

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10846

研究課題名(和文)力学刺激による腱・靭帯付着部形成における細胞・分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of a cell and the molecular mechanism in the tendon-ligament insertion department formation by the dynamics stimulation

研究代表者

中島 弘美(Nakajima, Hiromi)

茨城大学・農学部・特命研究員

研究者番号：30323215

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)：ウサギでの前十字靭帯(ACL)、大腿四頭筋腱(QT)、膝蓋腱(PT)およびアキレス腱(AT)における付着部線維軟骨層の発達やSox9およびⅡ型コラーゲンの発現は違っていた。これらの違いは筋力や負荷などの機械的環境の違いが影響している可能性がある。ペリオスチンはマウスにおけるACL付着部線維軟骨層の細胞外基質の発達に影響を及ぼした。我々の結果は年齢に基づいて適切な治療の管理に貢献し、腱・靭帯付着部線維軟骨層を再生するための方法の開発に役立つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウサギの成長過程における腱・靭帯付着部軟骨層の発達を軟骨細胞と細胞外基質タンパクに注目して検索した結果、付着部軟骨層の発達は筋肉や負荷などの機械的環境が影響していた。また、ペリオスチンノックアウトマウスを用いた成長過程の検索では、ペリオスチンはマウス前十字靭帯付着部線維軟骨層の細胞外基質の発達に影響を及ぼした。これらの結果はヒトの腱や靭帯の疾患に際して年齢に基づいて適切な治療、その後のリハビリやスポーツ復帰までの管理に貢献できる。加えて腱・靭帯付着部線維軟骨層を再生するための方法の開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The developmental processes, Sox9 and type 2 collagen-expression of fibrocartilage layers during anterior cruciate ligament (ACL), quadriceps tendon (QT), patellar tendon (PT) and Achilles tendon (AT) insertions differed substantially in rabbits. These differences have a possibility that the difference among mechanical environments, such as muscular strength and load, has influenced. Periostin influenced the development of the fibrocartilage layer extracellular matrix of ACL insertion in mice. Our results contribute to the administration of appropriate treatments based on the age, and aid in the development of methods for regenerating enthesis fibrocartilage layers.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：前十字靭帯 膝蓋腱 アキレス腱 付着部軟骨層 軟骨細胞 細胞外基質タンパク ペリオスチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腱・靭帯の付着部は、腱・靭帯 - 非石灰化軟骨層 - 石灰化軟骨層 - 骨の4層構造から成り、腱・靭帯からの力学負荷に反応するメカノセンサーとして機能しており、その形成において力学刺激は必須である。我々はこれまでに、これを裏付ける2つの研究を実施した。

1つ目は、腱・靭帯付着部の力学負荷を制御したウサギを用いた実験モデルによる研究である。まず、腱・靭帯付着部の力学負荷を減じるモデルとして前十字靭帯 (ACL) を切除する靭帯切除モデル、膝蓋骨と脛骨粗面に軟鋼線をかけて膝蓋腱を短縮して締結する靭帯除負荷モデル、膝関節を3本の鋼線で固定する関節固定モデルを開発した。これらの動物実験において、ACL・膝蓋腱付着部は、術後1~4週において軟骨細胞のアポトーシスが誘導され、軟骨基質のグリコサミノグリカン (GAG) は術後2~8週の間で産生が減じることを明らかにした。一方、腱・靭帯付着部に負荷をかけるモデルとしては、ACLを部分的に切除する靭帯部分切除モデル、膝蓋骨と脛骨粗面に鋼線を挿入し、創外固定伸長器を装着した後、徐々に膝蓋腱を伸長させる膝蓋腱伸長モデルを開発した。これらの動物実験においては、ACL・膝蓋腱付着部は、術後2~8週において軟骨細胞のアポトーシスが減じ、逆に増殖能力が増し、GAG産生は増加することが明らかとなった。

2つ目の研究は、腱にリン酸カルシウム (CaP) を複合化させて骨孔に移植し、移植腱-骨孔の固着を促進するものである。この方法を用いると、ウサギACL再建術では移植腱が術後2週という早期に骨と直接固着し、また、ヤギACL再建術では術後6か月~2年で移植腱-骨孔間は軟骨層を介した正常付着部に近い構造をとることが明らかとなった。さらに、そのヤギACL再建術後の脛骨に前方力をかけた力学試験においては、従来法に比べ、脛骨前方制動性が増し、移植腱内に高い張力を有することから、正常ACLに近い機能を持っていることが明らかとなった。

これらの一連の研究から、腱・靭帯付着部にかかる力学負荷によって、軟骨細胞はアポトーシスや増殖能力を変化させ、付着部の軟骨基質を変化させること、また、付着部は軟骨層を有することでより大きな負荷を許容し、機能的に優れるということが明らかとなった。しかし、腱・靭帯付着部において、力学刺激がいつどのように付着部の軟骨細胞に影響し、非石灰化軟骨層・石灰化軟骨層を形成するのか、軟骨細胞増減・基質タンパクの発現は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ウサギ成長過程およびペリオスチンノックアウトマウスを用いて、時間経過を追って腱・靭帯付着部を組織学的に評価する。

### 3. 研究の方法

以下の研究について、腱・靭帯付着部線維軟骨層の形成過程を組織学的に、加えて付着部線維軟骨層の軟骨細胞に関わる Sox9 と細胞外基質のⅡ型コラーゲンおよびペリオスチンの発現を免疫組織化学的分析に基づく定量的形態計測で実施した。

#### (1) ウサギ成長過程

前十字靭帯 (ACL)、大腿四頭筋腱 (QT)、膝蓋腱 (PT) およびアキレス腱 (AT) の各付着部の線維軟骨層の発達を評価するために日本白色家兎の雄を使用した。各年齢 (1日および1、2、4、6、8、12、および24週) で6匹、計48匹の動物を安楽死した。軟骨細胞の増殖率、アポトーシス率、Sox9陽性率および細胞数を評価した。細胞外基質のⅡ型コラーゲン染色領域およびペリオスチンの発現、サフラニンO染色によるグリコサミノグリカン (GAG) 領域、タイドマーク長および挿入幅も評価した。すべてのパラメーターは24週齢のパラメーターと比較した。

## (2) ペリオスチンノックアウトマウス

C57BL/6N 野生型マウス(ペリオスチン+/+: 野生型; n = 54)とペリオスチンノックアウト型マウス(ペリオスチン-/-: ノックアウト型; n = 54)を使用した。各群で6匹の動物を1日および1、2、3、4、6、8、10および12週齢で安楽死をした。前十字靭帯(ACL)付着部線維軟骨層の軟骨細胞数、軟骨細胞増殖、軟骨細胞アポトーシス、サフラニンO染色によるGAG染色域、型コラーゲン染色領域、タイドマーク長および付着部幅を野生型とノックアウト型で比較評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ウサギ成長過程

前十字靭帯(ACL)、大腿四頭筋腱(QT)、膝蓋腱(PT)およびアキレス腱(AT)の各付着部共に軟骨細胞と細胞外基質の変化は、それぞれ8週齢と12週齢までに完了した。加えて各付着部の線維軟骨層の発達も12週齢までに完了した。しかしながら軟骨細胞、細胞外基質および線維軟骨層の発達状況は、ACL、QT、PTおよびATで異なり、ACL、AT、PTおよびQTの順であった。

軟骨細胞の発達に関わるSox9の発現率では、ACLとATは生後1日齢が最も多く、その後12週齢にかけて徐々に減少したが、QTとPTは24週齢に比べて生後1日齢と1週齢で有意に低かった。

細胞外基質における型コラーゲン染色領域は、ACLでは2週齢で染色領域がみられ、4週齢以降12週齢まで増加した。2、4および6週齢の型コラーゲン染色領域は付着部軟骨層の全体にみられたが、8週齢以降では特に付着部石灰化軟骨層に型コラーゲン染色領域が集中していた。ATでは、4週齢までは型コラーゲン染色領域がみられず、8週齢から染色領域がみられて以後24週齢まで変わらなかった。ペリオスチンの発現は、ATでは1日齢~4週齢で発現がみられ、それ以降ではほとんどなかった。

ACL、QT、PTおよびATでの発達や発現の違いは筋肉や負荷などの機械的環境の違いが影響を及ぼしている可能性がある。

### (2) ペリオスチンノックアウトマウス

軟骨細胞増殖は、野生型で1日齢では低く2週齢まで高く、特にノックアウト型は1日および1週齢で野生型よりも低かった。軟骨細胞アポトーシスは、野生型では8週齢まで、ノックアウト型では6週齢で高く、特にノックアウト型は1週齢で野生型よりも高かった。グリコサミノグリカン領域の幅広い期間は、野生型では1日齢から4週齢、ノックアウト型では2週齢から6週齢と続いた。型コラーゲン染色領域は、6週齢と8週齢ではノックアウト型よりも野生型で厚かった。タイドマークの長さは、ノックアウト型の8週齢から12週齢の間ではノックアウト型よりも野生型で長かった。

このようにノックアウト型は出生後初期段階で細胞増殖が低く、アポトーシスが高く、成長に伴って細胞外基質の変化が遅れ、前十字靭帯(ACL)付着部の不完全な発達を示した。ペリオスチンは出生後初期段階で軟骨細胞増殖を減少させ、マウスにおけるACL付着部線維軟骨層の細胞外基質の発達に影響を及ぼした。ペリオスチンは、ACL付着部線維軟骨層の発達に影響を与える可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirota Mutsuzaki, and Hiromi Nakajima	4. 巻 8
2. 論文標題 Differences in the Development of Fibrocartilage Layers in the Quadriceps Tendon and Patellar Tendon Insertions in Rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthopaedic Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2325967120966418	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 該当する
1. 著者名 Hirota Mutsuzaki, Hiromi Nakajima, Maika Someji and Masataka Sakane	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of fibrocartilage layers in the anterior cruciate ligament insertion in rabbits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 1 - 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2614-0.	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 該当する
1. 著者名 Hirota Mutsuzaki and Hiromi Nakajima	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of fibrocartilage layers in Achilles tendon enthesis in rabbits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Rural Medicine	6. 最初と最後の頁 160-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2185/jrm.2021-015	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 該当する
1. 著者名 Hirota Mutsuzaki, kazuki Kuwabara, and Hiromi Nakajima	4. 巻 -
2. 論文標題 Influence of periostin in development of fibrocartilage layers of anterior cruciate ligament insertion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	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.otsr.2022.103215.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩原 一輝、中島 弘美、六崎 裕高
2. 発表標題 前十字靭帯(ACL)付着部軟骨層の形成過程におけるペリオスチンの関与
3. 学会等名 日本畜産学会 第128回大会 形態・生理
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木璃子、六崎裕高、中島弘美
2. 発表標題 ウサギ出生後の膝蓋靭帯及び大腿四頭筋腱付着部軟骨層の形成過程
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会・獣医解剖分科会
4. 発表年 2018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	六崎 裕高	茨城県立医療大学・保健医療学部・教授	
	(Mutsuzaki Hiroataka)		
	(50550927)	(22101)	

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