

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390406
 研究課題名（和文） 力学的環境変化により生じる膝蓋腱マトリクス改変現象の人為的制御に関する統合的研究
 研究課題名（英文） Multidisciplinary study on the regulation of the remodeling of the patellar tendon matrix in response to mechanical environment
 研究代表者
 遠山 晴一（TOHYAMA HARUKAZU）
 北海道大学・大学病院・准教授
 研究者番号：60301884

研究成果の概要：廃用がもたらす除負荷は腱組織の力学特性を低下させることが知られているが、この機序や制御に関しては不明であった。本研究では *in vivo* 動物モデルを用い、除負荷が膝蓋腱細胞における IL-1 β 発現を亢進させ、IL-1 抑止は除負荷膝蓋腱の力学特性を改善させることを明らかにし、廃用による腱組織の力学的劣化には炎症性サイトカインが重要な役割を担い、本サイトカイン制御により廃用がもたらす腱の力学的劣化を抑止する可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：腱・靭帯、バイオメカニクス、サイトカイン、炎症、力学的負荷、廃用

1. 研究開始当初の背景

(1) 種々の生活習慣病を運動により予防しようとする社会的要求が高まっているにもかかわらず、運動の休止による力学的環境の変化がもたらす運動器組織の脆弱化に対する治療あるいは予防はその質において極めて遅れており、新しいイノベーションが求められている。

(2) 腱組織は運動器を構成する最重要組織の一つであるにもかかわらず、その機能のことも基本となる腱マトリクス改変現象の発現機序の解明は不十分であった。

(3) 前述の社会的背景にも後押しされ、力学

的環境が腱組織の改変現象に与える効果に関する研究が近年、国際的に注目されている。(4) 研修者は過去に廃用がもたらす除負荷は膝蓋腱の力学的特性を著明に低下させることを報告した。しかし、この力学的低下の機序およびならびに分子標的制御に関しては不明であった。

2. 研究の目的

(1) 除負荷がもたらす膝蓋腱の力学的劣化の機序を rat モデルによる力学的および免疫組織学的検討により明らかにする。

(2) 力学的負荷の減少により腱組織に生じるマトリクス改変現象の発生機序を解明し、力学的環境変化が腱組織にもたらす本現象を人為的に制御する手法を開発するため、家兎モデルを用いて外因性 TGF- β 1 あるいは TGF- β 1 中和抗体の投与が除負荷による膝蓋腱の力学的特性に与える効果を明らかにする。

(3) 力学的負荷の減少により腱組織に生じるマトリクス改変現象の発生機序を解明するため、家兎モデルを用いて IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) の投与が除負荷による膝蓋腱と膝蓋腱線維束の力学的特性に与える効果を比較検討する。

3. 研究の方法

(1) 除負荷がもたらす rat 膝蓋腱の力学的劣化の機序に関する力学的および免疫組織学的検討

① Wistar rat40 匹を右膝蓋腱に除負荷処置 (図 1) を行った除負荷群と sham 手術を行った対照群の 2 群に分けた。

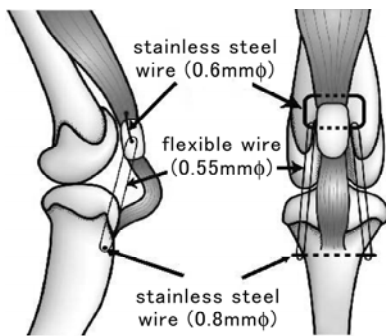


図 1 rat 膝蓋腱除負荷処置

② 処置後 2 週および 6 週で各群 5 匹ずつ力学的検討と免疫組織学的検討に供した。

③ 力学的検討には引張試験を非接触性歪計測と共に行ない (図 2)、免疫組織検討には各種サイトカインに対する免疫染色により陽性細胞率を検討した。

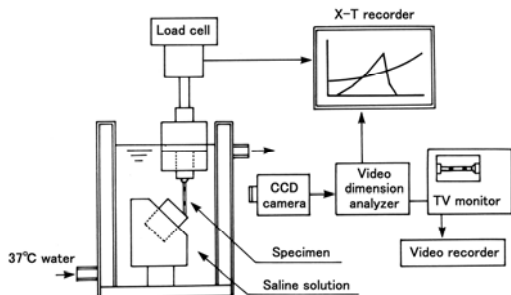


図 2 一軸引張試験による膝蓋腱力学特性評価システム

(2) TGF- β が除負荷による家兎膝蓋腱の力学的劣化に与える意義の検討

① 日本白色家兎の右膝蓋腱に対し除負荷手法 (図 3) を加えた後、sham 群では PBS0.2ml のみを、TGF 群では 4ngTGF- β 1 を膝蓋腱周囲に投与した。

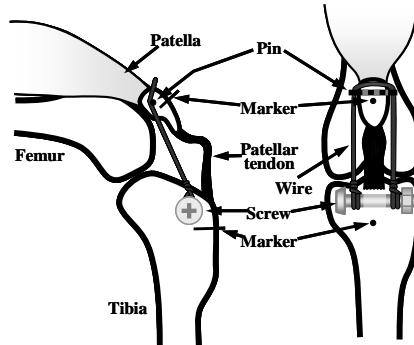


図 3 家兎膝蓋腱除負荷処置

② 同処置を施した後、I 群には PBS0.2ml のみを、II 群では非感作マウス IgG を、III 群では 50 μ g 抗 TGF- β 1 抗体を膝蓋腱周囲に投与した。

③ 術後は同様に飼育し、3 週で力学的検討を行なった。

(3) IL-1 が除負荷による家兎における膝蓋腱と膝蓋腱線維束の力学的劣化に与える意義の検討

① 白色家兎右膝蓋腱に対し除負荷処置後 (図 3)、IL-1ra 群では 5- μ g IL-1ra を、PBS 群では PBS0.2ml のみを膝蓋腱周囲に投与した。

② 投与後 3 週で膝蓋腱と膝蓋腱線維束の力学的検討を行なった。

③ 膝蓋腱線維束の力学的検討に際しては、膝蓋腱を径 300 μ m の線維束に採型し、micro-tensile tester (図 4) を用い、力学特性を評価した。

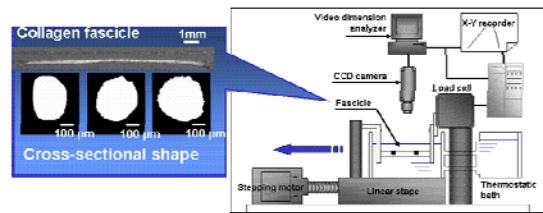


図 4 micro-tensile tester による膝蓋腱線維束力学特性評価システム

4. 研究成果

(1) 除負荷がもたらす rat 膝蓋腱の力学的劣化の機序に関する力学的および免疫組織学的検討

①力学的検討では除負荷群の膝蓋腱の断面積は有意に増加し、弾性率は sham 群に比し有意に低値であった(図5)。

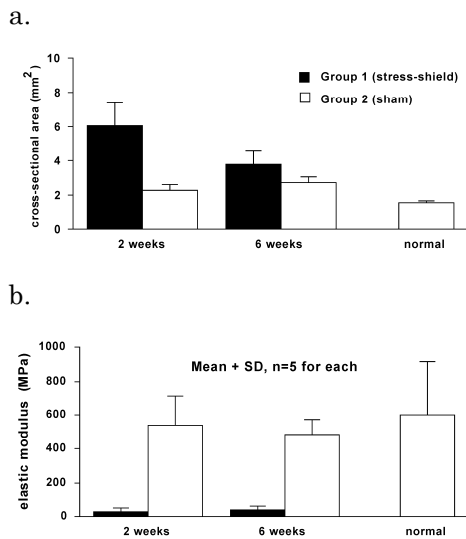


図5 除負荷の rat 膝蓋腱の力学的特性に対する効果。除負荷群 (Group1) は sham 群 (Group2) に比し、断面積 (a) は有意に増加し、弾性率 (b) は有意に低下している。

②免疫組織学的 (図7) には除負荷群の IL-1 β , TNF- α および TGF- β 陽性細胞率は対照群に比べて有意に高値であった (図8)。

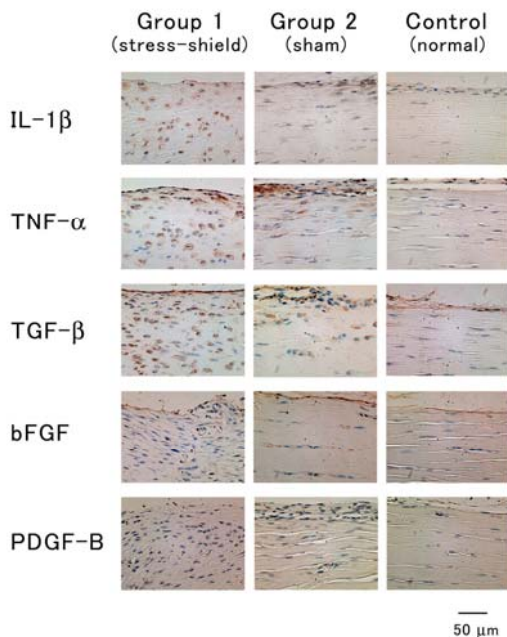


図7 除負荷の rat 膝蓋腱のサイトカイン発現に関する免疫組織学的検討(除負荷後3週)。

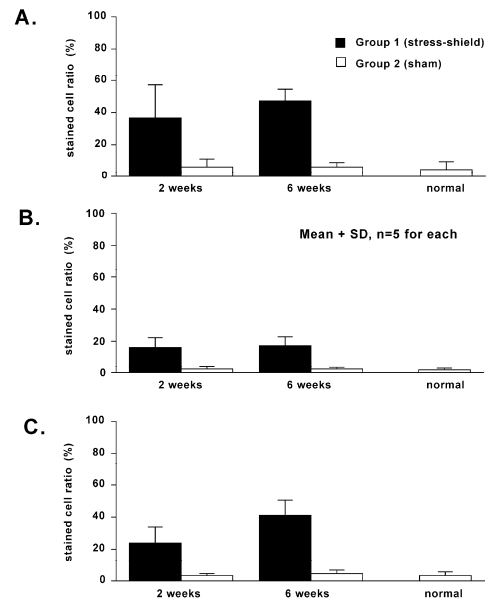


図8 除負荷の rat 膝蓋腱におけるサイトカイン陽性細胞率 (a. IL-1 β , b. TNF- α , c. TGF- β)。

③本研究は除負荷が早期より膝蓋腱の弾性率の低下をもたらすと共に膝蓋腱内の線維芽細胞における IL-1 β , TNF- α , TGF- β の発現を亢進させることを明らかにした。これは廃用による腱組織の力学的劣化には炎症性サイトカインが重要な役割を担うことを示唆するものであった。

(2) TGF- β が除負荷による家兎膝蓋腱の力学的劣化に与える意義の検討

①除負荷膝蓋腱における外因性 TGF- β 1 投与の効果: sham 群および TGF 群において弾性率はそれぞれ 95 ± 23 MPa および 173 ± 56 MPa であり, TGF 群は sham 群より有意に高値を示した。

②除負荷膝蓋腱における抗 TGF- β 1 抗体投与の効果: I 群, II 群, III 群で弾性率がそれぞれ 98 ± 27 MPa, 102 ± 45 MPa, 52 ± 25 MPa であり, III 群は I および II 群と比べて有意に低値であった。

③本研究では外因性 TGF- β 1 局所投与は除負荷膝蓋腱の弾性率を有意に増加させた。一方, 抗 TGF- β 1 抗体局所投与は除負荷膝蓋腱の弾性率を有意に低下させた。したがって, 抗 TGF- β 1 抗体の局所投与が除負荷により膝蓋腱線維芽細胞から分泌された TGF- β を中和し, その結果, 膝蓋腱の力学的劣化を促進させたことが示唆され, 除負荷における膝

蓋腱線維芽細胞の TGF- β 過剰産生は膝蓋腱の力学的劣化の原因ではなく、むしろ膝蓋腱の力学的劣化に対する二次的修復機転である可能性が高いと考えられた。

(3) IL-1 が除負荷による家兎における膝蓋腱と膝蓋腱線維束の力学的劣化に与える意義の検討

① IL-1ra 投与群 (Group I) の膝蓋腱における弾性率および引張強度は PBS 投与群 (Group II) より有意に高値を示した (弾性率: $p=0.016$ 、引張強度: $p=0.006$) (図 9)。

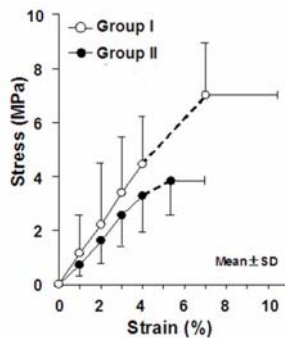


図 9 IL-1ra 投与の除負荷膝蓋腱の力学的特性に対する効果。L-1ra 投与群 (Group I) は PBS 投与群 (Group II) に比し、弾性率および引張強度は有意に低下している。

② 一方、膝蓋腱線維束の弾性率および引張強度に関しては IL-1ra 群と PBS 群の間に有意差を認めなかった (図 10)。

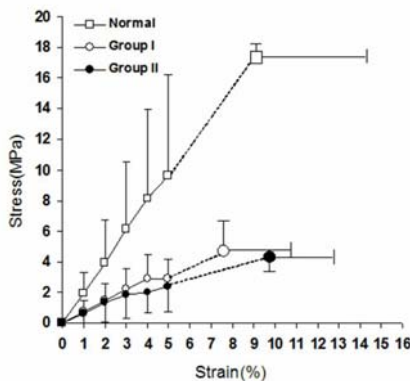


図 10 IL-1ra 投与の除負荷膝蓋腱線維束の力学的特性に対する効果。L-1ra 投与群 (Group I)、PBS 投与群 (Group II) は正常膝蓋腱線維束に比し、弾性率および引張強度は有意に低下しているが、両群間に有意の差を認めない。

③ 腱組織の力学特性は構成体である線維束の力学特性に加え、線維束間の結合力が関与

することが知られている。したがって、本研究の知見は除負荷による IL-1beta 過剰発現は腱線維束間の結合力を減少させることにより膝蓋腱の力学的劣化を惹起させることを示唆し、廃用による腱組織の力学的劣化に対する治療戦略に有用な情報をもたらすものと考えられた。

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 22 件)

- ① Onodera S, Oshima S, Nishihira J, Yasuda K, Tohyama H, Irie K, Koyama Y. Active immunization against macrophage migration inhibitory factor using a novel DNA vaccine prevents ovariectomy-induced bone loss in mice. *Vaccine*. 2008 Feb 6;26(6):829-36. 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*. 2008;41(4):884-9. 査読有
- ③ Okamoto S, Tohyama H, Kondo E, Anaguchi Y, Onodera S, Hayashi K, Yasuda K. Ex vivo supplementation of TGF-beta1 enhances the fibrous tissue regeneration effect of synovium-derived fibroblast transplantation in a tendon defect: a biomechanical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008 Mar;16(3):333-9. 査読有
- ④ 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*. 2008 Aug;16(8):763-9. 査読有
- ⑤ Tohyama S, Onodera S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Mizue Y, Hamasaka A, Abe R, Koyama Y. A novel DNA vaccine-targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis. *Gene Ther*. 2008 Dec;15(23):1513-22. Epub 2008 Jul 24. 査読有
- ⑥ Hayashi R, Kondo E, Tohyama H, Saito T, Yasuda K. In vivo local administration of osteogenic protein-1 increases structural properties of the overstretched anterior cruciate ligament with partial midsubstance laceration: a biomechanical study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 2008 Oct;90(10):1392-400. 査読有
- ⑦ Ikema Y, Tohyama H, Yamamoto E, Kanaya

- F, Yasuda K. Ex vivo infiltration of fibroblasts into the tendon deteriorates the mechanical properties of tendon fascicles but not those of tendon bundles. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2007 Jan;22(1):120-6. Epub 2006 Nov 2. 査読有
- ⑧ Maeda E, Noguchi H, Tohyama H., Yasuda K., Hayashi K. The tensile properties of collagen fascicles harvested from regenerated and residual tissues in the patellar tendon after removal of the central third. Biomed Mater Eng. 2007;17(2):77-85. 査読有
- ⑨ Onodera S., Ohshima S, Tohyama H., Yasuda K., Nishihira J, Iwakura Y, Matsuda I, Minami A, Koyama Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. Arthritis Rheum. 2007 Feb;56(2):521-30. 査読有
- ⑩ Azuma C, Tohyama H., Nakamura H, Kanaya F, Yasuda K. Antibody neutralization of TGF-beta enhances the deterioration of collagen fascicles in a tissue-cultured tendon matrix with ex vivo fibroblast infiltration. J Biomech. 2007;40(10):2184-90. 査読有
- ⑪ Kondo E., Yasuda K., Ichiyama H, Azuma C, Tohyama H. Radiologic evaluation of femoral and tibial tunnels created with the transtibial tunnel technique for anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy. 2007 Aug;23(8):869-76. 査読有
- ⑫ Kondo E., Yasuda K., Tohyama H. In vivo effects of partial electrothermal shrinkage on mechanical properties of the anterior cruciate ligament in rabbits. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2007 Nov;22(9):1037-44. 査読有
- ⑬ 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. 2007 Sep;89(9):1261-7. 査読有
- ⑭ Ju YJ, Tohyama H., Kondo E., Yoshikawa T, Muneta T, Shinomiya K, Yasuda K. Effects of Local Administration of Vascular Endothelial Growth Factor on Properties of the in Situ Frozen-Thawed Anterior Cruciate Ligament in Rabbits. Am J Sports Med. 2006 Oct 6;34(1) 84-91. 査読有
- ⑮ Tohyama H., Yasuda K., Beynon BD, Renstrom PA. Stabilizing effects of ankle bracing under a combination of inversion and axial compression loading. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006 Apr;14(4):373-8. 査読有
- ⑯ Yasuda K., Kondo E., Ichiyama H, Tanabe Y, Tohyama H. Clinical evaluation of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction procedure using hamstring tendon grafts: comparisons among 3 different procedures. Arthroscopy. 2006 Mar;22(3):240-51. 査読有
- ⑰ Katsura T, Tohyama H., Kondo E., Kitamura N, Yasuda K. Effects of administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 and anti-TGF-beta1 antibody on the mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. J Biomech. 2006;39(14):2566-72. 査読有
- ⑱ Yoshikawa T, Tohyama H., Enomoto H, Matsumoto H, Toyama Y, Yasuda K. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in patellar tendon grafts in the early phase after anterior cruciate ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006 Sep;14(9):804-10. 査読有
- ⑲ Yoshikawa T, Tohyama H., Katsura T, Kotani Y, Matsumoto H, Toyama Y, Yasuda K. Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on mechanical characteristics of the semitendinosus tendon graft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. Am J Sports Med. 2006 Dec;34(12):1918-25. 査読有
- ⑳ Tohyama H., Uchida H, Yasuda K. Is the increase in type III collagen of the patellar tendon graft after ligament reconstruction really caused by "ligamentization" of the graft? Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006 Dec;14(12):1270-7. 査読有
- 21 Onodera S., Sasaki S, Ohshima S, Amizuka N, Li M, Udagawa N, Irie K, Nishihira J, Koyama Y, Shiraiishi A, Tohyama H., Yasuda K. Transgenic mice overexpressing macrophage migration inhibitory factor (MIF) exhibit high-turnover osteoporosis. J Bone Miner Res. 2006 Jun;21(6):876-85. 査読有
- 22 Yamazaki S, Yasuda K., Tomita F, Minami A, Tohyama H. The effect of intraosseous graft length on tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction using flexor tendon. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006 Nov;14(11):1086-93. 査読有
- [学会発表] (計 4 件)
- ① Tohyama H., Ikoma K, Ueda M, Yuri M, Chiba T, Urayama R, Hori K, Yasuda K. The relationship between open and closed kinetic chain strength of the lower limb and jumping

performance in the anterior cruciate ligament deficient Subjects. the XVII Congress of International Society of Electrophysiology and Kinesiology (ISEK), Niagara Falls, Ontario, Canada, 2008.6.19

- ② Tohyama H., Okamoto S., Hayashi K., Yasuda K.: Synovium-derived fibroblast transplantation possibly deteriorates mechanical properties of the regenerated tissue in the patellar tendon after the harvest of its central one-third portion. International Symposium on Ligaments & Tendons VIII, Stanford University, CA, U.S.A., 2008. 3. 1
- ③ Tohyama H., Okuzumi T., Kondo E., Nakamura H., Yasuda K. : The implantation of autologous synovial tissue-derived fibroblasts after TGF-beta stimulation Inhibits mechanical and ultrastructural deterioration of the ACL after the in situ freeze-thaw treatment, The 6th biennial congress of International Society of Arthroscopy, Knee, and Orthopaedic Sports Medicine, Florence, Italy, 2007. 5. 29
- ④ Tohyama H., Kondo E. , Miyatake S., Katsura T., Yasuda K. : The effect of cytokine inactivation on stress-deprived patellar tendons, the 7th International Symposium on Ligaments & Tendons, La Jolla, Carifornia, U.S.A., 2007.2.10

[図書] (計 8 件)

- ① 遠山晴一, 安田和則 : 後十字靭帯二重束再建術. 94 頁-99 頁 (安田和則編: OS NOW Instruction No. 8 スポーツによる膝・足関節靭帯損傷の治療, メジカルビュー, 東京) 2008
- ② 遠山晴一, 安田和則 : 靭帯・腱. 16 頁-19 頁 (岩谷 力ほか編:運動器リハビリテーションクルズ, 南江堂, 東京) 2008
- ③ 遠山晴一, 安田和則 : 力とモーメント, 関節にかかる負荷. 202 頁-207 頁 (越智隆弘編:最新整形外科大系 運動器の生物学と生体力学, 中山書店, 東京) 2008
- ④ Tohyama H., Yasuda K.: Growth Factors and Other New Methods for Graft Healing Enhancement. (Chadwick Prodromos, Charles Brown, Freddie Fu, ed.: THE ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT: RECONSTRUCTION AND BASIC SCIENCE, WB Saunders Co) 2007
- ⑤ 遠山晴一 : ジャンパー膝. 767 頁-768 頁 (山口 徹, 北原光夫, 福井次矢編:今日の治療指針 2007, 医学書院, 東京) 2007
- ⑥ 遠山晴一, 安田和則 : 半月板切除. 327 頁-331 頁 (越智隆弘編:最新整形外科大系

膝関節・大腿, 中山書店, 東京) 2006

- ⑦ 遠山晴一, 安田和則 : 治癒促進のための前十字靭帯再建膝への成長因子の応用. 36 頁-43 頁 (宗田 大編:実践 すぐに役立つ膝靭帯損傷 診断・治療マニュアル, 全日本病院出版, 東京) 2006
- ⑧ 遠山晴一, 安田和則 : 膝関節の診察. 47 頁-51 頁 (守屋秀繁, 糸満盛憲, 内田淳正, 荻野利彦, 黒坂昌弘, 戸山芳昭編:整形外科診療実践ガイド, 文光堂, 東京) 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 晴一 (TOHYAMA HARUKAZU)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号 : 6 0 3 0 1 8 8 4

(2) 研究分担者

安田 和則 (YASUDA KAZURORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 2 0 1 6 6 5 0 7

小野寺 伸 (ONODERA SHIN)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号 : 0 0 3 5 9 4 8 1

(2006 年度のみ)

近藤 英司 (KONDO EIJI)
北海道大学・創成科学研究機構・
特任准教授
研究者番号 : 6 0 3 7 4 7 2 4

(3) 連携研究者

なし