

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：22401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17679

研究課題名(和文)前十字靭帯損傷を自己治癒へ導くリハビリテーションの臨床応用へ向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental research for clinical application about the rehabilitation that leads to spontaneous healing after ACL injury

研究代表者

国分 貴徳(Kokubun, Takanori)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授

研究者番号：10616395

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 今回の研究では、前十字靭帯損傷患者に対する保存的治療法の確立へ向けて、保存的治療法の損傷部位による適応の可能性を明らかにすること、および自己治癒過程におけるリハビリテーション介入の影響を明らかにすることを目的とした。結果として、実験動物において保存的治療法は前十字靭帯損傷の多数を占める中間部損傷と大腿骨近位部損傷の双方に適応できる可能性が示された。また、運動介入においては、メカニカルストレス受容性が高いとされる膝蓋下脂肪体を介して、異常運動を制動した上での介入は、治癒を促進させる可能性が示された。この結果は前十字靭帯損傷の治癒過程における適切なリハビリテーションの重要性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、前十字靭帯損傷に対する保存的治療法が、損傷部位(大腿骨近位部か中間部か)に関わらず適応可能であること、および異常な関節運動を制動した状態における適度な運動は、完全損傷した前十字靭帯の自己治癒反応を促進することを明らかにした。以上の結果は、我々の基礎研究を臨床へ応用していく上で、対象となる患者の適応の有無の判断と、その後の治癒を促進するリハビリテーション介入に関する基礎的なデータとなる可能性があり、前十字靭帯損傷患者に対する新たな治療法の選択肢確立へ有用な成果である。

研究成果の概要(英文): In this study, we investigated that the indication for treatment related to location of ACL rupture and the effect of rehabilitation in conservative therapy after anterior cruciate ligament (ACL). The results showed our original controlled abnormal tibial translation (CATT) model can apply for both mid-portion and femoral side injured ACL. Additionally, rehabilitation exercise during conservative therapy for complete injured ACL may promote the expression for connecting organizer between ECM and the cells (Integrin and Fibronectin). Infra-Patellar Fat-Pad works as a mechano-sensor intra-articular environment after ACL injury. These results suggest that rehabilitation intervention under control of abnormal movement has a important role during spontaneous healing for complete ACL injured knee.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：前十字靭帯損傷 ACL 保存療法 適応 リハビリテーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前十字靭帯(Anterior Cruciate Ligament: ACL)損傷は、膝関節外傷として発症頻度が高く、近年の健康運動志向の高まりに伴い、中高年世代にも患者層が広がっている。患者ニーズとして多様な治療法の選択肢が求められているが、損傷した ACL は自己治癒しないことが認識され、現状は外科的再建術の一択となっている。

2010 年頃までの ACL 損傷に関する基礎・臨床研究の起源は、この完全損傷した ACL が自己治癒しないという課題を解決することであった。古くは、1966 年に O'Donoghue らが犬を対象としてこの疑問に立ち向かい、完全断裂では治癒しないことを実験的に明らかにした。これ以降多くの研究者が、様々な実験動物を対象として自己治癒しない理由についての研究を進め、数多くの関節包内因子が報告された。

ACLが治癒しない要因として報告された関節包内因子

- ・ 血行不良 (Bray et al. 1990, 1991)
- ・ 生体力学的負荷の相違 (Viidik et al. 1990)
- ・ Collagen線維の含有率 (Amiel et al. 1990)
- ・ 炎症細胞と関連物質 (Akeson et al. 1990)
- ・ α プロコラーゲンのRNA量 (Wiig et al. 1991)
- ・ 一酸化窒素量 (Cao et al. 2000)
- ・ 治療過程のFibronectin量 (Almaraz et al. 2006)
- ・ α SMA/TGF- β の発現量 (Menetrey et al. 2010)
- ・ MMPの発現量 (Zhang et al. 2010)
- ・ 生体幹細胞の治癒能力 (Zhang et al. 2011)

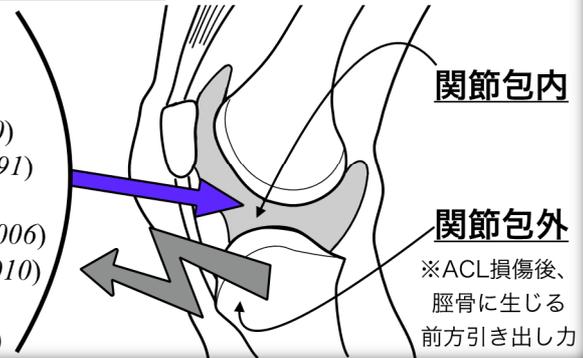


図1 ACLの低治癒能の要因に関する先行研究

このような状況の中で、Harvard Medical School の整形外科医である Murray MM らは、損傷 ACL にも他の靭帯と同等の治癒反応が見られることを明らかにしたが、関節液により血餅(Fibrin Clot)が安定しないこと(2000)や治癒するための鋳型(Scaffold)がないこと(2007, 2013)など、ACL が存在する関節内の特殊な環境が ACL の自己治癒を妨げていると報告した。また、靭帯損傷の保存療法に積極的であった Woo ら (1988,1990) は、同じ膝関節の内側側副靭帯が自己治癒するが、ACL はしない理由として、「内側側副靭帯の役割である膝関節外反制動は損傷後も ACL によって代償されるが、ACL の役割である脛骨の前方制動は他の組織では代償されない」ことを明示し、初めて関節包外からの因子が治癒に及ぼす影響を考察した。

ACL 損傷に対する自己治癒能に関しての以上の潮流の中で、応募者はメカニカルストレスが生体組織に負荷されることで生体内に生物学的な反応が惹起されるというメカノバイオロジーの視点から、ACL 損傷後に生じる異常関節運動を制動し運動することで、完全損傷であっても自己治癒し、かつ治癒した ACL の破断強度が再建靭帯の強度を上回ることを報告した (Kokubun et al. AJSM. 2016)。しかしながら、ACL の保存的治療法には、治療成績のバラツキや高い再断裂率など問題点も未だ多く残されている。

2. 研究の目的

本研究計画では、以下の二つの研究課題の解明を目標とした。

研究1: 損傷部位の違いが、保存的治療法の適応に影響を及ぼすか？

臨床で報告されている ACL 損傷の損傷部位については、靭帯中間部と大腿骨近位部での損傷が多いとされ、それらの合計は約 95% にのぼるとされている (van der List JP, et al. Orthop J Sports Med. 2017)。この損傷部位の違いが、保存的治療法の適応に影響を及ぼすかについて、新たなモデルを開発し、解明することを目指した。

研究2: 保存的治療法において運動はいかなる影響を及ぼすか？

我々が開発した ACL 損傷に対する保存的治療法では、ACL 損傷後に生じる異常な関節運動を制動するため、関節包外での制動処置を実施している。これにより関節の異常な運動を制動することで、同時に損傷から治癒した靭帯に対してはメカニカルストレスが付加されることのない状況を生み出している。靭帯の強度とメカニカルストレスの関連については、関節固定後の関節周囲組織を分析した研究において、固定により靭帯のコラーゲンおよび細胞の配向に歪みを認めたとの報告 (James AN., Br. J Sports Med. 1986) もあり、強い関連が示唆されている。そこで本研究では、治癒過程の早期から関節に適度なメカニカルストレスを付加することを目的に、運動介入の波及効果について解明を目指した。

以上により、我々の基礎研究成果を実際の患者治療へ確実にトランスレーションするため、ACL 損傷に対する保存的治療法の適応基準と、最適なりハビリテーションプロトコル確立に繋

がる基礎データを提示することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、我々が開発した、Wistar 系雄性ラットの ACL 損傷後、異常関節運動を制動し ACL を自己治癒に導いたモデル (Controlled Abnormal Tibia Translation Model; CATT model) を使用し、二つの研究課題解明に挑んだ。

研究 1: 損傷部位の違いと、保存的治療法の治癒反応

我々の開発した CATT model は、外科的に ACL 損傷を発生させるモデルであるが、損傷部位は ACL の中間部 (Anterior Cruciate Ligament Transection-Midportion rupture: ACLT-MP) であった。これに加え、大腿骨近位部損傷 (Anterior Cruciate Ligament Transection-Femoral side rupture: ACLT-FS) 群を作成し、これらの群間における治癒反応の違いについて、損傷後 4、6、8 週時点において組織学的解析、損傷後 8 週および 12 週時点において生体力学的検討を行った。

研究 2: 保存的治療法における運動介入の影響解明

ACL 完全損傷に対する保存的治療法において、治癒過程の ACL に対し、メカニカルストレスを負荷するため、トレッドミルによる運動介入を実施した。この運動介入が及ぼす効果について、ACL とその治癒過程における組織像において、顕著な変化を見せていた膝蓋下脂肪体 (Infrapatellar Fat-Pad: 以下 FP) について、治癒および炎症関連因子の発現を解析し、運動介入の波及効果を検討した。

4. 研究成果

1) 損傷部位の違いと保存的治療法の適応について

今回の研究では、中間部損傷モデルと新たに開発した大腿骨近位部損傷モデルの双方に置いて、損傷した ACL の治癒が確認された。なお、両部位の損傷で関節の異常運動を制動する介入を実施しないモデルにおいては、靭帯組織の連続性を認めなかったため、我々の確立した脛骨の前方引き出し制動介入は、ACL 損傷の損傷部位にかかわらず、治癒を促進する効果を有することが確認された。

治癒経過に関しては、4 週時点においては、疎な組織が損傷部位の間隙を埋めていたが、6 週および 8 週時点においては、靭帯様の形態が観察された。どちらの損傷部位においても、ともに治癒領域において幼弱な細胞が高密度に密集した組織が観察され、コラーゲン線維や細胞の配列は、正常組織のそれとは異なる長軸方向に対して無秩序な配列となっていた。また大腿骨近位部損傷モデルにおいては、関節腔前方に存在する滑膜および膝蓋下脂肪体の増殖と、治癒領域に浸潤する像が観察された。

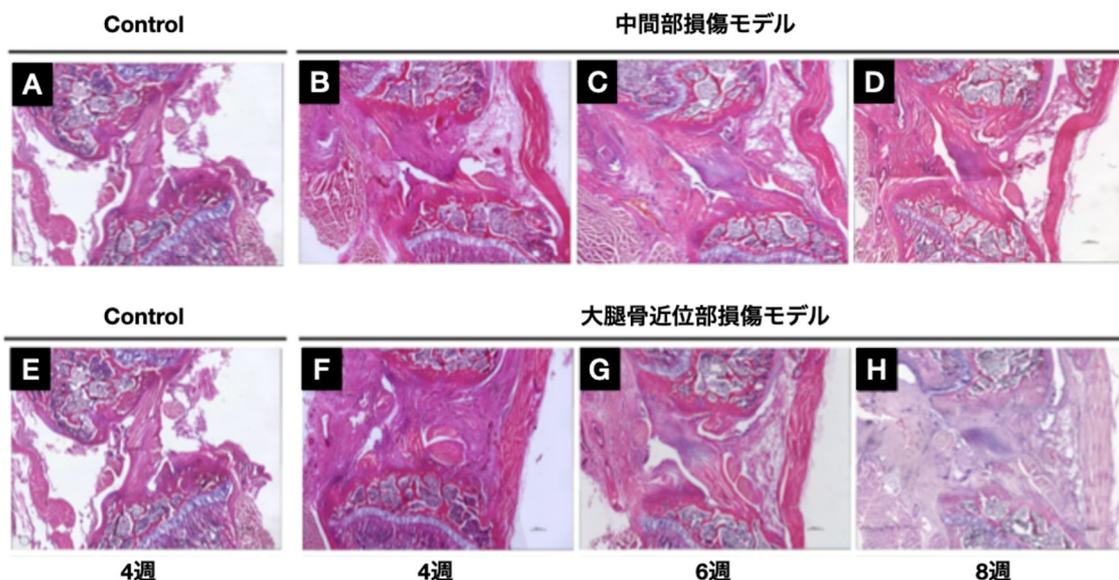


図 2 ACL 損傷部位の違いによる治癒経過 (Hematoxylin-Eosin 染色)

中間部・大腿骨近位部ともに損傷後 4 週時点においては、疎な組織による専属性を認める。その後、6、8 週時点においては、靭帯様の組織へと形状が変わっていく様子が見られる。

また、治癒した ACL の生体力学的解析では、中間部損傷および大腿骨近位部損傷モデルの双方に置いて、損傷後 8 週および 12 週時点における破断強度は、正常の ACL に比べて優位に低かった。しかしながら、両群ともに正常 ACL の 60%~80% の強度まで回復を認めており、特に中間部損傷モデルにおいては、正常靭帯の 80% 近い強度まで回復していることが示されたため、保存的治療法の適応が高い可能性が示された。

表 1 ACL 損傷部位の違いによる力学的破断強度

中間部・大腿骨近位部ともに損傷後の保存的治療法による回復を認め、その破断強度は 8 週および 12 週時点において、正常 ACL の 60~80% まで回復していた。

	Control	中間部損傷モデル	大腿骨近位部損傷モデル	
8週間後	破断強度 [N]	24.5 ± 1.5	18.1 ± 4.6 74%	17.0 ± 3.6 69%
	破断時変位量 [mm]	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.2 120%	2.0 ± 0.4 133%
	剛性 [N/mm]	16.6 ± 1.8	10.7 ± 3.7 64%	8.6 ± 1.3 52%
12週間後	破断強度 [N]	31.2 ± 2.8	24.4 ± 3.4 78%	18.3 ± 4.0 59%
	破断時変位量 [mm]	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.3 121%	1.5 ± 0.4 107%
	剛性 [N/mm]	22.7 ± 3.2	14.3 ± 2.6 63%	13.2 ± 3.4 58%

2) 保存的治療法における運動介入の影響に関して

ACL の治癒過程において、運動介入によるメカニカルストレスが及ぼす影響について、mRNA レベルの遺伝子発現を、real-time PCR 法により解析を行った。本研究でターゲットとした因子は、細胞と細胞外マトリックス (Extra Cellular Matrix: ECM) との細胞基質接着および細胞-細胞の接着に関連する因子である Integrin と、Integrin が接着する ECM タンパク質である Fibronectin をターゲットとした。これに加えて、損傷組織の治癒に必須となる血管新生に関わる因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) と、その受容体である KDR、また治癒の過程において必要となる線維芽細胞増殖因子: Fibroblast Growth Factor (FGF) と炎症性サイトカインである Interleukin-6: IL-6 の発現を分析した。

結果として、創傷治癒過程における細胞と ECM、細胞-細胞間接着に関与するとされる Integrin および Fibronectin に関しては、治癒した ACL には発現を認めず、治癒した ACL への浸潤を認めていた膝蓋下脂肪体において、顕著な発現の亢進を認めた。また制動の有無に関わらず、運動を行うことで発現が増加していることも観察された。これらの結果は、創傷治癒を牽引する細胞接着関連因子の発現が、運動介入により促進される可能性が示唆されたことになる。また、炎症性のサイトカインである IL-6 の発現については、損傷後 1 週経過時点において、治癒した ACL および膝蓋下脂肪体の双方において、亢進を認めた。特に ACL 損傷後制動をせずに運動介入を実施した群では、他軍に比べて顕著な亢進を認め、自己治癒能の阻害への影響が推察された。加えて、一方制動群では運動の有無に関わらず同程度の発現であり、関節の制動が炎症のコントロールに貢献している可能性が示唆された。一方で今回ターゲットとした血管新生因子や線維芽細胞因子では、発現の傾向性を認めなかった。

以上の結果より、本研究では、ACL 損傷に対する保存的治療法の適応として、中間部損傷および大腿骨近位部損傷という ACL 損傷全体の 95% を占めるケースへの適応できる可能性が示された。また、治癒過程における運動介入は、異常関節運動を制動した上で実施することで、治癒に関連する因子の発現を促進する可能性が示された。これらの結果は実験動物を対象とした基礎研究であり、さらに進んだ解析が必要となるが、ACL 損傷患者に対する保存的治療法の臨床応用へ向けて、基礎となるデータの一部を提供することができたと考えている。

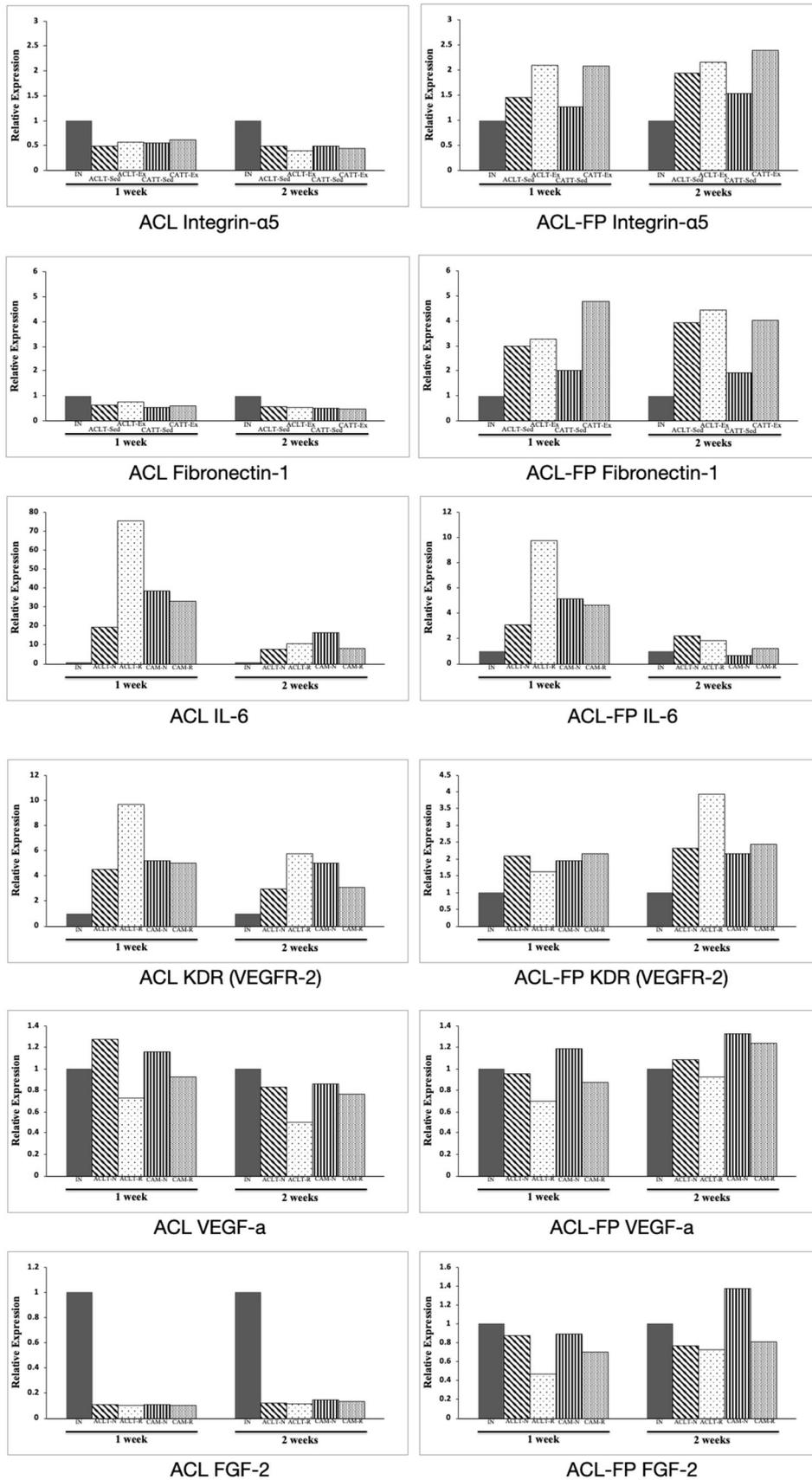


図3 ACL 治癒過程における治癒関連因子の mRNA 発現解析

治癒した ACL と、ACL の治癒過程において組織学的解析により顕著な変性を認めていた膝蓋下脂肪体 (Infra-patellar Fat-Pad: FP) における mRNA レベルの因子発現を解析した。制動の有無によって運動により関節内へ負荷されるメカニカルストレスに違いが生じていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishikawa Y, Kokubun T, Kanemura N, Takahashi T, Matsumoto M, Maruyama H, Takayanagi K	4. 巻 19
2. 論文標題 Effects of controlled abnormal joint movement on the molecular biological response in intra-articular tissues during the acute phase of anterior cruciate ligament injury in a rat model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-018-2107-6.	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 -

1. 著者名 Onitsuka K, Murata K, Kokubun T, Fujiwara S, Nakajima A, Morishita Y, Kanemura N	4. 巻 Apr.11
2. 論文標題 Effects of Controlling Abnormal Joint Movement on Expression of MMP13 and TIMP-1 in Osteoarthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cartilage	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） 10.1177/1947603518783449.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata K, Kokubun T, Takayanagi K, Kanemura N	4. 巻 13
2. 論文標題 Restoring knee joint kinematics after anterior cruciate ligament injury might inhibit synovial membrane inflammation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sport Sciences for Health	6. 最初と最後の頁 113-119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s11332-018-0481-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Takuma Kano; Takanori Kokubun; Kenji Murata; Yuichiro Oka; Kaichi Ozone; Kiyomi Takayanagi; Naohiko Kanemura
2. 発表標題 The Effect of Different Injured Sites on Spontaneous Healing Ability in Complete-Rupture ACL
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting, Austin, TX, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Yukina Nemoto; Takuma Kano; Kaichi Ozone; Yuichiro Oka; Kohei Arakawa; Ryosuke Ito; Takanori Kokubun
2. 発表標題	Does Exception of the Infrapatellar Fat Pad Affect Spontaneous Healing of the Anterior Cruciate Ligament in a Rat Model?
3. 学会等名	Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting, Austin, TX, USA (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Kohei Arakawa; Yuichiro Oka; Takuma Kano; Yukina Nemoto; Ryosuke Ito; Takanori Kokubun
2. 発表標題	To Elucidate the Onset Mechanism of Knee Osteoarthritis Using Different Mechanical Stress Models
3. 学会等名	Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting, Austin, TX, USA (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Naohiko Kanemura , Takanori Kokubun, Yuri Morishita, Kenji Murata, Yuka Shimahara , Aya Nakajima, Yuichiro Oka, Kiyomi Takayanagi.
2. 発表標題	Gene expressions dynamics in nerve regeneration after anterior cruciate ligament injury in a rat model
3. 学会等名	12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM 2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Aya Nakajima, Kenji Murata, Yuri Morishita, Takanori Kokubun, Yuichiro Oka, Naohiko Kanemura
2. 発表標題	Improvement in joint instability reduces inflammatory pain of early degenerative knee osteoarthritis
3. 学会等名	12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM 2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 Yuri Morishita, Naohiko Kanemura, Takanori Kokubun, Kenji Murata, Kiyomi Takayanagi
2. 発表標題 Microscopic observation of a rat spontaneous anterior cruciate ligament healing
3. 学会等名 12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takanori Kokubun, H. Shono, Y. Morishita, N. Kanemura, K. Murata, T. Kano, K. Ozone, Y. Oka, H.
2. 発表標題 Integrin and Fibronectin guide bridging movement of remnants during anterior cruciate ligament spontaneous
3. 学会等名 12th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納 拓馬、国分 貴徳、村田 健児、岡 優一郎、小曾根 海知、根本 由季菜、荒川 航平、森下 佑里、西元 淳司、桑原 希望、高柳 清美、金村 尚彦
2. 発表標題 自己治癒前十字靭帯の力学的特性に対して治癒期間が与える影響
3. 学会等名 第27回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 優一郎、国分 貴徳、村田 健児、加納 拓馬、小曾根 海知、荒川 航平、西元 淳司、桑原 希望、金村 尚彦
2. 発表標題 異常関節運動制動後の運動療法は軟骨の変性を抑制する
3. 学会等名 第27回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納 拓馬, 国分 貴徳, 村田 健児, 岡 優一郎, 小曾根 海知, 森下 佑里, 西元 淳司, 桑原 希望, 高柳 清美, 金村 尚彦
2. 発表標題 損傷部位の違いは前十字靭帯の自己治癒能に影響を及ぼすか
3. 学会等名 第37回 関東甲信越ブロック理学療法士学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.spu.ac.jp/academics/db/tabid334.html?pdid=172koku https://researchmap.jp/kokubun-takanori/ http://spubasic-lab.p2.weblife.me/

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
研究協力者	村田 健児 (Murata Kenji) (30792056)	埼玉県立大学・理学療法学科・助教 (22401)	
研究協力者	加納 拓馬 (Kano Takuma)	埼玉県立大学大学院・保健医療福祉学研究科 博士後期課程・大学院生 (22401)	
研究協力者	金村 尚彦 (Kanamura Naohiko) (20379895)	埼玉県立大学・理学療法学科・教授 (22401)	