

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882030

研究課題名(和文)筋性拘縮の発生メカニズムの解明と新たなリハビリテーションの治療戦略の開発

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of muscle contracture and development of the new therapeutic strategies for rehabilitation on muscle contracture

研究代表者

本田 祐一郎 (HONDA, Yuichiro)

長崎大学・病院(医学系)・技術職員

研究者番号：40736344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は筋性拘縮の発生メカニズムを明らかにし、リハビリテーションの新たな治療戦略を開発することが目的である。不動化によって惹起させたラットヒラメ筋の線維化の分子機構を検討した結果、短期の不動ではマクロファージの増加に伴うIL-1 / TGF- $\beta$ 1シグナリングの賦活化が筋線維芽細胞への分化を促し、線維化の発生につながる可能性が示唆された。また、長期の不動では骨格筋に低酸素状態が惹起され、このこととIL-1 / TGF- $\beta$ 1シグナリングの賦活化が相互に作用し、線維化の進行につながると推察された。加えて、単収縮を誘発する電気刺激療法が筋性拘縮に対する治療戦略として有用であることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanism of muscle contracture and development of the new therapeutic strategies for rehabilitation on muscular contracture. The molecular mechanism on immobilization-induced muscle fibrosis in rat soleus muscle was determined in this study. As a result, in the early stages of immobilization, upregulation of IL-1 / TGF- $\beta$ 1 via macrophages might promote fibroblast differentiation that might affect muscle fibrosis. The skeletal muscle became hypoxic in the later stages of immobilization, suggesting that hypoxia influences the progression of muscle fibrosis. In addition, we considered new therapeutic strategies for muscle contracture, electrical stimulation therapy with muscle twitch was effective to muscle contracture.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：不動 筋性拘縮 線維化 マクロファージ IL-1 TGF- $\beta$ 1 低酸素状態 電気刺激

1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定,あるいは痛みや麻痺などによる関節の不動は拘縮と呼ばれる関節運動制限を惹起するが,医療技術や介護施策が進んでいる今日でも臨床症例の多くに拘縮が頻発している事実がある.この背景には,高齢化の進展という生物学的影響に加え,拘縮の発生メカニズムの解明と効果的な治療方法の開発の立ち遅れが大きく影響している.そこで,申請者の所属研究室ではこれまで拘縮の責任病巣として重要とされる骨格筋に着目し,その器質的变化に由来した拘縮,すなわち筋性拘縮の発生メカニズムを解明するための検索を進めてきた.現在までに,筋性拘縮の発生メカニズムには不動によって惹起される骨格筋の線維化が強く関与し,これはサイトカインである TGF- $\beta$ 1 の発現が発端となり,線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が進み,タイプ I・III コラーゲンの過剰増生が生じた結果であることが明らかになっている.しかし,なぜ骨格筋を不動状態に曝すことで TGF- $\beta$ 1 の発現が増加するのかといったサイトカイン発現の上流で関わる分子機構は明らかにできておらず,加えて,不動期間が 4 週以上になると骨格筋内のタイプ I コラーゲンのさらなる増加,すなわち線維化の進行が認められているが,この点の分子機構についても明らかではなく,今後の検討課題となっていた.

2. 研究の目的

本研究の第 1 の目的は所属研究室の成果を踏まえ,不動に伴う骨格筋の線維化のさらに詳細な分子機構を解明し,筋性拘縮の発生メカニズムを明らかにすることにある.さらに,第 1 の目的を明らかにした上で,筋性拘縮に対する新たなリハビリテーションの治療戦略の開発を行うことを第 2 の目的とする.

3. 研究の方法

本研究課題の目的を明らかにするために 2 つの研究テーマを設けた上で実験を進めた.以下,実施した研究テーマ毎にその方法を述べる.

(1) 筋性拘縮の発生メカニズムに関わる分子機構の解明

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 50 匹を使用し,これらを無処置の対照群 (n = 25) 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) でギプス包帯を用いて不動化する不動群 (n = 25) に振り分けた.なお,不動群の不動期間は 1, 2, 4, 8, 12 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, 12, 16, 20 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,マクロファージや筋線維芽細胞の変化を検索するための免疫組織化学的解析ならびに IL-1 $\beta$  や HIF-1 $\alpha$  の変化を検索するための分子生物学的解析に供した.

(2) 筋性拘縮の発生メカニズムを踏まえた新たなリハビリテーションの治療戦略の開発

本実験では前述の筋性拘縮のモデルラットを用い,4 週間ヒラメ筋を弛緩位で不動化した状態のまま,以下の条件で電気刺激療法を実施することで筋性拘縮に対する治療介入を実験的にシミュレーションした.特に,この実験計画で考慮している点は筋性拘縮の発生予防に効果的な至適周波数を決定することにあり,筋力低下や筋萎縮の予防・進行対策として臨床で頻りに適用されている高周波通電 (周波数; 50 ~ 100Hz) による骨格筋の強縮誘発が効果的なのか,それとも低周波通電 (周波数; 5 ~ 10Hz) による骨格筋の単収縮誘発が効果的なのかを検討した.

具体的な方法として,まずギプスによる不動化は刺激電極を下腿後面に貼付した後に行うこととし,以下の条件での電気刺激療法はギプスを装着したまま麻酔下で行うこととした.電気刺激の条件としては,パルス幅を 250  $\mu$  秒に設定し,周波数を 10 Hz とした低周波通電と 50Hz とした高周波通電の 2 条件を設定した.なお,電気刺激療法機器には trio300 (伊藤超短波社製) を使用し,いずれの条件とも通電時間は 1 日 30 分間,治療頻度は週 6 日とし,不動化の期間である 4 週間継続して行った.

実験期間終了後は麻酔下で両側ヒラメ筋を摘出し,右側試料は免疫組織化学的解析に供し,左側試料は分子生物学的解析に供した.なお,具体的な実験モデルの作製手順や検索試料の解析手順に関しては (1) の項と同様である.

4. 研究成果

(1) 筋性拘縮の発生メカニズムに関わる分子機構の解明

マクロファージのマーカーである CD-11b 陽性細胞数ならびに IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量は各不動期間とも不動群は対照群より有意に高値を示したが,不動期間による有意差は認められなかった (図 1, 2).

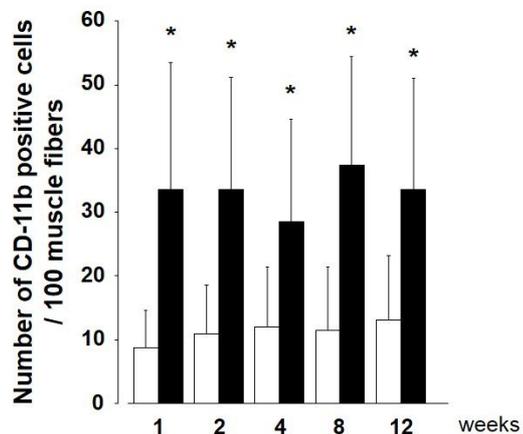
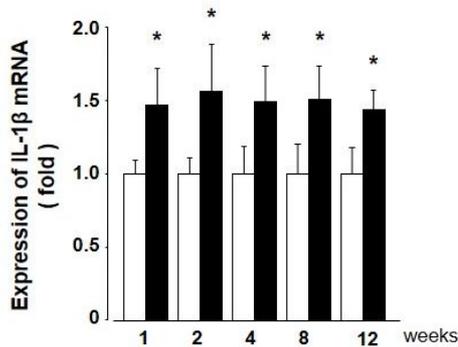
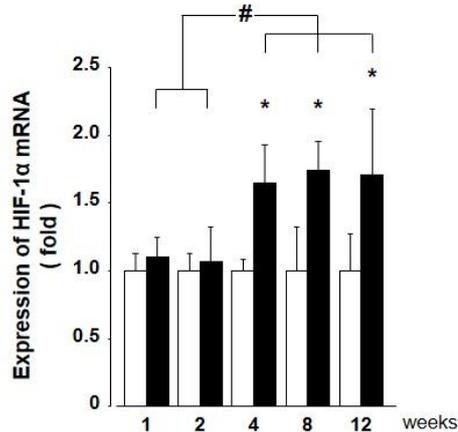


図 1. 不動に伴うマクロファージの変化



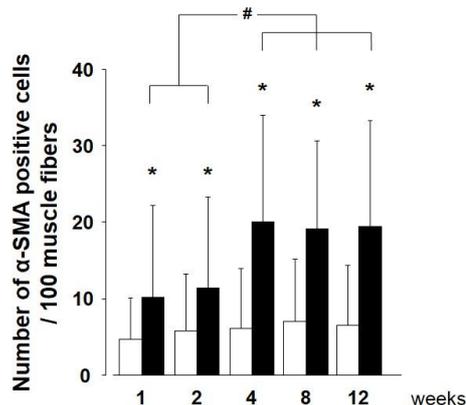
**図 2 . 不動に伴う IL-1β mRNA 発現量の変化**

一方、低酸素状態の指標である HIF-1α の mRNA 発現量は不動 4 週以降において不動群は対照群より有意に高値を示し、不動期間で比較すると不動 4, 8, 12 週は不動 1, 2 週より有意に高値であった (図 3)。



**図 3 . 不動に伴う HIF-1α mRNA 発現量の変化**

さらに、筋線維芽細胞の指標である α-SMA 陽性細胞数は不動群が各不動期間において対照群より有意に高値で、不動期間で比較すると不動 4, 8, 12 週が不動 1, 2 週より有意に高値を示した (図 4)。



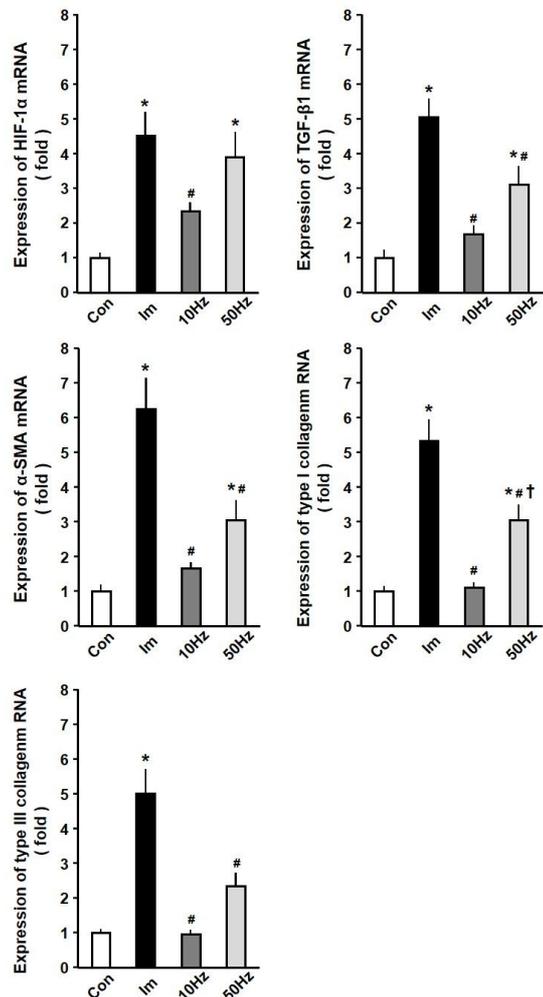
**図 4 . 不動に伴う筋線維芽細胞の変化**

以上の結果とこれまでの所属研究室の成果を踏まえると、1, 2 週間という短期の不動で骨格筋内のマクロファージが増加し、この

ことが IL-18 や TGF-β1 の発現増加を促すとともに、これらの相互作用によって筋線維芽細胞への分化も促され、線維化の発生につながったと推察される。そして、4 週間以上の長期の不動ではヒラメ筋に低酸素状態が惹起され、このことと IL-18 や TGF-β1 の発現増加が相互に作用し、筋線維芽細胞への分化もさらに進み、線維化の進行につながったと推察される。

(2) 筋性拘縮の発生メカニズムを踏まえた新たなリハビリテーションの治療戦略の開発

HIF-1α や TGF-β1, α-SMA, タイプ I コラーゲンの mRNA 発現量は不動群、強縮群ともに対照群に比べて有意に高値であったが、単収縮群と対照群の間には有意差を認めなかった (図 5)。一方、タイプ III コラーゲンの mRNA 発現量は対照群、単収縮群、強縮群の間に有意差を認めず、不動群はこれら 3 群より有意に高値を示した (図 5)。



**図 5 . 不動に伴う線維化関連分子の mRNA 発現量の変化**

以上の結果から不動の過程で骨格筋に単収縮を誘発すると低酸素状態が緩和されるとともに、TGF-β1 の発現抑制や線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化ならびにコラー

ゲン産生が軽減することが示唆され、線維化の進行を抑制する効果が認められた。一方、強縮群の結果から不動の過程で骨格筋に強縮を誘発しても線維化の進行を抑制する効果は認められないといえる。つまり、筋性拘縮の治療戦略に電気刺激を用いる際は、単収縮を誘発する刺激周波数が有用であると推察される。

#### 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5件)

Nakabayashi K, Sakamoto J, Kataoka H, Kondo Y, Hamaue Y, Honda Y, Nakano J, Okita M: Effect of continuous passive motion initiated after the onset of arthritis on inflammation and secondary hyperalgesia in rats. *Physiol Res*. 2016 March 15. [Epub ahead of print]. (査読有)

Honda Y, Sakamoto J, Nakano J, Kataoka H, Sasabe R, Goto K, Tanaka M, Origuchi T, Yoshimura T, Okita M: Upregulation of interleukin-18/transforming growth factor- $\beta$ 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. *Muscle Nerve* 52(3): 419-427, 2015. (査読有)

Morimoto Y, Kondo Y, Kataoka H, Honda Y, Kozu R, Sakamoto J, Nakano J, Origuchi T, Yoshimura T, Okita M: Heat treatment inhibits skeletal muscle atrophy of glucocorticoid-induced myopathy in rats. *Physiol Res* 64(6): 897-905, 2015. (査読有)

吉際俊明, 山口淳子, 宿野真嗣, 福田卓民, 桑田美代子, 本田祐一郎, 沖田 実: 療養型病院入院中の障害高齢者における膝関節伸展可動域制限の予防的介入とリスクファクターについて. *リハビリテーション連携科学* 15(2): 107-113, 2014. (査読有)

沖田 実, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 後藤響, 佐々部陵, 田中美帆: 関節拘縮—最新のトピックス—. *Locomotive Pain Frontier* 3(2):52-54, 2014. (査読無)

##### [学会発表](計13件)

本田祐一郎: 筋性拘縮の発生・進行に関わる分子メカニズムの探索. 日本基礎理学療法学会「基礎理学療法 夏の学校」キックオフミーティング(招待講演), 2016年1月30日~31日, ホテル豊の国(大分県・大分市).

Honda Y, Sakamoto J, Nakano J, Kataoka H, Sasabe R, Goto K, Tanaka M, Tanaka M, Okita M: IL-18/TGF- $\beta$ 1 up-regulation and hypoxia induced in immobilization are related to the molecular mechanisms governing muscle contracture. 第50回日本理学療法学会大会, 2015年6月5日~7日, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区). 後藤 響, 坂本淳哉, 佐々部陵, 本田祐一郎, 近藤康隆, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田 実: 不動によって惹起される皮膚性拘縮における線維化の発生メカニズムに関する検討. 第50回日本理学療法学会大会, 2015年6月5日~7日, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区). 田中美帆, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動期間に伴うラットヒラメ筋の伸張性の変化に関する縦断的検索. 第50回日本理学療法学会大会, 2015年6月5日~7日, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区).

本田祐一郎, 田中美帆, 佐々部陵, 後藤響, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動に伴う骨格筋の伸張性の変化と線維化関連分子の動態変化の関連性. 第47回日本結合組織学会学会大会, 2015年5月15日~16日, コクヨホール(東京都・港区).

後藤 響, 坂本淳哉, 佐々部陵, 本田祐一郎, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田 実: 不動に伴う皮膚の線維化の発生メカニズムに関する検討. 第47回日本結合組織学会学会大会, 2015年5月15日~16日, コクヨホール(東京都・港区).

佐々部陵, 坂本淳哉, 後藤 響, 本田祐一郎, 沖田 実: 不動によるラット膝関節の関節包におけるタイプI・IIIコラーゲンの動態変化に関する検討. 第47回日本結合組織学会学会大会, 2015年5月15日~16日, コクヨホール(東京都・港区).

本田祐一郎, 近藤康隆, 佐々部陵, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動に伴う骨格筋の線維化の分子メカニズムの探索. 第49回日本理学療法学会大会, 2014年5月30日~6月1日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

森本陽介, 近藤康隆, 片岡英樹, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 神津 玲, 中野治郎, 沖田 実: 温熱刺激によるステロイド筋症の進行抑制効果のメカニズムを探る—筋タンパク質の分解と毛細血管新生に関わる分子に着目して—. 第49回日本理学療法学会大会, 2014年5月30日~6月1日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

吉村彩菜, 田中美帆, 原植希世子, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 中野治郎, 片岡英樹, 山下潤一郎, 沖田 実: 電気刺激を用い

た筋収縮運動の収縮様式の違いがラットヒラメ筋の線維化ならびに拘縮におよぼす影響。第 49 回日本理学療法学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。  
田中美帆, 中村早紀, 本田祐一郎, 近藤康隆, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 運動方法の違いがラットヒラメ筋の筋性拘縮におよぼす影響—ストレッチと歩行運動の比較—。第 49 回日本理学療法学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。  
中村早紀, 田中美帆, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 森本陽介, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田 実: 短時間の歩行運動ならびに温熱負荷の併用による筋萎縮と拘縮の進行抑制効果の検討。第 49 回日本理学療法学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。  
青木久実, 橋爪稚乃, 本田祐一郎, 田中美帆, 中願寺風香, 寺中 香, 関野有紀, 中野治郎, 沖田 実: ラット膝関節炎モデルに対する前肢を用いた運動が腫脹や痛みにおよぼす影響。第 49 回日本理学療法学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

〔図書〕(計 1 件)

本田祐一郎, 吉際俊明, 桑田美代子: 拘縮に対する治療戦略。エンド・オブ・ライフケアとしての拘縮対策 - 美しい姿で最後を迎えていただくために(福田卓民, 沖田 実(編)), 三輪書店, 2014 (総ページ数 192), pp85-122。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic\\_pt/index.html](http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 祐一郎 (HONDA, Yuichiro)  
長崎大学・病院(医学系)・技術職員  
研究者番号: 40736344

(2) 研究協力者

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

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授  
研究者番号: 20380834

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Jyunya)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授  
研究者番号: 20584080