

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350645

研究課題名(和文) 関節運動によるメカニカルストレスは関節痛を軽減し組織を修復できるか？

研究課題名(英文) Can the joint movement induced mechanical stress reduce pain and restore the joint tissue?

研究代表者

浅田 啓嗣 (Asada, Keiji)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授

研究者番号：10440851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜へのメカニカルストレス(MS)がどのように神経に情報伝達を行うか、滑膜細胞と後根神経節細胞の共培養システムを用い検証した。滑膜へのMSにより細胞内小胞体からのカルシウムイオン遊離とTRPV4チャネルの活性化によるカルシウムイオンの流入が生じ、滑膜から神経へカルシウムイオン依存性の情報伝達をしていることが示唆された。さらに、初期変形性関節症の治療法検討に有用なモデルとして、ラット正常膝関節に対する強制走行時の関節組織変化を組織学的に検討した。6週間の強制運動負荷で関節症様の変化が観察されなかった。適正体重での走行による関節運動は関節にとって適度なメカニカルストレスで有益であった可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The first aim of the study was to reveal any interactions of sensory mechanisms to mechanical stimulation (MS) of fibroblast-like synoviocytes (FLS) in co-culture system with dorsal root ganglionic neurons. The results suggested the possibility that the response of FLS to MS included calcium ion release from the intracellular store (endoplasmic reticulum) and calcium ion influx through the TRPV4 channels. MS of synovium may elicit any calcium ion-dependent signal transmissions from FLS to sensory neurons. The second aim of this study was to investigate the histopathological changes in rat knee joint tissue with excessive running. After running of 6 weeks, any changes like osteoarthritis were not observed. The findings indicate that joint movements with ideal weight gives a moderate stress and is beneficial to the joint.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：メカニカルストレス 滑膜 カルシウムイオン 膝関節

1. 研究開始当初の背景

関節痛は最も多くの国民が感じている痛みの症状であり、介護や支援が必要となる最大の原因と言われている。中でも膝関節痛は約 2000 万人以上の患者が訴えている重要な問題のひとつである。関節への長期にわたる過度のメカニカルストレスが原因と言われているが、疼痛発生のメカニズムは未だ明らかにされていない。関節症に対する理学療法の一つである関節運動は骨関節の位置異常の修正を行なう一種のメカニカルストレスを与える治療であるが、組織に与える影響については検証がはじまったばかりである。関節拘縮に対する温浴や関節運動の治療的介入は関節の状態次第では軟骨・滑膜組織の変性を進行させる可能性が指摘されており、効果的な治療確立には関節組織のメカニカルストレス応答メカニズムの解明が必要である。

2. 研究の目的

関節を構成する滑膜細胞と神経細胞との生理的な相互作用を解明することによって、メカニカルストレスが神経を含む関節構成組織に及ぼす影響を明らかにする。さらに関節症モデル動物を用いた検証により、疼痛軽減や組織修復を図る治療的対応の基盤確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞と神経細胞との細胞間相互作用の検証

細胞培養

生後 10 週から 12 週のマウス後根神経節 (DRG) より神経細胞を単離し、24 時間培養する。マウス滑膜細胞 (Applied Biological Materials Inc. Richmond) を 5 日間培養後、共培養としてさらに 24 時間培養する。その後、蛍光カルシウム指示薬である Fluo-3AM を負荷する。

滑膜細胞の機械的刺激による神経細胞の反応

申請者が確立した共培養細胞刺激実験システム (Asada K et al. Am J Physiol-Cell Physiol. 2012) を用い滑膜細胞に機械的刺激を加える。ガラスマイクロピペットを装着したマニピュレーターを用いて、単一細胞を直接刺激することが可能である。そのときの滑膜細胞および神経細胞に起こるカルシウム濃度変化を測定する。カルシウム濃度変化の測定は Ca^{2+} 蛍光検出解析ソフト AQUACOSMOS を使用して行う。

(2) 関節症モデル動物の検討

MRI によるヒト膝蓋大腿関節の状態把握

理学療法の効果検証には障害の程度が軽度である初期関節症モデルの構築が必要となる。膝関節痛の初期には膝蓋大腿関節の異常が関与していると考えられる。MRI にてヒト膝蓋大腿関節の状態について把握し動物

モデル作成時の参考とする。

強制走行によるモデル動物の検討

ラットをラット用トレッドミルにて強制走行させ軟骨の変性状態を確認する。1 日 1 時間、週 5 回のトレッドミル強制走行を実施する。飼育期間は 3 週間、6 週間、9 週間とし、各飼育期間終了後に膝関節を摘出し、HE 染色・サフラニン O 染色にて組織学的に観察し、モデル動物の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 滑膜細胞と神経細胞との細胞間相互作用の検証

共培養による実験結果

滑膜細胞と神経細胞の共培養において滑膜細胞に機械的刺激 (MS) を与えると、刺激された滑膜細胞内のカルシウム濃度の上昇が見られた。ついでこの滑膜細胞に軸索を伸ばしている神経軸索の反応が観察され、滑膜・神経間の求心性の反応が観察された (図 1)。

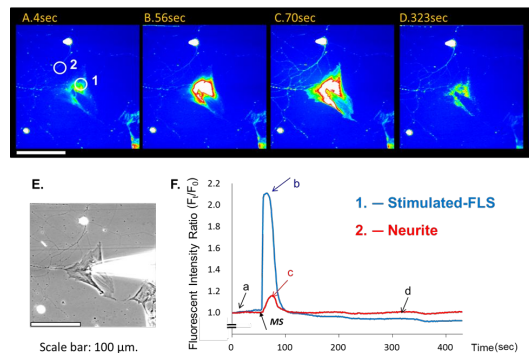


図 1：滑膜細胞の機械的刺激による DRG 細胞のカルシウム濃度の経時的変化

カルシウムフリー条件による滑膜細胞の反応

神経との相互作用メカニズムを検証するに先立ち、MS に対するカルシウムを介した滑膜細胞内シグナル伝達経路の解明に着手した。滑膜細胞は外液カルシウム存在下において複数回の MS に反応した (図 2)。

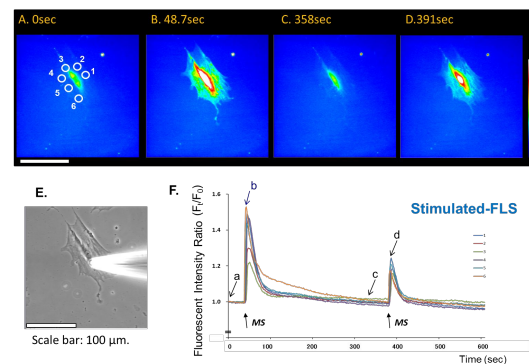


図 2：滑膜細胞の複数回 MS 時のカルシウム濃度の経時的変化

一方、カルシウムフリー条件下では初回 MS に反応するが、2 回目 MS には反応しなかった (図 3)。この結果から、MS に対する滑膜細胞内カルシウム上昇反応に細胞内小胞体からのカルシウム遊離が関わっていると考えられる。

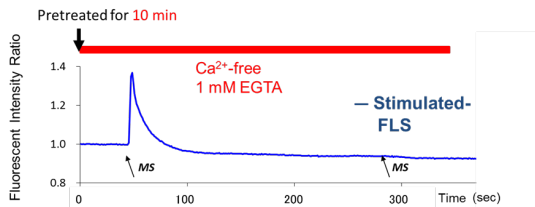


図 3：細胞外カルシウムフリー条件下における滑膜細胞のカルシウム濃度の経時的変化

滑膜細胞のカルシウムチャネルの同定

伸展活性化カルシウムチャネルブロッカーおよび電位依存性カルシウムチャネルブロッカー存在下では複数回 MS 時の反応に変化は認められなかった。TRPV4 カルシウムチャネルブロッカー投与時には 2 回目の刺激で反応は消失した (図 4)。この結果から MS に対する滑膜細胞の反応には TRPV4 カルシウムチャネルが関与していることが示唆された。今後さらに滑膜細胞のカルシウムチャネルの同定について検討が必要である。

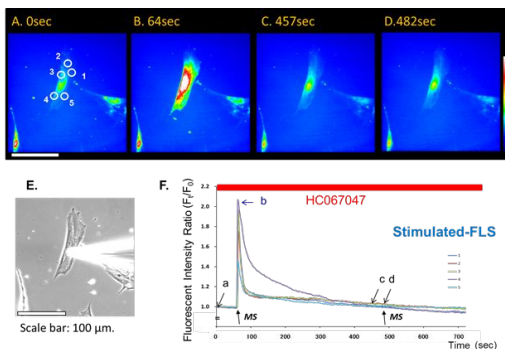


図 4：TRPV4 カルシウムチャネルブロッカー投与時の滑膜細胞の反応

(2) 関節症モデル動物の検討

MRI によるヒト膝蓋大腿関節の状態把握

膝に手術歴や著明な運動制限のない成人男女を対象に、膝関節を 0 度・30 度・60 度・90 度と屈曲させ、MRI 装置にて撮像を行った。大腿骨に対する膝蓋骨の位置を把握するため膝蓋骨を基準とした横断面像を解析した。若年群・高齢群の比較において、両群ともに膝蓋骨は屈曲 30 度で大腿骨顆間溝のほぼ中央に位置し、60 度、90 度と屈曲するに従い、より外側に偏位する傾向が見られたが有意な差は見られなかった。膝蓋軟骨容積、大腿骨前脂肪体において高齢群は若年群に比べ有意に減少していた ($p < 0.05$)。加齢による膝蓋軟骨量や脂肪組織の減少があっても、

歩行などの日常運動を継続することで膝蓋大腿関節機能を維持できると考えられた。

強制走行によるモデル動物の検討

ラット用トレッドミルにて強制走行の結果、全てのラットで疼痛を示唆するような走行異常は観察されなかった。体重変化率は運動群で低い傾向を示した (図 5)。いずれの飼育期間においても、全ての部位で対照群と運動群の軟骨および滑膜所見に著明な差はなく、関節症様の変化は認められなかった (図 6、7)。強制走行負荷により関節症様の変化が得られるとされる先行研究とは異なる結果であった。要因として、動物種の違い、週齢の違いに加え、体重の違いが考えられた。適正体重での走行による関節運動は関節にとって適度なメカニカルストレスであり有益であることが示唆された。

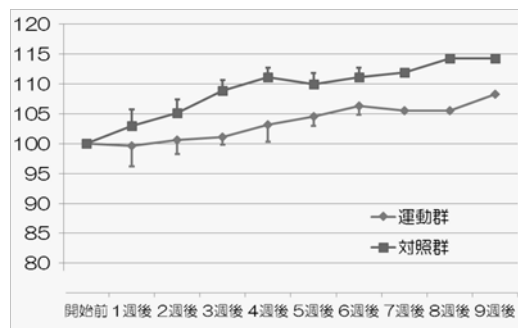


図 5：強制走行中のラットの体重変化

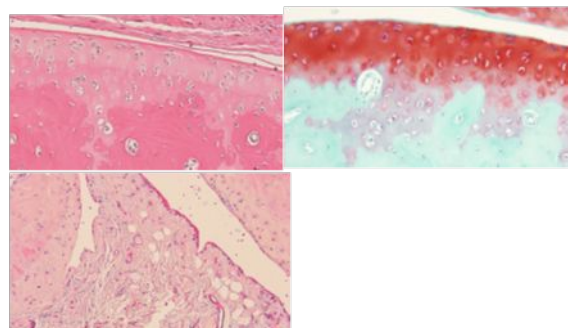


図 6：対照群 6W 軟骨および滑膜の所見、 $\times 200$ 、左上段：軟骨 HE 染色、右上段：軟骨サフラニン O 染色、下段：滑膜 HE 染色

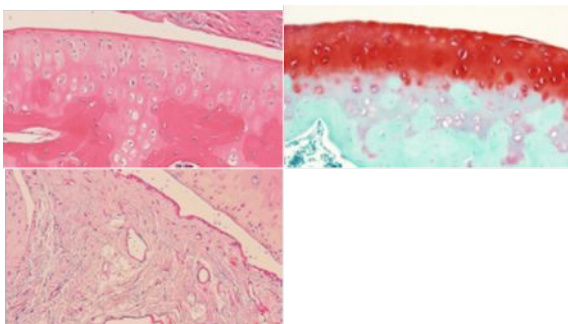


図 7：運動群 6W 荷重部の軟骨所見、 $\times 200$ 、左上段：軟骨 HE 染色、右上段：軟骨サフラニン O 染色、下段：滑膜 HE 染色

関節症動物モデルの検討

強制走行では関節症様の関節変化が得られなかったため、理学療法効果の検証に適したモデルを再検討するため、外科的・化学的誘発モデルによる組織変化を比較した。

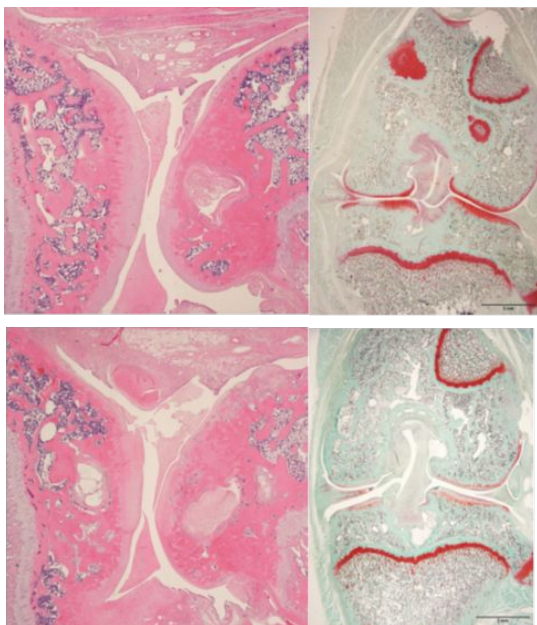


図8：外科的・化学的誘発モデルの所見
上段：内側半月靭帯切除モデル（DMMモデル）、下段：モノヨード酢酸投与モデル（MIAモデル）、左：HE染色、右：サフラニンO染色

モノヨード酢酸投与モデル（MIAモデル）では内側・外側とも同程度、広範囲に軟骨基質の染色性低下が観察された。内側半月靭帯切除モデル（DMMモデル）では限局して染色性の低下を認めた。強制走行モデル以外の各モデルは概ね先行研究と同様の結果が再現できた。軟骨の損傷程度はDMMモデルが軽微であった。DMMモデル作成後、軽度の歩行（走行）負荷により、関節症進行を予防できたことが報告されている。一方、MIAモデルは走行負荷により関節症進行が加速することが報告されている。これらの走行負荷と今後検討する理学療法介入による負荷を単純に比較することはできないが、実験動物を用いて、理学療法介入と関節症病態進行との関係を検討する場合には、DMMモデルが適しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計9件）

浅田 啓嗣：運動器障害と疼痛 変形性膝関節症の疼痛の理解と対策。理学療法みえ 2，印刷中，2015。査読無

浅田 啓嗣，川村 和之：変形性膝関節症に対する徒手療法のエビデンス。徒手

理学療法 15，101-108，2015。査読有。
渡邊 晶規，小島 聖，細 正博：組織学的見地からの関節拘縮の病態と徒手理学療法。徒手理学療法 14，51-57，2014。査読有。

渡邊 晶規，小島 聖，日比野至，他：不動化により膝関節構成体の強度は低下する。組名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学編 3，1-7，2015。査読有

Satoshi Kojima, Masahiro Hosono, Masanori Watanabe, Taro Matsuzaki, Itaru Hibino: Experimental joint immobilization and remobilization in the rats. J Phys Ther Sci. 26, 865-871, 2014. doi: 10.1589/jpts.26.865 査読有

浅田 啓嗣：高齢者の姿勢異常に対する評価と理学療法 メカニカルストレスの適正化。理学療法兵庫 20，29-34，2014。査読有

Taro Matsuzaki, Shinya Yoshida, Satoshi Kojima, Masanori Watanabe, Masahiro Hosono: Influence of ROM exercise on the joint components during immobilization. J Phys Ther Sci 25, 1547-1551, 2013. doi: 10.1589/jpts.25.1547. 査読有

小泉 宗久，重松 英樹，岩田 栄一郎，倉 知彦，奥田 哲教，田中 康仁：腰椎固定術後の隣接椎間変化 矯正デバイス使用の有無に関して。中部日本整形外科災害外科学会雑誌 56，991-992，2013。査読有

Kei Goto, Go Kato, Isao Kawahara, Yi Luo, Koji Obata, Hiromi Misawa, Tatsuya Ishikawa, Hiroki Kuniyasu, Junich Nabekura, Miyako Takaki: In Vivo Imaging of Enteric Neurogenesis in the Deep Tissue of Mouse Small Intestine. PLoS One 8. e54814, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0054814. 査読有

〔学会発表〕（計20件）

渡邊 晶規，浅田 啓嗣，小島 聖，細 正博：理学療法介入効果検証に向けたラット変形性膝関節症モデルの検討。第51回日本理学療法学会大会，2016年5月27日，札幌コンベンションセンター，札幌

Keiji Asada, Yasuhiko Morimoto, Yu Okumura, Miyako Takaki: Calcium imaging of dorsal root ganglionic neurons and fibroblast-like synoviocytes to mechanical stimulation in co-culture system. 第93回日本生理学会大会 2016年3月24日，札幌コンベンションセンター，札幌
浅田 啓嗣：運動器障害と疼痛（招待講

演). 第 27 回三重県理学療法学会, 2016 年 3 月 13 日, 鈴鹿医療科学大学, 鈴鹿
渡邊 晶規, 浅田 啓嗣, 小島 聖, 細正博: 強制走行がラット膝関節組織に与える影響第 8 回日本運動器疼痛学会, 2015 年 12 月 13 日, 名古屋国際会議場, 名古屋
渡邊 晶規, 小島 聖, 浅田 啓嗣, 細正博: 変形性膝関節症の進行における加齢の影響. 第 2 回日本基礎理学療法学会 学術集会 日本基礎理学療法学会第 20 回学術大会 合同学会, 2015 年 11 月 14 日, 神奈川県立保健福祉大学, 横須賀
浅田 啓嗣, 森本安彦, 高木 都: 共培養系による滑膜細胞・神経細胞間相互作用の解析. 第 25 回日本病態生理学会大会, 2015 年 8 月 2 日, 愛媛大学城北キャンパス, 松山
森本安彦, 浅田 啓嗣, 高木 都: 骨芽細胞と神経細胞の共培養実験系における相互作用について. 第 25 回日本病態生理学会大会, 2015 年 8 月 1 日, 愛媛大学城北キャンパス, 松山【奨励賞受賞】
Asada Keiji, Kitaoka Hitomi, Okada Keita, Nagai Kazuki: Patellofemoral kinematics during knee flexion in healthy younger and older adults. 第 50 回日本理学療法学会学術大会, 2015 年 6 月 6 日, 東京国際フォーラム, 東京
Kojima Satoshi, Masanori Watanabe, Hoso Masahiro: The effect of cryotherapy for the prevention of contracture. The World Confederation for Physical Therapy Congress 2015 (国際学会), 2015 年 5 月 1 日~4 日, Suntec, Singapore
Masanori Watanabe, Kojima Satoshi, Hoso Masahiro: Histopathological changes in joint components in a rat knee joint contracture model following low-intensity pulsed ultrasound. The World Confederation for Physical Therapy Congress 2015 (国際学会), 2015 年 5 月 1 日~4 日, Suntec, Singapore
浅田 啓嗣: 高齢者の脊柱変形に対するアプローチ. 和歌山理学療法連盟研修会 (招待講演) 2015 年 2 月 22 日, 和歌山国際厚生学院, 和歌山
有田圭吾, 浅野木葉, 岡田穂菜美, 富田康博, 土居伸匡, 仲本大晃, 浪上愛, 廣垣智也, 穴山直人, 北岡ひとみ: MRI を用いた膝蓋大腿関節の加齢に伴う影響. 第 7 回中部放射線医療技術学術大会, 2014 年 11 月 1 日, 名古屋国際会議場, 名古屋
浅田 啓嗣, 北岡ひとみ, 高木 都: 膝関節屈曲角度変化に伴う膝蓋骨挙動の加齢変化. 第 24 回日本病態生理学会大会, 2014 年 8 月 9 日, 北九州国際会議場,

北九州

渡邊 晶規: 組織学的見地からの関節拘縮の病態と徒手理学療法. 第 19 回日本徒手理学療法学会学術大会 (招待講演). 2014 年 3 月 16 日, 鈴鹿医療科学大学, 鈴鹿

加納 志穂, 小林 豊典, 浅田 啓嗣, 廣垣 智也, 穴山 直人, 北岡 ひとみ: 膝関節屈曲角度変化に伴う膝蓋骨側方挙動 MRI による測定. 第 19 回日本徒手理学療法学会学術大会, 2014 年 3 月 16 日, 鈴鹿医療科学大学, 鈴鹿
浅田 啓嗣, 小泉 宗久, 小畑 孝二, 高木 都, 田中 康仁: 共培養実験系における骨芽細胞と神経細胞の細胞間相互作用. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013 年 10 月 17 日~18 日, 幕張メッセ, 千葉.

Asada Keiji, Kotoura Terumasa, Furubayashi Chihiro, Kawasaki Yuri, Nagaiwa Mizuki, Ogawa Taihei, Kawamura Kazuyuki: Compensatory lumbopelvic rotation during hip external rotation in individuals with and without low back pain. The 12th international congress of Asian confederation for physical therapy, 2013 年 9 月 5 日~9 日, Taichung, Taiwan
Masanori Watanabe, Satoshi Kojima, Itaru Hibino, Masahiro Hoso M: The effect of ROM exercise on prevention of ROM limitation and histopathological changes in rat. The 12th international congress of Asian confederation for physical therapy, 2013 年 9 月 5 日~9 日, Taichung, Taiwan

浅田 啓嗣, 小畑 孝二, 高木 都: 骨組織の機械的刺激は知覚神経を活性化する?. 第 23 回日本病態生理学会, 2013 年 8 月 4 日, 東京慈恵医科大学, 東京
浅田 啓嗣, 川村 和之, 前原 由貴, 尾崎 圭吾, 鈴木 正人, 松田 実友貴: 膝関節屈曲位における膝蓋骨位置評価とその有用性. 2013 年 5 月 24 日~26 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 啓嗣 (ASADA, Keiji)
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授
研究者番号: 10440851

(2) 研究分担者

高木 都 (TAKAKI, Miyako)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 00033358

小泉宗久 (KOIZUMI, Munehisa)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：80382307

渡邊 晶規 (WATANABE, Masanori)
名古屋学院大学・リハビリテーション学
部・准教授
研究者番号：60460549

北岡ひとみ (KITAOKA, Hitomi)
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・助教
研究者番号：00410936

(3)連携研究者

田中康仁 (TANAKA Yasuhito)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30316070