

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10786

研究課題名(和文) 正常な自由運動と損傷組織への力学的ストレスは前十字靭帯と半月板の治癒を促進させる

研究課題名(英文) Normal free motion and mechanical stress on the damaged tissue promote healing of the anterior cruciate ligament and meniscal tear

研究代表者

高柳 清美 (Takayanagi, Kiyomi)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・客員教授

研究者番号：20274061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膝前十字靭帯(ACL)は自然治癒しないため、外科的再建術を選択せざるを得ない状況である。我々は治癒しないとされてきたACL保存療法を確立するために動物を利用した基礎研究やACL保存療法によって生じるとされる二次的な障害予防について知見を積み上げてきた。本研究では、ACL治癒過程における関節固定に伴うメカニカルストレスである伸張刺激が治癒ACLの力学強度に与える影響について調査した。ACLに対して伸張刺激を与えることで力学強度が維持され、ACL由来線維芽細胞への伸張刺激が有意にコラーゲンの発現量を増加させた。故に、伸張刺激はコラーゲン合成能力を増大させ、力学的強度へ影響を与える可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膝関節の前十字靭帯は損傷や断裂によって、身体機能の低下や関節不安定性を引き起こし、変形性膝関節症といった二次的な疾病を惹起する。一般的に他の靭帯組織とは異なり、前十字靭帯は断裂後に自然に治癒はしない。ACL断裂後は保存療法によって治癒するという確固たる証拠がないことから外科的再建術を選択せざるを得ない状況である。しかし、我々の研究は前十字靭帯が保存的に治癒する基礎的知見を積み上げ、損傷後の適切かつ機能的なリハビリテーションプロトコルを提案し、新たな治療の選択肢を提供ができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The ACL does not spontaneously heal after a complete rupture, ACL reconstruction is one of the most common orthopedic techniques performed worldwide. Our group have developed a model that allows for the healing of ACLs for conservative therapy, and our goal is to expand treatment options. However, healing ACL mechanical strength was 50% of normal in the conservative therapy model. In this study, we investigated the effect of mechanical stress in the ACL healing process, on the mechanical strength of healing ACL. Mechanical stress increased the ability to synthesize collagen, suggesting that it may affect mechanical strength in ACL.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：膝関節前十字靭帯 保存療法 線維芽細胞 メカニカルストレス 伸張刺激

1. 研究開始当初の背景

膝関節の前十字靭帯（Anterior Cruciate Ligament；以下 ACL）は損傷や断裂によって、身体機能の低下や関節不安定性を引き起こし、変形性膝関節症といった二次的な疾病を惹起する。生体における他の靭帯と異なり、ACL は保存療法によって治癒するという確固たる証拠がないことから外科的再建術を選択せざるを得ない状況にある。

そこで、我々は治癒しないとされてきた ACL の非観血的治癒の基礎的知見の構築から治療選択肢の拡大を目指すこととした。2016 年から ACL は他靭帯組織と同様に潜在的に治癒能力を有しているという基礎的知見の確立を目的とした動物モデルを開発し、検証を続けている¹⁾³⁾。しかしながら、固定開始の適応時期や関節運動の重要性について検討すべき課題は多い。本モデルを利用した ACL 自己治癒ラットモデルにおいても、膝関節を完全にギプスで固定した場合、治癒 ACL が正常 ACL のような線維芽細胞の配向性を再現できず、断端部が膝蓋下脂肪帯や前後方向の滑膜に牽引されていた。このために断端が丸状化することで腱膜を構成することができず、治癒されるべき靭帯の配向性を阻害している可能性があることから治癒過程に適切なメカニカルストレス、すなわち伸張ストレスが重要であると認識している。故に、正常な自由運動が ACL に良好な力学的ストレスとなり前十字靭帯の治癒を促進させると仮説立て、研究を進めてきた。

2. 研究の目的

正常な自由関節運動が ACL に良好な力学的ストレスとなり前十字靭帯の治癒を促進させるかどうか明らかにするために、研究 1 では in vivo 研究として関節固定が自己治癒 ACL の力学強度に与える影響について調査し、研究 2 では in vitro の研究として ACL 由来線維芽細胞の伸張刺激に対するコラーゲンや線維芽細胞成長因子の mRNA 発現量の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 実験計画と倫理

本研究は埼玉県立大学実験動物倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：2021-2）

2) 治癒靭帯の関節固定による力学的強度の検証

2.1 対象動物と手術方法

10 週齢の Wistar 系雄性ラット 20 匹を利用し、ACL の治癒を目的とした手術を施行した後、通常飼育（CA:Cage Activity）群と関節固定（EX:Experiment）群に無作為に分類した。実験動物はプラスチック製のゲージ内で飼料や水は自由摂取とし、12 時間の明暗サイクル、温度・湿度は一定の条件下で管理した。なお、ゲージ内での運動制限は設けなかった。対象動物はイソフルラン吸入下で三種混合麻酔を皮下注射した。右後肢の膝蓋骨内側を皮膚ならびに膝蓋骨外側縁から関節包を縦切し、ACL 中間部を切断した。脛骨前方引き出しによって ACL の断裂を確認し、関節包を縫合した。関節包外からの前方引き出しの制動は歯科用ドリル NSK アルチメイト XL（株式会社ナカニシ、JPN）を用いて、脛骨粗面内側下部から外側に向かって骨孔を作成した。骨孔から大腿骨顆部後面にナイロン縫合糸エプル 3-0（株式会社秋山作製所、JPN）を貫通し、膝関節 90° 屈曲位の状態でナイロン糸を緊縛、脛骨の前方不安定性を制動した。生理食塩水で関節周囲の洗浄後、閉創し、抗ドミトール拮抗薬を皮下注射した。

2.2 ギプス固定方法

イソフルランの持続的吸入麻酔下にて、右後肢を膝関節屈曲 90° でプライトン・100 :シーネ 3 号（アルケア、JPN）を用いて固定した。プライトン固定を覆うようにコーバン（スリーエムジャパン、JPN）を巻き、補強した。ギプス固定は 1 日 1 回の頻回観察を行い、ギプス固定の緩みや固定側の足部に浮腫やうっ血を認めた場合に、ギプスを巻き替えた。

2.3 引張強度試験

術後 8 週ですべてのラットから採取された ACL の力学試験を実施した。ACL を除くすべての膝関節周囲軟部組織を除去し、引張強度試験機 Univert（オレンジサイエンス、JPN）を利用し、0.5N の予荷重から一軸引張（5mm/min）で ACL を破断させた際の最大破断強度と破断までの変位量（mm）を調査した。

3) ACL 由来線維芽細胞の伸張刺激に対する mRNA 発現量の解析

3.1 ACL 由来線維芽細胞分散

ラット両後肢から ACL を採取し、D-PBS で洗浄後 Collagenase TypeV を含む MRM α 培地で調整した溶液中でミンスし、37°C で 3 時間静置した。26G 注射針で懸濁後、70 μ m のセルストレーナーで濾過し、500G で 3 分間遠心した。上清除去後に 6 ウェルプレート上に播種し、10%FBS および 1% Antibiotic-Antimycotic を含む MEM- α 調整培地を添加し、5%CO₂ 濃度、37°C、飽和湿度に設定されたインキュベーター内で培養した。培地は 1 週間に 2 回の頻度で交換し、細胞がコンフルエントに達した場合は TrypLE Express で培養容器底面に付着した細胞を乖離させて継代した。

3.2 細胞の形態確認と増殖能

細胞の形態確認には、Vimentin の免疫蛍光染色を実施した。初代培養細胞の継代時に、カバーガラスを設置した 6 ウェルプレート上に播種した。Vimentin Polyclonal Antibody (bioss, USA) を一次抗体、Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (invitrogen, USA) を二次抗体として免疫蛍光染色後、ProLong Glass Antifade Mountant with NucBlue (Thermo Fisher Scientific, JPN) を用いてスライドガラスへ封入し、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X800 (KEYENCE, JPN) で観察、撮像した。細胞の増殖能については、第 2 継代細胞を利用し、播種後 24 時間・48 時間・72 時間の細胞増殖能を評価した。コンフルエントに達した細胞を、96 ウェルプレート上に 5.0×10^3 個ずつ播種し、播種後 24 時間・48 時間・72 時間において MTT Assay Kit (abcam, USA) を用い、プロトコールに従って分析を行った。

3.3 細胞伸張試験

第 2 継代細胞を 2×2 cm の細胞シート伸展用チャンパー内へ 1.5×10^5 cells/ml の濃度で 1ml 播種した。播種から 24 時間後に 1 時間、125%の伸張率で伸張試験を自作した伸展装置を利用して行った。断続伸張群は 0.5Hz のスピードで伸縮を 1 時間継続した。伸張直後、3 時間後、12 時間後にリアルタイム PCR 法で mRNA 発現量を調査した。

3.4 リアルタイム PCR

ISOGEN (ニッポンジーン, JPN) を用い、プロトコールに従い Total RNA を抽出した。1ng の RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR は StepOnePuls (Thermo Fisher Scientific, USA) を利用し、Taqman プローブ法によって実施した。ターゲット遺伝子として COL1A1、COL3A1 ならびに Transforming Growth Factor- β (TGF- β) を採用し、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH) を内因性コントロールとした比較 CT 法で相対値を算出した。

4. 研究成果

1) 引張強度試験

関節制動術を行い、ACL 自己治癒を促したすべてのラットで ACL の連続性が確認された。最大破断強度は、EX 群 8.12 [4.02-12.22]N、CA 群 12.99 [9.47-16.51]N であり、有意に EX 群で低下した ($p=0.044$)。剛性は EX 群 3.44 [1.32-5.55]N、CA 群 7.34 [5.81-8.88]N であり、有意に EX 群で低下した ($p=0.003$)。

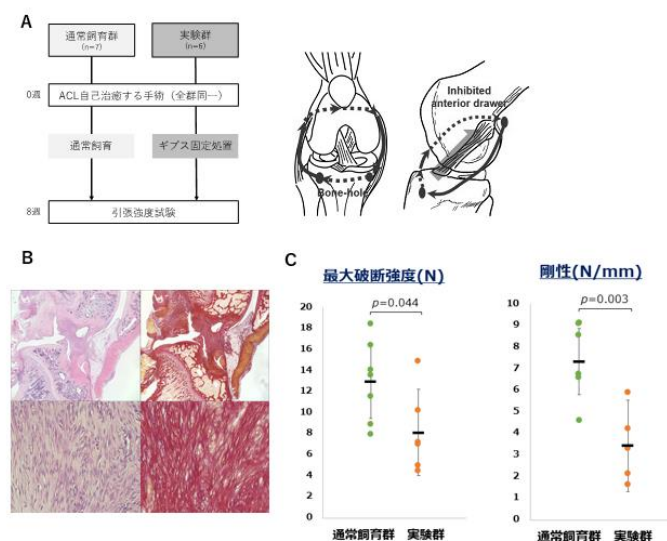


Fig.1 治癒靭帯の関節固定による力学的強度の検証
A: 実験プロトコールならびに ACL 自己治癒モデルにおける手術方法のスキーマ。B: 治癒 ACL の HE 染色ならびにピコシリウスレッド染色。C: 力学試験結果

2) ACL 由来線維芽細胞の形態確認と細胞生存能

本研究において培養を行った ACL 由来細胞に対する免疫蛍光染色の結果、撮像範囲内で染色され、全ての核周囲に Vimentin の染色像が確認された。Vimentin は細胞骨格タンパク質と呼ばれる中間径フィラメントの一種であり、細胞分化のマーカーとしても用いられていることから培養した細胞は ACL 由来線維芽細胞の可能性が高いことが示唆された。細胞生存能は、時間経過とともに漸減し、播種後 24 時間、4 時間後と比較して 72 時間後には有意に減少した。

3) 伸張刺激による mRNA 発現量について (図 3)

Col1a1 mRNA は、持続伸張直後において伸張刺激がない細胞に比べて 6.99 倍と発現量が有意に増加したが、断続伸張との場合は 0.98 倍であり、統計学的有意差を認めなかった。Col3a1 mRNA においても持続伸張直後では伸張刺激がない細胞に比べて 2.65 倍と発現量が有意に増加したが、断続伸張と伸張刺激がない細胞では有意差を認めなかった。持続伸張群における 0 時間と 3 時間と 12 時間の発現量の比較は、Col1a1 mRNA、Col3a1 mRNA、TGF- β 1 mRNA が 0 時間に比較して、3 時間と 12 時間で有意に発現量が減少した。

以上の成果から、本研究は膝前十字靭帯自己治癒モデルに対する関節固定による力学強度の変化と ACL 由来線維芽細胞に対する伸張刺激による mRNA 発現量の変化についての知見を提供するものである。治癒過程における術後早期からの伸張刺激の低下は合成能力が低下し、力学的強度が低下する可能性を示唆した。

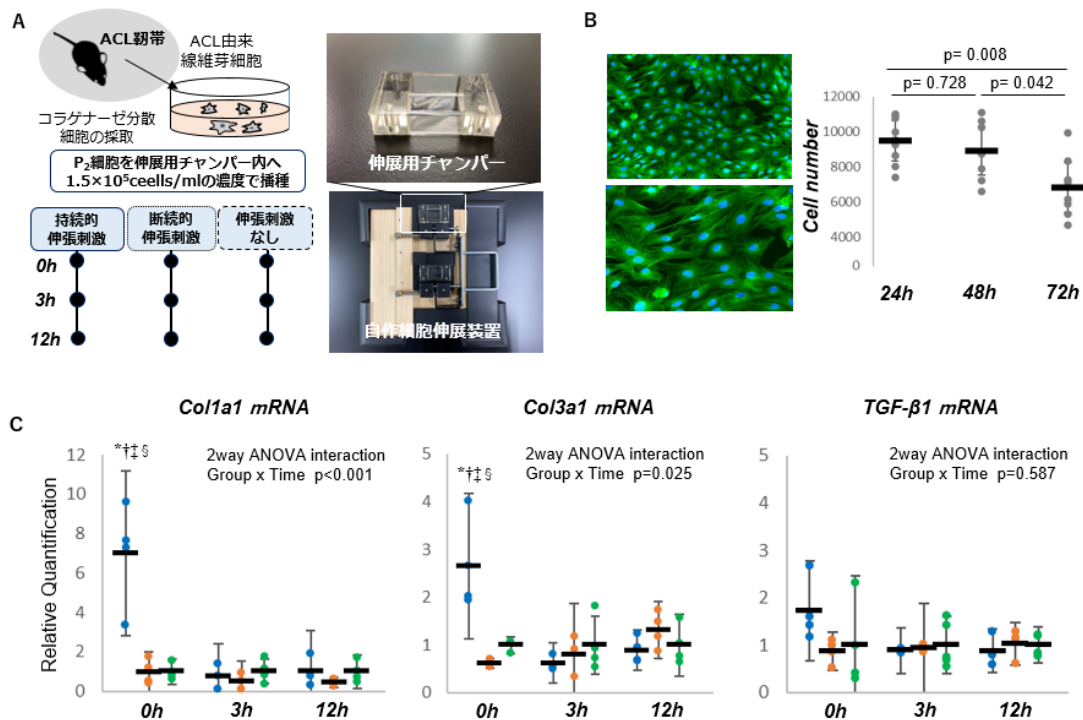


Fig. 2 持続・断続伸張刺激による mRNA 発現量について

A: 実験プロトコルを示す。伸張用チャンパーに播種された細胞は播種後 24 時間後に持続伸張（通常を 100% とした場合に 125% で保持）、断続伸張（自作した伸張装置を利用して、通常を 100% とした場合に 125%、1Hz で刺激）、刺激なしに分類され、刺激後の各タイムポイントで解析した。B: Vimentin 免疫蛍光細胞染色像。核は NucBlue で染色（白丸または紡錘上）。核周囲に Vimentin の染色像が確認された。右図は MTT assay による細胞生存能を播種後無血清培地にて 24 時間、48 時間、72 時間で増殖能力を評価した。結果、72 時間で有意に細胞生存能が低下した。一元配置分散分析（後検定は Tukey 法）C: 各群におけるリアルタイム PCR の発現量の相対値を示す。核は NucBlue で染色（白丸または紡錘上）。核周囲に Vimentin の染色像が確認された。右図は MTT assay による細胞生存能を播種後無血清培地にて 24 時間、48 時間、72 時間で増殖能力を評価した。結果、72 時間で有意に細胞生存能が低下した。一元配置分散分析（後検定は Tukey 法）

文献

- 1) Kokubun T, Murata K., et al. Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees With a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model. American journal of sports medicine 44 (11), 2900–2910, 2016.
- 2) Morishita Y, Murata K., et al. Acute molecular biological responses during spontaneous anterior cruciate ligament healing in a rat model. Sport Sciences for Health. 2019(15): 659-666.
- 3) Kano T., Murata K., et al. Influence of the site of injury on the spontaneous healing response in a rat model of total rupture of the anterior cruciate ligament. Connect Tissue Res. 2121;4: 1–13

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高須千晴, 小島拓真, 寺田秀伸, 川端空, 榊田拓真, 金村尚彦, 高柳清美, 村田健児
2. 発表標題 膝前十字靭帯自己治癒モデルに対する関節固定が靭帯強度に及ぼす影響
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiharu Takasu, Hidenobu Terada, Takuma Kojima, Takuma Kano, Yuri Morishita, Sora Kawabata, Takanori Kokubun, Naohiko Kanemura, Kiyomi Takayanagi, Kenji Murata
2. 発表標題 Effect of joint immobilization on ligament strength in self-healing model of the anterior cruciate ligament
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田秀伸, 小島拓真, 高須千晴, 川端空, 榊田拓真, 村田健児
2. 発表標題 膝前十字靭帯治癒過程における靭帯細胞のコラーゲンmRNA発現量の調査
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 健児 (MURATA KENJI) (30792056)	埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教 (22401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------