

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591927

研究課題名（和文） 除負荷が *In Vivo* で誘導する腱線維芽細胞アポトーシスの発見と分子機序の解明

研究課題名（英文） Evaluations of fibroblast apoptosis in the stress-deprived patellar tendon in vivo

研究代表者

北村 信人 (KITAMURA NOBUTO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80447044

研究成果の概要（和文）：除負荷とアポトーシスとの関連を *in vivo* において証明することが腱組織の萎縮や劣化の病態解明において最重要課題であり、この見地から我々が独自に開発した生体内で腱にかかる負荷を調整可能な膝蓋腱除負荷モデルを用いて研究を行なった。除負荷膝蓋腱の線維芽細胞において TUNEL、caspase-3、JNK および p38 陽性細胞は処置後 24 時間、2、4、日で有意に増加していた。除負荷による膝蓋腱線維芽細胞アポトーシスは処置後早期に MAPK シグナル経路を介して生じていることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The effect of stress deprivation on the tendon tissue has been an important focus in the field of biomechanics. Rabbits were divided into stress-shielded, sham-operated, and control groups. To completely shield the patellar tendon from stress, we used an established surgical method. Both the number and the ratio of TUNEL-, caspase-3-, JNK-, and p38-positive cells were significantly greater ($p < 0.0001$) in the stress-shielded group than in the sham group at 24 h, 2, and 4 days. This study demonstrated that complete stress deprivation induces fibroblast apoptosis *in vivo* with activation of JNK and p38 within 24h. This fact suggested that the fibroblast apoptosis caused by stress deprivation is induced via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・靭帯組織、除負荷、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性的な *disuse* や整形外科的種々の病態による腱組織の萎縮や劣化は生体工学および整形外科学領域における重要な研究対象である。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 (J Biomech Eng; 1993)、また膝蓋腱の力学特性の劣化は、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 (J Orthop Res; 1993, 1997)。さらに、我々は *in vivo* において TGF-beta の局所投与が凍結処理前十字靭帯の再構築において力学特性を変化させることを明らかにした (J Orthop Res; 2002, J Biomech; 2003)。そこでこれらの線維芽細胞によるマトリクス再構築現象の上流にはどのような分子機序が存在するのか? という問題が提起された。

(2) 最近の我々の膝蓋腱除負荷モデルを用いた研究において、除負荷膝蓋腱に IL-1-beta および TNF-alpha が過剰発現することが明らかになった (J Biomech; 2005)。そこで代表研究者は subtractive hybridization 法を用い、除負荷膝蓋腱に発現している遺伝子を網羅的に解析し、14 個の過剰発現遺伝子を発見した (Int J Mol Med; 2004)。特に、これらの遺伝子の中で抗酸化酵素の一つである Mn-SOD が遺伝子レベルのみならずタンパクレベルにおいても発現が亢進していることをはじめ明らかにした。

(3) Mn-SOD は活性酸素種に対する防御機構の一つとして広く知られており、同様に酸化ストレスはアポトーシス (apoptosis) と深く関与していることが知られている。そこで代表研究者は、除負荷は MAPK pathway を介してアポトーシスを引き起こすという仮説を立てた。近年、Yuan ら (Biochim Biophys Acta; 2003) は変性した肩腱板の線維芽細胞に過剰なアポトーシスが認められたと報告をしており、更に *in vitro* における培養細胞においては力学刺激の減少とアポトーシスの関連を示唆する報告 (Clin Orthop Relat Res; 2008) がある。しかし、*in vivo* において除負荷が腱の線維芽細胞にアポトーシスを起こすことを証明した研究は皆無である。

2. 研究の目的

負荷の減少 (除負荷) は、腱・靭帯組織の力学特性の劣化を招くが、その機序は明らかになっていない。我々は独自の研究結果から、「除負荷は mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway を介して線維芽細胞にアポトーシスを引き起こす」という仮説を立てた。本研究の目的はその仮説を検証することである。

3. 研究の方法

既に確立した膝蓋腱除負荷モデルを用いて、除負荷膝蓋腱における細胞動態を明らかにする。また、除負荷された膝蓋腱の力学特性を経時的に評価する。

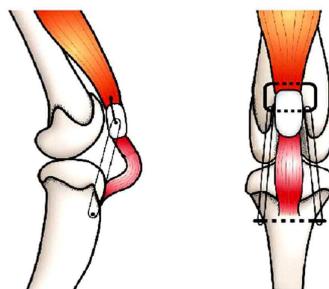


図1 膝蓋腱除負荷モデル

(1) 除負荷膝蓋腱におけるアポトーシス現象を組織学的および免疫学組織的に評価した。実験には日本白色家兎 35 羽を用いた。I 群は除負荷処置のまま新たな処置を加えず (n=15)、II 群では除負荷処置後すぐに除負荷ワイヤーを切断し Sham 手術とした (n=15)。III 群では無処置の正常対照とした (n=5)。手術後 1、2、4、7、14 日で各群とも 3 羽ずつ屠殺し、組織学的評価および超微細構造解析の評価に供した。各腱の中 1/3 を長軸方向で三等分し、各部分を表皮側と関節側に二分して、各切片から超薄切片を作製した。アポトーシス現象の証明において、TUNEL 法にて DNA 断片を検出しアポトーシスの程度を組織学的に検証した。また、アポトーシス誘導機構におけるシグナル伝達に関与しているシステインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーや、細胞増殖・分化のシグナル伝達を担う因子とされている MAPK ファミリーについて検証のために、カスパーゼファミリーの caspase-3 および MAPK ファミリーの p38、JNK の活性化を免疫組織学的に評価した。除負荷膝蓋腱における細胞形態については、HE、およびトルイジンブルー染色した超薄切片を光学顕微鏡にて観察した。また各腱から超薄切片を作製し、ウラン・クエン酸鉛染色を行って透過型電子顕微鏡を用いてコラーゲンフィブリルの横断面構造を観察した。

(2) 再構築現象による腱マトリクスの力学的特性の変化は非常に重要なため、引っ張り試験を行って、その結果を膝蓋腱内のアポトーシス現象と比較した。実験には日本白色家兎 20 羽を用いた。右膝蓋腱に対して除負荷処置を行ない、左膝蓋腱には何も処置を施さず正常対照とした。無作為に 2 群に分け、I 群は除負荷処置のまま新たな処置を加えず、II 群では除負荷処置後すぐに除負荷ワイヤーを切断し Sham 手術とした。手術後 7、14 日で各群とも 5 羽ずつ屠殺し、膝蓋腱の力学特性の評価を行なった。無作為に選別された左膝蓋

腱を正常対照データとして使用した。腱全体の力学試験は膝蓋骨—膝蓋腱—脛骨複合体を摘出し、Video-dimension analyserを組み込んだ生体軟組織材料試験システムを用いて37°C生理食塩水中での力学的パラメータの測定を行い、断面積、引っ張り強度、弾性率、破断伸び、最大破断荷重を測定した。除負荷された膝蓋腱の fibril の力学特性の評価には別の日本白色家兎 30 羽を用いて行った。同様の処置と群わけを行ない、手術後 7、14、21 日で各群とも 5 羽ずつ屠殺し、膝蓋腱 fibril の力学特性の評価を行なった。fibril の力学試験においては、独自のマイクロ引張り試験装置を用いて37°C生理食塩水中での力学的パラメータ（弾性率、破断伸び、破断強度）の測定を行なった。

4. 研究成果

(1) 除負荷群において、TUNEL 陽性細胞は術後 24 時間より認められ 4 日目まで増加し、陽性細胞数および陽性率ともに Sham 群より有意に増加していた (1 日 : $p < 0.0001$ 、2 日 : $p < 0.0001$ 、4 日 : $p < 0.0001$)。7 日目以降は、除負荷群においても TUNEL 陽性細胞は減少していたが Sham 群との比較では有意差を認めなかった ($p < 0.005$)。

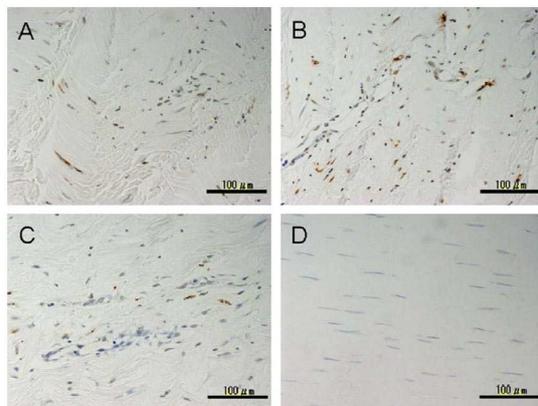


図2 TUNEL法による解析。(A) 除負荷 24 時間、(B) 除負荷 4 日、(C) 除負荷 7 日、(D) Sham 群

Active caspase-3 染色では、TUNEL 法による解析と同様の傾向を示した。術後 24 時間より認められ 7 日目まで陽性細胞数および陽性率ともに Sham 群より有意に増加していた (1 日 : $p < 0.0001$ 、2 日 : $p < 0.0001$ 、4 日 : $p < 0.0001$ 、7 日 : $p < 0.0001$)。p38 および JNK の発現も TUNEL 陽性細胞と同様の動向を示した。本研究は、除負荷が膝蓋腱線維芽細胞に早期 (24 時間) にアポトーシスを引き起こすことを *in vivo* で初めて明らかにした。この結果は、除負荷による膝蓋腱線維芽細胞のアポトーシスが MAPK pathway を介して起こること示唆した。

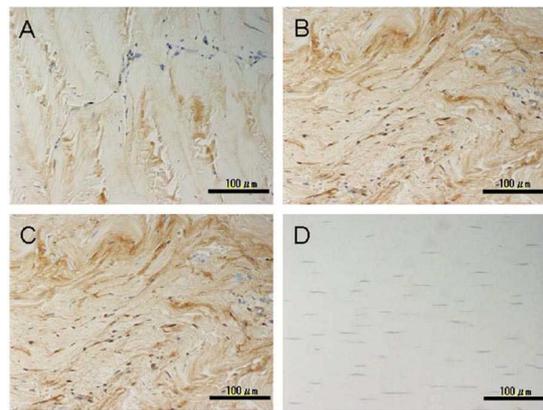


図3 active caspase-3 染色。(A) 除負荷 24 時間、(B) 除負荷 4 日、(C) 除負荷 7 日、(D) Sham 群

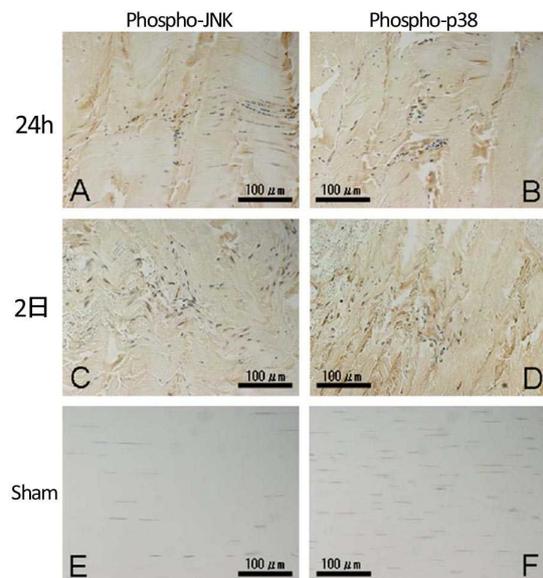


図4 Phospho-JNK、Phospho-p38 染色。(A) (B) 除負荷 24 時間、(C) (D) 除負荷 4 日、(E) (F) Sham 群

(2) 術後 1 週では、腱全体の断面積の平均 (mm^2) は、除負荷群は 17.2、対照群は 14.8、破断強度の平均 (N) は、除負荷群は 603、対照群は 948 であった。術後 2 週では、断面積の平均 (mm^2) は、除負荷群は 22.5、対照群は 14.4、破断強度の平均 (N) は、除負荷群は 422、対照群は 843 であった。両群間には各時期において有意差を認めた ($p < 0.05$)。除負荷が膝蓋腱線維芽細胞に早期 (1 日) にアポトーシスを引き起こすことが明らかになっており、アポトーシスと力学特性の変化の関与が示唆された。

(3) 正常膝蓋腱全体の Tangent modulus (MPa) は 1290、Tensile strength (MPa) は 72.0 であった。一方、除負荷された膝蓋腱全体の Tangent modulus (MPa) は 97、Tensile strength (MPa) は 3.9 であり正常と比較し有意に低下していた。また fibril の計測にお

いても、Tangent modulus および Tensile strength は正常腱で 227、16.5、除負荷腱で 53、4.4 と有意差を認めた。今回の結果は、除負荷は微細構造レベルにおいても力学特性に変化を与えることを示し、除負荷が膝蓋腱線維芽細胞に早期（1 日）にアポトーシスを引き起こすことが微細構造レベルから影響を与えていることを示唆した。除負荷によるアポトーシスは膝蓋腱の構造特性だけでなく材料特性にも有意な影響を与えることが明らかとなった。

（4）In vivo において除負荷が早期に JNK や p38 を活性化して線維芽細胞のアポトーシスを引き起こすことを世界で初めて証明した。線維芽細胞のアポトーシスはその後の外来性線維芽細胞の増加をもたらす、その細胞活動が構造特性の低下を招く。この発見は、今後の除負荷の効果の研究において分子生物学的解析の重要性を示しこの分野の学術的發展に大きな変化を与える。

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 7 件）

- ① Kawaguchi Y, Kondo E, Kitamura N, Kai S, Inoue M, Yasuda K. Comparisons of femoral tunnel enlargement in 169 patients between single-bundle and anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstructions with hamstring tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19: 1249-1257, 2011. 査読有
- ② Kawaguchi Y, Kondo E, Kitamura N, Arakaki K, Tanaka Y, Munekata M, Nagai N, Yasuda K. In vivo effects of isolated implantation of salmon-derived crosslinked atelocollagen sponge into an osteochondral defect. *J Mater Sci Mater Med* 22: 397-404, 2011. 査読有
- ③ Kitayama S, Onodera S, Kondo E, Kobayashi T, Miyatake S, Kitamura N, Tohyama H, Yasuda K. Deficiency of macrophage migration inhibitory factor gene delays healing of the medial collateral ligament: A biomechanical and biological study. *J Biomech* 44: 494-500, 2011. 査読有
- ④ Miyatake S, Kondo E, Tohyama H, Kitamura N, Yasuda K. Biomechanical evaluation of a novel application of a fixation device for bone-tendon-bone graft

(EndoButton CL BTB) to soft-tissue grafts in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 26: 1226-1232, 2010. 査読有

- ⑤ Yasuda K, Tanabe Y, Kondo E, Kitamura N, Tohyama H. Anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 26: S21-34, 2010. 査読有
- ⑥ Kawabata H, Katsura T, Kondo E, Miyatake S, Tanabe Y, Kitamura N, Setoguchi T, Komiya S, Yasuda K. Stress deprivation from the patellar tendon induces apoptosis of fibroblasts in vivo with activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biomech* 42: 2611-2615, 2009. 査読有
- ⑦ Yasuda K, Kitamura N, Kondo E, Hayashi R, Inoue M. One-stage anatomic double-bundle anterior and posterior cruciate ligament reconstruction using the autogenous hamstring tendons. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17: 800-805, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 北山聡一郎、小野寺伸、宮武慎、近藤英司、北村信人、遠山晴一、安田和則：マクロファーージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が膝内側側副靭帯損傷の治癒に与える影響、第 25 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、2010 年 10 月
- ② Ogawa M, Kitamura N, Kondo E, Kitayama S, Inagaki Y, Tohyama H, Tanaka Y, Yasuda K. Two to 15-year clinical results of anatomic reconstruction of the superficial layer of the medial collateral ligament using the semitendinosus tendon-hybrid graft. The 14th ESSKA Congress, Oslo, Norway, 2010, Jun
- ③ Kai S, Kondo E, Tohyama H, Kitamura N, Kawaguchi Y, Yasuda K, Mizutani K: Arthroscopical and radiological evaluations on intra-articular outlet location of tibial tunnels created with anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, The 14th ESSKA Congress, Oslo, Norway, 2010, Jun.

- ④ Kawaguchi Y, Kitamura N, Kondo E, Kai S, Inoue M, Tohyama H, Yasuda K. Bone tunnel enlargement following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring tendons: a comparison of single-bundle and anatomic double bundle reconstruction techniques. The 14th ESSKA Congress, Oslo, Norway, 2010, Jun.
- ⑤ 河口泰之、北村信人、近藤英司、松田英敏、稲垣有佐、横田正司、北山総一郎、小野寺純、今淵隆誠、甲斐秀顯、宮武慎、小野寺伸、遠山晴一、安田和則、井上雅之：膝屈筋腱-ハイブリッド代用材料を用いた1束前十字靭帯再建後と解剖学的2重束前十字靭帯再建後のX線学的骨孔径変化の比較、第118回北海道整形災害外科学会、北海道大学学術交流会館、札幌、2010年1月
- ⑥ 北山総一郎、小野寺伸、宮武慎、近藤英司、北村信人、安田和則、遠山晴一：マクロファーゼ遊走阻止因子遺伝子の欠損が膝内側側副靭帯損傷の治癒に与える影響：生体力学的評価、第117回北海道整形災害外科学会、グランドパーク小樽、小樽、2009年6月

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・講師
研究者番号：80447044

(2) 研究分担者

近藤 英司 (KONDO EIJI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60374724

(3) 研究分担者

安田 和則 (YASUDA KAZUNORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20166507