

不動の過程における周期的な単収縮の誘発が 骨格筋の線維化に及ぼす影響

川寄真理子・田中美帆

要旨

本研究では、不動の過程において電気刺激を用いて周期的な単収縮を誘発することが、骨格筋の線維化にどのような影響を及ぼすのかを、その標的分子の動態変化から検討した。Wistar 系雄性ラット 20 匹を無作為に①4 週間通常飼育する対照群 (n=5), ②4 週間両側足関節を最大底屈位でギプス固定する不動群 (n=7), ③4 週間のギプス固定中に下腿三頭筋に対して電気刺激を用いて単収縮を誘発する不動+刺激群 (n=8) に振り分けた。結果、不動+刺激群は不動群に比べ関節可動域制限の進行が抑制され、不動群に認められた線維化の標的分子の mRNA の発現増加も不動+刺激群では抑制されていた。したがって、不動の過程において周期的な単収縮を誘発することで、骨格筋由来の拘縮の発生を軽減できることが示唆され、この結果は拘縮の治療の一助になると考える。

はじめに

長期臥床やギプス固定などの関節の不動は関節拘縮 (以下、拘縮) を引き起こし、ADL や QOL の低下につながる。そして、先行研究によればこの拘縮の責任病巣の中心は骨格筋にあり、その主な病態は骨格筋の伸張性低下といわれている¹⁾。骨格筋の伸張性低下は、コラーゲンから構成される筋膜の変化に由来するところが大きく、具体的には、不動状態に曝らされた骨格筋ではコラーゲン含有量が増加し、筋周膜や筋内膜には肥厚が認められるという²⁾。つまり、不動によって骨格筋にはコラーゲンの増生に伴う線維化が発生し、このことが伸張性低下の一因になっている可能性が高い²⁾。しかし、不動による骨格筋の線維化の発生メカニズムに関しては、その詳細は明らかになっていない。

一方、肺線維症や肝硬変などに代表される内臓器の線維化の発生メカニズムに関しては分子レベルにまで掘り下げられて解明が進んでいる。具体的には、内臓器の線維化は炎症が発端となることがほとんどで、このイベントが線維芽細胞を刺激し、線維化の主要サイトカインとされるトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor; 以下、TGF)- β の発現増加を促すといわ

れている³⁾。そして、TGF- β が線維芽細胞を活性化し、コラーゲン産生を促すとともに、線維芽細胞の亜型である筋線維芽細胞への分化も促し、コラーゲン産生は加速するとされている⁴⁾。また、最近の研究によれば、線維芽細胞が筋線維芽細胞へ分化する過程においては低酸素状態がその促進因子として深く関与していることが明らかになっている⁵⁾。

一方、不動に伴う骨格筋の線維化に関しても炎症に起因する点を除けば、前記した内臓器の線維化の発生メカニズムに類似した変化が認められるとした報告が散見される。例えば、Hondaら⁶⁾は 1 週間という短期の不動でラットヒラメ筋には TGF- β mRNA の発現増加が認められたと報告している。また、組織の低酸素状態を示唆する低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor; 以下、HIF)-1 α に関しては mRNA レベルでも、タンパクレベルでも 4 週間という比較的長期の不動によってラットヒラメ筋で発現増加が認められている⁶⁾、⁷⁾。そして、骨格筋の線維化は不動期間の影響を受けることも明らかになっており、特にラットヒラメ筋を検索材料とした報告では不動 4 週間まではその期間に準拠して線維化も顕著なものになるとされている⁸⁾。つまり、以上のような先行研究の結果を踏まえると、不動によって骨格筋の低酸素

状態が惹起されることが線維化の進行に直接的に影響していると推察される。

そこでわれわれは、不動化した骨格筋に対して何らかの刺激を加えることで低酸素状態を緩和することができれば、線維芽細胞が筋線維芽細胞へ分化するのを防ぎ、線維化の発生を抑制、ひいては拘縮の進行抑制につながるのではないかと仮説を立てた。そして、具体的な理学療学的方法としては電気刺激による筋収縮の誘発に着目した。電気刺激の効果には疼痛軽減や筋力増強などがあるといわれているが⁹⁾、拘縮に対する効果に関しては報告の数が少ないのが現状である。その中で、沖ら¹⁰⁾は10Hzの電気刺激によって1日5分間ラットヒラメ筋に単収縮を誘発し、これを週3回の頻度で実施すると、不動によって惹起されるヒラメ筋内の結合組織の増生ならびにその伸張性低下が軽減したと報告している。しかし、この報告では骨格筋の線維化のメカニズムに関与すると思われる各種標的分子の動態変化に対する電気刺激の影響については明らかにされていない。

そこで、本研究では不動の過程において電気刺激を用いて周期的な単収縮を誘発することが、骨格筋の線維化にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、線維化の標的分子の動態変化から検討した。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット20匹を用い、これらを無作為に4週間通常飼育する対照群(n=5)、4週間両側足関節を最大底屈位でギプス固定する不動群(n=7)、4週間のギプス固定の過程においてギプスを装着したまま電気刺激を用いて下腿三頭筋に単収縮を誘発する不動+刺激群(n=8)に振り分けた。なお、今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ、長崎大学先端生命科学支援センター動物実験施設で実施した。

2) 足関節のギプス固定の方法

不動群と不動+刺激群の各ラットに対してはペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投

与によって麻酔を行い、両側足関節を最大底屈位の状態で前足部から膝関節上部までギプス固定した。なお、不動+刺激群においては下腿三頭筋の筋腹にリード線付き双極式電極を貼付し、リード線の末端はギプスから露出させた上でギプス固定を行っている。そして、ギプス固定の際の留意事項として、両群とも足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、ギプスの緩みや浮腫の発生を認めた場合には麻酔下で適宜巻き替えを行った。また、両群のラットはギプス固定中も前肢にて飼育ケージ内を移動でき、水と餌は自由摂取とした。

3) 電気刺激の方法

不動+刺激群の各ラットに対しては、週6日の頻度で腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与し、麻酔を行った後、ギプス固定を行った状態で以下の方法にて下腿三頭筋に単収縮を誘発した。具体的には、ギプスから露出させた双極式電極のリード線に電気刺激装置(Trio300;伊藤超短波社製)を接続し、沖ら¹⁰⁾の報告を参考に周波数10Hz、パルス幅250 μ sの刺激条件で1日30分間、電気刺激を行い、下腿三頭筋に周期的な単収縮を誘発した。なお、麻酔による成長不良などの影響を排除する目的で、対照群と不動群の各ラットに対しても同頻度で麻酔のみを行った。

2. 検索方法

4週間の実験期間中は週1回の頻度で後述する方法で各群すべてのラットの足関節背屈可動域を測定し、拘縮の進行状況を評価した。また、実験期間終了後はペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によって各群のラットを麻酔し、体重ならびに足関節背屈可動域を測定した後にヒラメ筋を採取し、後述する組織学的・分子生物学的検索に供した。

1) 足関節背屈可動域の測定方法

麻酔したラットを側臥位とし、股・膝関節を他動的に最大屈曲させ、足底部に丸型テンションゲージ(大場製作所製)の先端部をあてた。そして、0.3Nの張力で足関節を他動的に背屈させた際の背屈角度を測定し、これを背屈可動域として採用した。背屈可動域の測定は腓骨外果に角度器の中心を合わせ、基本軸を膝関節裂隙中

央部と腓骨外果を結んだ線, 移動軸を腓骨外果と第 5 中足骨頭を結んだ線とし, これらの軸がなす外角を 5° 単位で読み取った. なお, 以上の測定は 3 回行い, その最大値をデータとして採用した.

2) 材料採取

体重ならびに足関節背屈可動域の測定が終了した後に両側からヒラメ筋を採取した. そして, 右側試料については電子天秤にて筋湿重量を測定し, その後, 組織学的検索に供した. 一方, 左側試料については分子生物学的検索に供した.

3) 組織学的検索

右側試料は筋腹中央部で 2 分割し, トラガントガムに包埋後, 液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結した. 凍結した試料はクリオスタット(Leica 社製)を用いて 7 μ m 厚の横断切片を作製し, 以下の染色を実施した. 具体的には, 組織病理学的検索のために Hematoxylin & Eosin (以下, H&E) 染色を, 筋周膜ならびに筋内膜を構成するコラーゲンを可視化するために Picrosirius Red 染色を施し, 光学顕微鏡で顕鏡した. また, H&E 染色像は 100 倍の拡大像でコンピュータに取り込み, 画像解析ソフト(Scion Image)を用いて 1 筋につき 100 本以上の筋線維直径を計測した.

4) 分子生物学的検索

左側試料は real time reverse transcription polymerase chain reaction (以下, real time RT-PCR) 法にて低酸素状態のマーカーである HIF-1 α , 線維化の主要サイトカインである TGF- β , 筋線維芽細胞のマーカーである α -平滑筋アクチン(smooth muscle actin; 以下, SMA)ならびに骨格筋内の主要なコラーゲンタイプであるタイプ I・IIIコラーゲンそれぞれの分子の mRNA 発現量を検索した. 具体的には, 左側ヒラメ筋から抽出した RNA を逆転写することで鋳型となる cDNA を作製し, real time PCR 機器(Mx 3005P; Agilent Technologies 社製)を用いて, この cDNA の増幅処理を行い, SYBR Green 法に基づいて定量化を行った. なお, 内因性コントロールには glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase (以下, GAPDH)を用い, 各分子の mRNA 発現量を GAPDH のそれで除し, データとして採用した.

5) 統計処理

各群の足関節背屈可動域, 筋湿重量を体重で除した相対重量比, 筋線維直径ならびに各分子の mRNA の発現量を各群で比較するため, 一元配置分散分析(以下, ANOVA)を適用し, 有意差を判定した. そして, ANOVA にて有意差を認めた場合は, 事後検定として Scheffe の方法を適用し, 有意差を判定した. なお, すべての統計手法とも有意水準は 5%未満とした.

結果

1. 相対重量比

相対重量比の平均値は, 対照群 0.38mg/g, 不動群 0.23mg/g, 不動+刺激群 0.23mg/g であり, 不動群と不動+刺激群は対照群と比較して有意に低値を示した. また, 不動群と不動+刺激群の間に有意差は認められなかった.

2. 筋線維直径

筋線維直径の平均値は, 対照群 45.9 μ m, 不動群 34.3 μ m, 不動+刺激群 32.9 μ m であり, 不動群と不動+刺激群は対照群と比較して有意に低値を示した. また, 不動群と不動+刺激群の間に有意差は認められなかった.

3. 足関節背屈可動域

不動群における足関節背屈可動域の平均値は, 各不動期間とも対照群のそれと比較して有意に低値を示し, 不動期間の延長に伴って低下した. また, 不動+刺激群は各不動期間とも不動群と比較して有意に高値を示し, 不動期間の延長に伴う低下は不動群よりも軽度であった(図 1).

4. 各分子の mRNA 発現量

1) HIF-1 α mRNA の発現量

HIF-1 α mRNA の発現量は, 対照群 1.47, 不動群 3.27, 不動+刺激群 2.05 であり, 不動群は対照群と比較して有意に高値を示した. 一方, 不動+刺激群は不動群と比較して有意に低値を示し, 対照群との間にも有意差を認めなかった(図 2A).

2) TGF- β mRNA の発現量

TGF- β mRNA の発現量は、対照群 1.01, 不動群 2.62, 不動+刺激群 1.48 であり、不動群は対照群と比較して有意に高値を示した。一方、不動+刺激群は不動群と比較して有意に低値を示し、対照群との間にも有意差を認めなかった(図 2B)。

3) α -SMA mRNA の発現量

α -SMA mRNA の発現量は、対照群 0.81, 不動群 3.24, 不動+刺激群 1.6 であり、不動群は対照群と比較して有意に高値を示した。一方、不動+刺激群は不動群と比較して有意に低値を示し、対照群との間にも有意差を認めなかった(図 2C)。

4) タイプ I コラーゲン mRNA の発現量

タイプ I コラーゲン mRNA の発現量は、対照群 1.57, 不動群 6.51, 不動+刺激群 3.19 であり、不動群は対照群と比較して有意に高値を示した。一方、不動+刺激群は不動群と比較して有意に低値を示し、対照群との間にも有意差を認めなかった(図 2D)。

5) タイプ III コラーゲン mRNA の発現量

タイプ III コラーゲン mRNA の発現量は、対照群 1.20, 不動群 3.03, 不動+刺激群 2.62 であり、不動群と不動+刺激群は対照群と比較して有意に低値を示した。また、不動群と不動+刺激群の間にも有意差は認められなかった(図 2E)。

5. 組織学的所見

H&E 染色像を顕鏡した結果、すべての群において細胞浸潤や壊死線維の出現といった炎症を示唆する所見は認められなかったが、不動群と不動+刺激群では筋線維萎縮が認められた。また、Picrosirius Red 染色像を顕鏡した結果、不動群、不動+刺激群ともに対照群と比較して筋周膜や筋内膜に肥厚が認められたが、その程度は不動+刺激群が不動群よりも軽度であった(図 3)。

考察

本研究では、不動の過程において電気刺激を用いた周期的な単収縮を誘発することがラットヒラメ筋の線維化にどのような影響を及ぼすのかを、その標的分子の動態変化から検討した。

まず、対照群と比較した不動群の結果をみると、

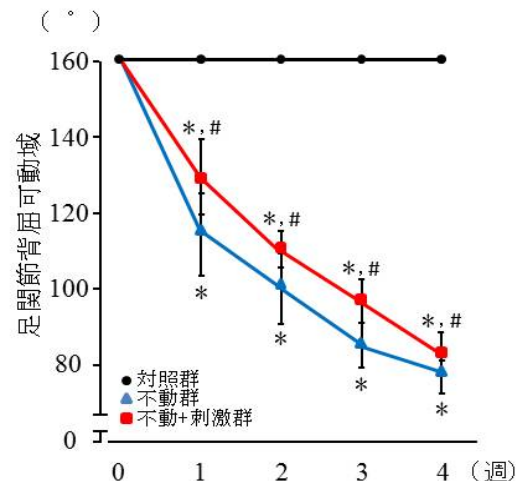


図1 足関節背屈可動域の変化

データはすべて平均値±標準偏差で示す。

*; 対照群との有意差 (P<0.05)

#; 不動群との有意差 (P<0.05)

HIF-1 α mRNA の発現が増加しており、これは先行研究^{6), 7)}でも報告されているように、不動によってヒラメ筋が低酸素状態に陥っていることを示唆している。さらに、線維芽細胞におけるコラーゲン産生や線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促すことが知られている線維化の主要サイトカインである TGF- β ⁵⁾ についても、その mRNA の発現は不動によって増加していた。そして、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA mRNA の発現も不動によって増加しており、これは筋線維芽細胞の増加を示唆していると思われる。また、線維芽細胞や筋線維芽細胞が産生するタイプ I・III コラーゲン mRNA についても不動によって発現が増加しており、Picrosirius Red 染色像の検鏡結果でも不動群では筋周膜や筋内膜において肥厚が認められた。つまり、不動によってヒラメ筋にはコラーゲンの増生に伴う線維化が発生していることは明らかであり、このメカニズムには上記の標的分子の動態が関与していると思われる。加えて、不動群には顕著な足関節背屈可動域制限が認められ、これは、拘縮の発生を意味し、その要因の一つとしてヒラメ筋の線維化が関与していることは先行研究²⁾の結果からも明らかであろう。

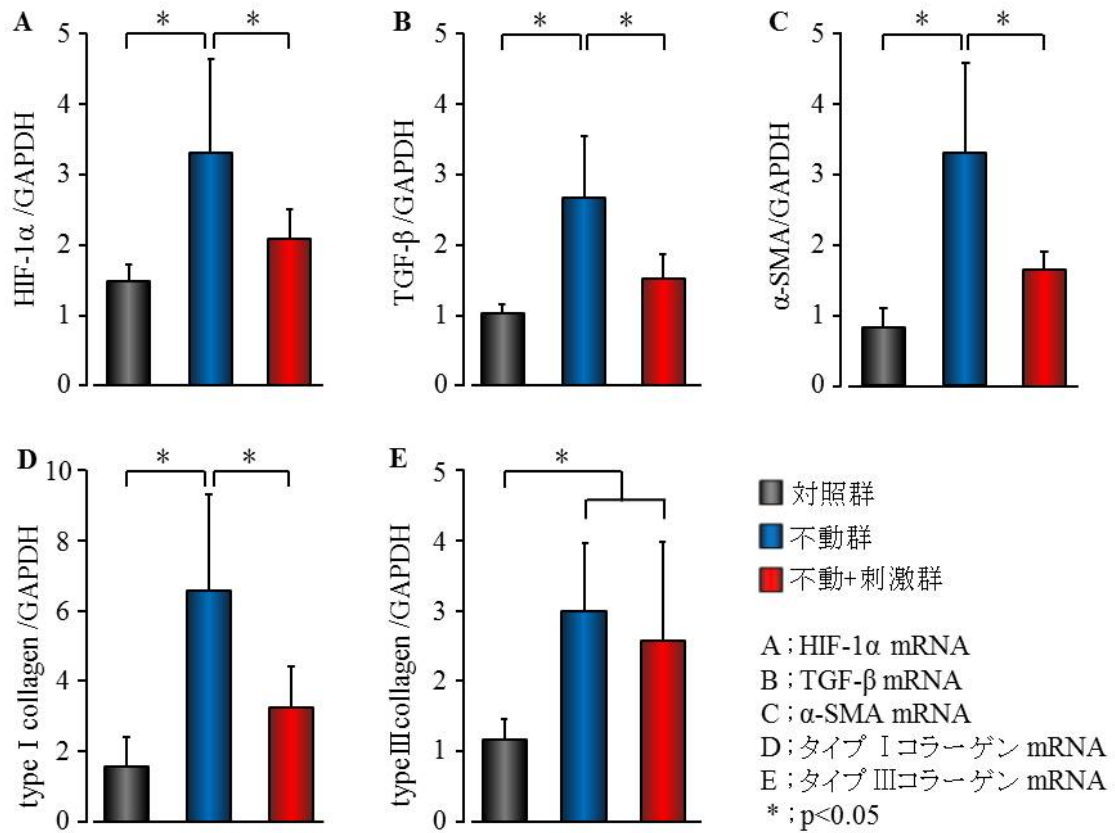


図2 各分子の mRNA 発現量
 データはすべて平均値±標準偏差で示す。

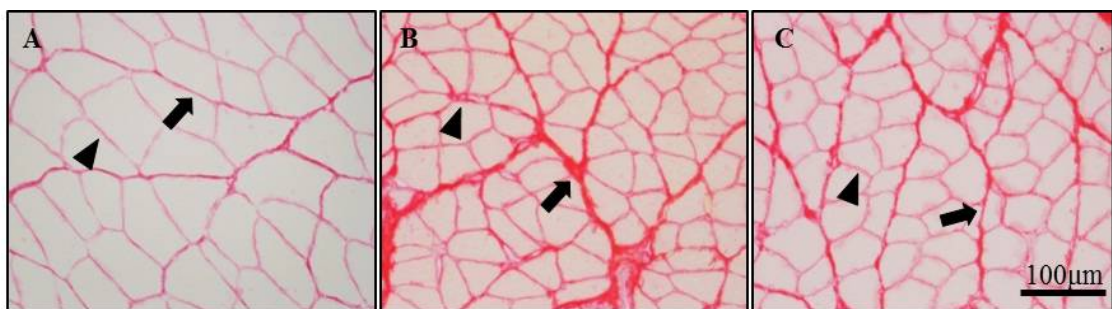


図3 Picrosirius Red 染色像
 A; 対照群, B; 不動群, C; 不動+刺激群
 矢印が筋周膜, 矢頭が筋内膜を示す。

次に、不動群と比較した不動+刺激群の結果をみると、不動の過程で電気刺激を用いて周期的な単収縮を誘発することで、ヒラメ筋における HIF-1 α mRNA の発現が抑制されることが明らかとなった。そして、これは周期的な単収縮によるマッスルポンピング作用が筋内の血流量を増加し、低酸素状態を緩和したのではないかと考えられる。しかし、本研究では実際に筋内の血流が増加したか否かについては明らかにできておらず、この点については今後の検討課題である。ただ、その他の線維化の標的分子に関しても、タイプ III コラーゲンを除けばすべて mRNA の発現が抑制されており、Picrosirius Red 染色像の検鏡結果においても筋周膜や筋内膜の肥厚は不動群より軽度であり、これらのことから、不動+刺激群のヒラメ筋における線維化の発生は不動群より軽度であるといえよう。そして、不動+刺激群の足関節背屈可動域制限は不動群より軽度であり、これは拘縮の進行が抑制されていることを意味し、ヒラメ筋における線維化の発生が軽度であったことが影響していると思われる。加えて、相対重量比や筋線維直径の結果からわかるように、今回の電気刺激の条件では不動によって惹起される筋萎縮の進行は抑制できておらず、筋線維サイズの変化が線維化の発生に影響している可能性は低いのではないかとと思われる。

以上のことから、不動の過程においても骨格筋に周期的な単収縮を誘発するだけで、当該筋の低酸素状態が緩和され、線維化の主要サイトカインである TGF- β の発現や、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が抑制され、結果的に線維芽細胞や筋線維芽細胞でのコラーゲン産生が抑制される可能性が示唆された。つまり、このようなメカニズムによって骨格筋の線維化が軽減されることで、拘縮の進行抑制につながると推察される。そして、このことを支持する先行研究として、HIF-1 α や TGF- β などの検索までには及んでいないが、Blaauboer ら¹¹⁾はヒトの正常肺線維芽細胞を培養し、周期的機械的刺激を 48 時間負荷したところ、 α -SMA やタイプ I・III コラーゲンの mRNA の発現を抑制することができたと報告している。また、Bouffard ら¹²⁾は 1 週間の創傷治癒過程におけるラットの皮下組織を培養し、機械的伸張刺激を最大張力の 20% で 1 日 2 回、

各 10 分間負荷するとタイプ I・III コラーゲンの増生が減少したと報告している。つまり、これらの報告からも筋収縮に代表されるような機械的刺激を頻回に負荷することで、不動によって惹起される骨格筋の線維化の発生を軽減できることが示唆される。そして、本研究はギプス装着下という理学療法士が治療介入することが難しい臨床場面を想定した研究デザインであり、今回の結果はこのような状況での拘縮の治療戦略の一助になると考えられ、今後さらに効果的な方法論について検討していきたい。

謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力頂いた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研究室の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 沖田 実:関節可動域制限の責任病巣, 関節可動域制限—病態の理解と治療の考え方. 沖田 実(編), 三輪書店, 東京, 2008, pp. 70-88.
- 2) 沖田 実, 坂本淳哉, 他:関節可動域制限の発生メカニズム. 理学療法. 2012;29:9-15.
- 3) 山内広平:線維芽細胞の気道リモデリングにおける役割. 喘息. 2007;20:43-48.
- 4) Li Z, Dranoff JA, et al. :Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. Hepatology. 2007;46:1246-56.
- 5) Comito G, Giannoni E, et al. :Stromal fibroblasts synergize with hypoxic oxidative stress to enhance melanoma aggressiveness. Cancer Lett. 2012;324:31-41.
- 6) Honda Y, Kondo Y, et al. :Examination of the molecular mechanism of muscle contracture in immobilized rat soleus muscle. JAPAN-KOREA 1st JOINT CONFERENCE Program and Abstract book. 2012:60.
- 7) 吉村彩菜, 小川千草, 他:不動による骨格筋の線維化における低酸素とサイトカインの関与について. 長崎大学医学部保健学科理学療法学専攻卒業研究論文集. 2010;6:18-24.
- 8) 沖田 実:痛みの発生メカニズム—末梢機構, Pain Rehabilitation—ペインリハビリテーション. 松原 貴子, 沖田 実, 森岡 周(著), 三輪書店, 東京, 2011, pp. 134-177.
- 9) 金子文成:電気刺激療法概論, 物理療法第 2 版. 沖田 実(編), 神陵文庫, 神戸, 2009, pp. 241-266.
- 10) 沖 貞明, 柴田大法, 他:不動性萎縮筋に対する電気刺激の効果—筋性拘縮の発生を抑制できるか?—. 運動・物理療法. 1997;8:53-57.
- 11) Blaauboer ME, Smit TH, et al. :Cyclic mechanical stretch reduces myofibroblast differentiation of primary lung fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2011;404:23-27.
- 12) Bouffard NA, Cutroneo KR, et al. :Tissue stretch decreases soluble TGF- β 1 and type-1 procollagen in mouse subcutaneous connective tissue:evidence from ex vivo and in vivo models. J Cell Physiol. 2008;214:389-395.

(指導教員 沖田 実)