

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0411

研究課題名（和文）発生・発達のメカノバイロジを応用した前十字靭帯自己治癒機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of spontaneous healing of injured anterior cruciate ligament applying a mechanobiology mechanism of development

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） 11,700,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究構想は、前十字靭帯（Anterior Cruciate Ligament：ACL）の損傷後治癒過程における細胞成熟の不全性の解明に向け、発生生物学の知見を応用し、治癒部に凝集する未成熟な細胞を成熟に導くメカニズムの探索を行った。ACLの成熟プロセスや力学的強度の獲得プロセスなど様々な面で、ACLの発生発達は治癒過程に類似している点を有することを見出した。これらの知見は、今後損傷したACLの自己治癒を高めるための介入プロセスへ応用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前十字靭帯（Anterior Cruciate Ligament：ACL）損傷は、最も一般的な膝関節外傷の一つであり、受傷患者も多い。現状では自家腱を用いた外科的再建術が一般的な治療法として行われているが、様々な理由から非外科的治療法に対するニーズは高い。本研究では、非外科的治療における損傷ACLの治癒を高めるための科学的基盤として発生発達におけるメカノバイロジの解明から、その糸口を探索した。本研究の成果は、ACLを損傷に対し、自己治癒を目的とした保存的治療法が選択肢として提示されるための基盤的研究であり、ACL損傷患者に新たな治療選択肢を提示するための基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the developmental process of the Anterior Cruciate Ligament: ACL to apply for the spontaneous healing of a completely injured ACL. We especially focused on the cell maturing process of ACL progenitor cells in the early developmental phase in mice. Our results suggested that some developmental processes of ACL were similar to the spontaneous healing process of ACL. These results support the scientific evidence of the improvement of novel non-surgical ACL treatment after complete rupture.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：前十字靭帯 発生 発達 治癒メカニズム

1. 研究開始当初の背景

前十字靭帯 (Anterior Cruciate Ligament; 以下 ACL) は完全損傷では治癒しないとされ、現状の治療法は外科的再建術の一択である。応募者は患者ニーズに適応した治療成績の高い非外科的治療法の確立を目指し、実験動物において ACL が保存的に治癒する条件を解明した。一方、治癒した ACL に観察される未分化な細胞が十分に成熟しないという課題は残されたままとなっていた (図 1)。

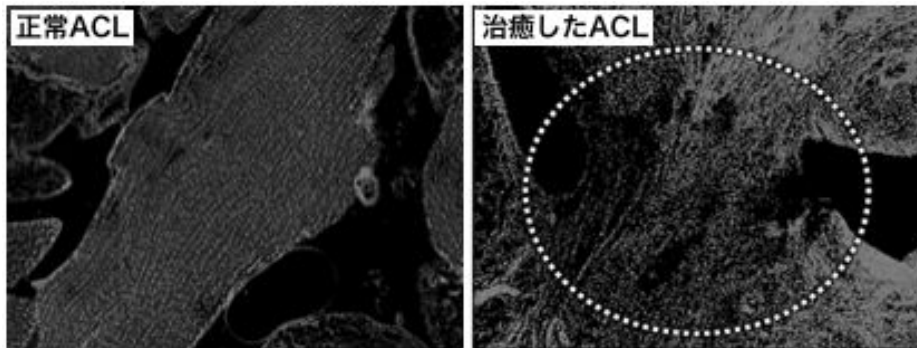


図 1 正常な ACL と非外科的に治癒した ACL の組織像比較

損傷部は再接続しているものの、治癒部には未分化な細胞が凝集しており、成熟した靭帯像を形成しているとは言い難い。

膝関節において ACL は、関節の安定化と同時に関節運動を制御するため、十分な強度を有している必要がある。これまでの成果において、自己治癒した ACL の力学的強度は、正常な靭帯の 50~70%程度であることを破断強度試験により明らかにした。正常な靭帯や腱の発生・発達過程においては、組織に対してメカニカルストレスが負荷されることで、細胞がストレスに応答し、生物学的反応が誘発されることで器官として成熟していくとされている。しかし、我々のモデルでは、異常な関節運動の制動により ACL の治癒を導いた後も、再断裂のリスクを回避するため、メカニカルストレスから保護した状態を維持してきた。

そのため、治癒した ACL の再接続した治癒部では、未分化な多数の細胞が不整なまま凝集している像が観察された (図右)。この像は、比較的長期的な治癒期間を経ても共通して観察されており、単なる時間経過では変化しないことは明らかとなっている。これらの細胞の成熟には、適切なタイミングにおける適切なメカニカルストレスの付与が必要であると考え、基課題のテーマとして設定した。以上の仮説に基づき、現状の実験では、損傷からの回復程度を見極めながら運動を開始するデザインを採用しているが、不十分な治癒段階では再断裂に繋がるため、タイミングの見極めが重要となる。適切にメカニカルストレスを負荷するタイミングを見極めるためには、未分化な細胞が ACL へと成熟していく際のメカノバイオロジー機構を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究構想では、腱や靭帯の発生生物学の著名な研究者との国際共同研究により、筋骨格系の発生生物学の知見と研究技術を治癒 ACL の成熟過程の理解に応用することで、自己治癒能が低いとされる ACL の生物学的特性を解明し、臨床応用へ向けた基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

C57BL/6 の胎児期から生後早期を対象とした。胎児期を対象としては、筋骨格系が形成されていく胎生 11 日前後を基準として、経時的に筋骨格系が形成されていく過程を組織学的に分析するとともに、ACL がいかなる過程で形成されていくのかについて、一般染色および in situ hybridization 等により因子の局在も含め観察を行なった。

ACL が強度を獲得していく過程については、生後のマウスを対象として実験を行った。生後 7, 14, 21 日目 (P7, 14, 21) の C57BL/6 マウスの膝関節を採取し、力学試験にて ACL, MCL の力学的強度と破断部位を記録した。ACL の力学的強度が、他の靭帯の力学的強度の獲得過程と異なる違いを有するのかを比較するため、内側側副靭帯 (Medial Collateral Ligament: MCL) を同時に採取し、力学試験の検出を行った。また同時期の構造的解析を行うため、一部組織は固定・脱灰の処理後に凍結ブロックを作成、その後 12 μ m 厚の凍結切片を作成し、組織学的解析にて ACL と MCL の形態を評価した。

4. 研究成果

正常なマウスの ACL 発生過程では、胎生 14.5 日の胎児マウスでは膝関節内に未分化な細胞が充満しているのみであるが、この時点において既に関節内に局在する細胞集団が、ACL と ACL が接続する大腿骨および脛骨の形態形成に向け細胞遊走が始まっていることを示唆する像が観察された。この時期は、筋腱複合体の形成も始まっているタイミングであり、骨格筋が収縮能を既に獲得しているタイミングであることから、関節運動が行われている可能性がある。タイミングとしては、関節運動とこれら細胞の分化に関係がある可能性を示す結果といえることができるが、その直接的な関係性の解明には、今後の探索が必要である。

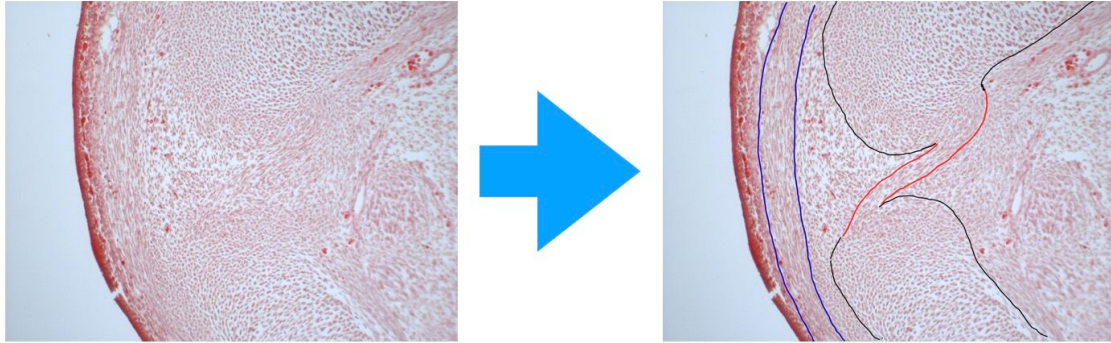


図2 胎生 14.5 日目のマウス膝関節構造

一見無秩序な細胞の凝集に見えるが、一部の細胞は分化へ向けた反応を示していることがわかる。

これに対し、生後 0 日の乳児マウスになると、ほぼ正常な ACL の靭帯形状を示目していることが観察された(図 3)。周辺の細胞も各組織への分化へ向けた遊走を開始しており、明瞭な ACL 構造が観察されている。このタイミングに前後における四肢の関節運動を分析するため、胎生期における四肢の運動と、生後の四肢の運動および四肢にかかる負荷量を計測した。結果として、胎生 17-19 日の後期においては、スペース的問題から明確な四肢の運動は観察されず、出生後に四肢運動が急激に増加することが明らかとなった。この変化は、関節内靭帯である ACL の発生・発達においては極めて重要な意味を持っていると考えられる。すなわち、胎生 14 日前後の細胞がやや無秩序に空間を埋めている状態から、出生 0 日の ACL が形作られる発生過程においてはまだには、関節運動が寄与している可能性は限定的であり、メカニカルストレス以外の因子が影響を及ぼしていることを示唆している。

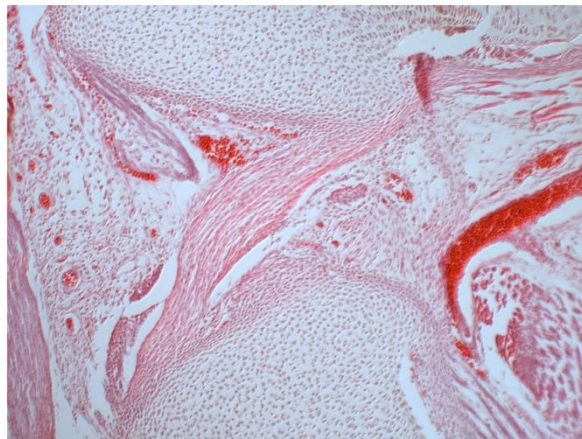


図3 出生 0 日目におけるマウスの膝関節 ACL

胎生期から数日ほどで、完全なほぼ成人に見られるような ACL 構造が観察された。

生後の ACL の分析においては、P7 の ACL と MCL では高密度な核凝集が観察され、P14、21 に従い核密度の減少、平行な核配列が観察された (図 4)。加えて、時間経過とともに核の配列が整然とし、かつ靭帯の強度獲得に重要な細胞外マトリクス (Extra-Cellular matrix: ECM) が占める割合が増加している像が観察された。この時期は、マウスが身体運動を徐々に獲得していく時期であり、四肢にかかるメカニカルストレスと関節運動が増加するタイミングであり、これらが ACL の成熟に寄与している可能性が示唆された。また P7 で不明瞭であった骨端線は P21 までに明瞭に観察される状態へと変わっていた。

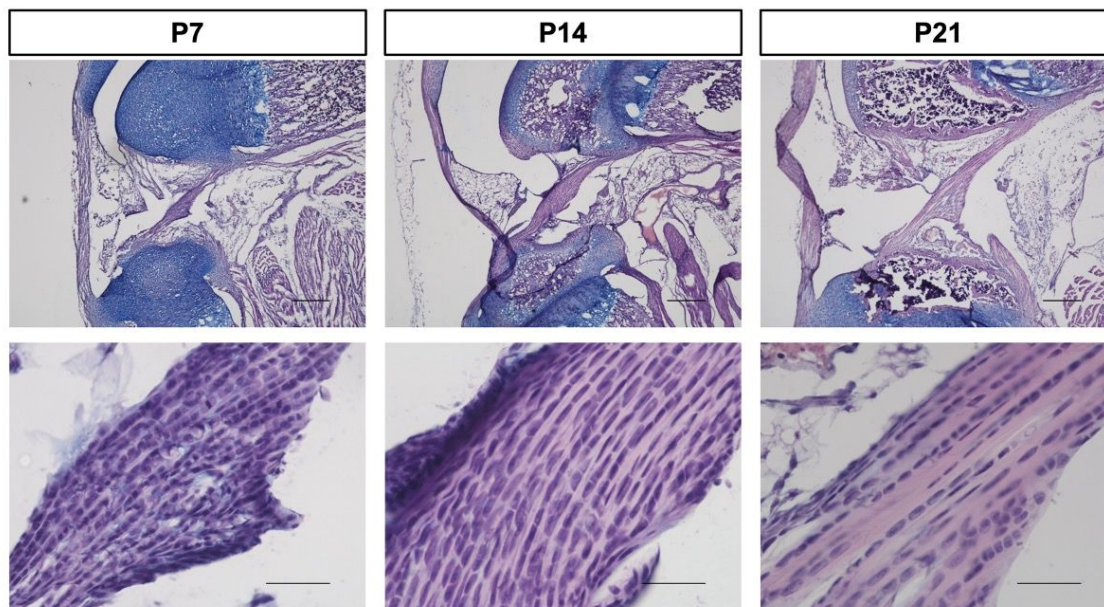


図 4 生後 7、14、21 日目におけるマウスの膝関節 ACL の組織像

生後 7 日から、21 日目にかけて、核の配列が制限と整理され、細胞外マトリクスの占める割合が増加していることが観察される。

力学試験では発達とともに MCL の力学的強度が上昇した一方で、ACL の力学的強度は変化を認めなかった (表 1)。しかし ACL 力学試験では、多くのサンプルが骨端線で剥離し、ACL よりも骨端線部の力学的脆弱性を認めた。先行研究では、発達期の ACL は MCL に比べ、早期に太い靭帯が形成されることが示されている。これを本研究結果と統合すると、発達期の力学的な成熟は ACL の方が早く、骨・軟骨部よりも高い力学的応答を有する可能性が示唆された。

表 1 生後 7、14、21 日目におけるマウスの ACL と MCL の力学的強度

	P7		P14		P21	
	Load to failure (N)	Failure location	Load to failure (N)	Failure location	Load to failure (N)	Failure location
Sample 1	0.285	MCL	0.928	MCL	1.165	MCL
Sample 2	0.425	MCL	0.403	MCL	1.136	MCL
Sample 3	0.275	MCL	0.326	MCL	1.359	MCL
Sample 4	0.322	MCL	0.483	Tibia	0.819	MCL
Average	0.327 N		0.552 N		1.120 N	
	P7		P14		P21	
	Load to failure (N)	Failure location	Load to failure (N)	Failure location	Load to failure (N)	Failure location
Sample 1	0.535	ACL	0.553	ACL	2.333N	Femur
Sample 2	0.600	ACL	1.193	Femur	2.21N	Femur
Sample 3	0.564	Femur	1.015	Tibia	2.688N	Femur
Sample 4	0.941	Tibia	0.931	Femur	2.329N	Tibia
Sample 5	0.881	Femur	-	-	-	-
Average	0.568 N		0.553 N		-	

この間の ACL の力学的強度は、P7 : 0.65 ± 0.22 N (n=2), P14 : 0.55 N (n=1) であったが、P21 は全て ACL ではなく大腿骨・脛骨骨端線で剥離した (2.39 ± 0.21 N)。MCL の力学的強度は、P7 : 0.23 ± 0.07 N (n=4), P14 : 0.55 ± 0.27 N (n=3), P21 : 1.12 ± 0.22 N (n=4) であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Usami Yuna, Iijima Hirotaka, Kokubun Takanori	4. 巻 --
2. 論文標題 Exploring the Role of Mechanical Force on Tendon Development in vivo Model: a Scoping Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ResearchSquare	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） 10.21203/rs.3.rs-1681832/v1	査読の有無 無
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 宇佐美 優奈、船越 逸生、国分 貴徳	4. 巻 25
2. 論文標題 発達に伴うメカニカルストレスの変化はアキレス腱の組織成熟に関与する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 基礎理学療法学	6. 最初と最後の頁 18～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24780/jjptf.JJPTF_2021-6	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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Usami Y, Kokubun T
2. 発表標題 Physical Movement Related To Tendon Development During Embryo To Postnatal Mice
3. 学会等名 ORS 2023 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saito R, Aizawa Y, Usami Y, Arakawa K, Enomoto S, Kokubun T
2. 発表標題 Increasing Mechanical Stress in the Spontaneous Healing Process of Completely Ruptured Anterior Cruciate Ligament Does Not Inhibit Ligamentation in a Mouse Model
3. 学会等名 ORS 2022 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斉藤陸, 中山和己, 宇佐美優奈, 国分貴徳
2. 発表標題 自己治癒過程の前十字靭帯に対する運動介入効果の性差
3. 学会等名 第31回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山和己, 高島啓, 斉藤陸, 国分貴徳
2. 発表標題 老齡マウスモデルにおける非侵襲的前十字靭帯切断に対する異常関節運動制動の有用性
3. 学会等名 第31回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斉藤陸, 相澤幸夏, 宇佐美優奈, 荒川航平, 榎本沙彩, 国分貴徳
2. 発表標題 損傷前十字靭帯の自己治癒過程におけるリハビリテーションは靭帯治癒を阻害しない
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法士学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤陸, 宇佐美優奈, 国分貴徳
2. 発表標題 損傷前十字靭帯自己治癒モデルマウスにおける大腿四頭筋萎縮の解明
3. 学会等名 第10回日本運動器理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Usami Y, Kokubun T
2. 発表標題 The mechanical force generated by limb movement depending on the environment affects tendon development during the embryo to neonatal phase
3. 学会等名 the 55th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇佐美 優奈, 国分貴徳
2. 発表標題 損傷前十字靭帯の保存的治癒確立へ向けた前十字靭帯発生・発達過程の組織学的解析
3. 学会等名 第40回 関東甲信越ブロック理学療法士学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Usami Y, Saito R, Enomoto S, Aizawa Y, Funakoshi H, Kokubun T
2. 発表標題 The Relationship Between Mechanical Change and Morphological Differentiation of Anterior Cruciate Ligament Development
3. 学会等名 ORS 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y.Usami, K.Takahata, K.Arakawa, K.Murata, N.Kanemura, D.Pal, B.Pryce, R.Schweitzer, T.Kokubun
2. 発表標題 The Influence of Mechanical Force on Embryonic and Postnatal Tendon Development
3. 学会等名 ORS 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇佐美優奈、高畠啓、船越逸生、国分貴徳
2. 発表標題 マウスアキレス腱複合体の胎生期から生後早期におけるメカニカルストレスと成長関連因子発現の関係
3. 学会等名 第29回 埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇佐美 優奈、荒川 航平、米野 萌恵、高橋 花奈、高畠 啓、船越 逸生、村田 健児、金村 尚彦、国分 貴徳
2. 発表標題 マウスアキレス腱複合体の発達におけるメカニカルストレスと成長関連因子発現の関係
3. 学会等名 第25回 日本基礎理学療法学会
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