

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09581

研究課題名(和文) 膝前十字靭帯における6型コラーゲンの役割

研究課題名(英文) The role of Collagen 6 in knee anterior cruciate ligament

研究代表者

長尾 雅史 (Nagao, Masashi)

順天堂大学・革新的医療技術開発研究センター・特任准教授

研究者番号：50384110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：前十字靭帯(ACL)断裂は、スポーツ選手にとって一般的な膝の怪我で、治療によって100%の機能回復は難しいのが現状である。過去、コラーゲンVIやXII遺伝子とACL断裂関連が報告されていたため、コラーゲンXII欠失がACL損傷を引き起こすと考え、COL12A1欠マウス(KO)モデルの解析を行った。KOマウスは歩行異常があり、5-19週齢のKOマウスでは20-60%の確率でACLの連続性が失われていた。ACLには十分な12型コラーゲンタンパク及びmRNA発現が確認されたが、年齢と共に発現が減弱することが確認された。以上からコラーゲンXII欠失がACL損傷のリスクを高めることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スポーツ選手で一般的な膝外傷である前十字靭帯(ACL)損傷には一般的に手術療法が勧められている。様々な手術方法が提案されているが、スポーツ復帰までに最低半年間要する上に、怪我以前のパフォーマンスに戻れないことが多い。本研究では、ACL断裂におけるリスク因子としての12型コラーゲンが明らかになったことで、今後12型コラーゲンの遺伝子多型などでのリスク分析に繋がる可能性がある。本遺伝子の変異が明らかになれば選手へのリスクの説明や情報提供、トレーニングメニューの調整など可能となり、ACL損傷の予防に繋がる可能性のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Anterior cruciate ligament (ACL) rupture is a common knee injury for athletes. Although surgical reconstruction is recommended for the treatment of ACL ruptures, 100% functional recovery is unlikely. Several studies have reported an association between polymorphisms of the collagen XII gene COL12A1 and ACL rupture. Collagen XII is highly expressed in tendons and ligaments and regulates tissue structure and mechanical property. To elucidate the influence of collagen XII deficiency on ACL, 4 to 19-week-old male Col12a1^{-/-}(KO) and wild-type(WT) mice were used. The KO mice showed an abnormal gait with a 2.7-fold increase in step angle, suggesting altered step alignment. KO mice displayed 20-60% ACL discontinuities, but 0% discontinuity in the posterior cruciate ligament. No discontinuities were found in WT mice. Collagen XII mRNA expression in the ACL tended to decrease with aging. Our study demonstrates for the first time that collagen XII deficiency increases the risk of ACL injury.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：前十字靭帯損傷 遺伝子 膝 靭帯損傷

1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は主にスポーツ選手の外傷として広く知られ、一般的に保存加療は無効である。不安定性が残存する場合は自家ハムストリング腱などによる再建術がスポーツ復帰には必要となる。近年の ACL 再建術の進歩に関わらず、再建術後もスポーツ復帰できない選手が少なからず存在することから、ACL 損傷をいかに予防するかは重要なテーマである。しかしながら、スポーツ参加者全員に予防を行うことは非現実的であり、リスクの高い選手を見極めることが必要である。

研究分担者の過去の研究から XII 型コラーゲン (Col12) は筋細胞の献上変化に関与し、筋量と質を維持すること (Zou and Izu et al. Human Mol. Genet. 2014) 等が明らかとなっている。またそれぞれのコラーゲンは ACL の構成コラーゲンであり、最近の研究から特定の遺伝子多型 (SNP) が ACL 損傷や腱損傷と関連があると報告されている。特に XII 型コラーゲンは、力学的ストレスの高い部位での発現が高く、線維形成制御に寄与すると想定されている (Olsen BR et al. Curr Opin Cell Biol, 1995) が、ACL における機能は未解明である。

2. 研究の目的

本研究は Col12a1 欠失マウスの ACL を含む膝関節の変化を明らかにすることで、XII 型コラーゲンの役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

< マウス >

4-19 週齢の野生型 (WT) 及び遺伝子改変マウス (Col12a1 欠失マウス, KO マウス) を利用した

< 歩行解析 >

歩行解析はビデオ録画により行った。各マウスの足に塗料を塗り、トンネル内を歩行させ、ステップ角度を測定した (右図)。

< 組織学的評価 >

組織学的は両マウスの後肢で行った。組織をパラフィンに包埋し、矢状面に沿って 2µm 切片を作成した。ヘマトキシリン/エオシン (HE) 染色と Safranin-O/Fast green 染色を行った。ACL と後十字靭帯 (PCL) の不連続性は、Safranin-O/Fast green 染色を用いて判定した。免疫染色での評価は脱灰後、凍結切片として解析に用いた。

< リアルタイム PCR 解析 >

4 週齢および 17 週齢の ACL およびアキレス腱を用いた。逆転写は、500 ng の total RNA を用い、ランダムプライマーを用いて行った。定量的リアルタイム PCR は QuantStudio3 (Applied Biosystems) を用いて行った。

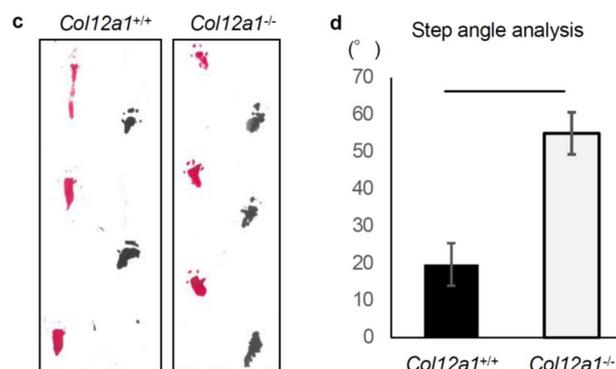
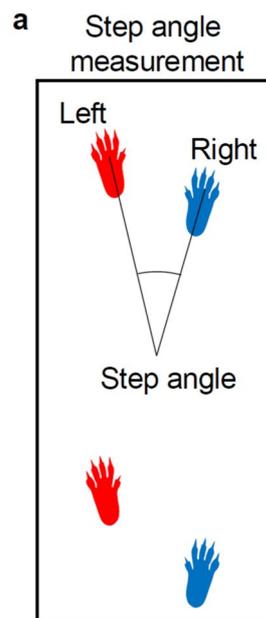
4. 研究成果

< Col12a1 欠失 (KO) マウスは歩行異常を伴う膝関節変形を示す >

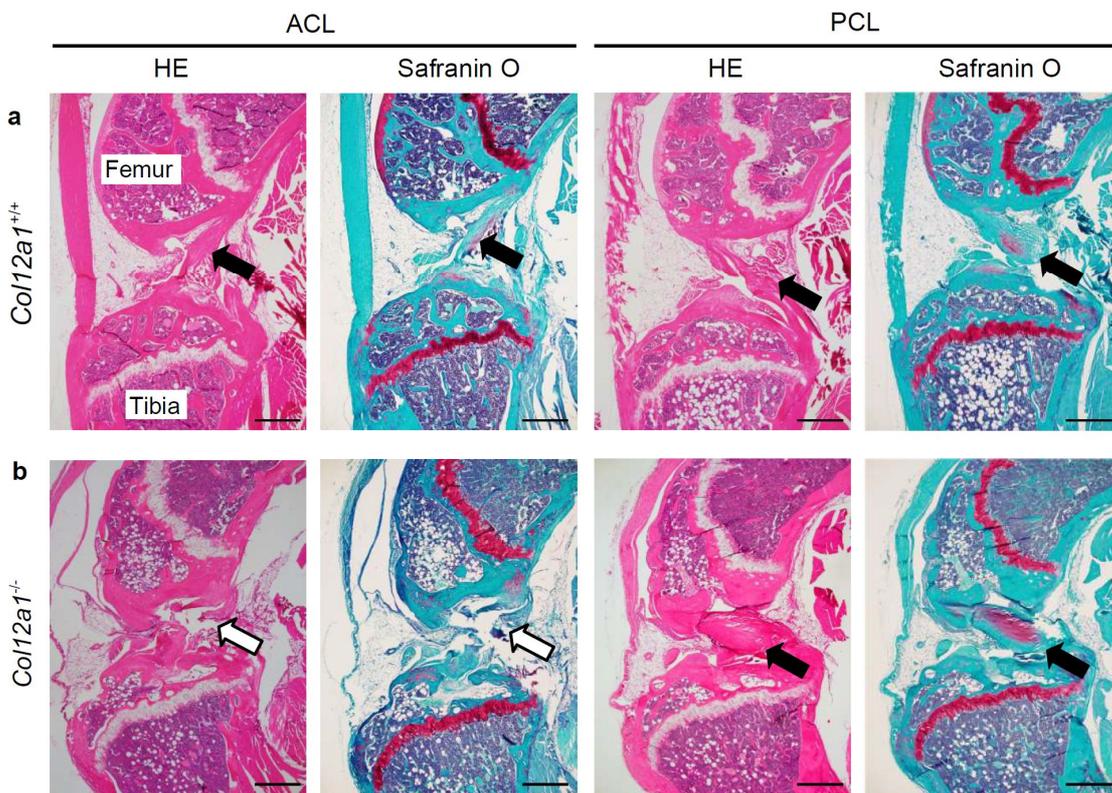
KO マウスは exon2-5 欠失している。歩行解析の結果、WT マウスと比較して KO マウスは歩行異常を示し、運動能力が低下していた。軽度の膝関節伸展制限がみられ、ステップ角度を測定したところ、WT の足跡は進行方向に対してほぼ平行であったのに対し、KO マウスの足跡は外側に傾斜していた (右図)。角度を計測したところ、KO マウスのステップ角は野生型マウスの約 2.7 倍であった (右図)。

< コラーゲン XII 欠失は ACL 不連続を引き起こす >

野生型の ACL と PCL は、若週齢マウスと成体マウスの両方で大腿骨脛骨間に連続性が見られた一方、



KO マウスでは一部個体の ACL は不連続であり、脛骨大腿骨間に連続性が見られなかった。(下図)。KOマウスの PCL では不連続性は観察されなかった。関節軟骨と半月板は、野生型、KO両群に差は見られなかった。

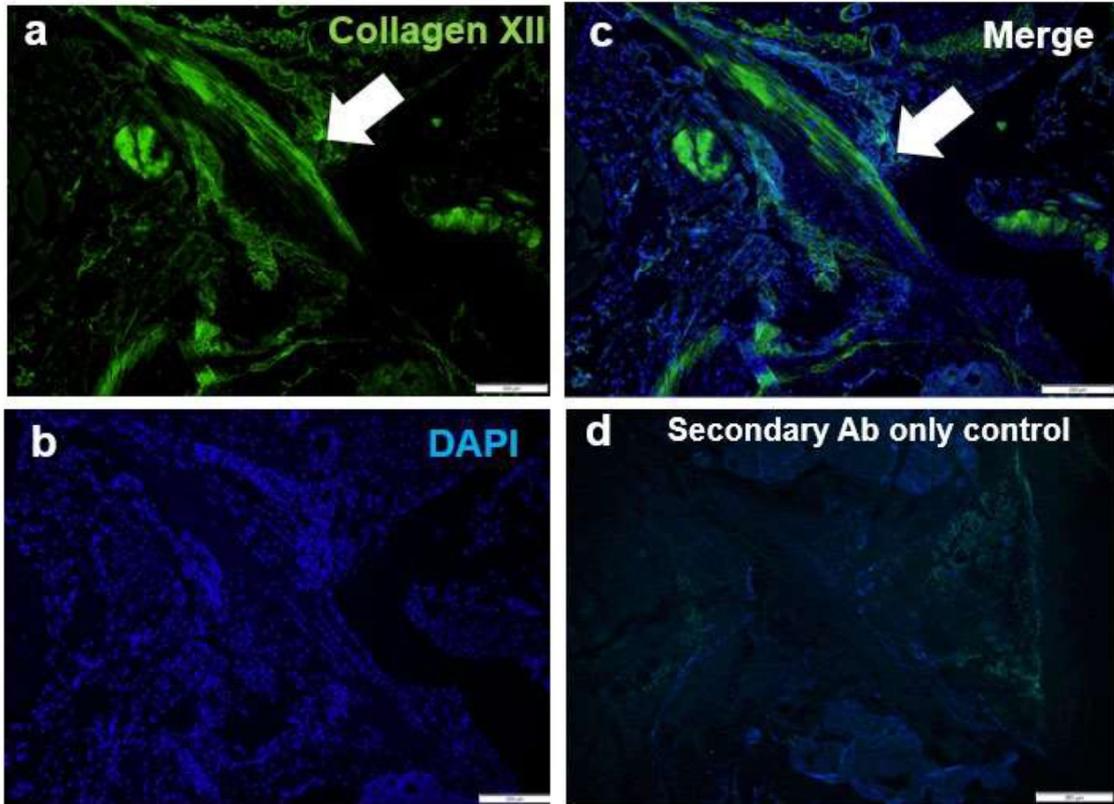


ACLの不連続性が見られた割合は5週齢で20%、17-19週齢で53%であった(下テーブル)

	Young Stage (5-Week-Old)	Mature Stage (17-19-Week-Old)
<i>Col12a1</i> ^{+/+}	0% (0/4)	0% (0/8)
<i>Col12a1</i> ^{-/-}	20% (1/5)	53% (8/15)

< XII型コラーゲンは ACL の構成成分である >

XII型コラーゲンが ACL に発現しているかどうかを調べるために、17週齢の野生型マウスの膝関節を免疫蛍光分析した。核は DAPI 染色で可視化した。その結果、XII型コラーゲンは ACL で検出され、フィブリル状の配列を示した。この結果から、コラーゲン XII は ACL の構成要素の一つであることが確認された(下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Fukusato Shin, Nagao Masashi, Fujihara Kei, Yoneda Taiju, Arai Kiyotaka, Koch Manuel, Kaneko Kazuo, Ishijima Muneaki, Izu Yayoi	4. 巻 10
2. 論文標題 Collagen XII Deficiency Increases the Risk of Anterior Cruciate Ligament Injury in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4051 ~ 4051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10184051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inomata Takenori, Nakamura Masahiro, Iwagami Masao, Sung Jaemyoung, Nakamura Masahiro, Ebihara Nobuyuki, Fujisawa Kumiko, Muto Kaori, Nojiri Shuko, Ide Takuma, Okano Mitsuhiro, Okumura Yuichi, Fujio Kenta, Fujimoto Keiichi, Nagao Masashi, Hirotsawa Kunihiko, Akasaki Yasutsugu, Murakami Akira	4. 巻 76
2. 論文標題 Symptom based stratification for hay fever: A crowdsourced study using the smartphone application AllerSearch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 3820 ~ 3824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Homma Yasuhiro, Masubuchi Yosuke, Shirogane Yuichi, Amano Hirofumi, Muramoto Yuko, Nagao Masashi, Okuno Ryuji, Baba Tomonori, Yamaji Ken, Tamura Naoto, Kaneko Kazuo, Ishijima Muneaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Grafting of autologous concentrated bone marrow processed using a point-of-care device for patients with osteonecrosis of the femoral head: A phase 1 feasibility and safety study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 18 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Maria, Inomata Takenori, Nojiri Shuko, Sung Jaemyoung, Nagao Masashi, Shimazaki Jun, Midorikawa-Inomata Akie, Okumura Yuichi, Fujio Kenta, Akasaki Yasutsugu, Kuwahara Mizu, Huang Tianxiang, Nakamura Masahiro, Iwagami Masao, Hirosawa Kunihiko, Fujimoto Keiichi, Murakami Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical efficacy of diquafosol sodium 3% versus hyaluronic acid 0.1% in patients with dry eye disease after cataract surgery: a protocol for a single-centre, randomised controlled trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e052488 ~ e052488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2021-052488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inomata Takenori, Nakamura Masahiro, Iwagami Masao, Sung Jaemyoung, Nakamura Masahiro, Ebihara Nobuyuki, Fujisawa Kumiko, Muto Kaori, Nojiri Shuko, Ide Takuma, Okano Mitsuhiro, Okumura Yuichi, Fujio Kenta, Fujimoto Keiichi, Nagao Masashi, Hirosawa Kunihiko, Akasaki Yasutsugu, Murakami Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Individual characteristics and associated factors of hay fever: A large-scale mHealth study using AllerSearch	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2021.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Hiroaki, Nanmo Hisayoshi, Nojiri Shuko, Nagao Masashi, Nishizaki Yuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Projected numbers of knee and hip arthroplasties up to the year 2030 in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2021.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osawa Yoshihiro, Nomura Kaho, Kimira Yoshifumi, Kushibe Seiji, Takeyama Ken-ichi, Nagao Masashi, Kataoka-Matsushita Aya, Koizumi Seiko, Mano Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Monitoring urinary collagen metabolite changes following collagen peptide ingestion and physical activity using ELISA with anti active collagen oligopeptide antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92934-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Hui, Nagao Masashi, Nishio Hirofumi, Kaneko Haruka, Saita Yoshitomo, Takazawa Yuji, Ikeda Hiroshi, Kaneko Kazuo, Ishijima Muneaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Remnant preservation provides good clinical outcomes after anterior cruciate ligament reconstruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 3763 ~ 3772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-020-06406-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huang Hui, Nagao Masashi, Nishio Hirofumi, Kaneko Haruka, Saita Yoshitomo, Takazawa Yuji, Ikeda Hiroshi, Kaneko Kazuo, Ishijima Muneaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Remnant preservation provides good clinical outcomes after anterior cruciate ligament reconstruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-020-06406-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Hui, Nagao Masashi, Arita Hitoshi, Nishio Hirofumi, Kaneko Haruka, Saita Yoshitomo, Ishijima Muneaki, Takazawa Yuji, Ikeda Hiroshi, Kaneko Kazuo	4. 巻 26
2. 論文標題 Validation and defining the minimal clinically important difference of the Japanese version of the IKDC Subjective Knee Form	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 149 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamori Takayuki, Nagao Masashi, Shimasaki Yu, Okazaki Takayuki, Akiyoshi Naoki, Nishio Hirofumi, Takazawa Yuji, Yoshimura Masafumi	4. 巻 32
2. 論文標題 Reliability assessment of the functional movement screen for predicting injury risk in Japanese college soccer players	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physical Therapy Science	6. 最初と最後の頁 850 ~ 855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1589/jpts.32.850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yohei, Saita Yoshitomo, Takaku Tomoiku, Yokomizo Tomomasa, Nishio Hirofumi, Ikeda Hiroshi, Takazawa Yuji, Nagao Masashi, Kaneko Kazuo, Komatsu Norio	4. 巻 7
2. 論文標題 Platelet-rich plasma (PRP) accelerates murine patellar tendon healing through enhancement of angiogenesis and collagen synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40634-020-00267-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kim Sung-Gon, Nagao Masashi, Nozawa Masahiko, Doi Tokuhide	4. 巻 27
2. 論文標題 Optimal cutoff score for patient-reported outcome measures after anterior cruciate ligament reconstruction using load?displacement curve analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Surgery	6. 最初と最後の頁 none
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2309499019887581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Hui, Nagao Masashi, Arita Hitoshi, Shiozawa Jun, Nishio Hirofumi, Kobayashi Yohei, Kaneko Haruka, Nagayama Masataka, Saita Yoshitomo, Ishijima Muneaki, Takazawa Yuji, Ikeda Hiroshi, Kaneko Kazuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Reproducibility, responsiveness and validation of the Tampa Scale for Kinesiophobia in patients with ACL injuries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Health and Quality of Life Outcomes	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12955-019-1217-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 福里 晋, 伊豆 弥生, 長尾 雅史, 石島 旨章
2. 発表標題 6型、12型コラーゲンの膝前十字靭帯における機能解明
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福里晋、長尾雅史
2. 発表標題 膝前十字靭帯損傷における新たなリスク要因としてのXII型コラーゲンの機能の解明
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福里晋、長尾雅史、伊豆弥生
2. 発表標題 Collagen XII as a maintenance factor for anterior cruciate ligament
3. 学会等名 アメリカ骨代謝学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福里晋、長尾雅史、伊豆弥生
2. 発表標題 膝前十字靭帯損傷における新たなリスク要因としてXII型コラーゲンの機能の解明
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福里晋、長尾雅史、伊豆弥生
2. 発表標題 膝前十字靭帯損傷における新たなリスク要因としてVI型およびXII型コラーゲンの機能の解明
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2019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	伊豆 弥生 (Izu Yayoi) (90431949)	岡山理科大学・獣医学部・准教授 (35302)	

	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 協力者	福里 晋 (Fukasato Shin)	順天堂大学・整形外科・博士過程 (32620)	

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
---------	---------