

肩関節拘縮の原因の探索

東北大学医学部整形外科 井樋 栄二, 萩原 嘉廣

物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーション 花方 信孝, 箕輪 貴司, 竹村 太郎



(左から) 東北大学医学部整形外科 井樋 栄二, 萩原 嘉廣



(左から) 物質・材料研究機構 花方 信孝, 箕輪 貴司, 竹村 太郎

はじめに

日常診療において「関節拘縮」は自動・他動的な関節運動制限と定義され、整形外科のみならず他の診療科でもしばしば遭遇する疾患で、廃用症候群の一つとしても捉えられる。関節の固定（ギプスなど）による不動化や、寝たきりなどの廃用でも起こる。特に肩関節においては「五十肩」として一般に広く知られている。糖尿病、軽微な外傷などがきっかけで起こることも多い。五十肩は激的な痛みを伴ったのち、肩関節の可動域制限（肩関節拘縮症）が起こる。肩関節拘縮症は日常生活動作を著しく制限し、患者さんのクオリティ・オブ・ライフ（生活・人生の質）を損なう。治療としては保存療法としてリハビリテーションが行われる。十分な効果が得られない場

合は手術療法（鏡視下関節包切離術）が選択される。関節拘縮はあらゆる関節で起こり、筋委縮や関節軟骨の変性も惹き起こす。さまざま合併症を引き起こす関節拘縮の予防・原因究明は、超高齢社会を迎える本邦においては急務である。しかしながらその根本的な原因は未だに不明である。

今回、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業を利用してNIMS ナノテクノロジー融合ステーションの協力でDNAチップ（DNAマイクロアレイ）を用いた網羅的な遺伝子発現解析により、肩関節拘縮の病因解明に分子的なアプローチを行った。具体的には肩関節拘縮症および関節可動域制限のない肩腱板断裂患者（関節可動域制限なし）から関節包の一部を採取し、両者の遺伝子の発現パターンを比較した。

研究の背景

肩関節の可動域制限（肩関節拘縮）は、肩甲・胸郭の機能不全や痛みとの強い関連があり、患者のクオリティ・オブ・ライフを著しく障害している。しかし、その原因は明らかではない。肩関節拘縮症という言葉は古くから使われているが [1]、完全な定義は未だに確立されていない [2]。

肩関節拘縮症の推定罹患率は人口の 2～5% [3] であり、患者の多くは 40 歳 -70 歳台の女性である [4]。肩関節拘縮症の経過としては、自然に回復する場合もあるが [1]、中には関節可動域制限が回復せず、日常生活動作に著しい障害を残す場合もある。治療としては肩甲・胸郭のストレッチングを中心としたリハビリテーションを行うことが通常である [5]。しかし、このような保存療法によっても十分な関節可動域が得られない場合、手術療法（鏡視下関節包切離術、内視鏡的に硬くなった関節包を切離する）が選択される [6]。関節包を切離することによって関節可動域制限が回復することから、関節包は関節拘縮の主要な病因である。我々は以前より、関節拘縮の病態モデル（ラット膝関節不動化モデル）において、関節包の柔軟性が低下し [7]、関節包の切開によって関節可動域の改善が起こることを報告してきた [8]。

肩関節拘縮症の原因については、炎症、線維化が主要な病態と考えられており、TGF- β 、PDGF、HGF といった成長因子やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs)

の関与なども示唆されてきた [9][10][11][12][13][14]。しかしながらその病態解明には至っていない。本研究の目的は、肩関節拘縮症の病態を分子生物学的手法に基づいて明らかとすることである。遺伝子発現に関しては、DNA チップによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。この稿では NIMS 分子・物質合成プラットフォームで実施した網羅的遺伝子発現解析を中心に述べる。

研究の対象

この研究のプロトコールは船橋整形外科病院および東北大学での審査委員会の承認を受けたものである。2007 年の 7 月から 2009 年の 6 月までの期間に肩関節拘縮症で鏡視下関節包切離術を行った 12 肩が対象である。全員が術前の 6 か月間に保存療法を受け、症状の改善が見られなかったかあるいは悪化した者である。可動域が制限されていない肩腱板断裂患者を対照群（16 肩）とした。いずれの場合も肩関節関節包（図 1）を関節鏡視下に採取した。

組織学的観察

肩関節拘縮症と腱板断裂患者の肩関節包組織標本をヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡観察した。さらに組織の硬さ（音速）を比較するため、超音波顕微鏡で

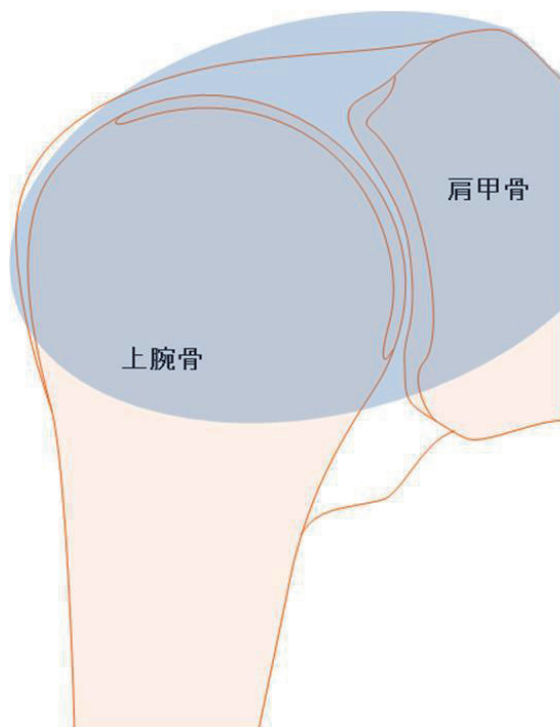


図 1 肩関節の概念図
淡青色部分のように肩関節の関節包は、肩甲骨と上腕骨を包んでいる。

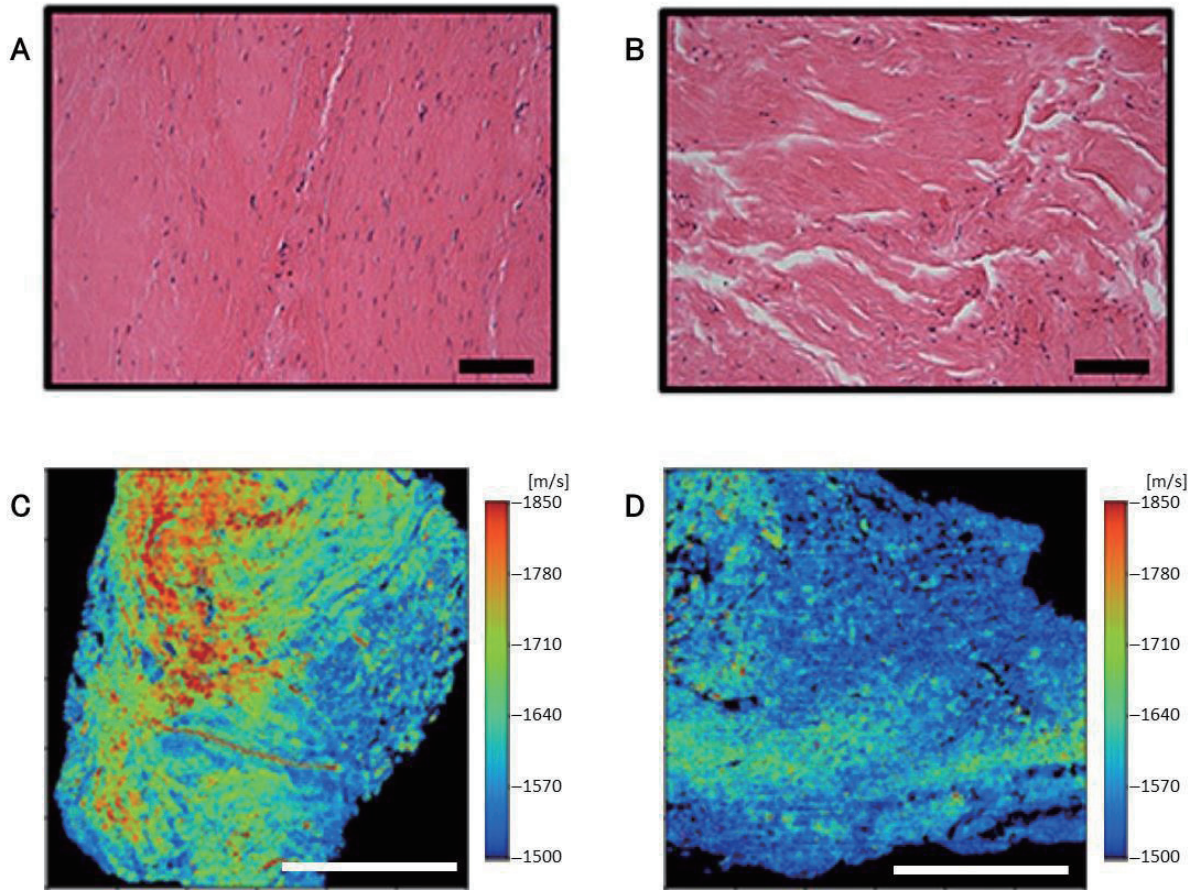


図2 組織の顕微鏡観察

A, Bはヘマトキシリン・エオジン染色による顕微鏡観察像。
 Aは肩関節拘縮症, Bは腱板断裂(コントロール)。スケールバー(黒)は100 μ m。
 肩関節拘縮症ではコントロールと比較して密になっており, 細胞(黒く見える点)の数も多い。
 C, Dは超音波顕微鏡による観察像。Cは肩関節拘縮症, Dはコントロール。
 スケールバー(白)は1mm。カラーバーは音速を表す。音速がより速い部分はより硬い部分と考えられる。

組織の音速を計測した(図2)。肩関節拘縮症の標本では組織が密になっており, 線維芽細胞様の細胞も多く, さらに音速が高い(硬い)ことが明らかとなった。

RNAの抽出

肩関節拘縮症(12肩)および関節可動域制限のない腱板断裂患者(3肩)の関節包からRNAを抽出した(図3)。

DNAチップ解析

肩腱板断裂患者(3肩)より得られたRNAを等量混合しコントロールサンプルとして用いた。図4にDNAチップ解析の概要を示す。肩関節拘縮症(12肩)からのRNAサンプルとコントロールのRNAサンプルを異なる蛍光色素でラベルし, DNAチップ上の各遺伝子スポットにハイブリダイズしたRNA量をそれぞれの蛍光強度を比較する

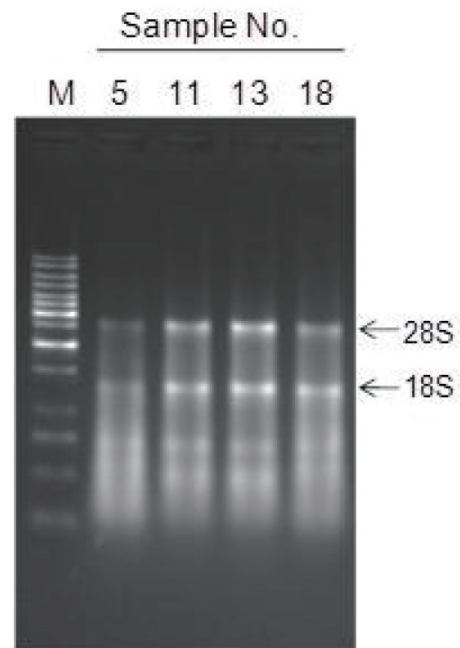


図3 精製したRNA(代表例)

ことで測定し、遺伝子発現量が肩関節拘縮症でどの程度増大、減少しているかを推定した。

DNA チップ解析の結果を用いて各サンプルの遺伝子の発現傾向でクラスタリングしたところ関節拘縮症とコントロールという二つの群に分かれる結果が得られた(図5)。これはコントロールに比べ肩関節拘縮の群には遺伝子の発現に関し共通した傾向がある、ということを示している。

ついでコントロールサンプルと比較して、肩関節拘縮症で発現が2倍以上増大していた遺伝子と半分以下に減少していた遺伝子を抽出した。表1に増大した遺伝子、表2に減少した遺伝子をそれぞれ示す。およそ2万種の遺伝子のうち33個の遺伝子の発現が増加し、11個の遺伝子の発現が減少していた。発現が増大した遺伝子のうち、FOS, FOSB, ACAN, COL10A1は軟骨化に関連する遺伝子、COL1A1, EGR1, PDGF-B, SPARC, MMP-14は

線維化に関連した遺伝子、CYR61は血管新生に関連する遺伝子であった。先行研究[15][16][17][18][19][20][21][22]を参照し、今回発現変化のあった遺伝子群について考察すると肩関節拘縮の原因は単純ではない複数の経路が関与していることが考えられた。

結論

この網羅的遺伝子発現解析の結果と組織化学的解析、さらには、組織の物理的特性解析の結果とあわせ、線維化、炎症反応、軟骨化が肩関節拘縮症の主な病因であると考え、論文として発表した[23]。この成果が製薬企業に注目され、現在東北大学と製薬企業とのあいだで医薬共同開発研究に進展したところである。

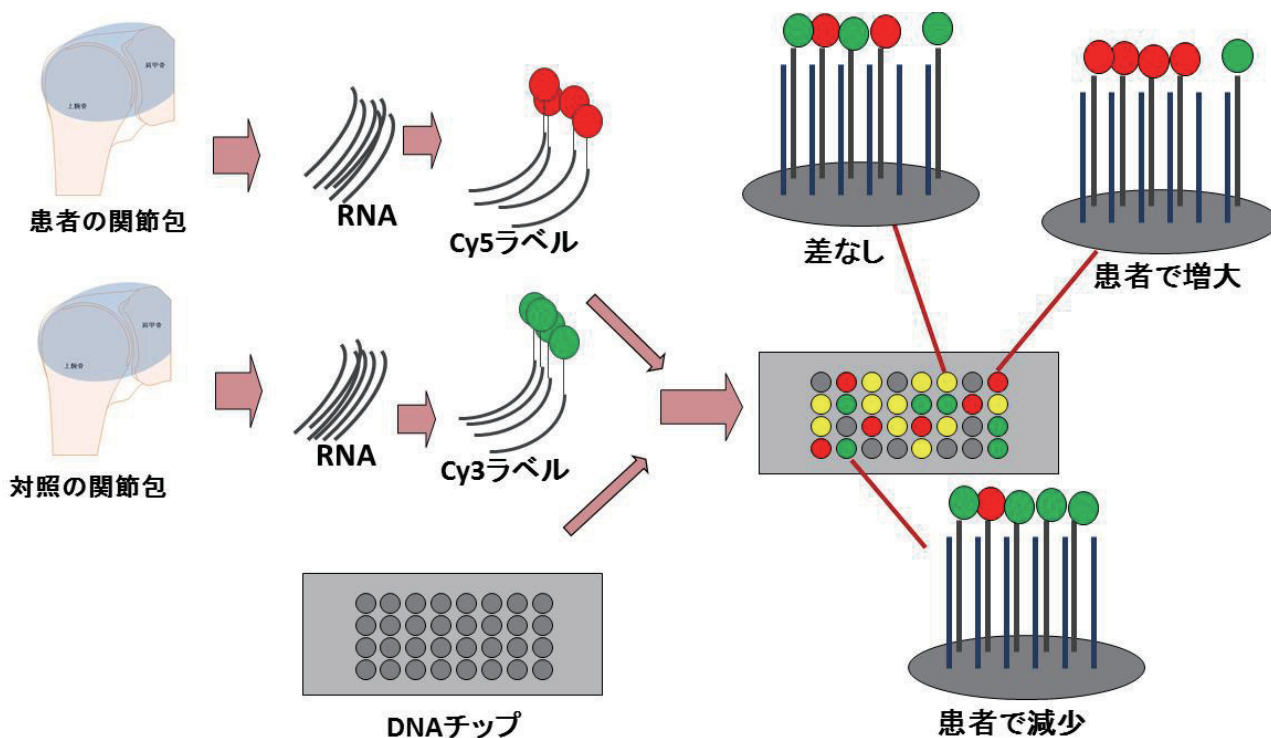


図4 DNA チップ解析

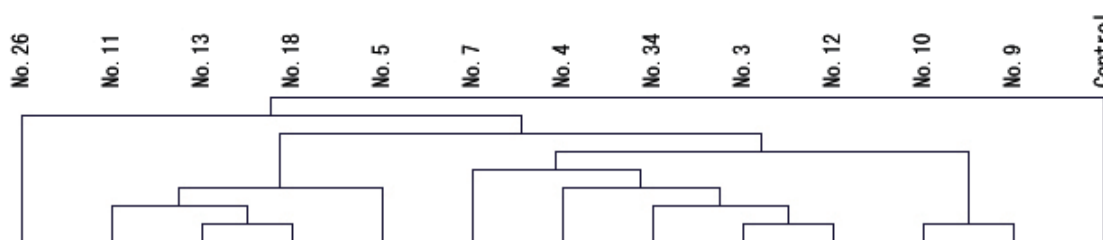


図5 全サンプル間の階層クラスタリング
発現変動遺伝子数:18,004個、ピアソンの相関係数による。

表 1 肩関節拘縮で発現が増大していた遺伝子

Genbank	Gene Name	Description
NM_005252	FOS	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
NM_058197	CDKN2A	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4), transcript variant 3
NM_013227	ACAN	Homo sapiens aggrecan. Transcript variant 2
NM_006732	FOSB	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B, transcript variant 1
NM_001964	EGR1	Homo sapiens early growth response 1
NM_002922	RGS1	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 1
NM_002928	RGS16	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 16
NM_001554	CYR61	Homo sapiens cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
NM_000399	EGR2	Homo sapiens early growth response 2 (EGR2), transcript variant 1
NM_002135	NR4A1	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1, (NR4A1), transcript variant 1
NM_005203	COL13A1	Homo sapiens collagen, type XIII, alpha 1 (COL 13A1), transcript variant 1
NM_178172	GPIHBP1	Homo sapiens glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1
THC2724906		Q96HL9_HUMAN, CHP protein
NM_174858	AK5	Homo sapiens adenylate kinase 5, transcript variant 1
Z74615	COL1A1	Homo sapiens mRNA for prepro-alpha1(I) collagen
NM_001050	SSTR2	Homo sapiens somatostatin receptor 2
NM_001321	CSRP2	Homo sapiens cysteine and glycine-rich protein 2
NM_032181	FAM176A	Homo sapiens family with sequence similarity 176, member A (FAM176A), transcript variant 2
XR_015254		Homo sapiens similar to FL00310 protein (LOC728295)
NM_001040619	ATF3	Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3), transcript variant 4
NM_004417	DUSP1	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1
NM_003118	SPARC	Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
NM_001114734	PABPC4L	Homo sapiens poly (A) binding protein, cytoplasmic 4-like
AK055302		Homo sapiens cDNA FLJ30740 fis, clone FEBRA2000319
NM_052970	HSPA12B	Homo sapiens heat shock 70kD protein 12B, transcript variant 1
NM_001004343	MAP1LC3C	Homo sapiens microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma
NM_144586	LYPD1	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1, transcript variant 1
NM_000493	COL10A1	Homo sapiens collagen, type X, alpha 1
NM_032510	PARD6G	Homo sapiens par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. elegans)
NM_006033	LIPG	Homo sapiens lipase, endothelial
NM_031910	C1QTNF6	Homo sapiens C1q and tumor necrosis factor related protein 6
NM_020130	C8orf4	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 4
NM_033438	SLAMF9	Homo sapiens SLAM family member 9, transcript variant 1

表 2 肩関節拘縮で発現が減少していた遺伝子

Genbank	Gene Name	Description
AB172662		MYOC Macaca fascicularis brain cDNA clone: Qf1A-19129, similar to human myocilin. Trabecular meshwork inducible glucocorticoid response
NM_001890	CSN1S1	Homo sapiens casein alpha s1, transcript variant 1
NM_002084	GPX3	Homo sapiens glutathione peroxidase 3 (plasma)
NM_021146	ANGPTL7	Homo sapiens angiopoietin-like 7
NM_003012	SFRP1	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1
NM_020415	RETN	Homo sapiens resistin, transcript variant 1
NM_031950	FGFBP2	Homo sapiens fibroblast growth factor binding protein 2
NM_000065	C6	Homo sapiens complement component 6, transcript variant 1
NM_015101	GLT25D2	Homo sapiens glycosyltransferase 25 domain containing 2
NM_012431	SEMA3E	Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E
NM_145791	MGST1	Homo sapiens microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1), transcript variant 1c



おわりに～運動器の10年

整形外科は運動器の疾患を扱う診療科である。運動器とは具体的には、関節や脊椎などの骨格とそれを動かす神経、筋肉、靭帯などのことである。また、診療科名に「外

科」という言葉が使われてはいるものの、内科的な治療（薬や理学療法）と外科的な治療（手術）の両方を行っている。運動器の重要性は21世紀に入り遅ればせながら認識されるようになり、世界保健機構（WHO）の提唱で、「運動器の10年」という運動機能障害から解放され終生すこやかに身体を動かすことができる社会の実現を目指した

運動が行われている。高齢者が要介護、要支援になる原因の20-30%は運動器の疾患に起因する。そのため運動器疾患を予防することが要介護、要支援者を減らし、高齢者のクオリティ・オブ・ライフを高めることにつながる。筆者らも、運動器疾患の予防、治療を通して患者さんのクオリティ・オブ・ライフを高めていきたいと考えており、今回のような運動器の疾患の原因を探るような研究も積極的に実施していきたいと考えている。その際に臨床医にとって、種々の先端的測定技術などが豊富なナノテクノロジープラットフォームのような存在は大変ありがたいものである。



参考文献

- [1] Codman EA. The Shoulder. Boston: Thomas Todd 1934: 216-24.
- [2] Zuckerman JD, Cuomo F. Frozen shoulder. In: Matsen 3rd FA, Fu FH, Haskins RJ, Eds. The shoulder: A Balance of Mobility and Stability. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1993: 253-68.
- [3] Cuomo F, Flatow EL, Schneider JA, Bishop JY. Idiopathic and diabetic stiff shoulder: decision-making and treatment. In: Warner JJ, Iannotti JP, Flatow EL, Eds. Complex and Revision Problems in Shoulder Surgery. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2005: 205-29.
- [4] Hand C, Clipsham K, Rees JL, Carr AJ. Long term outcome of frozen shoulder. J Shoulder Elbow Surg. 2008; 17: 231-6.
- [5] Vermeulen HM, Obermann WR, Burger BJ, Kok GJ, Rozing PM, van Den Ende CH. End-range mobilization techniques in adhesive capsulitis of the shoulder joint: a multi-subject case report. Phys Ther. 2000; 80: 1204-13.
- [6] Holloway GB, Schenk T, Williams GR, Ramsey ML, Iannotti JP. Arthroscopic capsular release for the treatment for refractory postoperative or post-fracture shoulder stiffness. J Bone Joint Surg Am. 2001; 83: 1682-7.
- [7] Hagiwara Y, Saijo Y, Chimoto E, Akita H, Sasano Y, Matsumoto F, et al. Increased elasticity of capsule after immobilization in a rat knee experimental model assessed by scanning acoustic microscopy. Ups J Med Sci. 2006; 111: 303-13.
- [8] Chimoto E, Hagiwara Y, Ando A, Itoi E. Progression of an arthrogenic motion restriction after immobilization in a rat experimental knee model. Ups J Med Sci. 2007; 112: 347-55.
- [9] Neviasser JS. Adhesive capsulitis of the shoulder. J Bone Surg Am. 1945; 27: 211-22.
- [10] Lundberg BJ. The frozen shoulder. Acta Orthop Scand. 1969; 119: 1-59.
- [11] Bunker TD, Anthony PP. The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease. J Bone Surg Br. 1995; 77: 677-83.
- [12] Hand GC, Athanasou NA, Matthews T, Carr AJ. The pathology of frozen shoulder. J Bone Joint Surg Br. 2007; 89: 928-32.
- [13] Rodeo SA, Hannafin JA, Tom J, Warren RF, Wickiewicz TL. Immunolocalization of cytokines and their receptors in adhesive capsulitis of the shoulder. J Orthop Res. 1997; 15: 427-36.
- [14] Bunker TD, Reilly J, Baird KS, Hamblen DL. Expression of growth factors, cytokines and matrix metalloproteinases in frozen shoulder. J Bone Joint Surg Br. 2000; 82: 768-73.
- [15] Thomas DP, Sunter A, Gentry A, Grigoriadis AE. Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene. J Cell Sci. 2000; 113: 439-50.
- [16] Silverman ES, Collins T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. Am J Pathol. 1999; 154: 665-70.
- [17] Tan L, Peng H, Osaki M, Choy BK, Auron PE, Sandell LJ, et al. Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. J Biol Chem. 2003; 278: 17688-700.
- [18] James CG, Woods A, Underhill TM, Beier F. The transcription factor ATF3 is upregulated during chondrocyte differentiation and represses cyclin D1 and A gene transcription. BMC Mol Biol 2006; 7: 30.
- [19] Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semrl S, Takagawa S, Mori Y, et al. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. J Biol Chem 2006; 281: 21183-97.
- [20] de Belle I, Mercola D, Adamson ED. Method for cloning in vivo targets of the Egr-1 transcription factor. Biotechniques 2000; 29: 162-9.
- [21] Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S. Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. Rheumatol Int 1992; 12: 53-9.
- [22] Trabandt A, Gay RE, Sukhatme VP, Gay S. Expression of collagenase and potential transcriptional factors c-fos and egr-1 in periodontal gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med 1992; 21: 232-40.

[23]Hagiwara Y, Ando A, Onoda Y, Takemura T, Minowa T, Hanagata N, Tsuchiya M, Watanabe T, Chimoto E, Suda H, Takahashi N, Sugaya H, Saijo Y, Itoi E. Coexistence of fibrotic and chondrogenic process

in the capsule of idiopathic frozen shoulders. Osteoarthritis Cartilage. 2012; 20; 241-9.

(東北大学 萩原 嘉廣, 物質・材料研究機構 箕輪 貴司)



【お問い合わせ】

分子・物質合成プラットフォーム

(独) 物質・材料研究機構

☎ 029-859-2399

E-mail sml@nims.go.jp

ホームページ

<http://www.nims.go.jp/mmsp/>