

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650309

研究課題名(和文)末梢神経損傷に対する肝細胞増殖因子投与およびストレッチングの併用効果の検証

研究課題名(英文) Study of combined effect of hepatocyte growth factor and mechanical stretching to the peripheral nerve injured muscle

研究代表者

田中 正二 (TANAKA, Shoji)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：70422657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：脱神経筋モデル動物を用いて、骨格筋の線維化および萎縮因子を指標に伸張運動の効果を検討した。線維化に關与するTGF-beta 1、 α -SMA、collagen、筋量をコントロールするmyostatin、筋特異的ユビキチンキナーゼであるMuRF1、atrogin-1は脱神経によって早期に増加した。さらに脱神経筋に対してゆっくりとした他動的伸張運動を加えたところ、それら因子は伸張運動を加えない群よりも著しく増加した。ゆっくりとした伸張運動は骨格筋の線維化および萎縮を助長するのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Although the electrical stimulation and stretching are often used in rehabilitation to treat denervated muscles, an accomplished treatment method has not been established. We therefore investigated the effect of stretch to skeletal muscle fibrosis and atrophy using an animal model of muscle denervation. The transforming growth factor-beta 1, alpha-smooth muscle actin and collagen which are related to tissue fibrosis, myostatin, which controls the muscle mass, and muscle RING-Finger Protein-1 and atrogin-1, which are muscle specific ubiquitin kinases, were up-regulated in plantaris muscle in early stage of sciatic nerve denervation. Furthermore, these factors were significantly increased after 0.5 times/min passive stretch in denervated muscle compared with non-stretched denervated muscle. These results might suggest that the slow stretching exercise promotes fibrosis and atrophy in denervated muscle.

研究分野：理学療法学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション 脱神経筋 ストレッチ

1. 研究開始当初の背景

何らかの外傷や絞扼により末梢神経損傷を来たした場合、その支配筋は神経支配を失い機能不全に陥るため日常生活に支障を来たすこととなる。現在においても損傷した末梢神経の再生治療は困難であり、自然治癒を待つこととなる。骨格筋は脱神経されると徐々に収縮機能を失い、筋萎縮や筋線維の変性、筋線維タイプの速筋化、筋細胞のアポトーシス、循環不全を引き起こす。何らかの治療的介入がなければ、その退行変性は顕著となり、たとえ再神経支配が成されても機能障害を残存させる場合が多い。末梢神経損傷例に対するリハビリテーションでは、脱神経筋の機能維持としての電気刺激療法が行われているが、その効果については意見が分かるところである。リハビリテーション医学において、如何に脱神経筋の機能維持を図り、障害の残存を防止するかは重要な課題である。近年、脱神経筋に対するリハビリテーション治療としてのストレッチは筋萎縮抑制効果があることが示されているが、そのような報告はまだ少ない。

肝臓をはじめ様々な組織に高い修復作用、抗アポトーシス作用、抗線維化作用、血管新生作用を有する肝細胞増殖因子 (HGF) とその受容体 (c-Met) が、脱神経筋において発現することが報告されている。HGF は閉塞性動脈硬化症の治療薬としても臨床試験が行われている蛋白質であり、骨格筋においては、筋衛星細胞を活性化させることで骨格筋再生に關与する重要な因子である。しかし、脱神経筋における役割はまだ未解明である。

2. 研究の目的

末梢神経損傷後の脱神経筋に対するストレッチと HGF 投与の効果を調査し、ストレッチと HGF による筋萎縮抑制、筋機能維持効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 線維化因子 mRNA および筋萎縮因子 mRNA 発現量の変化

ラット右坐骨神経を切断することで足底筋の除神経を行った。組織は 1、3、5、7、9 日後に採取し、筋湿重量および Real-time PCR 法を用いて線維化の指標として Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)、alpha-smooth muscle actin (SMA)、collagen-type alpha 2 (Col a2) および collagen-type alpha 1 (Col a1)、筋萎縮の指標として myostatin、MuRF1、atrogin-1 mRNA 発現量を調査した。

(2) 脱神経筋に対する他動的伸張運動の効果

ラット右坐骨神経切断後、右足関節に 1 回 / 1 日、20 分間 / 回の他動的伸張運動を加え 7 日後の筋湿重量および TGF- β 1、alpha-SMA、Col a2、Col a1、myostatin、MuRF1、atrogin-1 mRNA 発現量を比較した。ラットは脱神経および麻酔のみ行う脱神経 (Denervation; Den) 群、脱神経後他動的伸張運動を行う脱神経 (Den) + 他動的伸張運動 (Stretch; Str) 群に振り分けた。Den + Str 群は 1 分間に行う伸張運動の回数により、さらには 3 つ群に分類した。Den + Str 群は 1 分間に 12 回の伸張運動を行う Den + 12Str 群、1 分間に 3 回行う Den + 3Str 群、1 分間に 0.5 回行う Den + 0.5Str 群に振り分けた。

(3) 他動的伸張運動による筋損傷の発生

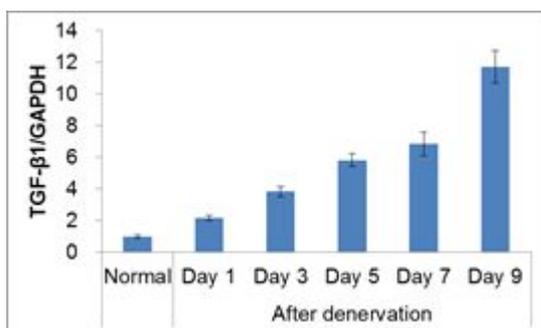
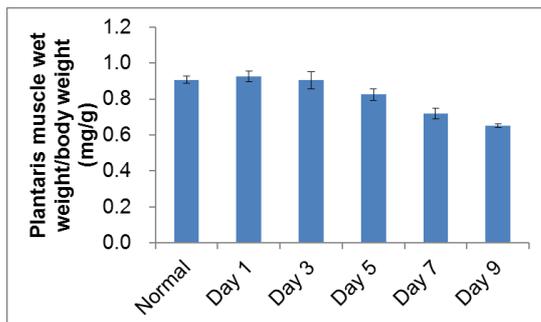
ラット右坐骨神経切断後、右足関節に 20 分間 1 回の他動的伸張運動を加え 3 日後に組織を採取し、ヘマトキシリン エオジン染色およびエバンス・ブルー染色により筋損傷について組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 線維化因子 mRNA および筋萎縮因子

mRNA 発現量の変化

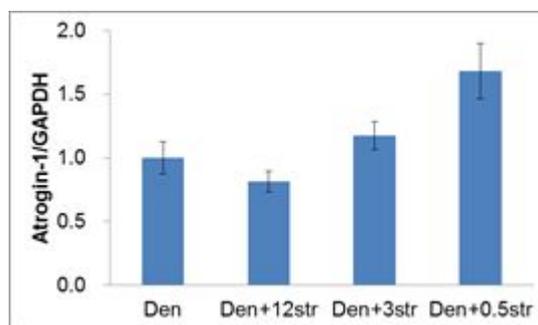
脱神経群の体重に対する足底筋湿重量は対照群の足底筋湿重量に対して、7 日目以降に有意に減少した。TGF- β 1、 α -SMA、Col a2、Col a1 mRNA 発現量は、それぞれ脱神経 3 日後、7 日後、5 日後、5 日後に有意に増加した。また、myostatin、MuRF1、atrogin-1 mRNA 発現量は、それぞれ脱神経 1 日後、3 日後、3 日後に有意に増加した。



(2) 脱神経筋に対する他動的伸張運動の効果

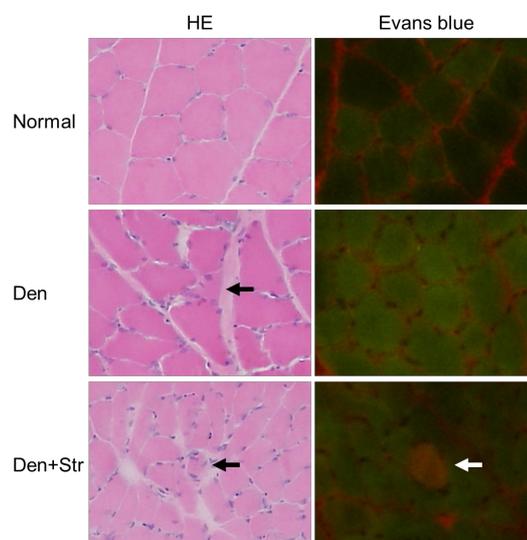
足底筋湿重量は 4 群間で有意な差は見られなかった。

TGF- β 1、 α -SMA、Col a2、Col a1 mRNA 発現量は脱神経後の他動的伸張運動のサイクルが遅いほど増加した。Myostatin、MuRF1 mRNA 発現量は変化しなかったが、Atrogin-1 mRNA 発現量は Den+0.5Str 群で Den 群に対して有意に増加した。



(3) 他動的伸張運動による筋損傷の発生

脱神経群および他動的伸張運動群では若干の筋線維壊死が確認された。また、脱神経群では筋細胞膜損傷はほぼ見られなかったが、他動的伸張運動群ではわずかながら筋細胞膜損傷が見られた。



以上の結果より、坐骨神経切断によって脱神経された足底筋に対する他動的伸張運動によって筋線維化および筋萎縮抑制の効果は認められなかった。むしろ、ゆっくりとした伸張運動は筋線維化および筋萎縮を助長させる可能性が示唆された。

他動的伸張運動は運動速度、伸張保持時間、伸張トルクなど様々な要因により規定される。また、足関節の場合、背屈筋が伸張されている間は底屈筋が短縮位となり、逆に底屈筋が伸張されている間は背屈筋が短縮位となるという関係がある。骨格筋は短縮位に保持されると萎縮しやすいことが知られてお

り、今回の研究では底背屈運動中に短縮位を強制されたことによる萎縮促進効果が見られたのかもしれない。脱神経筋に対する伸張運動の効果に関する先行研究は少なく、効果的な伸張運動の方法は明らかではない。今回の研究結果は、脱神経筋に対してリハビリテーションを行う際の一つの非効果的な方法を提供しているかもしれない。例えば、腓骨神経麻痺による前脛骨筋機能不全に対して、下腿三頭筋の短縮予防のために下腿三頭筋に伸張運動を行う場合があるが、伸張運動中は前脛骨筋が短縮位となる。今回の研究結果から、ゆっくりとした伸張運動によって前脛骨筋は萎縮を助長されることになり、前脛骨筋にとってはむしろ有害な状態を強いられることが推測される。

今後は、他動的伸張運動の運動速度、伸張保持時間、伸張トルク、運動パターンなどそれぞれに線維化や筋萎縮を抑制する方法や助長する方法などを検討し、リハビリテーションの科学的基盤を形成する必要がある。今回、HGF 投与に至らなかった。HGF は脱神経 7 日後頃をピークに発現上昇して筋衛星細胞の活性化を刺激して筋細胞の増殖に働くが、Atrogin-1 は筋細胞増殖に抑制的に働く。この二つのバランスの制御が骨格筋の肥大・萎縮にどのように関与しているのか検討する必要がある。

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)

[その他]

ホームページ等

http://phys_ther.w3.kanazawa-u.ac.jp/staff_10/staff_10.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 正二 (TANAKA, Shoji)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：70422657

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中川 敬夫 (NAKAGAWA, Takao)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：40217675

船越 洋 (FUNAKOSHI, Hiroshi)

旭川医科大学・教育研究推進センター・教授

研究者番号：40273685