2014 年 6 月 6 日(2014 年 6 月 6 日-2014 年 6 月 8 日). 大阪市, 大阪国際会議場.

青木元邦, 川畑浩久, 森下竜一, 荻原俊男. 関節拘縮における関節内病変についての組織学的・分子生物学的検討. 第 55 回日本老年医学会. 2013 年 6 月 6 日 (2013 年 6 月 6 日-2013 年 6 月 8 日). 大阪市, 大阪国際会議場.

外林大輔,川畑浩久,根來信也,葉山直史,吉川徹. 関節拘縮における滑膜の分子生物学的変化と LIPUS による治療介入の検討. 2012 年 11 月 25 日 (2012 年 11 月 24 日-2012 年 11 月 25 日). 第 21 回日本柔道整復接骨医学会: 福岡 福岡国際会議場.

青木元邦,外林大輔,川畑浩久: 関節拘縮の進展メカニズムに関する検討. 第 12 回日本

抗加齢医学会総会. 2012年6月22日(2012年6月22日-2012年6月24日). 神奈川パシフィコ横浜.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川畑 浩久 (KAWAHATA Hirohisa)

森ノ宮医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：30454680

### (1) 研究分担者

青木 元邦 (AOKI Motokuni)

森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00346214