

滑膜マクロファージに着目した変形性膝関節症に対する
トレッドミル運動の効果に関する研究

埼玉県立大学 大学院
保健医療福祉学研究科
博士論文

2022年 3月

学籍番号 2191001

岡 優一郎

| | |
|---|-----------|
| 1. 研究の背景..... | 4 |
| 1.1. 変形性膝関節症の概要 | 4 |
| 1.2. 膝関節の構造 | 4 |
| 1.3. 関節軟骨の構造..... | 5 |
| 1.4. 変形性膝関節症の発症 | 6 |
| 1.5. トレッドミル運動による治療効果 | 8 |
| 1.6. 研究目的・仮説..... | 10 |
| 2. 研究 I：変形性膝関節症モデルマウスに対する異なる強度のトレッドミル運動 が軟骨・滑膜に与える影響 | 11 |
| 2.1. 研究の概要..... | 11 |
| 2.2. 方法 | 11 |
| 2.2.1. 倫理的配慮 | 11 |
| 2.2.2. 実験デザイン | 11 |
| 2.2.3. 飼育条件 | 12 |
| 2.2.4. モデル作成 | 12 |
| 2.2.5. 運動介入 | 13 |
| 2.2.6. 組織学的解析 | 13 |
| 2.2.7. 統計解析 | 16 |
| 2.3. 結果 | 17 |
| 2.3.1. 関節軟骨に対する組織学的検討..... | 17 |
| 2.3.2. 滑膜に対する組織学的検討..... | 21 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.4. | 考察 | 25 |
| 3. | 研究Ⅱ：変形性膝関節症モデルマウスに対するトレッドミル運動の効果とマクロファージとの関係性の検討..... | 30 |
| 3.1. | 研究の概要 | 30 |
| 3.2. | 方法 | 30 |
| 3.2.1. | 倫理的配慮 | 30 |
| 3.2.2. | 実験デザイン | 30 |
| 3.2.3. | モデル作成 | 31 |
| 3.2.4. | 運動介入 | 31 |
| 3.2.5. | マクロファージ枯渇剤の投与 | 32 |
| 3.2.6. | 組織学的解析 | 33 |
| 3.2.7. | 統計解析 | 35 |
| 3.3. | 結果 | 36 |
| 3.3.1. | 関節軟骨に対する組織学的検討..... | 36 |
| 3.3.2. | 滑膜に対する組織学的検討..... | 40 |
| 3.4. | 考察 | 44 |
| 4. | 総合的考察..... | 48 |
| 5. | 結語 | 53 |
| 6. | 謝辞..... | 54 |
| 7. | 引用文献..... | 55 |
| 8. | 補足資料..... | 71 |

| | | |
|--------|--------------------------------|----|
| 8.1. | 染色手順 | 71 |
| 8.1.1. | Hematoxylin Eosin 染色 | 71 |
| 8.1.2. | Safranin-O Fast Green 染色 | 72 |
| 8.1.3. | 免疫組織化学染色 | 73 |
| 8.2. | 使用抗体一覧 | 74 |
| 8.3. | スコアリング方法 | 75 |
| 8.3.1. | OARSI スコア | 75 |
| 8.3.2. | 滑膜炎スコア | 75 |
| 9. | 参考論文 | 76 |

1. 要旨

変形性膝関節症（膝 OA）は関節軟骨の変性を主病変とする退行性の運動器疾患である。本邦では無症候性の OA も含めると 2530 万人が膝 OA であることが明らかにされており、治療法の確立は社会的命題と言える。しかし、膝 OA に対する治療法として、薬物療法、物理療法、理学療法が挙げられるが、主病変である関節軟骨の変性を防止する疾患修飾型治療法の確立には程遠い現状がある。

理学療法的観点より、運動処方によって OA の進行を予防することを目的とした研究が散見され、適度なトレッドミル運動は軟骨変性を遅延することが実験動物を用いた研究で明らかとなっている。トレッドミル運動の効果としては、適度なトレッドミル運動は適度なメカニカルストレスとして解釈され、軟骨保護効果が説明されてきた。しかし、一般的な OA モデル動物は関節軟骨が過度なメカニカルストレスに曝され、時間依存的に OA が進行する。この状態にトレッドミル運動を実施すると関節軟骨に付加されるメカニカルストレスは増大することが推察されるが、軟骨変性は遅延する結果が得られるため、トレッドミル運動の効果をメカニカルストレスのみで解釈することには限界がある。

そこで我々は滑膜マクロファージの役割に着目した。滑膜に存在するマクロファージは炎症状態を調節し、OA の進行に深く関与する。また、他分野の研究ではトレッドミル運動によって損傷部位のマクロファージの動態が変化し、組織修復や機能改善に貢献することが明らかとなっており、膝 OA においてもトレッドミル運動時のマクロファージの動態変化が軟骨変性に影響を与えると仮説を立て、膝 OA に対するトレッドミル運動時に変化するマクロファージの動態の検証（研究 I）、マクロファージの影響を抑制した場合の膝関節の応答を検証（研究 II）した。

研究 I では、緩徐な運動を実施した群において軟骨変性が遅延しており、同時に滑膜での抗炎症因子の増加と M1 マクロファージ比の減少、M2 マクロファージ比の増加を認めた。また、高強度な運動では軟骨変性が進行し、M1 マクロファージ比の増加、M2 マクロファージの減少を認めた。

研究 II ではクロドロン酸リポソームによって滑膜マクロファージを減少させると、軟骨変性が遅延するのに対し、クロドロン酸リポソームの投与とトレッドミル運動を同時期に実施した場合、軟骨変性はむしろ進行する結果が得られた。

これらのことから、トレッドミル運動は低強度であっても、関節軟骨へ直接的に与える影響としては負の効果である可能性が高く、トレッドミル運動による軟骨保護作用を機能させるためにはマクロファージの応答が必要であることが明らかとなった。

これまで、トレッドミル運動による軟骨保護効果の因果論については議論が十分にされていなかった。本研究結果はトレッドミルを用いた全身的な運動が、滑膜における抗炎症因子を増加させ、マクロファージの機能を介して軟骨変性を遅延させるという理論の一部を支持するものであり、トレッドミル運動の効果を捉えるに当たり、メカニカルストレスだけでなく、多角的な視点を持つことの重要性を問うデータである。また、これらのデータは膝 OA 患者に対する運動療法を処方する上で、運動の種類や強度を決定するための一助となりうる。

2. 略語一覽

| | |
|--------|---|
| ACL | Anterior Cruciate Ligament |
| ACLT | Anterior Cruciate Ligament Transection |
| ADAMTS | A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs |
| HE | Hematoxylin Eosin |
| IL | Interleukin |
| KL | Kellgren-Lawrence |
| MACS | Magnetic cell sorting |
| MCLT | Medial Cruciate Ligament Transection |
| MIA | Monosodium iodoacetate |
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| MΦ | Macrophage |
| OA | Osteoarthritis |
| OARSI | Osteoarthritis Research Society International |
| PBS | Phosphate Buffered Salts |
| ROAD | Research on. Osteoarthritis Against Disability |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TIMP | Tissue inhibitors of metalloproteinases |

1. 研究の背景

1.1. 変形性膝関節症の概要

変形性膝関節症 (Knee Osteoarthritis; 膝 OA) は関節軟骨の変性を主病変とし、関節痛や運動機能障害、進行すると日常生活動作障害を引き起こす代表的な運動器疾患の一つである。大規模住民コホート Research on Osteoarthritis / osteoporosis Against Disability (ROAD) プロジェクト^{1,2)}によると臨床的に膝 OA の診断として使用される Kellgren-Lawrence (KL) 法の grade2 以上を膝 OA と定義した場合、膝 OA の有病率は男性 42.6%、女性 62.4%であった。また、高齢者ほど有病率は高く、特に女性に多いことが報告された。この結果から本邦の有病者数を推定すると、X 線で診断される膝 OA の有病者数は 2530 万人 (男性 860 万人、女性 1670 万人) となり、膝 OA の有症状患者数は 800 万人に達する。世界的に高齢社会を迎え高齢者の健康寿命の延伸、医療費削減のためには、OA の病態解明や治療法の開発が喫緊の課題であるが、現在は対症的な治療に留まっている。

1.2. 膝関節の構造

膝関節は大腿骨と脛骨による大腿脛骨関節、膝蓋骨と大腿骨による膝蓋大腿関節によって構成される。膝関節は構造的特徴から骨による安定性が欠けているため、膝関節を取り巻く数多くの筋、静的な安定化機能を有する十字靭帯や側副靭帯、大腿骨と脛骨の衝撃を吸収する半月板などの組織によって関節の安定性を高めている。また、膝関節は外側の線維膜と内側の滑膜から成る関節包に覆われており、その中は関節面の潤滑作用としての機能を持つ滑液で満たされている。

1.3. 関節軟骨の構造

関節軟骨は関節を構成する骨の表面に存在し、硝子軟骨に分類される。関節軟骨はタイドマークを境に、非石灰化層と石灰化層に大別され、非石灰化層は表面から浅層、中間層、深層に細分化され、石灰化層と合わせて4つの層状構造をとる。また、関節軟骨は70~80%の水分を含有する組織であり、海綿骨構造と相まって荷重分散・衝撃緩和作用を有するとともに、弾性変形効果により、表面保護作用も有している。水分以外の20%は軟骨細胞や細胞外基質³⁾(Ⅱ型コラーゲンやプロテオグリカン)によって構成され、コラーゲン線維は軟骨表面で表層に平行に配列し、主として引っ張り荷重に抵抗すると考えられている。プロテオグリカンは保水性に富むコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸がコアタンパク質に結合し、主として圧縮荷重に抵抗する⁴⁾とみなされている。

関節軟骨は血管、リンパ管、神経が存在しないため自己修復能が著しく低い組織である。そのため、一度変性が生じると二度と元に戻らない組織である⁵⁾と広く認知されてきた。しかし、近年では細胞シートや幹細胞の投与などの再生医療技術の発展により軟骨が修復する可能性が見出されている。

1. 4. 変形性膝関節症の発症

正常の関節軟骨は軟骨細胞から生じる基質合成因子と分解因子の釣り合いにより、関節軟骨の恒常性が維持されている。しかし、膝 OA においては関節軟骨に過剰なメカニカルストレスが加わることにより、関節軟骨構成体の合成因子に対して関節軟骨破壊因子が相対的に増加することにより、関節軟骨の変性が生じると認識されている。

Matrix metalloproteinase (MMP) や A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) などのタンパク質分解酵素活性に起因する II 型コラーゲンやプロテオグリカンを含む軟骨細胞外基質の損失は OA の特徴的な所見である^{6,7)}。MMP-1 や MMP-13 はコラゲナーゼとも呼ばれ、肥大化した軟骨細胞から誘導され、関節軟骨に多く存在する II 型コラーゲンに対して強い分解能を持つ⁸⁾。これに対し、tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) -1 を代表とする TIMP は MMP の活性を抑制する⁹⁾と報告されている。従って MMP と TIMP 活性の均衡は軟骨の変性に関わる重要な要素である^{10,11)}。また、Interleukin (IL) - 1 β や IL-6, Tumor necrosis factor (TNF) - α などの炎症関連因子は軟骨細胞死や細胞外基質の減退に大きく関与している。IL-1 β は MMP を上方制御、TIMP を下方制御すると報告されており^{12,13)}、炎症因子の抑制は OA の進行を防止するために必要不可欠である。

従来、上記に述べたように膝 OA は長期にわたるメカニカルストレスや加齢によって軟骨が欠損するといった、比較的単純な軟骨変性疾患として捉えられてきた。しかし、現在では関節軟骨、軟骨下骨、半月板、靭帯、筋肉、滑膜などの周辺組織すべてが OA の病理学的プロセスに関与する、複雑な多因子疾患として考えられるようになってきた。関節内の組織代謝の恒常性を維持するためには異化と同化のバランスが重要な鍵

となるが、現在では膝 OA には全身性および局所的な軽度の慢性炎症を伴うことが多く、これが異化と同化のバランスを崩す可能性があることが認識¹⁴⁾されている。関節軟骨に含まれる軟骨細胞は免疫系の細胞ではないにも関わらず、自然免疫に関する受容体を多く発現し、炎症性および異化性のメディエータを産生することが出来る¹⁵⁾ところからも、膝 OA と炎症の関係性の深さが伺える。

炎症に関わる組織の中でも滑膜は OA の発症・進行に大きく関与すると報告されている。滑膜マクロファージおよびマクロファージが産生するメディエータは OA における炎症および破壊反応に関して主要な役割を果たしている。マクロファージはその起源、機能およびプログラミング過程で産生される分子に応じて炎症 (M1) または抗炎症 (M2) 細胞に分極することが明らかになっている^{16,17)}。M1 マクロファージは TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインを放出することが特徴である。近年、M1 マクロファージの極性化は OA 動物モデルを悪化させることが明らかになっており¹⁸⁾、M1 表現型からのリプログラミングが OA の治療戦略として期待されている。反対に M2 マクロファージは IL-4 や IL-10 といった抗炎症性サイトカインを放出する¹⁹⁾ことが特徴である。M2 マーカーである組み換え因子を膝関節内に注射すると、イヌ実験モデル OA において骨棘や軟骨病変の発生を防ぐことができた²⁰⁾と報告されており、滑膜内での M2 マクロファージの増加が、軟骨病変の予防のための治療となり得ることを示唆した。

マクロファージはヒト OA 患者の滑液でも検出された²¹⁾。Liu ら²²⁾は膝 OA 患者の滑液では M1/M2 マクロファージの比率が健常高齢者と比較して顕著に高いことを示した。また、M1/M2 マクロファージの比率は、膝 OA 患者の KL grade と正の相関があることを示し、マクロファージ

の不均衡が OA の進行に深く関与することを示唆した。

1.5. トレッドミル運動による治療効果

膝 OA に対する治療法は大きく保存療法と観血的治療法に大別される。保存療法には筋力増強運動や関節可動域訓練などの運動療法，ヒアルロン酸注射薬や抗炎症薬などの薬物療法，超音波や温熱を代表とする物理療法がある。一方で病期が進行すると人工膝関節置換術や脛骨骨切り術といった観血的治療法が選択される。しかし現在の治療法全てが膝 OA によって生じる痛みや機能障害を改善するための症状緩和型治療法であり，膝 OA の主病変である関節軟骨の変性を防止する疾患修飾型治療法は存在しない。

これに対し，近年軟骨の変性を防止するために動物モデルを使用した基礎研究が盛んに行われている。その中の一分野として，理学療法的観点より，運動処方によって OA の進行を予防することを目的とした研究が散見される。軟骨の維持には適度なメカニカルストレスが必要であり，健常軟骨を有するラットを対象にトレッドミル運動を処方した結果，細胞外基質の合成因子の増加や炎症因子の抑制など，運動は軟骨における幅広い代謝経路に対し，強力な転写因子として働くことが示されている²³⁾。また，薬剤を投与し関節内の炎症を誘発する mono-iodoacetate (MIA) モデルを対象に運動を処方した場合も同様に運動が軟骨維持に働く因子を増加させることが報告²⁴⁾されており，中等度の運動は軟骨の変性を遅延させるという多数の報告がある²⁵⁻²⁷⁾。さらに近年では OA 化させるための外科的処置から一定期間経過し OA が発症した動物モデルに対しても，中等度の運動を処方することによって軟骨変性の進行が遅延するという報告がなされており^{28,29)}，運動の重要性が伺える。

しかし、なぜトレッドミル運動に軟骨保護効果があるのかはまだ十分に解明されていない。上記に述べたように軟骨の維持には適度なメカニカルストレスが必要不可欠であり、トレッドミル運動がその役割を担っていると考えられてきた。実験動物を用いた研究では関節内の靭帯を切断する ACLT モデル³⁰⁾や DMM モデル³¹⁾が一般的なモデルとして採用されている。これらは関節軟骨が過度なメカニカルストレスに曝され、時間経過と共に OA が発症・進行する。トレッドミル運動を実施した先行研究でもこれらの動物モデルが採用されており、上記の状態にさらに運動というストレスが付加されている。トレッドミル運動の効果としては低・中等度の強度であれば軟骨変性を抑制出来るが^{25,32)}、高強度であると軟骨の変性を助長すると報告³³⁻³⁶⁾されていることから、運動強度と軟骨変性は非線形的な関係を示す。つまり靭帯切断後未処置の OA モデル動物は過度なメカニカルストレスによって OA が進行するが、トレッドミル運動によってメカニカルストレスをさらに付加しても軟骨変性は抑制されるということから、トレッドミル運動の軟骨保護効果をメカニカルストレスのみで解釈することは困難であり、軟骨保護効果を捉え直す必要があると考えている。

我々の報告³⁷⁾では膝関節の不安定性を抑制する介入のみよりも、その状態でトレッドミル運動を実施した方が、軟骨変性を抑制するだけでなく、滑膜炎も抑制することを報告した。同様に OA モデルラットに対してトレッドミル運動を実施した場合、滑膜における炎症因子を軽減、抗炎症因子を増加させ、滑膜炎を抑制すると報告³⁸⁾されており、運動によって OA の進行に深く関与する滑膜炎を抑制することが明らかになってきている。

さらに他分野のトレッドミル運動を用いた研究では、トレッドミル運

動が脂肪組織におけるマクロファージの浸潤を抑制し、M1/M2 の比率を軽減することが報告³⁹⁾されており、末梢神経性疼痛モデルマウスに対する緩徐なトレッドミル運動は坐骨神経における IL-4 の発現率の増加と、M1/M2 の比率が軽減することを報告⁴⁰⁾している。つまり、トレッドミル運動が損傷組織のマクロファージの表現型を変化させることが明らかとなっており、OA 滑膜におけるマクロファージの表現型に関しても同様の変化が生じる可能性があると考えられる。

1.6. 研究目的・仮説

膝 OA に対するトレッドミル運動の効果として、関節軟骨に加わるメカニカルストレスよりも、滑膜マクロファージを介した炎症状態の調節による効果が大きいのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では膝 OA モデルマウスに対するトレッドミル運動の効果に関して、滑膜およびマクロファージの動態に着目し、トレッドミル運動とマクロファージの関係性を探索した。

2. 研究 I : 変形性膝関節症モデルマウスに対する異なる強度のトレッドミル運動が軟骨・滑膜に与える影響

2.1. 研究の概要

OA マウスモデルに対するトレッドミル運動の軟骨保護効果を報告したものはわずかであり、マウスに対する効果的な運動強度の検証はされていない。そこで先行研究を参考に走行速度の違う 3 種類の強度を設定し、トレッドミル運動による軟骨保護効果を検証した。更に、適度な強度のトレッドミル運動を行った時の滑膜の反応を確認するために、マクロファージの表現型の変化と滑膜炎やマクロファージの表現型に影響を与えるとされる炎症・抗炎症因子の動態についての検証を実施した。

2.2. 方法

2.2.1. 倫理的配慮

本学における研究推進委員会の承認を得た後、動物実験基本計画書ならびに動物実験実施計画書に従い、研究を推進した（承認番号 2020-3）。また、動物倫理に配慮し、統計学的解析を行うための最小限の動物を実験に供した。

2.2.2. 実験デザイン

変形性膝関節症モデルマウスに対する異なる強度のトレッドミル運動が軟骨・滑膜に与える影響 (図 1)

12 週齢 ICR 系雄性マウス 32 匹に対し ACL を切断することで軟骨の線維化や軽微な欠損が生じる早期の膝 OA を惹起させる。その後、未処置の ACLT 群と 3 種類の運動強度(Mild, Moderate, High)のトレッドミル運

動を処方した合計 4 群に振り分けた (n = 8). 4 週間の運動後, マウスの膝関節を採取し膝 OA に対する運動の効果に関節軟骨と滑膜組織に着目し検証した.

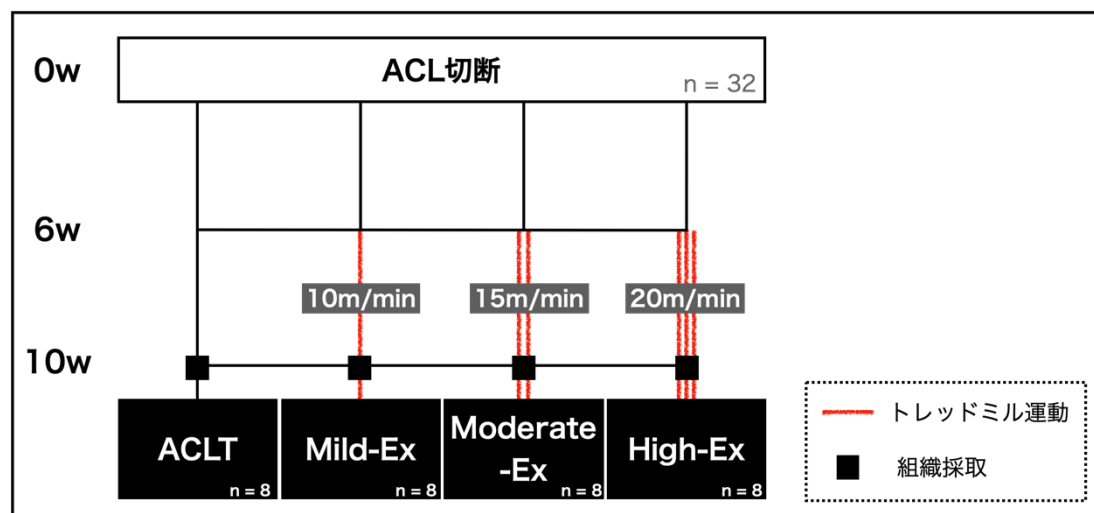


図 1 : 研究 I の実験デザイン

2.2.3. 飼育条件

全てのマウスの飼育条件として, 温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ に設定された部屋で, プラスチックゲージに 2 匹ずつ入れた. 昼夜 12 時間サイクルで明暗を管理し, 固形飼料と水は自由摂食, 運動は制限しない環境で飼育した.

2.2.4. モデル作成

イソフルラン(Mylan Seiyaku Ltd, Tokyo, JPN) にて吸入麻酔後, 三種混合麻酔薬 (ドミツール®10 ml (Nippon Zenyaku Kohgyo Co. , Ltd. Fukushima, JPN), ドルミカム注射液®10 mg (Astellas Pharma Inc., Tokyo, JPN), ベトルファール®5 mg (Meiji Seika Pharma Co. , Ltd. Tokyo, JPN) と生理食塩水を調合量 25 ml において, それぞれ 1.875

ml, 2 ml, 2.5 ml, 18.625 ml の割合で調合), メデトミジン拮抗薬 (アンチセダン®10 ml (Nippon Zenyaku Kohgyo Co., Ltd. Fukushima, JPN) と生理食塩水を調合量 10 ml において, それぞれ 0.15 ml, 9.85 ml の割合で調合) を体重 10 g あたり 0.1 ml 皮下に投与し, 深麻酔および疼痛緩和処置を行った. その後膝関節の前面を縦切開し, 膝蓋腱の内側から関節包内に侵入させた剪刀 (Muromachi Kikai Co., Ltd. Tokyo, JPN) を用いて ACL を切断した. 徒手的に脛骨を前方に引き出し, 関節不安定性が惹起されたことを確認した. ACL 切断後, 切開した関節包と皮膚を縫合糸 (Bear Medic Co., Ltd. Tokyo, JPN) で閉創した.

2.2.5. 運動介入

小動物用トレッドミル MK-680 (Muromachi Kikai Co., Ltd. Tokyo, JPN) を使用して運動介入を行った. 運動介入を行う全てのマウスはトレッドミルの機械音や電気刺激などへの環境適応期間として 1 日 30 分間, 3 m/min の速度で 3 日間の運動を課した. 運動介入はマウス OA モデルに対してトレッドミル運動を実施した我々の報告⁴¹⁾で使用したプロトコールに従い, 週 3 日, 4 週間行った. 1 日の介入時間は 30 分間とし運動強度は先行研究を参考に 10, 15, 20 m/min (Mild, Moderate, High) の 3 種類の運動強度を設けた.

2.2.6. 組織学的解析

採取した膝関節は生理食塩水にて洗浄後, 4 % Paraformaldehyde リン酸緩衝液で 24 時間, 4°C の条件で固定した. 固定後, 水道水で洗浄し, 20 % エチレンジアミン四酢酸溶液を用いて 10 日間, 4°C の条件で脱灰した (脱灰溶液は 2 日に一度交換). 脱灰終了後, 脱水・パラフィン置換

処理を行った後，パラフィンディスペンサーTEC-P-DC-J0 (Sakura Finetek Japan Co., Ltd. Tokyo, JPN) を用いてパラフィンブロックを作成した．その後，マイクロトーム ROM-380 (Yamato Kohki Industrial Co., Ltd. Saitama, JPN) にて，矢状断切片 (7 μm) を作成した．

組織切片に対し，関節軟骨を観察するために Safranin-O Fast Green 染色を Schmitz らの方法⁴²⁾に従い行った．また，滑膜を観察するために Hematoxylin Eosin (HE) 染色を実施した．染色した切片はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE Co., Osaka, JPN) を用いて撮影した．関節軟骨は OARSI によって推奨されているスコアリング法⁴³⁾に基づき，各個体 2 切片 (内側から切片を作成し，半月板が前方と後方に別れた部分を 1 切片目，その点から 84 μm 進んだ部分を 2 切片目) を評価した．OARSI スコアは Safranin-O の染色性低下や軟骨の構造変化など 8 段階 (0, 0.5, 1-6) で OA の進行度を分類する評価スケールである．滑膜は各個体 2 切片 (内側から切片を作成し，顆間窩に入り脂肪体がはっきりと確認された部分を 1 切片目，その点から 84 μm 進んだ部分を 2 切片目) を評価した．解析位置としては膝蓋下脂肪体の内側にある滑膜に対して任意の 2 箇所を撮影し，解析対象とした (図 2)．滑膜炎スコアは滑膜層の数や肥厚度，細胞浸潤度から 5 段階 (0-4) で滑膜炎を分類する評価スケール⁴⁴⁾である．評価はランダム化された組織像を 2 名の研究者が独立して採点し，平均値をスコアとした．

次に VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, CA, USA) のプロトコルに基づき，Avidin-Biotinylated enzyme Complex 法を用いて免疫組織化学染色を実施した．組織切片に対しキシレン，エタノールにより脱パラフィン処理をした．次に内在性酵素活性を除去するため，過酸化水素水 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.

Tokyo, JPN) を 0.3 %含むメタノールに 30 分間浸漬した。また、正常ヤギ血清 (Vector Laboratories, CA, USA) に 20 分間浸漬することで一次抗体の非特異結合をブロックした。関節軟骨に対しては一次抗体として抗 Gremlin-1 抗体 (ab231065 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/200) , 抗 MMP-13 抗体(ab39012 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/250) , 抗 ADAMTS4 抗体(bs-4191R ; Bioss Antibodies Co., Ltd. MA, USA 希釈濃度 1/100) を加えた。滑膜に対しては, 抗 CD68 抗体 (ab125212 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/100) , 抗 iNOS 抗体 (2977S ; Cell Signaling Technology, Inc. MA, USA, 希釈濃度 1/200) , 抗 CD206 抗体(18704-1-AP ; Proteintech Group. IL, USA, 希釈濃度 1/500) , 抗 TLR4 抗体(ab13867 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/250) , 抗 IL-4 抗体(GTX66741 ; Gene Tex Inc. CA, USA, 希釈濃度 1/100) を加えた。抗体滴下後は 4°C で管理された冷蔵庫内で 8 時間以上反応させた。二次抗体には Anti-Rabbit IgG Biotinylated Antibody (Vector Laboratories, MA, USA) を用いて 30 分間反応させた。また増感反応として VECTASTAIN ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, MA, USA) を用いて 30 分間反応させた。最後に, ジアミノベンジン (DAB) (NICHIREI BIOSCIENCE INC. Tokyo, JPN) にて発色させた。データ解析は 84 μm 間隔の 2 切片に対し, ランダムに選択された範囲での軟骨 (10000 (100 \times 100) μm^2), および滑膜 (2500 (50 \times 50) μm^2) における, 陽性細胞/Hematoxylin によって染色された核を含む全細胞を陽性細胞率として算出した。マクロファージの細胞数, M1/M2 マクロファージの比率は 3 つの連続した切片から算出した。CD68 抗体で染色した切片からヘマトキシリンによって染色された細胞に対する CD68 陽性細胞率を算出した。その数値から iNOS, CD206 抗体で染色した切片の CD68 陽

性細胞を推定し，その推定値に対する iNOS，CD206 陽性細胞の割合を M1 もしくは M2 マクロファージの割合とした．

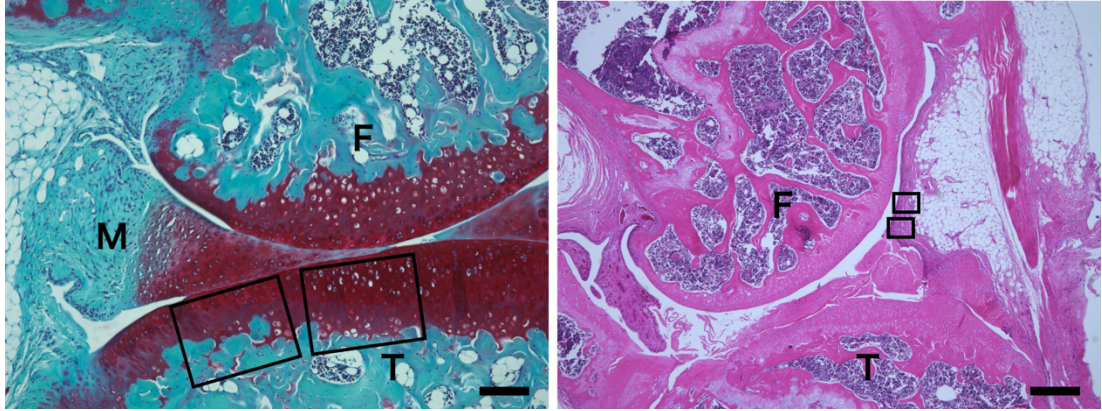


図 2 : Safranin-O Fast Green 染色 (左)，HE 染色 (右)．四角での位置を撮影対象とし，任意範囲の陽性細胞について解析を実施．

F : 大腿骨，T : 脛骨，M : 半月板，I : 脂肪体．スケールバー : 100 μ m

2.2.7. 統計解析

統計解析は，SPSS を用いた．全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った．正規性を認めた OARSI スコア，滑膜炎スコア，免疫組織化学染色による Gremlin-1，MMP-13，ADAMTS4，IL-4，TLR4 陽性細胞率のデータに対し，一元配置分散分析後，事後検定として Tukey 法を用いた．正規性を認めなかった CD68 陽性細胞数，iNOS，CD206 の陽性細胞率については Kruskal Wallis 検定後，事後検定として Steel Dwass 法を用いた．正規性を認めたデータは平均値 [95 %信頼区間] ，正規性を認めなかったデータは中央値 [四分位範囲] で示した．また，全ての有意水準は 5 %未満とした．

2.3. 結果

2.3.1. 関節軟骨に対する組織学的検討

Safranin-O Fast Green 染色による関節軟骨の組織像と OARSI スコアの分析結果を（図 3）に示す。

関節軟骨の組織像では全群において軟骨表層の不整や表層の細胞数の低下が見られた。運動強度が強い程軟骨の欠損や染色性の低下が見られ、High-Ex 群では軟骨の欠損が石灰化層に達していた。OARSI スコアによる関節軟骨の評価では、Mild-Ex 群が ACLT 群、High-Ex 群と比較して有意に低値を示した([Mild-Ex vs ACLT] ; $p = 0.022$, [Mild-Ex vs High-Ex] ; $p < 0.001$)。また、High-Ex 群は Moderate-Ex 群と比較して有意に高値を示した([High-Ex vs Moderate-Ex] ; $p = 0.006$) (ACLT 群 : 2.7 [2.4-3.0] ; Mild-Ex 群 : 1.9 [1.6-2.2] ; Moderate-Ex 群 : 2.6 [2.2-3.0] ; High-Ex 群 : 3.5 [3.2-3.8])。

次に関節軟骨に対する免疫組織化学染色の組織像と陽性細胞率の分析結果を（図 3）に示す。Gremlin-1 に関して、全群を通して非石灰化層に陽性所見を認めた。また、運動強度が強いほど多くの陽性細胞が観察された。陽性細胞率は Moderate-Ex 群は ACLT 群と比較して有意に高値を示した([Moderate-Ex vs ACLT] ; $p = 0.003$)。さらに High-Ex 群では ACLT 群、Mild-Ex 群よりも陽性細胞率が有意に高値を示した([High-Ex vs ACLT, Mild-Ex] ; $p < 0.001$) (ACLT 群 : 49.0 [43.1-54.9] % ; Mild-Ex 群 : 53.7 [50.0-57.4] % ; Moderate-Ex 群 : 62.8 [59.2-66.4] % ; High-Ex 群 : 72.5 [67.4-77.5] %)。

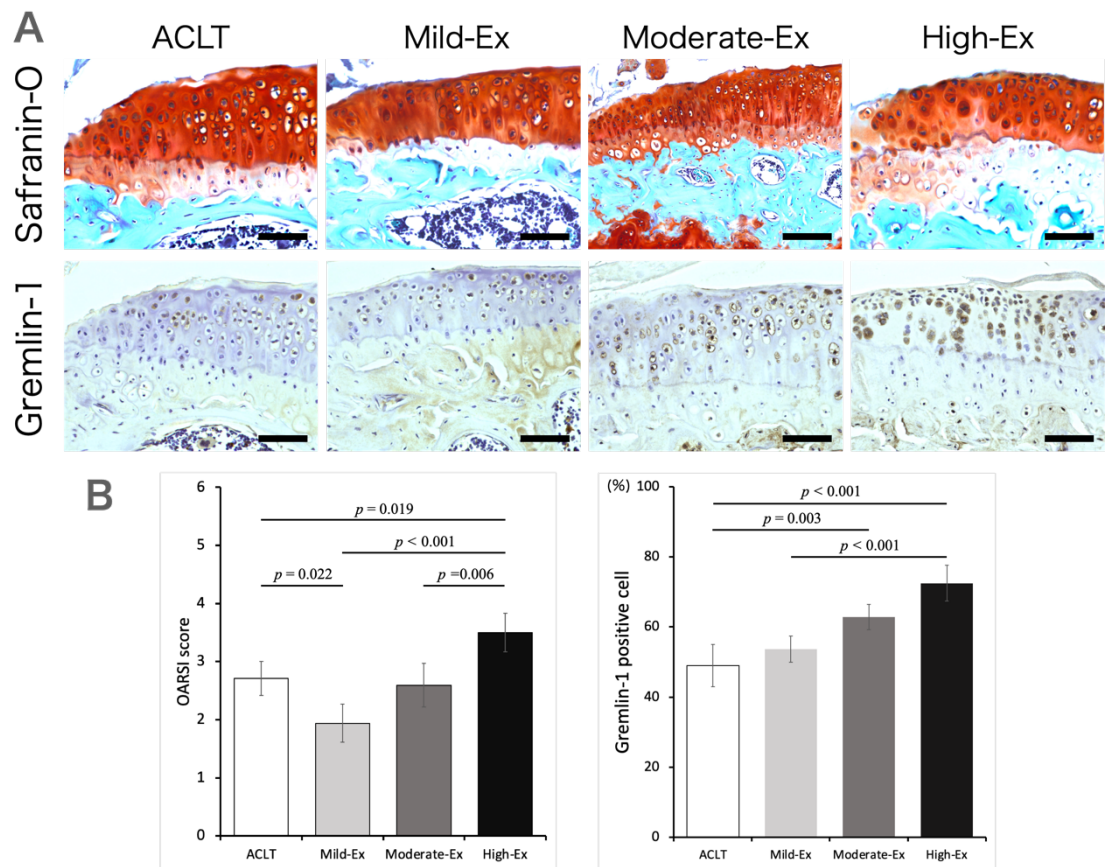


図 3 : Safranin-O Fast Green による染色像と Gremlin-1 の免疫組織化学染色による染色像 (A). 軟骨変性を評価する OARSI スコアによるスコアリング結果と Gremlin-1 陽性細胞率 (B). スケールバー : 50 μ m

次に関節軟骨に対する関節軟骨異化因子の免疫組織化学染色による組織像と陽性細胞率の分析結果を（図 4）に示す.

MMP-13 に関して組織像では Mild-Ex 群での陽性細胞があまり観察されなかった. 陽性細胞率の分析では, Mild-Ex 群が他の 3 群と比較して有意に低値を示した([Mild-Ex vs ACLT, Moderate-Ex, High-Ex]; $p = 0.004$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). また, Moderate-Ex 群, High-Ex 群は ACLT 群と比較して有意に高値を示した([Moderate-Ex, High-Ex vs ACLT]; $p = 0.001$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 48.1 [43.4-52.8] % ; Mild-Ex 群 : 35.5 [32.4-38.5] % ; Moderate-Ex 群 : 63.3 [58.1-68.4] % ; High-Ex 群 : 72.9 [68.2-77.6] %).

ADAMTS4 に関して, 組織像では Moderate-Ex 群, High-Ex 群において陽性細胞が多数観察された. 陽性細胞率の分析結果では Moderate-Ex 群, High-Ex 群の陽性細胞率が ACLT 群, Mild-Ex 群と比較して有意に高値を示した([Moderate-Ex, High-Ex vs ACLT, Mild-Ex]; $p = 0.010$, $p < 0.001$, $p = 0.004$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 51.0 [45.3-56.7] % ; Mild-Ex 群 : 46.5 [43.7-49.4] % ; Moderate-Ex 群 : 58.8 [53.9-63.7] % ; High-Ex 群 : 67.5 [64.9-70.1] %).

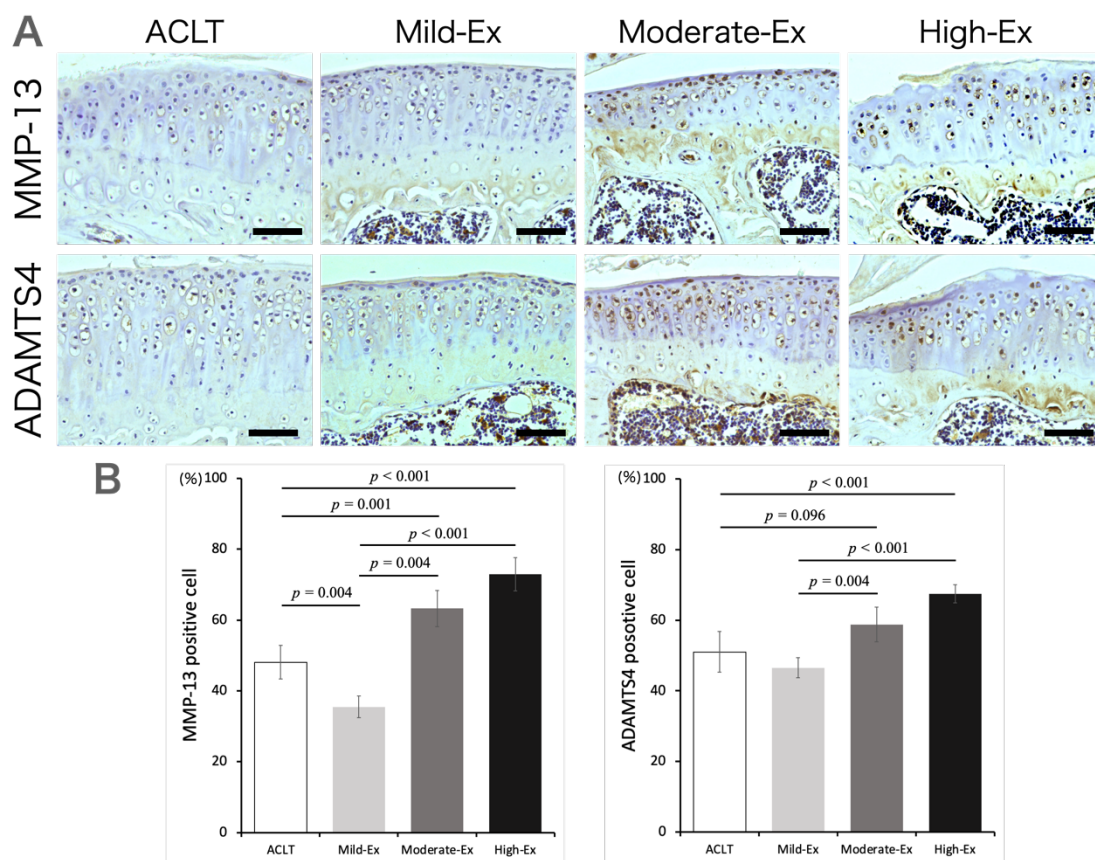


図 4 : 関節軟骨に対する MMP-13, ADAMTS4 の免疫組織化学染色による組織像 (A). MMP-13 (左図), ADAMTS4 (右図) 陽性細胞率の解析結果 (B). スケールバー : 50 μ m

2.3.2. 滑膜に対する組織学的検討

HE 染色による滑膜の組織像と滑膜炎のスコアリング結果を（図 5）に示す。滑膜の組織像では全群において滑膜組織の肥厚が確認されたが、Mild-Ex 群では滑膜の肥厚や細胞数の増加が抑制されていた。特に High-Ex 群では脂肪体との境界が不明瞭となり、脂肪体に滑膜組織が浸潤している様子が確認された。

滑膜炎のスコアリングは Mild-Ex 群が他の 3 群と比較して有意に低値を示した([Mild-Ex vs ACLT, Moderate-Ex, High-Ex]; $p < 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.003$) (ACLT 群 : 2.7 [2.3-3.0]; Mild-Ex 群 : 1.7 [1.5-1.9]; Moderate-Ex 群 : 2.6 [2.4-2.8]; High-Ex 群 : 3.2 [2.9-3.5])。)

次に滑膜に対する免疫組織化学染色の組織像と陽性細胞率の分析結果を（図 5）に示す。TLR4 に関して、陽性所見は滑膜表層の細胞に多く観察され、特に High-Ex 群では陽性細胞が多く見られた。陽性細胞率の分析では、Mild-Ex 群が他の 3 群と比較して有意に低値を示した([Mild-Ex vs ACLT, Moderate-Ex, High-Ex]; $p = 0.027$, $p = 0.002$, $p < 0.001$)。)

また、High-Ex 群は ACLT 群、Moderate-Ex 群と比較して陽性細胞率が有意に高値を示した([High-Ex vs ACLT, Moderate-Ex]; $p = 0.001$, $p = 0.011$) (ACLT 群 : 49.4 [44.4-54.3] % ; Mild-Ex 群 : 40.1 [36.4-43.8] % ; Moderate-Ex 群 : 52.9 [49.5-56.4] % ; High-Ex 群 : 63.4 [59.3-67.6] %)。)

IL-4 に関して、陽性細胞は運動群で多く観察された。陽性細胞率の分析では Mild-Ex 群、Moderate-Ex 群、High-Ex 群が ACLT 群と比較して有意に高値を示した([Mild-Ex, Moderate-Ex, High-Ex 群 vs ACLT]; $p = 0.002$, $p = 0.009$, $p = 0.003$) (ACLT 群 : 40.0 [34.7-45.4] % ; Mild-Ex 群 : 52.6 [49.3-55.9] % ; Moderate-Ex 群 : 50.5 [46.8-54.2] % ; High-

Ex 群 : 52.0 [48.7-55.2] %).

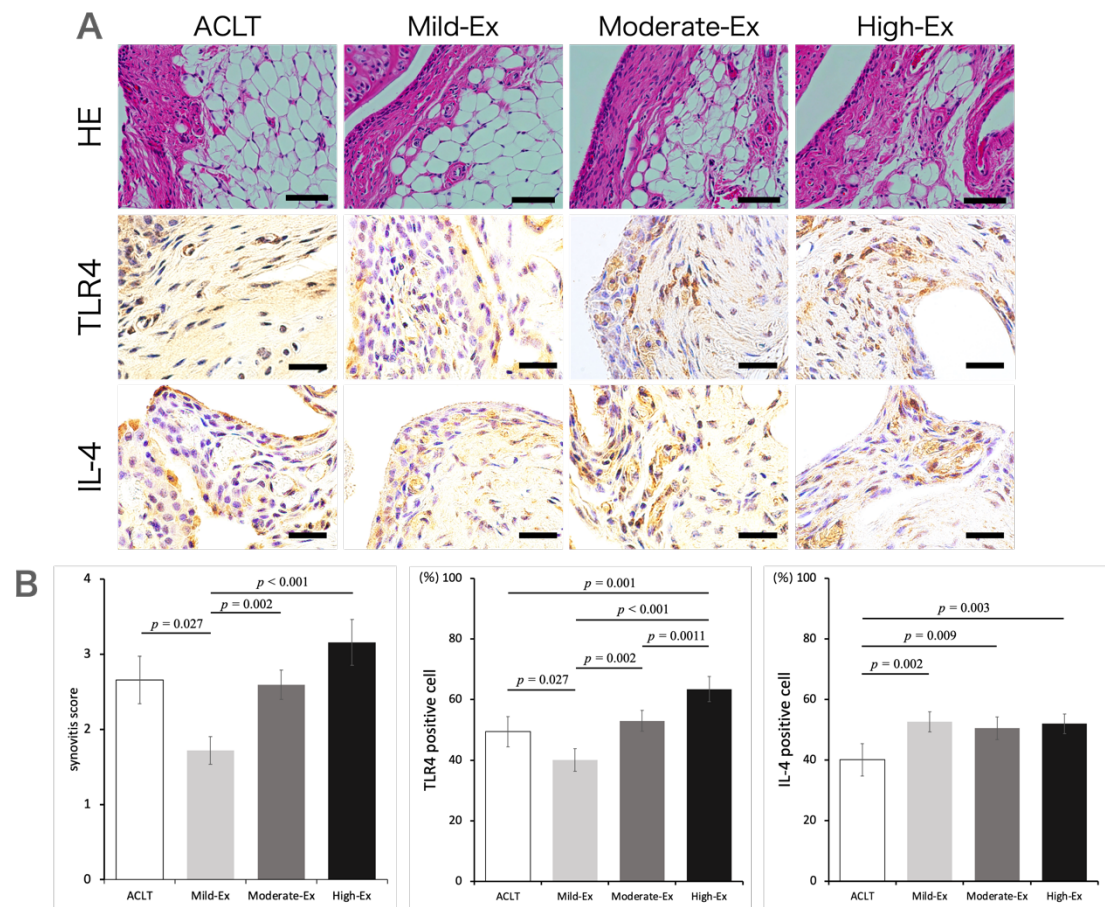


図 5 : HE 染色による滑膜の組織像と TLR4, IL-4 の免疫組織化学染色による染色像 (A). 滑膜炎のスコアリング結果 (左図) と TLR4 (中央), IL-4 (右図) の陽性細胞率の解析結果 (B). スケールバー : 上段 (50 μ m), 中・下段 (10 μ m)

次に滑膜マクロファージに関する免疫組織化学染色による染色像と陽性細胞の分析結果を(図 6)に示す. 全マクロファージを標識する CD68 の染色像は全群において主に滑膜表層で陽性細胞が観察されたが, 一部は脂肪体においても陽性所見が観察された. CD68 の陽性細胞数は 4 群間で有意な差は見られなかった(ACLT 群 : 90 [79-95] ; Mild-Ex 群 : 86 [80-109] ; Moderate-Ex 群 : 91 [85-96] ; High-Ex 群 : 91 [81-116]; $p = 0.921$).

M1 マクロファージを標識する iNOS の染色像においても陽性所見は主に滑膜表層で観察された. iNOS の陽性細胞から算出された全マクロファージにおける M1 マクロファージの割合は Mild-Ex 群が他の 3 群と比較して有意に低値を示した([Mild-Ex vs ACLT, Moderate-Ex, High-Ex] ; $p = 0.024$, $p = 0.042$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 58.9 [54.3-63.1] % ; Mild-Ex 群 : 40.1 [36.2-44.3] % ; Moderate-Ex 群 : 57.1 [54.2-59.6] % ; High-Ex 群 : 67.1 [60.2-68.2] %).

M2 マクロファージを標識する CD206 の染色像においても滑膜表層に陽性所見が多く観察された. CD206 の陽性細胞から算出された全マクロファージにおける M2 マクロファージの割合は Mild-Ex 群が他の 3 群と比較して有意に高値を示した([Mild-Ex vs ACLT, Moderate-Ex, High-Ex] ; $p = 0.027$, $p = 0.048$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 41.1 [36.9-45.7] % ; Mild-Ex 群 : 59.4 [55.7-63.8] % ; Moderate-Ex 群 : 43.0 [40.4-45.8] % ; High-Ex 群 : 32.9 [31.8-39.8] %).

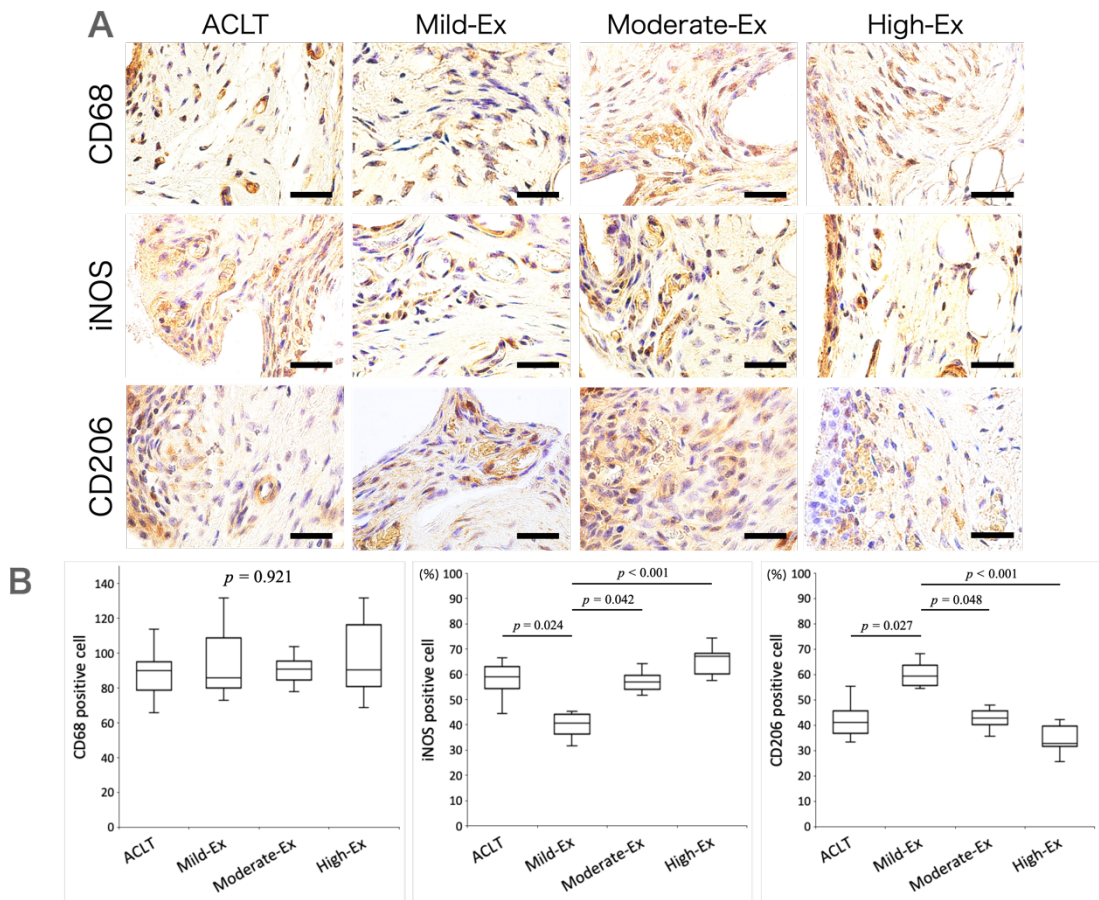


図 6 : CD68, iNOS, CD206 の免疫組織化学染色による染色像 (A). CD68 (左図), iNOS (中央), CD206 (右図) の陽性細胞率の解析結果 (B). スケールバー : 10 μ m

2.4. 考察

研究 I では早期の膝 OA モデルマウスに対して異なる強度のトレッドミル運動を行い，運動によって関節軟骨や滑膜組織にどのような反応が起きるのか検証することを目的とした．

本研究の膝 OA モデルに関して，ACLT 後 6 週時点を早期 OA モデルとした．マウス ACLT モデルを採用している Kamekura ら³⁰⁾は ACLT 後 4 週で軟骨細胞数増加や肥大細胞への変形といった組織学的変化，8 週では軟骨表層から深層までの組織学的欠損を報告しており，我々の予備的データでは ACLT 後 6 週時点で Safranin-O の染色性低下や関節軟骨表層の欠損，フィブリル化を認めた．近年 MRI 技術の進歩やバイオマーカー診断など，従来から使用されてきた単純 X 線で変性を確認できる前段階から OA の病態を捉えることができ，疾患の進行予防ができる可能性⁴⁵⁾が出てきており，Madry ら⁴⁶⁾は OA の組織病変の程度を示す OARSI スコア⁴⁷⁾の Grade3 である欠損が軟骨の中間層に満たないものを早期変形性膝関節症と定義していることからマウスモデルでは ACLT 後 6 週を早期膝 OA とした．

関節軟骨に関して，本研究で用いた強度の中で最も低負荷であった Mild-Ex 群の軟骨変性が遅延された．ラットを対象とした OA モデルに対する運動の効果を検証した先行研究では，中等度負荷のトレッドミル運動が軟骨変性を抑制すると報告されている^{24-28,38,48,49)}．運動強度に関する検証は多くの報告がなされており，結果として軟骨変性を遅延させた運動プロトコルは運動強度 12-18 m/min を 30-60 分間，週 3-7 日の範囲であり，この範囲が中等度の運動として認識されている．しかし，上記の範囲以上の強度で運動を実施した場合は軟骨変性を助長すると報告³³⁻³⁶⁾されている．ただ，OA マウスモデルを対象にトレッドミル運動を

実施した報告は少なく、我々の先行研究⁴¹⁾では 18 m/min の運動強度でトレッドミル運動を実施したところ、MMP-13 や IL-1 β と言った関節軟骨異化因子の発現が増加し、非運動群よりも軟骨変性が著明に進行するという結果を得た。この報告では、ACL が切断された異常な関節運動が生じている環境で運動を行っても軟骨変性を助長させてしまうと考察したが、マウスとラットの大きさを考慮すると 18 m/min という運動強度が適度な運動強度でなかった可能性があったため、本研究ではその点を解決するために運動強度を下げた群を設定した。その結果、運動群で最も負荷や走行距離が少ない Mild-Ex 群の軟骨変性が抑えられた。また、Mild-Ex 群では関節軟骨のマトリックス分解酵素として知られる MMP-13 や ADAMTS4 の陽性細胞率も減少しており、緩徐な運動という刺激が異化に傾いた関節内状態を是正し、軟骨変性を遅延したと言える。

しかし、緩徐な運動がなぜ OA の抑制に働いたのかという議論に関しては理解が十分にされているとは言えない。培養環境下で軟骨細胞に対し、機械によるメカニカルストレスを付加した研究では Sox9 や TGF- β といった軟骨基質合成因子の増加が多数報告⁵⁰⁻⁵³⁾され、正常ラットに対してトレッドミル運動を行った研究では炎症因子の減少や軟骨基質合成因子が増加する²³⁾ことが明らかになっている。これらの報告から、トレッドミル運動が軟骨に対する適度なメカニカルストレスとなり、軟骨変性が抑制されたと考えられてきた。

本研究では関節軟骨に対する Gremlin-1 の免疫組織化学染色を実施し、運動強度が上がるほど Gremlin-1 の陽性細胞率が高値を示した。近年、過度なストレスが関節軟骨に負荷された時の生体内の反応として、Gremlin-1-NF- κ B 経路を通じて軟骨変性が生じることが報告⁵⁴⁾された。また、この報告において Gremlin-1 は繰り返されるストレスによって軟

骨細胞や関節軟骨の非石灰化層の細胞外基質に発現すると報告し、培養条件下では強度依存的に Gremlin-1 の発現が増加することが明らかとなった。本研究では ACLT 群、Mild-Ex 群、Moderate-Ex 群、High-Ex 群と Gremlin-1 の発現率は線形的に増加しており、関節軟骨にかかるメカニカルストレスは運動強度依存的に強くなったと考えられるが、軟骨変性の重症度が非線形的な関係となった。

また、近年の OA モデルラットに対してトレッドミル運動を実施した報告³⁸⁾では、滑膜中の線維芽細胞から放出され、関節の潤滑剤として軟骨保護に重要な役割を持つとされるルブリシンが増加することが明らかとなっている。また、MIA モデルラットに対してトレッドミル運動を行った報告⁵⁵⁾では、炎症収束に関与する代表的な分子であるリポキシン A₄が増加し、これらが滑膜中のマクロファージや滑膜細胞での抗炎症活性の経路を介して、軟骨分解因子の抑制や軟骨変性の遅延を導いた可能性を示唆している。これらの報告からも運動の効果に関してメカニカルストレスのみで解釈するのではなく、他要因の関与を考慮すべきであると考えられる。

本研究では関節軟骨に併せて、滑膜に対する分析を実施した。滑膜は滑膜関節の関節包の内側を覆う組織層である。滑膜は主に結合組織と血管からなる層（滑膜下層）の上に、マクロファージ様 A 型細胞と線維芽細胞様 B 細胞によって滑膜表層が構成されている。滑膜炎は内膜の過形成、線維化、新生血管の形成を特徴⁵⁶⁾とし、関節鏡、MRI、超音波検査などから OA 関節における滑膜炎の存在が示されており、関節の構造的変化の進行を予測する因子として示唆されている^{15,57-60)}。

炎症状態の滑膜にはマクロファージ様 A 細胞、線維芽細胞様 B 細胞の他にマスト細胞など様々な種類の細胞が浸潤している。OA 滑膜の細胞

組成を調査した研究では、最も多く存在するのはマクロファージであり、次いで T 細胞およびマスト細胞であったと報告^{61,62)}されている。そのため OA に関して炎症反応において特に重要な役割を果たしているのはマクロファージであると考えられている。活性化されたマクロファージは基質分解酵素として MMP-13 や ADAMTS5, サイトカインとして IL-1 β や IL-6, 成長因子として TGF- β などを産生することが示されている^{63,64)}。

滑膜炎のスコアリングでは Mild-Ex 群の滑膜炎が抑制されており、滑膜における IL-4 の増加や炎症因子である TLR4 の減少を認めた。

Castrogiovanni ら³⁸⁾はラット OA モデルに対して、一般的な中等度の強度とされるトレッドミル運動により滑膜炎の抑制、IL-4 の増加、IL-1 β の抑制を報告しており、本研究も類似した結果となった。本研究の新規性となる滑膜におけるマクロファージの解析では Mild-Ex 群で M1 マクロファージを標識する iNOS の陽性率が低値を示し、反対に M2 マクロファージを標識する CD206 の陽性率が高値を示した。M1 マクロファージは炎症因子によって誘導され、炎症状態を助長する特徴がある⁶⁵⁾。それに対して M2 マクロファージは IL-4 や IL-13 といった抗炎症因子によって誘導され^{66,67)}、骨棘の成熟や軟骨の摩耗を防ぐ役割を持つことが明らかになっている²⁰⁾。また、他分野の研究では有酸素運動が M1/M2 比を低下させ、炎症状態を改善することも報告されている。高脂肪食肥満マウスに対して有酸素レベルのトレッドミル運動を行った結果、非運動肥満マウスと比較して、TNF- α や IL-6 と言った炎症性サイトカインの mRNA が減少しており、脂肪組織における M1 マクロファージの発現が減少し、M2 マクロファージの発現が増加したと報告³⁹⁾された。また、末梢神経損傷モデルマウスに対してトレッドミル運動を行った研究では、

IL-4 のノックアウト技術を用いて、トレッドミル運動を実施すると M1/M2 比が改善され、これには IL-4 の役割が関与することが明らか⁴⁰⁾ となった。これらの結果から、トレッドミル運動は OA 滑膜におけるマクロファージの表現型を変化させ、炎症状態にあった関節を調整し、それに続く軟骨変性を抑制した可能性が示唆される。

しかし、滑膜における IL-4 の陽性細胞率は軟骨変性が遅延しなかった Moderate-Ex 群、High-Ex 群においても増加していた。IL-4 や IL-10, IL-13 などの抗炎症因子は有酸素運動によって増加することが報告されている^{68,69)}。本研究で用いた運動強度の 10-20 m/min は有酸素運動の範囲内であり、どの群においても単球や筋組織などから放出される抗炎症因子が増加したと考えられる。運動群すべてで滑膜における抗炎症因子が増加していたにも関わらず、Mild-Ex 群の軟骨変性が遅延し、高強度になるほど軟骨変性が進行したことから、運動によって起こるメカニカルストレスの負の効果量とマクロファージを介した炎症状態の調節からの正の効果量の差が軟骨変性に影響を及ぼしていると考えられる。

ただ、OA とマクロファージの関係性は複雑に関与し、一方向性関係ではない。マクロファージの活性は軟骨端や死細胞などの貪食反応から開始されると認識されている^{70,71)}が、その後の軟骨変性とマクロファージの活性化は相互に影響を及ぼす。つまり、今回の結果からトレッドミル運動という刺激がマクロファージの活性を変化させたと考えられるが、その一方で運動が何か他の要因に影響し、軟骨変性が抑制された結果としてマクロファージの表現型に差が生じた可能性も否定出来ないという課題も残される。

3. 研究Ⅱ：変形性膝関節症モデルマウスに対するトレッドミル運動の効果とマクロファージとの関係性の検討

3.1. 研究の概要

研究Ⅰより、緩徐なトレッドミル運動を実施すると軟骨変性が遅延することが分かった。それと同時に滑膜では炎症因子の増加と抗炎症因子の減少が確認され、滑膜マクロファージの解析では M1 マクロファージの減少、M2 マクロファージが増加することが明らかとなった。これらのことからトレッドミル運動の軟骨保護効果にはマクロファージの役割が関与しているのではないかと考えた。そのため、関節内のマクロファージを枯渇させることで、トレッドミル運動時の OA に対するマクロファージの役割を明らかにすることを目的に研究Ⅱを実施した。

3.2. 方法

3.2.1. 倫理的配慮

本学における研究推進委員会の承認を得た後、動物実験基本計画書ならびに動物実験実施計画書に従い、研究を推進した（承認番号 2020-3）。また、動物倫理に配慮し、統計学的解析を行うための最小限の動物を実験に供した。

3.2.2. 実験デザイン

変形性膝関節症モデルマウスに対するトレッドミル運動の効果とマクロファージとの関係性の検討（図 7）

12 週齢 ICR 系雄性マウス 32 匹に対し、軟骨の線維化や軽微な欠損が生じる軽度の膝 OA を惹起させる。その後未処置の ACLT 群、トレッド

ミル運動を行う Ex 群, 滑膜のマクロファージを枯渇させる薬剤を投与する MΦ-de 群, トレッドミル運動とマクロファージ枯渇剤の投与を実施する Ex+MΦ-de 群の 4 群に振り分けた (n = 8). 4 週間の介入後膝関節を採取し, 膝 OA に対するトレッドミル運動の効果をマクロファージとの関係性に関して検証した.

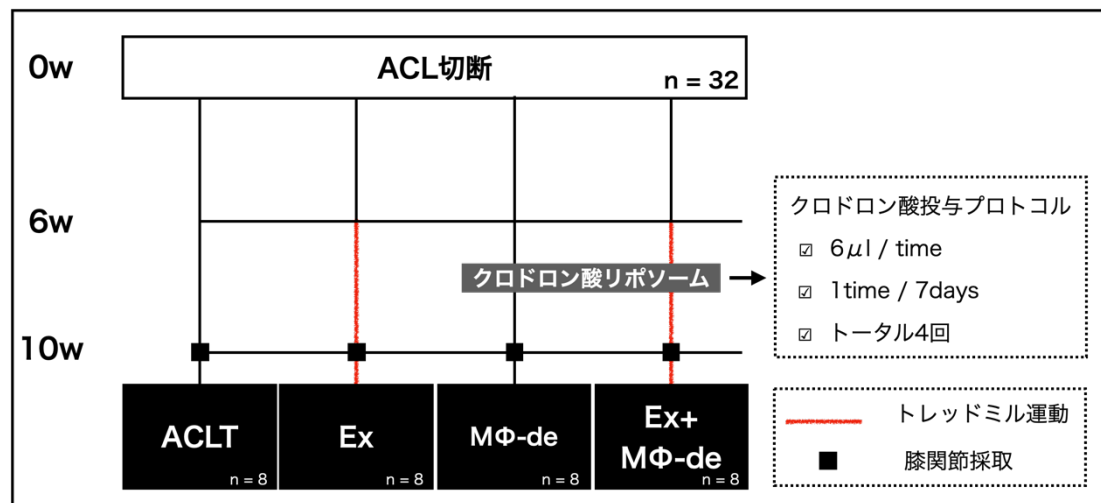


図 7 : 研究 II の実験デザイン

3.2.3. モデル作成

イソフルランにて吸入麻酔後, 三種混合麻酔薬, メデトミジン拮抗薬を体重 10 g あたり 0.1 ml 皮下に投与し, 深麻酔および疼痛緩和処置を行った. その後膝関節の前面を縦切開し, 膝蓋腱の内側から関節包内に侵入させた剪刀を用いて ACL を切断した. 徒手的に脛骨を前方に引き出し, 関節不安定性が惹起されたことを確認した. ACL 切断後, 切開した関節包と皮膚を縫合糸で閉創した.

3.2.4. 運動介入

Ex 群, Ex+MΦ-de 群に対し小動物用トレッドミルを使用して運動介

入を行った。運動介入を行う全てのマウスはトレッドミルの機械音や電気刺激などへの環境適応期間として 1 日 30 分間、3 m/min の速度で 3 日間の運動を課した。運動介入の強度は研究 I において最も軟骨変性の抑制もたらした 10 m/min を採用し、その他の条件は研究 I と同様のプロトコルで実施した。

3.2.5. マクロファージ枯渇剤の投与

滑膜のマクロファージを枯渇するためにクロドロン酸内包リポソーム（株式会社ヒュギエイアバイオサイエンス，大阪，日本）を使用した。動物モデルにおけるマクロファージの化学的枯渇は、クロドロン酸リポソーム溶液を用いて行われる⁷²⁾。クロドロン酸に内包されたりポソームは食細胞によって異物として認識され、ファゴソームに取り込まれる。その後ファゴソームはフォスホリパーゼを含むリソソームと融合し、リポソームの膜を破壊して細胞内でのクロドロン酸の放出を誘導する^{73,74)}。細胞内に放出されたクロドロン酸によってミトコンドリアの機能と完全性が変化し、細胞のアポトーシスのシグナルが開始され、マクロファージのアポトーシスを引き起こす作用を持つ⁷⁵⁾。

MΦ-de 群，Ex+MΦ-de 群に対し，クロドロン酸リポソームを膝関節内に直接投与した。投与は 30G の針を装着したハミルトンシリンジを使用した。イソフルランによる吸入麻酔下で，膝蓋腱の内側から針を侵入させ，クロドロン酸を投与した。注入後は薬剤の漏れを防ぐために 1 分間静置した。抜針後は関節内にクロドロン酸を行き渡らせるために膝関節を 10 回屈伸させた。クロドロン酸の投与は Arjen ら⁶⁴⁾，Lent ら⁷⁶⁾ の報告に基づき 1 回につき 6 μl を投与した。また，クロドロン酸によるマクロファージの枯渇効果は 1 週で消失することから薬剤の投与は 7 日

毎に行い、全 4 回実施した。また、ACLT 群、Ex 群は対照群として、クロドロン酸の投与と同様の方法で PBS (pH7.4) を投与した。

3.2.6. 組織学的解析

採取した膝関節は生理食塩水にて洗浄後、4 % Paraformaldehyde リン酸緩衝液で 24 時間、4°C の条件で固定した。固定後、水道水で洗浄し、20 % エチレンジアミン四酢酸溶液を用いて 10 日間、4°C の条件で脱灰した (脱灰溶液は 2 日に一度交換)。脱灰終了後、脱水・パラフィン置換処理を行った後、パラフィンディスペンサー TEC-P-DC-J0 (Sakura Finetek Japan Co., Ltd. Tokyo, JPN) を用いてパラフィンブロックを作成した。その後、マイクロトーム ROM-380 (Yamato Kohki Industrial Co., Ltd. Saitama, JPN) にて、矢状断切片 (7 μm) を作成した。

組織切片に対し、関節軟骨を観察するために Safranin-O Fast Green 染色を Schmitz らの方法⁴²⁾に従い行った。また、滑膜を観察するために Hematoxylin Eosin (HE) 染色を実施した。染色した切片はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE Co., Osaka, JPN) を用いて撮影した。関節軟骨は OARSI によって推奨されているスコアリング法⁴³⁾に基づき、各個体 2 切片 (内側から切片を作成し、半月板が前方と後方に別れた部分を 1 切片目、その点から 84 μm 進んだ部分を 2 切片目) を評価した。OARSI スコアは Safranin-O の染色性低下や軟骨の構造変化など 8 段階 (0, 0.5, 1-6) で OA の進行度を分類する評価スケールである。滑膜は各個体 2 切片 (内側から切片を作成し、顆間窩に入り脂肪体がはっきりと確認された部分を 1 切片目、その点から 84 μm 進んだ部分を 2 切片目) を評価した。解析位置としては膝蓋下脂肪体の内側にある滑膜に対して任意の 2 箇所を解析対象とした。滑膜炎スコア⁴⁴⁾は滑膜層の

数や肥厚度，細胞浸潤度から 5 段階（0-4）で滑膜炎を分類する評価スケールである．評価はランダム化された組織像を 2 名の研究者が独立して採点し，平均値をスコアとした．

次に VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, CA, USA) のプロトコルに基づき，Avidin-Biotinylated enzyme Complex 法を用いて免疫組織化学染色を実施した．組織切片に対しキシレン，エタノールにより脱パラフィン処理をした．次に内在性酵素活性を除去するため，過酸化水素水 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Tokyo, JPN) を 0.3% 含むメタノールに 30 分間浸漬した．また，正常ヤギ血清 (Vector Laboratories, CA, USA) に 20 分間浸漬することで一次抗体の非特異結合をブロックした．関節軟骨に対しては一次抗体として抗 Gremlin-1 抗体 (ab231065 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/200) ，抗 MMP-13 抗体(ab39012 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/250) ，抗 ADAMTS4 抗体(bs-4191R ; Bioss Antibodies Co., Ltd. MA, USA 希釈濃度 1/100) を加えた．滑膜に対しては，抗 CD68 抗体 (ab125212 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/100) ，抗 iNOS 抗体 (2977S ; Cell Signaling Technology, Inc. MA, USA, 希釈濃度 1/200) ，抗 CD206 抗体(18704-1-AP ; Proteintech Group. IL, USA, 希釈濃度 1/500) ，抗 TLR4 抗体(ab13867 ; Abcam plc. MA, USA, 希釈濃度 1/250) ，抗 IL-4 抗体(GTX66741 ; Gene Tex Inc. CA, USA, 希釈濃度 1/100) を加えた．抗体滴下後は 4°C で管理された冷蔵庫内で 8 時間以上反応させた．二次抗体には Anti-Rabbit IgG Biotinylated Antibody (Vector Laboratories, MA, USA) を用いて 30 分間反応させた．また増感反応として VECTASTAIN ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, MA, USA) を用いて 30 分間反応させた．最後に，ジアミノベンジン (DAB)

(NICHIREI BIOSCIENCE INC. Tokyo, JPN) にて発色させた. データ解析は 84 μm 間隔の 2 切片に対し, ランダムに選択された範囲での軟骨 (10000 (100 \times 100) μm^2), および滑膜 (2500 (50 \times 50) μm^2) における, 陽性細胞/Hematoxylin によって染色された核を含む全細胞を陽性細胞率として算出した. マクロファージの細胞数, M1/M2 マクロファージの比率は 3 つの連続した切片から算出した. 関節軟骨の解析は脛骨中央から後方にかけて 2 箇所実施し, 滑膜の解析は膝蓋下脂肪体の内側にある滑膜に対して任意の 2 箇所を解析対象とした. CD68 抗体で染色した切片からヘマトキシリンによって染色された細胞に対する CD68 陽性細胞率を算出した. その数値から iNOS, CD206 抗体で染色した切片の CD68 陽性細胞を推定し, その推定値に対する iNOS, CD206 陽性細胞の割合を M1 もしくは M2 マクロファージの割合とした.

3.2.7. 統計解析

統計解析は, SPSS を用いた. 全てのデータに対し Shapiro-Wilk 検定による正規性の検証を行った. 正規性を認めた OARSI スコア, 滑膜炎スコア, 免疫組織化学染色による Gremlin-1, MMP-13, ADAMTS4, IL-4, TLR4 陽性細胞率のデータに対し, 一元配置分散分析後, 事後検定として Tukey 法を用いた. 正規性を認めなかった CD68 陽性細胞数, iNOS, CD206 の陽性細胞率については Kruskal Wallis 検定後, 事後検定として Steel Dwass 法を用いた. 正規性を認めたデータは平均値 [95 %信頼区間], 正規性を認めなかったデータは中央値 [四分位範囲] で示した. また, 全ての有意水準は 5 %未満とした.

3.3. 結果

3.3.1. 関節軟骨に対する組織学的検討

Safranin-O Fast Green 染色による関節軟骨の組織像と OARSI スコアの分析結果を (図 8) に示す. 関節軟骨の組織像では 全ての群で軟骨表層の不整やびらんが確認されたが, Ex+MΦ-de 群では関節軟骨の非石灰化層が欠損し石灰化層が曝露されている組織像が観察された. OARSI スコアは Ex 群, MΦ-de 群が ACLT 群と比較して有意に低値を示した([Ex 群, MΦ-de 群 vs ACLT]; $p < 0.001$, $p = 0.002$). また Ex+MΦ-de 群は他の 3 群と比較して OARSI スコアが有意に高値を示した([Ex+MΦ-de vs ACLT, Ex, MΦ-de]; $p = 0.007$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 3.0 [2.6-3.3]; Ex 群 : 1.7 [1.5-1.9]; MΦ-de 群 : 2.0 [1.8-2.3]; Ex+MΦ-de 群 : 3.8 [3.4-4.2]).

次に関節軟骨に対する免疫組織化学染色の組織像と陽性細胞率の分析結果を (図 8) に示す. Gremlin-1 に関して, どの群においても同様に, 主に非石灰化層で陽性細胞が観察された. 陽性細胞率の分析では Ex 群が ACLT 群と比較して陽性率が有意に高値を示した ($p = 0.047$). また, Ex+MΦ-de 群が MΦ-de 群と比較して陽性率が有意に高値を示した([Ex+MΦ-de vs MΦ-de]; $p = 0.036$) (ACLT 群 : 46.2 [42.2-50.2] % ; Ex 群 : 53.3 [48.5-58.2] % ; MΦ-de 群 : 45.3 [40.0-50.3] % ; Ex+MΦ-de 群 : 58.3 [52.5-64.0] %).

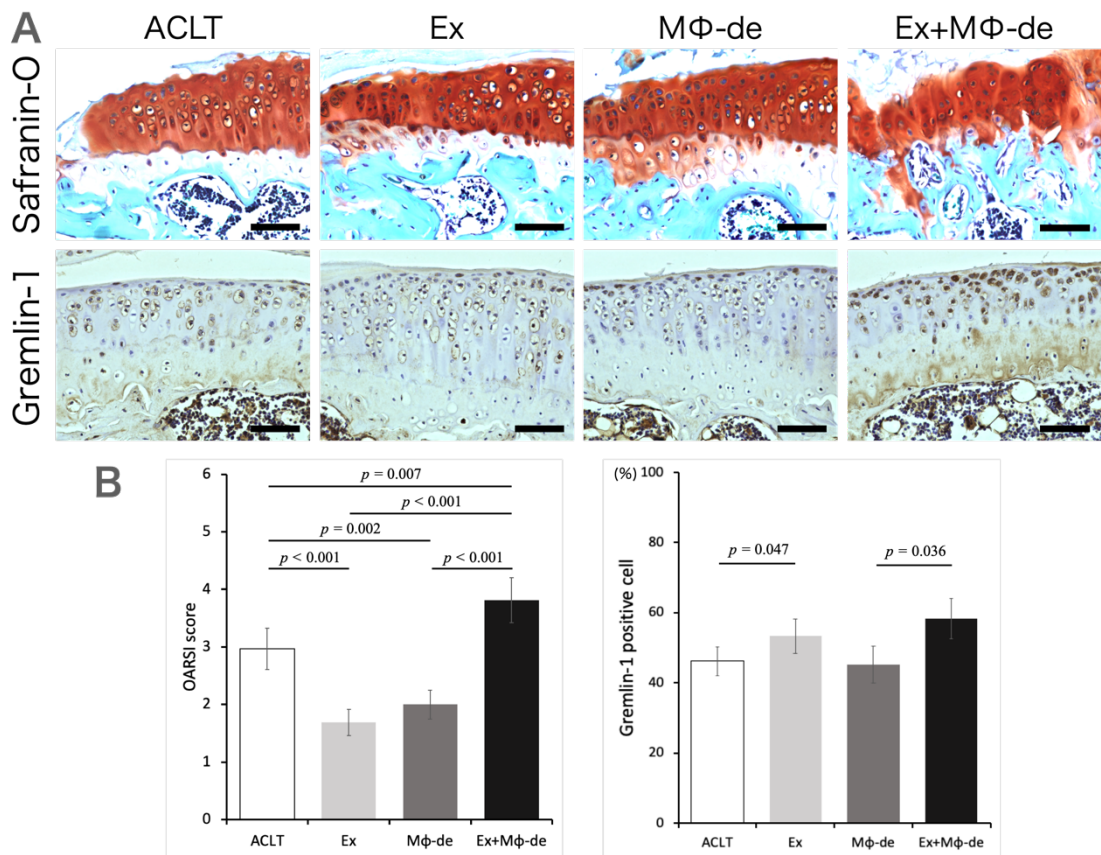


図 8 : Safranin-O Fast Green による染色像と Gremlin-1 の免疫組織化学染色による染色像 (A). 軟骨変性を評価する OARSI スコアによるスコアリング結果と Gremlin-1 陽性細胞率 (B). スケールバー : 50 μ m

次に関節軟骨に対する関節軟骨異化因子の免疫組織化学染色による組織像と陽性細胞率の分析結果を（図 9）に示す.

MMP-13 に関して，組織像では Ex+MΦ-de 群で強い陽性所見が多く観察された．陽性細胞率の分析では Ex 群，MΦ-de 群が ACLT 群と比較して有意に低値を示した([Ex 群, MΦ-de 群 vs ACLT] ; $p = 0.002$, $p = 0.050$). また Ex+MΦ-de 群は他の 3 群と比較して有意に高値を示した([Ex+MΦ-de vs ACLT, Ex, MΦ-de] ; $p = 0.035$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 48.9 [44.7-53.1] % ; Ex 群 : 35.1 [32.1-38.0] % ; MΦ-de 群 : 39.5 [34.3-44.7] % ; Ex+MΦ-de 群 : 58.8 [53.4-64.3] %).

ADAMTS4 に関して，Ex+MΦ-de 群は他の 3 群と比較して陽性細胞率が有意に高値を示した([Ex+MΦ-de vs ACLT, Ex, MΦ-de] ; $p = 0.006$, $p = 0.018$, $p < 0.001$) (ACLT 群 : 47.3 [42.1-52.3] % ; Ex 群 : 48.9 [43.8-54.0] % ; MΦ-de 群 : 43.2 [40.1-46.3] % ; Ex+MΦ-de 群 : 60.6 [54.9-66.3] %).

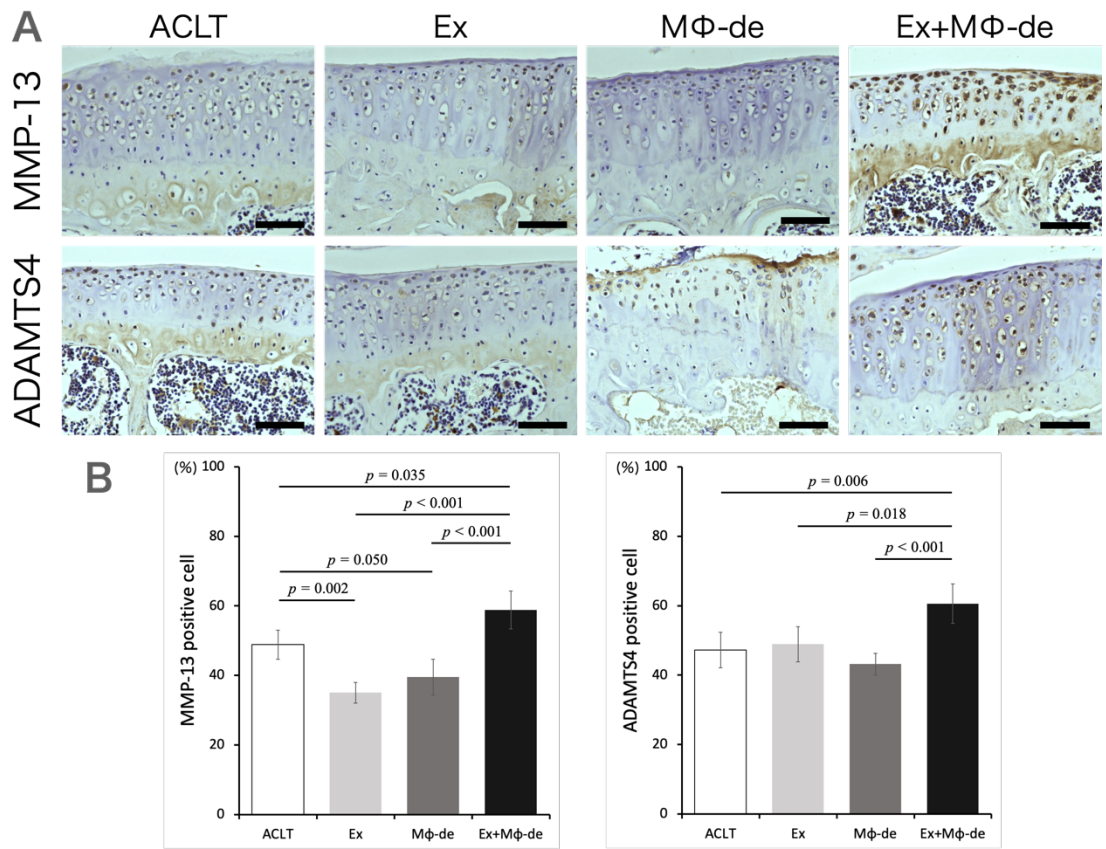


図 9 : 関節軟骨に対する MMP-13, ADAMTS4 の免疫組織化学染色による組織像
 (A). MMP-13 (左図), ADAMTS4 (右図) 陽性細胞率の解析結果 (B). スケールバー : 50 μ m

3.3.2. 滑膜に対する組織学的検討

HE染色による滑膜の組織像と滑膜炎のスコアリング結果を(図 10)に示す. すべての群において滑膜の肥厚が確認された. しかし, Ex+MΦ-de群では滑膜と脂肪体との境界が不明瞭となり, 滑膜が脂肪体部分に大きく浸潤している様な像が観察された. また, マクロファージ枯渇剤を投与したMΦ-de群, Ex+MΦ-de群では滑膜表層の細胞が減少している像が観察された. 滑膜炎スコアに関して, Ex群は他の3群と比較して滑膜炎スコアが有意に低値を示した([Ex vs ACLT, MΦ-de, Ex+MΦ-de]; $p = 0.025$, $p = 0.009$, $p < 0.001$). また, Ex+MΦ-de群はACLT群, MΦ-de群と比較して滑膜炎スコアが有意に高値を示した([Ex+MΦ-de, ACLT群 vs MΦ-de]; $p = 0.001$, $p = 0.003$) (ACLT群: 2.6 [2.2-2.9]; Ex群: 1.9 [1.6-2.1]; MΦ-de群: 2.7 [2.3-3.0]; Ex+MΦ-de群: 3.5 [3.3-3.8]).

次に滑膜に対する免疫組織化学染色の組織像と陽性細胞率の分析結果を(図 10)に示す. TLR4に関して, Ex群の滑膜表層における陽性細胞はあまり観察されなかった. 陽性細胞率の分析ではEx群はACLT群, Ex+MΦ-de群と比較して有意に陽性細胞率が低値を示した([Ex vs ACLT, Ex+MΦ-de]; $p = 0.042$, $p < 0.001$). また, Ex+MΦ-de群の陽性細胞率は他の3群と比較して有意に高値を示した([Ex+MΦ-de vs ACLT, Ex, MΦ-de]; $p = 0.005$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (ACLT群: 50.0 [45.6-54.4] %; Ex群: 41.8 [38.1-45.4] %; MΦ-de群: 43.2 [40.1-46.3] %; Ex+MΦ-de群: 61.4 [56.4-66.4] %).

IL-4に関して運動群では陽性細胞が多く観察された. 陽性細胞率の分析では, Ex群, Ex+MΦ-de群の陽性細胞率がACLT群, MΦ-de群と比較して有意に高値を示した([Ex, Ex+MΦ-de vs ACLT, MΦ-de]; $p =$

0.001, $p = 0.003$, $p = 0.001$, $p = 0.005$) (ACLT 群 : 41.3 [39.0-43.7] % ; Ex 群 : 54.0 [49.3-58.6] % ; MΦ-de 群 : 43.2 [40.1-46.3] % ; Ex+MΦ-de 群 : 53.6 [49.4-57.8] %).

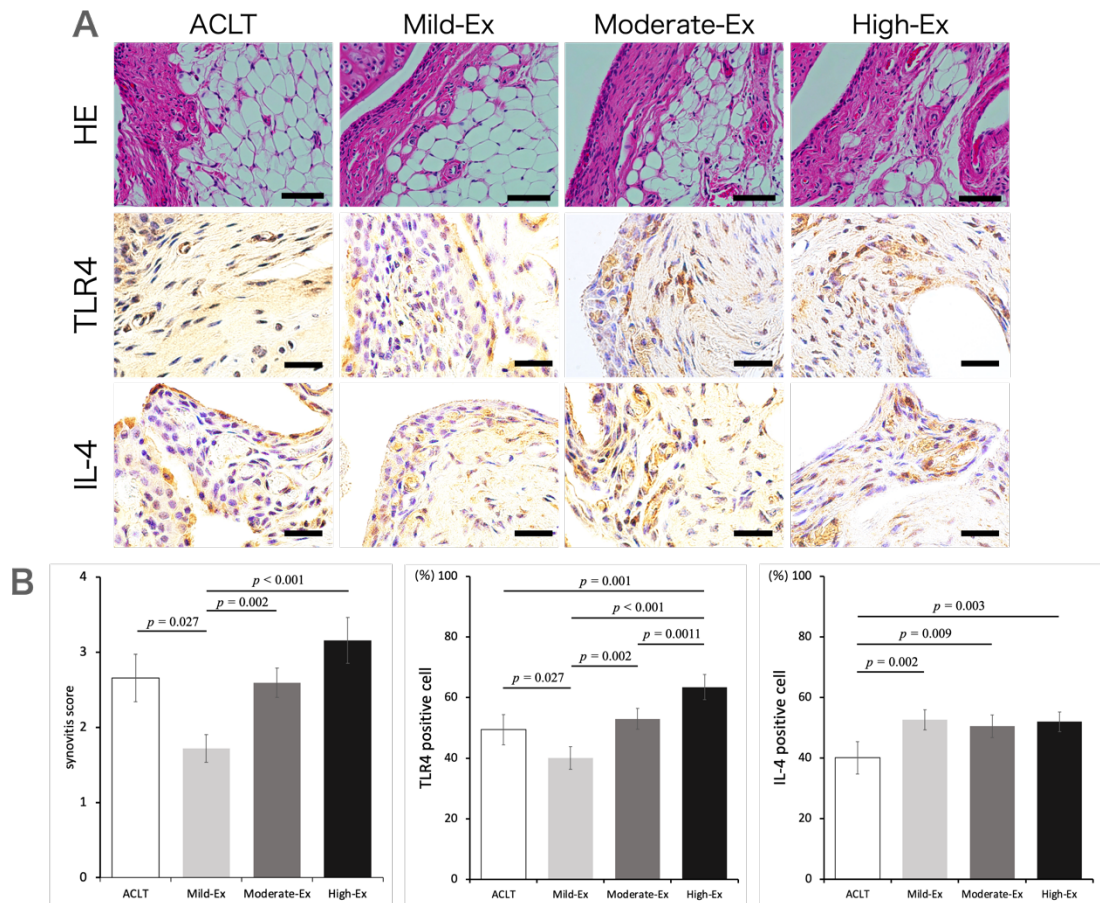


図 10 : HE 染色による滑膜の組織像と TLR4, IL-4 の免疫組織化学染色による染色像 (A). 滑膜炎のスコアリング結果 (左図) と TLR4 (中央), IL-4 (右図) の陽性細胞率の解析結果 (B). スケールバー : 上段 (50 μ m), 中・下段 (10 μ m)

次に滑膜マクロファージに関する組織化学染色による染色像と陽性細胞の分析結果を（図 1 1）に示す。CD68 に関して ACLT 群, Ex 群では滑膜表層に多くの陽性細胞が観察されたが, マクロファージ枯渇剤を投与した MΦ-de 群, Ex+MΦ-de 群では陽性細胞はあまり観察されなかった。陽性細胞数の分析においても MΦ-de 群, Ex+MΦ-de 群は ACLT 群, Ex 群と比較して, 有意に細胞数が減少していた([MΦ-de, Ex+MΦ-de vs ACLT, Ex]; $p = 0.006$, $p = 0.006$, $p = 0.003$, $p = 0.002$) (ACLT 群 : 79 [76-85]; Ex 群 : 84 [73-99]; MΦ-de 群 : 17 [12-21]; Ex+MΦ-de 群 : 15 [12-22]).

iNOS に関して, Ex 群では陽性細胞があまり観察されなかった。iNOS の陽性細胞から算出された全マクロファージにおける M1 マクロファージの割合は Ex 群が他の 3 群と比較して有意に低値を示した([Ex vs ACLT, MΦ-de, Ex+MΦ-de]; $p = 0.010$, $p = 0.002$, $p = 0.003$) (ACLT 群 : 58.5 [54.3-62.6] % ; Ex 群 : 42.7 [40.9-44.5] % ; MΦ-de 群 : 61.7 [58.6-64.8] % ; Ex+MΦ-de 群 : 61.4 [56.2-66.5] %).

CD206 に関しては iNOS とは反対に, Ex 群で多くの陽性細胞が観察された。CD206 の陽性細胞から算出された全マクロファージにおける M2 マクロファージの割合は Ex 群が他の 3 群と比較して有意に高値を示した([Ex vs ACLT, MΦ-de, Ex+MΦ-de]; $p = 0.010$, $p = 0.002$, $p = 0.003$) (ACLT 群 : 58.5 [54.3-62.6] % ; Ex 群 : 42.7 [40.9-44.5] % ; MΦ-de 群 : 61.7 [58.6-64.8] % ; Ex+MΦ-de 群 : 61.4 [56.2-66.5] %).

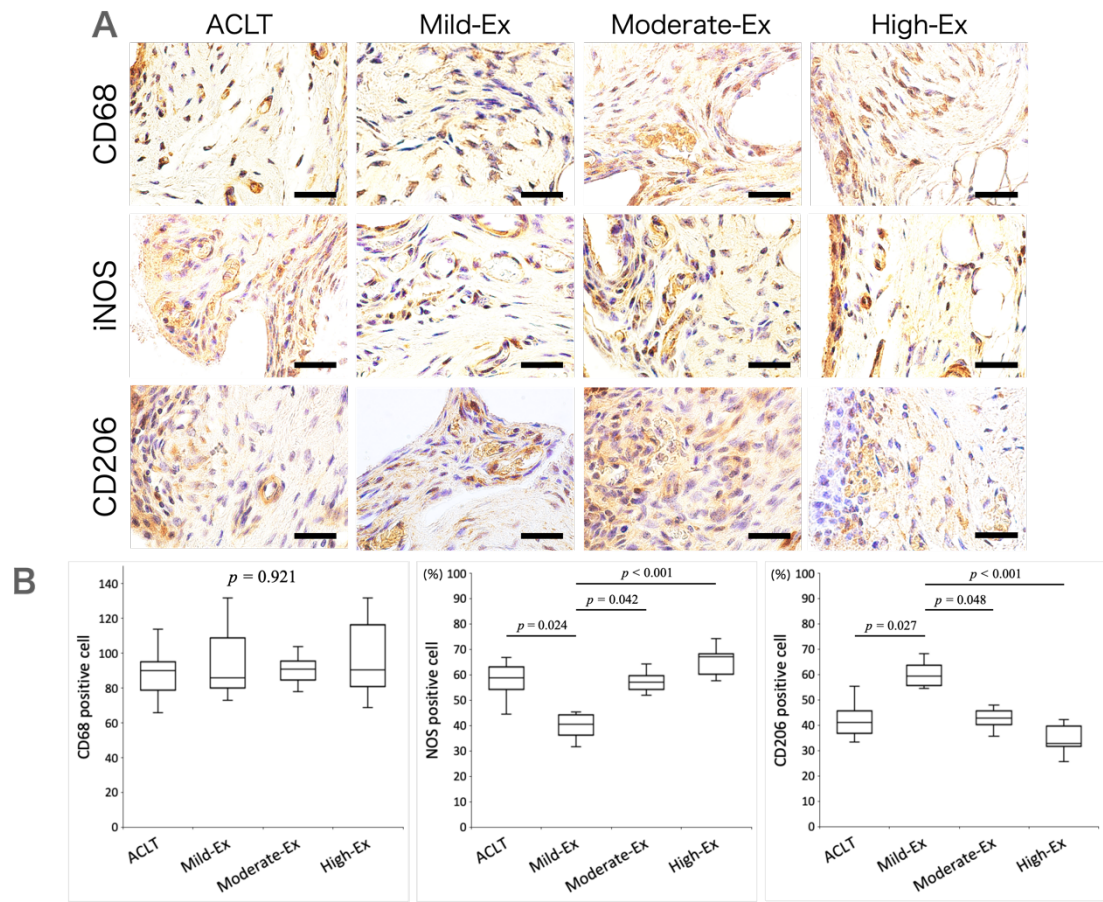


図 1 1 : CD68, iNOS, CD206 の免疫組織化学染色による染色像 (A). CD68 (左図), iNOS (中央), CD206 (右図) の陽性細胞率の解析結果 (B). スケールバー : 10 μ m

3.4. 考察

研究Ⅱでは、膝 OA に対するトレッドミル運動の効果は滑膜におけるマクロファージの動態変化が関節軟骨の変性に関与するのではないかという仮説に対して、膝関節内マクロファージを枯渇する薬剤を用いて、トレッドミル運動とマクロファージ動態の関係性についての一端を明らかにすることを目的に研究を遂行した。

研究Ⅰによって最も軟骨変性を抑制したプロトコルを採用した Ex 群では研究Ⅰと同様に、軟骨変性を遅延し滑膜炎やそれに伴う M1 マクロファージ比率の減少や M2 マクロファージ比率が増加するなど、軟骨変性を抑制し得る変化が生じていた。

マクロファージ枯渇剤を用いた MΦ-de 群においても Ex 群と同程度軟骨変性を遅延させた。クロドロン酸によるマクロファージの枯渇作用に関して、先行研究ではマクロファージを 60-75 % 枯渇させたと報告^{77,78)}しているが、本研究ではマクロファージ 80 % 程度枯渇させることが出来ており、薬剤の効果としては十分に作用していたことが示唆される。磁気ビーズを用いる magnetic-activated cell sorting (MACS) 法⁷⁹⁾によって滑膜マクロファージを枯渇させたところ、IL-1 β 、TNF- α 、MMP の産生が減少し、軟骨の変性が減少したという報告がある。また本研究でも用いたクロドロン酸を膝関節内に投与し、滑膜マクロファージを枯渇させると、滑膜における M1 マクロファージから放出される MMP-3 および MMP-9 の遺伝子発現が有意に減少⁷⁷⁾し、コラゲナーゼ誘発マウスモデルにおいては TGF- β を介した骨棘形成を減少させたと報告⁶⁴⁾されている。このように、マクロファージが OA の進行に直接的に関与することが明らかであり、本研究においてもマクロファージが劇的に減少した MΦ-de 群ではマクロファージの絶対量の減少が、軟骨変性を遅

延させた可能性がある。

特筆すべき結果として、クロドロン酸投与、トレッドミル運動それぞれ単独の場合は軟骨変性が遅延したにも関わらず、それらを併用した Ex+MΦ-de 群では軟骨変性が進行していた。この結果は膝 OA に対するトレッドミル運動が軟骨変性の遅延を導くためにはマクロファージの存在が必要となることを示している。膝 OA の治療に関してマクロファージの貢献が期待されている⁸⁰⁾。その多くが M1 と M2 といったマクロファージの表現型の特徴に基づいて検証されており、グルココルチコイドが OA 患者の滑膜マクロファージの CD163 (M2 マーカーの一種) の発現を増加させたといった報告⁸¹⁾や、Utomo ら⁸²⁾は OA 患者の滑膜摘出標本に対してデキサメタゾンを追加したところ、M1 マクロファージを抑制し、M2 マクロファージの発現を増加させると報告した。また、Lee ら⁸³⁾は OA 患者に TGF-β1 を投与するために Tissuegene-C を使用した結果、関節内の抗炎症環境を誘導することを示唆した。さらにラット MIA モデルでは Tissuegene-C を投与すると IL-10 をはじめとする M2 マクロファージによって発現する因子の産生量が増加することを確認しており、マクロファージの働きが OA に対する治療となることが期待されている。

また、別項で述べたようにトレッドミル運動のような全身的な運動が損傷部位におけるマクロファージの表現型を変化させ、抗炎症環境を誘導することも報告^{39,40)}されており、研究 I の結果からも OA 滑膜におけるマクロファージの表現型も変化させることが期待される。

上記のように OA とマクロファージの関係性、運動とマクロファージの関係性は明らかになりつつあるが、OA 分野における運動とマクロファージの関係性を検証する報告はない。それに対して本研究の結果はト

レッドミル運動とクロドロン酸投与の効果を併用することによって打ち消し合うことが明らかとなり，これは運動という刺激に対してマクロファージの動態変化が関与していたことを示す．また，マクロファージが枯渇した状態での運動が軟骨変性を進行させた原因としては，炎症状態に陥った膝関節の環境を抗炎症環境に変換させる生体反応を誘導することが困難であったことが挙げられる．トレッドミル運動のみの Ex 群とクロドロン酸を併用した Ex+MΦ-de 群との比較では，滑膜中の IL-4 陽性細胞率は同様の結果を示した．Ex 群では IL-4 の増加がマクロファージの表現型を変化させ，膝関節内の炎症状態を是正した可能性があるが，Ex+MΦ-de 群では IL-4 などの抗炎症因子が影響を与えるマクロファージや表現型が変化したマクロファージがクロドロン酸によって細胞死したため，関節内の炎症状態を変化させることが出来なかった可能性が挙げられる．つまり，トレッドミル運動によって抗炎症因子の増加が起きても，マクロファージが枯渇すると軟骨変性を遅延することが出来ないことが明らかとなった．

また，クロドロン酸投与のみの MΦ-de 群と Ex+MΦ-de 群との比較において，Ex+MΦ-de 群では滑膜中の抗炎症因子の発現が増加していたが，OARSI スコアや軟骨分解因子の発現率は Ex+MΦ-de 群で増加していた．双方の群ともにクロドロン酸の投与によりマクロファージは枯渇している状態である．また，Gremlin-1 の陽性細胞率は MΦ-de 群よりも Ex+MΦ-de 群で高値を示した．Gremlin-1 は軟骨細胞において，過度なメカニカルストレスが負荷されると発現し，軟骨変性を導くと報告⁵⁴⁾されている．つまり Ex+MΦ-de 群ではトレッドミル運動により，関節軟骨にメカニカルストレスが更に付加されたため，軟骨細胞における軟骨分解因子が増加し，軟骨変性が加速したと考えられる．つまり，トレッドミル

運動は膝関節内のマクロファージの機能を弱化させると関節軟骨に対して負の効果を持つことが分かった。

これらの結果から、トレッドミル運動によって軟骨を保護するためにはマクロファージを介した炎症状態の調節機構の働きが重要であり、マクロファージによる免疫反応を弱化させるとトレッドミル運動による効果は負に転じてしまうことが明らかとなった。

4. 総合的考察

本研究では膝 OA に対するトレッドミル運動の効果について検証した。現在までトレッドミル運動による軟骨保護効果は適度なメカニカルストレスが付加されたからと捉えられてきた。しかし、無介入の状態よりも運動によって関節軟骨にかかるメカニカルストレスは増大するが、結果として軟骨変性が抑制されるという点に相違があることを見出し、運動の効果について捉え直す必要性があることを指摘した。さらに、トレッドミル運動が持つ軟骨保護作用にはマクロファージの貢献が関与しているのではないかと仮説を立て、膝 OA に対するトレッドミル運動時に変化するマクロファージの動態の検証（研究 I）、マクロファージの影響を抑制した場合の膝関節の応答を検証（研究 II）した。

研究 I では 3 種類の運動強度を設定し、トレッドミル運動の効果検証を実施した。その結果、最も低強度の運動を行った Mild-Ex 群で軟骨変性が遅延し、それよりも強度が高い 2 群では軟骨変性は遅延しないという非線形的な結果を示した。またマクロファージの動態について、Mild-Ex 群では抗炎症的に作用する M2 マクロファージの割合が増加したが、Moderate-Ex 群、High-Ex 群では M1 マクロファージの比率が増加していた。この変化は軟骨変性と同様の変化を示しており、トレッドミル運動による軟骨保護効果はマクロファージが関与しており、Mild な運動であれば、トレッドミル運動由来の関節軟骨に付加されるメカニカルストレスによって生じる異化反応を、マクロファージによる同化反応の貢献度が上回ったため、軟骨変性が遅延したのではないかと考えられる。

研究 II では軟骨の保護と深く関与していると示唆されたマクロファージの反応性を弱体化させ、トレッドミル運動時のマクロファージの貢献について検証した。

クロドロン酸投与によってマクロファージを枯渇させた状態でトレッドミル運動を実施した **Ex+MΦ-de** 群では軟骨変性が著明に進行していた。同様の運動を行った場合でも、マクロファージが枯渇した環境では軟骨変性が進行することから、トレッドミル運動による軟骨保護作用を機能させるためにはマクロファージの応答が必要であることが明らかとなった。また、**MΦ-de** 群と **Ex+MΦ-de** 群の比較では、**Gremlin-1** の陽性細胞率に差が生じていた。このことから、**Ex** が関節軟骨に直接的に与える影響としては、同化反応よりも、メカニカルストレスによる異化反応の可能性があることが示唆された。

これらのデータは膝 OA 患者に対する運動療法を処方する上で、運動の種類や強度を決定するための一助となりうる。現在膝 OA に対する一般的な治療プログラムは OA 患者最大の主訴である疼痛の軽減や 10 m 歩行などの機能的改善が目標となっている。ただ、それらの治療介入が膝 OA 本来の主病変である軟骨変性に対して、効果があるのかは不明である。また、有酸素運動としてウォーキングが推奨されているが、本研究の結果から、運動強度の設定次第では OA を進行させてしまうリスクが伴うことがわかる。また、ウォーキングよりも効果的な有酸素運動があるのではないかとすることも推察される。

本研究ではトレッドミルを用いた全身的な運動が、抗炎症因子を増加させ、マクロファージの機能を介して軟骨変性を遅延させるという理論の一部を支持するものである。

つまり、臨床の場面を想定し OA のような関節環境にある場合、関節軟骨への直接的負荷は極力軽減することが求められ、その中で全身的な有酸素運動を行うことが良いのではないかと考えられる。近年、水中運動や免荷式トレッドミルなどを取り入れた報告も散見⁸⁴⁻⁸⁶⁾されるが、こ

これらの治療効果を支持するデータともなり得る。臨床レベルでは根拠なく治療が選択されてきているが、それぞれの運動の効果に関して根拠を持って説明することで、より効果的な治療介入を展開することが可能となるだろう。

本研究には結果を考察する上で、考慮すべき点が存在する。はじめに、実験群に非損傷の対照群を設定していない点が挙げられる。本研究は運動が膝 OA の治療として効果があるのかを検証するための実験を実施したため、対照群を ACL 切断し軟骨変性が生じる ACLT 群とした。ただ、今後運動が有する治療効果としての可能性も考慮すると、軟骨損傷を治癒するといった根治を目指す介入として運動を行うことに価値があるのかを検証するためにも、非損傷の対照群を設定することが望まれる。

また、マクロファージに関して、トレッドミル運動によってマクロファージの比率の変化が生じたが、その変化が運動に起因するものであると断定することは困難である。変化したマクロファージがどの組織から集積し分化したのか、何によって影響を受けたのかを断定することが出来ればより運動の効果を追求することが可能になる。マクロファージの発生に関して、ヒト、マウス、ラットの個体発生では胚 7.5 日までの胎生期造血は卵黄嚢に始まり^{87,88)}、次いで胚 8.5 日から 10.5 日頃には肝臓造血⁸⁹⁾、やがて胚 16 日頃には骨髄造血と造血の場所が変化し、生後の造血は骨髄に依存する。この造血の変化とともにマクロファージの前駆細胞も移動し、それぞれの場所でマクロファージが発生する。滑膜における常在マクロファージは卵黄嚢と肝臓から発生したものとされており⁹⁰⁾、そのほとんどが肝臓の赤血球系前駆細胞から単球を生成し、マクロファージに分化したものである。また炎症性刺激が加わった場合などに新たに動員されるマクロファージは骨髄由来の単球系マクロファージ

に分類される。常在もしくは骨髄由来マクロファージは、その発生源が異なるが故にその機能にも異質性がある⁹¹⁾。胚由来の常在マクロファージは組織の恒常性を維持することが主な役割であり、非常に長命であることが知られている。反対に骨髄由来マクロファージは炎症刺激によって動員され、組織に定着した後 M1 または M2 様の表現型に分化し、炎症や治癒を制御すると示されているが、寿命は長くとも 2 週間以内とされている⁹²⁾。このように滑膜中のマクロファージには由来によって特徴が異なる。胚由来のマクロファージは F4/80 に陽性を示すが、CD11b には陰性であることが報告されている。一方非常在マクロファージは Ly6C や CX3CR に陽性を示すと報告⁹³⁾されている。本研究では起源による区別を実施しておらず、今後の展望としてトレッドミルによって変化したマクロファージの由来やタイミングなどを上記のマーカーを使用して分別することが出来れば、関節内での反応に留まっているのか、もしくは全身運動としての効果を含むのかなど運動の効果をより詳細に明らかにすることが出来ると考えられる。

また、本研究では軟骨変性に影響を与える因子として、メカニカルストレスに起因するものとマクロファージの反応によるものの 2 点を挙げた。しかし、トレッドミル運動を採用する以上、メカニカルストレスによる要因と全身運動による要因を切り離すことができない。本研究ではその 2 つ要素を効果量の差として結果を捉えたが、どちらが影響しているのかをより明確にするためには、トレッドミル運動だけでなく近年報告されている水中運動や免荷などの技術を組み合わせた検証が必要となるだろう。

そして本研究をより深く考察するためには Ex+MΦ-de 群でなぜ OA が進行したのか追加検証する必要がある。本研究の結果からはトレッド

ミル運動の軟骨保護効果はマクロファージを介している可能性を提起した。マクロファージの動態変化がなぜ生じたのかを検証すると同時に、運動による関節軟骨への直接的な影響として、過度なメカニカルストレスとなっているのか検証することで、運動がもたらす関節軟骨への直接的影響と、間接的影響を明らかにすることが可能となる。

5. 結語

本研究では、変形性膝関節症に対するトレッドミル運動の効果を、滑膜マクロファージとの関係性から捉え直す必要性があることを提起した。組織学的変化の解析やマクロファージ枯渇剤の投与から、トレッドミル運動時の滑膜マクロファージの動態と関節軟骨の関係性を検証し、以下の結論を導いた。

(1) 変形性膝関節症モデルマウスに対して、緩徐な運動は関節軟骨の変性を遅延させた。

(2) 軟骨変性が遅延した緩徐な運動群では、滑膜における抗炎症因子が減少し、M1/M2 比が低下した。

(3) トレッドミル運動強度が高い群ほど軟骨保護効果は低下し、高強度のトレッドミル運動は軟骨変性を助長した。

(4) 軟骨変性を助長した高強度の運動群では、滑膜における炎症因子の増加、抗炎症因子の低下を認め、M1/M2 比が増加した。

(5) 変形性膝関節症に対して、膝関節にクロドロン酸リポソームを投与すると、滑膜マクロファージが減少し、関節軟骨の変性が遅延した。

(6) 緩徐なトレッドミル運動とクロドロン酸リポソームの投与を並行して実施すると、関節軟骨の変性は進行した。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり審査や貴重ご指導を賜りました，主査 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 共通教育科 滑川道人教授，副査 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 小栢進也准教授，広島国際大学 小澤淳也教授に深く感謝いたします。

埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科 田中健一教授には副指導教員として様々な視点からご指導賜りました。埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 国分貴徳准教授には，副指導教員として実験デザインの構成や研究結果の解釈についてのご指導を賜りました。埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 村田健児助教には各実験の方法や結果の解釈に加えて，本論文執筆にあたり丁寧なご指導を賜りました。ここに深く感謝いたしますとともに，御礼申し上げます。

本研究にご協力頂きました，小曾根海知先生，峯岸雄基先生ならびに加納拓馬先生には深く感謝申し上げます。

最後に，終始ご指導ならびにご鞭撻賜りました，指導教員である埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 金村尚彦教授に心より深く感謝申し上げます。

7. 引用文献

1. Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N. Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: A large-scale population-based study. *Arthritis Care Res* (2009);61(6):779-786.
2. Muraki S, Oka H, Akune T, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: The ROAD study. *Osteoarthr Cartil* (2009);17(9):1137-1143.
3. Mow, VC; Proctor CKM. Biomechanics of articular cartilage. Philadelphia 1989:113-177.
4. Murakami T, Sakai N, Sawae Y, Tanaka K, Ihara M. Influence of Proteoglycan on Time-Dependent Mechanical Behaviors of Articular Cartilage under Constant Total Compressive Deformation. *JSME Int J Ser C* (2004);47(4):1049-1055.
5. Hunter W. Of the structure and diseases of articulating cartilages. *Philos Trans R Soc* (1743);42:514-521.
6. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, Goebel JC, Mainard D, Blum A, Pourel J, Netter P, Gillet P. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee:

- Correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum* (2005);52(11):3492-3501.
7. Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: Pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* (2006);58(2):128-149.
 8. Bramono DS, Richmond JC, Weitzel PP, Kaplan DL, Altman GH. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res* (2004);(428):272-285.
 9. P J, D L, IM C. Metalloproteinase Gene Expression Correlates With Clinical Outcome in Dupuytren's Disease. *J Hand Surg* (2008);33(A):1160-1167.
 10. Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* (2002);12(2):131-138.
 11. Murate T, Hayakawa T. Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): New aspects in hematopoiesis. *Platelets* (1999);10(1):5-16.
 12. Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Shiratsuchi H, Motohashi M, Matsumura H. The effect of IL-1 β on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci* (2005);77(25):3210-3221.
 13. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in matrix degradation of human osteoarthritic

- cartilage. *Arthritis Rheum* (2005);52(1):128-135.
14. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2016);12(10):580-592.
 15. van den Bosch MHJ, van Lent PLEM, van der Kraan PM. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. *Osteoarthr Cartil* (2020);28(5):532-543.
 16. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J Clin Invest* (2012);122(3):787-795.
 17. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal* (2014);26(2):192-197.
 18. Zhang H, Lin C, Zeng C, Wang Z, Wang H, Lu J, Liu X, Shao Y, Zhao C, Pan J, Xu S, Zhang Y, Xie D, Cai D, Bai X. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. *Ann Rheum Dis* 2018:1-11.
 19. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep* (2014);6(March):1-13.
 20. Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier JP. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental

- osteoarthritis: Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* (1996);39(9):1535-1544.
21. Kriegova E, Manukyan G, Mikulkova Z, Gabcova G, Kudelka M, Gajdos P, Gallo J. Gender-related differences observed among immune cells in synovial fluid in knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* (2018);26(9):1247-1256.
 22. Liu B, Zhang M, Zhao J, Zheng M, Yang H. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis. *Exp Ther Med* (2018);16(6):5009-5014.
 23. Blazek AD, Nam J, Gupta R, Pradhan M, Perera P, Weisleder NL, Hewett TE, Chaudhari AM, Lee BS, Leblebicioglu B, Butterfield TA, Agarwal S. Exercise-driven metabolic pathways in healthy cartilage. *Osteoarthr Cartil* (2016);24(7):1210-1222.
 24. Nam J, Perera P, Liu J, Wu LC, Rath B, Butterfield TA, Agarwal S. Transcriptome-wide gene regulation by gentle treadmill walking during the progression of monoiodoacetate-induced arthritis. *Arthritis Rheum* (2011);63(6):1613-1625.
 25. Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Loeuille D, Netter P, Mainard D, Gillet P. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: A pilot study. *Osteoarthr Cartil* (2004);12(10):779-786.
 26. Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Zhang X, Tajino J, Kuroki H. Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. *J Orthop Res* (2013);31(7):1026-

1031.

27. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Yamaguchi S, Nagai M, Tajino J, Zhang X, Kuroki H. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* (2015);23(9):1563-1574.
28. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Yamaguchi S, Nagai M, Kiyon W, Zhang X, Kuroki H. Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. *Osteoarthr Cartil* (2016);24(6):1092-1102.
29. Iijima H, Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Kiyon W, Nakahata A, Zhang J, Wang T, Aoyama T, Nishitani K, Kuroki H. Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. *Osteoarthr Cartil* (2017);25(6):964-975.
30. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthr Cartil* (2005);13(7):632-641.
31. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito BA, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Kanki K, Wang E, Peluso D, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* (2004);50(8):2547-

2558.

32. Assis L, Milares LP, Almeida T, Tim C, Magri A, Fernandes KR, Medalha C, Renno ACM. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthr Cartil* (2016);24(1):169-177.
33. Siebelt M, Groen HC, Koelewijn SJ, de Blois E, Sandker M, Waarsing JH, Müller C, van Osch GJVM, de Jong M, Weinans H. Increased physical activity severely induces osteoarthritic changes in knee joints with papain induced sulfate-glycosaminoglycan depleted cartilage. *Arthritis Res Ther* (2014);16(1):1-12.
34. Ni G, Lei L, Zhou Y. Intensity-dependent effect of treadmill running on lubricin metabolism of rat articular cartilage. *Arthritis Res Ther* (2012);14(6):R256.
35. Tang T, Muneta T, Ju YJ, Nimura A, Miyazaki K, Masuda H, Mochizuki T, Sekiya I. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: Protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Res Ther* (2008);10(1):1-8.
36. Sekiya I, Tang T, Hayashi M, Morito T, Ju YJ, Mochizuki T, Muneta T. Periodic knee injections of BMP-7 delay cartilage degeneration induced by excessive running in rats. *J Orthop Res* (2009);27(8):1088-1092.
37. Oka Y, Murata K, Ozone K, Kano T, Minegishi Y, Kuro-Nakajima A, Arakawa K, Kokubun T, Kanemura N. Treadmill exercise after

- controlled abnormal joint movement inhibits cartilage degeneration and synovitis. *Life* (2021);11(4):1-13.
38. Castrogiovanni P, Di Rosa M, Ravalli S, Castorina A, Guglielmino C, Imbesi R, Vecchio M, Drago F, Szychlinska MA, Musumeci G. Moderate physical activity as a prevention method for knee osteoarthritis and the role of synoviocytes as biological key. *Int J Mol Sci* (2019);20(3):1-17.
 39. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev* (2010);16:105-118.
 40. Franciane Bobinski , Juliana Maia Teixeira , Kathleen Anne Sluka and AR, Santosa S. IL-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Physiol Behav* (2018);159(3):437-450.
 41. Oka Y, Murata K, Kano T, Ozone K, Arakawa K, Kokubun T, Kanemura N. Impact of Controlling Abnormal Joint Movement on the Effectiveness of Subsequent Exercise Intervention in Mouse Models of Early Knee Osteoarthritis. *Cartilage* 2019.
 42. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthr Cartil* (2010);18(SUPPL. 3):S113-S116.
 43. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE, Fuller CJ, Hurtig M, Cruz A. The OARSI histopathology initiative–recommendations for

- histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthr Cartil* (2010);18:S93-S105.
44. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthr Cartil* (2010);18(SUPPL. 3):S24-S34.
 45. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet* (2015);386(9991):376-387.
 46. Madry H, Luyten FP, Facchini A. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* (2012);20(3):407-422.
 47. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell K, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthr Cartil* (2006);14(1):13-29.
 48. Chen L, Lou Y, Pan Z, Cao X, Zhang L, Zhu C, Liang J. Treadmill and wheel exercise protect against JNK/NF- κ B induced inflammation in experimental models of knee osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun* (2020);523(1):117-122.
 49. Zhang X, Yang Y, Li X, Zhang H, Gang Y, Bai L. Alterations of autophagy in knee cartilage by treatment with treadmill exercise in a rat osteoarthritis model. *Int J Mol Med* (2019);43(1):336-344.
 50. Nebelung S, Gavenis K, Rath B, Tingart M, Ladenburger A, Stoffel M, Zhou B, Mueller-Rath R. Continuous cyclic compressive

- loading modulates biological and mechanical properties of collagen hydrogels seeded with human chondrocytes. *Biorheology* (2011);48(5-6):247-261.
51. Mawatari T, Lindsey DP, Harris AHS, Goodman SB, Maloney WJ, Smith RL. Effects of tensile strain and fluid flow on osteoarthritic human chondrocyte metabolism in vitro. *J Orthop Res* (2010);28(7):907-913.
 52. Chu F, Feng Q, Hu Z, Shen G. Appropriate cyclic tensile strain promotes biological changes of cranial base synchondrosis chondrocytes. *Orthod Craniofacial Res* (2017);20(3):177-182.
 53. Karamesinis K, Spyropoulou A, Dalagiorgou G, Katsianou MA, Nokhbehshaim M, Memmert S, Deschner J, Vastardis H, Piperi C. Continuous hydrostatic pressure induces differentiation phenomena in chondrocytes mediated by changes in polycystins, SOX9, and RUNX2. *J Orofac Orthop* (2017);78(1):21-31.
 54. Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, Taniguchi Y, Sugita S, Yano F, Chung U il, Kim-Kaneyama J ri, Yanagita M, Economides A, Canalis E, Chen D, Tanaka S, Saito T. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1–NF- κ B pathway. *Nat Commun* (2019);10(1):1-5.
 55. Yang Y, Wang Y, Kong Y, Zhang X, Zhang H, Gang Y, Bai L. The therapeutic effects of lipoxin A 4 during treadmill exercise on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Mol Immunol* (2018);103:35-45.
 56. Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A.

- Grading of chronic synovitis - A histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract* (2002);198(5):317-325.
57. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2010);6(11):625-635.
58. Kortekaas MC, Kwok WY, Reijniere M, Stijnen T, Kloppenburg M. Brief Report: Association of Inflammation with Development of Erosions in Patients with Hand Osteoarthritis: A Prospective Ultrasonography Study. *Arthritis Rheumatol* (2016);68(2):392-397.
59. Roemer FW, Guermazi A, Felson DT, Niu J, Nevitt MC, Crema MD, Lynch JA, Lewis CE, Torner J, Zhang Y. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: The MOST study. *Ann Rheum Dis* (2011);70(10):1804-1809.
60. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: A potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - Results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthr Cartil* (2005);13(5):361-367.
61. Moradi B, Rosshirt N, Tripel E, Kirsch J, Barié A, Zeifang F, Gotterbarm T, Hagmann S. Unicompartmental and bicompartmental knee osteoarthritis show different patterns of mononuclear cell infiltration and cytokine release in the affected

- joints. *Clin Exp Immunol* (2015);180(1):143-154.
62. Klein-Wieringa IR, De Lange-Brokaar BJE, Yusuf E, Andersen SN, Kwekkeboom JC, Kroon HM, Van Osch GJVM, Zuurmond AM, Stojanovic-Susulic V, Nelissen RGHH, Toes REM, Kloppenburg M, Ioan-Facsinay A. Inflammatory cells in patients with endstage knee osteoarthritis: A comparison between the synovium and the infrapatellar fat pad. *J Rheumatol* (2016);43(4):771-778.
 63. Samavedi S, Diaz-Rodriguez P, Erndt-Marino JD, Hahn MS. A three-dimensional chondrocyte-macrophage coculture system to probe inflammation in experimental osteoarthritis. *Tissue Eng - Part A* (2017);23(3-4):101-114.
 64. Blom AB, van Lent PLEM, Holthuysen AEM, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* (2004);12(8):627-635.
 65. Lopa S, Leijts MJC, Moretti M, Lubberts E, van Osch GJVM, Bastiaansen-Jenniskens YM. Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. *Osteoarthr Cartil* (2015);23(11):1853-1857.
 66. Schulert GS, Fall N, Harley JB, Shen N, Lovell DJ, Thornton S, Grom AA. Monocyte MicroRNA Expression in Active Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis Implicates MicroRNA-125a-5p in Polarized Monocyte Phenotypes. *Arthritis Rheumatol* (2016);68(9):2300-2313.

67. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. *Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease*. Vol 233.; 2018.
68. Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *J Am Med Assoc* (1999);281(18):1722-1727.
69. Knudsen NH, Stanya KJ, Hyde AL, et al. Interleukin-13 drives metabolic conditioning of muscle to endurance exercise. *Science* (80-) (2020);368(6490).
70. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* (2013);5(2):77-94.
71. Scanzello CR, Plaas A, Crow MK. Innate immune system activation in osteoarthritis: Is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol* (2008);20(5):565-572.
72. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, Van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* (2011);208(2):761-771.
73. Rooijen N Van, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and

- applications. *J Immunol Methods* (1994);174(1-2):83-93.
74. Van Rooijen N, Bakker J, Sanders A. Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs. *Trends Biotechnol* (1997);15(5):178-185.
75. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo K V., Mönkkönen J, Rogers MJ, Azhayev A, Kalervo Väänänen H, Hassinen IE. Further insight into mechanism of action of clodronate: Inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* (2002);61(5):1255-1262.
76. Van Lent PLEM, Blom AB, Van Der Kraan P, Holthuysen AEM, Vitters E, Van Rooijen N, Smeets RL, Nabbe KCAM, Van Den Berg WB. Crucial Role of Synovial Lining Macrophages in the Promotion of Transforming Growth Factor β -Mediated Osteophyte Formation. *Arthritis Rheum* (2004);50(1):103-111.
77. Blom AB, Van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, Van Der Kraan PM, Van Rooijen N, Van Den Berg WB. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: Involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum* (2007);56(1):147-157.
78. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, Van Den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (2010);62(3):647-657.

79. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* (2006);8(6):1-12.
80. Xie J, Huang Z, Yu X, Zhou L, Pei F. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine Growth Factor Rev* (2019);46(January):36-44.
81. Chen Y, Jiang W, Yong H, He M, Yang Y, Deng Z, Li Y. Macrophages in osteoarthritis: Pathophysiology and therapeutics. *Am J Transl Res* (2020);12(1):261-268.
82. Utomo L, van Osch GJVM, Bayon Y, Verhaar JAN, Bastiaansen-Jenniskens YM. Guiding synovial inflammation by macrophage phenotype modulation: an in vitro study towards a therapy for osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* (2016);24(9):1629-1638.
83. Lee H, Kim H, Seo J, Choi K, Lee Y, Park K, Kim S, Mobasheri A, Choi H. TissueGene-C promotes an anti-inflammatory micro-environment in a rat monoiodoacetate model of osteoarthritis via polarization of M2 macrophages leading to pain relief and structural improvement. *Inflammopharmacology* (2020);28(5):1237-1252.
84. Hao X, Wang S, Zhang J, Xu T. Effects of body weight-supported treadmill training on cartilage-subchondral bone unit in the rat model of posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Res* (2021);39(6):1227-1235.

85. Hsieh YL, Yang CC. Early intervention of swimming exercises attenuate articular cartilage destruction in a rat model of anterior cruciate ligament and meniscus knee injuries. *Life Sci* (2018);212(October):267-274.
86. Assis L, Tim C, Magri A, Fernandes KR, Vassão PG, Renno ACM. Interleukin-10 and collagen type II immunoexpression are modulated by photobiomodulation associated to aerobic and aquatic exercises in an experimental model of osteoarthritis. *Lasers Med Sci* (2018);33(9):1875-1882.
87. Stremmel C, Schuchert R, Wagner F, et al. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat Commun* (2018);9(1).
88. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* (2016);44(3):439-449.
89. Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* (2005);106(9):3004-3011.
90. Wu CL, Harasymowicz NS, Klimak MA, Collins KH, Guilak F. The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair. *Osteoarthr Cartil* (2020);28(5):544-554.
91. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S. Synovial tissue macrophages: Friend or foe? *RMD Open* (2017);3(2):1-10.
92. Furth V. Origin and turnover of monocytes and macrophages. In *Cell Kietics of Inflammatory Reaction*, (Iversos, O. H., ed. Springer-Verlag Berlin 1989:125-150.

93. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* (2013);38(1):79-91.

8. 補足資料

8.1. 染色手順

8.1.1. Hematoxylin Eosin 染色

| Hematoxylin Eosin (HE) 染色 | | |
|---------------------------|-----------|-----|
| | キシレン | 4分 |
| | キシレン | 4分 |
| | キシレン | 4分 |
| 脱パラフィン | 100%エタノール | 3分 |
| | 90%エタノール | 3分 |
| | 80%エタノール | 3分 |
| | 70%エタノール | 3分 |
| 染色 | 流水 | 1分 |
| | ヘマトキシリン | 10分 |
| | 流水 | 1分 |
| | エオジン | 10分 |
| 脱水 | 80%エタノール | 3分 |
| | 90%エタノール | 3分 |
| | 100%エタノール | 3分 |
| 透徹 | キシレン | 3分 |
| | キシレン | 3分 |
| 封入 | | |

8.1.2. Safranin-O Fast Green 染色

| Safranin-O Fast Green 染色 | | |
|--------------------------|----------------|-----|
| | キシレン | 4分 |
| | キシレン | 4分 |
| | キシレン | 4分 |
| 脱パラフィン | 100%エタノール | 3分 |
| | 90%エタノール | 3分 |
| | 80%エタノール | 3分 |
| | 70%エタノール | 3分 |
| 染色 | 流水 | 1分 |
| | ヘマトキシリン | 5分 |
| | 流水 | 1分 |
| | 0.1%ファストグリーン溶液 | 5分 |
| | 1%酢酸溶液 | 15秒 |
| | 0.5%サフラニン溶液 | 5分 |
| 脱水 | 100%エタノール | 5分 |
| | 100%エタノール | 5分 |
| | 100%エタノール | 5分 |
| 透徹 | キシレン | 3分 |
| | キシレン | 3分 |
| 封入 | | |

8.1.3. 免疫組織化学染色

| 免疫組織化学染色 | | |
|----------|--|------------|
| 脱パラフィン | キシレン | 4分 |
| | キシレン | 4分 |
| | キシレン | 4分 |
| | 100%エタノール | 3分 |
| | 90%エタノール | 3分 |
| | 80%エタノール | 3分 |
| | 70%エタノール | 3分 |
| 内因性POD抑制 | 洗浄 (PBS) | 3分 × 2 |
| | 0.3% H ₂ O ₂ メタノール溶液 | 30分 |
| ブロッキング | 洗浄 (PBS) | 3分 × 2 |
| | 正常ヤギ血清 | 20分 |
| 一次抗体反応 | 一次抗体溶液 | Over night |
| | 洗浄 (PBS) | 3分 × 2 |
| 二次抗体反応 | 二次抗体溶液 | 30分 |
| | 洗浄 (PBS) | 3分 × 2 |
| 増感反応 | ABC溶液 | 30分 |
| | 洗浄 (PBS) | 3分 × 2 |
| 発色 | DAB溶液 | 1分 |
| 核染色 | ヘマトキシリン | 1分 |
| | 流水 | 1分 |
| 脱水 | 80%エタノール | 3分 |
| | 90%エタノール | 3分 |
| | 100%エタノール | 3分 |
| 透徹 | キシレン | 3分 |
| | キシレン | 3分 |
| 封入 | | |

8.2. 使用抗体一覧

| 抗体 | 製造会社 | 製品番号 | 希釈倍率 |
|-----------|---------------------------|------------|-------|
| Gremlin-1 | Abcam | ab231065 | 1/200 |
| MMP-13 | Abcam | ab39012 | 1/250 |
| ADAMTS4 | Bioss Antibodies | bs-4191R | 1/100 |
| TLR4 | Abcam | ab13867 | 1/250 |
| IL-4 | Gene Tex | GTX66741 | 1/100 |
| CD68 | Abcam | ab125212 | 1/100 |
| iNOS | Cell Signaling Technology | 2977S | 1/200 |
| CD206 | Proteintech | 18704-1-AP | 1/500 |

8.3. スコアリング方法

8.3.1. OARSI スコア

| グレード | OARSIスコア |
|------|------------------------------------|
| 0 | 変化なし |
| 0.5 | 構造変化はないが、染色性が低下している |
| 1 | 軟骨の欠損はないが、表層の線維化が生じている |
| 2 | 軟骨表層への亀裂やいくつかの表層の欠損 |
| 3 | 関節軟骨表面の25%未満の範囲に石灰化軟骨層への亀裂やびらんがある |
| 4 | 関節軟骨表面の25-50%の範囲に石灰化軟骨層への亀裂やびらんがある |
| 5 | 関節軟骨表面の50-75%の範囲に石灰化軟骨層への亀裂やびらんがある |
| 6 | 関節軟骨表面の75%以上の範囲に石灰化軟骨層への亀裂やびらんがある |

8.3.2. 滑膜炎スコア

| グレード | 滑膜炎スコア |
|------|-----------------------------------|
| 0 | 変化なし(1-2層) |
| 1 | 細胞層の増殖(3-4層)、滑膜下層への僅かな浸潤 |
| 2 | 細胞層の増殖(3-4層)、滑膜下層への浸潤 |
| 3 | 細胞層の増殖(4層以上)、滑膜下層への浸潤と炎症性細胞の僅かな浸潤 |
| 4 | 細胞層の増殖(4層以上)、滑膜下層への浸潤と炎症性細胞の浸潤 |

9. 参考論文

論文 I



Original Article

Impact of Controlling Abnormal Joint Movement on the Effectiveness of Subsequent Exercise Intervention in Mouse Models of Early Knee Osteoarthritis

CARTILAGE
1–11
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1947603519885007
journals.sagepub.com/home/CAR

Yuichiro Oka¹, Kenji Murata², Takuma Kano¹, Kaichi Ozone¹, Kohei Arakawa¹, Takanori Kokubun², and Naohiko Kanemura²

Abstract

Objective. Moderate mechanical stress is necessary for preserving the cartilage. The clinician empirically understands that prescribing only exercise will progress osteoarthritis (OA) for knee OA patients with abnormal joint movement. When prescribing exercise for OA, we hypothesized that degeneration of articular cartilage could be further prevented by combining interventions with the viewpoint of normalizing joint movement. **Design.** Twelve-week-old ICR mice underwent anterior cruciate ligament transection (ACL-T) surgery in their right knee and divided into 4 groups: ACL-T, controlled abnormal joint movement (CAJM), ACL-T with exercise (ACL-T/Ex), CAJM with exercise (CAJM/Ex). Animals in the walking group were subjected to treadmill exercise 6 weeks after surgery, which included walking for 18 m/min, 30 min/d, 3 d/wk for 4 weeks. Joint instability was measured by anterior drawer test, and safranin-O staining and immunohistochemical staining were performed. **Results.** OARSI (Osteoarthritis Research Society International) score of ACL-T/Ex group showed highest among 4 groups ($P < 0.001$). And CAJM/Ex group was lower than ACL-T/Ex group. Positive cell ratio of IL-1 β and MMP-13 in CAJM/Ex group was lower than ACL-T/Ex group ($P < 0.05$). **Conclusions.** We found that the state of the intra-articular environment can greatly influence the effect of exercise on cartilage degeneration, even if exercise is performed under the same conditions. In the CAJM/Ex group where joint movement was normalized, abnormal mechanical stress such as shear force and compression force accompanying ACL cutting was alleviated. These findings may highlight the need to consider an intervention to correct abnormal joint movement before prescribing physical exercise in the treatment of OA.

Keywords

articular cartilage, tissue, knee osteoarthritis, exercise, joint instability

Introduction

Knee osteoarthritis (OA) is caused by articular cartilage degeneration and its progression results in arthralgia, motor dysfunction, and impairment of activities of daily living. As societies are aging worldwide, it is imperative to develop strategies for extending the healthy life expectancy and minimizing medical expenses associated with aging-specific disorders such as OA. In this context, substantial effort has been expended to elucidate the pathology of OA and to develop therapeutic methods. However, to date, only symptomatic treatment is available for OA.

It is currently accepted that moderate mechanical stress is necessary for preserving the cartilage. In rats with healthy cartilage, treadmill exercise was associated with increased expression of factors involved in extracellular matrix synthesis, as well as with suppression of inflammatory factors.¹ Therefore, exercise is required for cartilage preservation.

Furthermore, recent evidence from animal models of surgically induced OA indicates that the progression of cartilage degeneration can be delayed by moderate exercise.²⁻⁷

On the other hand, joint instability induces excessive mechanical stress and contributes to OA onset and

¹Department of Health and Social Services, Health and Social Services, Graduate School of Saitama Prefectural University, Koshigaya, Saitama, Japan

²Department of Physical Therapy, Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Saitama, Japan

Supplementary material for this article is available on the *Cartilage* website at <https://journals.sagepub.com/home/car>.

Corresponding Author:

Naohiko Kanemura, Department of Physical Therapy, Health and Social Services, Saitama Prefectural University, 820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan.
Email: kanemura-naohiko@spu.ac.jp

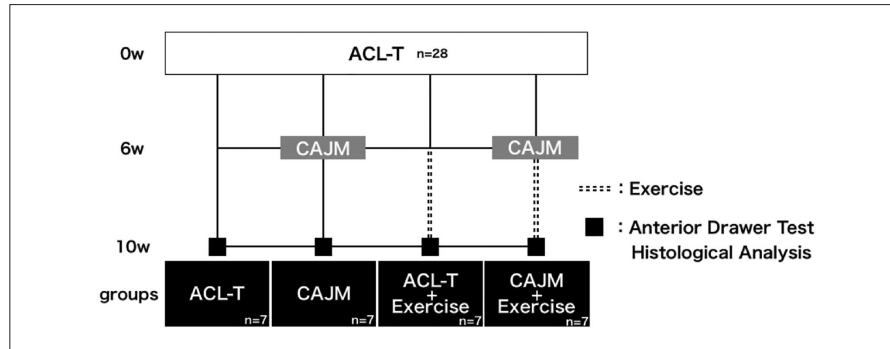


Figure 1. Experimental design. anterior drawer test, histological evaluation, and immunohistochemical evaluation were performed. These analyses involved the ACL-T group without exercise intervention, CAJM group without exercise intervention, ACL-T with exercise intervention (ACL-T/Ex) group, and CAJM with exercise intervention (CAJM/Ex) group (for each group, $n = 7$). ACL-T, anterior cruciate ligament transection; CAJM, controlled abnormal joint movement.

progression.⁸ In addition, joint instability resulting from knee joint ligament injury, meniscus damage, or malalignment leads to inflammation and cartilage degeneration.^{9,10} Many patients with knee OA have joint instability, and the characteristic gait disturbance in such patients is involved in OA progression.¹¹⁻¹³ The association between joint instability and knee OA is well established.

Studies using animal models of OA aim to elucidate the mechanisms underlying the onset and progression mechanisms of OA. The anterior cruciate ligament transection (ACL-T) model, which is a commonly used animal model of surgically induced OA, involves cutting the ACL in order to induce joint instability and progression to OA. However, studies based on ACL-T cannot clarify the influence of biological factors such as inflammation accompanying ligament rupture or secondary joint instability. In contrast, the controlled abnormal joint movement (CAJM) model, proposed by Murata *et al.*^{14,15} and Onitsuka *et al.*¹⁶ involves ACL-T followed by another surgical procedure to re-stabilize the joint and reduce joint instability. In the CAJM model, the expression of inflammatory factors and cartilage matrix degrading factors is suppressed, joint instability is reduced, and progression to OA is slower.

Previous studies often used models involving ACL-T or destabilization of the medial meniscus to examine the effect of exercise intervention. However, in all such studies, exercise intervention was performed in the presence of joint instability caused by ligament rupture. Therefore, the impact of joint instability on the effectiveness of exercise intervention is unknown.

We hypothesized that exercise intervention is more effective at preventing the degeneration of articular

cartilage in knee OA if joint instability is controlled. In the present study, we used mouse models of surgically induced OA to test this hypothesis.

Methods

Animals and Experimental Design

This study was approved by the Animal Research Committee of Saitama Prefectural University (approval number: 29-12), and the animals were handled in accordance with the relevant legislation and institutional guidelines for humane animal treatment. This study used 28 adults (12-week-old) ICR (Institute for Cancer Research) male mice. The mice were divided into 4 experimental groups: ACL-T without exercise intervention, CAJM without exercise intervention, ACL-T with exercise intervention (ACL-T/Ex), and CAJM with exercise intervention (CAJM/Ex) (**Fig. 1**). All mice were housed 2 to a plastic cage maintained at a temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12-hour light/dark cycle.

Surgical Procedures

The ACL-T and CAJM procedures were performed with the mice under a combination anesthetic (medetomidine, 0.375 mg/kg; midazolam, 2.0 mg/kg; and butorphanol, 2.5 mg/kg). To induce knee OA in the right hind limb, the medial capsule was exposed, and the ACL was transected using scissors. For mice assigned to ACL-T groups, the joint was loosely stitched using thread. For mice assigned to CAJM groups, a 25-gauge needle was used to create bone tunnels

in the anterior portion of the proximal tibia and in the posterior portion of the femoral condyle in order to decrease the anterior translation of the tibia onto the femur. Subsequently, 4-0 nylon thread was passed through the bone tunnels to compensate for ACL function and help control the anterior translation of the tibia. The results of verifying the validity of the model were added to the supplemental material.

Anterior Drawer Test

To assess knee joint instability, the anterior drawer test was performed using a constant force spring (0.05 kgf; Sanko Spring Co., Ltd., Fukuoka, Japan) and a soft X-ray device (M-60; Softex Co., Ltd., Kanagawa, Japan). The right hind limb was collected for this experiment. The half of the quadriceps proximal to the femur and the hamstrings were cut with scissors, and then the femur was fixed with a clamp. The test pulled the proximal tibia forward with 4-0 nylon thread. The radiographic parameters were as follows: tube potential, 28 kV; tube current, 1.5 mA; exposure time, 1 second. The image was digitized using a NAOMI digital image sensor (RF Co., Ltd., Nagano, Japan). Based on the soft X-ray image, anterior displacement was quantified using dedicated image analysis software (Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Treadmill Exercise Intervention

Mice allocated to the exercise groups (ACL-T/Ex and CAJM/Ex) were exercised on a rodent treadmill. After the mice in the CAJM groups underwent the second surgery, all mice were allowed to become familiarized with the treadmill environment for 3 days. Afterward, the mice allocated to exercise groups were exercised on the treadmill at a constant speed of 18 m/min for 30 min/d, 3 d/wk, for 4 weeks.

Histological Analysis

At the end of the study period, the mice were sacrificed, and the knee joint was collected and fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline for 24 hours, followed by decalcification in 10% ethylenediaminetetraacetic acid for 21 days, dehydration in 70% and 100% ethanol and xylene, and embedding in paraffin blocks. Thin sections (7 μm) were cut in the sagittal plane using a microtome (ROM-360; Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Saitama, Japan), stained with safranin-O/fast green, and subjected to histology evaluation to estimate the degree of cartilage damage. The Osteoarthritis Research Society International (OARSI) histopathology grading system was used to assess cartilage damage reflected as structural changes and fibrillation lesions.¹⁷ Two independent observers (T Kano and KO) performed OARSI scoring on a scale of 8 stages (0, 0.5, 1-6), and the average value was retained. Furthermore, cartilage

roughness and thickness were evaluated as characteristics of degenerative OA. Cartilage thickness was measured in the tibia anterior and tibia posterior regions. For each region, the roughness of the cartilage surface was calculated as the ratio between the actual length along the articular surface and the length of an approximately straight line connecting 2 points in the region of interest.

Definition of Regions

Two regions of interest were used in this study, namely the tibia anterior and tibia posterior. The tibia anterior was defined as the region beyond the outer edges of the anterior meniscal horn, while the tibia posterior was defined as the region beyond the outer edges of the posterior meniscal horn.

Immunohistochemical Analysis

In this study, we examined interleukin-1 β (IL-1 β) as a marker of inflammation and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) as a marker of tissue catabolism. To evaluate the expression of IL-1 β and MMP-13, we performed immunohistochemical staining using the avidin-biotinylated enzyme complex method and the VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The tissue sections were deparaffinized with xylene and ethanol, and antigen activation was carried out using proteinase K (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA) for 30 minutes. Endogenous peroxidase was inactivated with 0.3% H₂O₂/ethanol (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) for 30 minutes. Nonspecific binding of the primary antibody was blocked using normal goat serum for 20 minutes, and then the sections were incubated with anti-IL-1 β and anti-MMP-13 primary antibodies overnight at 4°C. Afterward, the sections were incubated with biotinylated secondary antibody anti-rabbit IgG and stained with aniline. For analysis, we calculated the ratio between the number of IL-1 β - or MMP-13-positive cells and the number of chondrocytes in an articular cartilage area of 10000 μm^2 (100 μm \times 100 μm).

Statistical Analysis

All analyses were performed using R version 3.5.1 (<http://www.R-project.org/>). First, the Shapiro-Wilk test was used to check for normality of the distribution for each data set. To clarify the impact of joint instability on the effectiveness of exercise intervention in knee OA, the following data were compared among the 4 experimental groups (ACL-T, ACL-T/Ex, CAJM, CAJM/Ex) using analysis of variance with Tukey's *post hoc* test: tibia anterior displacement, OARSI score, cartilage thickness, and cartilage roughness. The percentages of IL-1 β - and MMP-13-positive cells were compared among groups using the Kruskal-Wallis test with

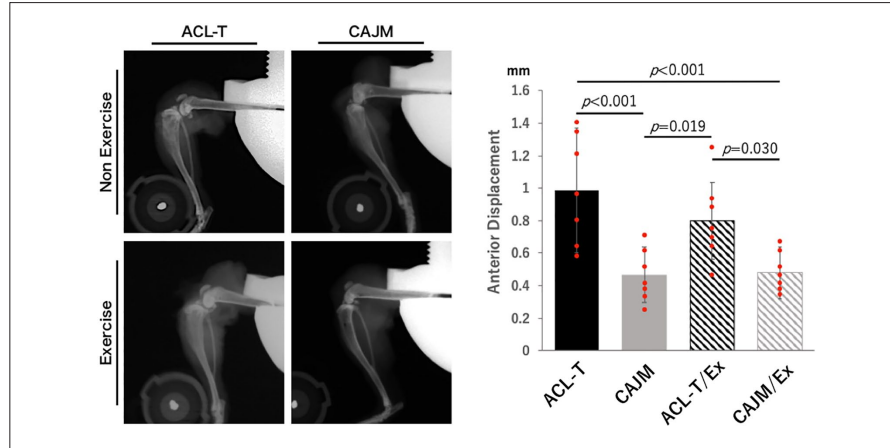


Figure 2. Knee joint instability with and without exercise intervention in mice stratified according to the joint environment following surgical induction of osteoarthritis (OA). (A) Representative soft X-ray radiograph taken during the anterior drawer test on the right knee joint of a mouse that had undergone surgical induction of knee OA followed by exercise intervention. (B) Tibial anterior displacement on the anterior drawer test. Tibial anterior displacement was significantly smaller in the CAJM and CAJM/Ex groups than in the ACL-T and ACL-T/Ex groups. Mice in the CAJM groups underwent joint re-stabilization after ACL-T. ACL-T, anterior cruciate ligament transection; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, with exercise.

Steel-Dwass *post hoc* analysis. Parametric data are shown as the mean with 95% confidence interval, whereas non-parametric data are shown as the median with interquartile range. All significance thresholds were set at 5%.

Results

X-Ray Radiography

Joint instability was quantified using X-ray radiography with the anterior drawer test (Fig. 2A).

Compared with the ACL-T and ACL-T/Ex groups, the CAJM and CAJM/Ex groups had significantly lower anterior displacement of the tibia (CAJM vs ACL-T, $P < 0.001$; CAJM vs ACL-T/Ex, $P = 0.019$; CAJM/Ex vs ACL-T, $P < 0.001$; CAJM/Ex vs ACL-T/Ex, $P = 0.030$) (ACL-T, 0.99 [0.60-1.37] mm; CAJM, 0.47 [0.30-0.64] mm; ACL-T/Ex, 0.80 [0.56-1.04] mm; CAJM/Ex, 0.48 [0.32-0.64] mm) (Fig. 2B).

Histological Analysis

Chondrocyte hypertrophy in the anterior part of the articular cartilage was confirmed for both models (ACL-T and CAJM) but no significant OA progression was noted in any group (Fig. 3). Exercise groups had significantly lower

OARSI score than that noted for the nonexercise groups: ACL-T, 0.8 [0.3-1.2]; CAJM, 0.6 [0.2-1.0]; ACL-T/Ex, 0.6 [0.3-0.9]; CAJM/Ex, 0.6 [0.2-0.3] ($P = 0.754$). In the ACL-T/Ex group, marked surface fibrillation and reduction in cartilage thickness were noted in the posterior part of the articular cartilage, together with a significantly higher OARSI score than that noted for the other 3 groups (ACL-T/Ex vs. ACL-T, CAJM, or CAJM/Ex, $P < 0.001$) (ACL-T, 1.6 [0.8-2.3]; CAJM, 1.0 [0.4-1.6]; ACL-T/Ex, 3.6 [2.4-4.9]; CAJM/Ex, 1.1 [0.7-1.5]).

There was no significant difference among the 4 groups with regard to cartilage thickness in the anterior part (ACL-T, 175.6 [167.5-183.7] μm ; CAJM, 174.2 [166.9-181.5] μm ; ACL-T/Ex, 178.8 [171.9-185.6] μm ; CAJM/Ex, 169.7 [157.0-182.5] μm ; $P = 0.401$) (Fig. 4A). However, in the posterior part, cartilage thickness was significantly higher for the ACL-T/Ex group (ACL-T/Ex vs. ACL-T, CAJM, or CAJM/Ex, $p < 0.001$) (ACL-T, 140.0 [127.4-152.6] μm ; CAJM, 152.3 [139.0-165.6] μm ; ACL-T/Ex, 94.9 [86.8-103.0] μm ; CAJM/Ex, 152.0 [144.5-159.5] μm).

With regard to the roughness of the cartilage surface in the anterior part, there was no significant difference among the 4 groups (ACL-T, 103.5% [102.3%-104.7%]; CAJM, 103.1% [101.5%-104.8%]; ACL-T/Ex, 103.7% [100.3%-107.2%]; CAJM/Ex, 102.6 [101.7%-103.6%]; $P = 0.952$) (Fig. 4B). However, the cartilage roughness in the posterior

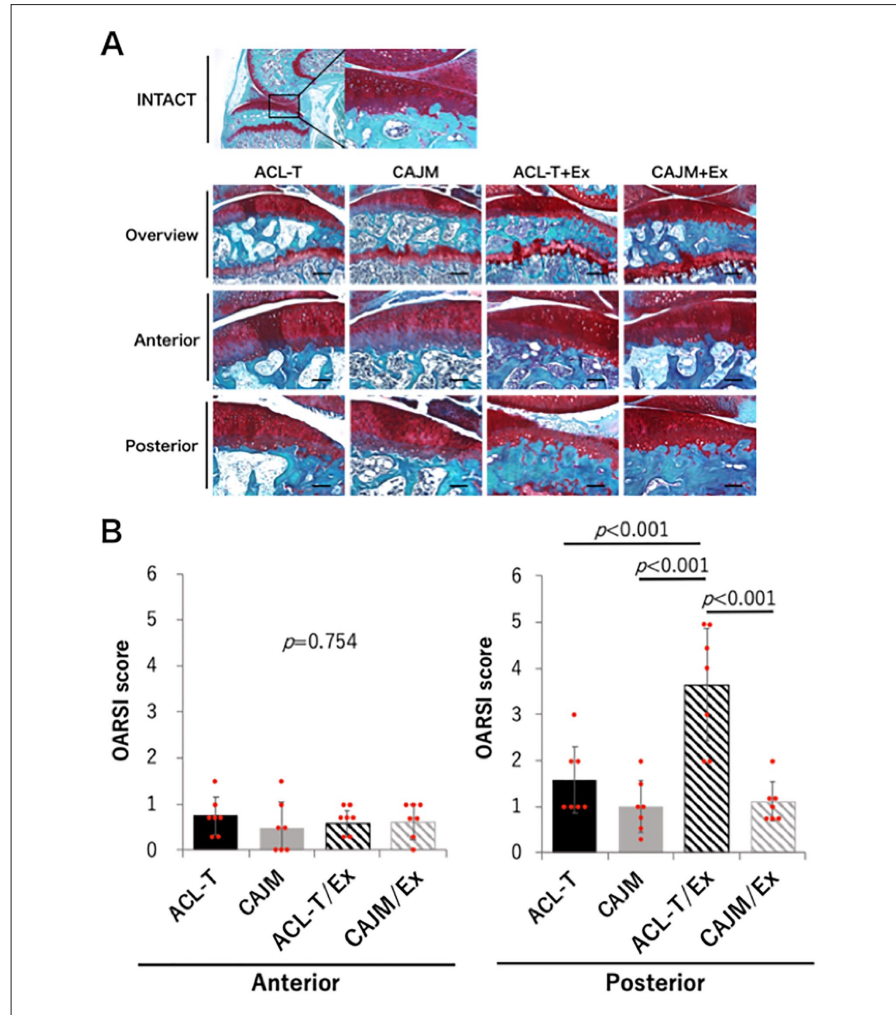


Figure 3. Knee cartilage degeneration with and without exercise intervention in mice stratified according to the joint environment following surgical induction of osteoarthritis. Mice in the CAJM groups underwent joint restabilization after ACL-T. **(A)** Results of safranin-O/fast green staining. None of the 4 groups exhibited significant degeneration of the cartilage in the anterior part of the joint. Irregularities in the superficial zone and decreased cartilage thickness in the posterior part of the joint were confirmed only for the ACL-T/Ex group. **(B)** OARSIS scores. There was no difference among the four groups regarding the OARSIS scores in the anterior part of the joint. The OARSIS scores in the posterior part were significantly higher for the ACL-T/Ex group. ACL-T, anterior cruciate ligament transection; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, with exercise; OARSIS, Osteoarthritis Research Society International.

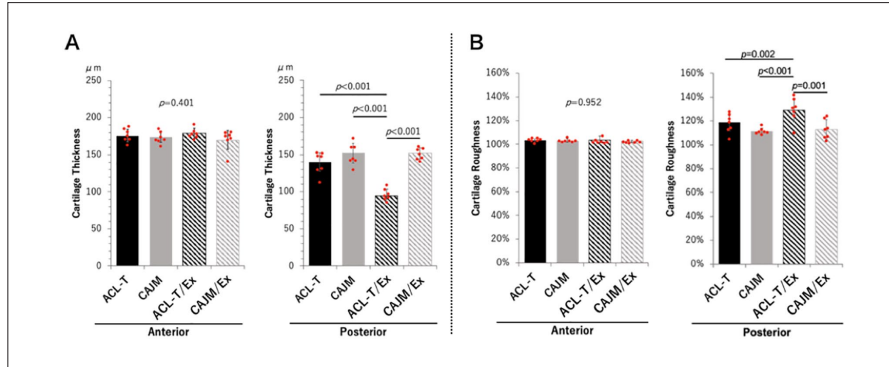


Figure 4. Knee cartilage thickness and roughness with and without exercise intervention in mice stratified according to the joint environment following surgical induction of osteoarthritis. Mice in the CAJM groups underwent joint restabilization after ACL-T. **(A)** Cartilage thickness. Decreased thickness was observed in the posterior part of the joint for the ACL-T/Ex group. **(B)** Cartilage surface roughness. Increased roughness was noted in the posterior part of the joint for the ACL-T/Ex group. ACL-T, anterior cruciate ligament transection; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, with exercise.

part was significantly higher for the ACL-T/Ex group (ACL-T/Ex vs. ACL-T, $P = 0.002$; ACL-T/Ex vs. CAJM, $P < 0.001$; ACL-T/Ex vs. CAJM/Ex, $P = 0.001$) (ACL-T, 118.9% [111.8%-125.9%], CAJM, 111.2% [108.5%-114.0%], ACL-T/Ex, 129.0% [119.2%-138.8%]; CAJM/Ex, 112.9% [104.4%-121.3%]).

With regard to inflammation, IL-1 β -positive cells were confirmed from the cartilage surface layer to the deep layer in the ACL-T, CAJM, and ACL-T/Ex groups but not in the CAJM/Ex group (Fig. 5A). The percentage of IL-1 β -positive cells in the anterior part of the cartilage was significantly higher in the ACL-T and ACL-T/Ex groups than in the CAJM/Ex group (ACL-T vs. CAJM/Ex, $P = 0.031$; ACL-T/Ex vs. CAJM/Ex, $P = 0.013$) (ACL-T, 32.2% [27.4%-42.1%]; CAJM, 24.6% [21.0%-34.5%]; ACL-T/Ex, 28.3% [27.5%-36.7%]; CAJM/Ex, 15.5% [13.4%-21.5%]) (Fig. 5B). A similar trend was noted for the posterior part of the cartilage, where the percentage of IL-1 β -positive cells was significantly higher for the ACL-T and ACL-T/Ex groups than for the CAJM/Ex group (ACL-T vs. CAJM/Ex and ACL-T/Ex vs. CAJM/Ex, $P = 0.048$) (ACL-T, 40.6% [34.3%-51.0%]; CAJM, 24.1% [17.2%-32.5%]; ACL-T/Ex, 35.8% [31.1%-38.0%]; CAJM/Ex, 20.0% [14.5%-24.9%]).

Similarly, MMP-13-positive cells were confirmed in the ACL-T and ACL-T/Ex groups, compared with very weak MMP-13 expression in the CAJM and CAJM/Ex groups (Fig. 5A). However, while no significant difference among the four groups was noted in terms of the percentage of MMP-13-positive cells in the anterior part of the cartilage

(ACL-T, 32.2% [32.0%-38.1%]; CAJM, 32.6% [23.3%-43.5%]; ACL-T/Ex, 41.1% [36.0%-51.8%]; CAJM/Ex, 33.8% [30.0%-42.4%]; $P = 0.382$), the percentage of MMP-13-positive cells in the posterior part of the cartilage was significantly higher for the ACL-T/Ex group than for the CAJM/Ex group (ACL-T/Ex vs. CAJM/Ex, $P = 0.020$) (ACL-T, 51.5% [45.3%-58.2%]; CAJM, 33.4% [27.6%-43.1%]; ACL-T/Ex, 55.2% [43.5%-59.1%]; CAJM/Ex, 32.9% [31.0%-36.5%]) (Fig. 5C).

Discussion

Previous studies reported that exercise alone could delay the progress of OA. However, our present results indicate that the internal environment of the joint strongly modulates the effect of exercise, sometimes completely canceling the benefit. In other words, when prescribing exercise, we need to consider the internal environment of the knee joint. This is the first study to assess and confirm the impact of controlling abnormal joint movement on the effectiveness of exercise therapy in knee OA.

Certain aspects of our results warrant further discussion. First, histological analysis revealed no difference between the ACL-T and CAJM groups regarding OARSI score, IL-1 β -positive cell percentage, or MMP-13-positive cell percentage. Murata *et al.*¹⁴ and Onitsuka *et al.*,¹⁶ who used the same CAJM model, also found no difference in OARSI score at 4 weeks after intervention but did report that differences could be seen after 8 or 12 weeks. These findings suggest that a follow-up of 4 w after joint intervention

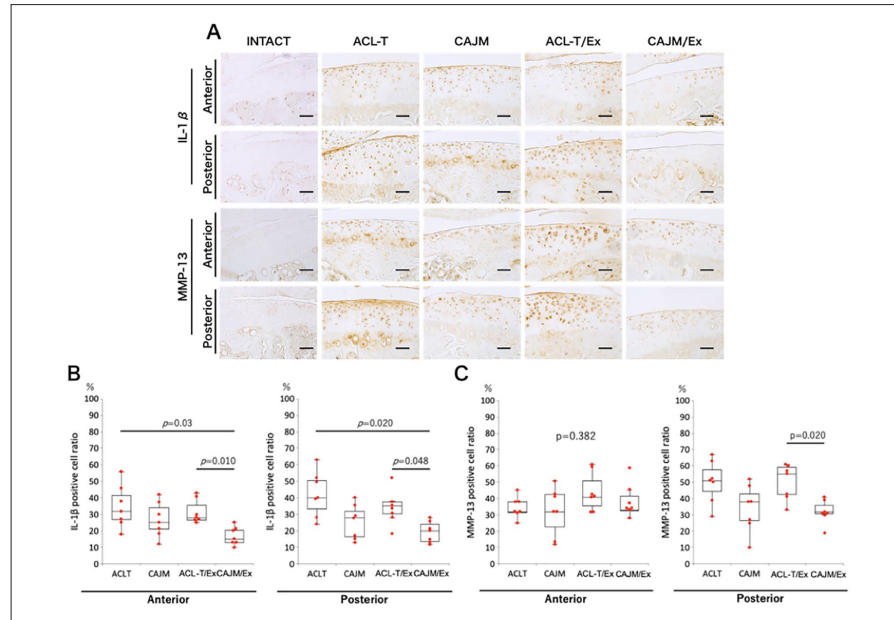


Figure 5. Knee inflammation and tissue catabolism with and without exercise intervention in mice stratified according to the joint environment following surgical induction of osteoarthritis. Mice in the CAJM groups underwent joint restabilization after ACL-T. **(A)** Representative immunohistochemical stains for IL-1 β and MMP-13. **(B)** Percentage of IL-1 β -positive cells. The percentage of IL-1 β -positive cells was lower in the CAJM/Ex group than in the ACL-T and ACL-T/Ex groups. **(C)** Percentage of MMP-13-positive cells. The percentage of positive cells in the posterior part of the joint was lower in the CAJM/Ex group than in the ACL-T/Ex group. ACL-T, anterior cruciate ligament transection; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, with exercise; IL-1 β , interleukin-1 β ; MMP-13, matrix metalloproteinase-13.

might be insufficient to reveal the influence of the internal joint environment on cartilage degeneration by OARSI score. On the other hand, Murata *et al.*,¹⁴ reported a difference in tumor necrosis factor (TNF)- α levels even if the absence of a difference in OARSI scores. In other words, whereas only IL-1 β and MMP-13 were examined in this study, ACL-T and CAJM may differ in terms of other factors related to cartilage degeneration.

Interestingly, we found that the OARSI score was significantly higher for the ACL-T/Ex group than for the other three groups. Moreover, in the ACL-T/Ex group, the cartilage thickness was lower, and the roughness of the cartilage surface layer was substantially higher than for the other groups. High OARSI score, decreased cartilage thickness,^{14,18,19} and increased surface roughness^{20,21} are pathological findings characteristic of OA. In the ACL-T model, forward dislocation of the tibia is clearly visible on X-ray

radiography. In addition, osteophytes start to develop on the posterior part of the tibia as soon as at 2 weeks after ACL-T, and the osteophyte volume increases with time.^{22,23} Onur *et al.*²⁴ reported that degeneration of the articular cartilage progresses after ACL-T but not only due to compressive force. In other words, the ACL-T model exhibits forward instability of the tibia and results in OA onset and progression. In the present study, we found worse OARSI score after ACL-T with exercise alone (ACL-T/Ex), which was different from the previous study. Previous reports indicate that moderate-intensity exercise helps preserve the articular cartilage while high-intensity exercise accelerates OA.²⁵⁻²⁸ Our present study is the first to include treadmill exercise in a mouse OA model, whereas previous studies focused mainly on rats. Mice are small compared with rats and, when exercising under the same conditions, would need to perform a higher number of steps. In other words, in our

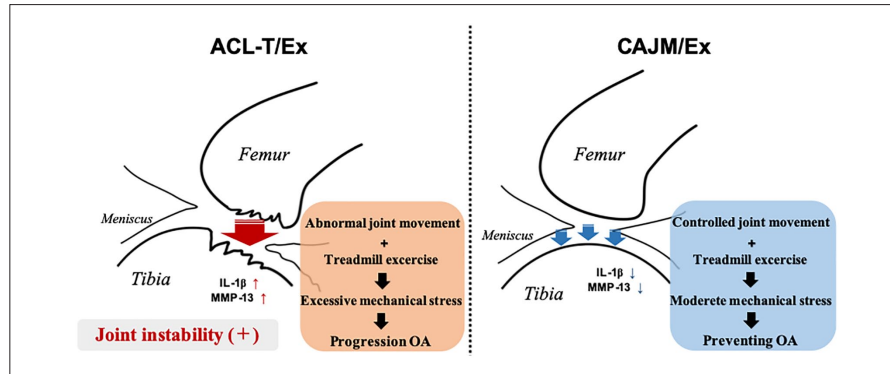


Figure 6. It is necessary to consider surgical intervention to correct abnormal joint movement before prescribing physical exercise in the treatment of knee osteoarthritis.

study targeting mice, the treadmill exercise was conducted at high intensity, which might have accelerated OA progression in the ACL-T/Ex group. On the other hand, mice in the CAJM/Ex group were subjected to the same exercise regime and did not exhibit OA progression. In the CAJM/Ex group, abnormal joint movement during exercise was controlled, which reduced abnormal shear and compression forces and thus might have prevented OA progression. Taken together, our results indicate not only that cartilage degeneration can be prevented by improving the intraarticular environment, thus improving the quality of joint motion during exercise, but that this protective effect holds even at high-intensity exercise, which would otherwise promote OA.

Compared with the CAJM/Ex group, the ACL-T/Ex group exhibited a higher percentage of IL-1 β -positive cells throughout the entire articular cartilage, and a higher percentage of MMP-13-positive cells in the posterior portion of the cartilage. IL-1 β and MMP-13 promote cartilage catabolism and inflammation, serving as representative biomarkers of OA, though it should be highlighted that OA is a complex condition.^{29,30} Previous reports showed that abnormal mechanical stress causes an increase in inflammatory factors and cartilage matrix degrading factors,³¹ and that IL-1 β and MMP-13 levels increase with the intensity of the stress on the articular cartilage, supporting the role of these proteins as cartilage degeneration factors produced in OA. On the other hand, IL-1 β levels were increased throughout the cartilage and not only in the posterior part of the tibia, suggesting that this may simply be the result of direct mechanical stress. Biomechanical changes in knee joint following ACL-T are characterized by decreased aggrecan and collagen gene expression in chondrocytes and synovial cells.³² In addition, abnormal knee mechanics lead to

increased IL-1 β , TNF- α , and MMP expression in the entire knee joint, including the synovium and synovial fluid.^{33,34} Thus, it is possible that ACL-T-induced changes in the synovial fluid affect the entire environment of the joint enclosed in the synovial membrane. In this study, we confirmed that not only the cartilage lesion but also the insult to the tendon (ACL-T) causes an inflammatory response throughout the joint, with increased IL-1 β expression both on the anterior and posterior part of the tibia, and that this response is due to the mechanical abnormality.

Cartilage matrix-degrading proteinases, evaluated here in terms of MMP-13, are expressed in the articular cartilage not only due to the increase in inflammatory factors such as IL-1 β but also due to chondrocyte hypertrophy, which occurs in response to abnormal mechanical stress.^{35,36} In terms of MMP-13 expression, there was no difference between the ACL-T group and the CAJM group for either side of the articular cartilage. However, MMP-13 expression on the posterior part of the tibia was increased in the ACL-T/Ex group and decreased in the CAJM/Ex group, suggesting that the abnormal joint movement, which was not controlled in the ACL-T/Ex group, resulted in concentration of stress on the posterior tibia, with corresponding expression of matrix-degrading proteinases in addition to the inflammatory reaction. Meanwhile, such concentration of stress did not occur in the CAJM/Ex group, suggesting that it is possible to avoid local accumulation of stress in the joint by imposing exercise therapy after controlling abnormal joint movement, thus suppressing the expression of MMP-13 through the anti-inflammatory action of exercise.

The exact influence of physical therapy intervention on cartilage degeneration remains unclear. Although correcting abnormal joint movement is generally the most important

focus of physical therapy in patients with knee OA, especially in the clinical setting, the relationship with cartilage degeneration has not been elucidated. In the present study, we found that the state of the intra-articular environment can greatly influence the effect of exercise on cartilage degeneration, even if exercise is performed under the same conditions. In the clinical setting, these findings may translate in the need to consider an intervention to correct abnormal joint movement before prescribing physical exercise in the treatment of OA (Fig. 6).

There are some points to consider when interpreting the results of this research. First, there was no difference between the CAJM group and CAJM/Ex group. Our expectation was that the CAJM/Ex group would have less damage, but there was no difference. Considering the increased OARSI score in the ACL-T/Ex group, having normal joint movement during walking appears to be more important to than exercising, with a treadmill for example, to prevent cartilage degeneration.

On the other hand, we think it is likely that the exercise intensity utilized in the present study was strong. Moderate exercise has been reported to have a protective effect on articular cartilage, such as reducing inflammatory factor expression and increasing the expression of cartilage matrix synthesis factors. In a rat model of OA, moderate exercise with beneficial effect is defined as treadmill running at a speed of 12 to 18 m/min, for 30 to 60 min/d, 3 to 7 d/wk. However, it is known that high-intensity exercise adversely affects cartilage. Therefore, setting the exercise intensity within an adequate range is important to clarify the relationship between exercise and OA. Studies in mice typically do not involve the use of a treadmill and instead use a rotating cylinder. While the exact protocol depends on the lineage, mice typically perform active exercise in the rotating cylinder at a rate of 15 to 25 m/min per day. Therefore, with reference to the rat model, we set the treadmill speed to 18 m/min, the exercise duration to 30 min/d, and the exercise frequency to 3 d/wk, expecting that this protocol would be within the comfortable range for mice. Therefore, by implementing various exercise protocols in the future, it may be possible to prevent cartilage degeneration by exercise alone. If the appropriate conditions are found, then the CAJM/Ex paradigm may be more effective than CAJM alone.

Second, the therapeutic intervention period was short (4 weeks), and only 1 time point was analyzed. According to the results of immunostaining, we believe that mice in the CAJM/Ex group might also be protected from future articular degeneration, though this is only speculation, as we did not conduct analyses at a later time. However, it is worth noting that Assis *et al.*,¹⁹ who conducted similar investigations in a rat ACL-T model, reported no change in OARSI scores later than 4 weeks. Further research is warranted, where each treatment effect is analyzed in detail.

Third, among the many peripheral factors involved in OA-related cartilage degeneration, our study focused only on IL-1 β and MMP-13. Other inflammation and degradation factors including TNF- α , IL-6, MMP-3, and ADAMTS-5 might account for some of the conclusions drawn in this study. Tissue inhibitors of metalloproteinases inhibit MMPs (i.e., substrate degrading factors) and contribute to maintaining cartilage homeostasis. Further investigation of such factors is warranted. Furthermore, although immunostaining is the optimal method for confirming cellular localization, this technique cannot be used to quantify the expression of the factors of interest. Further studies should conduct quantitative and kinetic analysis of the gene expression of inflammatory factors and cartilage matrix degrading factors

Author Contributions

All authors approved the final version to be published. Study design: YO, KM, T Kokubun, and NK. Data collection, Histological analysis: YO, T Kano, KO, and KA. Manuscript composition: YO, KM, T Kokubun, and NK.

Acknowledgments and Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical Approval

This study was approved by the Animal Research Committee of Saitama Prefectural University (approval number: 29-12).

Animal Welfare

The animals were handled in accordance with the relevant legislation and institutional guidelines for humane animal treatment.

ORCID iD

Yuichiro Oka  <https://orcid.org/0000-0002-9107-6320>

References

- Blazek AD, Nam J, Gupta R, Pradhan M, Perera P, Weisleder NL, *et al.* Exercise-driven metabolic pathways in healthy cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(7):1210-22. doi:10.1016/j.joca.2016.02.004
- Nam J, Perera P, Liu J, Wu LC, Rath B, Butterfield TA, *et al.* Transcriptome-wide gene regulation by gentle treadmill walking during the progression of monoiodoacetate-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(6):1613-25. doi:10.1002/art.30311
- Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Honrionnet C, Loeuille D, *et al.* Dose-response relationship

- for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(10):779-86. doi:10.1016/j.joca.2004.06.008
4. Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Zhang X, *et al*. Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2013;31(7):1026-31. doi:10.1002/jor.22332
 5. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Yamaguchi S, Nagai M, Tajino J, *et al*. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(9):1563-74. doi:10.1016/j.joca.2015.04.015
 6. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Yamaguchi S, Nagai M, *et al*. Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(6):1092-102. doi:10.1016/j.joca.2016.01.006
 7. Iijima H, Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Kiyari W, *et al*. Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(6):964-75. doi:10.1016/j.joca.2016.12.008
 8. Tochigi Y, Vaseenon T, Heiner AD, Fredericks DC, Martin JA, Rudert MJ, *et al*. Instability dependency of osteoarthritis development in a rabbit model of graded anterior cruciate ligament transection. *J Bone Joint Surg Am*. 2011;93(7):640-7. doi:10.2106/JBJS.J.00150
 9. Hada S, Ishijima M, Kaneko H, Kinoshita M, Liu L, Sadatsuki R, *et al*. Association of medial meniscal extrusion with medial tibial osteophyte distance detected by T2 mapping MRI in patients with early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):201. doi:10.1186/s13075-017-1411-0
 10. Hunter DJ, Zhang YQ, Niu JB, Tu X, Amin S, Clancy M, *et al*. The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):795-801. doi:10.1002/art.21724
 11. Sharma L, Lou C, Felson DT, Kirwan-Mellis G, Dunlop DD, Hayes KW, *et al*. Laxity in healthy and osteoarthritis knees. *Arthritis Rheum*. 1999;42(5):861-70. doi:10.1002/1529-0131(199905)42
 12. Van der Esch M, Van der Leeden M, Roorda LD, Lems WF, Dekker J. Predictors of self-reported knee instability among patients with knee osteoarthritis: results of the Amsterdam osteoarthritis cohort. *Clin Rheumatol*. 2016;35(12):3007-13. doi:10.1007/s10067-016-3411-x
 13. Fukutani N, Iijima H, Fukumoto T, Uritani D, Kaneda E, Ota K, *et al*. Association of varus thrust with pain and stiffness and activities of daily living in patients with medial knee osteoarthritis. *Phys Ther*. 2016;96(2):167-75. doi:10.2522/ptj.20140441
 14. Murata K, Kanemura N, Kokubun T, Fujino T, Morishita Y, Onitsuka K, *et al*. Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(2):297-308. doi:10.1016/j.joca.2016.10.011
 15. Murata K, Kokubun T, Morishita Y, Onitsuka K, Fujiwara S, Nakajima A, *et al*. Controlling abnormal joint movement inhibits response of osteophyte formation. *Cartilage*. 2018;9(4):391-401. doi:10.1177/1947603517700955
 16. Onitsuka K, Murata K, Kokubun T, Fujiwara S, Nakajima A, Morishita Y, *et al*. Effects of controlling abnormal joint movement on expression of MMP13 and TIMP-1 in osteoarthritis. *Cartilage*. Epub 2018 June 1. doi:10.1177/1947603518783449
 17. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE, Fuller CJ, Hurtig M, Cruz A. The OARSI histopathology initiative—recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(Suppl 3):S93-S105. doi:10.1016/j.joca.2010.05.025
 18. Ozawa J, Kaneguchi A, Tanaka R, Kawamata S, Kurose T, Moriyama H, *et al*. Interaction between gastrocnemius muscle weakness and moderate exercise deteriorates joint integrity in rat knee. *Scand J Med Sci Sport*. 2015;25(1):e11-e19. doi:10.1111/sms.12195
 19. Assis L, Milares LP, Almeida T, Tim C, Magri A, Fernandes KR, *et al*. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(1):169-77. doi:10.1016/j.joca.2015.07.020
 20. Maerz T, Newton MD, Kurdziel MD, Altman P, Anderson K, Matthew HWT, *et al*. Articular cartilage degeneration following anterior cruciate ligament injury: a comparison of surgical transection and noninvasive rupture as preclinical models of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(11):1918-27. doi:10.1016/j.joca.2016.06.013
 21. Maerz T, Newton MD, Matthew HWT, Baker KC. Surface roughness and thickness analysis of contrast-enhanced articular cartilage using mesh parameterization. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(2):290-8. doi:10.1016/j.joca.2015.09.006
 22. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, *et al*. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(7):632-41. doi:10.1016/j.joca.2005.03.004
 23. Hsia AW, Anderson MJ, Heffner MA, Lagmay EP, Zavadovskaya R, Christiansen BA. Osteophyte formation after ACL rupture in mice is associated with joint destabilization and loss of range of motion. *J Orthop Res*. 2017;35(3):466-73. doi:10.1002/jor.23252
 24. Onur TS, Wu R, Chu S, Chang W, Kim HT, Dang ABC. Joint instability and cartilage compression in a mouse model of posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2014;32(2):318-23. doi:10.1002/jor.22509
 25. Siebelt M, Groen HC, Koelewijn SJ, de Blois E, Sandker M, Waarsing JH, *et al*. Increased physical activity severely induces osteoarthritic changes in knee joints with papain induced sulfate-glycosaminoglycan depleted cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R32. doi:10.1186/ar4461
 26. Ni G, Lei L, Zhou Y. Intensity-dependent effect of treadmill running on lubricin metabolism of rat articular cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R256. doi:10.1186/ar4101
 27. Tang T, Muneta T, Ju YJ, Nimura A, Miyazaki K, Masuda H, *et al*. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of

- rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R13. doi:10.1186/ar2363
28. Sekiya I, Tang T, Hayashi M, Morito T, Ju YJ, Mochizuki T, *et al.* Periodic knee injections of BMP-7 delay cartilage degeneration induced by excessive running in rats. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1088-92. doi:10.1002/jor.20840
29. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, *et al.* The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(423):17-26. doi:10.1097/01.blo.0000131233.83640.91
30. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, *et al.* Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996;97(3):761-8. doi:10.1172/JCI118475
31. Lohmander LS, Dahlberg L, Ryd L, Heinegard D. Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury. *Arthritis Rheum.* 1989;32(11):1434-42.
32. Brandt K, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Med Clin North Am.* 2009;93(1):1-24.
33. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, *et al.* Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 2005;52(1):128-35. doi:10.1002/art.20776
34. Yang C, Lin C, Wang H, Lyu S. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in medial plica and pannus-like tissue contribute to knee osteoarthritis progression. *PLoS One.* 2013;8(11):e79662. doi:10.1371/journal.pone.0079662
35. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, *et al.* Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3492-501. doi:10.1002/art.21373
36. Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):128-49. doi:10.1016/j.addr.2006.01.020



Article

Treadmill Exercise after Controlled Abnormal Joint Movement Inhibits Cartilage Degeneration and Synovitis

Yuichiro Oka ¹, Kenji Murata ², Kaichi Ozone ¹, Takuma Kano ¹, Yuki Minegishi ¹, Aya Kuro-Nakajima ¹, Kohei Arakawa ¹, Takanori Kokubun ² and Naohiko Kanemura ^{2,*}

¹ Department of Health and Social Services, Health and Social Services, Graduate School of Saitama Prefectural University, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan; 2191001s@spu.ac.jp (Y.O.); 2191003x@spu.ac.jp (K.O.); 2291004n@spu.ac.jp (T.K.); 2191004f@spu.ac.jp (Y.M.); 2181301f@spu.ac.jp (A.K.-N.); murata-kenji@spu.ac.jp (K.A.)

² Department of Physical Therapy, Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan; 2191002a@spu.ac.jp (K.M.); kokubun-takanori@spu.ac.jp (T.K.)

* Correspondence: kanemura-naohiko@spu.ac.jp; Tel.: +81-48-971-0500



Citation: Oka, Y.; Murata, K.; Ozone, K.; Kano, T.; Minegishi, Y.; Kuro-Nakajima, A.; Arakawa, K.; Kokubun, T.; Kanemura, N. Treadmill Exercise after Controlled Abnormal Joint Movement Inhibits Cartilage Degeneration and Synovitis. *Life* **2021**, *11*, 303. <https://doi.org/10.3390/life11040303>

Academic Editor: Nina Ivanovska

Received: 20 February 2021

Accepted: 29 March 2021

Published: 1 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cartilage degeneration is the main pathological component of knee osteoarthritis (OA), but no effective treatment for its control exists. Although exercise can inhibit OA, the abnormal joint movement with knee OA must be managed to perform exercise. Our aims were to determine how controlling abnormal joint movement and treadmill exercise can suppress cartilage degeneration, to analyze the tissues surrounding articular cartilage, and to clarify the effect of treatment. Twelve-week-old ICR mice ($n = 24$) underwent anterior cruciate ligament transection (ACL-T) surgery on their right knees and were divided into three groups as follows: ACL-T, animals in the walking group subjected to ACL-T; controlled abnormal joint movement (CAJM), and CAJM with exercise (CAJM + Ex) ($n = 8$ /group). Walking-group animals were subjected to treadmill exercise 6 weeks after surgery, including walking for 18 m/min, 30 min/day, 3 days/week for 8 weeks. Safranin-O staining, hematoxylin-eosin staining, and immunohistochemical staining were performed. The OARSI (Osteoarthritis research Society international) score was lower in the CAJM group than in the ACL-T group and was even lower in the CAJM + Ex group. The CAJM group had a lower meniscal injury score than the ACL-T group, and the CAJM + Ex group demonstrated a less severe synovitis than the ACL-T and CAJM groups. The observed difference in the perichondrium tissue damage score depending on the intervention method suggests different therapeutic effects, that normalizing joint motion can solve local problems in the knee joint, and that the anti-inflammatory effect of treadmill exercise can suppress cartilage degeneration.

Keywords: anterior cruciate ligament; cartilage degeneration; controlled abnormal joint movement; osteoarthritis; treadmill exercise

1. Introduction

Knee osteoarthritis (OA) is one of the most common musculoskeletal diseases, characterized by degeneration of the articular cartilage. It is a disease that develops due to the complex involvement of many factors such as aging, obesity, genetics, and mechanical stress [1–5], and its pathogenesis remains unclear. Currently, medication, physiotherapy, such as LLLT [6–10], and physical therapy, are the main conservative treatments for knee OA. However, although these therapies have been reported to be effective for reducing pain [11], which is the main complaint associated with knee OA, the establishment of disease-modifying therapies that inhibit cartilage degeneration has not been realized. With the progression of cartilage degeneration, knee OA is associated with pathological changes such as synovitis, sub-chondral bone lesions, and osteophytes, resulting in increased pain and decreased motor function. Surgical treatments such as UKA (unicompartmental knee Arthroplasty) and TKA (total knee arthroplasty) are needed when the lesions are advanced,

Article

Treadmill Exercise after Controlled Abnormal Joint Movement Inhibits Cartilage Degeneration and Synovitis

Yuichiro Oka ¹, Kenji Murata ², Kaichi Ozone ¹, Takuma Kano ¹, Yuki Minegishi ¹, Aya Kuro-Nakajima ¹, Kohei Arakawa ¹, Takanori Kokubun ² and Naohiko Kanemura ^{2,*}

¹ Department of Health and Social Services, Health and Social Services, Graduate School of Saitama Prefectural University, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan; 2191001s@spu.ac.jp (Y.O.); 2191003x@spu.ac.jp (K.O.); 2291004n@spu.ac.jp (T.K.); 2191004f@spu.ac.jp (Y.M.); 2181301f@spu.ac.jp (A.K.-N.); murata-kenji@spu.ac.jp (K.A.)

² Department of Physical Therapy, Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan; 2191002a@spu.ac.jp (K.M.); kokubun-takanori@spu.ac.jp (T.K.)

* Correspondence: kanemura-naohiko@spu.ac.jp; Tel.: +81-48-971-0500



Citation: Oka, Y.; Murata, K.; Ozone, K.; Kano, T.; Minegishi, Y.; Kuro-Nakajima, A.; Arakawa, K.; Kokubun, T.; Kanemura, N. Treadmill Exercise after Controlled Abnormal Joint Movement Inhibits Cartilage Degeneration and Synovitis. *Life* **2021**, *11*, 303. <https://doi.org/10.3390/life11040303>

Academic Editor: Nina Ivanovska

Received: 20 February 2021

Accepted: 29 March 2021

Published: 1 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cartilage degeneration is the main pathological component of knee osteoarthritis (OA), but no effective treatment for its control exists. Although exercise can inhibit OA, the abnormal joint movement with knee OA must be managed to perform exercise. Our aims were to determine how controlling abnormal joint movement and treadmill exercise can suppress cartilage degeneration, to analyze the tissues surrounding articular cartilage, and to clarify the effect of treatment. Twelve-week-old ICR mice ($n = 24$) underwent anterior cruciate ligament transection (ACL-T) surgery on their right knees and were divided into three groups as follows: ACL-T, animals in the walking group subjected to ACL-T; controlled abnormal joint movement (CAJM), and CAJM with exercise (CAJM + Ex) ($n = 8$ /group). Walking-group animals were subjected to treadmill exercise 6 weeks after surgery, including walking for 18 m/min, 30 min/day, 3 days/week for 8 weeks. Safranin-O staining, hematoxylin-eosin staining, and immunohistochemical staining were performed. The OARSI (Osteoarthritis research Society international) score was lower in the CAJM group than in the ACL-T group and was even lower in the CAJM + Ex group. The CAJM group had a lower meniscal injury score than the ACL-T group, and the CAJM + Ex group demonstrated a less severe synovitis than the ACL-T and CAJM groups. The observed difference in the perichondrium tissue damage score depending on the intervention method suggests different therapeutic effects, that normalizing joint motion can solve local problems in the knee joint, and that the anti-inflammatory effect of treadmill exercise can suppress cartilage degeneration.

Keywords: anterior cruciate ligament; cartilage degeneration; controlled abnormal joint movement; osteoarthritis; treadmill exercise

1. Introduction

Knee osteoarthritis (OA) is one of the most common musculoskeletal diseases, characterized by degeneration of the articular cartilage. It is a disease that develops due to the complex involvement of many factors such as aging, obesity, genetics, and mechanical stress [1–5], and its pathogenesis remains unclear. Currently, medication, physiotherapy, such as LLLT [6–10], and physical therapy, are the main conservative treatments for knee OA. However, although these therapies have been reported to be effective for reducing pain [11], which is the main complaint associated with knee OA, the establishment of disease-modifying therapies that inhibit cartilage degeneration has not been realized. With the progression of cartilage degeneration, knee OA is associated with pathological changes such as synovitis, sub-chondral bone lesions, and osteophytes, resulting in increased pain and decreased motor function. Surgical treatments such as UKA (unicompartmental knee Arthroplasty) and TKA (total knee arthroplasty) are needed when the lesions are advanced,

and the establishment of a treatment method is essential to improve the quality of life for patients with OA and to reduce the burden on society.

In recent years, there have been reports on the effects of exercise therapy using animal OA models, and some studies have aimed to suppress cartilage degeneration via physical exercise such as treadmill exercise. Moderate mechanical stress is necessary to maintain cartilage homeostasis, and it is thought that OA develops and progresses when the balance is disturbed. Previous studies have reported that exercise increases extra-cellular matrix synthesis and suppresses inflammatory factors [12], and moderate-intensity treadmill exercise in OA model rats was found to suppress cartilage degeneration more than that in the non-exercise group [13–20]. In other words, physical exercise such as treadmill exercise could be a part of the treatment for OA.

The anterior cruciate ligament transection (ACL-T) model, which is a commonly used animal model of surgically induced OA, involves cutting the ACL to induce joint instability and progression to OA. In contrast, the controlled abnormal joint movement (CAJM) model, proposed by Murata et al. [21,22] and Onitsuka et al. [23], involves ACL-T followed by another surgical procedure to re-stabilize the joint and reduce joint instability. In the CAJM model, the expression of inflammatory factors and cartilage matrix-degrading factors is suppressed, joint instability is reduced, and progression to OA is slower. Previous studies often used models involving ACL-T or destabilization of the medial meniscus to examine the effect of exercise intervention. However, in all such studies, exercise intervention was performed in the presence of joint instability caused by ligament rupture. We found that the state of the intra-articular environment can greatly influence the effect of exercise on cartilage degeneration, even if exercise is performed under the same conditions [24].

We showed that treadmill exercise after improving joint motion further suppresses cartilage degeneration. However, the mechanism by which cartilage degeneration is suppressed is still unclear. Mechanical stress is a factor for these therapeutic effects. It has been reported that controlling joint movement reduces mechanical stress and suppresses cartilage degeneration and osteophyte maturation, and we believe that the anti-inflammatory effects of exercise are realized in this environment. In recent years, OA has been regarded as a whole joint disease, including synovitis, subchondral bone lesions, and abnormal function of the meniscus, and the suppression of lesions in the tissues surrounding the articular cartilage might help to prevent cartilage degeneration. In other words, it is thought that the positive effects of controlling joint movement and treadmill exercise on the tissues around the cartilage will lead to the suppression of cartilage de-generation. The purpose of this study was to assess the lesions in the tissues surrounding the articular cartilage and to clarify the effects of controlling joint movement and treadmill exercise on this disease.

2. Materials and Methods

2.1. Research Design

This study was approved by the Animal Research Committee of Saitama Prefectural University (approval number: 29-12), and the animals were handled in accordance with the relevant legislation and institutional guidelines for humane animal treatment. Twelve-week-old male ICR mice ($n = 24$) from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) were used in this study. The mice were divided into three groups ($n = 8$ /group) as follows: ACL-T group (untreated after ACL-T), controlled abnormal joint movement (CAJM) group (controlling joint movement only), and CAJM + Ex group (controlling joint movement followed by treadmill exercise) (Figure 1). Mice were housed in cages at two mice per cage and a room temperature of 23 ± 1 °C and relative humidity of $55 \pm 5\%$. The day/night cycle was set at 12 h, feed and water were provided ad libitum, and exercise was not restricted.

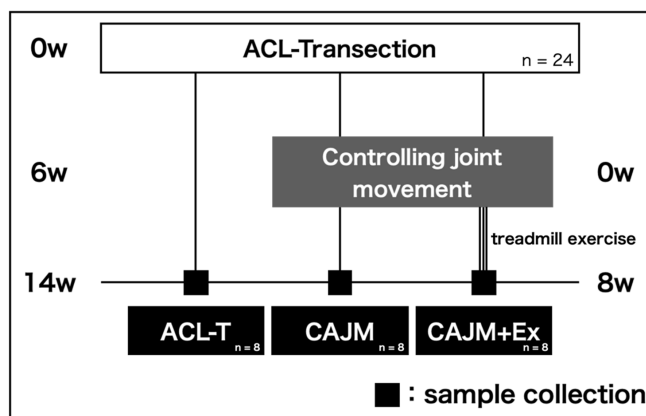


Figure 1. Protocol of X-ray radiography, histological evaluation, and immunohistochemical evaluation. These analyses were performed on the anterior cruciate ligament transection (ACL-T) group, the controlled abnormal joint movement (CAJM) group without exercise intervention, and the CAJM group with exercise intervention (CAJM + Ex) (each group, $n = 8$).

2.2. Surgical Procedure

The animals were anesthetized via the inhalation of diethyl ether (Nacalai Tesque Co., Ltd., Kyoto, Japan), followed by the administration of a triple mixture of anesthetics (Domitor, 10 mL (Nippon Zenyaku Kohgyo Co., Ltd., Fukushima, Japan); dolmicam injection, 10 mg (Astellas Pharma Inc, Tokyo, Japan); medetomidine antagonists (Antisedan[®], 10 mL; Nippon Zenyaku Kohgyo Co., Ltd. Japan and Betolphal[®], 5 mg (Meiji Seika Pharma Co., Ltd. Tokyo, Japan) and saline in the proportions of 1.875 mL, 2 mL, 2.5 mL, and 18.625 mL, respectively, in a 25 mL preparation), and saline at a ratio of 0.15 mL and 9.85 mL, respectively, in a 10 mL volume, which was administered subcutaneously at a dose of 0.1 mL per 10 g of body weight for deep an-esthesia and pain relief. An incision was made in the anterior aspect of the knee joint to expose the joint capsule, and then, the ACL was cut by penetrating the capsule with a shear blade from the medial side of the patellar tendon. In the CAJM model, the femur and tibia were perforated and looped with 3-0 nylon thread to control the anterior instability of the tibia [24]. In the ACL-T group, the instability of the tibia was not limited by loosely applying nylon thread loops.

2.3. Exercise Intervention

The CAJM + Ex group was subjected to physical exercise using a rodent treadmill. All mice were allowed to become familiarized with the treadmill environment for 3 days. Interventions were performed 3 days per week for 8 weeks according to our protocol, with a daily intervention time of 30 min at a speed of 18 m/min.

2.4. Evaluation of Tibial Malposition

To evaluate joint instability, photographs were taken using a soft X-ray system. The right hind leg was photographed in the 90° flexion position of the knee joint after pruning the muscles. The imaging conditions were a voltage of 28 kV, current of 1.5 mA, and exposure time of 1 s. The images were digitized using a digital image sensor NAOMI (RF Co., Ltd. Nagano, Japan). The joint instability of the knee joint was quantified as the amount of anterior translation of the tibia with the image processing software Image J (im-agej.nih.gov).

2.5. Histological Analysis

Histological analysis was performed to evaluate the lesions of the articular cartilage, subchondral bone, meniscus, and synovium. The collected right knee joints were washed with saline and fixed in 4% PFA for 24 h. They were then demineralized with 10% EDTA for 21 days. After demineralization, the samples were dehydrated with ethanol and replaced with xylene. Paraffin blocks were prepared using the paraffin dispenser TEC-P-DC-J0. Subsequently, sagittal sections (7 μm) were prepared using a microtome ROM-380 (Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Saitama, Japan).

To evaluate the articular cartilage, subchondral bone, and meniscus, Safranin O Fast Green staining was performed according to the method of Schmitz et al. The stained sections were photographed using an all-in-one fluorescence microscope BZ-X700 (KEYENCE Co., Osaka, Japan). Articular cartilage was evaluated based on the scoring method recommended by OARSI [25]. The posterior meniscus was evaluated with reference to the report by Kwok et al. [26]. The total scores for all criteria (structural, cellularity, and matrix staining) ranged from 0 to 21. The subchondral bone was analyzed with reference to the report by Aho et al. [27]. HE (hematoxylin–eosin) staining was performed to evaluate the synovitis of the patellar groove. The evaluation of synovitis was performed based on the OARSI histopathology initiative [28] and by measuring synovial thickness. The criteria for the synovial inflammation score are based on increased numbers of synovial lining cell layers, the proliferation of subsynovial tissue, and infiltration of inflammatory cells. Synovial thickness was quantified using dedicated image analysis software (Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Moreover, the synovial thickness was measured at three points per section. Since the evaluation was based on two sections, the average of the six points was used as the representative value. Two independent observers performed scoring, and the average value was retained. For the evaluation of cartilage, meniscus, subchondral bone, and synovitis, two sections were evaluated each. The two sections were spaced 100 μm apart.

2.6. Immunohistochemistry (IHC) Analysis

Immunostaining was performed to evaluate the activity of factors involved in cartilage degeneration and synovitis. IHC was performed using the Avidin-Biotinylated enzyme complex method based on the protocol of the VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, CA, USA). Tissue sections were deparaffinized with xylene and ethanol and then immersed in ethanol containing 0.3% hydrogen peroxide (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) for 30 min to deplete endogenous enzyme activity. Non-specific binding of primary antibodies was blocked by immersion in normal animal serum (Vector Laboratories, USA) for 20 min, and then, anti-MMP13 antibody (ab39012; Abcam plc., Japan, dilution 1/250), anti-Gremlin-1 antibody (ab Japan, diluted concentration 1/200), and anti-TNF- α antibody (BS-2081R; Bioss plc. diluted 1/100) were applied. The reaction was carried out for more than 8 h. For the secondary antibody, anti-rabbit IgG Biotinylated Antibody (Vector Laboratories, USA) was used, and the reaction was carried out for 30 min. As a sensitizing reaction, VECTASTAIN ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, USA) was used for 30 min. Finally, color was generated by diaminobenzidine (Dako Japan Co., Ltd., Japan). Gremlin-1 and MMP13 were analyzed in the articular cartilage; TNF- α was analyzed in the synovium and infrapatellar fat pad (IFP). For analysis, the percentage of positive cells was calculated as the number of positive cell relative to the cell containing nuclei, stained by hematoxylin, in a randomly selected articular cartilage area of 10000 (100 \times 100) μm^2 .

2.7. Statistical Analysis

All data were tested for normality by the Shapiro-Wilk test. The tibia anterior displacement data were compared among the three experimental groups (ACL-T, CAJM, CAJM + Ex) using analysis of variance with Tukey's post hoc test. The OARSI score, meniscus score, subchondral bone score, synovium inflammation score, the percentages of

Gremlin-1-, MMP-13-, and TNF- α -positive cells were compared among groups using the Kruskal-Wallis test with a Steel-Dwass post hoc analysis. Parametric data are shown as mean values [95% confidence intervals], and non-parametric data are shown as median values [interquartile range]. All significance levels were set at <5%.

3. Results

3.1. CAJM Suppresses Anterior Displacement of the Tibia

After tissue collection, the knee joint was photographed in the sagittal plane using soft X-rays, and the anterior deviation of the tibia was measured (Figure 2). The amount of anterior displacement was 0.84 [0.60–1.07] mm in the ACL-T group, 0.45 [0.30–0.60] mm in the CAJM group, and 0.57 [0.47–0.67] mm in the CAJM + Ex group. The CAJM and CAJM + Ex groups exhibited significantly decreased anterior displacement compared to that in the ACL-T group ([ACL-T vs. CAJM] $p = 0.031$, [ACL-T vs. CAJM + Ex] $p = 0.007$), and there was no significant difference in anterior displacement between the CAJM and CAJM + Ex groups.

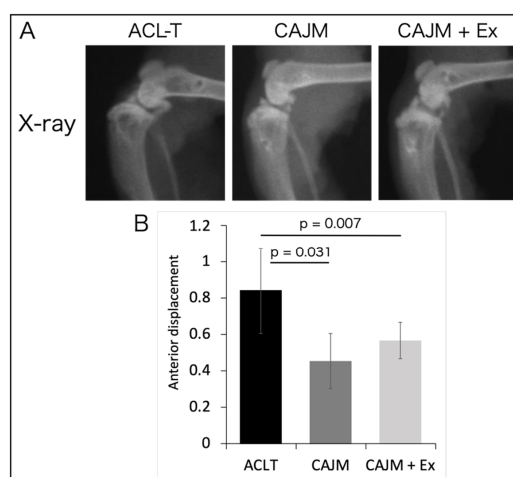


Figure 2. Soft X-ray radiographs of the knee joint (A) and measurement of the amount of anterior displacement of the tibia (B). The CAJM model exhibited suppressed anterior displacement of the tibia, and the stability of the knee joint was regained (each group, $n = 8$). ACL-T, anterior cruciate ligament transection group; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, treadmill exercise.

3.2. Treadmill Exercise After CAJM Inhibits Cartilage Degeneration

Histological images and scoring results of Safranin-O Fast Green staining are shown in Figure 3A. In the ACL-T group, the cartilage loss reached the middle layer, whereas in the CAJM group, cartilage loss was limited to the superficial layer, and in the CAJM + Ex group, the cartilage loss was limited to superficial cracks and decreased staining was observed. The CAJM group had a lower OARSI score than the ACL-T group, and the CAJM + Ex group had even less cartilage degeneration ([ACL-T vs. CAJM] $p = 0.048$, [ACL-T vs. CAJM + Ex] $p = 0.013$, [CAJM vs. CAJM + Ex] $p = 0.042$) (ACL-T: 3.0 [3.0–4.0], CAJM: 2.5 [2.0–3.0], CAJM + Ex: 2 [1.75–2.0]) (Figure 3B).

Regarding the meniscus injury score, the CAJM group had significantly reduced scores compared to those in the ACL-T group, and there was no significant difference between the CAJM and CAJM + Ex groups ([ACL-T vs. CAJM] $p = 0.039$) (ACL-T: 14.5 [12.8–16.3],

CAJM: 8.0 [5.8–9.3], CAJM + Ex: 9.0 [8.0–11.3]) (Figure 4A,B). There was also no significant difference in subchondral bone damage scores among the three groups ($p = 0.893$; ACL-T: 2.0 [1.0–2.0], CAJM: 2.0 [1.0–2.0], CAJM + Ex: 2.0 [1.8–2.3]) (Figure 4A,C).

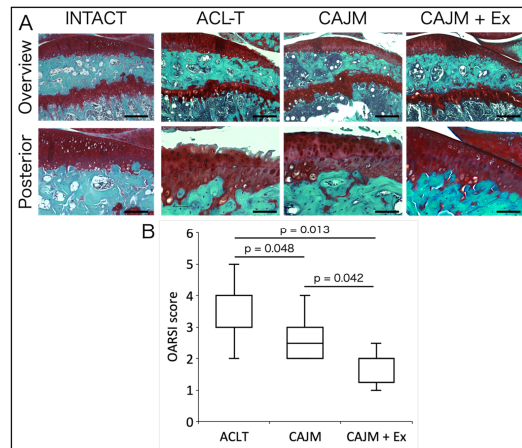


Figure 3. Results of Safranin-O Fast Green staining (A) and OARSI scoring of cartilage defects (B). The CAJM group had a lower OARSI score than the ACL-T group, and the CAJM + Ex group had even less cartilage degeneration (each group, $n = 8$). ACL-T, anterior cruciate ligament transection group; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, treadmill exercise. Scale bar: Overview 200 μm , posterior 100 μm .

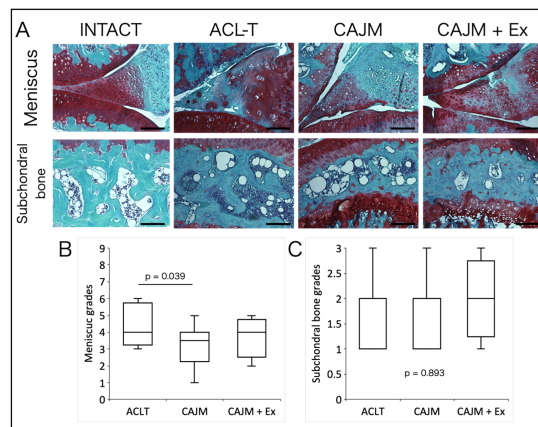


Figure 4. Histological images of the meniscus and subchondral bone with Safranin-O Fast Green staining (A). The CAJM group and the CAJM + Ex group had even less cartilage degeneration (B). Subchondral bone scoring results: no difference between the three groups (C) (each group, $n = 8$). ACL-T, anterior cruciate ligament transection group; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, treadmill exercise. Scale bar: 100 μm .

3.3. CAJM Inhibits the Expression of Gremlin-1

Histological images obtained by immunohistochemical staining showed cells positive for Gremlin-1 in the superficial and deep layers of articular cartilage, and some positive findings were also observed in the extracellular matrix of the deep cartilage layers (Figure 5A). In terms of the positive cell rate, the CAJM group showed significantly lower values than the ACL-T group ([ACL-T vs. CAJM] $p = 0.047$) (ACL-T: 67.4 [58.5–74.3] %, CAJM: 57.0 [50.5–62.0] %, CAJM + Ex: 62.3 [55.3–73.3] %) (Figure 5B). For MMP-13, positive cells were observed throughout the entire articular cartilage (Figure 5A). In terms of positive cell rates, the CAJM and CAJM + Ex groups showed a lower value than the ACL-T group ([ACL-T vs. CAJM] $p = 0.023$, [ACL-T vs. CAJM + Ex] $p = 0.025$) (ACL-T: 74.4 [70.3–80.5] %, CAJM: 55.9 [49.8–66.0] %, CAJM + Ex: 56.5 [52.5–61.8] %) (Figure 5B).

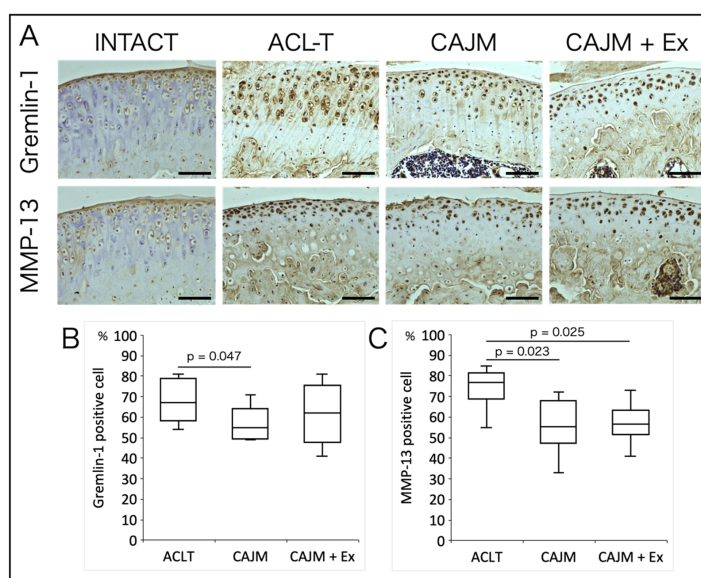


Figure 5. Histological images of immunostaining for articular cartilage (A). Gremlin-1 showed a decreased positive cell rate in the CAJM group (B), and MMP-13 showed a decreased positive cell rate in the CAJM and CAJM + Ex groups compared to that in the ACL-T group (C) (each group, $n = 8$). ACL-T, anterior cruciate ligament transection group; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, treadmill exercise. Scale bar: 100 μ m.

3.4. Treadmill Exercise Suppresses Synovitis

In terms of synovitis scores, the CAJM + Ex group showed lower inflammation scores than the ACL-T and CAJM groups ([ACL-T vs. CAJM + Ex] $p = 0.003$, [CAJM vs. CAJM + Ex] $p = 0.040$) (ACL-T: 4.0 [3.8–5.0], CAJM: 3.5 [3.0–4.0], CAJM + Ex: 2.0 [1.0–2.3]) (Figure 6C). In terms of synovial thickness, the CAJM + Ex group showed lower than the ACL-T and CAJM groups ([ACL-T vs. CAJM + Ex] $p < 0.001$, [CAJM vs. CAJM + Ex] $p = 0.032$) (ACL-T: 119.5 [96.0–142.5] μ m, CAJM: 110.5 [91.8–120.5] μ m, CAJM + Ex: 72.0 [63.5–76.0] μ m) (Figure 6B). For the analysis in the synovium, the results of TNF- α are shown. Positively stained cells were observed in the synovium and IFP. The number of positive cells was significantly lower in the CAJM + Ex group than in the ACL-T and CAJM

groups ([ACL-T vs. CAJM + Ex] $p = 0.006$, [CAJM vs. CAJM + Ex] $p = 0.050$) (ACL-T: 65.3 [57.3–73.5] %, CAJM: 65.6 [62.5–70.3] %, CAJM + Ex: 51.1 [47.5–56.0] %) (Figure 6D).

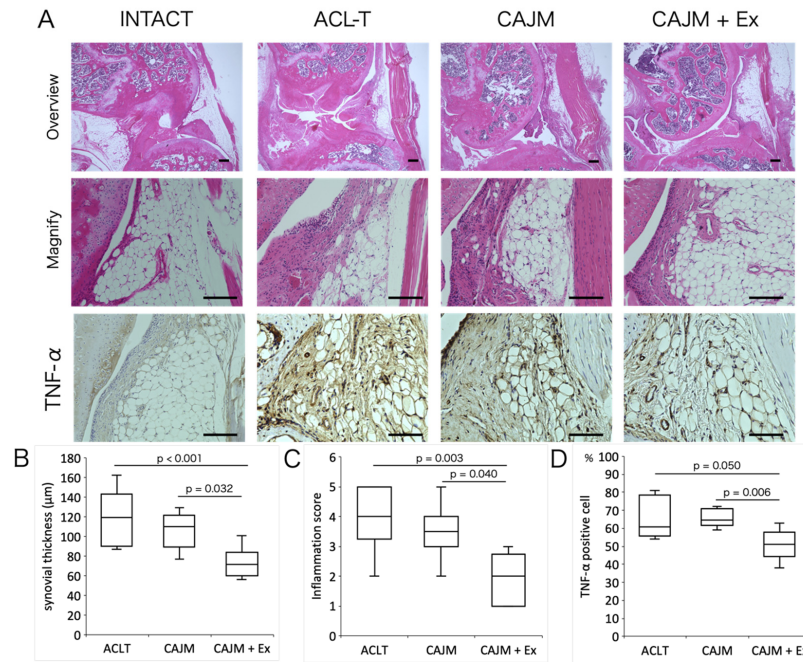


Figure 6. Histological images of synovium by HE staining, and histological images of immunostaining (A). The positive cell rate of TNF- α and the synovitis inflammation in the CAJM + Ex group was suppressed more than that in the ACL-T and CAJM groups (B–D) (each group, $n = 8$). ACL-T, anterior cruciate ligament transection group; CAJM, controlled abnormal joint movement; Ex, treadmill exercise. Scale bar: 100 μm .

4. Discussion

The purpose of this study was to clarify the effects of interventions to manage abnormal joint motion and subsequent treadmill exercise in a mouse model of early-stage OA by evaluating not only the articular cartilage but also the surrounding tissues. In a previous study, we pointed out the need to consider the kinematics of the knee joint itself to perform treadmill exercise and reported that exercise with abnormal joint motion can lead to progressive OA changes. In response to this, this study attempted to elucidate why such interventions are necessary. We found that interventions focusing on the knee joint involved increasing or decreasing mechanical stress on the articular cartilage and that interventions with treadmill exercise might involve factors other than mechanical stress.

In the comparison between the ACL-T and CAJM groups, cartilage degeneration was suppressed in the CAJM group. Murata et al. reported a delay in the onset of OA compared to that with ACL-T at 8 weeks after CAJM in a rat model [21], which is similar to the results of previous studies. Moreover, Oka et al. reported that CAJM suppressed the expression of inflammatory and substrate-degrading factors in mice with OA, although there was no difference in cartilage degeneration at 4 weeks [24]. In this study, we examined the effect of intervention at 8 weeks in a mouse model of OA and found that cartilage

degeneration was suppressed in the CAJM group through the downregulation of factors related to OA changes. In this study, we also analyzed Gremlin-1, which has been reported to be generated when excessive mechanical stress is added to chondrocytes and to cause OA via the NF- κ B pathway [29]. In the present study, the positive cell rate of Gremlin-1 was lower in the CAJM group than in the ACL-T group, which might indicate that CAJM reduced mechanical stress on the cartilage. In the ACL-T model, ACL transection increases the anterior instability of the tibia and changes the contact area between the femur and tibia, resulting in the development and progression of OA in the posterior part of the cartilage [30]. The CAJM model, in contrast, is a model in which the function of the ACL is augmented by surgical treatment from outside the joint capsule to suppress the anterior instability of the tibia [31]. The soft X-ray results also confirmed the anterior deviation of the tibia in the ACL-T group, whereas the anterior deviation of the tibia was suppressed in the group that adopted the CAJM model. These data predict a difference in contact conditions between the ACL-T and CAJM models and support the rationale for accelerated posterior cartilage degeneration of the tibia in the ACL-T group. MMP-13 is a proteolytic enzyme and is deeply involved in the onset and progression of OA. It has been reported that MMP-13 is particularly expressed when the Gremlin-1 pathway is activated. In this study, MMP-13 was decreased in the CAJM group, suggesting that a decrease in mechanical stress is involved in the suppression of MMP-13 expression. Murata et al. reported that the CAJM model shows suppressed osteophyte maturation through the downregulation of TGF β expression and inhibition of the activity of signaling that causes endochondral ossification [32]. It is believed that osteophytes are formed by increased mechanical stress, and the suppression of Gremlin-1 and the results of previous studies suggest that CAJM reduces mechanical stress on articular cartilage. Tissues related to mechanical stress on articular cartilage include the meniscus and subchondral bone. The meniscus and subchondral bone are adjacent to the articular cartilage and absorb shock during the load response [33,34]. In the present study, there was a difference in the damage score of the meniscus between the CAJM and ACL-T groups. In the ACL-T model, it is assumed that the contact area changes behind the articular cartilage due to ACL dysfunction. With CAJM, the contact environment was controlled to avoid concentrating mechanical stress on the meniscus, which might have led to the suppression of damage. This change in the function of the meniscus could have caused an increase or decrease in mechanical stress on the articular cartilage, leading to cartilage degeneration in the CAJM model.

However, although there was a difference in OARSI scores between the CAJM and CAJM + Ex groups, there was no difference in the meniscus or subchondral bone damage scores. This suggests that the mechanism of treadmill exercise as a chondroprotective effect is less related to the increase or decrease in mechanical stress. The fact that the ACL-T group had more advanced degeneration than the CAJM and CAJM + Ex groups, in terms of meniscal damage scores, indicates that the environment within the knee joint is more important than exercise in terms of effects on the meniscus. In the CAJM + Ex group, the stress added to the meniscus by treadmill exercise might have been increased more than that in the CAJM group. In other words, the results of our previous study showed that cartilage degeneration can be prevented if the environment in the joint is controlled. Furthermore, although there was a difference in the OARSI scores between the CAJM and CAJM + Ex groups, there was no difference in the positive cell rates of Gremlin-1 and MMP-13 in the articular cartilage analysis. Gremlin-1 is thought to be expressed in a stress-dependent manner, and the increased number of steps in the CAJM + Ex group, due to exercise, might be the reason for the lack of a difference between the CAJM and CAJM + Ex groups. In addition to MMP-13, many other factors have been reported to degrade the extracellular matrix of articular cartilage, and it is possible that other factors suppressed the OARSI score in the CAJM + Ex group, as compared to that in the CAJM group.

In addition, we performed histological analysis of the synovium to clarify the mechanism by which physical exercise inhibits cartilage degeneration. There was a difference in

synovitis scores between the CAJM and CAJM + Ex groups. Furthermore, TNF- α , which indicates that inflammation is occurring, was also suppressed in the CAJM + Ex group, suggesting that the chondroprotective effect of exercise is mediated by the synovium. In recent years, OA has been recognized as an inflammatory disease, and the involvement of immune response mechanisms, including synovial-mediated inflammatory responses, has been attracting attention. The mechanism underlying synovitis includes cartilage debris and dead cells that are recognized as DAMPs, which activate M1 macrophages that produce inflammatory and substrate-degrading factors [35–37]. The factors produced by M1 macrophages accelerate cartilage degeneration. Indeed, previous studies have shown that besides synovial inflammation, infrapatellar fat pad inflammation is involved in the progression of OA [38]. It has also been reported that exercise suppresses inflammation in adipose tissue by reducing macrophage infiltration [39]. Although we did not identify the cells of the synovium and IFP in this study, exercise possibly suppressed inflammation of IFP by switching the phenotype of macrophages. Since synovitis was suppressed only in the CAJM + Ex group that exercised in the present study, treadmill exercise might be one therapeutic strategy to stop the cycle of synovitis and cartilage degeneration.

Previous reports have shown that moderate mechanical stress increases the production of cartilage matrix synthesis factors, such as TGF- β and Sox9, in chondrocytes in vitro [40,41], suggesting that the mechanism of chondroprotection mediated by exercise therapy is the addition of moderate mechanical stress. The results of the present study suggest that the chondroprotective effect of exercise therapy is due to the added mechanical stress. However, there was no difference in the damage to tissues adjacent to articular cartilage, such as subchondral bone and the meniscus. Furthermore, in animal OA models, cartilage degeneration is suppressed by treadmill exercise in an environment where excessive mechanical stress is added by ACL-T, making it difficult to understand the effect of exercise therapy based on mechanical stress alone. Aerobic exercise, such as treadmill exercise, is thought to have anti-inflammatory effects due to its systemic influence. It has been reported that aerobic exercise not only decreases inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α in blood monocytes but also increases anti-inflammatory factors such as IL-10 and IL-4 [42,43]. Furthermore, it has also been reported that exercise decreases inflammatory monocytes. This response might indicate that exercise improves the inflammatory state in the blood, decreases inflammatory macrophages, and increases anti-inflammatory macrophages in the synovium, leading to the suppression of cartilage degeneration.

It is also possible that the suppression of synovitis was not caused by an improvement in the systemic inflammatory state. Since synovitis in OA is usually caused by cartilage damage, it is possible that synovitis occurred because cartilage degeneration was suppressed in this study. The analysis of the meniscus and subchondral bone also did not verify the type of reaction that occurred in those tissues. It is possible that molecular anabolic signaling pathways are activated by exercise in these tissues, and the results of this study alone cannot clarify what suppressed synovitis. However, the fact that synovitis was not suppressed by CAJM, which can be used to manage mechanical stress, indicates that synovitis was caused by exercise. Whether the mechanical addition of exercise had an effect on the knee joint itself or on the whole body must be verified in the future.

Another limitation of this study is that the function of the meniscus and subchondral bone was only examined in terms of structural changes in the tissue. It is difficult to explain the causal relationship only by comparing the histological damage scores. By examining the factors expressed in each tissue and additional time-series data, it will be possible to clarify the mechanism by which joint bracing and treadmill exercise suppress cartilage degeneration.

5. Conclusions

The present study examined the effect of treadmill exercise on the suppression of abnormal joint motion in relation to the tissues surrounding the cartilage. The results showed that the suppression of abnormal joint motion might have inhibited damage to

the meniscus and thus suppressed cartilage degeneration. We also found that treadmill exercise suppressed synovitis and that the anti-inflammatory effect of systemic exercise could be involved in the suppression of cartilage degeneration. Further clinical data will form the basis to clarify the therapeutic effect, which could contribute to the establishment of a treatment regimen for knee OA.

Author Contributions: Study design: Y.O., K.M., T.K. (Takanori Kokubun) and N.K. Data collection, Histological analysis: Y.O., K.O., T.K. (Takuma Kano), Y.M., A.K.-N. and K.A. Manuscript composition: Y.O., K.M., T.K. (Takanori Kokubun) and N.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially funded by Grant of Saitama Chapter, Japanese Physical Therapy Association for Study Promotion 19-11.

Institutional Review Board Statement: The Animal Research Ethics Committee of the authors' university approved this study, which was performed in compliance with the University Animal Experiment Guidelines (Approval number: 29-12).

Data Availability Statement: Data available in a publicly accessible repository.

Conflicts of Interest: The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Greene, M.A.; Loeser, R.F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1966–1971. [\[CrossRef\]](#)
- Collins, K.H.; Reimer, R.A.; Seerattan, R.A.; Leonard, T.R.; Herzog, W. Using diet-induced obesity to understand a metabolic subtype of osteoarthritis in rats. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 957–965. [\[CrossRef\]](#)
- Gabay, O.; Hall, D.J.; Berenbaum, F.; Henrotin, Y.; Sanchez, C. Osteoarthritis and obesity: Experimental models. *Jt. Bone Spine* **2008**, *75*, 675–679. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nelson, F.; Billinghurst, R.C.; Pidoux, R.T.; Reiner, A.; Langworthy, M.; McDermott, M.; Malogne, T.; Sittler, D.F.; Kilambi, N.R.; Lenczner, E.; et al. Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of the anterior cruciate ligament. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 114–119. [\[CrossRef\]](#)
- Felson, D.T. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthr. Cartil.* **2013**, *21*, 10–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tomazoni, S.S.; Leal-Junior, E.C.P.; Frigo, L.; Pallotta, R.C.; Teixeira, S.; de Almeida, P.; Bjordal, J.M.; Lopes-Martins, R.Á.B. Isolated and combined effects of photobiomodulation therapy, topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and physical activity in the treatment of osteoarthritis induced by papain. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 108001. [\[CrossRef\]](#)
- Tomazoni, S.S.; Leal-Junior, E.C.P.; Pallotta, R.C.; Teixeira, S.; de Almeida, P.; Lopes-Martins, R.Á.B. Effects of photobiomodulation therapy, pharmacological therapy, and physical exercise as single and/or combined treatment on the inflammatory response induced by experimental osteoarthritis. *Lasers Med. Sci.* **2017**, *32*, 101–108. [\[CrossRef\]](#)
- Assis, L.; Milares, L.P.; Almeida, T.; Tim, C.; Magri, A.; Fernandes, K.R.; Medalha, C.; Renno, A.C.M. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 169–177. [\[CrossRef\]](#)
- Pallotta, R.C.; Bjordal, J.M.; Frigo, L.; Leal Junior, E.C.P.; Teixeira, S.; Marcos, R.L.; Ramos, L.; De Moura Messias, F.; Lopes-Martins, R.Á.B. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med. Sci.* **2012**, *27*, 71–78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dos Santos, A.A.; Oliveira, P.; Fernandes, K.R.; Rhon, L.; Tim, C.R.; Vasilceac, F.A.; Pinto, K.N.Z.; Mattiello, S.M.; Parizotto, N.A.; Renno, A.C.M. Effects of low-level laser therapy on cartilage repair in an experimental model of osteoarthritis. *Photonics Lasers Med.* **2014**, *3*, 255–264. [\[CrossRef\]](#)
- Lim, B.W.; Hinman, R.S.; Wrigley, T.V.; Sharma, L.; Bennell, K.L. Does knee malalignment mediate the effects of quadriceps strengthening on knee adduction moment, pain, and function in medial knee osteoarthritis? A randomized controlled trial. *Arthritis Care Res.* **2008**, *59*, 943–951. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Blazek, A.D.; Nam, J.; Gupta, R.; Pradhan, M.; Perera, P.; Weisleder, N.L.; Hewett, T.E.; Chaudhari, A.M.; Lee, B.S.; Leblebicioglu, B.; et al. Exercise-driven metabolic pathways in healthy cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 1210–1222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nam, J.; Perera, P.; Liu, J.; Wu, L.C.; Rath, B.; Butterfield, T.A.; Agarwal, S. Transcriptome-wide gene regulation by gentle treadmill walking during the progression of monoiodoacetate-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **2011**, *63*, 1613–1625. [\[CrossRef\]](#)
- Galois, L.; Etienne, S.; Grossin, L.; Watrin-Pinzano, A.; Cournil-Henrionnet, C.; Loeuille, D.; Netter, P.; Mainard, D.; Gillet, P. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: A pilot study. *Osteoarthr. Cartil.* **2004**, *12*, 779–786. [\[CrossRef\]](#)
- Yamaguchi, S.; Aoyama, T.; Ito, A.; Nagai, M.; Iijima, H.; Zhang, X.; Tajino, J.; Kuroki, H. Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **2013**, *31*, 1026–1031. [\[CrossRef\]](#)

16. Iijima, H.; Aoyama, T.; Ito, A.; Yamaguchi, S.; Nagai, M.; Tajino, J.; Zhang, X.; Kuroki, H. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1563–1574. [[CrossRef](#)]
17. Iijima, H.; Aoyama, T.; Ito, A.; Tajino, J.; Yamaguchi, S.; Nagai, M.; Kiyan, W.; Zhang, X.; Kuroki, H. Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 1092–1102. [[CrossRef](#)]
18. Iijima, H.; Ito, A.; Nagai, M.; Tajino, J.; Yamaguchi, S.; Kiyan, W.; Nakahata, A.; Zhang, J.; Wang, T.; Aoyama, T.; et al. Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. *Osteoarthr. Cartil.* **2017**, *25*, 964–975. [[CrossRef](#)]
19. Zhang, X.; Yang, Y.; Li, X.; Zhang, H.; Gang, Y.; Bai, L. Alterations of autophagy in knee cartilage by treatment with treadmill exercise in a rat osteoarthritis model. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 336–344. [[CrossRef](#)]
20. Chen, L.; Lou, Y.; Pan, Z.; Cao, X.; Zhang, L.; Zhu, C.; Liang, J. Treadmill and wheel exercise protect against JNK/NF- κ B induced inflammation in experimental models of knee osteoarthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *523*, 117–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Murata, K.; Kanemura, N.; Kokubun, T.; Fujino, T.; Morishita, Y.; Onitsuka, K.; Fujiwara, S.; Nakajima, A.; Shimizu, D.; Takayanagi, K. Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. *Osteoarthr. Cartil.* **2017**, *25*, 297–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Murata, K.; Kokubun, T.; Morishita, Y.; Onitsuka, K.; Fujiwara, S.; Nakajima, A.; Fujino, T.; Takayanagi, K.; Kanemura, N. Controlling Abnormal Joint Movement Inhibits Response of Osteophyte Formation. *Cartilage* **2017**, 194760351770095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Onitsuka, K.; Murata, K.; Kokubun, T.; Fujiwara, S.; Nakajima, A.; Morishita, Y.; Kanemura, N. Effects of Controlling Abnormal Joint Movement on Expression of MMP13 and TIMP-1 in Osteoarthritis. *Cartilage* **2018**. [[CrossRef](#)]
24. Oka, Y.; Murata, K.; Kano, T.; Ozone, K.; Arakawa, K.; Kokubun, T.; Kanemura, N. Impact of Controlling Abnormal Joint Movement on the Effectiveness of Subsequent Exercise Intervention in Mouse Models of Early Knee Osteoarthritis. *Cartilage* **2019**. [[CrossRef](#)]
25. McNulty, M.A.; Loeser, R.F.; Davey, C.; Callahan, M.F.; Ferguson, C.M.; Carlson, C.S. Histopathology of naturally occurring and surgically induced osteoarthritis in mice. *Osteoarthr. Cartil.* **2012**, *20*, 949–956. [[CrossRef](#)]
26. Kwok, J.; Onuma, H.; Olmer, M.; Lotz, M.K.; Grogan, S.P.; D’Lima, D.D. Histopathological analyses of murine menisci: Implications for joint aging and osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 709–718. [[CrossRef](#)]
27. Aho, O.M.; Finnilä, M.; Thevenot, J.; Saarakkala, S.; Lehenkari, P. Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–16. [[CrossRef](#)]
28. Gerwin, N.; Bendele, A.M.; Glasson, S.; Carlson, C.S. The OARSI histopathology initiative—Recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18*, 524–534. [[CrossRef](#)]
29. Chang, S.H.; Mori, D.; Kobayashi, H.; Mori, Y.; Nakamoto, H.; Okada, K.; Taniguchi, Y.; Sugita, S.; Yano, F.; Chung, U.; et al. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1–NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–5. [[CrossRef](#)]
30. Kamekura, S.; Hoshi, K.; Shimoaka, T.; Chung, U.; Chikuda, H.; Yamada, T.; Uchida, M.; Ogata, N.; Seichi, A.; Nakamura, K.; et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthr. Cartil.* **2005**, *13*, 632–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kokubun, T.; Kanemura, N.; Murata, K.; Moriyama, H.; Morita, S.; Jinno, T.; Ihara, H.; Takayanagi, K. Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees with a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model. *Am. J. Sports Med.* **2016**, *44*, 2900–2910. [[CrossRef](#)]
32. Murata, K.; Kokubun, T.; Onitsuka, K.; Oka, Y.; Kano, T.; Morishita, Y.; Ozone, K.; Kuwabara, N.; Nishimoto, J.; Isho, T.; et al. Controlling joint instability after anterior cruciate ligament transection inhibits transforming growth factor-beta-mediated osteophyte formation. *Osteoarthr. Cartil.* **2019**, *27*, 1185–1196. [[CrossRef](#)]
33. Proctor, C.S.; Schmidt, M.B.; Whipple, R.R.; Kelly, M.A.; Mow, V.C. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J. Orthop. Res.* **1989**, *7*, 771–782. [[CrossRef](#)]
34. Radin, E.L.; Parker, H.G.; Pugh, J.W.; Steinberg, R.S.; Paul, I.L.; Rose, R.M. Response of joints to impact loading—III. Relationship between trabecular microfractures and cartilage degeneration. *J. Biomech.* **1973**, *6*. [[CrossRef](#)]
35. Sokolove, J.; Lepus, C.M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2013**, *5*, 77–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Scanzello, C.R.; Plaas, A.; Crow, M.K. Innate immune system activation in osteoarthritis: Is osteoarthritis a chronic wound? *Curr. Opin. Rheumatol.* **2008**, *20*, 565–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lopa, S.; Leijts, M.J.C.; Moretti, M.; Lubberts, E.; van Osch, G.J.V.M.; Bastiaansen-Jenniskens, Y.M. Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1853–1857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hoshino, T.; Tsuji, K.; Onuma, H.; Udo, M.; Ueki, H.; Akiyama, M.; Abula, K.; Katagiri, H.; Miyatake, K.; Watanabe, T.; et al. Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2018**, *19*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Kawanishi, N.; Yano, H.; Yokogawa, Y.; Suzuki, K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc. Immunol. Rev.* **2010**, *16*, 105–118.
40. Mawatari, T.; Lindsey, D.P.; Harris, A.H.S.; Goodman, S.B.; Maloney, W.J.; Smith, R.L. Effects of tensile strain and fluid flow on osteoarthritic human chondrocyte metabolism in vitro. *J. Orthop. Res.* **2010**, *28*, 907–913. [[CrossRef](#)]
41. Chu, F.; Feng, Q.; Hu, Z.; Shen, G. Appropriate cyclic tensile strain promotes biological changes of cranial base synchondrosis chondrocytes. *Orthod. Craniofacial Res.* **2017**, *20*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Beavers, K.M.; Brinkley, T.E.; Nicklas, B.J. Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 785–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Smith, J.K.; Dykes, R.; Douglas, J.E.; Krishnaswamy, G.; Berk, S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *J. Am. Med. Assoc.* **1999**, *281*, 1722–1727. [[CrossRef](#)]