

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700458

研究課題名 (和文)

骨格筋線維化形成メカニズムの解明とその予防

研究課題名 (英文)

Understanding and prevention of the fibrotic process in denervated rat skeletal muscle

研究代表者

小澤 淳也 (OZAWA JUNYA)

広島国際大学・保健医療学部・理学療法学科・講師

研究者番号：00435059

研究成果の概要 (和文) : 脱神経されたラットヒラメ筋の筋周膜や筋内膜で type I、III collagen の時間依存的増加が免疫組織化学により示された。COL1 α 1 mRNA 発現は変化がなかったが、COL3 α 1 mRNA は脱神経後 3 日に減少したが、その後は回復した。TGF- β 1 mRNA およびタンパクの発現は、脱神経後時間依存的に増加傾向を示し、ともに脱神経後 14 日で有意に増加を示した。脱神経に伴う骨格筋線維化は TGF- β 1 の増加と同期して生じた。

研究成果の概要 (英文) : In the soleus muscle, type I and III collagen deposition increased at intramuscular spaces following 7 and 14 days of denervation. Realtime PCR analysis revealed that type I collagen (COL1A1) mRNA expression did not change, and type III collagen (COL3A1) transiently decreased at 3 days after denervation. TGF- β 1 mRNA and protein expressions, on the other hand, elevated in a time-dependent manner, both TGF- β 1 mRNA and protein levels significantly increased at 14 days of denervation. Type I and III collagen were increased with TGF- β 1 synchronously in denervated muscles in the early stage of fibrotic process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

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：線維化、TGF- β 1、脱神経、骨格筋、collagen

1. 研究開始当初の背景

長期間にわたる関節不動や脱神経により、

骨格筋では筋線維萎縮が起こるほか、細胞外基質が増加して線維化が生じる。骨格筋の線

維化は関節の柔軟性を制限し、日常生活活動の阻害因子となり得るため、予防や治療的対策が必要である。

2. 研究の目的

脱神経骨格筋の線維化の原因として、線維芽細胞の増殖や細胞外基質を構成するコラーゲンタンパク合成を刺激することが知られている成長因子 transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1)が関与すると申請者は考えた。本研究では、脱神経筋における TGF- β 1 mRNA およびタンパクの発現量と、細胞外基質の形態学的変化を経時的に調べることで、骨格筋の線維化を制御する因子の解明と、線維化形成に対する予防的介入の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

8週齢雄性 Wistar rat の一側坐骨神経を切除し、3, 7, 14 日間自由に飼育した。無処置の同週齢の動物を対照群とした。深麻酔による安楽死後、ヒラメ筋を採取し、凍結切片を作成して HE 染色、抗 type I および type III collagen 抗体を用いた免疫組織化学を行なった。また、ヒラメ筋から抽出した total RNA を逆転写酵素反応させて cDNA を作成し、I 型コラーゲン α 1 鎖遺伝子 COL1A1、III 型コラーゲン α 1 鎖遺伝子 COL3A1、TGF- β 1 mRNA 発現量を Taqman 法にて測定した。内在性コントロールには S18 mRNA を用いた。さらに、筋組織の一部は緩衝液とともに破砕し、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を行なって TGF- β 1 の発現量を測定した。統計処理は Kruskal-Wallis 検定を行い、有意差が認められた場合は Turkey 検定で多重比較を行なった。

4. 研究成果

1) 筋湿重量

ヒラメ筋の筋湿重量比率 (脱神経側/非手術

側)は、脱神経後 3, 7, 14 日でそれぞれ 88%、62%、38%と時間依存的に減少した。

2) type I および III collagen の免疫組織化学

免疫組織化学による形態学的変化について、脱神経後 3 日では正常筋線維とほぼ同様であったが、脱神経後 7 日より明らかな筋萎縮とともに神経や血管周囲、筋内膜や筋周膜で Type I、III collagen の肥厚が観察され、脱神経後 14 日でその傾向は顕著となった (図 1a, b)。

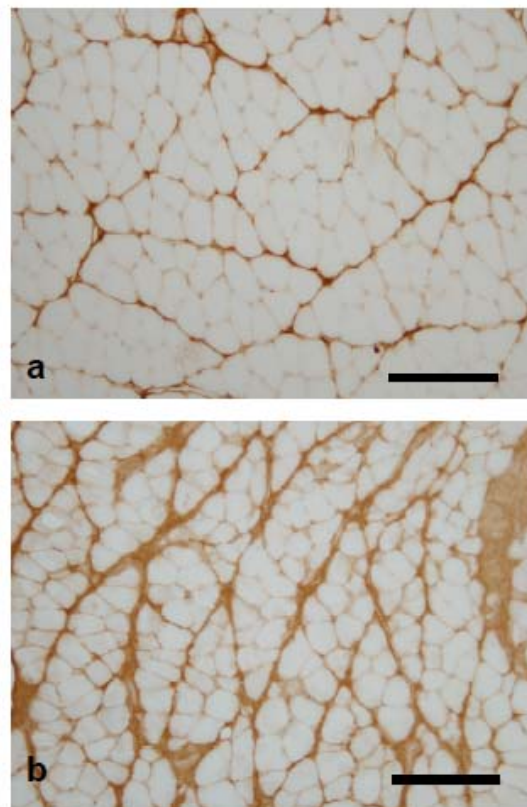


図 1: 正常および脱神経 14 日後のラットヒラメ筋 Type III collagen 免疫組織化学顕微鏡像。対照側 (a) に対し、脱神経 14 日後のヒラメ筋 (b) の筋内膜や筋周膜で Type III collagen が増加している。Scale bar=200 μ m.

3) COL1A1 および COL3A1 mRNA の発現

対照群に対する脱神経 3, 7, 14 日後のヒラメ筋の COL1A1 mRNA /S18 mRNA はそれぞれ 38%、44%、60%であった (有意差無し)。COL3A1/S18 mRNA は脱神経後 3 日に一過性に減少し (25%、 $P<0.05$)、7, 14 日にはそれぞれ 60%および 74%に回復した (図 2)。

COL1A1 mRNA に対する COL3A1 mRNA の割合は、対照群に対し、脱神経後 3 日で 56% に減少後、7 日、14 日はそれぞれ 155% および 182% に増加した。

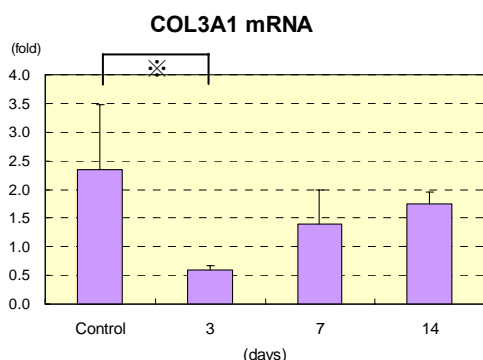


図 2. 脱神経ヒラメ筋における COL1A1 mRNA に対する COL3A1 mRNA の変化. $*P < 0.05$ versus control group.

3) TGF- β 1 mRNA およびタンパクの発現

脱神経ヒラメ筋の S18 mRNA に対する TGF- β 1 mRNA について、脱神経後 3、7、14 日でそれぞれ 1.5 倍、2.4 倍、3.4 倍 ($P < 0.05$) と増加した (図 3)。TGF- β 1 タンパク量も mRNA と同様、脱神経後に時間依存的に増加し、脱神経後 3、7、14 日でそれぞれ 1.09 倍、1.27 倍、1.6 倍 ($P < 0.05$) と増加した (図 4)。

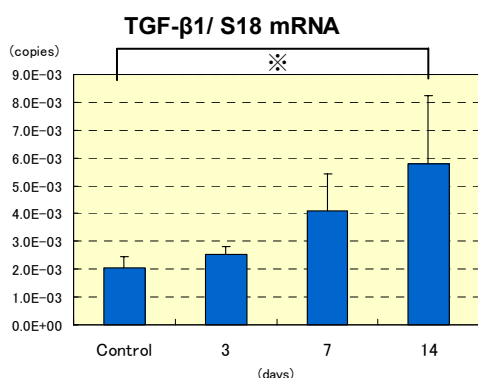


図 3. 脱神経ヒラメ筋における TGF- β 1 mRNA 発現量の変化. $*P < 0.05$ versus control group.

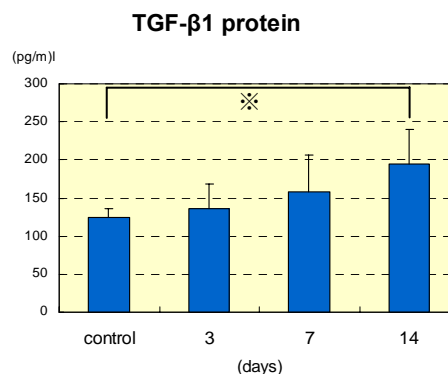


図 4. 脱神経ヒラメ筋における TGF- β 1 タンパク発現量の変化. $*P < 0.05$ versus control group.

【考察・まとめ】

脱神経骨格筋における TGF- β 1 の発現は mRNA、タンパクレベルともに時間依存的に増加し、その変化は組織学的な線維化過程とおよそ一致した。TGF β 1 が脱神経骨格筋で増加した理由として、TGF- β 1 mRNA 発現が時間依存的に増加する傾向がみられたことに加え、脱神経後では筋線維タンパクの分解が急速であったため、TGF- β 1 タンパク濃度が相対的に増加した可能性がある。TGF- β 1 は線維芽細胞の増殖や活性を刺激すること、筋損傷後の癒痕形成における線維化が抗 TGF- β 1 物質の投与により抑制されること、筋原性細胞を線維性細胞に分化させるなど、結合組織の合成に促進的な役割を果たす。したがって、脱神経骨格筋における結合組織の増加においても TGF- β 1 が密接に関与していることが予測される。今回、免疫組織化学により細胞外基質の主成分である type I および type III collagen が脱神経後のヒラメ筋で増加した一方で、COL1A1 および COL2A1 mRNA は増加せず、逆に COL3A1 mRNA は一過性に減少した。脱神経後の線維化にはコラーゲン合成の増加より分解の減少に起因するであろう。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

小澤 淳也 (OZAWA JUNYA)

研究者番号: 00435059

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: