

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03045

研究課題名(和文) 拘縮の標的分子解明と新たな理学療法の治療戦略の開発に関する実験研究

研究課題名(英文) Experimental study on elucidation of target molecule of joint contracture and development of therapeutic strategy for new physical therapy

研究代表者

沖田 実 (OKITA, Minoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授

研究者番号：50244091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、拘縮の実験動物モデルを用い、関節包と靭帯の変化に由来した拘縮の発生メカニズムに関わる分子機構を検討した。結果、拘縮の主病態である関節包の線維化はtype Iコラーゲンの増生に起因した変化で、その産生細胞は筋線維芽細胞であることが示唆された。一方、靭帯には線維化の発生は認めず、逆にコラーゲン産生が低下することから拘縮の責任病巣としては寄与していないことが明らかとなった。加えて、拘縮の進行過程で骨格筋に周期的な筋収縮を誘発し、筋ポンプ作用の促進を図る介入実験を行った。結果、拘縮の標的分子に想定されているHIF-1の発現が抑制され、線維化の発生も予防できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used an experimental animal model of joint contracture to investigate the molecular mechanisms of the contracture derived from changes in joint capsule and ligament. As a result, the fibrosis of the joint capsule, which is the main pathology of contracture, is a change caused by the increase of type I collagen, suggesting that the producing cell is myofibroblast. On the other hand, in the ligament, fibrosis was not observed, and collagen production was decreased. Therefore, we guessed that the ligament did not contribute to the responsible lesion of contracture. In addition, intervention experiments were conducted to induce cyclic muscle contraction in the skeletal muscle during the progress of contracture and to promote muscle pumping action. As a result, expression of HIF-1 assumed to be a target molecule of contracture was suppressed, and it became clear that occurrence of fibrosis can also be prevented.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：拘縮 関節包 靭帯 線維化 標的分子 HIF-1 理学療法 治療戦略

1. 研究開始当初の背景

高齢者人口は今後も加速的に増加すると予想されており、2035年には総人口の33.4%に達すると推計されている。このことは、わが国が健康長寿国として発展していることを表す一方で、障害を抱えながらも長寿を全うする高齢者が急増する現実的課題も示唆しており、理学療法的見地から捉えると如何にして障害高齢者のQOLを亡くなる最後の時まで維持させることができるかが重要な鍵になると思われる。QOLの低下をもたらす原因は疾病の進展のみならず、その後起こる二次障害の影響も大きく、特に関節拘縮(以下、拘縮)を伴った四肢の変形した無残な姿は本人のみならず家族も含めた他者に対してもQOLへの影響は大きく、しかも介護を中心とした日常ケアの実践すら困難なものとする。このことは、理学療法士をはじめとした医療・福祉専門職の殆どが周知の事実として認識していることであるが、現実には障害高齢者の殆どに拘縮が発生しており、しかも最近の先行研究では重篤な拘縮を有した障害高齢者が増加していることが明らかになっている。つまり、臨床においては未だ拘縮の治療に難渋しているといえ、このことは現状の理学療法的治療戦略の限界を示している。そのため、拘縮の新たな治療戦略の開発は不可欠であり、その意味で発生メカニズムの分子機構ならびに標的分子を解明することは極めて重要である。

2. 研究の目的

拘縮の責任病巣の中心は骨格筋と関節包であり、骨格筋に関してはこれまでの自験例の検索によって主病態である線維化の発生メカニズムに関わる分子機構の詳細が明らかになっている。一方、関節包についても自験例の検索によって線維化の発生・進行といった病態解明は進展したものの、その分子機構も含めた発生メカニズムの詳細は未だ不明である。加えて、関節構成体の構成軟部組織である靭帯に関しては拘縮発生時の病態すら明らかではなく、拘縮の責任病巣の一部として寄与しているか否かを検証する必要がある。そこで、本研究では関節包ならびに靭帯の変化に由来した拘縮の発生メカニズムの分子機構を明らかにすることを第一の目的とする。加えて、自験例の骨格筋の検索結果から、拘縮の主病態である線維化の発生メカニズムに関わる標的分子として低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor-1 α ; HIF-1 α)が想定されている。つまり、関節周囲軟部組織の低酸素状態を緩和し、HIF-1 α の発現を抑制できれば、拘縮の発生予防につながる可能性がある。そこで、骨格筋の低酸素状態の緩和が期待できる周期的な筋収縮の誘発による筋ポンプ作用の促進を図る理学療法的治療戦略を開発し、その介入効果を検証することを本研究の第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 関節包の変化に由来した拘縮の発生メカニズムの検討

実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット60匹を用い、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1・2・4週間ギプスで不動化する不動群(n=30)と週齢を合致させた無処置の対照群(n=30)を設定した。なお、本研究のすべての動物実験は長崎大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた後(承認番号; 1404161137)、本学が定める動物実験指針に準じ、先導生命科学研究支援センター・動物実験施設で実施した。

各不動期間終了後は三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって各ラットを麻酔し、両側の膝関節を採取した。そして、Morse液脱灰処理を行った膝関節組織のパラフィン包埋標本を作製し、type I・IIIコラーゲンmRNA陽性細胞をIn situ hybridization (ISH)法にて検索した。また、 α -smooth muscle actin (α -SMA)に対する免疫組織化学染色を実施し、コラーゲン合成能が高い筋線維芽細胞の動態を検索した。

(2) 靭帯の変化に由来した拘縮の発生メカニズムの検討

実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット31匹を用い、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2・4週間ギプスで不動化する不動群(n=18)と週齢を合致させた無処置の対照群(n=13)を設定した。各不動期間終了後は三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって各ラットを麻酔し、両側の前十字靭帯を採取した。そして、左側試料はreal time reverse transcription polymerase chain reaction (以下、real time RT-PCR)法に供し、type I・IIIコラーゲンmRNA発現量を検索した。一方、右側試料は加水分解処理を行った後に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定量を行い、コラーゲンタンパク量の検索を行った。

(3) 筋ポンプ作用の促進を図る理学療法的治療戦略の介入効果の検討

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット29匹を用い、無処置の対照群(n=10)、両側足関節を最大底屈位とした状態で4週間ギプスで不動化する不動群(n=8)、不動の過程で1Hzの刺激周波数による60分間の電気刺激(週5日)によってヒラメ筋に周期的な筋収縮を誘発し、筋ポンプ作用の促進を図る電気刺激群(n=11)を設定した。そして、4週間の実験期間終了後は両側のヒラメ筋を採取し、HIF-1 α 、transforming growth factor- β (TGF- β)、 α -SMA、type I・IIIコラーゲンといった線維化関連分子の動態をreal time RT-PCR法で検索した。

4. 研究成果

(1) 関節包の変化に由来した拘縮の発生メカニズムの検討

関節包における type I コラーゲン mRNA 陽性細胞数は各不動期間とも不動群は対照群より有意に高値を示し、不動期間依存的な増加が認められた (図 1). しかし、type III コラーゲン mRNA 陽性細胞数は各不動期間とも不動群と対照群の間に有意差は認められなかった (図 2). 加えて、関節包における筋線維芽細胞数は各不動期間とも不動群は対照群より有意に高値を示し、不動期間依存的な増加が認められた (図 3).

以上の結果から、関節性拘縮の主病態である関節包の線維化は type I コラーゲンの増生に起因しており、その産生細胞は筋線維芽細胞である可能性が示唆された.

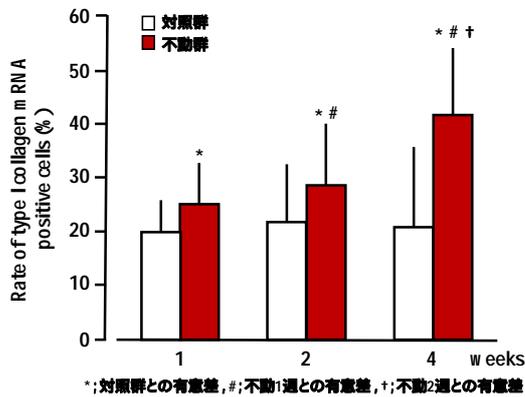


図1 type I コラーゲン mRNA 陽性細胞の変化

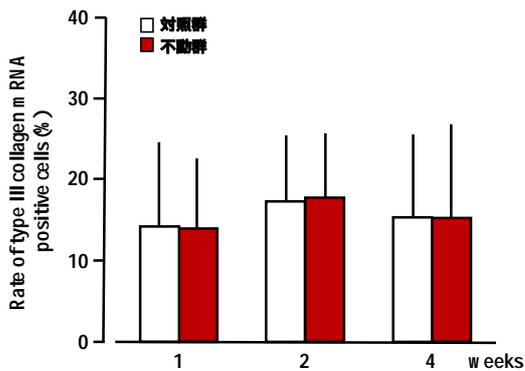


図2 type III コラーゲン mRNA 陽性細胞の変化

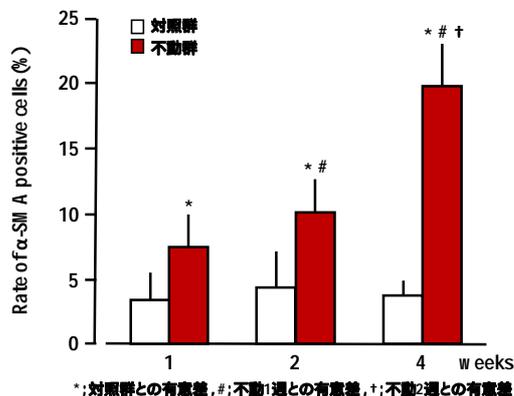


図3 筋線維芽細胞の変化

(2) 靭帯の変化に由来した拘縮の発生メカニズムの検討

前十字靭帯における type I・III コラーゲン mRNA 発現量は不動 2・4 週後とも不動群は対照群より有意に低値を示した (図 4, 5). 一方、コラーゲンタンパク量は不動 4 週後のみ不動群が対照群より有意に低値を示した (図 6).

以上の結果から、前十字靭帯を構成するコラーゲンは遺伝子レベルでは不動 2 週後から、タンパクレベルでは不動 4 週後からその発現量が低下することが明らかとなり、このことは不動によって靭帯は脆弱化する可能性があることを示唆している. つまり、前十字靭帯はラット膝関節屈曲拘縮の責任病巣としてさほど重要な影響をおよぼしていないと推察される.

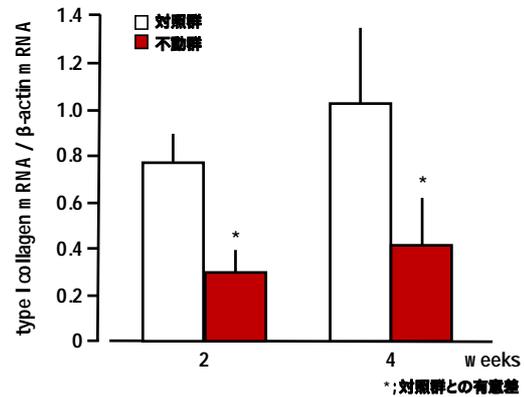


図4 type I コラーゲン mRNA 発現量の変化

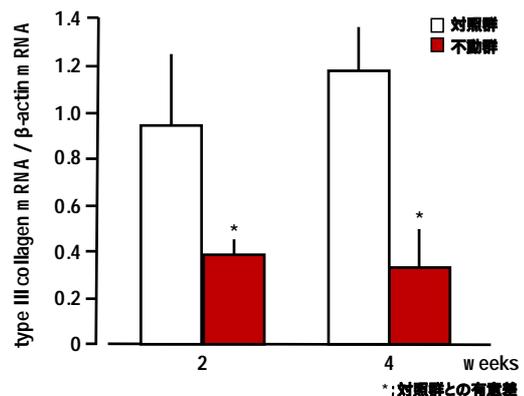


図5 type III コラーゲン mRNA 発現量の変化

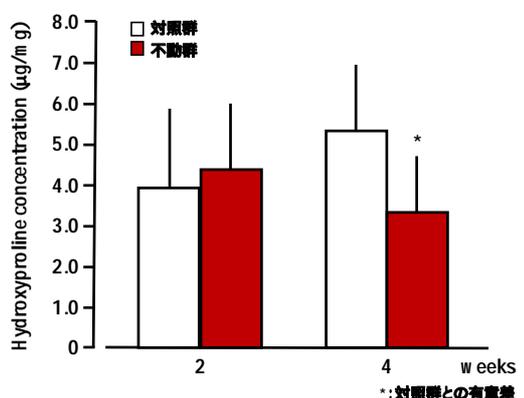


図6 コラーゲンタンパク量の変化

(3) 筋ポンプ作用の促進を図る理学療法的治療戦略の介入効果の検討

まず、今回の介入によって HIF-1 α の発現が抑制できるかを検証した。その結果、HIF-1 α mRNA 発現量は不動群が対照群より有意に高値を示し、電気刺激群は不動群より有意に低値を示した。また、電気刺激群と対照群との間にも有意差は認められなかった(図7)。つまり、不動の過程で周期的な筋収縮を誘発し、筋ポンプ作用の促進を図ることで、不動によって惹起される骨格筋の低酸素状態が緩和され、HIF-1 α の発現が抑制されることが明らかとなった。

次に、TGF- β や α -SMA, type I・III コラーゲンといった線維化関連分子の mRNA 発現量についても検討した。その結果、いずれの分子とも不動群は対照群より有意に高値を示したが、電気刺激群は不動群より有意に低値を示し、TGF- β と type III コラーゲンの mRNA 発現量に関しては、対照群との有意差も認められなかった(図8~11)。

以上の結果から、拘縮の主病態である線維化の発生メカニズムに関わる標的分子の一つは HIF-1 α であることは間違いないといえよう。そして、周期的な筋収縮の誘発による筋ポンプ作用の促進といった理学療法的治療戦略は、骨格筋における HIF-1 α の発現抑制ならびに線維化の発生予防に効果があることから、拘縮の新たな治療戦略の一つに位置付けることができると思われる。

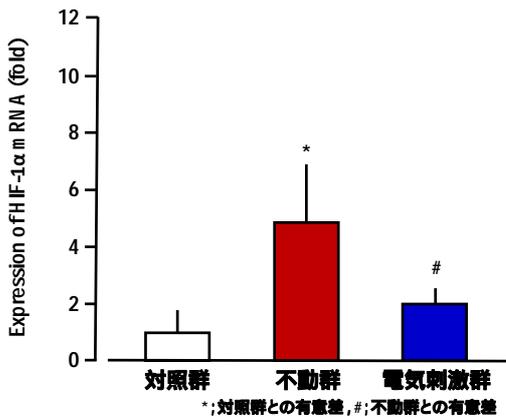


図7 HIF-1 α mRNA発現量の変化

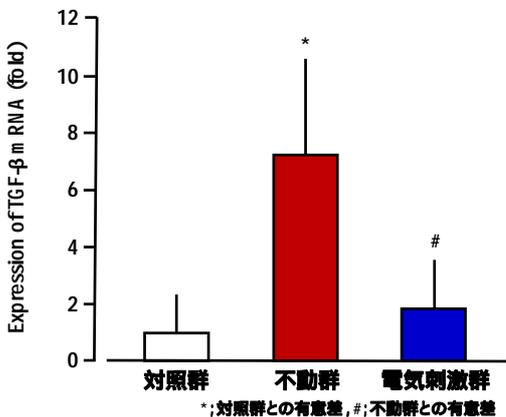


図8 TGF- β mRNA発現量の変化

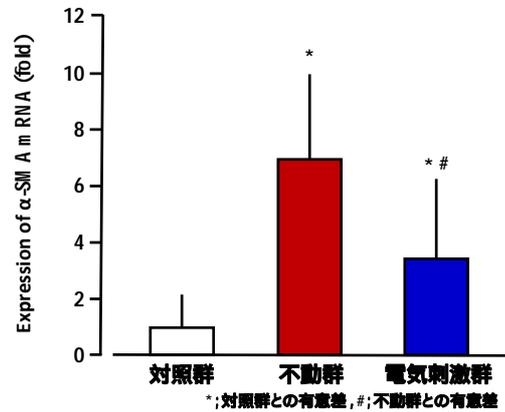


図9 α -SMA mRNA発現量の変化

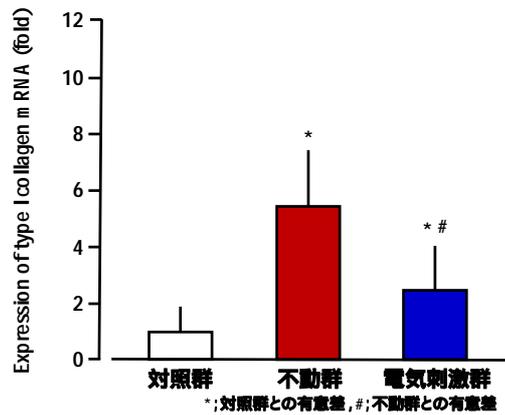


図10 type I コラーゲン mRNA 発現量の変化

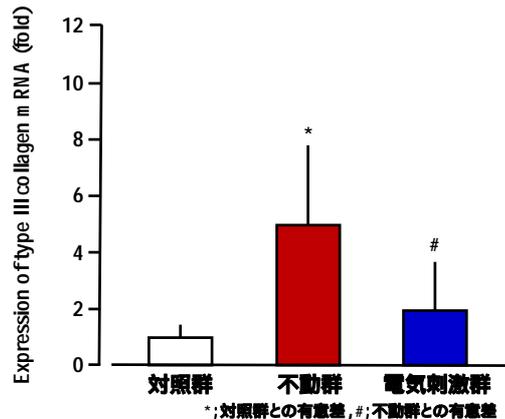


図11 type III コラーゲン mRNA 発現量の変化

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* 57(4): 672-678, 2018.
DOI: 10.1002/mus.26011. 査読有.
 - 2) 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* 35(9): 1998-2006, 2017.
DOI: 10.1002/jor.23498. 査読有.
 - 3) 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- β 1 and hypoxic conditions in a rat knee joint contracture model. *Connect Tissue Res* 58(6): 586-596, 2017.
DOI: 10.1080/03008207.2017.1284823. 査読有.
 - 4) 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* 58(5): 487-495, 2017.
DOI: 10.1080/03008207.2016.1257004. 査読有.
 - 5) Honda Y, Sakamoto J, Nakano J, Kataoka H, Sasabe R, Goto K, Tanaka M, Origuchi T, Yoshimura T, Okita M: Upregulation of interleukin-1 β /transforming growth factor- β 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. *Muscle Nerve* 52(3): 419-427, 2015.
DOI: 10.1002/mus.24558. 査読有.
 - 6) 沖田 実: 基礎理学療法領域におけるコア・パラダイム. *理学療法学* 42(8): 697-698, 2015.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/rigaku/42/8/42_42-8_042/_pdf. 査読無.
- [学会発表](計15件)
- 1) 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.
 - 2) 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回日本理学療法学会大会, 2017.
 - 3) 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: 不動化したラットヒラメ筋における筋核数の変化がマクロファージの動態におよぼす影響. 第52回日本理学療法学会大会, 2017.
 - 4) 沖田 実: 関節拘縮に対する治療戦略—終末期までの対応. 第4回全国介護・終末期リハ・ケア研究会研究大会(招待講演), 2016.
 - 5) 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.
 - 6) 田中なつみ, 吉田菜津希, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 関節不動がラット前十字靭帯のコラーゲンアイソフォームの発現量におよぼす影響. 第51回日本理学療法学会大会, 2016.
 - 7) 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.
 - 8) 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回日本理学療法学会大会, 2016.
 - 9) 沖田 実: 拘縮のメカニズム. 第17回日本褥瘡学会(招待講演), 2015.
 - 10) 沖田 実: 基礎理学療法領域におけるコア・パラダイム. 第50回日本理学療法学会大会(招待講演), 2015.
 - 11) 田中美帆, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動期間に伴うラットヒラメ筋の伸張性の変化に関する縦断的検索. 第50回日本理学療法学会大会, 2015.
 - 12) 後藤 響, 坂本淳哉, 佐々部陵, 本田祐一郎, 近藤康隆, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田 実: 不動によって惹起される皮膚性拘縮における繊維化の発生メカニズムに関する検討. 第50回日本理学療法学会大会, 2015.
 - 13) 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: 不動に伴う骨格筋の伸張性の変化と線維化関連分子の動態変化の関連性. 第47回日本結合組織学会学術大会, 2015.
 - 14) 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・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学術大会, 2015.

- 15) 後藤 響, 坂本淳哉, 佐々部陵, 本田祐一郎, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田 実: 不動に伴う皮膚の繊維化の発生メカニズムに関する検討. 第 47 回日本結合組織学会学術大会, 2015.

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 沖田 実: 関節可動域 - 基礎科学, 原理. 図解運動療法ガイド (内山 靖, 奈良 勲(編), 文光堂, 2017(総ページ数 1318), pp56-62.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室
(http://www2.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・医歯薬学総合研究科 (保健学
科)・教授
研究者番号 : 50244091

(2) 研究分担者

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (保健学
科)・准教授
研究者番号 : 20380834

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Jyunya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (保健学
科)・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

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