

# 本田祐一郎 論文内容の要旨

主 論 文

Upregulation of IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture

IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 の発現と低酸素状態の惹起は  
不動に伴う筋性拘縮の分子メカニズムに關与する

本田祐一郎, 坂本 淳哉, 中野 治郎, 片岡 英樹, 佐々部 陵, 後藤 響,  
田中 美帆, 折口 智樹, 吉村 俊朗, 沖田 実

Muscle and Nerve (2015, in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員: 沖田 実 教授)

## 【緒 言】

ギプスや装具等による関節不動が原因で生じる筋性拘縮は、リハビリテーションの阻害因子となる機能障害である。そして、筋性拘縮の病態には骨格筋内におけるコラーゲンの過剰増生に起因した線維化の発現が關与するとされているが、その分子メカニズムはこれまで明らかになっていない。一方、検索が進められている内臓器等の線維化の分子メカニズムに着目すると、線維化の病変部位にマクロファージが増加することで IL-1 $\beta$  の発現が増加し、この変化が線維芽細胞における TGF- $\beta$ 1 産生を亢進させるといわれている。また、TGF- $\beta$ 1 の産生亢進は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進し、コラーゲンの過剰増生に關与すると指摘されている。さらに、最近では組織が低酸素状態に陥ると、それが刺激となり、TGF- $\beta$ 1 を介した線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進することも明らかになっている。つまり、骨格筋の不動に伴うマクロファージを介した IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 の発現増加や低酸素状態の惹起が線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進し、コラーゲンの過剰増生につながると仮説できるが、この点を検証した報告はこれまでにない。そこで、本研究では不動化したラットヒラメ筋を検索材料に用いて上記の仮説を検証し、不動に伴う骨格筋の線維化の分子メカニズムの探索を行った。

## 【対象と方法】

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 50 匹を用い、両側足関節を最大底屈位で 1, 2, 4, 8, 12 週間ギプスで不動化する不動群 (各 5 匹, 計 25 匹) と同期間、

通常飼育する対照群（各 5 匹，計 25 匹）に振り分け，各不働期間終了後は両側ヒラメ筋を採取した．そして，右側試料から凍結横断切片を作製し，一部にはマクロファージのマーカである CD-11b ならびに筋線維芽細胞のマーカである  $\alpha$ -SMA に対する免疫組織化学染色を施し，筋線維 100 本あたりのそれぞれの陽性細胞数を計測した．また，一部にはタイプ I・III コラーゲンに対する蛍光免疫染色を施し，その発光輝度の画像解析によって筋周膜，筋内膜におけるこれらコラーゲンの発現状況を半定量化した．一方，左側試料は RT-PCR 法に供し，IL-1 $\beta$ ，TGF- $\beta$ 1，HIF-1 $\alpha$ ，タイプ I・III コラーゲンそれぞれの mRNA 発現量を検索した．

### 【結 果】

CD-11b 陽性細胞数ならびに IL-1 $\beta$ ，TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現量は各不働期間とも不働群は対照群より有意に高値を示したが，不働期間による有意差は認められなかった．一方，HIF-1 $\alpha$  の mRNA 発現量は不働 4 週以降において不働群は対照群より有意に高値を示し，不働期間で比較すると不働 4，8，12 週は不働 1，2 週より有意に高値を示した．さらに，不働群における  $\alpha$ -SMA の陽性細胞数は各不働期間において対照群より有意に高値で，不働期間で比較すると不働 4，8，12 週が不働 1，2 週より有意に高値を示した．加えて，タイプ I・III コラーゲンの mRNA 発現量はいずれも各不働期間において不働群が対照群より有意に高値で，不働期間で比較するとタイプ I コラーゲン mRNA 発現量のみ不働 4，8，12 週が不働 1，2 週より有意に高値を示した．また，タイプ I・III コラーゲンの発現状況の半定量解析結果では，筋周膜，筋内膜のいずれにおいても各不働期間において不働群が対照群より有意に高値で，不働期間で比較すると筋内膜のタイプ I コラーゲンのみ不働 4，8，12 週が不働 1，2 週より有意に高値を示した．

### 【考 察】

今回のタイプ I・III コラーゲンの結果は，ヒラメ筋の線維化が 1，2 週間という短期の不働で生じ，不働期間が 4 週間以上におよぶと筋内膜におけるタイプ I コラーゲンの増生が加速し，線維化が進行することを示唆している．そして，この分子メカニズムの探索を行った結果，1，2 週間という短期の不働でマクロファージが増加し，このことが IL-1 $\beta$  や TGF- $\beta$ 1 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働ではヒラメ筋に低酸素状態が惹起され，このことと IL-1 $\beta$  や TGF- $\beta$ 1 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，その結果，タイプ I コラーゲンの増生が加速し，線維化の進行につながったと推察される．