

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19996

研究課題名(和文) 骨格筋内脂肪細胞によるアディポカインが慢性疼痛発生に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The effect of Adipokines secreted from adipocyte in skeletal muscle on chronic pain

研究代表者

坂田 亮介 (SAKATA, Ryosuke)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50579323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000 円

研究成果の概要(和文)：腱断裂や神経損傷などに伴う筋の不動態により、骨格筋内には脂肪細胞が浸潤し、脂肪細胞が分泌するアディポカインが筋肉に影響を与えるとされている。アディポカインの中でAdiponectinに注目し、慢性炎症への影響について検討した。in vitro実験系により、炎症環境でのAdiponectinの抗炎症作用が示された。in vivo実験系にて腱断裂及び神経損傷モデルで筋萎縮及び脂肪変性が確認された。萎縮し、脂肪変性を来した筋肉内で炎症性サイトカインの上昇と抗炎症効果を有するAdiponectinの低下を認めた。不動態化した筋肉内では、浸潤した脂肪組織が関与する慢性炎症が生じ臨床成績を悪化させうる。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle atrophy with fatty degeneration and infiltration is often caused by tendon rupture or nerve damage. Adipokines secreted from infiltrated adipocyte is known to contribute to chronic inflammation. We focused on Adiponectin, and evaluated its effect on chronic inflammation.

We added Adiponectin to the muscle-derived cells cultured under inflammatory circumstances. Adiponectin showed the anti-inflammatory effect in this experiment. In in vivo experiment, muscle atrophy and fatty infiltration were observed in both torn tendon group and nerve damage group. The inflammatory cytokine was stimulated in atrophied and degenerated muscle. Simultaneously, Adiponectin was down-regulated in the endmysium of the atrophied muscle. Our results suggest that, in the atrophied and fatty infiltrated muscle caused by trauma such as tendon rupture and nerve damage, inflammation delays and chronic adipose inflammation would aggravate the clinical outcome.

研究分野：整形外科

キーワード：アディポネクチン 筋萎縮 脂肪変性 慢性疼痛 慢性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

腱断裂や神経損傷の一般的な病態生理としては、筋線維の萎縮、線維化、そして筋肉内や断端部に脂肪浸潤、蓄積が認められ、総称して脂肪変性と呼ばれている。(1, 2) 手術手技の進歩により、腱断裂や神経損傷に対しても優れた再建や修復が行われているが、しばしば慢性疼痛の残存や脂肪変性の残存所見が認められる。(3)

脂肪細胞はエネルギー貯留のみならず、サイトカインを分泌する内分泌器官としての役割が注目されており、肥満における耐糖能異常や動脈硬化といった生活習慣病との関与も示唆されている。(4) 脂肪細胞が分泌するサイトカイン(アディポカイン)の中には、アディポネクチンや炎症性サイトカインである IL-6 や TNF が含まれている。近年、筋肉内に浸潤した脂肪細胞より分泌されるこれらのサイトカインと脂肪組織炎症や慢性疼痛の関与も指摘されている。(5-8) 一方でアディポカインの中でもアディポネクチン投与することで筋へのダメージを軽減させる可能性も報告されている。(9) 脂肪変性の分子メカニズムには未知の部分が多く、その発症機序、病理学的意義、そして疼痛や機能障害との関連性などについて詳細な検討はなされていない。これらのメカニズムや関連性を解明することにより、腱断裂罹患患者の予後を改善させようと考えられる。

腱の加齢性変化を伴う腱断裂は高齢者に発症し、しばしば外科的な修復が行われる。しかし、前述のように特に変性を伴う腱断裂部には組織学的にも画像上でも脂肪変性が認められ、遷延する疼痛との関連性も考察されている。脂肪変性と慢性疼痛の関連性を解明することは、腱断裂患者の疼痛を改善するだけでなく、機能的予後を改善させる可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

腱断裂モデル及び神経損傷モデルを用いて、それぞれの筋肉内脂肪変性及び脂肪浸潤を判定し、その上で痛み関連物質やアディポカインの局在や発現の定量を行うこととした。これにより、腱断裂、神経損傷が筋肉の脂肪変性に与える影響について検討し、さらに炎症あるいは疼痛関連物質の測定を行うことで疼痛発生の機序やその治療法について知見を深めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### < in vitro 実験モデル >

$1.0 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> でラット腱由来細胞を IL-1  $1.0$  ng/ml を添加した炎症培地にて培養し、これに脂肪細胞より分離されるアディポネクチン  $0.3$   $\mu$ g/ml,  $1.0$   $\mu$ g/ml を加えた。24 時間後の細胞活性を WST assay にて評価、そして、腱異化マーカーとして MMP-2, MMP-9 について比較検討した。

### < in vivo 実験モデル >

12 週齢の SD ラットを使用した。ラット骨格筋脂肪変性モデルとして、腱断裂モデルおよび神経損傷モデルを作成した。これらのラットに対し、全身麻酔を行なった上で、腱断裂モデルとしては、右アキレス腱を踵骨付着部より 3mm の高位から 5mm に渡り切除し欠損させた。一方、右大腿骨後面を縦切開し、坐骨神経を露出し、これを血管縫合用クリップで 5 分間クランプし、挫滅させたものを神経損傷モデルとした。術後 4 週で安楽死させ、腓腹筋の筋萎縮及び脂肪変性を評価し、また慢性炎症に関連するマーカーやサイトカイン、そしてアディポネクチンの局在につき蛋白質・遺伝子レベルで対照群と比較し検討した。

### < 評価方法 >

両側腓腹筋を各々採取した。筋肉については湿性筋重量の測定、組織学的解析として筋肉の短軸断面切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による筋萎縮の評価及びアディポネクチン、その受容体である AdipoR1

の免疫組織染色を施行した。real-time RT-PCR 法にて炎症性サイトカイン、脂肪分化関連因子および筋関連マーカーについて解析を行った。

統計学的検定として、群間の比較には unpaired t 検定を用いて解析を行い  $P < 0.05$  を統計学的有意差ありと判断した。

#### 4. 研究成果

1) アディポネクチンの抗炎症作用について  
アディポネクチンの添加により、培養開始 24 時間後アディポネクチン非添加群と比較して  $0.3 \mu\text{g/ml}$  添加群及び  $1.0 \mu\text{g/ml}$  添加群で有意に細胞活性が高かった。(図 1a. \*印: adiponectin 非投与群と比較して統計学的有意差有り)

また、腱異化マーカーとして検討した MMP-2 並びに MMP-9 いずれも、アディポネクチン添加により有意に低下していた。(図 1b. \*印: adiponectin 非投与群と比較して統計学的有意差有り)

図 1a

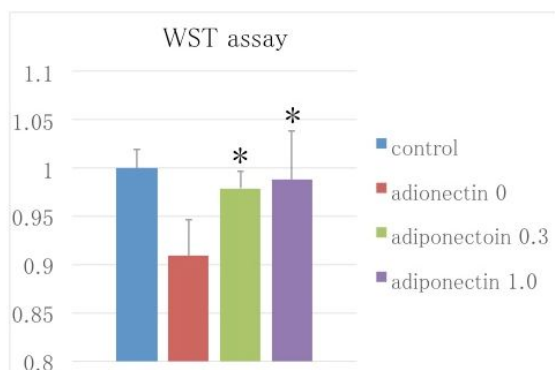
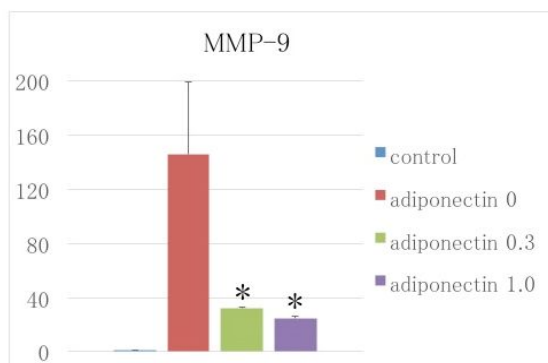
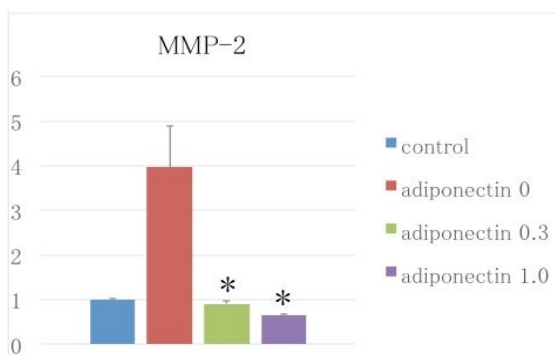
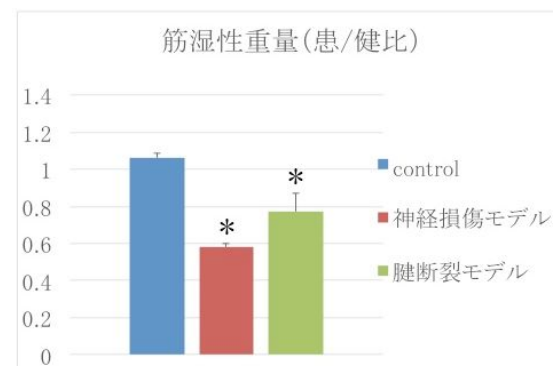


図 1b



2) 腱断裂群及び神経損傷群における、腓腹筋の筋萎縮および脂肪変性について  
腓腹筋の湿性筋重量は腱断裂群、神経損傷群いずれにおいても対照群と比較して有意に低下していた(図 2. \*印: control 群と比較して統計学的有意差有り)

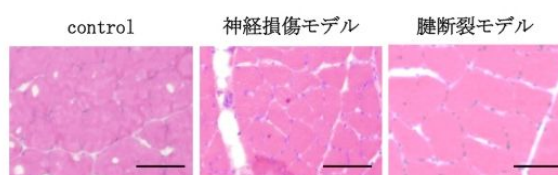
図 2



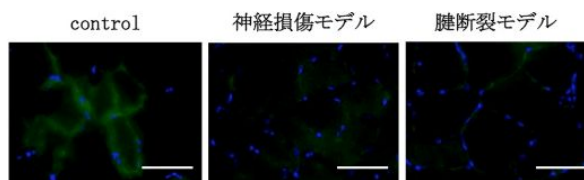
HE 染色では、筋線維あたりの面積は著明に減少しており、組織学的にも筋萎縮は明らかであった。またアディポネクチンは筋内膜に局在しており、腱断裂群及び神経損傷群において正常腓腹筋と比較し筋線維あたりの局在は減少していた。(図 3)

図 3

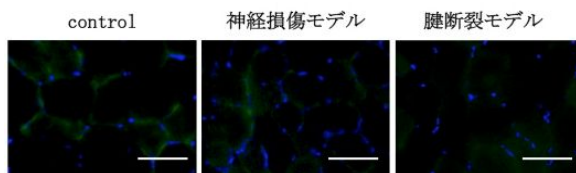
HE 染色



## Adiponectin 蛍光免疫染色



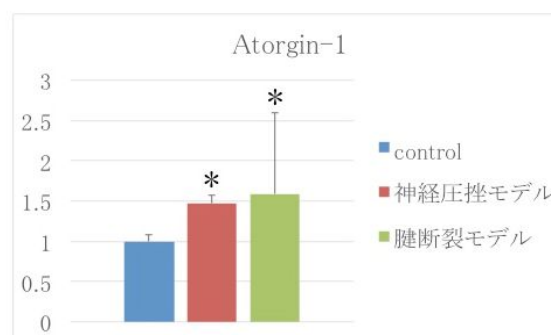
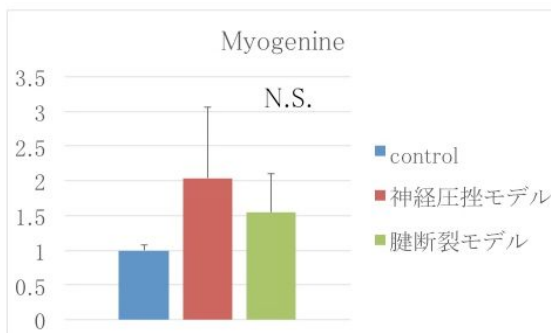
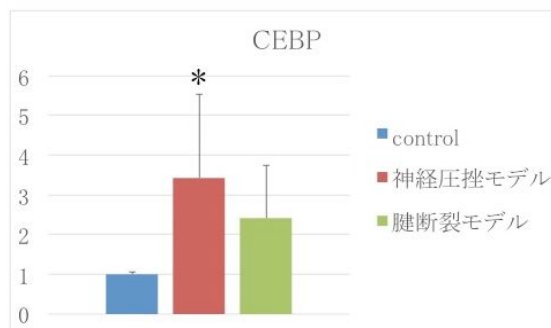
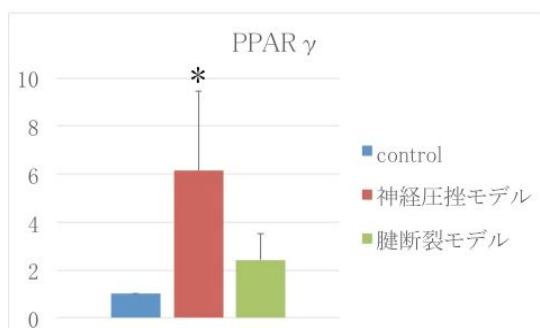
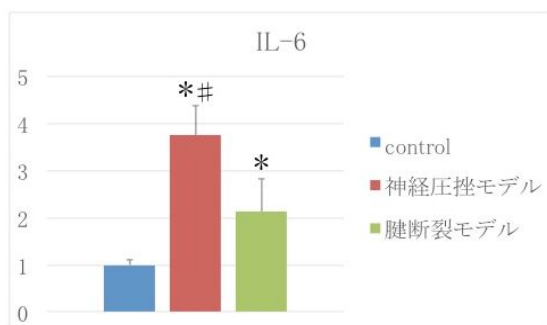
## Adipo R1 蛍光免疫染色



PCR 法による mRNA 発現の解析では、炎症性サイトカインである IL-6 では腱断裂群、神経損傷群で上昇し、脂肪変性マーカーである PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\beta$  は神経損傷群で対照群と比較し有意に上昇し、腱断裂群でも上昇傾向を認めた。一方、筋関連マーカーとして同化マーカーである myogenin は有意差は認めず、異化マーカーである atrogen1 は腱断裂、神経損傷両群で有意な上昇を認めた。(図4. \*印: control 群と比較して統計学的有意差有り、

印: 腱断裂群と比較して統計学的有意差有り)

図4



## < 考察 >

in vitro 実験系により、アディポネクチンの炎症環境における、細胞レベルの抗炎症作用が示唆された。

そして、in vivo 実験系において腱断裂及び神経損傷により筋萎縮及び脂肪変性が確認できた。萎縮し、脂肪変性を来した筋肉では炎症性サイトカインが上昇し、抗炎症効果を有するアディポネクチンの低下が認められ、炎症が遷延し、慢性脂肪組織炎症を来し臨床成績を悪化させている可能性が示唆された。今後も疼痛の評価として痛み関連遺伝子の評価などもすすめ、これまでの研究成果とともに順次発表予定である。

## <参考文献>

1. Itoigawa, Y., Kishimoto, K.N., Sano, H., Kaneko, K., and Itoi, E. Molecular mechanism of fatty degeneration in rotator cuff muscle with tendon rupture. J Orthop Res 29, 861, 2011.
2. Goutallier, D., Postel, J.M., Bernageau, J., Lavau, L., and Voisin, M.C. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. Clin Orthop Relat Res, 304, 78, 1994.
3. Gladstone, J.N., Bishop, J.Y., Lo, I.K., and Flatow, E.L. Fatty infiltration and atrophy of the rotator cuff do not improve after rotator cuff repair and correlate with poor functional outcome. Am J Sports Med 35, 719, 2007.
4. Messerli, F.H., Christie, B., DeCarvalho, J.G., Aristimuno, G.G., Suarez, D.H., Dreslinski, G.R., and Frohlich, E.D. Obesity and essential hypertension. Hemodynamics, intravascular volume, sodium excretion, and plasma renin activity. Arch Intern Med 141, 81, 1981.
5. Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Sato, K., Nakagawa, T., Funata, M., Yamaguchi, M., Namiki, S., Nakayama, R., Tabata, M., Ogata, H., Kubota, N., Takamoto, I., Hayashi, Y.K., Yamauchi, N., Waki, H., Fukayama, M., Nishino, I., Tokuyama, K., Ueki, K., Oike, Y., Ishii, S., Hirose, K., Shimizu, T., Touhara, K., and Kadowaki, T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. Nature 464, 1313, 2010.
6. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 112, 1796, 2003.
7. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. J Leukoc Biol 88: 33,2010.
8. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. Endocrinology 145: 5589, 2004.
9. Jortay J, Senou M, Delaigle AM, Noel L, Funahashi T, Maeda N, Many MC, Brichard SM. Local induction of adiponectin reduces lipopolysaccharide-triggered skeletal muscle damage. Endocrinology 151: 4840 2010.

## 5 . 主な発表論文等

〔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)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobe-seikei.com/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

坂田 亮介 (SAKATA, Ryosuke)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：5 0 5 7 9 3 2 3

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

美舩 泰 (MIFUNE, Yutaka)

乾 淳幸 (INU, Atsuyuki)

植田 安洋 (UEDA, Yasuhiro)

片岡 武史 (KATAOKA, Takeshi)