

関節拘縮における滑膜の 分子生物学的変化の検討

外林大輔^{1,2)}、川畑浩久^{1,2)}、吉川徹¹⁾、穴田夏希^{1,2)}、根來信也³⁾

1) 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 2) 森ノ宮医療大学 保健医療学部 3) 兵庫県柔道整復師会



●学 歴

平成14年 順天堂大学 スポーツ健康科学部 卒業
平成17年 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 卒業
平成22年 大阪市立大学大学院医学研究科 修了（医科学修士）

●職 歴

平成17年 医療法人尚信会 河村医院リハビリテーション科 勤務
平成21年 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 専科教員（現在に至る）
平成22年 森ノ宮医療大学 保健医療学部 非常勤講師（現在に至る）

●研究歴

平成23年 森ノ宮医療大学 保健医療学部 理学療法学科 研究員（現在に至る）

●所属学会

日本柔道整復接骨医学会、日本体力医学会、日本臨床スポーツ医学会

【はじめに】

近年の超高齢化社会においては、高齢者の転倒による骨折や脳卒中発症の増加にともない、長期間の安静や臥床を余儀なくされることも多い。しかしながら現在の医療技術は骨折や脳卒中発症リスクの軽減・治療においては著しい成果をあげているものの、長期間の安静臥床で発生する関節拘縮に関しては、従来からの運動療法や物理療法などのリハビリテーションが病態の進行を抑制する唯一の手段である。しかしそれでさえも十分な回復が得られなければ、ADL・QOLは著しく低下する結果となる。

そこで現在関節拘縮に対しては、早期かつ合理的に関節拘縮を予防・治療するさまざまな方法がもちいられている。しかしいずれの方法の効果も最終的な結果である関節可動域の変化のみにとらわれ、根本的な関節構成体の器質的变化を正常化するには至っ

ていない。

このことは関節拘縮に対する治療法の発展を滞らせ、関節拘縮に対する新たな有用な予防法および治療法の開発をも妨げる大きな要因となっていると考えられる。

一方で近年、医科学の分野における“全ての疾患の原因は遺伝子にある”とする革新的な概念は、ヒトの遺伝子や細胞を直接扱う分子生物学などを発達させ、疾患と遺伝子との関連性を次々と解明してきている。さらに再生医学の分野では、疾患の病態だけでなく修復や再生もまた、遺伝子で制御されていることが明らかにされてきている。これらのことは運動器においても例外ではない。すなわち関節拘縮における関節包や滑膜における線維化や軟骨・滑膜の癒着などの病態変化は、さまざまな分子の動態や発現状況に大きな変化がもたらされた結果であるこ

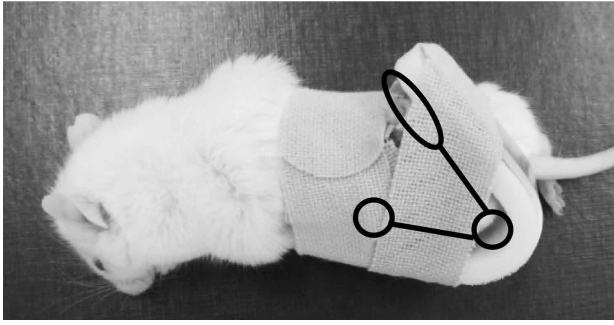


図1. 拘縮モデルの作成方法
(膝関節135°屈曲位)

とが容易に推測される。

しかしながら関節拘縮においては現代医学の主流である分子生物学的アプローチがいまだ不十分であり、関節包や滑膜における各種遺伝子発現状況の変化を捉え、関節拘縮を引き起こす分子の同定や動態を解明するには至っていない。

そこでこの度、従来の治療法のevidenceを明らかにすることを目的とし、関節固定が関節構成体の特に滑膜におよぼす影響について、動物モデルをもちいて組織学および分子生物学的に検討する。

【対象および方法】

1. 対象

対象として10週齢のICR雄マウス35匹を使用した。室温は20~26℃の範囲に収めるようにした飼育室にて、1ケージ内3~4匹で飼育した。また飼料と水は自由に摂取可能とした。なお実験動物の飼育ならびに本実験は森ノ宮医療大学動物実験倫理委員会の承認を得て、森ノ宮医療大学動物実験指針に基づき行われた。

2. 拘縮モデルの作成方法

後肢一侧の膝関節を完全屈曲位（屈曲135°）とし、アルフェンスシーネ（アルケア社：11号）およびテーピング（大和漢社：プロテクターリフレ）を用いて非観血的に固定を行い、関節拘縮を発生させた（図1）。なお固定を施す際、テーピングを巻き付けることによる血行障害を予防するためにできるだけ圧迫が加わらないようにした。固定を施行したものを固定群とし、固定を行わなかった群を非固定群とし、これを対象群とした。いずれの群も実験期間中は、固定部位以外は自由とし、ケージ内を移動

することを可能とし、常時マウスの全身状態に観察、留意し、テーピングが外れそうなものや足背部に浮腫がみられたものは速やかに処置を施した。

3. 関節可動域の測定法

麻酔下でマウスを側臥位にし、膝関節屈筋群に筋収縮が惹起されないことを確認の上、検者が強制的な力を加えないように注意しながら膝関節を他動的に伸展させ、抵抗を感じた角度を最大伸展角度とした。測定角度は5°刻みとし、3回測定した平均値を採用した。

4. 組織標本作製と観察

一定期間固定した後、麻酔薬をもちいて安楽死させ、速やかに膝関節を含め大腿骨、下腿骨を採取した。その際関節包や靭帯は温存し、筋は可能な範囲で除去した。採取した膝関節は4%パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋し、ミクロトームを使用して5μmの厚さで薄切した。

組織観察はヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学的染色を行い、光学顕微鏡下にて観察した。免疫組織染色は、一次抗体としてCTGF（SANTA CRUZ, USA）、CD31（abcam, Japan）のモノクローナル抗体を使用し、DAB発色で検出した。

5. 分子動態の解析

滑膜における種々の分子動態を解析するために、組織採取直後、液体窒素にて凍結させた組織からISOGEN II（日本ジーン）を用いてtotal RNAを抽出し、得られたtotal RNA同量に逆転写反応を行い、cDNAを作製した。これをもとにCTGFおよびVEGFに対する特異的プライマーをもちいて定量的PCRを行った。PCR後それぞれの結果について、GAPDH（ハウスキープ遺伝子）をもちいてサンプル間の補正を行い、発現量を定量的に検討した。

6. 統計分析

群間の有意差検定は、目的に応じて1要因または2要因の繰り返しのある分散分析（ANOVA）を実施し、有意差は危険率5%以下とした。

【結 果】

1. 膝関節伸展可動域

関節を固定し不動化することで膝関節の伸展可動域が固定前では $162.5 \pm 2.7^\circ$ であったものが、1週間後には $144 \pm 5.6^\circ$ 、2週間後には $114 \pm 8.6^\circ$ と可動域制限が顕著に進行し、1週目以降において固定しないものに比べ有意な差が認められた(図2-A、表1-A)。これらの結果より、膝関節の伸展可動域の制限がどの組織に原因があるのか確認するために、1週および2週固定後に膝関節屈筋群を切除した。1週固定後では筋を切除することで固定前の伸展可動域の約90%まで改善したが、2週固定後では筋を切除しても22%の改善しかみられなかった(図2-B、表1-B)。このことで、2週以降の拘縮の責任病巣は筋以外の関節包・滑膜にあることが確認できた。

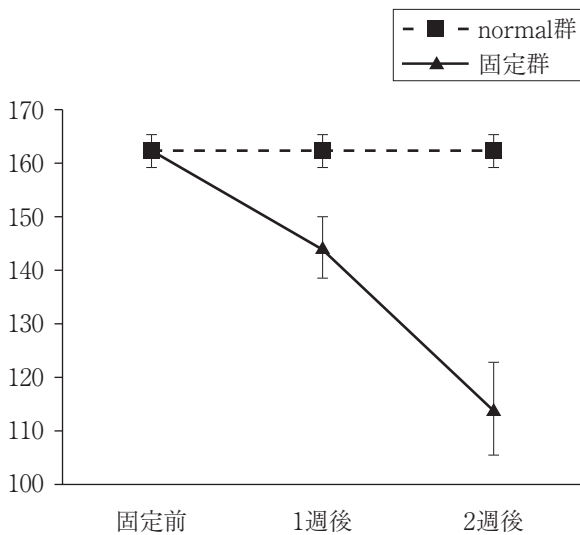


図2-A. 関節固定による膝関節伸展可動域の推移

	固定前	1週固定後	2週固定後
1	165°	140°	110°
2	160°	140°	120°
3	160°	135°	95°
4	160°	150°	120°
5	165°	145°	115°
6	160°	145°	115°
7	165°	150°	120°
8	165°	150°	120°
平均	162.5°	144.37°	114.37°
標準偏差	2.67°	5.62°	8.63°

表1-A. 固定群における膝関節伸展可動域の変化

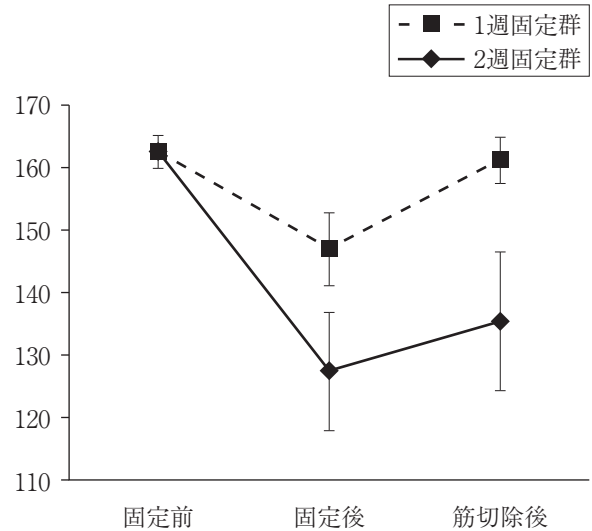


図2-B. 1週間および2週間固定後の筋切除による膝関節可動域制限の変化

	固定前	1週固定後	筋切除後
1	160°	140°	160°
2	160°	145°	155°
3	165°	150°	165°
4	160°	140°	160°
5	165°	150°	165°
6	165°	155°	160°
平均	162.5°	146.67°	160.83°
標準偏差	2.61°	5.77°	3.59°

	固定前	2週固定後	筋切除後
1	160°	125°	135°
2	160°	140°	150°
3	165°	125°	130°
4	160°	130°	135°
5	165°	125°	135°
6	165°	110°	115°
7	160°	135°	145°
平均	162.14°	127.14°	135.0°
標準偏差	2.67°	9.51°	11.18°

表1-B. 1週固定および2週固定群における膝関節屈筋群切除後の膝関節伸展可動域の変化

2. 組織学的所見

ヘマトキシリン・エオジン染色にて非固定群の膝関節を観察すると、膝前面膝蓋靭帯下の滑膜において、関節腔側より滑膜内皮、線維性滑膜、脂肪性滑膜の3層で構成されていた。これに対し固定群2週後の滑膜組織では、滑膜内皮は肥厚し、線維性滑膜において線維性組織の増生が認められた。また興味深いことに滑膜の肥厚に伴い、増生した線維性組織内には新たに血管が認められるようになっていた。さらにこの滑膜内皮の肥厚と線維性組織の増生は、固定期間を延長することで著明に進行した（図3-A, B, C）。

そこでこれらの滑膜の器質的な変化がどのような分子の作用により生じているのかを明らかにするた

め免疫組織化学的染色により、結合組織を増殖させる因子であるCTGF（結合組織増殖因子）の発現部位を確認した。その結果、非固定群の滑膜において、滑膜内皮細胞にわずかにCTGFの発現を認めたが、固定群1週では肥厚している滑膜組織内の線維芽細胞様細胞にCTGFの発現が認められた（図4-A, B, C）。さらに固定群2週後では線維性組織の増生に伴い、CTGF発現細胞は滑膜表層から線維性組織内の深部へと移行していた。

また血管内皮細胞のマーカーとされているCD31も、固定に伴い増生している滑膜組織内に発現細胞が認められ、固定前には血管が存在していなかった滑膜組織内で新生血管が形成されていることが示された（図5-A, B, C）。

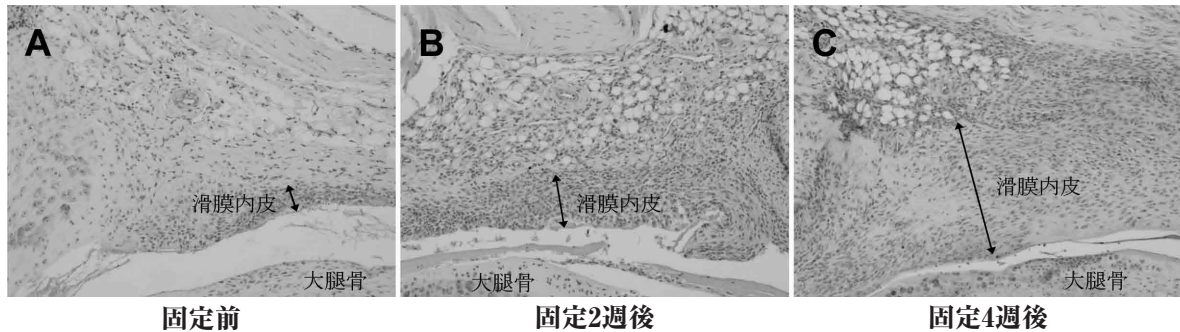


図3. 関節の不動化による膝関節前方滑膜の組織学的変化（ヘマトキシリン・エオジン染色×100）

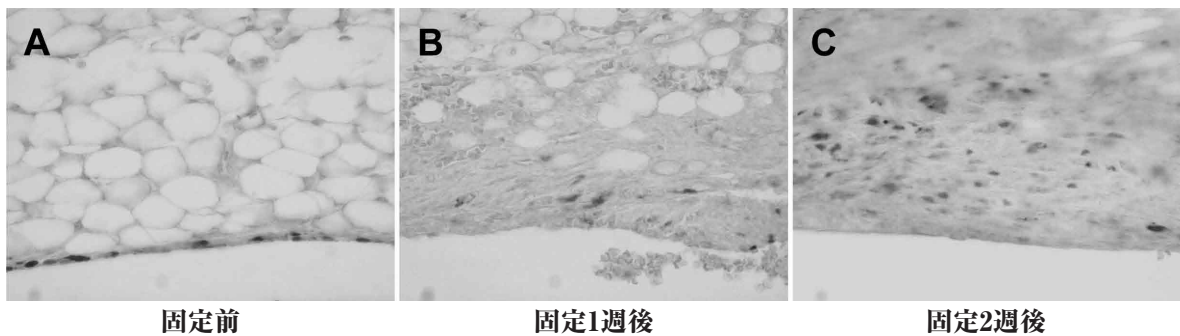


図4. 滑膜組織におけるCTGF発現細胞の分布（免疫組織化学的染色×400）

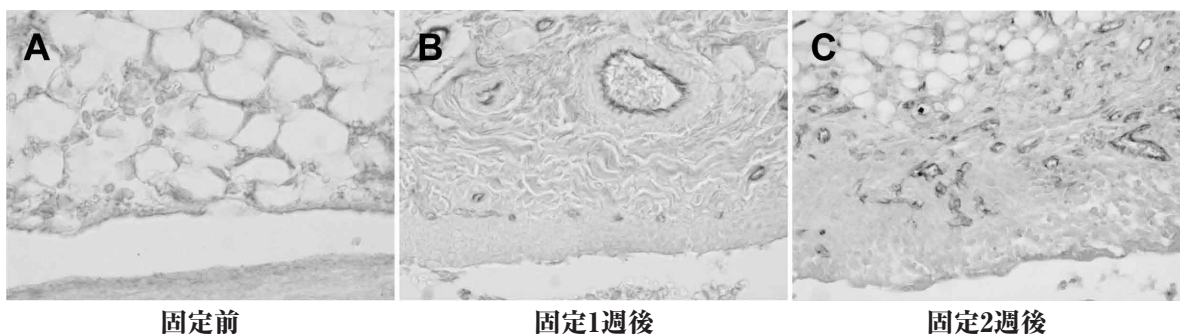


図5. 滑膜組織におけるCD31発現細胞の分布（免疫組織化学的染色×400）

3. 各分子の遺伝子発現状況の変化

各分子の遺伝子発現の変化をReal-Time PCR法をもちいて定量的に検討したところ、CTGFは固定1週後より発現が増加していき(図6-A)、2週後もその発現は維持されていた。

また血管内皮細胞を増殖させる因子であるVEGFについても検討したところ、固定後1週では大きな発現量の変化は認められなかったが、2週後より著しい発現の上昇が認められた(図6-B)。

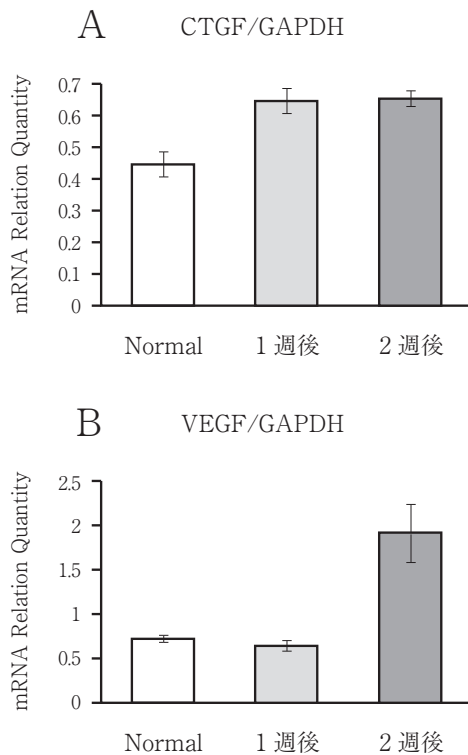


図6. 関節不動化による膝関節の分子動態の定量的変化

【考 察】

今回、関節を固定することにより関節拘縮モデルを作成し、滑膜組織の器質の変化ならびに分子動態を観察していくことで、関節拘縮は時間経過に伴い、その病態がダイナミックに変化していくことが明らかとなった。

関節拘縮の初期においては、可動域制限の原因は筋組織にあるが、安静固定期間の延長により、その原因は滑膜組織に移行していくことや、滑膜組織は初期には伸張性が低下する程度であるが、固定期間の延長により循環障害が発生し、徐々に滑膜組織の線維性組織の増殖が生じ、病的線維化を呈すること

が示された。

とくに滑膜組織の線維化については、先行研究においてもラット膝関節拘縮モデルにおいて滑膜に結合組織の増生と癒着を認めること¹⁾や滑膜細胞の萎縮と滑膜下層の線維増生が生じること²⁾などの報告があり、我々と同様の結果が示されていた。しかしこれらの報告では滑膜組織の線維性組織の増生がどのようなメカニズムで生じるかについては詳細な検討はなされていない。今回我々はこれについて免疫組織化学的、分子生物学的に解析を行い、滑膜組織の線維化に伴うCTGFの発現が上昇することを見いだした。

CTGFは軟骨細胞の分化を制御する分子として同定されたが、その後の研究により細胞増殖、血管新生などにも強く関与していることが明らかになってきている。またCTGFは皮膚組織の創傷治癒過程³⁾や骨折の修復過程⁴⁾などの組織修復過程においても認められる一方で、皮膚の線維化⁵⁾や糸球体硬化症⁶⁾、肺線維症⁷⁾などの病的な線維化の進行に関与していることも指摘されている。今回関節拘縮の滑膜組織においてCTGFの発現が上昇していることから、関節拘縮は単に組織の伸張性が低下したのではなく、滑膜組織に病的な線維化が生じており、とくに関節拘縮の発生初期においてCTGFが滑膜の線維化に大きな役割を果たすことが強く示された。

このように関節拘縮の発症にCTGFが強く関与していることが示唆されたため、その発現が上昇するメカニズムについても検討した。Miyakeらによると、ACL付着部に持続的伸張ストレスを加えることでCTGFの発現が上昇することから⁸⁾、本研究においても固定時に膝屈曲で前方の滑膜に伸張ストレスが加わり、CTGFの発現が促進されたと考えられる。また滑膜組織は関節運動により循環・栄養供給が保たれているが、関節固定では滑膜の伸張・弛緩は起こらず、循環障害、虚血が生じると考えられる。Nishidaらは、関節軟骨において虚血による低酸素状態ではCTGFの発現が誘導されることを報告している⁹⁾。このことから本研究においても関節固定により、滑膜に虚血が生じ、CTGFの発現が促されたと考えられる。すなわち関節を固定することによる滑膜組織への持続的伸張ストレスおよび循環

障害が、滑膜細胞でのCTGFの発現を誘導し、滑膜組織の線維化を促進したと考えられる。

さらに滑膜組織における血管の存在について、先行研究では滑膜や関節包に微小血管の拡張とうっ血が認められた^{10, 11)}としている。しかしながら今回線維化が起こっている滑膜組織ではCD31陽性となる血管内皮細胞が増加していることから、線維化が生じた滑膜組織内に新たな血管が形成されていると考えられる。これは関節拘縮において、滑膜の線維化に伴い、単に滑膜内でうっ血が生じるのではなく、滑膜に局所的な循環障害が生じ、これを機転として血管新生が形成されたことを示している。一般に生体組織に低酸素状態が発生すると、強力に新生血管の形成を誘導するとされているが、これはVEGFの作用による。VEGFは血管形成の一連の過程で血管内皮細胞に特異的に作用する重要な増殖因子で、新生血管形成において管腔形成の促進や内皮細胞の遊走などの作用があり、腫瘍発育の過程¹²⁾やRAの滑膜増生¹³⁾でもVEGFの発現上昇に伴い、腫瘍組織や滑膜組織の増殖がみられることが確認されている。すなわち関節拘縮においても、関節固定による循環障害により滑膜組織にVEGFの発現が促進され、新生血管の誘導やさらなる線維性組織の増生が生じたと考えられる。またさまざまな組織では、低酸素状態を回避するために新生血管が形成されることは必須であると考えられるが、VEGFによって新生された血管は平滑筋細胞の増殖と遊走がみられず、血管の成熟がしないことから¹⁴⁾、VEGFのみによって誘導された未熟な血管は、やがて破綻すると考えられる。すなわちVEGFの発現が上昇するという事は、一見血管が形成され、血流が維持されるように捉えられるが、実際にはこれにより形成された微小血管はいずれ破綻し、組織間同士の癒着を生じ、関節拘縮をさらに進行させると考えられた。したがってVEGFは関節拘縮の病態進展において、大きな役割を果たす分子であると考えられる。

このように、今回我々は関節拘縮の発生および病態進行について組織学的および分子生物学的に検討した結果、関節固定による持続的な伸張ストレスや循環障害はCTGF、VEGFの発現を誘導し、関節拘縮の発生段階および初期段階での病態進行におい

て、滑膜組織に線維化の発生を促進させることが明らかとなった。

最後に本研究が柔道整復師にとって、どのような有益な情報をもたらすのかについて検討した。その結果、関節拘縮の病態の詳細な解析は、従来から行われてきた柔道整復術に明らかなevidenceをもたらすことになることが明らかとなった。すなわち骨折治療において、ギプスにより持続的に一定期間固定すると高度の関節拘縮が生じるが、柔道整復師はかなり早期から骨折部を管理しながら、それ以外の関節を一時的にでも開放し後療法を行っている。これは骨折治癒を妨げず、かつ滑膜に対するストレスを軽減し、関節拘縮を最小限に抑えることができるきわめて有用な方法である。しかもこのような治療が展開できるのは、骨折治療を熟知した柔道整復師であるからこそである。

いいかえると柔道整復師の行う骨折治療法の有用性に明確なevidenceを与える本研究の結果は、柔道整復にとってきわめて重要な知見であるといえる。

【ま と め】

今回我々は関節拘縮の発生および病態進行について組織学的および分子生物学的に検討した結果、関節拘縮の発生および初期での病態進行において滑膜組織に線維化が生じ、CTGF、VEGFという分子が線維化に強く作用することが示唆された。またこれらの器質的な変化を予防および抑制するためには、不動化早期から介入手段が必要であることが示唆された。

【謝 辞】

本研究を進めるにあたり、(社)兵庫県柔道整復師会から研究事業助成をいただきましたことにつきまして心より感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Evans BE, Egger GWN, Butler JK, et al : Experimental immobilization and remobilization of rat knee joint. J Bone Joint Surg Am 42 : 737-758, 1960.
- 2) 由久保 弘明, 細 正博, 武村 啓住, et al, ラット膝関節拘縮 2 週間後における滑膜の病理組織学

- 的变化. 理学療法科学 16 (2) : 77-82, 2001
- 3) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR, Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4 (6) : 637-45, 1993.
- 4) Nakata E, Nakanishi T, Kawai A, Asaumi K, Yamaai T, Asano M, Nishida T, Mitani S, Inoue H, Takigawa M, Expression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) during fracture healing. *Bone* 31 (4) : 441-7, 2002.
- 5) Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K, Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis : A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181 (1) : 153-159, 1999.
- 6) Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, Goldschmeding R, Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 53 (4) : 853-61, 1998.
- 7) Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, Sawai T, Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J* 17 (6) : 1220-1227, 2001
- 8) Miyake Y, Furumatsu T, Kubota S, Kawata K, Ozaki T, Takigawa M, Mechanical stretch increases CCN 2/CTGF expression in anterior cruciate ligament-derived cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409 (2) : 247-252, 2011.
- 9) Nishida T, Kondo S, Maeda A, Kubota S, Lyons KM, Takigawa M, CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN 2/CTGF) regulates the expression of Vegf through Hif-1 alpha expression in a chondrocytic cell line, HCS-2/8, under hypoxic condition. *Bone* 44 (1) : 24-31, 2009
- 10) 渡邊 晶規, 細 正博, 武村 啓住, 由久保 弘明, 松崎 太郎, 小島 聖, 関節拘縮における関節構成体の病理組織学的変化-ラット膝関節長期固定モデルを用いた検討-. 理学療法科学 22 (1) : 67-75, 2007.
- 11) 松崎 太郎, 細 正博, ラット膝関節拘縮モデルを簡便に作成する新たな試みと関節構成体の変化. 金大医保つるま保健学会誌 32 (2) : 43-47, 2008.
- 12) Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G, Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133 (2) : 275-88, 1971.
- 13) Colville-Nash PR, Scott DL, Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis* 51 (7) : 919-25, 1992.
- 14) Morishita R, Aoki M, Hashiya N, Makino H, Yamasaki K, Azuma J, Sawa Y, Matsuda H, Kaneda Y, Ogihara T, Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 44 (2) : 203-9, 2004.

