

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03306

研究課題名（和文）前十字靭帯治癒過程の細胞外マトリクス合成機序解明と促進するリハビリテーション開発

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Extra-Cellular-Matrix during Spontaneous Healing of Injured Anterior Cruciate Ligament and Development of the Accelerating Rehabilitation

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、これまで不可能とされてきた前十字靭帯損傷に対する保存的治療法の確立へ向け、実験動物モデルにより課題となってきた治癒したACLの力学的強度を正常靭帯に近づけるためのリハビリテーション介入の基盤確立を目指した。ACLに限らず、治癒過程の靭帯は脆弱性を有しているため、強靭化のための介入が逆に再断裂などの有害事象を誘発する可能性があるため、治癒経過の仔細な分析から運動介入の実施タイミングとその強度について検討を行った。結果として、治癒組織が比較的安定する損傷後4週時点からの運動介入は、ACLの有害事象を引き起こさず、治癒靭帯における細胞外マトリクスの主成分であるコラーゲンの配向を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治癒過程のACLに対するリハビリテーションが、一定の強靭化効果を有することを明らかにした本研究成果は、完全損傷ACLを受傷しながらも非外科的治療を模索する患者において、治癒を目指した保存的治療法を選択する上での希望となりうる成果である。また学術的な視点からも、ACLに限らず損傷後の治癒メカニズムが十分には解明されておらず、治癒能が低いとして治癒を目指した非外科的治療法が治療の選択肢となっていない関節周囲組織は多い。保存的には治癒しないとして長らく非外科的治療が忌避されてきたACLの治癒に関する本研究成果は、低治癒能とされる関節周囲組織の非外科的治療法確立へ向けた基盤となるデータとなりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effect of rehabilitation intervention during the spontaneous healing process of completely ruptured Anterior Cruciate Ligament (ACL). While healing ligament, not only the ACL, has a weakness depending on the healing process, so we carefully determined the start timing and the intensity of exercise during ACL healing. Consequently, the four-week post-injury healing tissue got enough maturity to resist mechanical stress. The exercise during the remodeling phase induced alignment of collagen fibers, which is the main component of the healed ligament, and led to the recovery of mechanical properties compared to no-exercise healing ACL. Our results partially suggested that mechanical stress, depending on the exercise, contributes to the regain of the mechanical strength of healing ACL.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：前十字靭帯損傷 自己治癒 細胞外マトリクス リハビリテーション メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯 (Anterior Cruciate Ligament; 以下 ACL)は、骨構造上不安定な膝関節において、最も重要な静的安定化機構である。よって運動時には大きな力学的ストレスにさらされ、スポーツ傷害が高頻度に発生する。スポーツでの膝関節靭帯損傷のほぼ半数は ACL 損傷といわれ、米国では年間 10 万件以上発生し、治療費は 20 億ドル以上と推定されている。これまで ACL 損傷は、アスリートの傷害という側面が強かったが、近年では患者年齢層が拡大しており、それとともに比較的活動量の低い中高年以上の患者で理学療法を中心とした保存的治療のニーズが高まっている。さらにこれは、高齢化に伴いスポーツに興じる高齢者が増加することで拡大することが予想される。現状では、損傷 ACL は自己治癒能が低く、完全断裂した場合は自己治癒しないとされている。さらに ACL 損傷を放置すると半月板損傷や軟骨損傷などの二次的損傷が生じる。そのため、現状の治療選択はハムストリングスや膝蓋腱などの自家腱を用いた外科的再建術が一般的となっている。しかし、外科的再建術に関しては自家腱採取部の疼痛の長期残存や、筋力低下などの二次的な機能障害が報告されている。また、ACL 損傷を経験した患者の 60~90% が、その後変形性膝関節症に移行すると報告されているが、再建術による外科的介入はこの変形性膝関節症のリスクをさらに高める可能性も指摘されている。これらの再建術に伴うリスクは、特に中高年以上の患者にとって致命的なものになりうる。以上より、リスクの低い損傷 ACL を治癒に導く保存的治療法と、その後の理学療法を中心とした、患者自身の負担が少ない非外科的治療法確立が求められている。

上述したように、現状では完全断裂後の ACL は自己治癒しないというのが臨床上の一般的な見解であり、この理由について実験動物を対象とした先行研究では、関節包内の血流量の不足やコラーゲン線維の含有率、治癒に関連する Transforming Growth Factor- (TGF-) や smooth muscle action (SMA) の発現量など、関節包内の特殊な環境から ACL が治癒しない要因について多く報告されてきた。これに対して、Ihara らは臨床研究において、ACL 損傷患者に装具を用いて膝関節に対する力学的ストレスをコントロールすることで ACL が自己治癒することを明らかにした。これを元に我々は、実験動物を対象として ACL 完全断裂後に生じる異常関節運動という関節包外因子に着目し、脛骨の前方変位を制動することで完全損傷した ACL を自己治癒に導くことができるモデルを確立した。このように ACL は完全損傷した場合でも一定の条件下では自己治癒することが明らかとなっている。しかし、これまでの動物実験では自己治癒した ACL の力学的強度は正常 ACL の 50~70%程度と低く、治癒した ACL の再接続部分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ている。このように自己治癒した ACL の組織特性は不十分であることが明確であるが、これらの特徴は、単なる時間経過では改善しないことも明らかとなっている。特に力学的強度の低下は保存的治療法の確立に向けた大きな課題となるが、自己治癒した ACL の成熟メカニズムは未解明である。

この課題を解決するためには、保存療法においても外科的再建術後と同様に ACL 治癒後のリハビリテーションが重要になる。靭帯・腱治癒に関する動物実験では、治癒した内側側副靭帯 (MCL) への伸張ストレスが靭帯強度を改善するとの報告や、棘上筋腱縫合術後の適切な運動介入は腱の強度や成熟度を改善するとの報告がある。このように一般的に治癒後の組織に対する適切なメカニカルストレスは靭帯・腱の力学的強度や成熟度を改善する。よって、ACL 自己治癒後の適切なリハビリテーション介入は ACL の治癒・成熟を促進し、力学的強度を改善できると予測される。さらに ACL 再建術後のリハビリテーションでは、術後早期からのモビライゼーションや荷重負荷によって関節拘縮や筋力低下などの二次的機能障害を抑制できることが報告されている。そのため、ACL 治癒後のリハビリテーションでも同様に、二次的機能障害を予防・改善する効果が期待できる。しかし、自己治癒過程にある脆弱な組織に対する過剰なリハビリテーションは治癒不全や再損傷のリスクを伴う。棘上筋腱を対象とした動物研究においても、組織損傷後および術後早期の荷重負荷や過度な運動介入は組織の回復を遅延させ、変性を惹起することが明らかとなっている。よって ACL 自己治癒後のリハビリテーションにおいては、開始するタイミングとその強度等を慎重に検討する必要があるが、現時点ではリハビリテーション研究はほとんど行われておらず、そもそも運動を中心としたリハビリテーションが自己治癒過程の ACL にどのような効果をもたらすのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ACL 自己治癒モデルマウスを対象として、リハビリテーション介入が治癒 ACL にもたらす影響を組織学的および力学的視点から探索した。特に、治癒靭帯の強靭化において最も重要となる細胞外マトリクス合成を促進する上で最適なメカニカルストレスの設定に向け、我々が確立した損傷 ACL の治癒モデルに対する運動介入プログラムの開発と、その効果を探索した。これにより、リハビリテーションによる治癒 ACL の再断裂リスクおよび ACL の成熟度・

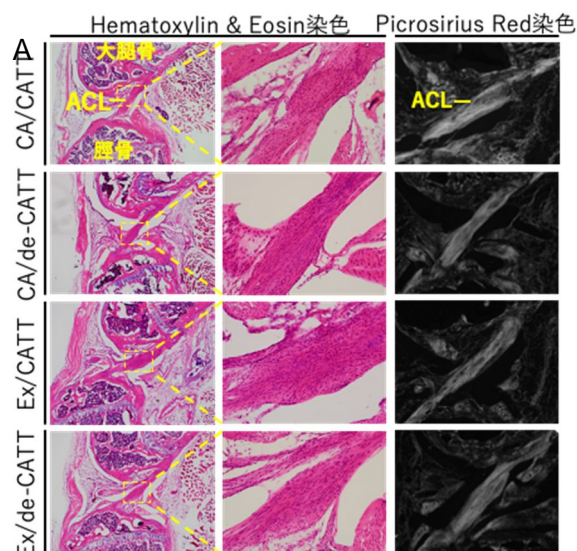
強度に対する介入効果を明らかにすることを目的とした。本研究で得られた知見によって、損傷 ACL の自己治癒過程におけるリハビリテーションプログラムの確立に向けた、基準となる基礎的データを提供できる。

3. 研究の方法

対象は、8 週齢の雌性 C57BL/6 マウスとした。全てのマウスの右後肢に対して、ACL の切断、および先行研究で ACL が自己治癒することが明らかとなった脛骨前方変位制動術(Controlled Anterior Tibial Translation; CATT)を施行した。ACL の切断方法は、予備実験にて損傷後の脛骨前方変位量を検証し、ばらつきが少ないことが確認され確立された手法を採用した。深麻酔として三種混合麻酔を腹腔内投与 (10mL/kg) した後、膝関節屈曲位とし、大腿骨を徒手的に後方に押し込むことで ACL を切断した。ACL 切断後、脛骨前方引き出しが誘導されることを徒手的に確認した。その後、異常な脛骨前方変位を制動する(CATT)ため 25 ゲージ針を用いて大腿骨顆部後方と脛骨近位部前方に骨孔を形成し、3-0 ナイロン糸をループ状に通すことで脛骨の前方変位を制動した。なお CATT によって関節運動は制限されず、脛骨の前方変位が制動されたことを徒手的に確認した後、皮膚を閉創した。CATT 後の飼育環境は、気温 23℃、12 時間サイクルで明暗とし、餌や給水は自由に摂取できる条件下のもと、運動制限は設けなかった。ACL 切断後、4 週時点でマウスを 4 群に無作為に分類した (各群 n=8)。ケージ内で通常飼育を行い、CATT を継続した通常飼育/脛骨前方変位制動 (Cage Activity/Controlled Anterior Tibial Translation; CA/CATT) 群、ケージ内で通常飼育を行い、CATT を除去した通常飼育/制動除去 (Cage Activity/de-Controlled Anterior Tibial Translation; CA/de-CATT) 群、週 3 日の運動介入を行い、CATT を継続した運動介入/脛骨前方変位制動 (Exercise/ Controlled Anterior Tibial Translation; Ex/CATT) 群、週 3 日の運動介入を行い、CATT を除去した (Exercise/de-Controlled Anterior Tibial Translation; Ex/de-CATT) 群。全てのマウスは ACL の切断後 8 週時点で炭酸ガスの吸入、頸椎脱臼法にて屠殺し、大腿骨骨幹部以遠を切り離すことで膝関節の採取を行った。なお、ACL の切断および CATT の介入を実施していない左後肢を正常 ACL として同様に組織採取を行い各解析に使用した。

4. 研究成果

HE 染色では、全ての群で ACL の連続性が確認された。その一方で、核配列に関しては正常群では核が ACL 長軸方向に平行に配列しているが、他の 4 群では核が不均一に凝集している組織像が共通して観察された(図 1-A)。靭帯の成熟度を示すグレースケールは、正常群: 165.921 ± 5.076、CA/CATT 群: 103.5 ± 20.8、CA/de-CATT 群: 117.4 ± 17.4、Ex/CATT 群: 149.3 ± 22.2、Ex/de-CATT 群: 141.5 ± 15.9であった。正常群が最も高く、次いでトレッドミルを実施した Ex/de-CATT、Ex/CATT 群、そして CA/de-CATT、CA/de-CATT 群の順に高い傾向を示したが、5 群間に有意差は認めなかった(図 1-B)。



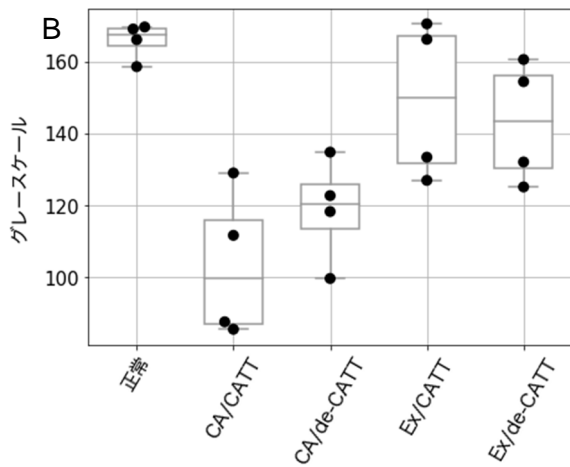


図1 染色像と Picrosirius Red 染色グレースケール結果

脛骨前方変位量は、正常群： $0.34 \pm 0.10\text{mm}$ ，CA/CATT 群： $1.13 \pm 0.19\text{mm}$ ，CA/de-CATT 群： $1.22 \pm 0.20\text{mm}$ ，Ex/CATT 群： $1.02 \pm 0.25\text{mm}$ ，Ex/de-CATT 群： $1.03 \pm 0.37\text{mm}$ であり，正常群の脛骨前方変位量が低い傾向を示したが，有意差は認めなかった(図2)。

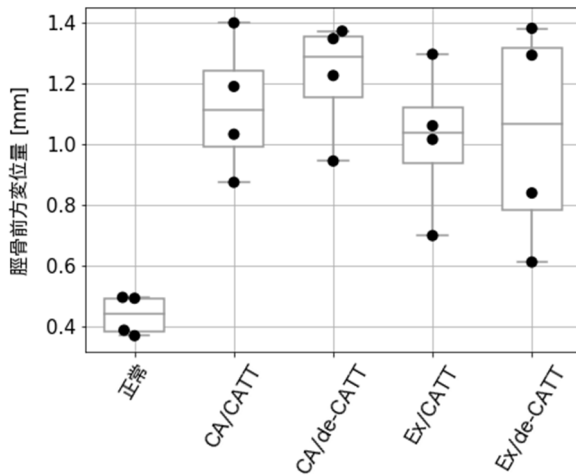


図2 脛骨前方変位量

ACL の破断強度は，正常群： $7.48 \pm 1.66\text{N}$ ，CA/CATT 群： $2.03 \pm 0.68\text{N}$ ，CA/de-CATT 群： $2.44 \pm 0.86\text{N}$ ，Ex/CATT 群： $2.43 \pm 0.64\text{N}$ ，Ex/de-CATT 群： $4.20 \pm 0.48\text{N}$ であり，正常群が最も高く，次いで Ex/de-CATT 群で高い傾向を示したが，有意差は認めなかった。

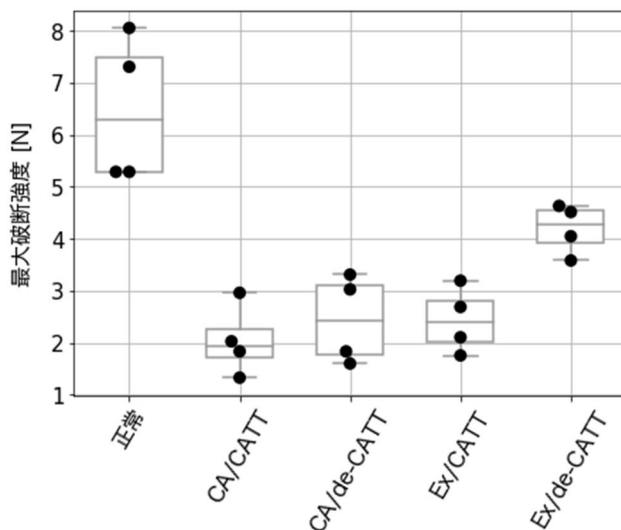


図3 ACL 最大破断強度

以上から、本研究では、ACL が自己治癒したマウスに対して脛骨前方変位制動(CATT)の除去およびトレッドミル運動という二つの方法で ACL へのメカニカルストレスを増加させる介入を実施し、ACL の組織学的・力学的特性を評価した。二つの介入の目的は、以下の通りである。CATT の除去は、ACL が自己治癒したのちに脛骨前方変位を制動していたナイロン糸を除去したことで、ACL に本来付与される脛骨前後変位に伴うメカニカルストレスを増加させることを目的とした。またトレッドミル運動は、実験動物を対象とした研究において一般的な運動介入方法で、自由飼育環境下と比較してランニング時間が増加し、膝関節運動が頻回となることで治癒 ACL へのメカニカルストレスを増加させることを目的とした。この2種類のリハビリテーション介入を組み合わせることで、治癒 ACL に対してメカニカルストレスの質と強度の異なるリハビリテーション介入を実施し、ACL の組織学的および力学的特性がどのように変化するか検証した。その結果、本研究では全てのマウスで ACL の再接続が確認され、運動によるメカニカルストレスの強度が最も高い Ex/de-CATT 群においても ACL の成熟度や力学的強度の低下などの有害事象は認めなかった。また正常 ACL と比較すると、リハビリテーションを実施した治癒 ACL では、力学的強度が 40~60%程度で、不整な核配列の組織像が認められた。これは、リハビリテーション介入を実施していないラットモデルでの先行研究と同程度の回復であった。この点からも、本研究で実施したリハビリテーション介入は ACL の治癒を促進するには不十分であった。しかし同時に、ACL へのメカニカルストレスが単なる時間経過での回復を阻害するものではなかったことを示している。よって、少なくとも損傷後4週時点での治癒 ACL は一定以上の強度回復が担保されており、この時点でのリハビリテーション介入は ACL の治癒・成熟を阻害しないことが明らかとなった。

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 斉藤 陸、相澤 幸夏、宇佐美 優奈、荒川 航平、榎本 沙彩、国分 貴徳	4. 巻 49
2. 論文標題 前十字靭帯損傷モデルマウスの自己治癒過程におけるリハビリテーション介入は靭帯治癒を阻害しない	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 理学療法学	6. 最初と最後の頁 381 ~ 388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15063/rigaku.12273	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 相澤幸夏, 斉藤陸, 高島啓, 宇佐美優奈, 榎本沙彩, 国分貴徳	4. 巻 --
2. 論文標題 マウス膝前十字靭帯の損傷後自己治癒過程における関節液動態とその性差の検討	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 理学療法 - 臨床・研究・教育	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） なし	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 相澤幸夏, 斉藤陸, 高島啓, 宇佐美優奈, 榎本沙彩, 国分貴徳	4. 巻 未定
2. 論文標題 マウス膝前十字靭帯の損傷後自己治癒過程における関節液動態とその性差の検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 理学療法 - 臨床・研究・教育	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

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 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

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 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, 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 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 斉藤陸, 宇佐美優奈, 国分貴徳
2. 発表標題 損傷前十字靭帯の自己治癒過程の組織学的解析
3. 学会等名 第41回 関東甲信越ブロック 理学療法士学会
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 Saitou R, Aizawa Y, Usami Y, Arakawa K, Enomoto S, Kokubun T
2. 発表標題 Effect of Exercise and Increased Mechanical Stress on Spontaneous Healed Anterior Cruciate Ligament After Complete Rupture
3. 学会等名 ORS 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aizawa.Y, Saito.R, Takahata.K, Usami.Y, Enomoto.S, Kokubun T
2. 発表標題 Gender Differences in the Spontaneous-Healing Ability of the Complete Ruptured Anterior Cruciate Ligament
3. 学会等名 ORS 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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 自己治癒後の膝前十字靭帯に対する運動とメカニカルストレス増加が靭帯にもたらす影響
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤幸夏, 斉藤陸, 高畠啓, 宇佐美優奈, 榎本沙彩, 国分貴徳
2. 発表標題 前十字靭帯損傷後の自己治癒メカニズム解明に向けたマウスモデルの分析
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2022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 完全断裂後自己治癒した膝前十字靭帯へのメカニカルストレス増加が治癒後の靭帯にもたらす影響
3. 学会等名 第26回 日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤幸夏, 斉藤陸, 高嶋啓, 宇佐美優奈, 榎本沙彩, 国分貴徳
2. 発表標題 前十字靱帯の自己治癒能力における性差について
3. 学会等名 第26回 日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 国分 貴徳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 10
3. 書名 運動器障害理学療法学	

〔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	金村 尚彦 (Kanemura Nohiko) (20379895)	埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授 (22401)	
研究分担者	村田 健児 (Murata Kenji) (30792056)	埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授 (22401)	
研究分担者	酒井 崇匡 (Sakai Takamasa) (70456151)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	

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