

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：22401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700545

研究課題名(和文) 力学的ストレスの違いが、筋腱複合体および骨接合部(エンテシス)に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of difference of mechanical stress for muscle-tendon complex and enthesis

研究代表者

国分 貴徳(Kokubun, Takanori)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教

研究者番号：10616395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、モデル動物を対象として、遠心性収縮と求心性収縮という異なる筋収縮様式を付与するモデルから、それぞれの筋収縮様式により生じるメカニカルストレスが、筋腱複合体および骨接合部であるエンテシス部に及ぼす影響について解析を行った。各関節の筋腱接合部の構造を解析した上で明瞭なエンテシス構造を示す肩関節における棘上筋の骨接合部、および膝関節における大腿四頭筋(膝蓋腱)骨接合部を解析対象とした。結果として、棘上筋部では明瞭なメカニカルストレスの影響は観察されなかったが、膝蓋腱部においては周囲組織と比較して膝蓋下脂肪体部において、遠心性収縮により炎症が惹起されやすい傾向が示された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I investigated effect of different muscle contraction mode (Eccentric contraction and Concentric contraction) to the muscle tendon complex and tendon-bone interface (Enthesis) in animal model. The supraspinatus of shoulder joint and quadriceps (patellar tendon) of knee joint, clearly showed enthesis organs, were applied for histological and biochemical analysis. Consequently, supraspinatus of shoulder joint showed no significant difference of the effect of mechanical stress. On the other hand, patellar tendon of knee joint showed a tendency to early onset of inflammatory reaction in postero-patellar fat-pad rather than other surrounding tissues.

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：エンテシス メカニカルストレス 遠心性収縮 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

筋腱や靭帯、関節包などの軟部組織が硬組織である骨に接合する部位は Enthesis と呼ばれ、段階的 4 層構造を呈している。Enthesis 部は筋が収縮により発生させる力学的ストレスや外力によるストレスに抗するため、周囲の滑液包や脂肪体などの器官と複合体を形成し、ストレスを緩衝する役割を担っている。それに反して、臨床上、同部は炎症の好発部位であり、成長期の骨端部炎症傷害やスポーツなどによるオーバーユースを起因とする傷害、近年では変性疾患における疼痛や変形の好発部位としても報告され、その機能が注目されている (Benjamin M et al. Arthritis Rheum 2000;43 (3):576-583)。

このように種々の運動器疾患における Enthesis 部の関与が報告される中、同部において炎症や変形が惹起される原因として力学的ストレスが挙げられているが、その特異性については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、運動様式および筋収縮様式の違いが、筋腱複合体とその骨接合部 (Enthesis ; エンテシス) の組織組成と構造に及ぼす影響について解明するものである。成長期ラットに一定期間トレッドミル運動 (上方走行・下方走行) とバランス運動を行わせ、異なる筋の収縮様式が筋腱複合体および Enthesis 部にどのような組織化学的・生化学的変化が生じるのかを明らかにする。以上により、筋腱複合体およびその骨接合部における炎症性疾患及び傷害の誘因となる特異的なメカニカルストレスを明らかにし、同関連疾患に対するリハビリテーション介入の基礎となるデータを提示することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 対象

Wistar 系白色雄性ラット 18 匹 (3 週齢) を、Level 群、Up 群、Down 群各 6 匹にランダムに分類した。体重は、介入開始時 63-77g、介入終了時 192-220g であった。飼育室の環境は気温 23 ± 1 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間サイクルで明暗とし、餌や給水は自由に摂取できる環境とした。なお、対象とした関節は、予備実験における組織学的な観察において、近接筋の骨接合部がエンテシス構造を有している肩関節と膝関節とした。

(2) 介入

環境適応として 1 週間管理し、ゲージでの生活やトレッドミルに順応させた。走行運動には小動物用トレッドミル (大阪マイクロシステムズ、大阪、日本) を使用した。走行方法は、事前に warm-up として 12m/分にて 5 分間の走行を行ったのち以下の運動介入を行った。

研究 1

運動介入は 12m/分にて 60 分間の走行を行った。トレッドミルの傾斜角度は、先行研究に従い、ラットがトレッドミルから滑り落ちない最も急な角度とされる 16 度とし、Level 群はトレッドミルの傾斜角度を 0 度 (水平)、Down 群は -16 度の下りと設定して走行を実施した。上記運動を週 5 日で 4 週間、計 20 日実施した。なお、トレッドミルの後方に設置された電気刺激装置を利用し、ラットが規定の運動速度より遅れた場合には電気刺激を与えて走行を促した。また、Control 群は通常飼育とした。対象関節は膝関節とした。

研究 2

研究 1 の結果から、ラットの運動強度による違いを比較するため、速度を 18m/分に上げて 60 分間の走行を行った。また、研究 2 では、Level 群と Down 群に加えて Up 群 (16 度の上り) を設定し、運動パターンの違いによる変化も比較可能な条件とした。筋収縮様式の違いを明確化するため、対象関節を肩関節とし、被験筋は棘上筋とした。

(3) サンプル採取

走行期間終了後、麻酔下にて以下の組織を採取した。各関節は、採取後 4%パラホルムアルデヒド in 0,1MPB に 24 時間浸漬し固定、その後 4%EDTA にて脱灰、OCT compound にて包埋した。

膝関節 (研究 1)

右の膝関節は組織学的観察用に脛骨と大腿骨を中央にて離断し採取した。また、筋腱複合体への影響を観察するため膝蓋腱を、周囲組織への影響を観察するため膝蓋下脂肪体を採取し、all tissue protect に浸漬、生化学的解析に使用した。



図 1 膝関節組織像

膝蓋下脂肪体は、膝蓋腱後方に付着し、膝蓋腱、大腿骨、および脛骨間の間隙を充足している。

肩関節（研究2）

右の肩関節は組織学的観察用に上腕骨と肩甲骨から離断し採取した。また、筋への影響を観察するため、左棘上筋を採取した。採取後被験筋を生理食塩水にて洗浄、筋湿重量を測定した。その後筋線維と垂直となるように筋腹中央を切断した。近位端は、断面が水平かつ上方となるようにトラガントゴムを用いてコルクに固定し、-100 で急速凍結した。遠位端は all tissue protect に浸漬し、インキュベーションし、生化学的解析に使用した。

（4）組織学的解析

採取した組織を、クリオスタット（LEICA CM3050S,ライカマイクロシステムズ,東京,日本）に固定し、棘上筋は厚さ 9 μ m,各関節は 14 μ m にて切片を作製した。Hematoxylin-Eosin Staining（HE染色）を行い、LEICA DM2500（ライカマイクロシステムズ,東京,日本）を用いて組織像を取り込んだ。

棘上筋の切片は WinROOF Version7.0（MITANI CORPORATION,東京,日）を使用し、切片の断面積と筋線維数を計測し、筋線維あたりの面積を算出した。

（5）生化学的解析

採取した左棘上筋は、Tissue Lyser LT（QIAGEN,東京,日本）によりホモジナイズをし、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit（QIAGEN, Venlo, Netherlands）のプロトコールに従い total RNA を抽出した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits（Applied Biosystems, Foster City, the United States）のプロトコールに従い、逆転写反応により total RNA から cDNA を合成した。各組織の解析には、それぞれ以下のプライマーを使用した。

<棘上筋>

- 1) Collagen Type
- 2) Collagen Type
- 3) TGF- β 1（Transforming Growth Factor）
- 4) LOX（Lysyl Oxdase）
- 5) IL-1 β （Interleukin- 1）
- 6) IL-6（Interleukin-6）

<膝蓋下脂肪体>

- 1) IL-1 β （Interleukin- 1）
- 2) VEGF-1（vascular endothelial growth factor）
- 3) FGF-2（Fibroblast Growth Factor）
- 4) TGF- β 1（Transforming Growth Factor）

なお、各因子を Duplicate にて実施し、各 well の平均値を採用した。内部標準遺伝子に GAPDH を用いてリアルタイム PCR の Ct 法にて mRNA 発現量の定量化を行なった。機器は StepOnePlus Real-Time PCR System（Applied Biosystems, Foster City, the

United States）を使用した。

4. 研究成果

以下に研究成果の一部を示す。

（1）組織学

棘上筋切片の画像上での巨視的变化として、Level 群と比較し、Up 群、Down 群で筋線維の集積が生じ、細胞間隙の狭小化が確認された。特に Down 群での狭小化が著明であった（図2）。しかし、筋線維あたりの面積の測定では群間での大きな差異はみられなかった（図3）。

また、各関節における骨接合部（Enthesis）の構造的変化に関しても、グループ間での著明な変化は認められなかった。

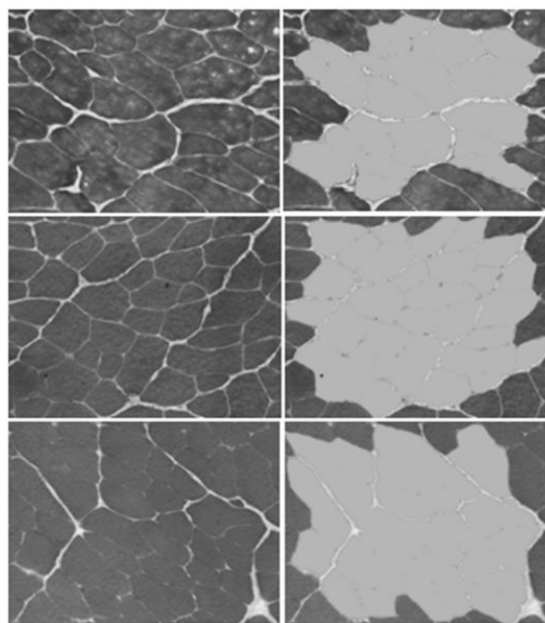


図2 組織像（研究2）

上から Level 群、Up 群、Down 群の棘上筋である。左染色像から、縁が切れていない筋線維を識別した。その後識別部の面積を算出し、筋線維数で除すことで、筋線維あたりの横断面積を測定した。

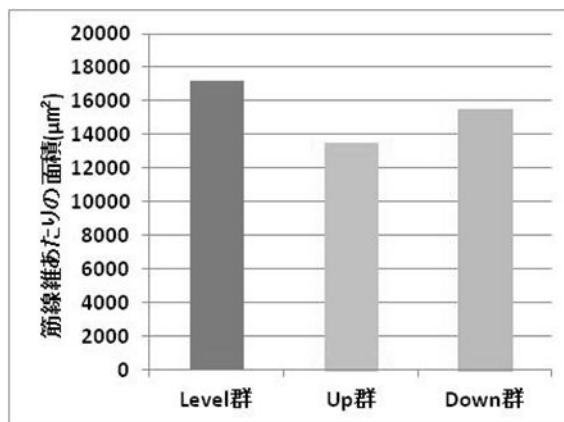


図3 筋線維あたりの面積（研究2）

図2にて算出した筋線維あたりの面積を比較したが、群間に著明な差はみられなかった。

(2) 生化学的解析

研究1では、膝蓋腱および膝蓋下脂肪体の解析結果を、研究2では棘上筋の解析結果を以下に示す。

研究1

膝蓋腱における血管新生因子および炎症性サイトカインの mRNA 発現解析においては、各グループ間において有意差を認めなかった。しかし、走行を行わない群に比較し、運動を実施した両群 (Level, Down 群) では炎症性サイトカインである IL-1 の mRNA 発現量が増加していたが、筋収縮様式における群間差は認めなかった (図4)。

一方、膝蓋下脂肪体においては、Down 走行群すなわち遠心性収縮が付与された群において、他の2群と比較して炎症性サイトカインである IL-1b の発現の顕著な増加を認めた。また、運動を実施した群においては、血管新生や創傷治癒に関連する因子である FGF-2 の発現量の増加を認め、特に Down 群ではその傾向が顕著であった。(図5)。

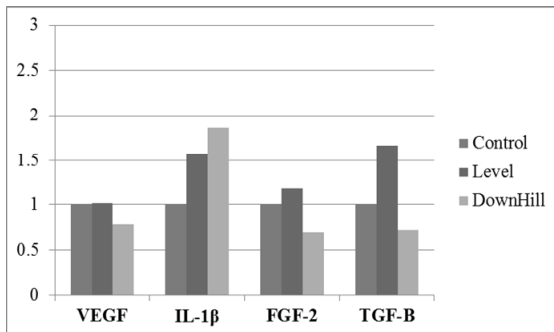


図4 膝蓋腱における mRNA 発現量

運動を実施した両群 (Level, Down 群) では炎症性サイトカインである IL-1 の mRNA 発現量が増加していたが、筋収縮様式における群間差は認めなかった。

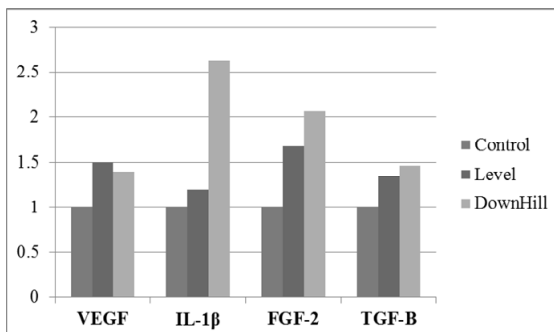


図5 膝蓋下脂肪体における mRNA 発現量

Down 走行群すなわち遠心性収縮が付与された群において、他の2群と比較して炎症性サイトカインである IL-1b の発現の顕著な増加を認めた。

研究2

棘上筋における炎症関連因子の mRNA 発現解析においては、グループ間における各因子の発現に有意な発現の増加は認められなかった。ただし、腱の主要な因子である Collagen Type I の mRNA 発現に関しては、Up 走行群で増加する傾向が見られた。また、Down 走行群では今回対象とした因子の mRNA 発現量は減少傾向であるという結果であった (図6)。

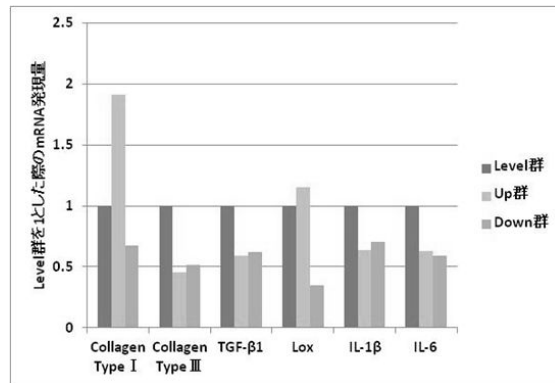


図6. 棘上筋における mRNA 発現量

有意差はみられなかったが、Up 群における Collagen Type I, LOX の発現量が Level 群よりも高値を示した。

以上の研究成果をまとめる。

本研究においては、通常飼育と比較して、ラットに水平走行および下り坂走行、上り坂走行を負荷し、筋腱複合体およびその骨接合部である Enthesis 部に及ぼす影響について調査した。

結果として、通常飼育と比較し、運動群では膝関節部の腱および周囲組織である膝蓋下脂肪体においてその影響を認め、その傾向は下り坂走行、すなわち遠心性収縮により顕著となることが明らかとなった。一方で、先行研究においてもより負荷が大きくなるとされている肩関節においては、棘上筋においてその影響は限定的であった。

(3) 今後の展望

今回の研究においては、筋腱複合体の骨接合部である Enthesis 部に、期待していたような組織学的観察における形態学的な所見は認められなかった。成長期の膝関節において、膝蓋腱の Enthesis 部に発症する Osgood-Schlatter 病などの発症要因としては、臨床上高強度かつ高頻度の運動負荷が原因として挙げられている。これに対し、本研究モデルは、ラットに対する運動介入としては比較的高強度であるということはできる (Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols, American

Physiological Society) が、高頻度であるとは言えない可能性がある。本研究におけるモデル動物は、その点においては先行研究における運動介入以上に、高頻度という点において今後運動介入プロトコルを検討していく必要があると考えられる。またその中において、負荷の違いすなわち筋の収縮様式の違いにおける影響を明らかにすることができれば、成長期の筋腱骨接合部に生じる炎症性疾患の予防およびリハビリテーション介入のエビデンスを確立することができると考えている。

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1件)

1. 村田健児, 金村尚彦, 国分貴徳, 松本純一, 藤野努, 高柳清美, ラット棘上筋腱の加齢変化と運動が血管内皮細胞増殖因子に与える影響. 12 理学療法 臨床・研究・教育 第21巻, pp12-15, 2014 (査読有)

[学会発表](計3件)

1. Kokubun T, Kanemura N, Maejima H, Morita S, Takayanagi K, Biochemical Changes affect immature patella tendon and Fat Pad after eccentric contraction. WCPT-AWP & ACPT Congress 2013, Sep.5, 2013, Taichung, Taiwan
2. Murata K, Kanemura N, Kokubun T, Matsumoto J, Fujino, T, Takayanagi K, THE EFFECT OF EXERCISE ON THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN THE SUPRASPINATUS TENDON, WCPT-AWP & ACPT Congress 2013, Sep.5, 2013, Taichung, Taiwan
3. 村田健児, 金村尚彦, 国分貴徳, 藤野努, 高柳清美, 老齢ラットにおける運動が棘上筋腱骨付着部に及ぼす影響, 第48回日本理学療法学会大会, 2013年5月24日, 名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国分 貴徳 (KOKUBUN TAKANORI)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教
研究者番号: 10616395

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし