

損傷靭帯自己治癒メカニズムの解明

埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科 博士論文

指導教員 金村尚彦 教授

2020年3月

1891006 森下 佑里

要約

第1章：序論

膝関節の安定性は主に4本の靭帯によって得られるがその内の1本が脛骨の前顆間区から大腿骨外側顆の内側面に走る前十字靭帯 (Anterior Cruciate Ligament: ACL) である。ACLは膝関節の矢状面の安定化に重要な役割を果たし、主に脛骨の前方移動と内旋、さらに膝関節の内反、外反、過伸展を抑制し、膝関節の安定化を担っている。

ACL損傷はスポーツ活動中に発生することが多く、特にバスケットボールやサッカーといった競技での発生が多い。主な受傷機転としては、膝関節の外反、過伸展、脛骨の過内旋を含んだ動作であり、非接触型による受傷が多い。我が国におけるACL損傷の発生率については、中高生を対象とした研究において年間0.81/1000人であると報告されているが、世界的に見ても発生率は年々増加傾向にある。ACL損傷後の膝関節は関節不安定性が増大し、放置すると関節内組織に不可逆的な変化が生じ、結果として我が国の代表的な膝関節の運動器疾患である変形性膝関節症を惹起する要因となりうる。そのため、効果的な治療法が必要である。ACL損傷に対する治療法としては、損傷前のACLに沿って大腿骨-脛骨の骨孔に自家膝蓋腱や自家ハムストリングスを関節内に移植する外科的再建術が主流である。その背景には、滑液の存在や血液供給、scaffoldの欠如といった要因によりACLの治癒能力が低いとされてきたことが挙げられる。しかし、外科的再建術を行っても約2割の患者に関節不安定性が残存するといった報告や、小児や中年以降のACL損傷者は予後を考慮して適応とならない場合が多いといったデメリットも存在する。一方、複数の臨床研究において、ACL損傷後に生じる関節不安定性を制御する装具の使用や膝関節の固定といった非観血的な保存療法により靭帯が自己治癒することが報告されている。さらに、我々の研究室でも動物モデルを用いてACLが自己治癒することを報告し、損傷後急性期からの運動学的介入がACLの自己治癒に重要であり、分子生物学的応答に影響を与えることを報告した。

保存療法によるACL自己治癒が報告されているにもかかわらず臨床において保存療法が普

及していない要因には、ACLが自己治癒しない靭帯であると未だに考えられていることや、治癒に至るまでの回復過程や治癒メカニズム、治癒靭帯の強度、再断裂のリスクなどが明らかになっていないことがあげられる。しかし、保存療法は外科的再建術のように対象者を限局せず、損傷後すぐに提供できる治療法であるため、再建術を念頭に入れている対象者に対しても第1選択として提供できる可能性は十分にあると考える。

本研究は、ACL自己治癒メカニズムの解明に向け、生化学的解析を用いてACL自己治癒を誘引する因子の探索、組織学的解析を用いてACLの自己治癒に貢献する細胞の探索及び自己治癒靭帯の特徴と機能の検証を行なった。メカニカルストレスの変化が細胞内シグナル伝達に影響する過程では創傷治癒関連遺伝子の発現が増加し、その後の細胞応答では間葉系幹細胞が損傷ACLの断端に帰着し線維芽細胞へと分化すると仮説立てた。

第2章：ACL自己治癒を誘引する因子の探索

メカニカルストレスの変化が遺伝的反応に影響を与える過程で、どのような創傷治癒関連遺伝子がACL自己治癒を誘引しているのかを明らかにすることを目的とし、創傷治癒関連遺伝子の発現を網羅的に調査した。異常な関節運動を制動することで細胞増殖因子やコラーゲン合成に関わる因子が増加すると仮説立てた。Wistar系雄性ラットを対象とし、Sham群、ACL切断後異常な関節運動を残存させた（Anterior Cruciate Ligament Transection: ACLT）群、ACL損傷後異常な関節運動を制動した関節包外関節制動（Controlled Abnormal Movement: CAM）群を作製した。外科的介入後、各群1週、2週時点で屠殺、サンプルを採取し、生化学的解析としてPCR Arrayによる多遺伝子発現解析を実施した。その結果、1週時点において細胞表面受容体のIl6st、2週時点において炎症性サイトカイン&ケモカインのCxcl1、ECMリモデリング酵素のFga、Mmp1、F13a1、成長因子のCsf3、Igf1、Egf、Hgf、TnfがACLT群とCAM群に有意な群間差を認めた。本研究で用いたACLT群とCAM群は、術侵襲、術後の身体活動、痛み群間差はなく、関節運動学的条件の違い、つまりメカニカルストレスの違いが遺伝子発現に影響していると言える。1週時点においてIl6stはCAM群で増加した。これは、Il-6の増加に伴う反応だけでなくJAK-STAT3経路や下流の因子の影響を受けている可能性がある。2週時点において炎症性サイトカイン&ケモカインのカテゴリーであるCxcl1はCAM群で増加した。この結果は、好中球などの免疫細胞を誘導し炎症の遷延を引き起こしているのではなく、血管新生に関与している可能性があると推察される。また、ECMリモデリング酵素のカテゴリーに含まれるFga及びMmp1はCAM群で増加、F13a1はCAM群で減少した。これらの結果は、一見ACL治癒を阻害しうる結果

に見えるが、2週時点のCAM群ではすでにACLの再連続性が獲得されていることを踏まえるとこれらの発現変化はACL治癒を促進するために必要な発現変化の結果であると推察される。さらに、成長因子であるCsf3, Igf1はCAM群で増加したのに対し、Egf, Hgf, Tnfは減少した。このから、関節制動により抗炎症性作用が働き慢性炎症が抑制され、靭帯が治癒しているため線維芽細胞の増殖よりも組織成熟が促されている可能性があると考えられる。

第3章：ACL自己治癒に貢献する細胞の探索と自己治癒した靭帯の特徴と機能の検証

メカニカルストレスの変化が細胞内シグナル伝達を経て、その後の細胞応答としてどのような細胞がACL治癒を促すのか、さらに再連続性を得たACLが靭帯としての特徴・機能を再獲得しているのかを明らかにすることを目的に、組織像にて観察される細胞の評価及び自己治癒靭帯と正常靭帯のコラーゲン組織における成熟を調査した。間葉系幹細胞等の細胞が損傷ACL断端に帰着、線維芽細胞へ分化し、ACL再連続性獲得、コラーゲン合成と成熟により靭帯としての機能を再獲得すると仮説立てた。Wistar系雄性ラットを対象とし、Sham群、ACLT群、CAM群を作製した。外科的介入後、各群1週、2週時点で屠殺、サンプルを採取し、組織学的解析としてHematoxylin Eosin (HE) 染色、Aldehyde Fuchsin Masson Goldner (AF-MG) 染色、Immunohistochemistry (IHC) 染色を実施した。

ACLの自己治癒に貢献する細胞の探索では、HE染色にて先行研究と同様にCAM群でACLの再連続性が観察され、ACLの自己治癒が確認された。IHC染色の結果、遺残靭帯やその周囲の細胞集団はCD68, P4HB, CD31, CD73, CD90, CD271の陽性所見を示し、CD45は陰性であった。CD68はA型滑膜細胞やマクロファージを、P4HBはB型滑膜細胞や線維芽細胞を検出するマーカーである。また、CD73, CD90, CD45は細胞表面マーカーであり、CD73, CD90, CD105が陽性、CD34やCD45が陰性であれば間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell:MSC)であると同定される。したがって、遺残靭帯やその周囲の細胞集団には滑膜細胞や間葉系幹細胞が存在することが明らかとなった。一方、MSCには骨髓由来、滑膜由来、滑液由来、脂肪由来、筋組織由来、半月板由来、ACL由来など様々な由来のMSCが存在するが、本研究では由来組織を特定するのは困難であった。

自己治癒靭帯の特徴と機能の検証では、AF-MG染色をしたSham群とCAM群の組織像を使用し、画像解析を実施した。単位面積当たりの膠原線維の割合はSham群の平均値 $79.2 \pm 4.03\%$ 、CAM群の平均値 $97.1 \pm 2.35\%$ であり、CAM群で有意に高かった。二次元高速フーリエ変換によるコラーゲン組織の定量化では平均アスペクト比はSham群 5.984 ± 1.5084 、CAM群 2.144 ± 0.5540 であり、CAM群で有意に低かった。本研究結果から、自己

治癒靭帯は組織としては再連続性を獲得し治癒しているものの、2週時点では靭帯の組織学的特徴を完全には再獲得していないことが示唆された。

第4章：考察

本研究では「膝関節の骨、靭帯損傷が同一状態」であり「異常な関節運動に違いがある」モデルとして Sham 群、ACLT 群、CAM 群を作製した。ACLT 群と CAM 群は術侵襲、術後の身体活動、痛みに群間差はないことが明らかとなっており、関節運動学的条件の違い、つまりメカニカルストレスの異なるモデルであると言える。ACL 損傷後は脛骨の前方移動と下腿の回旋が増大する。本研究では、異常な関節運動のうち脛骨の前方移動に介入しているため、メカニカルストレスの中でも関節に負荷される剪断応力や圧縮力や、靭帯に負荷される引張力が変化していると考えられる。

ACL 自己治癒を誘引する因子の探索では、1週時点において細胞表面受容体の Il6st, 2週時点において炎症性サイトカイン&ケモカインの Cxcl1, ECM リモデリング酵素の Fga, Mmp1, F13a1, 成長因子の Csf3, Igf1, Egf, Hgf, Tnf が ACLT 群と CAM 群に有意な群間差を認めた。ACL の自己治癒に貢献する細胞の探索では、遺残靭帯やその周囲の細胞集団に CD68, P4HB, CD31, CD73, CD90, CD271 の陽性所見を観察し、CD45 は陰性であった。自己治癒靭帯の特徴と機能の検証では、単位面積当たりの膠原線維の割合は CAM 群が有意に高く、2D FFT によるコラーゲン組織の定量化では平均アスペクト比は CAM 群で有意に低かった。2週時点で ACL が自己治癒することを踏まえると、1週時点に有意な差を示した遺伝子や陽性所見を示した細胞が増殖期において ACL の自己治癒を促している可能性がある。これらの結果から、脛骨の異常な前方移動を抑制した関節運動学的条件下において炎症性サイトカインとその受容体が ACL 自己治癒を誘引し、その結果滑膜細胞や間葉系幹細胞が ACL の自己治癒に貢献する可能性が示唆された。また、自己治癒靭帯は組織としては再連続性を獲得し治癒しているものの、2週時点では靭帯の組織学的特徴を完全には再獲得していないことが示唆された。

第5章：本研究の限界と今後の展望

本研究に関する限界としては、(1)種の違い、(2)ヒト ACL 損傷とは損傷形態が異なる点、(3) ACL 自己治癒を誘引する因子に関して mRNA 発現量のみ解析である点、(4)MSC の由来組織を特定することが困難であった点、(5)画像解析上の技術的問題により陽性細胞数を半定量化することが困難であった点、が挙げられる。今後さらに多面的な検討を行なうことで、ACL の自己治癒に関する基礎データを提供し、現在の標準治療である外科的再建術のデメリ

ットを補う保存療法を臨床に普及したいと考える。

第6章：結論

本研究は、ACL 自己治癒メカニズムの解明に向け、生化学的解析を用いて ACL 自己治癒を誘引する因子の探索、組織学的解析を用いて ACL の自己治癒に貢献する細胞の探索及び自己治癒靭帯の特徴と機能の検証を行なった。その結果、脛骨の異常な前方移動を抑制した関節運動学的条件下において炎症性サイトカインとその受容体が ACL 自己治癒を誘引し、その結果滑膜細胞や間葉系幹細胞が ACL の自己治癒に貢献する可能性が示唆された。さらに、自己治癒靭帯は2週時点では靭帯の組織学的特徴を完全には再獲得していないことが示唆された。

ACL 損傷は世界的にも発生頻度が高く、医師・リハビリ関連職・トレーナー・アスリートなど多くの職種の興味の対象である。そのため、ACL が自己治癒する根拠を示す本研究は、リハビリテーション分野のみならずスポーツ分野、さらに創薬や細胞療法といった分野においても貢献できる可能性を秘めている。臨床において保存療法を新たな治療の選択肢として提供することが可能となれば、外科的再建術よりも低侵襲で対象者を限局しないため、従来外科的再建術の適応ではなかった成長期の子供や中高年者、レクリエーションレベルでの競技復帰を目指す者などより多くの ACL 損傷者の生活の質向上につながると考える。また、本研究で得られた基礎研究のデータから、臨床において ACL 損傷直後で受診した患者に対してはテーピングや装具により異常な関節運動が生じないようにすることが推奨される。また、運動療法の際は脛骨の前方移動や内旋が過度に出ないように配慮し、手術せずとも治癒する可能性があることを示すことで本研究を臨床に還元できると考える。