

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19795

研究課題名(和文)筋性拘縮の発生機序に関わる分子メカニズムの探索と理学療法的戦略の開発

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms involved in the pathogenesis of muscular contracture and development of physical therapeutic strategies

研究代表者

本田 祐一郎 (HONDA, Yuichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・助教

研究者番号：40736344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋性拘縮の主病態である線維化の発生には筋核のアポトーシスが関与するが、その上流のメカニズムは明らかにできていなかった。一方、アポトーシスの発生にはミトコンドリア融合因子である mfn-1 の発現低下と分裂因子である drp-1 の発現亢進に伴うミトコンドリアDNAの減少とこれを契機としたミトコンドリア膜電位の低下が関与するとされている。つまり、不動化した骨格筋でも同様の変化を発端として筋核のアポトーシスが生じると仮説できることから、本研究ではこの点を検証した。結果、不動化した骨格筋では仮説と同様の変化が確認され、これが筋核のアポトーシスを誘導し、線維化、ひいては筋性拘縮の発生につながったと推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果とこれまでの自験例を照合した結果、不動状態に曝された骨格筋では mfn-1 の発現低下と drp-1 の発現亢進に伴うミトコンドリアDNAの減少によってミトコンドリア膜電位が低下し、これらの変化が筋核のアポトーシスを誘発することで線維化が生じることが明らかとなった。そして、この成果は筋性拘縮の発生メカニズムを解明するための一助になるものであり、これを応用すれば生物学的なエビデンスに裏打ちされた筋性拘縮に対する理学療法的戦略の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our laboratory clarified that myonuclear apoptosis was related to the development of muscle fibrosis, which was the main lesion of muscle contracture. However, the upstream of this mechanism was unclarified. whereas, previous research indicated that mitochondrial dysfunction has affected the incidence of apoptosis. Also, the reduction of mitochondria DNA through the downregulation of mitofusin (mfn)-1 expression and the upregulation of dynamin-related protein (drp)-1 expression was associated with the decrease in mitochondrial membrane potential, these alterations induced apoptosis via mitochondrial dysfunction. Accordingly, we hypothesize similar alterations trigger myonuclear apoptosis in immobilized skeletal muscle, examined the above hypothesis in this study. As a result, we confirmed the alterations similar to the hypothesis in the immobilized skeletal muscle. Namely, these changes induced myonuclear apoptosis and led to the development of muscle contracture via muscle fibrosis.

研究分野：理学療法学

キーワード：筋性拘縮 線維化 アポトーシス ミトコンドリア mfn-1 drp-1

1. 研究開始当初の背景

本邦では超高齢社会の到来により重篤な拘縮を抱えた障害高齢者は増加の一途を辿っている。そのため、効果的な治療戦略の開発のためにも拘縮の発生機序の解明は喫緊の課題といえ、研究代表者らは拘縮の発生初期段階の責任病巣の中心である骨格筋に着目し、筋性拘縮の発生機序の探索を進めてきた。その結果、骨格筋は1, 2週という短期の不動に曝すだけで伸張性が低下し、その主因は骨格筋内におけるコラーゲンの増生、すなわち線維化の発生が関与すること、また、その発生機序の分子メカニズムにはマクロファージの集積を介した interleukin-1 β /transforming growth factor- β 1 シグナリングの賦活化が関与することを明らかにしてきた。そして、不動化した骨格筋におけるマクロファージの集積はアポトーシスによる筋核の減少を契機としており、線維化のみならず、同時に筋線維萎縮を惹起することが最近明らかとなった。つまり、これまでの結果から筋性拘縮の発生機序に関わる分子メカニズムの上流においては、筋核のアポトーシスが最も重要な事象であると予測している。しかし、骨格筋の不動によって惹起される筋核のアポトーシスの詳細なメカニズムは不明であり、この点を明らかにすることは筋性拘縮の発生機序の解明にもつながることから極めて重要な課題といえる。

2. 研究の目的

所属研究室の先行研究では、不動化した骨格筋にミトコンドリアの機能不全を示唆する所見が認められている。そして、他臓器におけるミトコンドリアの機能不全を検討した先行研究では、ミトコンドリア融合因子である mitofusin (mfn) -1 の発現低下と分裂因子の dynamin related protein (drp) -1 の発現亢進によってミトコンドリア DNA が減少し、これらの変化がミトコンドリア膜電位の低下を誘導することでアポトーシスを促進すると報告されている。したがって、骨格筋を不動状態に曝すとミトコンドリアの機能不全によって筋核のアポトーシスが惹起され、これを契機にマクロファージの集積と線維化関連分子の賦活化が生じると仮説できるが、このことを立証した報告は国内外を含め皆無である。そこで、本研究課題では不動化した骨格筋内のミトコンドリアの恒常性を検索し、これまでの自験例の結果と照合を行い、筋性拘縮の発生機序に関わる詳細な分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物には8週齢の Wistar 系雄性ラット 20 匹を使用し、これらを実験群(n = 10)と両側足関節を最大底屈位とした状態(ヒラメ筋は弛緩位)でギブス包帯を用いて不動化する不動群(n = 10)に分けた。なお、不動群の不動期間は1, 2週間(各5匹)に設定し、対照群は各不動期間のラットと週齢を合わせるために9, 10週齢(各5匹)まで通常飼育した。そして、各実験期間終了後は両側ヒラメ筋を採取し、右側試料から凍結横断切片を作製した。凍結横断切片の一部には nicotinamide adenine dinucleotide hydrate-tetrazolium reductase (NADH-TR)染色ならびに succinate dehydrogenase(SDH)染色を施し、筋線維タイプ別の筋線維横断面積と単位面積当たりの optical density を計測した。また、一部には JC-1 染色を施し、ミトコンドリア膜電位を可視化した。さらに、左側試料の一部は JC-1 assay に供し、polymer の蛍光強度を monomer の蛍光強度で除すことで fluorescence intensity ratio を求め、ミトコンドリア膜電位の変化を検索した。加えて、左側試料の一部は PCR 法あるいは real time RT-PCR 法に供し、ミトコンドリア DNA 発現量、mfn-1 および drp-1 mRNA 発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア DNA ならびにミトコンドリア融合・分裂因子

不動群のミトコンドリア DNA ならびに mfn-1 の mRNA 発現量はいずれの不動期間とも対照群と比較して有意に低値を示した。また、不動群のミトコンドリア DNA ならびに mfn-1 の mRNA 発現量はいずれの不動期間とも対照群と比較して有意に高値を示した(図1)。

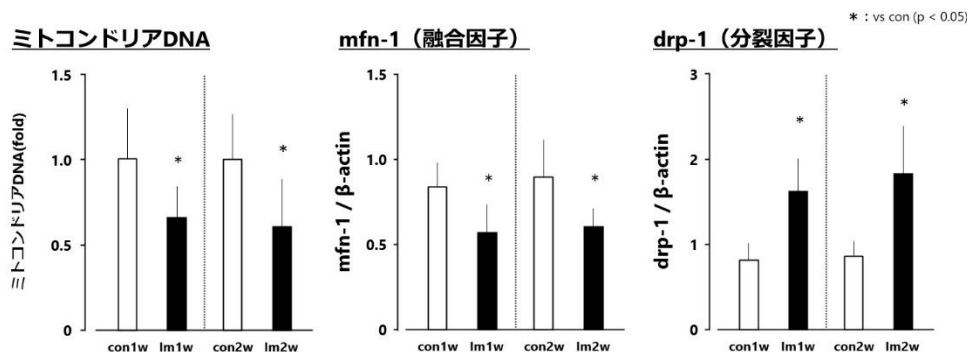
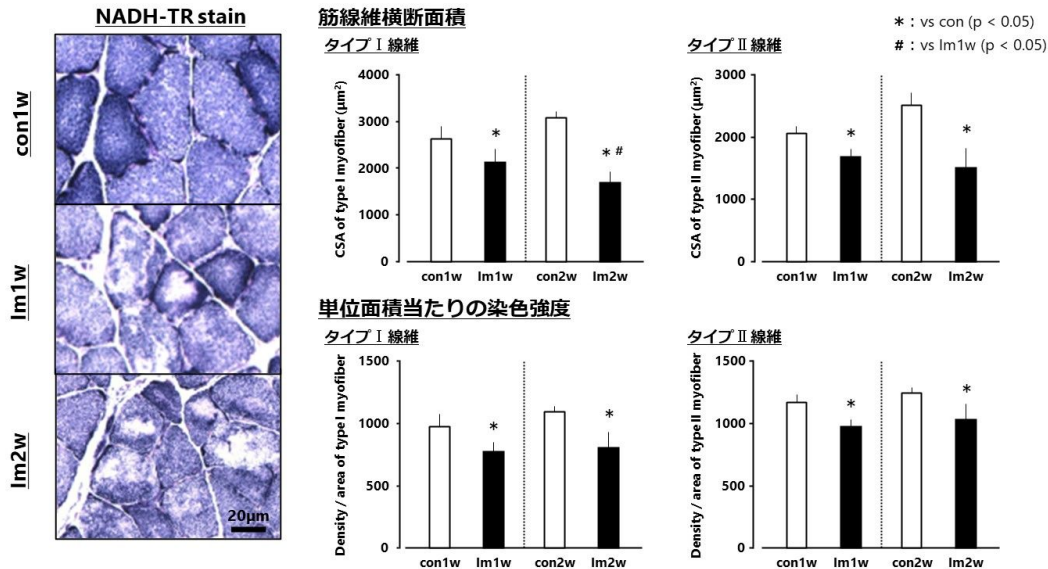


図1 不動に伴うミトコンドリア DNA , mfn-1 , drp-1 の変化

(2) ミトコンドリアの恒常性

NADH-TR 染色像ならびに SDH 染色像を顕鏡した結果、不動 1, 2 週のラットヒラメ筋ではタイプ I 線維の染色性が低下していた。また、各染色像における不動群のタイプ I 線維の筋線維横断面積はいずれの不動期間とも対照群と比較して有意に低値を示し、タイプ II 線維のみ不動 2 週が不動 1 週よりも有意に高値を示した。また、各染色像における不動群の単位面積当たりの optical density はいずれの筋線維タイプとも不動 1, 2 週で対照群より有意に低値を示した (図 2-A, B)。

A) NADH-TR 染色像に対する検索



B) SDH 染色像に対する検索

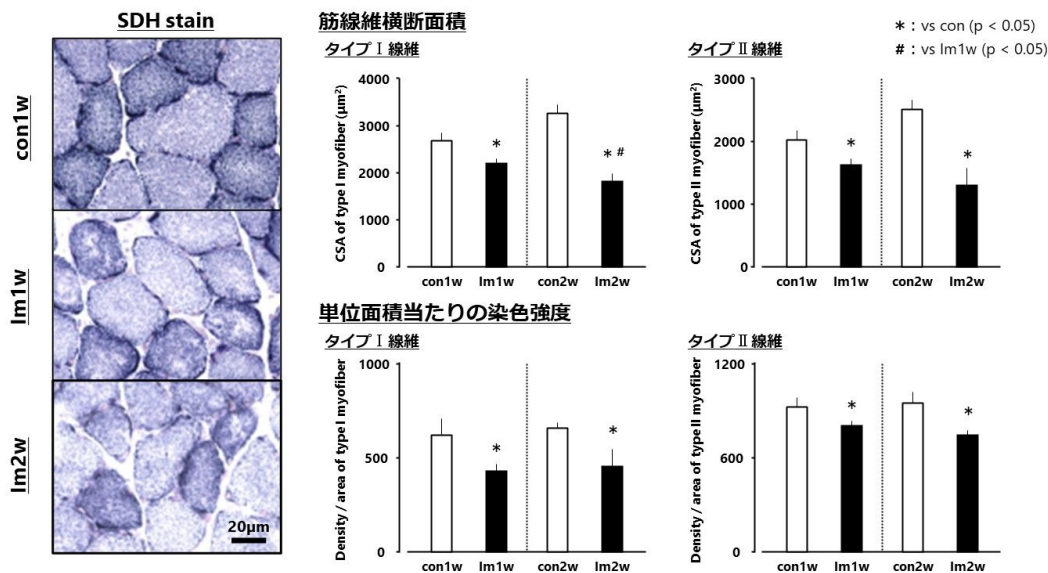


図 2 不動に伴うミトコンドリアの恒常性の変化

(A) は NADH-TR 染色像, (B) は SDH 染色像の検索結果を示す。なお、いずれの染色像とも淡染している筋線維がタイプ I 線維、濃染している筋線維がタイプ II 線維を示す。

(3) ミトコンドリア膜電位

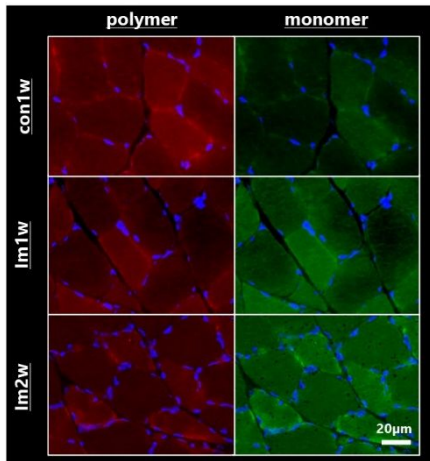
JC-1 染色像

JC-1 染色像を顕鏡した結果、対照群ではミトコンドリア膜電位が正常な場合に発色する polymer が濃染しており、不動 1, 2 週では polymer の染色性が低下していた。一方、対照群ではミトコンドリア膜電位が低下した場合に発色する monomer の染色性が低かったが、不動 1, 2 週では monomer が強く発色していた (図 3-A)。

JC-1 assay

不動群の fluorescence intensity ratio はいずれの不動期間とも対照群と比較して有意に低値を示した (図 3-B)。

A) JC-1 染色像



B) JC-1 assay

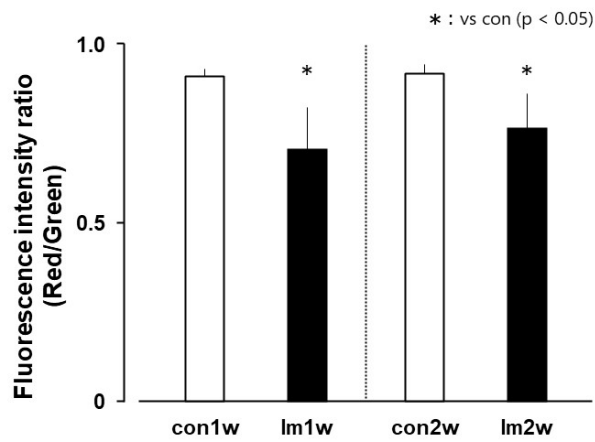


図3 不動に伴うミトコンドリア膜電位の変化

(A)はJC-1染色像,(B)はJC-1 assayの検索結果を示す。なお、JC-1染色像で淡染している筋線維がタイプ 線維、濃染している筋線維がタイプ 線維を示す。

(4) 研究成果に対する考察

以上の結果から、不動状態に曝された骨格筋では mfn-1 の発現低下と drp-1 の発現亢進によってミトコンドリア DNA が減少し、ミトコンドリア膜電位が低下することが明らかとなった。そして、このような変化によって骨格筋におけるミトコンドリアの機能不全が惹起され、筋核のアポトーシスが誘導されることでマクロファージの集積と線維化関連分子の賦活化が引き起こされ、線維化、ひいては筋性拘縮の発生につながったと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka N, Honda Y, Kajiwara Y, Kataoka H, Origuchi T, Sakamoto J, Okita M	4. 巻 65
2. 論文標題 Myonuclear apoptosis via cleaved caspase 3 upregulation is related to macrophage accumulation underlying immobilization induced muscle fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Muscle Nerve	6. 最初と最後の頁 341 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.27473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda Y, Tanaka N, Kajiwara Y, Kondo Y, Kataoka H, Sakamoto J, Akimoto R, Nawata A, Okita M	4. 巻 16
2. 論文標題 Effect of belt electrode-skeletal muscle electrical stimulation on immobilization-induced muscle fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田祐一郎
2. 発表標題 廃用に伴う骨格筋の可塑的变化のメカニズム～筋萎縮・拘縮・疼痛に対する新たな物理療法戦略～
3. 学会等名 第2回日本物理療法研究会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田祐一郎, 梶原康宏, 大賀智史, 田中なつみ, 吉村萌華, 高橋あゆみ, 坂本淳哉, 縄田 厚, 沖田 実
2. 発表標題 HIF-1 を標的とした筋性拘縮の新規介入戦略の開発に関する研究—電気刺激誘発性筋収縮運動に着目して
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村萌華, 高橋あゆみ, 梶原康宏, 田中なつみ, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 ベルト電極式骨格筋電気刺激を用いた筋収縮運動が筋性拘縮におよぼす影響
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中なつみ, 本田祐一郎, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 筋性拘縮の発生に関わるマクロファージの集積は活性型caspase-3を介した筋核アポトーシスが関与する
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 吉村萌華, 高橋あゆみ, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 不動化による骨格筋の線維化の発生メカニズムにはミトコンドリアを介した筋核のアポトーシスが関与する
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田祐一郎, 梶原康宏, 佐々木遼, 吉村萌華, 高橋あゆみ, 沖田星馬, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 筋性拘縮の進行に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果検証
3. 学会等名 第28回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田祐一郎, 梶原康宏, 吉村萌華, 高橋あゆみ, 田中なつみ, 佐々木遼, 近藤康隆, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 筋性拘縮の進行過程で実施する電気刺激誘発性単収縮運動の効果検証－異なる電極式デバイスによる比較－
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村萌華, 高橋あゆみ, 梶原康宏, 田中なつみ, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 ベルト電極式骨格筋電気刺激による筋性拘縮の予防効果の検討－筋収縮頻度の影響
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田祐一郎, 梶原康宏, 田中なつみ, 佐々木遼, 吉村萌華, 高橋あゆみ, 沖田星馬, 近藤康隆, 片岡英樹, 坂本淳哉, 縄田 厚, 沖田 実
2. 発表標題 B-SESによる単収縮運動は筋性拘縮の進行を抑制する－単極通電式デバイスとの比較検討－
3. 学会等名 第7回日本骨格筋電気刺激研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村萌華, 高橋あゆみ, 梶原康宏, 田中なつみ, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 B-SESを活用した筋収縮運動による筋性拘縮の予防効果－筋収縮頻度の影響
3. 学会等名 第7回日本骨格筋電気刺激研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 不動化したラットヒラメ筋における線維化と筋線維萎縮に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中なつみ, 本田祐一郎, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 不動によって惹起される骨格筋の線維化の発生メカニズムの探索
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 大賀智史, 近藤康隆, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 筋性拘縮に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果検証—日内介入頻度の影響—
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中なつみ, 本田祐一郎, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 筋性拘縮の発生メカニズムに関わる分子機構の探索
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田祐一郎, 梶原康宏, 田中なつみ, 稲富裕也, 近藤康隆, 片岡英樹, 坂本淳哉, 縄田 厚, 沖田 実
2. 発表標題 不動化したラットヒラメ筋における線維化と筋線維萎縮に対するB-SESの効果 - 日内介入頻度の影響 -
3. 学会等名 第6回日本骨格筋電気刺激研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 大賀智史, 稲富裕也, 片岡英樹, 坂本淳哉, 近藤康隆, 縄田 厚, 沖田 実
2. 発表標題 骨格筋の線維化と筋線維萎縮に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果 - 日内介入頻度の影響 -
3. 学会等名 第27回日本物理療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 稲富裕也, 片岡英樹, 坂本淳哉, 近藤康隆, 縄田 厚, 沖田 実
2. 発表標題 ラットヒラメ筋の筋性拘縮に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中なつみ, 本田祐一郎, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 筋性拘縮の発生メカニズムの探索 - 筋核のアポトーシスを介したマクロファージの集積機序の検討
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原康宏, 本田祐一郎, 田中なつみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 不動の過程におけるHIF-1 阻害薬の先行投与によって電気刺激誘発性単収縮運動の拘縮に対する効果が向上する
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田祐一郎, 田中なつみ, 梶原康宏, 稲富裕也, 片岡英樹, 坂本淳哉, 近藤康隆, 縄田 厚, 沖田 実
2. 発表標題 骨格筋の線維化に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法の介入効果
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中なつみ, 本田祐一郎, 梶原康宏, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 骨格筋の線維化の発生に関わるマクロファージ集積機序の検討
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原康宏, 本田祐一郎, 田中なつみ, 片岡英樹, 坂本淳哉, 沖田 実
2. 発表標題 不動に伴う骨格筋の線維化に対するHIF-1 阻害薬と電気刺激誘発性単収縮運動との併用効果
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 沖田 実, 坂本淳哉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 三輪書店	5. 総ページ数 264
3. 書名 運動器の傷害と機能障害 その病態とメカニズム	

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学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/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	沖田 実 (OKITA Minoru) (50244091)	長崎大学・生命医科学域(保健学系)・教授 (17301)	
研究協力者	坂本 淳哉 (SAKAMOTO Junya) (20584080)	長崎大学・生命医科学域(保健学系)・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------