

令和元年5月23日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12937

研究課題名(和文) HIF-1 を治療標的とした筋線維症に対する理学療法的治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of the physiotherapeutic strategy for muscle fibrosis with HIF-1 alpha as a therapeutic target

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋線維症に対する効果的な治療戦略を開発するためには、標的分子の同定が不可欠である。本研究ではHIF-1 をその候補に想定し、阻害薬投与と実験を通してこの点を明らかにした。加えて、阻害薬と理学療法との併用療法の効果も検討した。Wistar系雄性ラットを対照群と足関節を不動化する実験群に分け、実験群は不動処置のみの群、不動の過程でHIF-1 阻害薬を投与する群、不動の過程でHIF-1 阻害薬を先行投与し、不動2週後より理学療法介入を行う群に分けた。結果、HIF-1 阻害薬投与でヒラメ筋の筋線維症の進行が抑制されたが、理学療法介入を併用してもその相乗効果は認められず、介入条件が今後の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、不動によって惹起される筋線維症の治療標的分子はHIF-1 であることが明らかとなった。つまり、この成果は筋線維症に対する新たな理学療法的治療戦略の開発のための基礎データとして重要であり、学術的意義は大きいと思われる。また、高齢者の筋機能障害対策にもつながる基礎データであり、社会的にも意義のあるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Identification of target molecules is essential to develop effective therapeutic strategies for muscle fibrosis. We suppose that HIF-1 is one of target molecules of muscle fibrosis. This study examined whether inhibition of HIF-1 suppresses the progression of fibrosis in rat soleus muscle. Additionally, we investigated the effect of combination therapy of pharmacotherapy (HIF-1 inhibitor administration) and physiotherapy. Wistar male rats were divided into control group and an experimental group immobilizing the ankle joint. The experimental group was further divided into 1) immobilization only, 2) treated with HIF-1 inhibitor, 3) treated with HIF-1 inhibitor in immobilization period and physiotherapy intervention after 2 weeks immobilization. As a result, HIF-1 inhibitor suppressed the progression of muscle fibrosis in soleus muscle. However, no synergistic effect was observed when combined with physiotherapy intervention. Intervention conditions became a future task.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：理学療法 筋線維症 HIF-1 阻害薬実験 骨格筋電気刺激

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国において、筋量や筋力の低下といった筋機能障害を呈するサルコペニアの有病者数は300万人以上と推計されており、健康寿命を延伸するためにもその対策は喫緊の課題である。そして、最近の基礎研究によれば筋機能障害を重度化・複雑化する病理像としてコラーゲンの過剰増生・蓄積に起因した筋線維症（muscle fibrosis）の発生・進行が指摘されている。

一方、これまでの筋機能障害に対する理学療法は症状軽減を目的とした対症療法的アプローチであったことは否めない。しかし、様々な基礎研究の成果で筋機能障害の病態解明が進んでいる今日においては、病態そのものに対する生物学的アプローチの開発が必要といえる。そして、筋線維症に対する生物学的アプローチの開発を進めていく上では、治療標的分子の同定は不可欠であるが、残念ながら筋線維症の標的分子はこれまで明らかになっていない。しかし、肺や肝臓などの内臓器線維症においては、低酸素状態において誘導される転写因子の hypoxia inducible factor (HIF)-1 α が標的分子の候補として注目されている。なぜなら、HIF-1 α の発現を発端としてコラーゲン合成に関与する transforming growth factor (TGF)- β 1 や platelet-derived growth factor (PDGF) などの分子シグナリングが活性化することが明らかになっており、in vitro, in vivo 双方の実験系において HIF-1 α の発現を阻害することでコラーゲン合成が抑制される事実が確かめられているからである。加えて、自験例の先行研究でもラットヒラメ筋を4週間以上不動化すると筋線維症の進行が著しくなり、時期を同じくして HIF-1 α が発現することを明らかにしている。

2. 研究の目的

前述したように、本研究では筋線維症の発生・進行の標的分子として HIF-1 α を想定しており、この仮説が事実であるか否かを in vivo 系の阻害薬投与実験によって明らかにする。そして、この成果を基に薬物療法と理学療法のコンビネーション治療法の効果を検証し、最終的には筋線維症に対する生物学的アプローチとしての理学療法的治療戦略を開発することが目的である。

3. 研究の方法

8週齢の Wistar 系雄性ラット 26 匹を無作為に、4週間両側足関節を最大底屈位でギプスで不動化する実験群 (n=20) と無処置の対照群 (n=6) に振り分け、実験群はさらに、①不動処置のみを行う不動群 (n=8)、②不動の過程で HIF-1 α 阻害薬を投与する投与群 (n=6)、③不動の過程で HIF-1 α 阻害薬を先行投与し、不動2週後より電気刺激誘発性単収縮運動を負荷する併用群 (n=6) に分けた。投与群と併用群の各ラットには、HIF-1 α 阻害薬である YC-1 (2mg/kg) を不動期間中、毎日腹腔内投与した。また、併用群の各ラットには不動2週後よりギプスを装着した状態で電気刺激誘発性単収縮運動（刺激周波数；10Hz）を1日30分間、週6日、下腿三頭筋に負荷した。

4週間の実験期間中は、週に1回の頻度で各群すべてのラットの足関節背屈可動域を測定し、拘縮の発生・進行状況を評価した。そして、実験期間終了後は各ラットから両側ヒラメ筋を採取し、一部の試料は western blot 法に供し、HIF-1 α 発現量を半定量化した。なお、その際の内因性コントロールには GAPDH を採用した。また、試料の一部は生化学的検索に供し、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を定量した。加えて、試料の一部は real time RT-PCR 法に供し、線維化関連分子である TGF- β 1, α -SMA, type I collagen, type III collagen それぞれの mRNA の発現量を定量した。

各群間の比較のための統計処理には、一元配置分散分析と Bonferroni 法による事後検定を適用し、危険率 5%未満をもって有意差を判定した。

4. 研究成果

(1) 足関節背屈可動域の変化

足関節背屈可動域は対照群と比較して実験群の3群は不動1週後より対照群と比較して有意に低値を示し、その後は不動期間の延長に伴って減少した。実験群間を比較すると、不動2週後までは3群間に有意差を認めなかったが、不動3・4週後では投与群と併用群が不動群より有意に高値を示した。また、投与群と併用群の間には有意差を認めなかった（図1）。

(2) HIF-1 α 発現量の変化

HIF-1 α 発現量は対照群と比較して実験群の3群は有意に高値を示した。実験群の3群間を比較すると、投与群と併用群は不動群より有意に低値を示し、この2群間には有意差を認めなかった（図2）。

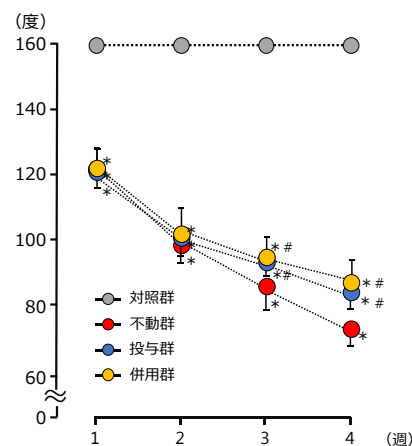


図1 足関節背屈可動域の変化

グラフ内の*は対照群との有意差、#は不動群との有意差を示している。

(3) ヒドロキシプロリン含有量の変化

ヒドロキシプロリン含有量は対照群と比較して実験群の3群は有意に高値を示した。実験群の3群間を比較すると、投与群と併用群は不動群より有意に低値を示し、この2群間には有意差を認めなかった(図3)。

(4) 線維化関連分子の mRNA 発現量の変化

線維化関連分子である TGF- β 1, α -SMA, type I collagen, type III collagen それぞれの mRNA 発現量は対照群と比較して不動群と投与群は有意に高値を示し、併用群は対照群と有意差を認めなかった。また、実験群間を比較すると投与群と併用群は不動群より有意に低値を示し、この2群間には有意差を認めなかった(図4)。

(5) 総括

内臓器の線維化の発生メカニズムには、HIF-1 α の発現亢進に伴う TGF- β 1 を介した分子シグナリングの活性化が関与するとされ、TGF- β 1 の発現亢進は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を誘導し、これらの結果、コラーゲンの過剰増生に起因した線維化に発展すると整理されている。つまり、不動の過程で HIF-1 α 阻害薬を投与した今回の投与群においては、ヒラメ筋における HIF-1 α の発現抑制によって TGF- β 1 の発現抑制を招き、あわせて筋線維芽細胞への分化誘導も抑制され、結果、コラーゲンの過剰増生に伴う線維化が抑制され、拘縮の進行も抑制されたと考えることができる。つまり、この結果から、HIF-1 α 阻害薬投与は筋線維症の進行抑制に効果的であることが示唆される。一方、併用群においても投与群と同様に線維化ならびに拘縮の進行抑制効果が認められたが、その効果には大差はなかった。したがって、不動開始直後より HIF-1 α 阻害薬を先行投与する薬物療法と、その後、電気刺激誘発性単収縮運動による理学療法的介入を行うコンビネーション治療法は、拘縮の進行抑制に対する相乗効果は少ないといえ、併用群に認められた効果に関しては HIF-1 α 阻害薬の影響が大きいのではないかと考えられる。加えて、両者の介入の相乗効果を高めるためには、電気刺激誘発性単収縮運動の刺激条件について再検討が必要であり、この点が今後の課題となった。

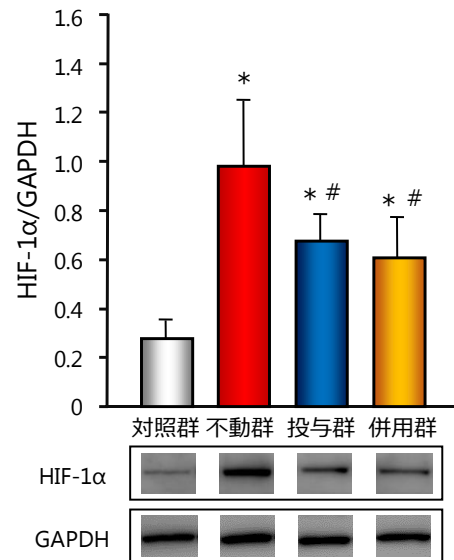


図2 HIF-1 α 発現量の変化

グラフ内の*は対照群との有意差、#は不動群との有意差を示している。また、グラフ下の画像はwestern blot法で得られたHIF-1 α ならびにGAPDHのバンド像である。

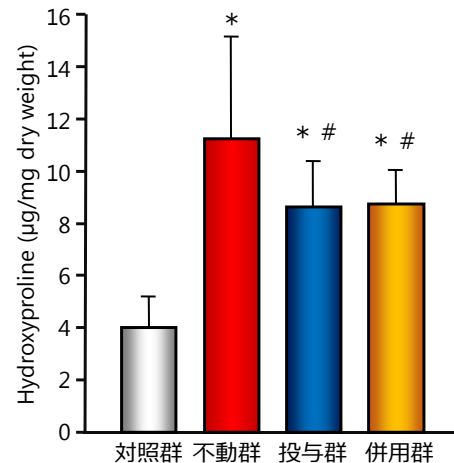


図3 ヒドロキシプロリン含有量の変化

グラフ内の*は対照群との有意差、#は不動群との有意差を示している。

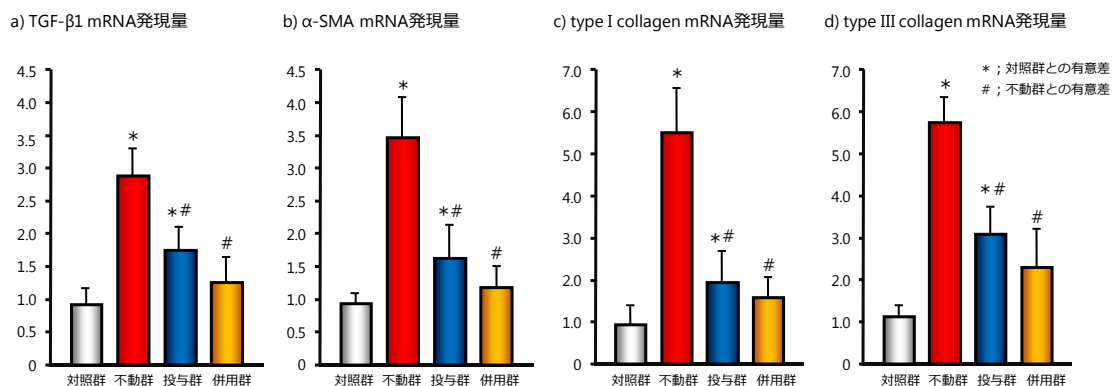


図4 線維化関連分子の mRNA 発現量の変化

グラフは左から TGF- β 1, α -SMA, type I collagen, type III collagen それぞれの mRNA 発現量を比較した結果で、グラフ内の*は対照群との有意差、#は不動群との有意差を示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kubo K, Sakamoto J, Honda A, Honda Y, Kataoka H, Nakano J, Okita M: Effects of twitch contraction induced by magnetic stimulation on expression of skeletal muscle fibrosis related genes and limited range of motion in rat. *Am J Phys Med Rehabil* 98(2): 147-153, 2019. doi: 10.1097/PHM.0000000000001042. (査読有)
- ② 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)
- ③ 沖田 実, 本田祐一郎, 片岡英樹: 拘縮に対する物理療法の臨床実践. *理学療法* 35(7): 601-610, 2018. (査読無)
- ④ 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 関節可動域制限に対する基礎研究の動向と臨床への応用—筋性拘縮の発生機序の解明ならびにエビデンスに基づいた治療戦略の開発を目的とした基礎研究—. *理学療法学* 45(4): 275-280, 2018. doi: https://doi.org/10.15063/rigaku.45-4kikaku_Honda_Yuichiro (査読有)
- ⑤ 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)
- ⑥ 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- α 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)
- ⑦ 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)

[学会発表] (計 17 件)

- ① Kajiwaraya Y, Kataoka H, Honda Y, Tanaka N, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Effect of HIF-1 α inhibitors for preventing the progress of muscle contracture in rat soleus muscles. 12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine, 2018.
- ② Honda Y, Tanaka N, Kajiwaraya Y, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Pathogenesis and molecular mechanism of muscle contracture in rat soleus muscles. 12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine, 2018.
- ③ Tanaka N, Honda Y, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, Okita M: Mechanisms of macrophages accumulation in the process of immobilized-induced muscle contracture in rats. 12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine, 2018.
- ④ 梶原康宏, 片岡英樹, 本田祐一郎, 田中なつみ, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動に伴う骨格筋の線維化に対する HIF-1 α 阻害薬の効果. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018.
- ⑤ 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 電気刺激誘発性筋収縮運動の収縮様式の違いが骨格筋の線維化におよぼす影響. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018.
- ⑥ 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: 不動化した骨格筋における線維化の発生メカニズム-マクロファージ集積機序の探索. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 2018.
- ⑦ 梶原康宏, 片岡英樹, 本田祐一郎, 田中なつみ, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: HIF-1 α 阻害薬投与と電気刺激による周期的な単収縮運動を併用した治療戦略がラットヒラメ筋の筋性拘縮におよぼす影響. 第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018.
- ⑧ 本田祐一郎, 梶原康宏, 田中なつみ, 石川空美子, 竹下いづみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動後早期からの筋収縮負荷は筋性拘縮の予防戦略として有効か?—動物実験用 B-SES を用いた検討. 第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018.
- ⑨ 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: 不動化によって生じる骨格筋内のマクロファージ集積の機序. 第 23 回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018.
- ⑩ 本田祐一郎, 梶原康宏, 稲富裕也, 田中なつみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 近藤康隆, 縄田 厚, 沖田 実: B-SES によるラットヒラメ筋の筋性拘縮の進行抑制効果に関する検討. 第 5 回日本骨格筋電気刺激研究会学術集会, 2018.
- ⑪ 沖田 実: 不活動が身体におよぼす影響とリハビリテーションの最新知見. 第 23 回日本ペインリハビリテーション学会学術大会, 招待講演, 2018.

- ⑫ 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.
- ⑬ 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.
- ⑭ 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会, 2017.
- ⑮ 沖田 実: 拘縮に対するリハビリテーション戦略. 第 20 回山梨県理学療法士会学会, 招待講演, 2017.
- ⑯ 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.
- ⑰ 沖田 実: 拘縮の科学. 第 2 回北海道千歳リハビリテーション科学学会, 招待講演, 2016.

[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, pp56-62, 2017.

[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:
 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:
 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/index.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中野 治郎

ローマ字氏名: NAKANO, Jiro

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 医歯薬学総合研究科 (保健学科)

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 20380834

研究分担者氏名: 坂本 淳哉

ローマ字氏名: SAKAMOTO, Jyunya

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 医歯薬学総合研究科 (保健学科)

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20584080

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：本田 祐一郎

ローマ字氏名：HONDA, Yuichiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。