

廃用性萎縮筋におけるタンパク分解酵素発現の 持続的他動運動による抑制

折口 智樹¹・沖田 実²・坂本 淳哉^{3,5}・坂井 孝行^{1,4}
中野 治郎¹・吉村 俊朗¹・川上 純⁵・江口 勝美⁵

要旨 関節固定をしたラットの筋組織の傷害メカニズムを解明するために、マトリックスメタロプロテアーゼの発現について検討した。8週齢のWistar系雄ラットをギブス固定し、廃用性筋萎縮モデルラットを作成した。2週、4週間固定後にヒラメ筋を採取し、試料とした。固定された筋組織においては、活性化されたGelatinase A (MMP-2) のbandならびにMMP-2 mRNAの発現が認められ、それによって筋組織が傷害されることが示唆された。さらに、これらのMMPの発現は持続的他動運動 (continuous passive motion; CPM) を施行することによって抑制することが可能であった。

保健学研究 19(1): 7-11, 2006

Key Words : 廃用性筋萎縮, 拘縮, マトリックスメタロプロテアーゼ, 持続的他動運動

はじめに

長期間関節を固定すると、関節拘縮や筋肉や骨の萎縮などの合併症をきたすことが知られている¹⁾。物理療法はそのような関節拘縮と廃用性筋萎縮を防ぐことができる。しかし、どのようなメカニズムによって、廃用性筋萎縮が抑制されるかについては、明らかにされていない。

これまでの研究によっても、ラットの足関節をギブス固定した筋においては、筋線維径の縮小や筋節長の短縮、筋原線維の微細形態の変化に加え、筋内膜コラーゲン線維網が変化することが、形態学的に明らかにされている²⁾。また、ストレッチングを施すことでこれらの形態学的変化が改善することがわかってきた²⁾。しかし、これらの形態学的変化が起こるメカニズムについては十分に解明されていない。

最近、いくつかの報告によって骨格筋の萎縮に複雑なタンパク分解システムが関与していることが示唆されている³⁻⁵⁾。筋線維周囲の結合組織は主にマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) のような細胞外タンパク分解酵素や浸潤しているマクロファージから分泌されるリソソーム分解酵素によって壊れる^{4,6,7)}。また、ユビキチンプロテアソーム系やリソソームプロテアーゼ、カルシウム依存性プロテアーゼ (カルパイン) などの細胞内タンパク分解システムも存在する^{4,8,9)}。

さらに、近年関節拘縮と筋萎縮のマウスモデルに対する理学療法の効果について研究されているが、大部分の研究は、形態学的な変化についての報告ばかりである¹⁰⁻¹²⁾。

HurstらやSasaらは、持続的他動運動 (CPM) がラットの萎縮した筋肉の回復に役立つと報告している^{13,14)}。

この研究において、私たちは関節固定したラットの筋線維の変性過程におけるMMPの活性化に注目し、固定ラットの廃用性筋萎縮におけるCPMの生化学的、あるいは分子生物学的効果について報告する。

方 法

1. 実験動物

実験動物として8週齢のWistar系雄ラット20匹を使用した。そして、無作為に10匹を拘縮群に、10匹をCPM群に振り分けた。

2. 関節固定およびCPMの方法

各実験群のラットに、腹腔内にペントバルビタールナトリウム溶液 (40mg/kg) を投与し、麻酔を行った後に右足関節を最大底屈位の状態で膝関節上部から前足部までギブス固定した。ギブスの緩みや足趾の浮腫が発生した際は、適宜巻き替えを行い、継続的にギブス固定した。拘縮群、CPM群とも、5匹は2週間関節を固定し、5匹は4週間関節を固定した。そして、拘縮群の関節固定をしていない左足関節をコントロールの筋肉として使用した。

CPM群には拘縮期間中、週6回の頻度でCPMを実施した。具体的には、酒井医療製アングルストレッチャーを用い、角速度10°/秒で足関節底背屈の他動運動を1日30分間行った。

- 1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科保健学専攻理学・作業療法学講座
- 2 星城大学リハビリテーション学部
- 3 長崎記念病院リハビリテーション部
- 4 虹が丘病院リハビリテーション部
- 5 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座

なお、今回の実験は、長崎大学が定める動物実験指針に順じ、長崎大学医学部附属動物実験施設で実施した。

3. ゲラチンゼイモグラフィー

各固定期間後、麻酔下でヒラメ筋を切離し、試料とした。筋肉サンプルはホモゲナイザーで溶解し、筋肉抽出液を作成した。そして、筋肉抽出液中のタンパク濃度をPIERCE法で測定した。

50 μ g/laneの蛋白量の筋肉抽出液にサンプルバッファーを加えて1mg/mlのゲラチンを含む8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを2.5%のTriton X-100で洗浄し、Triton X-100溶液に0.02%のNaN₃を加えて37℃で16時間インキュベートし、0.1%のCoomassie Brilliant Blue R250で染色した。

4. RT-PCR

RNAを各筋肉サンプルからIsogen（日本ジーン、東京）を使用して抽出した。First-strand DNAは、37℃で90分間oligo dTプライマーを含む反応液を使用して、MuLV reverse transcriptase（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）による逆転写によって合成した。95℃、5分間でタンパクを変性させた後、4℃に置いた。cDNAは、1U Taq DNA polymerase（Gibco BRL）、1mMのプライマー、1.5mM MgCl₂、1.5mM dNTPを含むTaq polymeraseバッファーを添加してPCRによって増幅した。PCRは

Perkin Elmer Cetus社のthermal cyclerで、30サイクル（94℃ 1分間；deanturation, 55℃ 1分間；annealing, 72℃ 1分間；elongation）とfinal extension（72℃ 10分間）を行った。MMP-2に対する特異的なプライマーは次の通りである。MMP-2 sense：5'-GCTGATACTGACACTGGTACTACTG-3'、MMP-2 antisense：5'-CAATCTTTTCTGGGAGCTC-3'。PCRで増幅後、PCR反応液は0.5mg/mlのエチジウムブロマイドw含む1.5%のアガロースゲル上で電気泳動した。

結 果

1. ゲラチナーゼ活性の検出

MMP-2がゲラチナーゼ活性を有することから、私達は筋組織内におけるゲラチナーゼ活性の発現を拘縮群、CPM群において検出した（図1）。ゲラチンゼイモグラフィーによってコントロールの筋肉にも分子量66kDaの位置にゲラチナーゼ活性（潜在型のpro-MMP-2）が検出される。この66kDaのバンドは拘縮2週後に強く誘導された。さらに、この66kDaのバンドの下に活性型のバンド（62kDa）が認められた。一方、これらのバンドの発現は、CPMによって抑制された。

2. MMP-2 mRNAの発現

私達は筋組織からDNAを抽出し、RT-PCR法を用いてMMP-2 mRNAの検出を行った（図2）。拘縮群にお

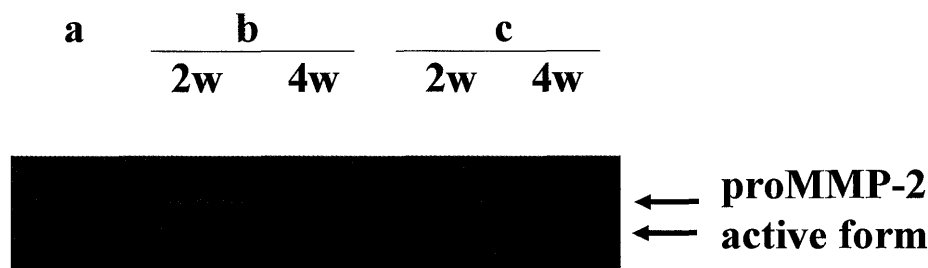


図1. ラットヒラメ筋のゲラチナーゼ活性における拘縮とCPMの効果

拘縮群とCPM群においてゲラチンゼイモグラフィーを用いて、ゲラチナーゼ活性の検出を行った（a；コントロール，b；拘縮群（2週後と4週後），c；CPM群（2週後と4週後）。潜在型のProMMP-2のバンドが66kDaの位置に検出される。拘縮2週後では66kDaのバンドの発現が増強し、その下に活性型のMMP-2のバンドが検出された。

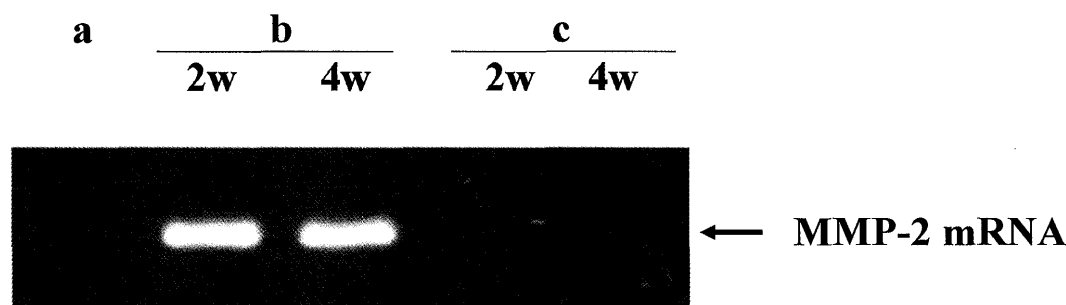


図2. ラットヒラメ筋におけるメッセンジャーRNA発現に対する拘縮とCPMの効果

拘縮群とCPM群においてMMP-2のメッセンジャーRNAの発現についてRT-PCR法を用いて検出した（a；コントロール，b；拘縮群（2週後と4週後），c；CPM群（2週後と4週後）。拘縮群では、2週後、4週後ともにMMP-2のメッセンジャーRNAの発現が増強した。CPM群では、その誘導されたMMP-2のメッセンジャーRNAの発現誘導が抑制された。

いてMMP-2mRNAの発現が認められた。一方、このMMP-2 mRNAの発現誘導は、コントロールの筋組織やCPM群では見られなかった。

考 察

臨床的に長期臥床やギブスや装具によって関節が固定されると、筋肉の弾性は低下し、関節可動域は減少する。Okitaらは、足関節の固定による関節の可動性、筋節長、コラーゲン線維の配列について報告している¹⁾。それによると、足関節の可動性は関節を固定する期間に応じて減少がみられる。筋節長は、固定1週後から短縮し始める。そして、筋内膜のコラーゲン線維の配列は、筋線維の走行に対して平行から円周性のものに変化する。

廃用性萎縮をきたした筋肉においては、微小血管機能の変化がみられる。固定された四肢の筋肉においては、毛細血管の構造変化がみられ、筋肉の変性への関与が示唆されている¹⁵⁾。筋肉の栄養と酸素の供給は、十分な運動によって増進するが、その供給は固定されたラットの筋肉においては減少する。筋肉を固定すると筋肉内の血流が低下し、筋肉の微小環境の栄養状態が悪化し、筋肉とその周囲の細胞外マトリックスを維持することができなくなる。その結果、筋肉は変性へと導かれる。

最近、いくつかの筋疾患、筋損傷、筋固定において特異的な変性機序が報告されている^{4,16-19)}。それらの疾患・病態では特定のMMPsが活性化し、それが細胞外マトリックスの変性や萎縮変化に関与していると報告されている。それらの報告にみられるMMPsの発現のピークは2～4週であった。

MMP-2は、基底膜の構造と活性を維持するのに重要な役割を演ずるタンパク質分解酵素のうちの1つである²⁰⁾。MMP-2は、血流の変化、神経刺激、運動などいろいろな状況下で活性化される²¹⁻²⁶⁾。

私達のゲラチンゼイモグラフィのデータから、ラットのMMP-2が固定2週後から増強されていることがわかった。MMP-2は広範囲にわたる結合組織に存在する細胞によって分泌されて、それらの細胞間のコラーゲン(I～V)の多くを分解する。Giannelliらによって、MMP-2が筋内膜の筋線維鞘に局在していることが明らかにされている。彼らは、MMP-2が筋内膜の線維化において筋組織のリモデリングや変性に関わっているかもしれないと報告している¹⁹⁾。

RT-PCRの結果から、関節固定によるMMP-2の発現の誘導は、メッセンジャーRNAレベルにおいても明らかになった。つまり、関節固定によってMMP-2のメッセンジャーRNAの発現が増強され、そして、その誘導されたMMP-2のメッセンジャーRNAがMMP-2の合成に働いているものと考えられる。

関節を固定すると、関節の可動性、筋節長、コラーゲン線維の配列などにおいて形態学的変化が認められる。今までそれらの変化には筋肉への栄養や酸素の供給が低

下するためと考えられてきたが、今回の研究によって、MMP-2の誘導が重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、このMMP-2の発現はCPM群では蛋白レベルにおいても、メッセンジャーRNAレベルにおいても抑制されており、CPMが廃用性筋萎縮を抑制する効果は、CPMがMMP-2の発現を抑制する機序も関与していることが示唆された。それによって、筋周囲の細胞外マトリックスの破壊の進行が抑制され、筋肉の細胞外からの栄養や酸素の供給が保たれるものと考えられた。

文 献

- 1) Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K: Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle, *J Muscle Res Cell Motil*, 25: 159-166, 2004.
- 2) Okamoto T, Atsuta Y, Shimazaki S: Sensory afferent properties of immobilised or inflamed rat knees during continuous passive movement, *J Bone Joint Surg Br*, 81: 171-177, 1999.
- 3) Carmeli E, Coleman R, Reznick AZ: The biochemistry of aging muscle, *Exp Gerontol*, 37: 477-489, 2001.
- 4) Reznick AZ, Menashe O, Bar-Shai M, Coleman R, Cameli E: Expression of matrix metalloproteinase, inhibitor, and acid phosphatase in immobilized hindlimbs of rats, *Muscle Nerve*, 26: 51-59, 2003.
- 5) Bar-Shai M, Carmeli E, Coleman R, Reznick AZ: Mechanisms in muscle atrophy in immobilization and aging, *Ann N Y Acad Sci*, 1019: 475-478, 2004.
- 6) Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Co; eman R: Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review, *Muscle Nerve*, 29: 191-197, 2004.
- 7) Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN: Acid phosphatases, *Mol, Pathol* 55: 65-72, 2002.
- 8) Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec CY, Schmid HP, Attaix D: Coordinate activation of lysosomal Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle, *Biochem J*, 316: 1116-1122, 1996.
- 9) Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL, Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states, *J Nutr*, 129 (Suppl. 1S): 227S-237S, 1999.

- 10) Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Saiki A : Pathogenesis of the joint contracture and the muscle stretching on the joint contracture, *J Invest Phys Ther*, 3 : 29-36, 2000.
- 11) Brown M, Hasser EM : Weight-bearing effects on skeletal muscle during and after stimulated bed rest, *Arch Phys Med Rehabil*, 76 : 541-546, 1995.
- 12) Alley KA, Tompson LV : Influence of stimulated bed rest and intermittent weight bearing on single skeletal muscle fiber function in aged rats, *Arch Phys Med Rehabil*, 78 : 19-25, 1997.
- 13) Hurst JE and Fitts RH : Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function : protective effect of isometric exercise, *J Appl Physiol*, 95 : 1405-1417, 2003.
- 14) Sasa T, Sairyō K, Yoshida N, Fukunaga M, Koga K, Ishikawa M, Yasui N : Continuous muscle stretch prevents disuse muscle atrophy and deterioration of its oxidative capacity in rat tail-suspension models, *Am J Phys Med Rehabil*, 83 : 851-856, 2004.
- 15) Oki S, Desaki J, Matsuda Y, Okumura H, Shibata T : Capillaries with fenestrae in the rat soleus muscle after experimental limb immobilization, *J Electron Microsc*, 44 : 307-310, 1995.
- 16) Choi YC, Dalakas MC, Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies, *Neurology*, 54 : 65-71, 2000.
- 17) Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, Gearing AJ, Gold R, Toyka KV, Hartung HP : Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies, *Brain*, 124 : 341-351, 2001.
- 18) Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S < Fournier JG, Verdier-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS : Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle : a study in experimentally injured and mdx muscles, *Dev Biol*, 205 : 158-170, 1999.
- 19) Giannelli G, De Marzo A, Marinosci F, Antonaci S : Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy, *Histol Histopathol*, 20 : 99-106, 2005.
- 20) Frisdal E, Teiger E, Lefaucheur JP, Adnot S, Planus F, Lafuma C, D'Ortho MP : Increased expression of gelatinases and alteration of basement membrane in rat soleus muscle following femoral artery ligation, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26 : 11-21, 2000.
- 21) Chin JR, Werb Z : Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration, and cartilage in the mandibular arch, *Development*, 124 : 1529-1530, 1997.
- 22) Singh A, Nelson-Moon ZL, Thomas GJ, Hunt NP, Lewis MP : Identification of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors type 1 and 2 in human masseter muscle, *Arch Oral Biol*, 45 : 431-440, 2000.
- 23) Gieson VEJ, Skalak TC : Chronic vasodilation induces matrix metalloproteinase 9 expression during microvascular remodeling rat skeletal muscle, *Microcirculation*, 8 : 25-31, 2001.
- 24) Schoser BG, Blottner D : Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle, *Neuroreport*, 10 : 2795-2797, 1999.
- 25) Koskinen SO, Kjaer M, Mohr T, Sorensen FE, Duuronen T, Takala TE : Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle : effect of functional electrical stimulation, *Muscle Nerve*, 23 : 580-589, 2000.
- 26) Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM, Kjaer M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, Takala TW : Acute exercise induced changes in rat skeletal mRNAs and proteins regulating type IV collagen content, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280 : R1292-300, 2001.

Inhibition of matrix metalloproteinase in disuse muscles by continuous passive motion

Tomoki ORIGUCHI¹, Minoru OKITA², Junya SAKAMOTO^{3,5}, Takayuki SAKAI^{1,4}, Jiro NAKANO¹, Toshiro YOSHIMURA¹, Atsushi KAWAKAMI⁵, Katsumi EGUCHI⁵

- 1 Graduate School of Health Sciences, Nagasaki University
- 2 Department of Rehabilitation, Seijo University
- 3 Nagasaki Memorial Hospital
- 4 Nijigaoka Hospital
- 5 Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

Abstract We examined the effects of immobilization and continuous passive motion on matrix metalloproteinase 2 expression in rat soleus muscle. Eight-week-old male Wister rats were used for each of two trials, one with 2 weeks, and another one with 4 weeks of immobilization with/without CPM. In each trial, rats were immobilized (immobilization group), and immobilized and simultaneously given CPM (CPM group). The soleus muscle of each rat was evaluated by gelatin zymography, western blotting, RT-PCR, and immunohistochemical staining. Gelatin zymography revealed a greater level of gelatinase activity in the extract of the muscles of the immobilization group than in those of the control and CPM group. The expressions of MMP-2 mRNA in the muscle extract of the immobilization group were also greater than those in the control and CPM group. Our results suggested that joint immobilization induces MMP-2 expression in muscles, resulting in muscular degeneration, and that CPM can prevent these changes.

Health Science Research 19(1): 7-11, 2006

Key Words : disuse atrophy, contraction, matrix metalloproteinase, continuous passive motion