

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10785

研究課題名(和文) 膝前十字靭帯損傷における関節動揺の安定化と神経機能回復過程の解明

研究課題名(英文) Stabilization of joint instability and neural function recovery in anterior cruciate ligament injury.

研究代表者

金村 尚彦 (Kanemura, Naohiko)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：20379895

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)：関節不安定を制動するモデル動物に対し、中枢神経や靭帯内線維芽細胞における神経可塑性を解析した。線維芽細胞ではBDNF,NGFにおいてACT切断群(ACLT群)は4週時点で有意に増加、関節制動群(CAM群)は8週時点において増加傾向を示した。後根神経節ではASIC3とASIC1について、8週間後に発現が増加し、ASIC3はCAM群においてSham群まで回復した。脊髄後角のPiezo2は、ラミナでⅡ・Ⅲ・Ⅴで発現し、疼痛因子と共局在を示した。脊髄におけるプロテーム解析では、特に、ACLT群ではAxonal growth inhibition因子が、CAM群では神経可塑性に関する因子が活性化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膝前十字靭帯(ACL)損傷による膝関節感覚機能の改善には、損傷靭帯の組織修復がなされ、靭帯に存在する神経機能の回復や中枢神経ネットワークの再構築が重要な鍵を握っている。関節不安定性を制動するモデル動物に対し、中枢神経や靭帯内線維芽細胞における神経可塑性因子を解析した。靭帯損傷から、関節不安定が引き起こされるが、その状態が続くと関節内組織にある線維芽細胞から発現する神経栄養因子の発現が影響を受ける。関節からの感覚経路として後根神経節や脊髄後角におけるエリアがあるが、靭帯損傷による膝関節が不安定をコントロールすると、中枢神経や線維芽細胞に影響を与える。関節機能の感覚機能回復することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuroplasticity factors in the central nervous system and fibroblasts in the ligaments were analyzed in an animal model of braking joint instability. In fibroblasts, BDNF and NGF were significantly increased at 4 weeks in the ACT transection group (ACLT group) and showed an increasing trend at 8 weeks in the joint braking group (CAM group). In the dorsal root ganglia, the expression of ASIC1 and ASIC3 increased at 8 weeks, and ASIC3 expression recovered to the sham group in the CAM group. Piezo2 in the dorsal horn of the spinal cord was expressed in laminae II, III, and V and co-localized with pain factors. Proteomic analysis of the spinal cord showed that axonal growth inhibition factors were activated, especially in the ACLT group, and factors related to neuroplasticity were activated in the CAM group.

研究分野：理学療法学 神経科学

キーワード：膝関節 靭帯損傷 神経機能ネットワーク 回復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ACL 損傷は、ジャンプ着地動作時に発生頻度が高く、自然治癒能力が低い靭帯として考えられており、自家腱を利用した外科的再建術が標準的治療である。臨床場面では術後、膝関節の力学的安定は得られているが、膝関節の不安感を訴えるケースによく遭遇する。先行研究では、固有感覚は、再建9ヶ月後から除去に回復するが、完全回復には18ヶ月を要した(Iwasa 2000)。患側だけではなく健側ともに膝関節固有感覚が低下していた(Shidahara 2011)。術後5から37ヶ月までの再建靭帯の組織学観察において、神経要素が観察されなかった(Aune 1996)など再建後の膝関節感覚機能の低下が報告されている。一方 ACL 損傷後に残余靭帯を温存し再建術を行った群は、残余靭帯を切除し再建術を行った群と比較した固有感覚機能が良好である事が示唆されている(Andonovski 2017, Byung2008)。ACLには関節には機械受容器と呼ばれているセンサーがあり、関節の運動方向や速度、加速度をモニターしているが、残余靭帯にもこの受容器の存在が確認されており(Dhillon 2010)、残余靭帯内の神経要素に注目が集まっている。申請者らは、動物実験によって、保存療法により損傷したACLが自己治癒することを世界に先駆けて報告した。ACLを切断すると大腿骨が脛骨に対し前方へ移動し、不安定な関節運動が引き起こされる。靭帯を切断した後に異常な関節を制動すると、2週後に靭帯組織の連続性が観察された。切断端の間隙を埋めるように滑膜組織などの軟部組織が増生し、治癒過程が観察され、力学試験においても良好な強度であった。しかしACL切断群では、靭帯断端が退縮し、連続性は確認されなかった。神経再生には、神経栄養因子の存在が必要であり、この因子は、靭帯内線維芽細胞により産生されている。膝関節感覚機能の改善には、損傷靭帯が治癒する過程において組織修復がなされ、靭帯に存在する神経機能の回復や膝関節に関与している中枢神経ネットワークとの再構築が重要な鍵を握っている。

2. 研究の目的

本研究は、異常関節運動を制動し自己治癒した靭帯内に存在する神経や中枢神経の可塑性に関する因子と中枢神経ネットワークが回復するか検証した。また靭帯や滑膜組織に存在する線維芽細胞における神経可塑性因子について、細胞培養により比較検討した。

3. 研究の方法

研究1 靭帯における線維芽細胞の神経栄養因子発現の比較

ラット ACL 損傷モデルを用いて、ACL 損傷後に異常関節運動を制動することにより、細胞から発現される神経栄養因子の発現量について比較した。11週齢 Wistar 系雄性ラットに対し ACL 切断群(以下 ACL-T 群)、ACL 切断後関節制動を行った群(以下 CAM 群)、偽手術群(以下 Sham 群)に無作為に分類し、術後2週、4週、8週時点で ACL の細胞を採取した。細胞培養し、total RNA を抽出した。その後、逆転写反応により cDNA を合成し、Real time PCR 法にて神経栄養因子 BDNF、NGF、NT3 mRNA 発現量を分析した。

研究2 脊髄後根神経節における蛍光免疫組織学染色と RNA 発現量の比較

10週齢の Wistar 系雄性ラットに対し、前十字靭帯切断群(ACLT 群)、ACL 切断後に関節制動を行った(CAM 群)群、非介入群(Sham 群)について、膝関節支配領域である第3~6腰髄レベルの後根神経節を採取し、total RNA 抽出、cDNA 合成を行い、Real time PCR 法にて ASIC1、ASIC3、BDNF、NT3 mRNA 発現量について RT 法により比較検討した。後根神経節における ASIC1、

ASIC3, BDNF と NT3 陽性細胞を免疫組織化学染色にて観察し、後根神経節単位面積あたりの陽性細胞数を算出した。

研究 3 脊髄後各領域における局在性の比較

10 週齢の Wistar 系雄性ラットに対し、前十字靭帯切断群 (ACLT 群) ACL 切断後に関節制動を行った (CAM 群) 群, 非介入群 (Sham 群) について、実験 2 週間と 8 週終了後、腰髄 L4-5 を採取し、凍結包埋後、横断切片作成した。免疫蛍光組織化学染色は一次抗体として Piezo2, CGRP, IB4 を使用した。脊髄後角 (2 ~ 4 層) の画像撮影を行い、陽性神経領域の分布を各群比較した。

研究 4 腰髄レベルのプロテーム解析とリアルタイム PCR の比較

10 週齢の Wistar 系雄性ラットに対し、前十字靭帯切断群 (ACLT 群) ACL 切断後に関節制動を行った (CAM 群) 群を対象とした。実験介入後 8 週間経過後、L4-5 レベルの脊髄を摘出し、全タンパク質を抽出し液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) により、プロテーム解析を行った。DAVID6.8 を用い、パスウェイ解析を行った。また神経可塑性に関与している神経栄養因子 BDNF、NGF、NT3 について Real time PCR 法により RT-PCR 法により比較検討した。

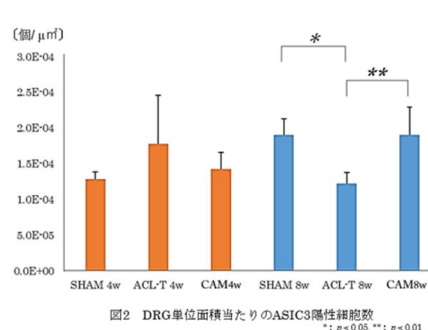
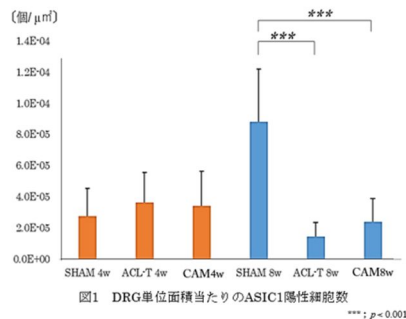
4 . 研究成果

研究 1

BDNF、NGF は ACLT 群は、4 週時点で増加、CAM 群は、8 週時点で増加傾向を示した。NT3 は各期間で変化を認めなかった。NGF は炎症に関わる因子で処理すると発現量が増加する。また NGF/TrkA シグナル伝達が阻害されることで、痛覚過敏が緩和したことから痛覚に関与している可能性が推察された。組織学分析において、ACLT 群では、損傷後連続した靭帯は観察されなかったが、CAM 群ではは 4 週以降に損傷された靭帯の連続性が観察されたことから、靭帯治癒後、線維芽細胞から神経再生に関与する因子の発現動態の一部が明らかとなった。

研究 2

機械感受性に関与している ASIC 後根神経節における ASIC1、BDNF と NT3 についてはそれぞれ有意な差を認めなかった。後根神経節における蛍光免疫組織化学染色において、ASIC1 は中型・大型細胞 への陽性を示し、一方 ASIC3 は小型・中型・大型細胞へ陽性所見を認めた。BDNF と NT3 については、すべての細胞に陽性所見を示した。ASIC1 について、4 週では 3 群ともに陽性細胞



数に有意差を認めなかったが、8 週において一元配置分散分析で有意差を認め多重比較にて Sham 群の陽性細胞数が ACLT 群および

CAM 群に対し有意に多かった ($p < 0.001$) (図 1)、

ASIC3 について、4 週では 3 群ともに陽性細胞数に有意差を認めなかったが、8 週において一元配置分散分析で有意差を認め多重比較にて ACLT 群の陽性細胞数が Sham 群 ($p < 0.05$) および CAM 群 ($p < 0.01$) に対し有意に減少した (図 2)。CAM 群は、Sham 群まで回復した。BDNF、NT3 陽性細胞数について有意差を認めなかった。ASIC1 について、4 週 Sham 群に対し、ACLT 群が 0.71 倍、

CAM 群が 0.87 倍であり、8 週 Sham 群に対して ACLT 群が 0.78 倍、CAM 群が 0.79 倍であった。

Asic3 について、4 週 Sham 群に対し、ACLT 群が 0.69 倍、CAM 群が 0.66 倍であった。また 8 週 Sham 群に対して ACL 切断群が 0.66 倍、CAM 群が 0.73 倍であった。4 週では有意差を認めなかったが、8 週において有意差を認め、Sham 群における mRNA 発現量は ACL-T 群、制動群に対し有意に高値であった。後根神経節に投射された感覚情報は、因子により違いを認めた。ACL 切断群は神経機能が低下するが、関節制動により、神経機能が回復する可能性が示唆された。BDNF, NT3 mRNA 発現量については、有意差を認めなかった。

研究 3

ACLT 群、CAM 群では各因子の陽性神経が観察された。Sham 群では IB4 と CGRP の局在は観察されず、Piezo2 に関してはラミナ I-IV にて陽性神経の局在が観察されたが、ACLT 群、CAM 群の場合よりも領域が狭小化した。機械感受性に関与している Piezo2 は、有髄神経 A にかつ脊髄

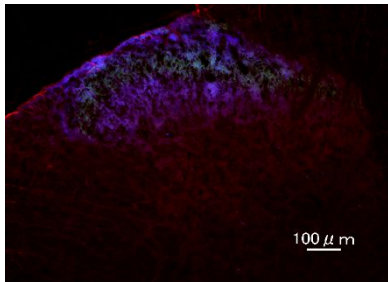


図 3 脊髄後角 (I-IV 層) 付近組織像

一次抗体 Piezo2 (赤), Isolectin B4 (IB4) (緑)
calcitonin gene-related peptide (CGRP) (青)

では、ラミナ I-IV に発現している。無髄神経 C 線維に発現する IB4 はラミナ I-IV 、CGRP は、ラミナ I-IV に存在する (Snider 1998)。ACL 切断により、脊髄レベルの ACLT 群と CAM 群により、Piezo2 はラミナ I-IV 、IB4 は、ラミナ I-IV 、CGRP はラミナ I-IV

で観察された。Piezo2 と IB4 はラミナ I-IV で共発現し、また Piezo2 と CGRP はラミナ I-IV で共発現として観察されたことから、靭帯損傷により、機械感受性に関与するとされている Piezo2 が膝関節のメカニカルストレスに疼痛にも関与している可能性が示唆された。

研究 4

ACLT 群では、Interleukin-12 signaling、Apoptotic phase で特に caspase mediated cleavage、PAK-2 p34 の経路、Axonal growth inhibition のパスウェイが活性化していた。一方 CAM 群では、Retrograde neurotrophin signalling、Axonal growth また signal Transduction では特に ERK/MAPK のシグナル伝達カスケードの活性化を認めた。ACLT 群の脊髄神経ではアポトーシスを惹起するパスウェイが活性するが、CAM 群では、神経可塑性にかかわる因子が活性化した。特に CAM 群では、ERK/MAPK の活性化されたが、このシグナル伝達カスケードは、神経細胞においては、分化や生存、シナプス可塑性、脳では記憶学習に関与している。膝関節損傷後の不安定が損傷後の炎症や関節不安定性後の炎症が慢性化し、脊髄神経へ影響を与えている可能性がある。膝関節不安定性により、脊髄神経におけるアポトーシスを誘導する経路が活性化した。次に神経可塑性に関与している神経栄養因子 BDNF, NGF, NT3 についてリアルタイム PCR の結果について、BDNF mRNA の発現量は、Sham 群の発現量を 1 とすると、ACL 切断群 0.7 倍、関節制動群において 1.1 倍であった。NGF mRNA の発現量は、Sham 群の発現量を 1 とすると、ACL 切断 0.9 倍、関節制動群 1.9 倍となり、有意差は認めなかった。一方 NT3 mRNA の発現量は、Sham 群を 1 とすると、ACL 切断群で 1.2 倍、関節制動群 7.9 倍であった。関節制動群は Sham 群と比較して有意に増加していた。膝関節支配レベルの脊髄において神経栄養因子の mRNA の発現に違いがみられたことから、末梢での損傷は神経機構において脊髄神経に影響を及ぼすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 N Kanemura, T Kokubun, Y Morishita, K Murata, A Nakajima, K Matsui, K Onitsuka, S Fujiwara
2. 発表標題 Influence of nerve regeneration on anterior cruciate ligament injury healing process in a rat model
3. 学会等名 12th ISPRM World Congress ISPRM 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金村 尚彦, 峯岸 雄基, 小曾根 海知, 加納 拓馬, 黒尾 彩, 岡 優一郎, 村田 健児, 森下 佑里, 国分 貴徳, 今北 英高
2. 発表標題 膝関節不安定性が脊髄神経機構に与える影響
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金村尚彦, 峯岸雄基, 黒尾彩
2. 発表標題 膝関節に対するメカニカルストレスの相違が疼痛発現に与える影響
3. 学会等名 第13回埼玉県立大学保健医療福祉科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷竜徳, 金村尚彦
2. 発表標題 脊髄後角でのPiezo channelsと疼痛因子の発現形態 -ACL損傷モデルラットを用いた検証-
3. 学会等名 第13回埼玉県立大学保健医療福祉科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井隆平, 金村尚彦
2. 発表標題 ラット膝前十字靭帯損傷モデルにおける靭帯・滑膜由来線維芽細胞でのASIC1,3 mRNA発現量の比較
3. 学会等名 第13回埼玉県立大学保健医療福祉科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋ひかり, 大塚香緒里, 山本芙雪, 高橋采紗, 国分貴徳, 村田健児, 金村尚彦
2. 発表標題 ラット膝前十字靭帯損傷後の関節制動が 脊髄における神経栄養因子の発現と神経修復に及ぼす影響
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 金村尚彦
2. 発表標題 膝関節不安定性を制動する装具療法と関節内組織修復能への影響
3. 学会等名 第2回 日本ファシア会議 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 宇都弥紀 峯岸雄基, 岡優一郎, 荒川航平, 西元淳司, 国分貴徳, 村田健児, 金村尚彦
2. 発表標題 ラット膝前十字靭帯損傷モデルにおける自己治癒靭帯の神経再生への影響
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金村尚彦
2. 発表標題 ファシアを含めた運動器の基礎と運動効果
3. 学会等名 第15回日本整形内科研究会 ウェビナー（招待講演）
4. 発表年 2020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

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