

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25702032

研究課題名(和文)メカニカルストレスを基軸とする運動器障害の発生機序解明：リハビリテーションの再考

研究課題名(英文) Underlying pathogenesis of cartilage alterations caused by insufficient or excessive mechanical stresses

研究代表者

森山 英樹 (MORIYAMA, Hideki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10438111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスは、関節の機能維持に不可欠であるが、程度により変性の誘因となる。この関節の変性の根本的な原因は、メカニカルストレスの過剰と減弱である。そのため、メカニカルストレスを基軸として、関節の主要構成体である関節軟骨に生じる変性の発生機序を解明することを目的とした。過剰と減弱ともに、関節軟骨の厚さの変化と軟骨基質の分解酵素が過剰に産生されるが、過剰で鍵となる軟骨細胞の肥大化がみられなかった。また、軟骨下骨は、脆弱化から硬化へ移行する過剰と異なり、減弱では一貫して破骨細胞の活性化による骨萎縮がみられた。関節軟骨の変性に至る過程における過剰と減弱の間の共通点と相違点が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Joints are composed of several different tissues, and articular cartilage plays an important role in maintaining mechanical competence. Mechanical stresses are crucial for the maintenance of the morphologic and functional integrity of articular cartilage. Joints are susceptible to insufficient or excessive stresses, leading to joint degeneration. After insufficient stresses, the joint surface was intact, but thickness of both the total and uncalcified layer of articular cartilage were decreased. These changes may be mediated by metabolic changes in chondrocytes including accelerated aggrecan catabolism and exquisitely modulated matrix mineralization, and cartilage matrix degradation and resorption by subchondral osteoclasts. Cartilage degeneration without chondrocyte hypertrophy under disuse condition indicate the possible existence of mechanism which is different from excessive mechanical stresses.

研究分野：理学療法学

キーワード：メカニカルストレス 運動器 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

高齢社会の到来とともに、変形性関節症に代表される関節疾患や、寝たきりや関節固定など不動状態による廃用症候群は、今後より一層、医療上の大きな課題となることが確実視されている。こうした運動器障害は、異常なメカニカルストレス（前者では過剰、後者では減弱）が契機となり発生する。メカニカルストレスは、関節の機能維持に不可欠であるが、このように、程度により変性の誘因となる。メカニカルストレスの過剰と減弱に起因する運動器障害の根本的な原因は、メカニカルストレスの異常であるにもかかわらず、現在の臨床や研究での視点は、最終的に生じた変性を基軸としており、根本的な原因であるメカニカルストレスはほとんど無視されている。

2. 研究の目的

運動器の主要構成体である関節の機能は、主に関節軟骨によって維持されている。さらに、関節軟骨の恒常性維持には、体重負荷や関節運動によって生まれる適度なメカニカルストレスが必要不可欠である。そこで、本研究では、関節軟骨を対象として、これまでの視点とは逆に、結果である変性ではなく、根本的な原因であるメカニカルストレスの視点から、メカニカルストレスの過剰と減弱に起因する関節軟骨の変性の発生機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)メカニカルストレスの減弱環境における軟骨細胞の応答

8週齢のC57BL/6J雄性マウスの膝関節軟骨から単離した初代軟骨細胞を用いた。宇宙飛行による廃用性筋萎縮の研究のために、宇宙環境を模擬した微小重力環境を再現できる3Dクリノスタットが、骨格筋細胞の培養実験に用いられている。しかし、主に用いられている機器は、試料に作用する重力をゼロGにすることに着目して運転され、X・Y・Zの3軸に作用する重力の分散が考慮されていない。実際、宇宙ライフサイエンス研究で用いられている市販の3Dクリノスタットを調査した結果、重力の分散がY軸方向に偏って作用しており、真の微小重力環境が再現されていなかった。そこでプログラミングを行い改良し、特定の向きに偏ることのない微小な重力場を実現できる制御手法を開発した。マウス膝関節より採取した初代軟骨細胞を、実験に要する細胞数まで増殖させた後、3Dクリノスタットに、6、12、24、36、48時間搭載した。実験時間終了後、細胞を採取し、細胞生存率、アポトーシス、細胞周期のフローサイトメトリー解析を行った。

(2)メカニカルストレスの減弱環境における関節軟骨の変化

8週齢の雄性C57BL/6マウスに対して、尾

部懸垂による後肢非荷重、あるいは外科手術による膝関節の創外固定を行った。尾部懸垂には、Implant Tail Ringを用いた。体重の50%が前肢にかかるために、マウスの身体とケージの床がなす角度がおおよそ30°になるように、毎日、調整した。

膝関節の創外固定には、Kirschner Wireとレジンを用いた。大腿骨と脛骨の骨幹部中央に、外側から内側に向かってKirschner Wireを貫通させ、膝関節最大屈曲位にて、2本のKirschner Wireをレジンを強固に固定した。未介入（コントロール）および各介入開始後2、4、8週の時点でマウスを屠殺し、膝関節を採取した。実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて大腿骨と脛骨の関節表面の構造を観察した後、X線マイクロComputed Tomography (CT)により軟骨下骨の構造を解析した。さらに、内側顆の中央レベルで膝関節の矢状断切片を作製し、大腿骨と脛骨で、それぞれ前方・中央・後方の6つの観察領域を設けた。各領域で関節軟骨厚、軟骨細胞密度、細胞外基質、基質分解酵素、肥大軟骨細胞マーカー、骨形成・骨吸収マーカーを分析し、結果は全領域の平均で示した。

(3)異なるメカニカルストレス負荷強度に対する軟骨細胞の応答

8週齢のC57BL/6J雄性マウスの膝関節軟骨から単離した初代軟骨細胞を用いた。軟骨細胞に対して、生体の関節軟骨に加わる負荷を模擬した刺激である周期的伸展刺激を負荷した。負荷する刺激の強度および頻度は、生体に加わる生理学的範囲を基準とし、高強度として10%、低強度として5%、高頻度として1.0Hz、低頻度として0.5Hz、長時間として12時間、短時間として6時間に設定した。比較のために、全く刺激を負荷しない群をコントロール群とした。周期的伸展刺激の負荷後、細胞からtotal RNAを抽出し、関節軟骨の同化作用の指標として細胞外基質の構成要素であるII型コラーゲンおよびアグリカン、異化作用の指標として基質分解酵素であるmatrix metalloproteinase 13 (MMP13)およびa disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5)のmRNAの発現量を、リアルタイムPCRで定量化した。

(4)異なるメカニカルストレス負荷強度に対する関節軟骨の変化

8週齢のC57BL/6J雄性マウスに、異なる強度・頻度・時間を組み合わせた8つのトレッドミル運動を、4週間行わせた。比較のために運動介入を行わないマウスを通常飼育群とした。高強度の運動として18m/min、低強度の運動として8m/min、高頻度の運動として毎日、低頻度の運動として3日に1回、長時間の運動として60分間、短時間の運動として15分間に設定した。トレッドミルの勾配は5% gradeに設定した。トレッドミル運動

後、マウスを麻酔下で屠殺した後、膝関節を採取し、組織学的に分析した。

4. 研究成果

(1) メカニカルストレスの減弱環境における軟骨細胞の応答

細胞生存率、アポトーシス、細胞周期いずれにおいても、実験開始前と比較して、変化が認められなかった。

(2) メカニカルストレスの減弱環境における関節軟骨の変化

① 関節軟骨の形態学的変化

実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて、非荷重と関節固定後の大腿骨顆部および脛骨高原の関節表面を観察した。その結果、コントロールとの違いは認められず、過剰なメカニカルストレスで生じる関節表面の線維化や不整化は、メカニカルストレスの減弱によっては生じないことが明らかになった。

トルイジンブルー染色を行った組織切片上で、関節軟骨における非石灰化層と石灰化層の厚さをそれぞれ計測し、これらを足し合わせることで全層の厚さを算出した (図1)。

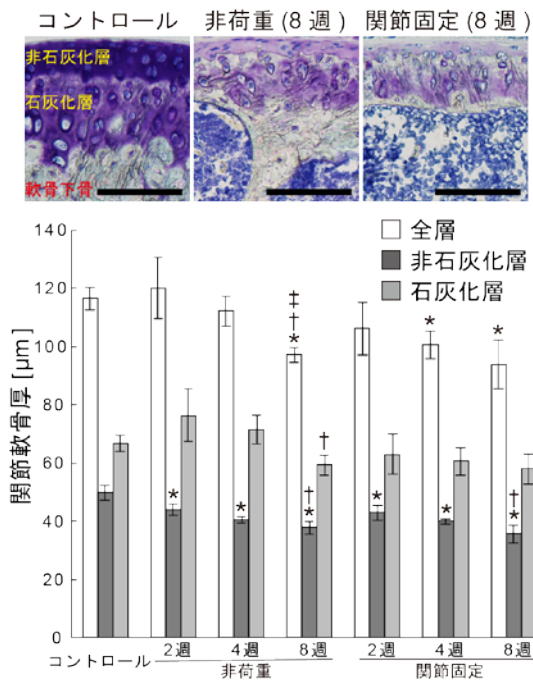


図1 関節軟骨厚

その結果、非荷重および関節固定後には、関節軟骨の非石灰化層の厚さが、ともに2週時点から減少し、また全層の厚さは、それぞれ8週、4週時点から減少した。これらの結果から、メカニカルストレスの減弱に曝された関節軟骨で、全層の菲薄化を検出するには、非石灰化層の菲薄化を検出するよりも長期の実験期間を要することが示唆され、これは先行研究の間での結果の矛盾を説明する手がかりとなり得る。さらに、関節軟骨の厚さを各領域間で比較したところ、非荷重後と関節固定後のそれぞれで、関節面が接触していない領域での変化が顕著であった。このこと

から、関節軟骨の厚さの維持には関節面の接触が重要であることが示唆された。

② 軟骨細胞の生死と分化および細胞外基質の代謝と石灰化

ワイゲルト鉄ヘマトキシリン染色を行った組織切片上で、正常な核を有する軟骨細胞数をカウントし、これを面積で除することにより密度を算出した。その結果、軟骨細胞密度は非荷重後には変化しなかった一方で、関節固定後には著明に減少した (図2)。このことから、軟骨細胞の生存には、関節運動が必須であることが明らかになった。

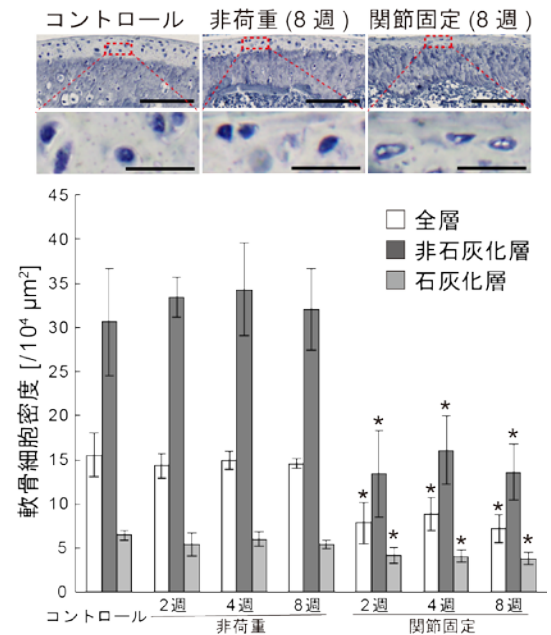


図2 軟骨細胞密度

肥大軟骨細胞のマーカーであるX型コラーゲンに対する免疫組織染色を行ったところ、陽性細胞は全て関節軟骨の石灰化層に局在し、非荷重や関節固定後に変化は認められなかった (図3)。このことから、メカニカルストレスの減弱による関節軟骨の変性は、変形性関節症の発症において決定的な役割を担う軟骨細胞の肥大分化を経ないことが示唆され、特異的な発生機序を有することが明らかになった。

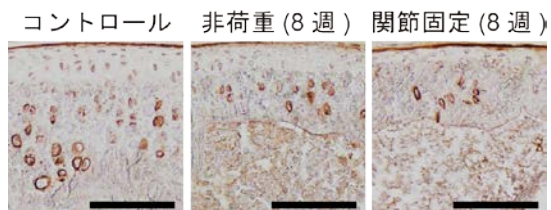


図3 X型コラーゲンの免疫組織学的所見

細胞外基質の代謝を分析するため、II型コラーゲンとアグリカン、MMP13とADAMTS5に対する免疫組織化学染色を行い、染色強度の数値化と、染色陽性の軟骨細胞数のカウントを行った。その結果、非荷重および関節固定後には、II型コラーゲンの含有量や、その分解に働くMMP13の発現が変化しない一方で、

アグリカンの含有量は減少し、その分解に働く ADAMTS5 の発現が増加することが示された (図 4~7)。これらの結果は、トルイジンブルーへの染色性が低下していた (図 1) こととも一致し、メカニカルストレスの減弱は、アグリカンをはじめとするプロテオグリカンの異化作用を亢進させることが示唆された。また、メカニカルストレスの減弱環境に曝された関節軟骨では、プロテオグリカンの変性が II 型コラーゲンの変性よりも重度である、あるいは先行することが示唆された。

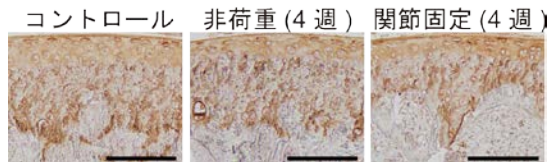


図 4 II 型コラーゲンの免疫組織学的所見

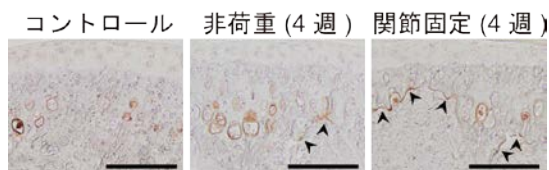


図 5 MMP13 の免疫組織学的所見

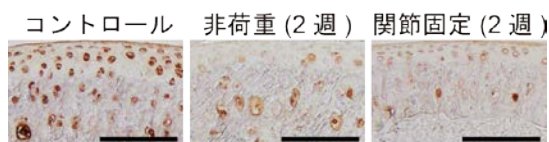


図 6 アグリカンの免疫組織学的所見

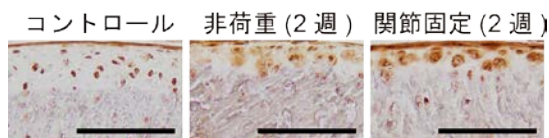


図 7 ADAMTS5 の免疫組織学的所見

アルカリフォスタファラーゼ (ALP) 活性は骨や軟骨の石灰化に関与し、その準備段階において必要であると考えられている。そのため、石灰化の指標として ALP 染色を行い、染色陽性の軟骨細胞数をカウントした。その結果、非荷重と関節固定後の ALP 陽性軟骨細胞数は、関節軟骨全体では不変であったものの、非石灰化層で増加し、反対に石灰化層で減少していた (図 8)。通常、ALP 活性は骨芽細胞や肥大軟骨細胞に局在するが、本研究では非荷重や関節固定後に X 型コラーゲンの局在は変化しなかった (図 3) ことから、肥大軟骨細胞マーカーと ALP 活性の局在は必ずしも一致しないことが明らかになった。また、関節軟骨などの非石灰化組織では、プロテオグリカンが石灰化基質の沈着を阻止していると考えられている。このことから、本研究において非荷重と関節固定後に認められた関節軟骨の非石灰化層におけるプロテオグリカンの減少と ALP 活性の増加は、そこでの石灰化の亢進を示唆している。メカニカルストレスの減弱環境下では、関節軟骨の非石灰化層

が石灰化層に置換された結果、非石灰化層の厚さが減少するという機序が存在する可能性が示された。

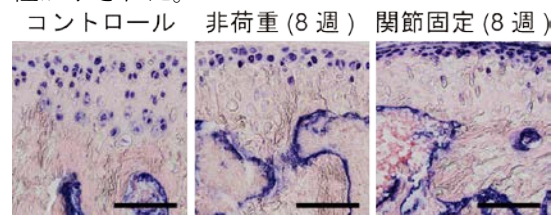


図 8 ALP 活性の組織学的所見

③軟骨下骨と破骨細胞の活性の変化

マイクロ CT 解析により、大腿骨遠位骨端部および脛骨近位骨端部の骨密度を計測したところ、非荷重および関節固定後には、骨密度の有意な減少が認められた。さらに、組織学的にも同様の所見が得られ、軟骨下骨の萎縮に伴って、拡大した骨髓腔が関節軟骨の下端に接触している所見が観察された。

破骨細胞の活性化の指標として酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行った。非荷重および関節固定後 2 週の時点で、骨端部全体における染色陽性の面積が増加し、関節軟骨の下端に接触する破骨細胞面も増加した (図 9)。活性化した破骨細胞は、MMPs 産生能や軟骨基質吸収能を有することから、本研究で観察された、関節軟骨の下端に接触する骨面における MMP13 の局在 (図 5) や、TRAP 活性の関節軟骨への浸食は、破骨細胞による軟骨基質の分解・吸収を示唆している。これにより、関節軟骨の石灰化層が骨や骨髓腔に置換された結果、関節軟骨の全層が菲薄化するという機序が存在する可能性が示された。

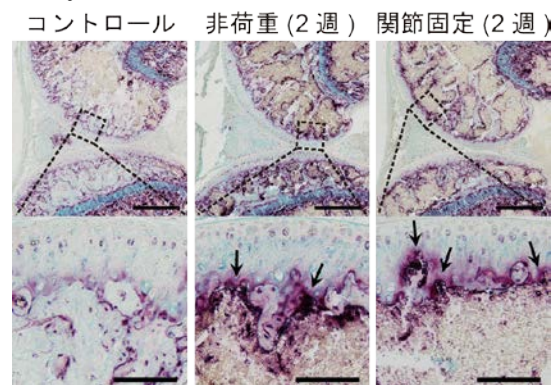


図 9 TRAP 活性の組織学的所見

関節軟骨の石灰化層における ALP 活性の減少 (図 8) は、そこでの石灰化の抑制を介して、骨髓腔のさらなる拡大 (関節軟骨への浸食) に寄与している可能性があると考えられた。さらに、破骨細胞の活性を制御する因子として知られている receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) および osteoprotegerin (OPG) に対する免疫組織化学染色を行い、染色陽性の関節軟骨細胞数をカウントした。その結果、非荷重および関節固定後 2 週の時点で、RANKL 陽性細胞の増加と OPG 陽性細胞の減少が認められた (図 10)。このことから、

メカニカルストレスの減弱環境では、関節軟骨細胞が軟骨下骨における破骨細胞の活性化に働く可能性が示された。これらの結果は、メカニカルストレスの減弱環境における関節軟骨と軟骨下骨の相互作用を示唆している。

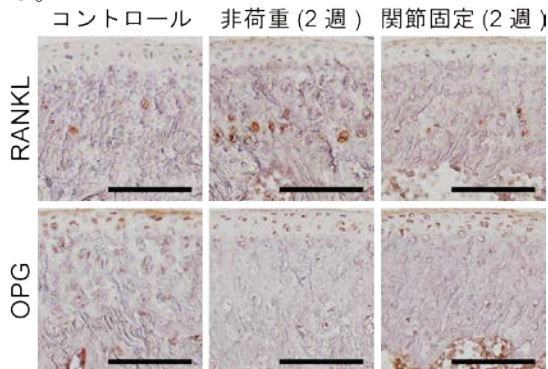


図 10 RANKL・OPG の免疫組織学的所見

(3) 異なるメカニカルストレス負荷強度に対する軟骨細胞の応答

軟骨細胞に対する周期的伸展刺激に対する各条件において、各 mRNA の発現量は同様の変化を示した。低強度・低頻度の刺激では、長時間の刺激によって mRNA の発現量が増加したのに対し、低強度・高頻度の刺激では短時間の刺激から増加し、長時間の刺激でさらに増加した。一方、高強度の刺激では、刺激の頻度に関わらず、短時間の刺激で mRNA の発現量は増加し、長時間の刺激では逆に減少した。さらに高強度・高頻度を組み合わせた刺激が、mRNA 発現量の増加が最も大きかった。これらのことから、軟骨細胞はメカニカルストレスの蓄積に応じて同化・異化に関わらず mRNA の発現量が増加し、その増加は特に強度および頻度に依存することが示された。

(4) 異なるメカニカルストレス負荷強度に対する関節軟骨の変化

組織学的分析の結果、脛骨関節軟骨のプロテオグリカンの含有量は各条件間で著明な変化は観察できなかった。一方で、高強度・高頻度・長時間群の脛骨の関節軟骨厚は、低強度・高頻度・長時間群および低強度・高頻度・短時間群と比較して有意に減少した。

脛骨の関節軟骨における、軟骨細胞のアポトーシスに対する免疫組織染色の結果、高強度群では非石灰化層のアポトーシス陽性細胞率は通常飼育群よりも増加する傾向にあった。一方で、低強度群では、非石灰化層のアポトーシス陽性細胞率は通常飼育群よりも減少する傾向にあった。高強度・高頻度・長時間群の非石灰化層のアポトーシス陽性細胞率は、高強度・高頻度・短時間群以外の全ての群と比較して有意に増加した。また、高強度・高頻度・短時間群の非石灰化層のアポトーシス陽性細胞率は、通常飼育群および低強度・高頻度・長時間群と比較して有意に増加した。石灰化層のアポトーシス陽性細胞率には各群間に有意な差は認められなかつ

た。

以上のことから、低強度のトレッドミル運動は軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、関節軟骨を厚くするのにに対し、高強度のトレッドミル運動は軟骨細胞のアポトーシスを増加させ、関節軟骨の菲薄化を招く可能性が示された。さらにこれらの変化は、特に運動を高頻度で行った場合に顕著であった。軟骨細胞の結果と併せると、軟骨細胞および関節軟骨の応答は、加わるメカニカルストレスの強度に依存し、さらにその応答は加わる頻度によって調節されることが示された。

(5) 関節軟骨の廃用と過用による変性

本研究結果から、関節軟骨におけるメカニカルストレスの減弱（廃用）と過剰（過用）による組織学的な変性を比較すると、図 11 になる。過剰と減弱ともに、関節軟骨の厚さの変化と軟骨基質の分解酵素が過剰に産生されるが、過剰で鍵となる軟骨細胞の肥大化がみられなかった。減弱では関節表面に微細な粗雑化がみられるが、過剰のように高度ではなかった。また、軟骨下骨は、脆弱化から硬化へ移行する過剰と異なり、初期から一貫して破骨細胞の活性化により骨吸収が亢進し、高度な骨萎縮がみられた。

さらに関節固定モデル（荷重許可・関節不動）では軟骨細胞数が減少するが、尾部懸垂モデル（非荷重・関節運動許可）では軟骨細胞数に変化がみられないことから、軟骨細胞数を維持するためには、荷重よりも関節運動が必須と考えられた。

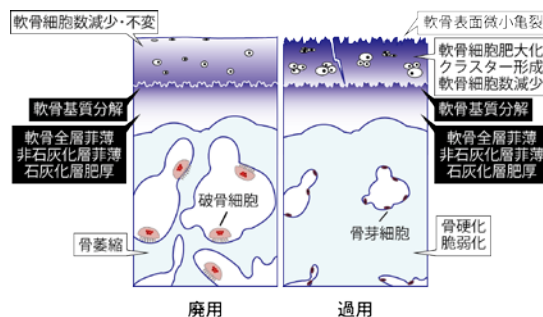


図 11 廃用と過用による変性の比較

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 4 件）

- (1) Sakitani N, Iwasawa H, Nomura M, Miura Y, Kuroki H, Ozawa J, Moriyama H. Mechanical stress by spasticity accelerates fracture healing after spinal cord injury. Calcif Tissue Int. in press. DOI: 10.1007/s00223-017-0293-0
- (2) Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Kohara Y, Takano S, Wakimoto Y, Kuroki H, Moriyama H. Thinning of articular cartilage after joint unloading or

immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. Osteoarthritis Cartilage. 25(5): 727-36, 2017. DOI: 10.1016/j.joca.2016.11.013

- (3) 森山英樹. 運動が関節におよぼす影響. Clin Calcium. 27(1): 87-94, 2017. DOI: CliCa17018794
- (4) Iwasawa H, Nomura M, Sakitani N, Watanabe K, Watanabe D, Moriyama H. Stretching after heat but not after cold decreases contractures after spinal cord injury in rats. Clin Orthop Relat Res. 474(12): 2692-701, 2016. DOI: 10.1007/s11999-016-5030-x

[学会発表] (計10件)

- (1) 森山英樹. 基礎研究からみたエビデンスー理学療法におけるこれからの基礎研究のあり方ー. 第52回日本理学療法学会大会, 千葉市 (千葉県)
- (2) Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Wakimoto Y, Takano S, Kohara Y, Shimaya S, Moriyama H. Mechanical unloading causes subchondral osteoclast activation resulting in thinning of articular cartilage. 第3回国際再生リハビリテーションシンポジウム, 京都市 (京都府)
- (3) 崎谷直義, 岩澤裕之, 野村将人, 脇本祥夫, 高野祥子, 小原雄太, 島谷俊亮, 伊藤明良, 長井桃子, 太治野純一, 張項凱, 山口将希, 飯島弘貴, 黒木裕士, 森山英樹. 脊髄損傷後の骨折は通常と異なる骨化様式を経て早く治癒する. 第3回日本運動器理学療法学会, 金沢市 (石川県)
- (4) 野村将人, 崎谷直義, 岩澤裕之, 高野祥子, 小原雄太, 島谷俊亮, 脇本祥夫, 長井桃子, 飯島弘貴, 黒木裕士, 森山英樹. 関節内におけるメカニカルストレスの分布の変化が関節軟骨に与える影響ーマウス後肢非荷重および関節固定モデルを用いた実験的検討ー. 第3回日本運動器理学療法学会, 金沢市 (石川県)
- (5) 島谷俊亮, 崎谷直義, 小澤淳也, 渡部大地, 野村将人, 脇本祥夫, 高野祥子, 小原雄太, 森山英樹. 脊髄損傷後の痙性が関節拘縮に与える影響. 第3回日本運動器理学療法学会, 金沢市 (石川県)
- (6) Moriyama H, Atsuji H, Usumoto Y, Ozawa J, Kito N, Tanaka R, Kanemura N, Deie M. Comparison of thermal and cold therapy combined with stretching for correction of contracture after spinal cord injury in rats. World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015, 2015.5.1-4, シンガポール (シンガポール)

ンガポール (シンガポール)

- (7) Iwasawa H, Sakitani N, Nomura M, Watanabe D, Watanabe K, Takano S, Moriyama H. The effects of heat, icing, and stretching on knee joint capsule in rat contracture model of spinal cord injury. World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015, 2015.5.1-4, シンガポール (シンガポール)
- (8) Watanabe K, Iwasawa H, Sakitani N, Nomura M, Watanabe D, Moriyama H. Changes of muscular and articular factors in joint contracture after spinal cord injury in rats. World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015, 2015.5.1-4, シンガポール (シンガポール)
- (9) Nomura M, Iwasawa H, Sakitani N, Watanabe K, Watanabe D, Takano S, Moriyama H. Spinal cord injury leads to region specific tidemark advancement in articular cartilage of the knee joint in rats. World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015, 2015.5.1-4, シンガポール (シンガポール)
- (10) Sakitani N, Watanabe D, Iwasawa H, Nomura M, Watanabe K, Takano S, Moriyama H. Effects of spinal cord injury on fracture healing in rats. World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015, 2015.5.1-4, シンガポール (シンガポール)

[図書] (計1件)

森山 英樹、木藤 伸宏(編)、奈良 勲(監)、運動器疾患の病態と理学療法、医歯薬出版株式会社、2015、316

[その他]

運動器理学療法研究室ホームページ
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~morihide/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
森山 英樹 (MORIYAMA, Hideki)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 10438111
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし