

## 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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591673

 研究課題名（和文） マクロファージ遊走阻止因子制御による  
 腱・靭帯組織の修復促進に関する研究

 研究課題名（英文） Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor For  
 Healing of Tendons and Ligaments

研究代表者

遠山 晴一（TOHYAMA HARUKAZU）

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号：60301884

研究成果の概要（和文）：マクロファージ遊走阻止因子（MIF）の腱・靭帯損傷の治癒に与える影響は明らかではない。そこで MIF 遺伝子の欠損が膝内側側副靭帯（MCL）断裂後の治癒過程に与える影響を検討し、28 日における MIF knock-out マウスの大腿骨-MCL-脛骨複合体の力学的特性および MMP-2 および-13 の遺伝子発現は wild type に比し有意に低値であり、組織学的には肥厚しており血管新生に乏しくかつ細胞数の減少の遅延が観察された。以上より MIF 遺伝子欠損は MMP の遺伝子発現抑止を介して、MCL 損傷治癒を遅延させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： There have been no reports that investigated the expression or the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the repair process after ligament injury. The aim of this study was to test the hypothesis that that the deficiency in MIF gene might delay medial collateral ligament (MCL) healing. The present study showed that the levels of mechanical properties and matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -13 mRNA in the healing tissue were significantly lower in MIF gene-deficient mice (MIFKO) than in wild-type mice (WT) on day 28 after injury. Histologically, healing tissues in MIFKO exhibited prolonged hypertrophy, poor vascularity, and prolonged increase in cell number compared with those in WT. Taken together, it was suggested that MIFKO exhibited delayed healing of the MCL, which might be caused by lower mRNA expression of MMP-2 and -13.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：サイトカイン、創傷治癒、腱・靭帯、スポーツ傷害

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マクロファージ遊走阻止因子（以下 MIF）は活性型 T リンパ球より分泌される液性因子として発見され、様々な炎症反応の中で、炎症メディエータとして分泌される一方で、組

織の損傷後の細胞の増殖に重要な役割を示すことが知られている。

(2) MIF は皮膚の創傷治癒に重要であり、そして、MIF を含浸させたゼラチンビーズの局

所投与は皮膚創傷治癒を促進することが報告されている。

(3) 靭帯損傷は皮膚の治癒と類似した似た治癒過程をたどることから MIF は靭帯損傷後の治癒反応で重要な役割を果たす可能性がある。しかしながら MIF の靭帯損傷後の治癒過程における役割を検証した研究はこれまでにない。

(4) そこで研究者らは MIF 遺伝子の欠損は MCL 損傷後の治癒反応を遅延させるという仮説をたてた、

## 2. 研究の目的

MIF knockout マウスを用い、MIF 遺伝子の欠損が MCL 損傷後の治癒反応に与える効果を生体力学ならびに生物学的に検討すること。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物として MIF 遺伝子を欠損させた 10 週齢の MIF ノックアウト (MIFKO) マウス (Balb/c) および Wild type (WT) の Balb/c マウスを愛用した。

(2) 上記実験動物に対し全身麻酔下にし外科的に MCL を展開し、MCL を大腿脛骨関節の高さで鋭的に全層切離した。処置後はケージ内で自由に歩行させた。

(3) 力学的評価に関しては術後 28 日目で屠殺したマウスの大腿骨-MCL-脛骨複合体の力学特性をマイクロテンサイルテスターを用い引張試験により検討した。MCL 実質部の歪計測には video dimension analyser を用いた。

(4) 3, 7, 14, 28 日目に屠殺したマウスの MCL 切離部の治癒組織における MIF、TNF- $\alpha$ 、VEGF、MMP-2、MMP-9、MMP-13、GAPDH の mRNA 発現を real time RT-PCR を用いて検討した。

(5) 組織学的評価には処置後 7、14、28、および 56 日に屠殺したマウスの MCL 切離部の治癒組織の HE 染色した脱灰標本を光学顕微鏡により、損傷部位付近の厚さ、細胞数、血管数を検討した。

(6) 統計学的検討には分散解析および t 検定を用い、有意水準は 5%未満とした。

## 4. 研究成果

(1) 術後 28 日目の治癒組織の厚さは WT 群より MIFKO 群は有意に高値であった (WT:  $140 \pm 43 \mu\text{m}$ , MIFKO:  $240 \pm 36 \mu\text{m}$ ,  $p=0.038$ ) であり、断面積に関しても、MIFKO 群は WT 群よりも有意に高値であった (WT:  $0.15 \pm$

$0.05\text{mm}^2$ , MIFKO:  $0.26 \pm 0.07\text{mm}^2$ ,  $p=0.0077$ )。

(2) 引張試験における断裂様式は全て実質部での断裂であった。荷重-伸び曲線 (図 1) からの構造特性に関しては、MIFKO 群の最大破断荷重は、WT 群のそれよりも有意の低値を示した (WT:  $4.71 \pm 0.94\text{N}$ , MIFKO:  $2.81 \pm 0.99\text{N}$ ,  $p=0.0065$ )。MIFKO 群の線形剛性も WT 群のそれより有意の低値を示した (WT:  $4.44 \pm 0.26\text{N/mm}$ , MIFKO:  $2.83 \pm 0.74\text{N/mm}$ ,  $p=0.0005$ )。MCL 実質部の応力-歪曲線 (図 2) からの材料特性に関しても、MIFKO 群の引張強度は WT 群のそれより有意の低値を認めた (WT:  $33.15 \pm 11.34\text{MPa}$ , MIFKO:  $11.06 \pm 4.47\text{MPa}$ ,  $p=0.013$ )。MIFKO 群の接線弾性係数も WT 群のそれより、有意の低値を認めた (WT:  $339.90 \pm 77.19\text{MPa}$ , MIFKO:  $116.38 \pm 15.92\text{MPa}$ ,  $p<0.0001$ )。

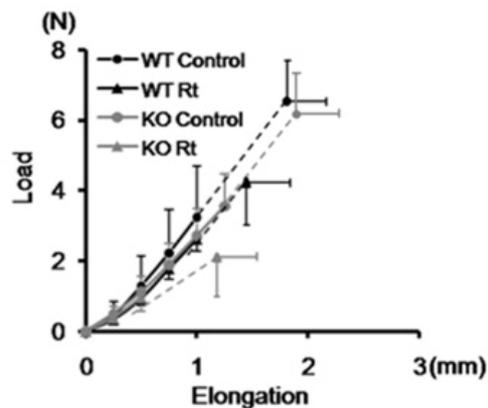


図 1 MCL 切離後 (WT Rt, KO Rt) および無処理 (WT Control, KO Control) の大腿骨-MCL-脛骨複合体の荷重-伸び曲線

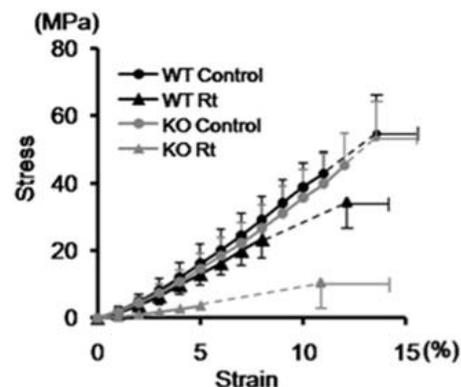


図 2 MCL 切離後 (WT Rt, KO Rt) および無処理 (WT Control, KO Control) の MCL 実質部の応力-歪曲線

(3) WT 群において損傷後 3 日目で有意な MIF の mRNA の上昇を認めた ( $p=0.0101$ ) (図 3)。TNF- $\alpha$  と MMP9 に関しては両群に有意差はな

いものの、MIFKO 群の VEGF および MMP-2 の mRNA 発現は損傷後 28 日目で WT 群と比較し有意に低値であった (図 4 および図 5)。また、MMP-13 の mRNA 発現は WT 群では損傷後 7 日目でピークを呈し、MIFKO 群の MMP-13 発現は WT 群と比し、有意に低値であった (図 6)。

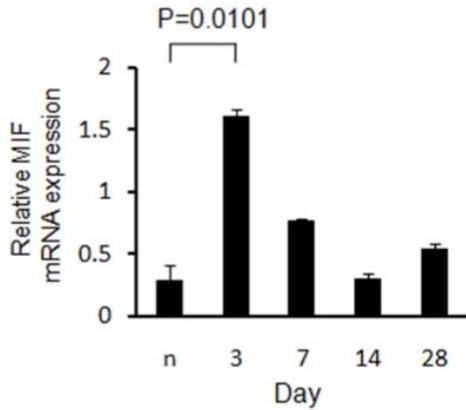


図 3 WT マウスの MCL 損傷前と MCL 損傷後 7, 14, 28, 日目における MIF の mRNA 発現

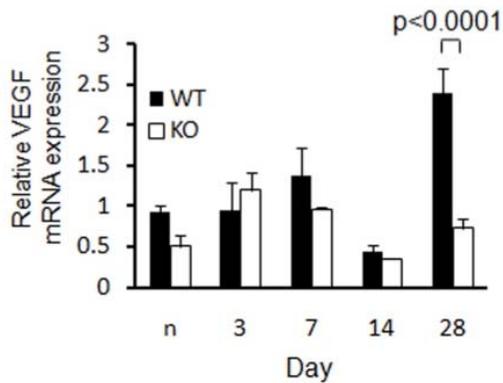


図 4 WT マウスと MIFKO マウスの MCL 損傷前と、MCL 損傷後 7, 14, 28, 日目における VEGF の mRNA 発現

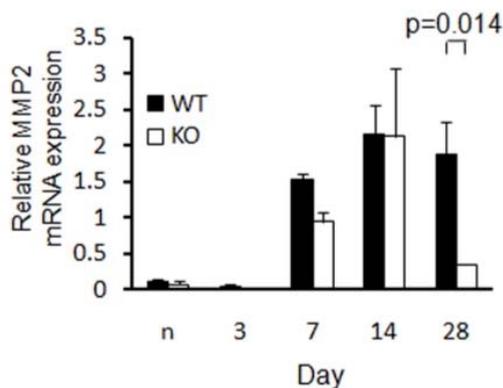


図 5 WT マウスと MIFKO マウスの MCL 損傷前と、MCL 損傷後 7, 14, 28, 日目における MMP2 の mRNA 発現

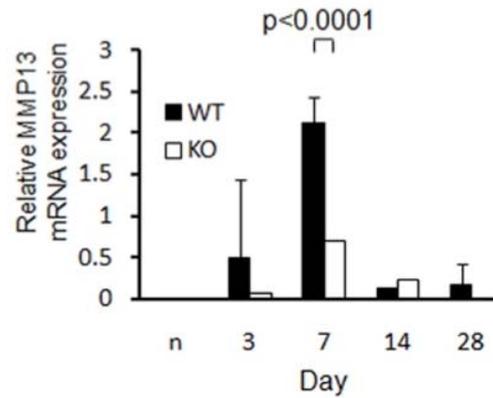


図 6 WT マウスと MIFKO マウスの MCL 損傷前と、MCL 損傷後 7, 14, 28, 日目における MMP13 の mRNA 発現

(4) MIFKO 群の損傷部位付近の肥厚および細胞密度の増加が損傷後 28 日目においても観察された (図 7)。定量評価では治癒組織の厚さは損傷後 28 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に高値であり (WT:  $94.95 \pm 21.28 \mu\text{m}$ , MIFKO:  $233 \pm 4.95 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.0001$ )、細胞密度は損傷後 14, 28 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に高値であった ( $p = 0.0014$ ,  $p = 0.0084$ )。一方、血管数は損傷後 14 日目で MIFKO 群は WT 群に対し有意に低値であった ( $p = 0.0073$ )。

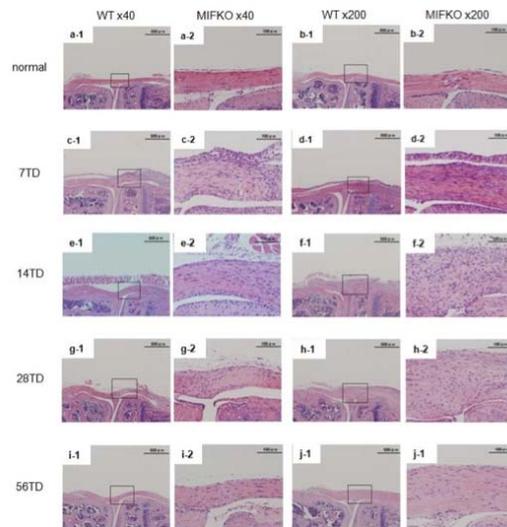


図 7 WT マウスと MIFKO マウスの正常 MCL と損傷後 7, 14, 28, 56 日目の MCL の組織学的評価 (HE 染色: x40 と x200)

(5) MIF の創傷治癒における役割はいまだ議論の分かれるところであるが、MIF が腱・靭帯組織の治癒過程での役割や発現について研究を行った報告はこれまでにない。本研究で研究者は MIF 遺伝子欠損マウスでは靭帯損傷後の治癒が遷延することをはじめて明らかにし、さらに MIF ノックアウトマウスでは損傷後 7 日目と 28 日目で MMP-2 と MMP-13 の遺伝子発現の有意な低下を認めた。また、組織学的には MIF ノックアウトマウスでは、正常マウスと比較し、長期にわたり治癒組織は肥厚し、新生血管に乏しく、細胞密度の増加を認めていた。したがって、MIF ノックアウトマウスにおける MCL 損傷後の治癒遅延は MMP-2 と MMP-13 発現の低下により生じた可能性が考えられた。これら知見は MIF が腱・靭帯組織の創傷治癒に大きく関与する重要な液性因子であることを解明した初の報告であり、腱・靭帯損傷の治癒過程を制御する新たな治療を開発する際に際し注目に値するものと考えられた。

#### 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 9 件)

- ① Takazawa K, Adachi N, Deie M, Kamei G, Uchio Y, Iwasa J, Kumahashi N, Tadenuma T, Kuwata S, Yasuda K, Tohyama H, Minami A, Muneta T, Takahashi S, Ochi M., Evaluation of magnetic resonance imaging and clinical outcome after tissue-engineered cartilage implantation: prospective 6-year follow-up study, J Orthop Sci, 査読有, 17(4), 2012, 413-424  
DOI: 10.1007/s00776-012-0231-y
- ② Kondo E, Yasuda K, Miyatake S, Kitamura N, Tohyama H, Yagi T., Clinical comparison of two suspensory fixation devices for anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 査読有, 20(7), 2012, 1261-1267  
DOI: 10.1007/s00167-011-1687-6.
- ③ Tohyama H, Kondo E, Hayashi R, Kitamura N, Yasuda K., Gender-based differences in outcome after anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring tendon autografts, Am J Sports Med, 査読有, 39(9), 2011, 1849-1857  
DOI: 10.1177/0363546511408864.
- ④ Kobayashi T, Onodera S, Kondo E, Tohyama H, Fujiki H, Yokoyama A, Yasuda K., Impaired fracture healing in macrophage migration inhibitory factor-deficient mice, Osteoporos Int, 査読有, 22(6), 2011, 1955-1965  
DOI: 10.1007/s00198-010-1385-0.
- ⑤ Kondo E, Yasuda K, Katsura T, Hayashi R, Azuma C, Tohyama H., Local administration of autologous synovium-derived cells improve the structural properties of anterior cruciate ligament autograft reconstruction in sheep, Am J Sports Med, 査読有, 39(5), 2011, 999-1007  
DOI: 10.1177/0363546510390424.
- ⑥ Takahashi K, Onodera S, Tohyama H, Kwon HJ, Honma K, Yasuda K., In vivo imaging of particle-induced inflammation and osteolysis in the calvariae of NF $\kappa$ B/luciferase transgenic mice, J Biomed Biotechnol., pii: 727063 査読有, 2011  
DOI: 10.1155/2011/727063.
- ⑦ Maeda E, Tohyama H, Noguchi H, Yasuda K, Hayashi K, Effects of maturation on the mechanical properties of regenerated and residual tissues in the rabbit patellar tendon after resection of its central one-third, Clin Biomech (Bristol, Avon), 査読有, 25(9), 2010, 953-958  
DOI: 10.1016/j.clinbiomech.2010.07.001.
- ⑧ 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, 査読有, 26(9), 2010, 1226-1232  
DOI: 10.1016/j.arthro.2010.01.007.
- ⑨ Kobayashi Y, Yasuda K, Kondo E, Katsura T, Tanabe Y, Kimura M, Tohyama H., Implantation of autogenous meniscal fragments wrapped with a fascia sheath enhances fibrocartilage regeneration in vivo in a large harvest site defect, Am J Sports Med, 査読有, 38(4), 2010, 740-748  
DOI: 10.1177/0363546509350749

[学会発表] (計 9 件)

- ① H. Tohyama, Application of Growth Factors for Enhancement Graft Healing Following Knee Ligament

- Reconstruction Surgery, BIT' s 5th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2012, 2012. 12. 2, Guangzhou Baiyun International Convention Center (China)
- ② H. Tohyama, K. Ikoma, K. Yasuda, The Relationship Between Open and Closed Kinetic Chain Strength of the Lower Limb and Jumping Performance in ACL-Reconstructed Subjects, ACL Study Group Meeting, 2012, 2, 16, HOTEL TERRA (USA)
- ③ H. Tohyama, K. Yasuda, Effectiveness of Video-based Home Exercise for Osteoarthritis of the Knee, 2012 American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting, 2012. 2. 8, Moscone Center (USA)
- ④ H. Tohyama, Keynote Lecture: Application of Growth Factors to Anterior Cruciate Ligament Surgery, Intern. Conf. on Surgery (Surgery '11), 2011. 9. 26, Hotel Adria Praha (Czech Republic)
- ⑤ H. Tohyama, T. Chiba, U. Kou, H. Oka, H. Kawaguchi, K. Nakamura, K. Ikoma, K. Yasuda, Effects of Video-based Home Exercise on Clinical and Radiographic Outcomes in Adults with Knee Osteoarthritis: A One-Year Randomized Controlled Trial, 2011 OARSI World Congress, 2011. 9. 15, Hilton San Diego Bayfront (USA)
- ⑥ 遠山晴一, 安田和則, シンポジウム: 軟部組織のバイオメカニクス, 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010. 10. 14, 京都国際会議場 (京都)
- ⑦ H. Tohyama, T. Chiba, K. Tadano, K. Ikoma, K. Yasuda, Effectiveness of Video-based Home Exercise for Osteoarthritis of the Knee: A Randomized Controlled Trial, 2010 OARSI World Congress, 2010. 9. 24, Royal Library of Albert I (Belgium)
- ⑧ H. Tohyama, E. Kondo, K. Yasuda, Graft Remodeling in Tendon & Ligaments, The 6th World Congress on Biomechanics, 2010, 8. 6, Suntec Convention Centre (Singapore)
- ⑨ H. Tohyama, E. Kondo, K. Yasuda, Basic Science Research on Ligament & Tendons, The 7th Biennial Meeting of APOSSM, 2010. 7. 3, 沖縄コンベンションセンター (沖縄)

[図書] (計 2 件)

- ① H. Tohyama, K. Yasuda, Springer Verlag,

The Knee Joint: Surgical Techniques and Strategies, 2012, 43-50

- ② H. Tohyama, K. Yasuda, Intech, Biomechanics in Applications, 2011, 83-100

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠山 晴一 (TOHYAMA HARUKAZU)  
北海道大学・北海道大学病院・准教授  
研究者番号: 60301884

### (2) 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

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: 00359481  
(H22 のみ)

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: 20166507

### (3) 連携研究者

なし