

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26750189
研究課題名(和文) 関節包の変化に由来する拘縮のメカニズムに関する分子基盤解明と振動刺激の効果検証

研究課題名(英文) The investigation of immobilization-induced arthrogenic contracture and effects of vibration

研究代表者
佐々部 陵 (SASABE, Ryo)
長崎大学・病院(医学系)・技術職員

研究者番号：50710985
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不動によって惹起される関節構成体由来の拘縮(以下、関節性拘縮)の病態解明およびその治療戦略の開発を目的に、ラット膝関節屈曲拘縮モデルを用いて検討を行なった。その結果、関節性拘縮の発生・進行には関節包の線維化が関与しており、その発生・進行の機序には、高いコラーゲン合成能を有する筋線維芽細胞の増加に伴うtype I collagenの過剰産生が関与することが明らかとなった。一方、不動の過程で振動刺激を負荷しても関節性拘縮の発生は抑制できない可能性が高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the time-dependent changes in the development of joint capsule fibrosis and in the number of myofibroblasts in the joint capsule after immobilization and effects of vibration on joint contracture, using a rat knee contracture model. This study revealed that joint capsule fibrosis with overexpression of type I collagen occurs and progresses within 1 week after immobilization, and an increase in myofibroblasts is related to the mechanism of joint capsule fibrosis. However, it was indicated that the immobilization-induced joint contracture might not be inhibited by vibration stimulator.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：不動 線維化 関節包 筋線維芽細胞 コラーゲン 振動刺激

1. 研究開始当初の背景

関節拘縮(以下、拘縮)とは、皮膚や骨格筋、靭帯、関節包といった関節周囲軟部組織の器質的变化によって生じた関節可動域制限であり、しばしば日常生活活動の阻害因子となることから、その病態や発生メカニズムを解明すること、ならびに効果的な治療法を開発することはリハビリテーション医療における喫緊の課題である。先行研究によれば、拘縮の責任病巣の中心は骨格筋と関節包にあるといわれている。近年、骨格筋由来の拘縮の発生メカニズムに関しては、その分子基盤の解明が進んでおり、具体的には不動によって生じる低酸素状態への暴露およびサイトカインや筋線維芽細胞などの線維化関連因子の増加によって筋膜におけるコラーゲンの増生、すなわち線維化が生じることが明らかとなっている。しかし、関節包由来の拘縮(以下、関節性拘縮)については、関節包に線維化が発生していることを裏付ける組織学的所見は示されているものの、それを支持する定量的データや拘縮の進行と線維化の発生状況との関連性を示したデータすら明らかになっておらず、関節包の線維化の分子基盤に関してはほぼ手つかずの状態であった。そこで、研究代表者はラット膝関節屈曲拘縮モデルを用いて不動によって生じる関節包の線維化について縦断的に検討してきた。その結果、拘縮の発生・進行と関節包におけるコラーゲンの増生ならびにその密生化が不動4週までは不動期間の延長にともない顕著になることが示唆された。しかし、関節包を構成する主要なコラーゲンアイソフォームである type I・III collagen や筋線維芽細胞などの分子基盤については明らかにできていないのが現状である。

一方、関節包の線維化を何らかの方法で抑制することができれば、拘縮の発生・増悪を抑制することができ、拘縮の治療開発につながるのではないかと考えられる。現時点において、研究代表者が注目しているのが振動刺激を用いた治療法である。先行研究では、ヒト真皮線維芽細胞を10日間培養する過程において、1日4時間100Hzの振動刺激を負荷すると、負荷しない場合と比べてコラーゲン合成量が低下するとして報告があり、振動刺激は線維化の発生抑制に有効に作用する可能性が示唆されている。すなわち、不動の過程で関節に対し振動刺激を負荷することで、関節包の線維化の発生・進行を抑制できるのではないかと推測できる。

2. 研究の目的

- (1) 不動によって惹起される関節包の線維化の分子基盤の解明
- (2) 不動の過程で負荷する振動刺激が関節性拘縮に与える影響についての検討

3. 研究の方法

(1)

実験動物には、12週齢のWistar系雄性ラット60匹を用い、これらを実験期間中に無作為に無処置の対照群30匹(各実験期間n=10)と不動群30匹(各実験期間n=10)に振り分けた。膝関節不動化についてはこれまで申請者が行ってきた方法で行った。すなわち、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与した後、麻酔下にてラットの両側股・膝関節を最大屈曲位、足関節を最大底屈位とした状態でギプス包帯を用いて不動化した。不動期間については、自験例の結果を基に不動による関節包の線維化が発生・進行する1,2,4週間とした。一方、無処置の対照群は不動群のラットと週齢を合わせるために13,14,16週齢まで通常飼育した。

各実験期間終了後、麻酔下にて両側の膝関節を摘出した。そして、硬組織に対する通方のパラフィン包埋の処理を行い、右側膝関節試料を免疫組織化学的分析に供した。具体的には、まず、この試料から薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、病理観察を行う。次に筋線維芽細胞のマーカーである抗- α -SMA抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、得られた染色像の後部関節包における血管内皮細胞を除く全細胞数および陽性細胞数を計数し、 α -SMA陽性細胞(筋線維芽細胞)の出現率を算出し、これを指標として検討した。

また、得られた左側試料については分子生物学的検索に供した。具体的には、硬組織に対する通方のパラフィン包埋の処理を行った後に薄切切片を作製し、この切片を用いて type I・III collagen mRNA に対する in situ hybridization を実施した。そして、得られた染色像から各コラーゲン mRNA 陽性細胞を同定し、血管内皮細胞を除く全細胞数に対する陽性細胞の割合を算出した。

(2)

実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット6匹を実験に供した。ラットは無作為に不動群、不動の過程において振動刺激を負荷する振動刺激群に振り分けた。不動の方法は前項で記載した通りであり、実験期間については4週間とした。次に、振動刺激群のラットに対しては以下のように振動刺激を負荷した。すなわち、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与した後、麻酔下にてギプス包帯を除去し、市販のバイブレーター(メディアクラフト社製、周波数50Hz)を用いて両側の膝窩に対してそれぞれ1日1回20分、週5回の頻度で振動刺激負荷を実施した。なお、振動刺激を負荷する際には、膝関節を過剰に伸展することで伸張刺激が負荷されないように注意を払った。拘縮の発生・進行状況を確認する指標として、膝関節伸展可動域(ROM)を測定した。具体的には、麻酔下にてラットを側臥位とし、

0.3N の張力で膝関節を他動的に伸展させた際の伸展角度を測定した。

統計処理として群間の比較には対応のない t 検定を群内の不動期間毎の比較には一元配置分散分析を適用し、その事後検定として scheffe 法を採用した。なお、すべての統計手法とも有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

実験 1 の結果として、各不動期間における不動群の α -SMA 陽性細胞の出現率は対照群に比べ有意に高値を示し、不動群内で比較すると不動期間依存的に有意に高値を示した。

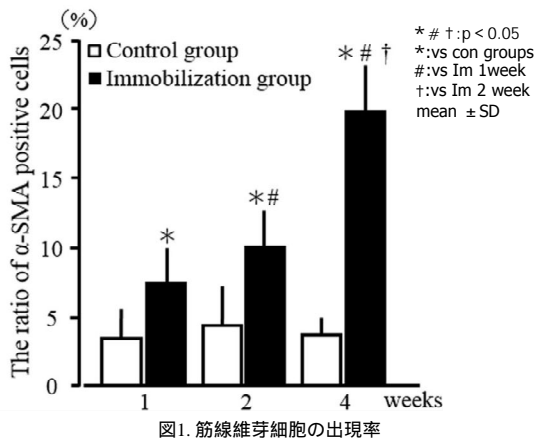


図1. 筋線維芽細胞の出現率

この結果から不動状態に曝された関節の関節包においては筋線維芽細胞が増加し、不動期間の延長に伴いその変化が顕著になることが示唆された。

次に、type I・III collagen mRNA に対する in situ hybridization を実施した結果、各不動期間において不動群の type I collagen mRNA 陽性細胞の割合は対照群に比べ有意に高値を示し、不動群内で比較すると不動期間に準拠して有意に高値を示していた。

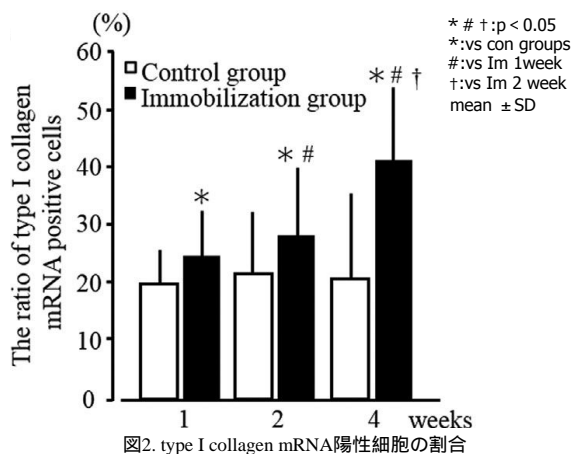


図2. type I collagen mRNA陽性細胞の割合

一方、type III collagen mRNA については各不動群において不動群と対照群の間に有意差を認めなかった。

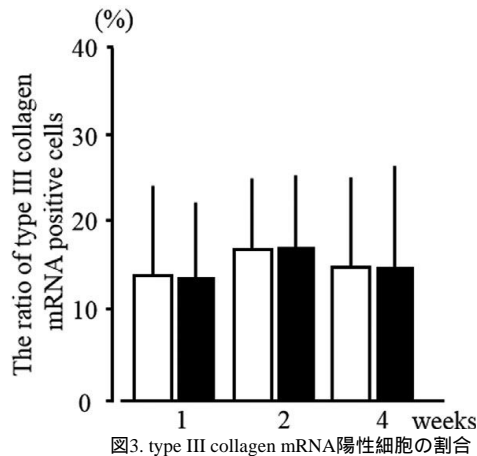


図3. type III collagen mRNA陽性細胞の割合

以上の結果から、不動状態に曝された関節包では type I collagen 産生能を有する細胞が不動 1 週より増加し、その変化は不動期間依存的に顕著になり、type III collagen 産生能を有する細胞は増加しないことが示唆された。免疫組織学的染色および先行研究の結果と照合すると、増加した type I collagen 陽性細胞は線維芽細胞から分化誘導された筋線維芽細胞である可能性が高いことが推察できる。そして、今回の成果とこれまでの自験例の結果を照合すると、筋線維芽細胞による type I collagen の過剰増生が不動状態に曝された関節包における線維化の発生メカニズムの一端であると推察される。

次に実験 2 の結果として、各不動期間において振動刺激群と不動群の ROM に有意な差は見られなかった。

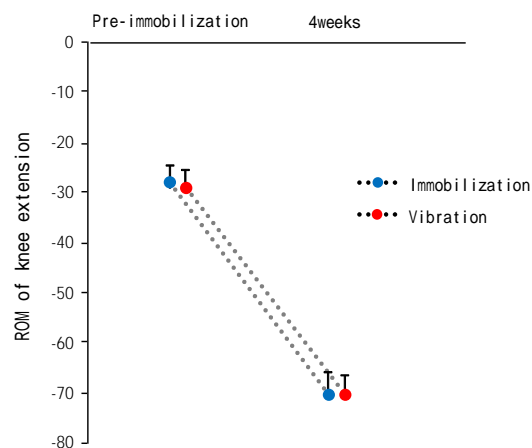


図4. ROMの推移

今回の結果から、不動の過程で振動刺激を负荷したとしても拘縮の発生・進行を抑制することは困難であることが示唆された。この点については体表からでは深部組織である関節包へ十分な振動刺激负荷が与えられなかったことが推察される。

不動によって惹起される関節性拘縮と関節包の線維化の発生・進行を縦断的かつ平行して捉えた報告はこれまでに見当たらず、加えて線維化発生時の関節包における type 別のコラーゲンの動態を詳細に捉えた報告も

見当たらない。つまり、不動によって惹起される関節包の線維化の分子基盤を縦断的および詳細に捉えて報告したことになり、拘縮の病態を解明していくにあたり本研究の成果のインパクトは大きいと考えている。

今後の展望として、不動によって惹起される関節包の線維化には筋線維芽細胞が関与するといったメカニズムの一端は明らかにできたが、その他の線維化関連因子については検討できていない。そのため、今後はこの点について検討していくことが必要であると考えている。また、拘縮の治療戦略として振動刺激に代わる治療ツールを検討し、その効果の検証を行っていくことも重要であると考えている。

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 2 件)

Ryo Sasabe, Junya Sakamoto, Kyo Goto, Yuichiro Honda, Hideki Kataoka, Jiro Nakano, Tomoki Origuchi, Daisuke Endo, Takehiko Koji, Minoru Okita, Effects of joint immobilization on changes in myofibroblasts and collagen in the rat knee contracture model. Journal of Orthopaedic Research, 査読有, in press, 2017
Goto Kyo, Sakamoto Junya, Nakano Jiro, Kataoka Hideki, Honda Yuichiro, Sasabe Ryo, Origuchi Tomoki, Okita Minoru, Development and progression of immobilization-induced skin fibrosis through overexpression of transforming growth factor and hypoxic conditions in a rat knee joint contracture model. Connective Tissue Research, 査読有, in press, 2017.

[学会発表](計 3 件)

佐々部陵, 坂本淳哉, 後藤響, 本田祐一郎, 片岡英樹, 中野治郎, 折口智樹, 遠藤大輔, 小路武彦, 沖田実, 不動によって惹起される関節性拘縮の病態に関する縦断的研究, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 28 日~30 日, 長崎大学医学部(長崎県長崎市)
佐々部陵, 後藤響, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田実, 不動によって惹起される関節包の線維化の病態解明に関する実験的研究, 第 51 回日本理学療法学会大会, 2016 年 5 月 27 日~29 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
佐々部陵, 坂本淳哉, 後藤響, 本田祐一郎, 沖田実, 不動によるラット膝関節の関節包におけるタイプ I・III コラーゲンの動態変化に関する検討, 第 47 回日

本結合組織学会, 2015 年 5 月 15 日~16 日, コクヨホール(東京都品川区)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々部 陵 (SASABE, Ryo)

長崎大学・病院(医学系)・技術職員

研究者番号: 50710985

(3) 連携研究者

沖田 実 (OKITA, Minoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

教授

研究者番号: 50244091

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

准教授

研究者番号: 20380834

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Junya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

准教授

研究者番号: 20584080

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