

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591658

研究課題名（和文）

腱移行術後における骨格筋収縮力低下の病態解明

研究課題名（英文）

Pathological analysis for loss of muscle contraction after tendon transfer surgery

研究代表者

高橋 光彦（TAKAHASHI MITSUHIKO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：10372715

研究成果の概要（和文）：筋肉が過度に引っ張られた状態での腱移行手術は筋線維中のサルコメア数が増加していた。しかしながらそれに伴う筋収縮の生理的可動域はむしろ減少していた。また筋肉の生理学的筋横断面積が変わらないにも関わらず筋肉活動性収縮力が減少していた。筋間の線維組織が増加しており、このことが生理的可動域や活動張力の減少に関わっていると思われた。高齢個体では、若年個体と比較して筋内腱成分の伸長に対して硬く、その分伸張するためには筋線維長の伸張（サルコメア数増加）が必要なことが分かった。

研究成果の概要（英文）：It is revealed that the tendon transfer surgery in which muscle is stretched leads to an increase in sarcomere number but decrease in physiologic range of the muscle contraction. The active tension of the muscle contraction decreased despite no change in physiologic cross sectional area. It is also revealed that intramuscular connective tissue volume increased, which was thought to be related with the decrease in both physiologic range and in active tension. Intramuscular tendinous tissue had lower extensibility in aged group than that in young group, which further required muscle fiber elongation and sarcomere number increase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨格筋；腱移行；筋収縮

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は適応能力の優れた臓器である。骨格筋の機能的収縮単位はサルコメアである。筋肥大は主に並列に並ぶサルコメアが増える（筋横断面積が増える）ことにより、筋が発生する最大張力を増加させる。筋長軸方向の伸張が起こった場合には、筋は伸張された位置で最適な筋力を発揮できるように、縦列の

サルコメア数を増やして対応する。しかし生理的運動範囲を超えて伸張された筋についてはどれだけ適応するか不明であった。整形外科の代表的機能再建手術である腱移行術は、このサルコメア長を大きく変えざるを得ない治療法である。実際の臨床では、腱移行を受けた筋は、滑走性の低下及び筋力低下をきたすことが知られている。そしてこの滑走性低下及び筋力低下は治療終了後に幾分改

善はするものの、決してもとのレベルに回復しない。

現在までに、術後筋力低下の原因について、まだ直接因子として解明されてたものはない。腱移行による機能再建手術の適応は今後拡大していくものと思われる。筋力は術後成績に直結する重要な項目であり、これを確実に維持して新しい運動機能を獲得させることは必須の課題と思われた。

2. 研究の目的

本研究では動物実験を通じて、筋力低下をきたした様々な条件下での筋を対象として、以下の各項目について術後筋力低下との関連を突き止める事を目的とした。

(1) 筋形態学的パラメーターの変化

サルコメア数、筋線維長、生理学的筋横断面積など筋内サルコメア配置を表す形態学的パラメーターを経時的に解析する。筋線維内のサルコメア数が十分増加しておらず、サルコメア長が長いままであるために筋力低下をきたしている可能性がありうる。生理学的筋横断面積増加は最大張力と、直列サルコメア数増加は有効筋滑走距離と比例しているはずだが、これが保たれていなければ術後の筋力は形態的特徴ではなく、他項目によって支配されていることになる。

(2) 筋細胞間の線維組織の立体構造、組成、硬度の変化

筋細胞間の線維組織が無秩序に増生すると正常な筋細胞の張力発生及び伝達を妨げる可能性がある。また線維組織の増生がみられていなくても、線維の立体配置が改変されると張力の伝達がうまく働かない。組成によっては通常柔軟性を持った線維組織の硬度上昇に伴って、筋収縮が阻害されている可能性がある。

(3) 筋細胞内膜電位—小胞体系の変化

筋疲労の原因として筋細胞内の興奮—収縮過程における機能低下が大きく関与している可能性が示されている。伸張刺激を受けた筋細胞はサルコメアのみならず、筋小胞体も機能低下に陥っている可能性もあると思われた。この機構の関与を明らかにする。

(4) サルコメア構成タンパク分解機構の変化

廃用性筋萎縮でみられるサルコメア構成タンパクの分解・異化が亢進している可能性を調べる必要がある。筋伸展刺激が異化作用も亢進している可能性がある。これらのユビキチンリガーゼ発現を定量することにより、筋萎縮の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル作成と筋張力測定：家兎の腱移行モデルを作成する。サルコメア長で1.2—2.0倍の一次的伸展を移行筋に負荷する。

術中のサルコメア長はレーザー回折を利用して測定する。骨長の10-30%の延長を行い、術後筋適応の期間をおいてから、再度麻酔下で支配神経の電気刺激を行い、目的筋の能動及び受動張力を様々な筋長下で測定する。

(2) 筋形態学的計測：張力測定を終えた動物より筋サンプルを採取する。家兎の正常筋形態学的特徴はこれまでに明らかにされている。各筋の筋重量、生理的横断面積、筋線維長などの筋形態学的解析を行い、サルコメア数適応の有無を観察する。

(3) 筋細胞間の線維組織解析：筋サンプルを化学固定した後に組織切片を作成し、光学顕微鏡で筋細胞間マトリックスを観察して画像処理ソフトで数値化する。また化学消化処理をして筋線維を融解させた後に電子顕微鏡で筋細胞間マトリックスを観察し、その立体構造を明らかにする。超音波顕微鏡による組織硬度を計測し、細胞外マトリックス増加による組織硬度の上昇が筋収縮力に与える影響を明らかにする。

(4) 筋細胞内の興奮—収縮構造改変の解析：術後の筋肉の発生する張力測定を終えた後に、筋サンプルを採取する。筋をリラクゼーション溶液内で一本一本の筋線維に分け、チャンバー内でマイクロトルクモーターに逢着する。等張で十分量のATPを含んだ溶液をチャンバーに満たし筋張力の変化を測定し、筋線維のCa²⁺感受性を求める。計測を終えた筋線維は、電子顕微鏡による筋小胞体形態を観察する。

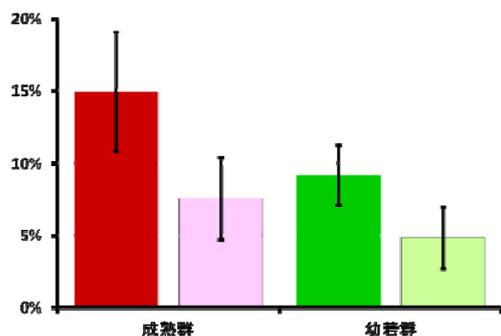
(5) 筋細胞内ユビキチンリガーゼ系による筋萎縮の関与：サルコメア構成タンパク分解機構の細胞内発現量を定量する。筋萎縮との可能性が示唆されているユビキチンリガーゼである **Siach-1A**、**MuRF-1**、**atrogen-1/MAFbx** についても同時に解析を行う。新鮮筋標本は凍結保存しておき解析に用いる。ウエスタンブロットとRT-PCRにてそれぞれタンパク量と遺伝子発現を調べる。

(6) 以上の結果を、家兎下腿骨延長による緩徐筋伸展で得られた筋サンプルと対照的に比較する。

4. 研究成果

手術後サルコメア数は短期間に増加するが、その後の腱組織の伸張により逆にサルコメア数は徐々にその数を減らしていくことを確認した。この経過中に筋の活動張力及び受動張力を調査したが、腱移行を受けた筋は生理学的筋横断面積は変わらないにも関わらずその活動張力が著明に減少していることが明らかにされた。また受動張力は術後4週間の期間で増加したままであった。筋細胞間の線維組織が増加しており、このことが受動張力増加の原因になっていると予想され、こ

れらは容易にリモデリングされずに長期にわたって筋線維間にとどまり、筋収縮をも妨げていることが示唆された。腱移行モデルと対比すべき骨延長モデルでの筋解析では、延長骨周囲に付着している骨格筋には元々の筋の状態により、伸張に対する適応能力に大きな差があることが分かった。また高齢個体では一部の筋で腱成分伸張が不良であり、その分さらに筋線維の伸張が必要なことが分かった。さらに高齢個体では元来、筋内の線維結合組織の割合が約2倍であり、骨延長によってその比率がさらに2倍になっていた。



これらのことから腱移行でドナーとして用いられる筋は、元々の機能により移行後の適応に大きな違いが出てくることを意味し、実際の臨床場面で、術後機能獲得に大きな影響を与えるものと予想される。

遺伝子改変動物によって筋内線維化を抑制出来るかどうかを確認中である。オステオアクチビントランスジェニック個体では、骨延長に伴う線維化がMMP発現などを介して若干抑制されており、筋線維断面積の増加とともに筋張力増加が確認できた。

これまでのデータから、過大伸長を強要する状態や、高齢個体での腱移行には、筋には形態的適応がおこるものの、それらが必ずしも機能的回復を意味しているものではないことが明らかとなった。筋内線維化は筋収縮力と関連している因子のひとつと思われ、引き続き解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Tonogai I, Takahashi M, et al. A massive chondroblastoma in the proximal humerus simulating malignant bone tumors. *Case Rep Orthop.* 2013; (2013)No.673576. doi: 10.1155/2013/673576. (査読有)
2. Higashino K, Nishisho T, et al. Early changes in muscle atrophy and muscle fiber type conversion after spinal cord transection and peripheral nerve

transection in rats. *J Neuroeng Rehabil.* 2013 May 20;10(1):46. doi:10.1186/1743-0003-10-46 (査読有)

3. Abe T, Nikawa T, et al. Cbl-b Is a Critical Regulator of Macrophage Activation Associated With Obesity-Induced Insulin Resistance in Mice. *Diabetes.* 2013 Jun;62(6):1957-1969. doi: 10.2337/db12-0677. (査読有)
4. Utsunomiya K, Nikawa T, et al. An intracellular fragment of osteostatin formed by ectodomain shedding translocated to the nucleoplasm and bound to RNA binding proteins. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012 Dec 23;76(12):2225-2229. doi.org/10.1271/bbb.120515 (査読有)
5. Iwamoto S, Takahashi M, et al. Usefulness of transcatheter arterial embolization prior to excision of hypervascular musculoskeletal tumors. *J Med Invest.* 2012;59(3-4):284-288. doi.org/10.2152/jmi.59.284 (査読有)
6. Kohno S, Nikawa T, et al. Unloading stress disturbs muscle regeneration through perturbed recruitment and function of macrophages. *J Appl Physiol.* 2012 May;112(10):1773-1782. doi: 10.1152/jappphysiol.00103.2012. (査読有)
7. Takahashi M, Ward SR, et al. Muscle excursion does not correlate with increased serial sarcomere number after muscle adaptation to stretched tendon transfer. *J Orthop Res.* 2012 Nov;30(11):1774-1780. doi: 10.1002/jor.22137. (査読有)
8. Morita Y, Nishisho T, et al. Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Sep;41(3):885-892. doi: 10.3892/ijo.2012.1529. (査読有)
9. Nishisho T, Nikawa T, et al. Angiogenesis and myogenesis in mouse tibialis anterior muscles during distraction osteogenesis: VEGF, its receptors, and myogenin genes

- expression. *J Orthop Res.* 2012 Nov;30(11):1767-1773. doi: 10.1002/jor.22136. (査読有)
10. Morimoto M, Takahashi M, et al. Expansively hemorrhagic foreign body granuloma at the pelvis caused by microscopic materials. *Open Journal of Orthopedics.* 2012 Mar 2(1): 1-5 DOI: 10.4236/ojo.2012.21001, (査読有)
 11. Takata S, Takahashi M, et al. Mineral to matrix ratio determines biomaterial and biomechanical properties of rat femur--application of Fourier transform infrared spectroscopy. *J Med Invest.* 2011 Aug;58(3-4):197-202. doi.org/10.2152/jmi.58.197 (査読有)
 12. Nishisho T, Takahashi M, et al. Locally administered zoledronic acid therapy for giant cell tumor of bone. *Orthopedics.* 2011 Jul 7;34(7):e312-315. doi:10.3928/01477447-20110526-22. (査読有)
 13. Kohno S, Nikawa T, et al. Rantes secreted from macrophages disturbs skeletal muscle regeneration after cardiotoxin injection in Cbl-b-deficient mice. *Muscle Nerve.* 2011 Feb;43(2):223-229. doi: 10.1002/mus.21829. (査読有)
 14. Winters TM, Takahashi M, et al. Whole muscle length-tension relationships are accurately modeled as scaled sarcomeres in rabbit hindlimb muscles. *J Biomech.* 2011 Jan 4;44(1):109-115. doi:10.1016/j.jbiomech.2010.08.033. (査読有)
 15. Takahashi M, Kawasaki Y, et al. Fragmental bone transport in conjunction with acute shortening followed by gradual lengthening for a failed infected nonunion of the tibia. *J Orthop Sci.* 2010 May;15(3):420-424. doi: 10.1007/s00776-009-1423-y. (査読有)
 16. 高橋光彦, 安井夏生ほか: 先天性下腿偽関節症の治療戦略, 日本整形外科学会雑誌 87 巻 : 32-37, 2013 (査読無)
 17. 高橋光彦, 江西哲也ほか: 兎下腿骨延長における高齢と幼若個体間での骨格筋適応の違い, *The Japanese Journal of Rehabilitation, Medicine*, Vol., 50, No. 1, 43-47, 2013 (査読有)
 18. 高橋光彦, 安井夏生ほか: 骨格筋の特性が脚延長への適応に与える影響, *日本整形外科雑誌* 85 巻 : 437-441, 2011 (査読無)
 19. 高橋光彦, 高田信二郎ほか: 腱移行手術は筋、筋線維束、筋線維の受動張力を増加させる, *The Japanese Journal of Rehabilitation, Medicine*, Vol., 48, No. 2, 129-133, 2011 (査読有)
 20. 高田信二郎, 江西哲也, 高橋光彦ほか: ラット大腿骨骨幹部骨膜の全周性切除が長径成長と骨微細構造に及ぼす影響, *Osteoporosis, Japan* 18 巻 2 号 252-253, 2010 (査読有)
- [学会発表] (計 5 件)
1. Takai M, Takahashi M et al. Morphological Difference among Finger Metacarpophalangeal Joints. Orthopaedic Research Society, Annual Meeting. 2013 年 1 月 26-29 日. Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA
 2. Takahashi M, Modulation of Bone Formation and Resorption in Distraction Osteogenesis by Bisphosphonates, 20th Anniversary Meeting of ASAMI Korea, 2012 年 11 月、Korea University, Seoul, Korea
 3. Takahashi M, Intramuscular Alteration of Mature and Immature in Rabbit Model of Distraction Osteogenesis, 20th Anniversary Meeting of ASAMI Korea, 2012 年 11 月、Korea University, Seoul, Korea
 4. Takahashi M et al. Diverse Skeletal Muscle Adaptation to Limb Lengthening between Adult and Young Animals. Orthopaedic Research Society, Annual Meeting. 2012 年 2 月 3-6 日. Moscone West Convention Center, San Francisco, California, USA
 5. Takahashi M et al. Impaired Architectural Adaptations in Plantarflexor Muscles to Accelerated Limb Lengthening. Orthopaedic Research Society, Annual Meeting. 2011

年 1 月 13-16 日. Long Beach Convention
Center, Long Beach, California, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 光彦 (TAKAHASHI MITSUHIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・講師
研究者番号 : 10372715

研究者番号 :

(2) 研究分担者

二川 健 (NIKAWA TAKESHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・教授
研究者番号 : 20263824
西庄 俊彦 (NISHISHO TOSHIHIKO)
徳島大学・病院・医員
研究者番号 : 40444723
高田 信二郎 (TAKATA SHINJIRO)
徳島大学・病院・准教授
研究者番号 : 20284292
江西 哲也 (ENISHI TETSUYA)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号 : 20467806

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

Richard L. Lieber
Professor, University of California San
Diego
Samuel R Ward
Professor, University of California San
Diego
Taylor Winters
Post Graduate Student, University of
California San Diego