

平成21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591748
 研究課題名（和文）除負荷による膝蓋腱マトリクス再構築現象を制御する分子動態の解明
 研究課題名（英文）Molecular biological study of the remodeling of the stress-deprived patellar tendon
 研究代表者
 北村 信人（KITAMURA NOBUTO）
 北海道大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：80447044

研究成果の概要：除負荷は整形外科的治療において不可避免的に発生し、関節構成体の生体力学的特性を著しく劣化させる。本研究は、IL-1受容体アンタゴニストが除負荷された膝蓋腱コラーゲン線維束自体には影響を与えず、コラーゲン線維束間の力学的相互作用、コラーゲン線維束と他のマトリクス成分間の力学的相互作用に影響を与えることを示唆した。また、除負荷により膝蓋腱線維芽細胞に過剰発現したサイトカインを制御することにより力学的強度の減少を抑制できる可能性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：再生医学、細胞・組織、除負荷、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

慢性的なdisuseによる腱組織の萎縮や弱体化、整形外科的種々の病態で発生する除負荷による有害な効果は無視できない問題であるが、disuseすなわち負荷の減少（除負荷）がどのような機序で腱・靭帯組織に障害を与えるかは未だ十分に解明されていない。国内外において、力学的環境が腱・靭帯を含む軟組織の再構築現象に与える効果に関する研究が国際的に注目され、生体力学的解明が行われている。

この分野において、我々は独自に開発した膝蓋腱除負荷モデルを用いて一連の研究を

行い、除負荷が膝蓋腱の力学特性に劇的な劣化をもたらすこと（Yamamoto;1993）、また膝蓋腱の力学的特性の劣化は、膝蓋腱マトリクス再構築過程において外在性浸潤線維芽細胞の侵入に伴って発生し、この時にコラーゲン線維の超微細構造に大きな変化が起こることを解明してきた（Ohno;1993, Tsuchida;1997）。

In vitroでは線維芽細胞の分化やコラーゲン合成はサイトカインにより大きな影響を受けることが報告されており、我々もin vivoにおいて凍結処理前十字靭帯の再構築においてサイトカインの一種であるtransforming

growth factor-betaやepidermal growth factorがその力学特性を変化させることを明らかにしてきた (Sakai:2002, Azuma:2003)。ラットを用いた膝蓋腱除負荷モデルにおいては、除負荷膝蓋腱に様々なタンパクや遺伝子が過剰発現することを解明し (Uchida:2005, Kitamura:2004)、この一連の研究から膝蓋腱の力学特性の劣化とマトリクス再構築現象においてサイトカインが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

近年、我々はラットの除負荷モデルで、IL-1 β が除負荷した膝蓋腱の線維芽細胞で過剰発現されることを明らかにした。他の研究者からも、腱組織のIL-1の発現については、IL-1が治癒の過程で腱の線維芽細胞で過剰発現されることや、腱板断裂患者の肩峰下滑液包でIL-1が過剰発現されることが報告されている。また、腱の機械的刺激に反応して、IL-1 β がマトリクスの代謝作用の調整に重要な役割を演じることが示されており、除負荷によって線維芽細胞に過剰発現したIL-1 β は膝蓋腱の力学的特性を劣化させる原因分子である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの研究をさらに発展させ、線維芽細胞の分化やコラーゲン合成を人為的にコントロールし、除負荷により膝蓋腱線維芽細胞に過剰発現したサイトカイン・遺伝子を制御することにより力学的強度の減少と腱マトリクス構造の劣化を抑制しようとするものである。本研究において、我々は「IL-1 α とIL-1 β に対する特異性および親和性の高いアンタゴニストであるIL-1 receptor antagonist (IL-1ra)の投与によるIL-1 β の抑制は、除負荷による膝蓋腱の力学的特性の劣化を抑制する」という仮説をたて、この仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には成熟メス日本白色家兎34羽を用いた。右膝蓋腱に対し、我々が既に報告している方法を用いて、1mmステンレス鋼線を膝蓋骨に、3mmステンレス螺子を脛骨粗面に挿入し、マーカープンの位置が処置前の距離の30%短縮するように軟鋼線で固定し、膝蓋腱をたわませ、除負荷処置を行なった (図1)。



図1. 膝蓋腱除負荷処置方法

その後、8羽をコントロールとし、残りの26羽を各群13羽ずつ以下の2群に分けた。除負荷処置を行い、その際にIL-1ra群では0.2ml PBS希釈したIL-1 receptor antagonist 5 μ gを膝蓋腱の周囲に投与した。PBS群ではPBS0.2mlのみを投与した。全動物とも手術後3週で屠殺し、それぞれ8羽を腱全体の生体力学的評価に、5羽をコラーゲン線維束 (fascicles)の生体力学的評価に供した。

生体力学的評価方法は以下の通りである。腱全体および膝蓋腱中央1/3である4mm幅の膝蓋骨-腱-脛骨複合体の腱の断面積はエリアマイクロメーターで測定した。Tensile testerを使用し、この膝蓋腱中央1/3幅の複合体に、preloadを0.5N、5分、preconditioningを約2%ひずみで、10サイクル行い、引張速度毎分20mmにて引張試験を行なった。腱実質部のひずみはVideo dimension analyzerを用いて計測した (図2)。

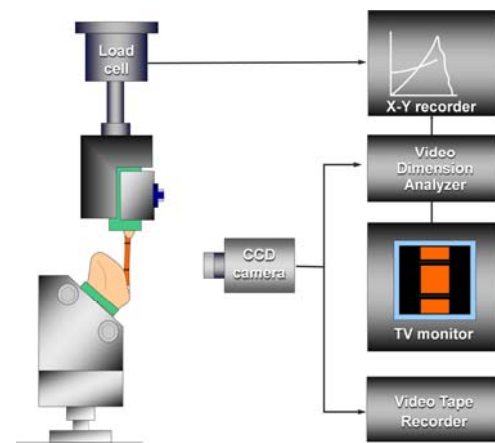


図2. 膝蓋腱全体の引張り試験

また、fasciclesの生体力学的評価方法として、Yamamotoらに準じて、膝蓋腱から直径約300 μ m、全長約15mmのfasciclesを切り出し、micro tensile testerを用い、preloadを0.01N、preconditioningを約1.7%ひずみで、10サイクル行い、毎分10mmの速度で引張試験を行なった。fasciclesの断面積と実質部ひずみはVideo dimension analyzerで計測した (図3)。

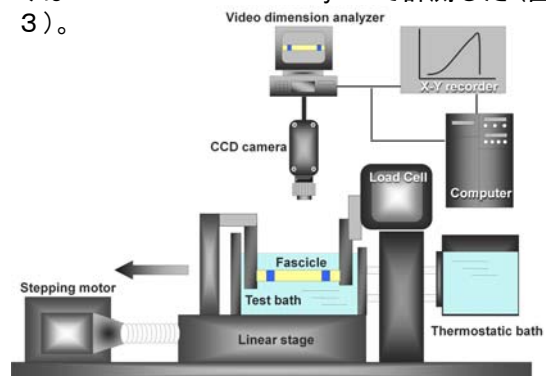


図3. 膝蓋腱fasciclesの引張り試験

統計学的解析にはUnpaired t-testを用い、有意水準は5%とした。

4. 研究成果

(1) 研究結果

除負荷膝蓋腱の断面積は正常よりIL-1ra群とPBS群の両群とも大きくなっていったが、両群間に有意差は認めなかった。また、除負荷膝蓋腱の長さも両群間に有意差は認めなかった(表1)。

	IL-1ra 群	PBS 群	正常
断面積(mm ²)	22.0 ± 6.6	25.6 ± 13.2	11.4 ± 1.9
	p=0.194		
長さ(mm)	17.3 ± 1.0	16.7 ± 1.4	18.7 ± 1.1
	p=0.285		

表 1. 各群における膝蓋腱の断面積 (cross-sectional area) および長さ (length)

①膝蓋腱全体の生体力学的評価

膝蓋腱全体に関する結果では、腱の破断はすべて2点のマーカ内であった。応力ひずみ曲線ではIL-1ra群はPBS群より高くなっていった(図4)。

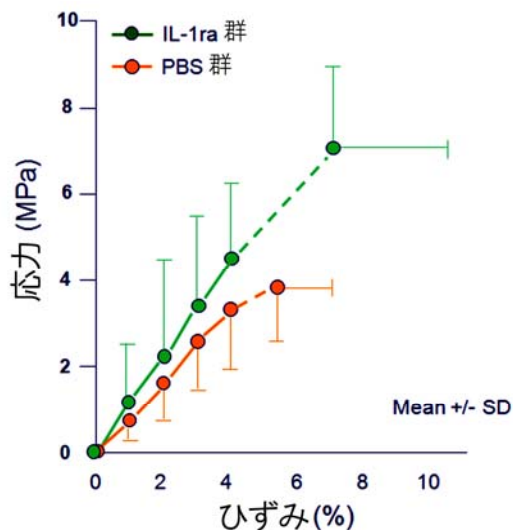


図 4. 膝蓋腱全体の引張り試験における各群の応力 (stress) —ひずみ (strain) 曲線

IL-1 receptor antagonist を投与した IL-1ra 群の弾性率、引張強度、および破断ひずみは、それぞれ 169 ± 70 (MPa)、6.7 ± 2.0 (MPa)、7.0 ± 3.5 (%) であった。PBS 群の弾性率、引張強度、および破断ひずみは、それぞれ 97 ± 28 (MPa)、3.9 ± 1.4 (MPa)、5.3 ± 1.8 (%) であった。IL-1ra 群の弾性率および引張強度は、PBS 群のそれらに比べて有意に高値であったが (p=0.016、p=0.006)、破断ひずみは両群間に有意差は認めなかった。

②膝蓋腱 fascicles の生体力学的評価

膝蓋腱 fascicles の破断はすべて2点のマーカ内であった。応力ひずみ曲線では正常に比べ IL-1ra 群と PBS 群の両群とも低く、PBS 群より IL-1ra 群でやや高いものの差は認めなかった(図5)。

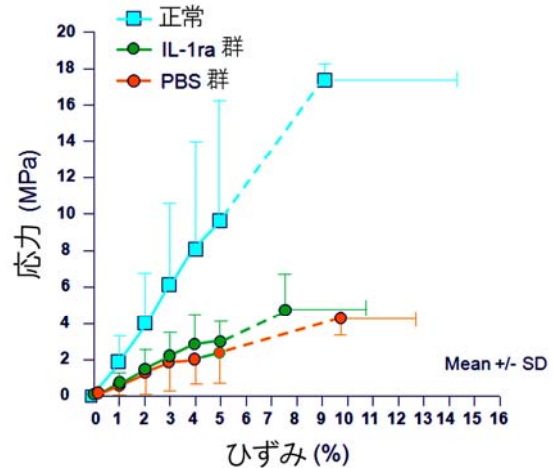


図 5. 膝蓋腱 fascicles の引張り試験における各群の応力 (stress) —ひずみ (strain) 曲線

IL-1 receptor antagonist を投与した IL-1ra 群の fascicles の弾性率、引張強度、および破断ひずみは、それぞれ 93 ± 40 (MPa)、4.8 ± 2.5 (MPa)、7.5 ± 3.0 (%) であった。PBS 群の fascicles の弾性率、引張強度、および破断ひずみは、それぞれ 53 ± 8 (MPa)、4.4 ± 0.9 (MPa)、10.0 ± 2.9 (%) であった。いずれの値も IL-1ra 群と PBS 群の間に有意差は認めなかった。

(2) 研究結果の重要性、学術的意義および国内外における位置づけ

本研究は、IL-1 receptor antagonist の局所投与が3週間の除負荷膝蓋腱の力学的劣化を腱全体としては、有意に抑制したが、腱 fascicles の力学的特性に有意な効果を与えないことを明らかにした。我々はこれまでに除負荷が膝蓋腱の線維芽細胞に IL-1β、TNF-α、TGF-β が過剰発現したことを報告してきた。その考察の中で、IL-1β は線維芽細胞の collagen の同化に抑制的に働くことが知られており、IL-1β が MMP-1、-3 誘導し、MMP-1 が collagen を、MMP-3 が proteoglycan を分解する働きが除負荷腱に起こったものと考えられた。つまり除負荷膝蓋腱の力学的劣化は、過剰発現した IL-1β が MMP を誘導した結果である可能性が示唆される。IL-1 receptor antagonist が高親和性をもった IL-1α および IL-1β の特異的アンタゴニストであり、従って IL-1 receptor antagonist による IL-1 の不活化が

除負荷膝蓋腱の力学的劣化を抑制したと考えられる。よって本研究は我々が示してきた除負荷膝蓋腱の線維芽細胞におけるIL-1 β の過剰発現は、除負荷による膝蓋腱の力学的劣化の重要な原因の一つであることを強く示唆した。一方、腱組織にはbundles, fascicles, fibrils, fibersから構成された階層構造がある。そして腱fasciclesの力学的特性には、fascicle自体、fascicles間、minor matrixとfasciclesが関与していると考えられている。膝蓋腱fasciclesの力学的評価に関して、Yamamoto, Hayashiらは、ウサギ膝蓋腱を構成するfasciclesの力学的評価として除負荷の効果はfasciclesに対してより腱全体の方が大きいと報告している。また、除負荷が膝蓋腱の線維走行に直交する方向への力学的特性を有意に低下させたことを、除負荷による力学的相互作用の減少がfascicles間やプロテオグリカンのようなminor matrixとfascicles間に影響したものと考察している。本研究の2つの結果を説明するメカニズムとして、過剰発現IL-1はfascicles間の力学的特性またはminor matrixとfascicleとの力学的特性に大きな効果を与え、それに対してfascicle自体に与えた効果は少ないと考えられる。

本研究は、線維芽細胞の分化やコラーゲン合成を人為的にコントロールし、除負荷により膝蓋腱線維芽細胞に過剰発現したサイトカイン(IL-1)を制御することにより力学的強度の減少と腱マトリクス構造の劣化を抑制できる可能性を示した。このような独創的な動物実験モデルを用いてこの現象を証明した研究は他にはなく、また腱全体およびその微細組織であるfasciclesにおける挙動までも検証したことには高い科学的意義がある。また本研究は損傷した生体軟組織の修復・再生・移植を人為的に制御するための新しい原理を与える可能性があり高い医学的意義がある。

(3) 今後の展望

本研究では、除負荷された膝蓋腱全体とその微細構造であるfasciclesにおいて、過剰発現IL-1はfascicles間の力学的特性またはminor matrixとfascicleとの力学的特性に大きな効果を与え、それに対してfascicle自体に与えた効果は少ないと考えられる結果を示した。しかし、このメカニズムについては不明であり、その詳細の解明は今後の課題である。

IL-1 receptor antagonistの臨床応用として、関節リウマチのような炎症性疾患の臨床治療に抗IL-1の戦略が注目されている。関節リウマチのIL-1 receptor antagonistの治療効果として臨床症状と関節破壊の進行を抑制することが報告されている。また、IL-1 receptor antagonistが敗血症症候群での患

者の死亡率が減少させたことも報告されている。IL-1は、このように様々な疾患において重要な標的分子の一つであり、除負荷の有害作用を回避するための治療を開発する研究戦略となり得る。

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)

[雑誌論文] (計3件)

(1) Hayashi R, Kitamura N, Kondo E, Anaguchi Y, Tohyama H, Yasuda K: Simultaneous anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in chronic knee instabilities: Surgical concepts and clinical outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16, 763-769, 2008、査読有

(2) Miyatake S, Tohyama H, Kondo E, Katsura T, Onodera S, Yasuda K: Local administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits deterioration of mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. *J Biomech* 41 (4): 884-889, 2008、査読有

(3) Tohyama H, Yasuda K, Uchida H, Nishihira J: The responses of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalised patellar tendon to IL-1beta are different from those of normal tendon fibroblasts. *J Bone Joint Surg Br.* 89(9) : 1261-1267, 2007、査読有

[学会発表] (計3件)

(1) 宮武慎、遠山晴一、近藤英司、桂太郎、小野寺伸、安田和則: IL-1 receptor antagonistの局所投与は除負荷膝蓋腱の力学的劣化を抑制するが、fascicleの力学特性は有意な変化を与えない。第23回日本整形外科学会基礎学術集会、国立京都国際会館、京都、2008. 10. 23-24

(2) Miyatake S, Tohyama H, Katsura T, Kondo E, Yasuda K: An in vivo local application of interleukin-1 receptor antagonist inhibits deterioration of mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon without significant changes in the fascicle properties. 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, U. S. A, March 2-5, 2008

(3) 宮武慎、遠山晴一、桂太郎、小野寺伸、安田和則: in vivoにおけるIL-1 receptor

antagonistの局所投与が除負荷による膝蓋
腱のfascicleの力学的特性に与える効果. 第
34回日本臨床バイオメカニクス学会、早稲田
大学国際会議場、東京、2007.12.7-8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 信人 (KITAMURA NOBUTO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80447044

(2) 研究分担者

遠山 晴一 (TOHYAMA HARUKAZU)

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号：60301884

(3) 連携研究者

なし