

動作時における筋収縮タイプの変化が  
骨及び Enthesis に及ぼす影響

—スポーツ関連性 Enthesopathy 発症メカニズムの解明に向けて—

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

2191002

小曾根 海知

## 目次

1	要旨 .....	1
2	発表論文・関連学会一覧 .....	3
3	略語一覧 .....	5
4	序論 .....	6
4.1	スポーツ障害に対する社会的背景 .....	6
4.2	スポーツ障害と Enthesis .....	7
4.3	スポーツ関連性 Enthesopathy .....	9
4.4	研究目的と解決方法 .....	11
5	検証 I : 運動量の変化と異なる走行条件における筋収縮タイプの変化がマウス上腕骨に及ぼす影響 .....	15
5.1	目的と仮説 .....	15
5.2	方法 .....	16
5.2.1	倫理的配慮 .....	16
5.2.2	研究デザインと運動介入プロトコル .....	16
5.2.3	標本採取 .....	17
5.2.4	骨形態学的解析 .....	17
5.2.5	組織学的解析 .....	19
5.2.6	統計的解析 .....	20
5.3	結果 .....	20
5.3.1	体重及び筋質重量比較結果 .....	21
5.3.2	上腕骨骨頭部及び Enthesis FC 領域の骨形態学的解析結果 ..	21

5.3.3	上腕骨骨幹部の骨形態学的解析結果	21
5.3.4	上腕骨骨頭部の組織学的解析結果	22
5.4	考察	26
<b>6</b>	<b>検証Ⅱ：運動量の変化と筋収縮タイプの変化がマウス棘上筋 Enthesis に及ぼす病理学的影響</b>	<b>29</b>
6.1	背景と目的	29
6.2	方法	30
6.2.1	倫理的配慮	30
6.2.2	研究デザインと運動介入プロトコル	30
6.2.3	標本採取	30
6.2.4	組織学的解析	30
6.2.5	免疫組織学的解析	32
6.2.6	骨形態学的解析	33
6.2.7	分子生物学的解析	33
6.2.8	統計学的解析	34
6.3	結果	35
6.3.1	棘上筋に対する組織学的解析結果	35
6.3.2	Enthesis 線維軟骨領域に対する組織学的解析結果	35
6.3.3	Enthesis 線維軟骨領域における炎症・変性関連因子の免疫組織化学染色結果	36
6.3.4	Enthesis 線維軟骨領域における石灰化関連因子の免疫組織化学染色結果	37
6.3.5	Enthesis 軟骨下骨領域における骨芽細胞分化関連因子の免疫組織化学染色結果	37

6.3.6	Enthesis 線維軟骨領域及び軟骨下骨領域における骨形態学的解析結果 .....	38
6.3.7	棘上筋腱に対する分子生物学的解析結果 .....	38
6.4	考察 .....	45
<b>7</b>	<b>検証Ⅲ：マウス棘上筋 Enthesis の病理的構造変化に影響を及ぼす分子経路の検証 .....</b>	<b>49</b>
7.1	背景と目的 .....	49
7.2	方法 .....	50
7.2.1	倫理的配慮 .....	50
7.2.2	研究デザインと運動介入プロトコル .....	50
7.2.3	標本採取 .....	51
7.2.4	プロテオミクス解析 .....	51
7.2.5	組織学的解析 .....	54
7.2.6	免疫組織学的解析 .....	55
7.2.7	分子生物学的解析 .....	56
7.2.8	骨及び腱の形態学的解析 .....	57
7.2.9	統計学的解析 .....	57
7.3	結果 .....	60
7.3.1	棘上筋-腱複合体の組織学及び形態学的解析結果 .....	60
7.3.2	Enthesis 線維軟骨領域の組織学的解析変化 .....	61
7.3.3	Enthesis 線維軟骨及び軟骨下骨領域の骨形態学的解析結果 .....	61
7.3.4	Enthesis 線維軟骨領域に対するプロテオミクス解析結果 .....	62
7.3.5	Enthesis 線維軟骨領域及び軟骨下骨領域に対する免疫組織化学染色結果 .....	64

7.3.6	Enthesis 線維軟骨領域及び棘上筋腱に対する分子生物学的解析 結果.....	66
7.4	考察 .....	80
8	総合的考察 .....	85
9	研究限界と今後の展望.....	89
10	結語 .....	93
11	謝辞 .....	94
12	引用文献 .....	95
13	補足資料 .....	114
13.1	補足資料 1 .....	114
13.1.1	Hematoxylin & Eosin (HE) 染色 .....	114
13.1.2	Toluidine-Blue (TB) 染色 .....	114
13.1.3	Safranin-O fast green (SOF) 染色 .....	114
13.1.4	Tartrate resistant acid phosphatase / Alkaline phosphatase (TRAP/ALP) 染色 .....	115
13.2	補足資料 2 .....	116
13.2.1	Single 免疫組織化学 (IHC) 染色手順 .....	116
13.2.2	Double 免疫組織化学 (IHC) 染色手順 .....	117
13.2.3	使用した一次抗体 .....	118
13.3	補足資料 3 .....	119
13.3.1	ISOGEN による RNA 抽出並びに RNA 精製手順 .....	119
13.3.2	High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit を用いた	

cDNA 合成手順 .....	121
13.3.3 使用した Primer.....	122
13.4 補足資料 4 .....	123
13.4.1 Qproteome FFPEkit を用いたタンパク質抽出過程 .....	123
13.4.2 タンパク質消化過程 .....	125
13.4.3 C-TIP を用いた脱塩濃縮過程 .....	126
<b>14 データ一覧 .....</b>	<b>128</b>
<b>15 発表論文 .....</b>	<b>132</b>

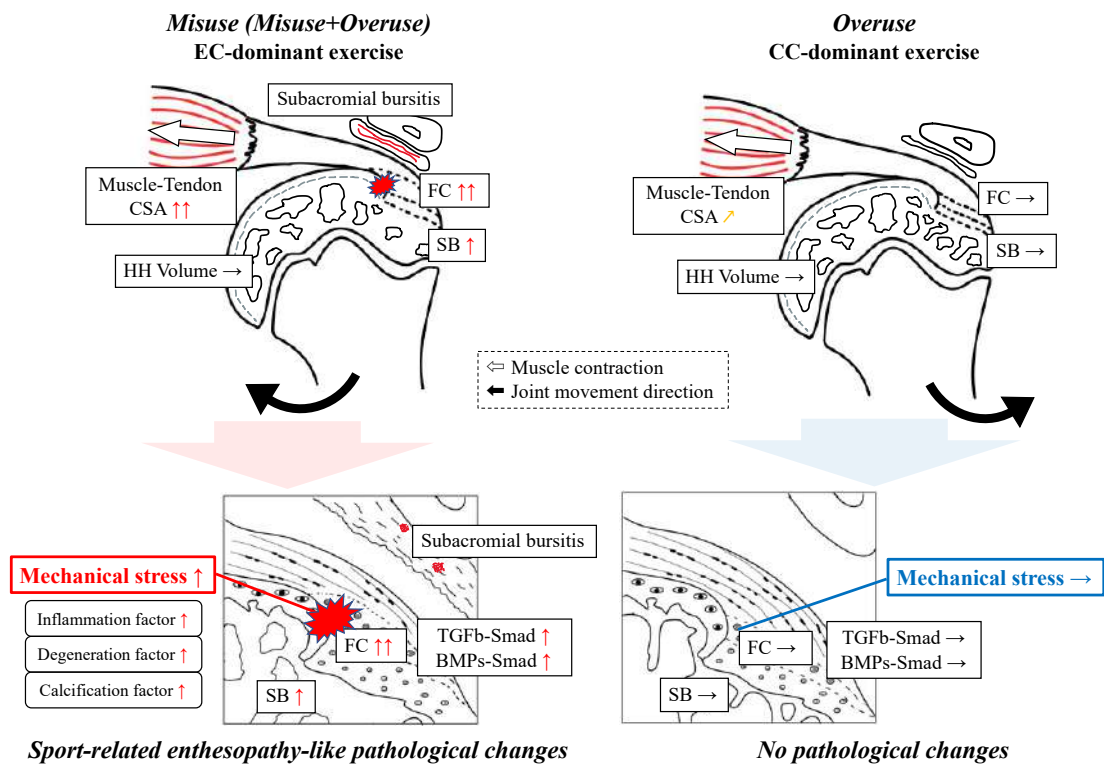
## 1 要旨

スポーツ活動は、若年者における健全な心身発育や高齢者における健康増進などの意義を有しているが、時にはスポーツ活動によって心身発育が阻害される場合がある。スポーツ障害の一つであるスポーツ関連性 Enthesopathy は、若年者における筋腱骨付着部 (Enthesis) で好発し、その主な発症要因は Overuse であると認識されている。しかし臨床現場において、Overuse を改善する対症療法を施しても、再燃する競技者が多い現状にある。また運動中の機械的ストレスを増加させる要因は、運動量の増加に加え、動作時における骨格筋の筋収縮タイプの優位性変化も影響する可能性が高い。これらのことから Overuse がスポーツ関連性 Enthesopathy の発症に影響を及ぼしているだけでなく、Overuse にならざるを得なかった根本の要因が存在する可能性が高いと考えた。そこで本研究は、スポーツ関連性 Enthesopathy 発症メカニズムの一端を解明することを目的に、動作中の運動量と筋収縮タイプの優位性に着目し検証を行なった。病態解明を目的としているため、小動物を用いた実験的基礎研究を実施した。

結果として、運動量の増加に伴う機械的ストレスは骨形成の促進や Enthesopathy 様の病理学的変化を誘導しないことが示唆された。一方、運動時における筋収縮タイプを遠心性収縮優位とした場合、運動量が少なくとも Enthesopathy 様の病理学的変化（線維軟骨領域の構造変化、炎症/変性反応の促進）を誘導し、Overuse が加わることでより病理学的変化が顕著となることが示唆された。また病理学的構造変化を誘導する分子経路としては、TGF $\beta$  スーパーファミリー経路（TGF $\beta$ -Smad 経路、BMP-Smad 経路）が関与していることが示唆され、これらの変化は 2 週間と短期的な運動であっても遠心性収縮優位

な動作により誘導されることが示された。

以上のことから、スポーツ関連性 **Enthesopathy** の発症には、運動量の増加に伴う機械的ストレスよりも、筋収縮タイプ特異的に増加する機械的ストレスが影響していることが示唆された。この結果は、スポーツ関連性 **Enthesopathy** に対する治療介入コンセプトのパラダイムシフトを引き起こす可能性を秘めており、対症療法による **Overuse** の改善よりも、身体の誤用 (**Misuse**) に伴う遠心性収縮優位な動作の改善が重要であることを強調する報告となった。



Abstract Figure



## 2 発表論文・関連学会一覧

### 発表論文

- 1) Effect of Various Types of Muscle Contraction with Different Running Conditions on Mouse Humerus Morphology. Kaichi Ozone, Yuichiro Oka, Yuki Minegishi, Takuma Kano, Takanori Kokubun, Kenji Murata, Naohiko Kanemura. *Life*,11(4):284,2020.  
<https://doi.org/10.3390/life11040284>

### 発表関連学会

- 1) Enthesopathy 発症要因の解明に向けた動物実験モデルの確立. 小曾根 海知, 国分 貴徳, 林 弘之, 加納 拓馬, 岡 優一郎, 金村 尚彦. 第6回日本運動器学会学術大会(口述). 2018年12月(福岡).
- 2) Eccentric contraction-dominant exercise associated with misuse of the body affects onset of enthesopathy. Kaichi Ozone, Takanori Kokubun, Hiroyuki Hayashi, Takuma Kano, Yuichiro Oka, Naohiko Kanemura. Orthopaedic Research Society Annual Meeting (Poster). Feb 2019(Austin).
- 3) Misuse rather than overuse contributes to mechanically related enthesopathy-like pathological changes. Kaichi Ozone, Takanori Kokubun, Kei Takahata, Haruna Takahashi, Moe Yoneno, Yuichiro Ok, Kouhei Arakawa, Naohiko Kanemura. Orthopaedic Research Society

Annual Meeting (Poster). Feb 2020(Phoenix).

- 4) スポーツ関連性 Enthesopathy 発症メカニズムの解明：筋収縮形態に着目して．小曾根 海知，国分 貴徳，金村 尚彦．第46回日本整形外科スポーツ医学会学術集会（口述）．2020年12月（兵庫）．
- 5) Proteomic Analysis of Sports-related Enthesopathy Onset Factors. Kaichi Ozone, Yuki Minegishi, Takanori Kokubun, Haruna Takahashi, Moe Yoneno, Kei Takahata, Kouhei Arakawa, Naohiko Kanemura. Orthopaedic Research Society Annual Meeting (Poster). Feb 2021(Virtual).
- 6) 筋-腱-Enthesis 線維軟骨複合体の経時的形態変化と筋収縮タイプの関連性．小曾根 海知，国分 貴徳，岡 優一郎，峯岸 雄基，米野 萌恵，高橋 花奈，高畠 啓，荒川 航平，金村 尚彦．第9回日本運動器学会学術大会(口述)．2021年10月(Virtual)．

### 3 略語一覧

本論文において、以下の略語を用いた（ローマ字順）

ALP or AP	: Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
Alp1	: Alkaline phosphatase 1	アルカリフォスファターゼ 1
AC	: Attenuation coefficient	減衰係数
ACN	: Acetonitrile	アセトニトリル
BMP4 / Bmp2,4	: Bone morphogenetic proteins 2,4	骨形成タンパク質 2,4
BMPR1A	: Bone morphogenetic proteins receptor type 1A	骨形成タンパク質 1A受容体
BV / TV	: Bone volume / Tissue volume	骨体積 / 骨組織体積; 骨体積比
CC	: Concentric contraction	求心性収縮
CFC	: Calcified fibrocartilage	石灰化線維軟骨
Col1a1	: Collagen type I alpha 1 chain	I 型コラーゲン $\alpha$ 1 鎖
Col2a1	: Collagen type II alpha 1 chain	II 型コラーゲン $\alpha$ 1 鎖
Col3a1	: Collagen type III alpha 1 chain	III 型コラーゲン $\alpha$ 1 鎖
Col II	: Collagen type II	II 型コラーゲン
Col X	: Collagen type X	X 型コラーゲン
CSA	: Cross sectional area	横断面積
Ct.Ar / Tt.Ar	: Cortical area / Total area	皮質骨面積 / 全断面積; 皮質骨体積比
Ct.Th	: Cortical thickness	皮質骨幅
DAB	: 3, 3'-diaminobenzidine	3,3'-ジアミノベンジジン
EC	: Eccentric contraction	遠心性収縮
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
FC	: Fibrocartilage	線維軟骨
Gapdh	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
HE	: Hematoxylin-eosin	ヘマトキシリン-エオジン
Hprt1	: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1
IC	: Isometric contraction	等尺性収縮
IHC	: Immunohistochemical	免疫組織化学
IHH	: Indian hedgehog	インディアンヘッジホッグ
IL-6 / Il-6	: Interleukin-6	インターロイキン-6
IPA	: Ingenuity pathway analysis system	インジェニユイティ パスウェイ解析
LC-MS/MS	: Liquid chromatograph - mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析
LMD	: Laser microdissection	レーザーマイクロダイセクション
Micro-CT	: Micro-computed tomography	マイクロコンピュータ断層撮影
MMP-13	: Matrix metalloproteinase-13	マトリックスメタロプロテアーゼ-13
MS	: Mass spectrometry	質量分析
OSD	: Osgood-schlatter disease	オスグッド-シュラッター病
OSX	: Osterix	オステリックス
PBS	: Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	: Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PFA	: Paraformaldehyde	パラホルムアルデヒド
pSmad1/5/9	: phospho-Smad1/5/9	リン酸化 Smad1/5/9
pSmad2/3	: phospho-Smad2/3	リン酸化 Smad2/3
Runx2 / Runx2	: Runt-related transcription factor 2	ラント関連転写因子2
SB	: Subchondral bone	軟骨下骨
SCX	: basic helix-loop-helix transcription factors scleraxis	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子 Scleraxis
SD	: Standard deviation	標準偏差
SOF	: Safranin-O fast green	サフランin-O ファストグリーン
SOX9 / Sox9	: SRY-box transcription factor 9	SRY-ボックス転写因子 9
TB	: Toluidine-blue	トルイジンブルー
Tb.N	: Trabecular number	骨梁数
Tb.Sp	: Trabecular separation	骨梁間隙
Tb.Th	: Trabecular thickness	骨梁幅
TFA	: Trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
TGF $\beta$ 1 / Tgfb1	: Transforming growth factor-beta 1	トランスフォーミング増殖因子 $\beta$
TGFBR1	: Transforming growth factor-beta receptor type 1	トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 1型受容体
TNF- $\alpha$ / Tnf- $\alpha$	: Tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子- $\alpha$
TRAP	: Tartrate resistant acid phosphatase	酒石酸耐性酸フォスファターゼ
UFC	: Uncalcified fibrocartilage	非石灰化線維軟骨

## 4 序論

### 4.1 スポーツ障害に対する社会的背景

スポーツは活力に満ちた社会の形成や、個人の心身発達に必要な不可欠な活動であり、若年者における健全な心身発育や高齢者における健康増進など、幅広い年代において様々な意義を有している。2000年以降からスポーツに関する政策が次々に公表され、2012年の「第1期スポーツ振興基本計画」<sup>1)</sup>では、若年層の体力低下改善策並びに成人層のスポーツ実施率向上政策（週1回のスポーツ実施率50%を目指す）が提案された。また2017年には「第2期スポーツ振興基本計画」<sup>2)</sup>としてライフステージに応じたスポーツ活動の推進とその環境整備を行うことを推進する方策が提案された（週1回のスポーツ実施率65%、週3回のスポーツ実施率30%を目指す）。これら政策やコロナ禍の影響により国民の健康思考が高まったことで、近年はスポーツ人口が増加傾向を辿っている<sup>3)</sup>。中でもアクティブスポーツ人口の割合（週2回以上、1回30分以上、運動強度「ややきつい以上」の運動を行うもの）は2020年に22.1%と過去最高の値となっており<sup>3)</sup>、スポーツ活動は現代社会において必要不可欠な文化となっている。

しかし、時にはスポーツ活動が若年者における心身発育の弊害になることもある。その大きな要因は傷害である。発育期に当たる若年期（特に小学生・中学生）は、骨組織中に軟骨成分が多く骨格が未熟であるため、傷害による後遺症が残りやすく、その後の健康的な日常生活に支障をきたすことがある<sup>4,5)</sup>。

スポーツ傷害は、打撲や捻挫・骨折など一度の外力によって生

じる「スポーツ外傷」と、スポーツ特有の動作を反復させることによって生じる「スポーツ障害」に分類される<sup>6)</sup>。医学的処置を必要とする前者に対し、後者は「応急処置や医学的処置、事故報告を要さないもの」として定義され<sup>7)</sup>、多くのスポーツ障害は過剰使用（**Overuse**）に起因する怪我であると認識されていることから、過小評価されやすく、適切な処置が行われないことが多い<sup>7)</sup>。そのため予防医学分野においては、スポーツ外傷よりも注目度が低く、適切な発症予防戦略が確立していない現状にある。スポーツ障害によって苦しむ若年者を減らし、本国のスポーツ文化を発展させるためにも、詳細な発症要因の解明並びに適切な治療方法の確立が急務である。

#### 4.2 スポーツ障害と Enthesis

軟組織の骨付着部は **Enthesis** と呼ばれており、靭帯・腱・関節包の骨付着部領域を示す<sup>8)</sup>。同部は軟組織で発生した引張応力を効率的に骨に伝達させる作用を有す。しかし軟組織と硬組織の異なる組織性質の移行部でもあることから、身体の中でも特に機械的ストレスが集中する領域である。スポーツ障害の多くは腱骨付着部で好発し<sup>9)</sup>、靭帯や関節包付着部での障害は稀である。本論文は、**Overuse** に起因するスポーツ障害に関して記述するため、以下より腱骨付着部に焦点を絞り記載する。

**Enthesis** は、線維性 **Enthesis** と、線維軟骨性 **Enthesis** の2種類に分類することができる。前者は、腱と骨の境界面にある高密度の線維性結合組織の存在が特徴であり、長骨の骨幹部に付着する腱によく見受けられる<sup>10)</sup>。付着領域は広い表面積を有し、

腱が骨もしくは骨膜に直接挿入されている<sup>11)</sup>。三角筋上腕骨付着部や大内転筋大腿骨付着部などが当てはまる<sup>12)</sup>。一方後者は、腱と骨の境界面に線維軟骨 (Fibrocartilage ; FC) を有するのが特徴であり、腱の角度変化が大きい骨格筋かつ骨端や骨頭部に付着する腱に多く見受けられる<sup>10)</sup>。付着領域の表面積は狭く、腱実質部から非石灰化線維軟骨層 (Uncalcified fibrocartilage ; UFC)、石灰化線維軟骨層 (Calcified fibrocartilage ; CFC)、骨・軟骨下骨層 (Subchondral bone ; SB) へと階層的構造を呈している特徴があり、Tidemark 呼ばれる好塩基性の線状領域によって CFC と UFC が分画されている (図 1)<sup>8)</sup>。棘上筋付着部やアキレス腱付着部、膝蓋腱付着部が当てはまる。線維軟骨性 Enthesis は線維性 Enthesis よりも一般的であり、過剰使用しやすい骨格筋の付着部であることから、損傷を受けやすい<sup>10,11)</sup>。実際、三角筋 Enthesis での障害は非常に少なく、Rotator cuff の一部である棘上筋腱 Enthesis や、アキレス腱 Enthesis における障害の方がスポーツ障害では一般的である。そのためスポーツ障害の治療を行うためには線維軟骨性 Enthesis の特徴を考慮する必要がある。本論文全体を通し線維軟骨性 Enthesis に着目しているため、以下より「線維軟骨性」の単語を割愛し記述する。

Enthesis は 2 種類の FC を有することで階層構造を呈し、同部に集中する機械的ストレスを緩衝している<sup>13)</sup>。しかしながら、Enthesis に付与される機械的ストレス量と、同部が有している緩衝能力のバランスが何かしらの要因によって破綻した場合、病理学的変化 (FC の増加や骨棘形成、血管新生、炎症因子の増加)<sup>10,14-18)</sup>が生じる。これらの病理学的変化が生じた状態のことを

Enthesopathy と呼び、スポーツ関連性疾患としては Osgood-Schlatter 病 (Osgood-Schlatter disease; OSD) やアキレス腱骨付着部症、テニス肘 (上腕骨外側上顆炎) などが含まれる。

#### 4.3 スポーツ関連性 Enthesopathy

スポーツ関連性 Enthesopathy の発症要因としては、内因性因子 (成長期における骨軟骨の脆弱化、マルアライメント、筋力不均衡、柔軟性の低下や筋力低下等) と外因性因子 (急な練習強度の増加や不適切な練習メニュー、競技用品、環境、技術の不足、指導者の知識不足) が相互に関連していると報告されている<sup>9,19,20)</sup>。中でも最重視されている要因としては、高強度かつ高負荷な運動とされる **Overuse** である<sup>9,21,22)</sup>。この **Overuse** に対し医療機関で推奨される治療法としては、運動の制限や安静、対象筋のストレッチ、アイシングなど、対症療法が主である<sup>23,24)</sup>。しかし実際の臨床現場において、上記治療を施しても症状の寛解はあるものの、スポーツ再開と同時に再燃し、一定期間スポーツ活動を休止せざるを得ない状況となることが多い。これはスポーツ活動者を治療対象とした前向き研究においても報告されており、**Popovich** ら (2000) は **Overuse** によるランニング障害に対し休息による改善効果はないことを示唆した<sup>25)</sup>。そもそも、個々人が所属するチームごとに練習量の差はあるものの、同チーム内であれば全員が同量の練習を行うはずであるため、練習内容や練習量など環境要因に大きな問題がある場合はチーム内の全員が罹患する可能性が高い。しかし **Fahlstrom** ら (2002) も報告しているように、スポーツ障害の症状とトレーニング量やプレー歴に

は相関が少ないため<sup>26)</sup>、多くの場合罹患者はチーム全員ではなく、限局的となる。これらを考慮すると、高強度かつ高負荷な **Overuse** がスポーツ関連性 **Enthesopathy** の発症に影響を及ぼしている可能性よりも、**Overuse** にならざるを得なかった根本の要因が存在する可能性が高い。しかしこれまでに、スポーツ関連性 **Enthesopathy** の発症要因に関して報告された研究は数少なく、その詳細は明確化されていない。

**Overuse** は一般的に、過剰な運動量に伴う機械的ストレスが増加した状態として認識されることが多い。しかし、運動時に生じる機械的ストレスを増加させる要因は運動量だけでなく、骨格筋の収縮タイプにも依存している可能性がある。スポーツ医学分野では骨格筋の収縮タイプを以下の3つに大別している(図2): 求心性収縮 (**Concentric contraction; CC**)、等尺性収縮 (**Isometric contraction; IC**)、遠心性収縮 (**Eccentric contraction; EC**)<sup>27,28)</sup>。CC は、骨格筋の収縮方向と同方向に関節運動が生じるため、筋腱組織内での剪断応力が小さいのが特徴である。さらに強制的な外力が加わらないため、筋肥大を起こしにくく、腱への張力も小さいのが特徴である。一方 EC は骨格筋の収縮方向とは反対方向に関節運動が生じるため(外力が骨格筋の張力を上回るため)、筋腱組織内で生じる剪断応力が大きくなる。この大きな負荷により筋腱組織の損傷が誘発され、結果として筋肥大や炎症反応、遅発性筋痛などを生じる<sup>28,29)</sup>。IC は骨格筋が収縮しているが関節運動は生じていない状態のため、腱組織への剪断応力は CC よりも大きくなるが、EC よりも小さくなる特徴がある。すなわち、筋-腱複合体に付与される機械的ストレスは、同じ運動量であっ



ても、筋収縮タイプの優位性により変動する可能性がある。これは筋-腱と直列関係にある Enthesis FC 領域、並びに Enthesis SB 領域にも影響を及ぼす可能性は高いと考えられることから、スポーツ関連性 Enthesopathy の発症には、動作時における筋収縮タイプの優位性も関与している可能性が考えられる。

しかし現状として、動作時における筋収縮タイプの優位性と Enthesopathy の発症に相関があることを示唆した研究はほとんどなく、我々が知る限りは1つのみである。Watanabe ら(2018)はスポーツ関連性 Enthesopathy の一種である OSD 罹患者を集め、サッカーにおけるキックモーションの動作解析を実施した<sup>30)</sup>。結果として軸足 OSD 罹患者の多くは、骨盤後傾かつ上半身質量中心の後方化が生じていたことを明らかにした。骨盤の後傾や上半身質量中心の後方化は膝関節伸展モーメントを増加させ、大腿直筋や外側広筋の過剰な筋活動を誘発する<sup>31)</sup>。すなわち軸足 OSD 罹患者は身体の誤用 (Misuse) により大腿四頭筋の EC 優位なキックモーションが原因で発症した可能性が考えられる。しかし、発症と筋収縮タイプの関係性を基礎研究として検証したものはこれまでに存在せず、現在は仮説のままで終わっている。

#### 4.4 研究目的と解決方法

若年期にスポーツ障害を罹患することは、その後の心身発育及び Quality of Life に多大な影響を及ぼす可能性が高い<sup>32)</sup>。2021年には東京オリンピック・パラリンピックも開催され、若年者のスポーツ活動が非常に注目を浴びている。若年スポーツ活動者の生活をより良いものにするためにも、スポーツ関連性

Enthesopathy の詳細な発症要因解明及び発症予防・治療方法の確立が必要不可欠である。

以上のことから本研究では、運動量と動作時における筋収縮タイプの優位性に着目し、スポーツ関連性 Enthesopathy 発症メカニズムの一端を解明することとした。仮説としては、単純に運動量を増加させた Overuse 実施群に比べ、Misuse を模倣した EC 優位な運動実施群の方が、骨及び Enthesis FC 領域に付与される機械的ストレスが増加し、スポーツ関連性 Enthesopathy 様の病理学的変化が生じると考えた。そしてこの仮説を根拠のある結果として明示するため、以下の3つの検証を行うこととした。

- ①運動量の変化と、異なる走行条件における筋収縮タイプの変化がマウス上腕骨に及ぼす影響を検証する。
- ②運動量の変化と、筋収縮タイプの変化がマウス棘上筋 Enthesis に及ぼす病理学的影響を検証する。
- ③運動量の変化と、筋収縮タイプの変化に伴い生じると予測される、マウス棘上筋 Enthesis の病理的構造変化に影響を及ぼす分子経路を検証する。

なお本研究に使用した介入方法は、電気刺激によって筋収縮タイプを変化させる実験系ではなく、スポーツ活動を反映し、特定の期間にわたり周期的に活発な運動を模倣できるトレッドミルモデルを用いることで仮説を検証した。また本研究は病態発症機序の解明に向けた基礎研究であるため、対象は小動物とした。実験に供する動物種に関しては、齧歯類の中でも走行実験に適しているマウスを用いることとした。系統としては、比較的容易に飼育が可能な ICR マウスを用いることとした。ICR マウスは傾斜

付き(25度)最大走行速度を計測した研究にて、Sedentary 群において最大約 30m/min<sup>33)</sup>で走行可能であることが示されており、対象として用いられていた C57BL/6 マウスよりも最大走行速度が速いことが証明されている。C57BL/6 マウスはマウスの中でも、最も運動に適していない系統であると報告されている研究もあることから<sup>34,35)</sup>、スポーツ動作を模倣する運動介入実験において C57BL/6 マウスを使用することは適していないことが考えられる。以上の理由から、汎用的に使用され、かつ運動介入実験にも適していると予測される ICR マウスを本実験にて使用することとした。スポーツ障害罹患者の多くは、骨・軟骨組織が脆弱な若年期において発症している。そのため本研究で介入を行う対象マウスも、すべて性成熟前である 4 週齢から 8 週齢までとした。

検証事項全体における実験群名称は以下のように統一した。単純に運動量を増加させ高強度かつ高負荷な運動を模倣した群は Overuse 群、運動量は少ないものの身体の誤用によって EC 優位となる運動を模倣した群は Misuse 群、運動量を増加させ、かつ EC 優位となる運動を模倣した群は Misuse+Overuse 群として定義した。

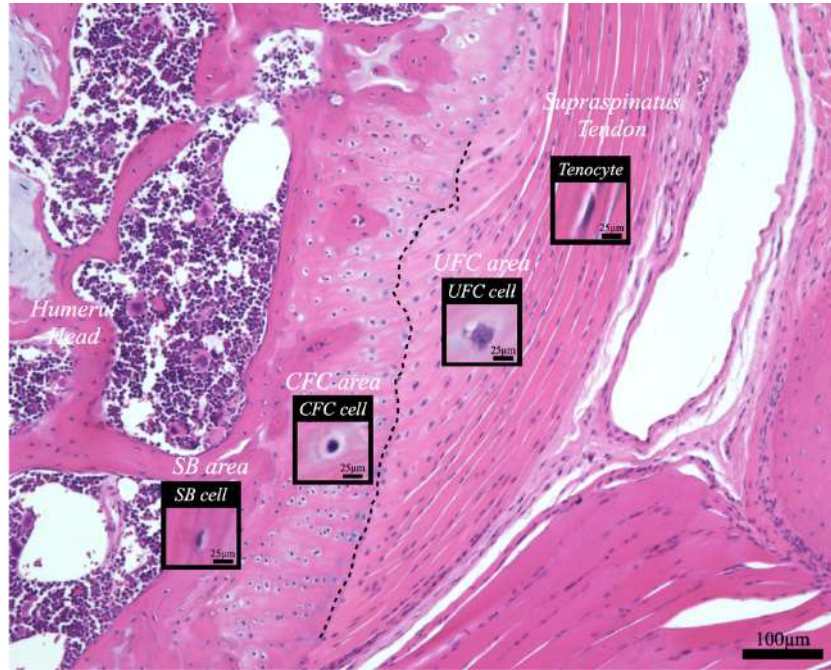


図 1： Entthesis の構造および細胞特徴

線維軟骨性Entthesisにおける特徴的な4層構造と各領域における細胞形状を示した。棘上筋腱(Supraspinatus Tendon)における腱細胞(Tenocyte)は紡錘状の細胞形状を呈す。UFC領域におけるFC細胞は丸状の細胞形状を呈し、核が大きく軟骨小腔が少ない特徴がある。CFC領域におけるFC細胞は丸状の細胞形状を呈し、核が小さく軟骨小腔が多い特徴がある。SB領域における細胞は楕円体状の細胞形状を呈し、骨小腔を周囲に有する特徴がある。全体像のScale bar: 100µm、細胞像のScale bar: 25µm。

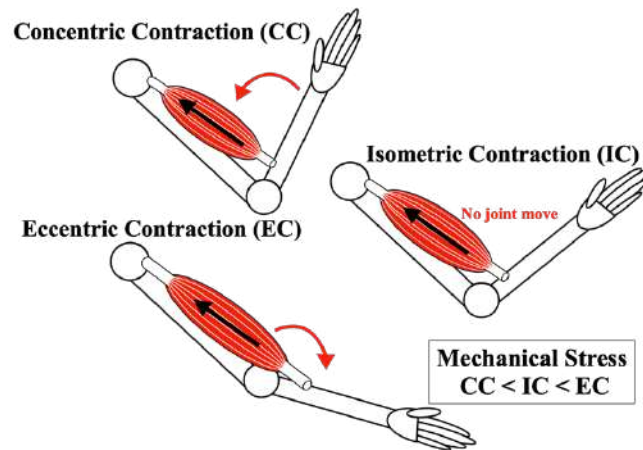


図 2： 筋収縮タイプの模式図

CCは骨格筋の収縮方向と関節運動が同じ方向に生じる収縮タイプである。ICは骨格筋が収縮しながらも関節運動が生じていない収縮タイプである。ECは骨格筋の収縮方向と関節運動が反対の方向に生じる収縮タイプである。これらの各収縮タイプが生じている場合、骨格筋や腱に生じる機械的ストレスは以下の順番で大きくなる：CC < IC < EC

## 5 検証 I：運動量の変化と異なる走行条件における筋収縮タイプの変化がマウス上腕骨に及ぼす影響

### 5.1 目的と仮説

運動は骨代謝活性を促進する役割があり、成熟期や高齢期における適度な運動が骨密度の増加を誘導する。すなわち適切な運動は骨成長の促進・骨萎縮予防・骨粗鬆症の改善につながる<sup>36,37)</sup>。しかしながら、運動強度が過剰となった場合は、骨の過形成や変形を伴う骨形成が促進されてしまう。例えばプロテニスプレイヤーは、非利き手と比べ利き手における上腕骨周径が過度に増加する<sup>38)</sup>。また若年期における過剰な負荷は骨端症やスポーツ関連性 **Enthesopathy** などのスポーツ障害の発症要因とされている<sup>9,21,22)</sup>。そのため運動に伴う機械的ストレスは、適切な骨形成の促進と過形成の両端を担う重要な要因である。運動中の機械的ストレスを決定づける要因としては、序論にも述べた通り運動量と筋収縮タイプが関連しているが、筋収縮タイプの変化と骨形成の関連性を証明した研究は非常に少ない。小動物を対象とした研究では Hamann N ら (2012) は EC 優位な刺激が大腿骨の骨形成を促進していることを検証した<sup>39)</sup>。またヒトを対象とした研究では、ジャンプ運動や高負荷運動、並びに EC 運動によって骨に付与される **strain** の変化を起因とした代謝活性変化や骨成長因子のクロストークによって骨密度が向上すると報告されている<sup>40-43)</sup>。すなわち CC 運動よりも EC 運動の方が、より骨幹部の骨密度増加を誘導できることが示唆されている。しかし収縮タイプの変化と骨形成を関連づけて記載している論文の多くは下肢を対象とすることが多く、上肢を対象とし、さらに骨頭部や腱骨付

着部などの細かい領域に焦点を絞っている研究は散見されずその詳細は不明であった。

以上のことから、検証1では、運動量と動作中の筋収縮タイプの変化が成長期マウス上腕骨形成にいかなる影響を与えるのか、骨形態学的解析並びに組織学的解析によって検証することとした。

## 5.2 方法

### 5.2.1 倫理的配慮

本検証内容は、埼玉県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに準じて実施した（承認番号 2019-3）。なお、使用動物数は可能な限り最小限に設定した。

### 5.2.2 研究デザインと運動介入プロトコル

Slc:ICR マウス(3週齢/雄)20匹を Japan SLC Inc.(Shizuoka, Japan) から購入した。1週間の環境適応後、4週間の運動介入を実施した。すべてのマウスは、12時間の明暗サイクルで  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  のプラスチックケージに個別に収容した。運動介入には小動物用トレッドミル TM-R-N1 (Osaka Micro System, Osaka, Japan) を使用し、以下の4群に分類した: Control (Sedentary: 図 3A) 群、Overuse (高速平地走行: 図 3B) 群、Misuse (低速下り坂走行: 図 3C) 群、Misuse+Overuse (高速下り坂走行: 図 3D) 群。下り坂走行により対象筋の EC を模倣できると報告した先行研究に基づき<sup>29,44,45</sup>、トレッドミルの傾斜角度を利用して筋収縮タイプを変更した。対象関節は肩関節とし、解析領域は上腕骨骨頭部及び棘上筋 Enthesis、上腕骨骨幹部とした。EC は、CC

及び IC の約 1.2-2 倍以上の関節トルクと力を発生すると報告されている<sup>46,47)</sup>。そのため Overuse 群と Misuse+Overuse 群を単純に比較してしまうと、全身負荷量が明らかに異なることから、収縮タイプの影響か、全身負荷量の影響かの判別がつかなくなる。そのため Misuse 群を設定し、Overuse 群及び Misuse+Overuse 群の走行速度を Misuse 群の 1.5 倍となるように設定することで全身負荷量の影響を排除した (図 3E)。介入頻度は 1 日 1 時間、週 5 日、4 週間とした。

### 5.2.3 標本採取

4 週間の運動介入終了直後にマウスの体重を測定した。その後イソフルランを用いた深麻酔下 (導入麻酔 : 4%、持続麻酔 : 2%) で熟練者による頸椎脱臼により安楽死させた。運動の種類が対象筋に及ぼす影響を確認するため、左棘上筋全体の湿重量を測定した。また骨の形態変化を確認するため左上腕骨を採取した。続いて組織学的解析のため、右棘上筋-腱-Enthesis 複合体を採取した。

### 5.2.4 骨形態学的解析

採取した左上腕骨を生理食塩水で洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA) / phosphate buffered saline (PBS) 溶液で固定処理を実施後、Micro-computed tomography Sky scan 127 (Micro-CT : BRUKER, MA, USA) による測定を行った。測定条件は以下のように設定した : X 線 60kV/165  $\mu$ A、検出器の分解能 2452 $\times$ 1640、ピクセルサイズ 5  $\mu$ m、回転角度 0.5 $^\circ$ /秒。続いて専用の視覚化アプリケーション (CTvox : BRUKER,

MA, USA) を使用して、測定データを 3 次元データに変換した。その後の分析は分析アプリケーション (CT Analyzer: BRUKER, MA, USA) を使用した。

解析に関しては以下の設定で実施した。上腕骨骨頭部に対する閾値は 60-200 に設定した。閾値は動物間で変更せず統一した。成長板より上部の SB 領域全体 (成長板を除く) を分析領域とした。関心領域は、上腕骨骨頭部全体が矢状断面画像に含まれるよう設定した。分析項目は以下の 4 項目とした: 骨体積比 (Bone volume/Tissue volume; BV/TV)、骨梁数 (Trabecular number; Tb.N)、骨梁厚 (Trabecular thickness; Tb.Th)、骨梁間隙 (Trabecular separation; Tb.Sp)。さらに、Enthesis FC 領域 (CFC を含む) に対する分析では、SB と区別するため、閾値を 60-100 に設定した。関心領域は矢状断面画像における Enthesis FC 領域に設定した。棘上筋腱付着範囲 (400 $\mu$ m) を分析領域として設定し、その体積を算出した。

上腕骨骨幹部に対する解析は、上腕骨外科頸下端から 2mm 下方部を分析した。上腕骨骨幹部領域は皮質骨であるため、閾値は 100-200 に設定した。分析項目は以下の 4 項目とした: 総断面積 (Total area; Tt.Ar)、皮質骨面積 (Cortical area; Ct.Ar)、皮質骨面積/総断面積 (Ct.Ar/Tt.Ar)、皮質骨厚 (Cortical thickness; Ct.Th)。Ct.Th は分析部位によって異なるため、撮影画像における皮質骨周囲の最も厚い部分、最も薄い部分、最も厚い部分の反対側の 3 点を測定し、その平均値を算出して比較した。



### 5.2.5 組織学的解析

採取した右棘上筋-腱-Enthesis 複合体に対しては 4% PFA/PBS 溶液で固定処理を実施した。続いて、10% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液を用いて脱灰処理を実施した。その後パラフィンに置換し、パラフィン包埋ブロック製造装置 (TissueTechTEC™Plus : Sakura Seiki, Tokyo, Japan) を使用してパラフィンブロックを調製した。マイクロトーム REM-710 (Yamato Kohki Industrial, Saitama, Japan) を使用し、5  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した。作成した切片に対して Tartarate resistant acid phosphatase (TRAP) / Alkaline phosphatase (ALP) 染色キット (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて TRAP 陽性細胞及び ALP 活性化を評価した。関節軟骨領域及び Enthesis FC 領域の組織画像を分析するために、巨視的観察を行った。染色手順の詳細は補足資料 1 の 13.1.4 に記した。

さらに、免疫組織化学 (Immunohistochemical ; IHC) 染色を上腕骨骨頭部の切片に対して実施した。前骨芽細胞分化マーカーである Osterix (OSX) を標識化するため、Anti-OSX rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/300, bs-1110R, Bioss, MA, USA) を使用し、上腕骨荷重関節面における SB 領域、並びに Enthesis SB 領域での骨芽細胞動態を評価した。解析には画像解析ソフトウェア Fiji<sup>48)</sup> を使用し、単位面積あたりにおける OSX 陽性細胞面積を算出した。なお IHC 染色の基本手順及び使用した一次抗体に関しては補足資料 2 の 13.2.1 と 13.2.3 に記した。

### 5.2.6 統計的解析

すべての解析は R version 3.4.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いた。正規性検定は Shapiro-Wilk test を実施した。すべての解析において正規性が認められた為、一元配置分散分析を実施した。事後検定には Tukey HSD を用いた。有意水準は 5%未満とし、すべての結果は平均値±標準偏差 (Standard deviation ; SD) で示した。なお算出した実測値は補足データ一覧に記述した。

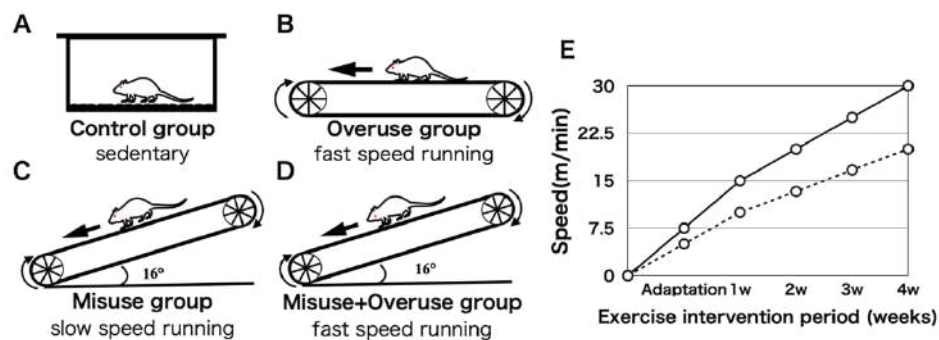


図 3： 介入群の設定と運動介入走行速度

A: Control (Sedentary)群。ケージ内において行動を自由とした。B: Overuse (高速平地走行)群。トレッドミルの傾斜角度を $0^{\circ}$  に設定し走行させた。C: Misuse (低速下り坂走行)群。D: Misuse+Overuse (高速下坂走行)群。トレッドミルの傾斜角度を $-16^{\circ}$  に設定し、先行研究に基づき走行中棘上筋のEC活動を誘発させた。E: 運動介入走行速度の経時的変化。点線はMisuse群の速度変化を示している。実線はOveruse群及びMisuse+Overuse群の速度変化を示している。収縮タイプによる負荷量を考慮し、Overuse群とMisuse+Overuse群は、Misuse群よりも1.5倍速い速度で実施した。

### 5.3 結果

骨形態学的解析結果は上腕骨骨頭部及び上腕骨骨幹部に対する結果を示した。また組織学的解析結果は、上腕骨骨頭部の解析結果を示した。

### 5.3.1 体重及び筋質重量比較結果

運動介入後の体重、棘上筋湿重量及び体重で正規化した筋湿重量の比較結果を示した（表 1）。体重に関しては Control 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意差が確認された ( $p<.05$ )。さらに棘上筋湿重量は、Control 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間で、また Overuse 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p<.05$ )。体重で正規化した筋湿重量も同様の結果を示した ( $p<.05$ )。

### 5.3.2 上腕骨骨頭部及び Enthesis FC 領域の骨形態学的解析結果

Micro-CT によって撮影された上腕骨骨頭画像を示した（図 4A）。BV/TV と Tb.Th は、Control 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意な増加が確認された ( $p<.05$ , 図 4B,C)。すべての群間で Tb.N に有意差は確認されなかった ( $p=.093$ , 図 4D)。また、Tb.Sp に関しては Control 群と Misuse+Overuse 群間、Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意な低下が確認された ( $p<.05$ , 図 4E)。Enthesis FC 領域体積に関しては、Control 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間で、また Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意な増加が確認された ( $p<.01$ , 図 4F)。撮影画像を観察した結果、上腕骨骨頭部における SB 領域（白矢頭）で、Control 群と比較し全運動介入群で拡大傾向にあることを示した (Overuse < Misuse < Misuse+Overuse)。

### 5.3.3 上腕骨骨幹部の骨形態学的解析結果

Micro-CT によって撮影された上腕骨骨幹部画像を示した（図

5A)。Tt.Ar はすべての群間で有意差が確認されなかった ( $p=.537$ , 図 5B)。Ct.Ar は Control 及び Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意な増加が確認された ( $p<.01$ , 図 5C)。Ct.Ar/Tt.A は Control 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意な増加が確認された ( $p<.01$ , 図 5D)。さらに Ct.Th は Control 及び Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意な増加が確認された ( $p<.05$ , 図 5E)。

#### 5.3.4 上腕骨骨頭部の組織学的解析結果

上腕骨骨頭部に対して TRAP/ALP 染色を行い、巨視的観察を実施した。関節軟骨領域では、TRAP 陽性細胞はすべての群間で著明な変化を示さなかった。また Control 群では ALP 陽性細胞はほとんど確認されなかったが、Overuse 群では関節軟骨領域で観察された。Misuse 群と Misuse+Overuse 群では、関節軟骨領域だけでなく SB 領域にも ALP 陽性細胞が確認された。ALP 活性化が増加するにつれて、SB 領域の拡大も観察された(図 6A)。続いて Enthesis FC 領域においても TRAP 陽性細胞はすべての群間で著明な変化を示さなかった。また ALP 陽性細胞に関しては、SB 領域ではほとんど確認されなかったが、Enthesis FC 領域における CFC 領域で顕著に観察された。巨視的な群間比較としては、Control 群と Overuse 群間における ALP 活性化はさほど観察されなかったが、Misuse 群と Misuse+Overuse 群は他群よりも活性化が生じていた (図 6B)。

続いて上腕骨骨頭部に対して OSX を標識化するために IHC 染色を実施した (図 7A,B)。関節軟骨の SB 領域における OSX 陽性面積比率は Control 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間

( $p < .001$ ) で、また Overuse 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p < .01$ , 図 7C)。Enthesis SB 領域における OSX 陽性面積比率は Control 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間 ( $p < .001$ ) で、また Overuse 群と Misuse 及び Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p < .01$ , 図 7D)。

表 1： 体重および筋質重量比較結果

Group	Body mass (g)	Muscle wet mass (mg)	Normalized value (mg/g)
Control	35.4 ± 1.02	46 ± 4.90	1.30 ± 0.12
Overuse	35.6 ± 1.02	50 ± 6.32	1.40 ± 0.17
Misuse	36.8 ± 0.75	62 ± 4.00 * †	1.68 ± 0.08 * †
Misuse+Overuse	37.4 ± 1.02 †	64 ± 4.90 † §	1.70 ± 0.09 † §

\*Control vs. Misuse;  $p < .05$  †Control vs. Misuse+Overuse;  $p < .05$  ‡Overuse vs. Misuse;  $p < .05$  §Overuse vs. Misuse+Overuse;  $p < .05$

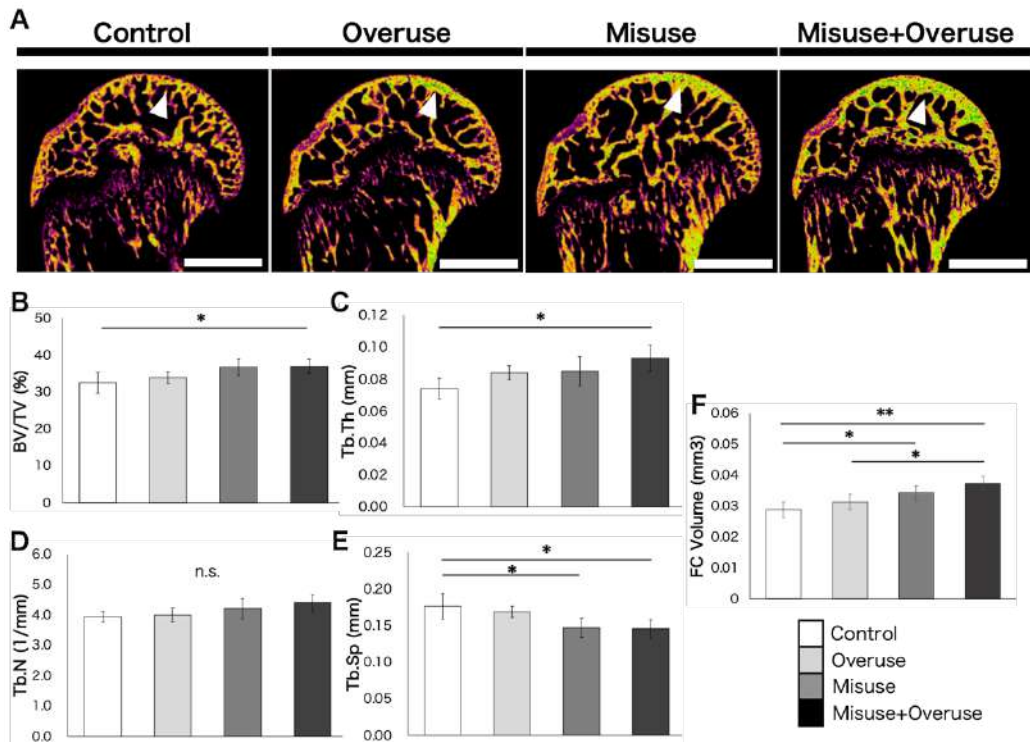


図 4： 上腕骨骨頭部及び Enthesis 部に対する骨形態学的解析結果

A: 各群における上腕骨骨頭部のMicro-CT画像。Scale bar; 1mm。白矢頭; 上腕骨骨頭部における関節面直下のSB領域。B: 上腕骨骨頭部におけるBV/TV比較結果。C: 上腕骨骨頭部におけるTb.Th比較結果。D: 上腕骨骨頭部におけるTb.N比較結果。E: 上腕骨骨頭部におけるTb.Sp比較結果。F: Enthesis FC領域の体積比較結果。B-F: すべてのデータは平均値±SDで示した。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。

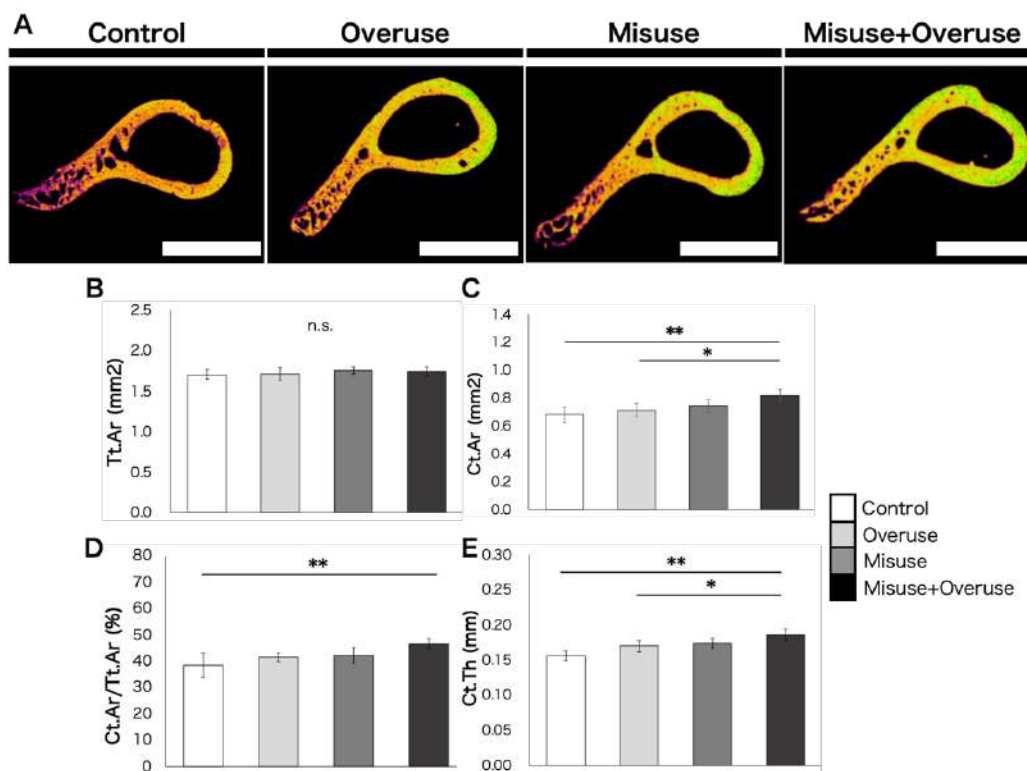


図 5： 上腕骨骨幹部に対する骨形態学的解析結果

A: 各群における上腕骨骨幹部のMicro-CT画像。Scale bar; 1mm。B: 上腕骨骨幹部におけるTt.Ar比較結果。C: 上腕骨骨幹部におけるCt.Ar比較結果。D: 上腕骨骨幹部におけるCt.Ar/Tt.Ar比較結果。E: 上腕骨骨幹部におけるCt.Th比較結果。B-F: すべてのデータは平均値±SDで示した。\*:  $p < .05$ , \*\*:  $p < .01$ , n.s.:  $p > .05$ 。

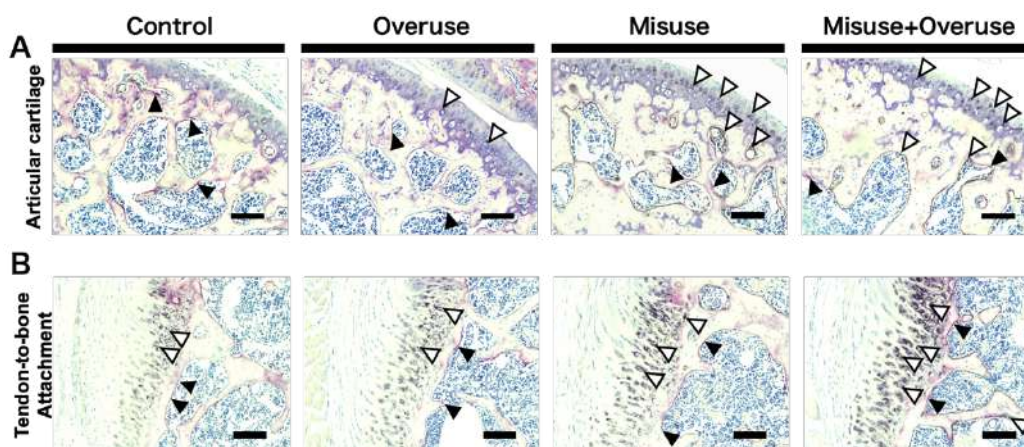


図 6： 上腕骨骨頭部に対する TRAP/ALP 二重染色画像

A: 関節軟骨領域に対するTRAP/ALP二重染色画像。B: 腱骨付着部領域におけるTRAP/ALP二重染色画像。A,B: 黒矢頭; TRAP陽性細胞。白矢頭; ALP陽性細胞。Scale bar; 100 $\mu$ m。



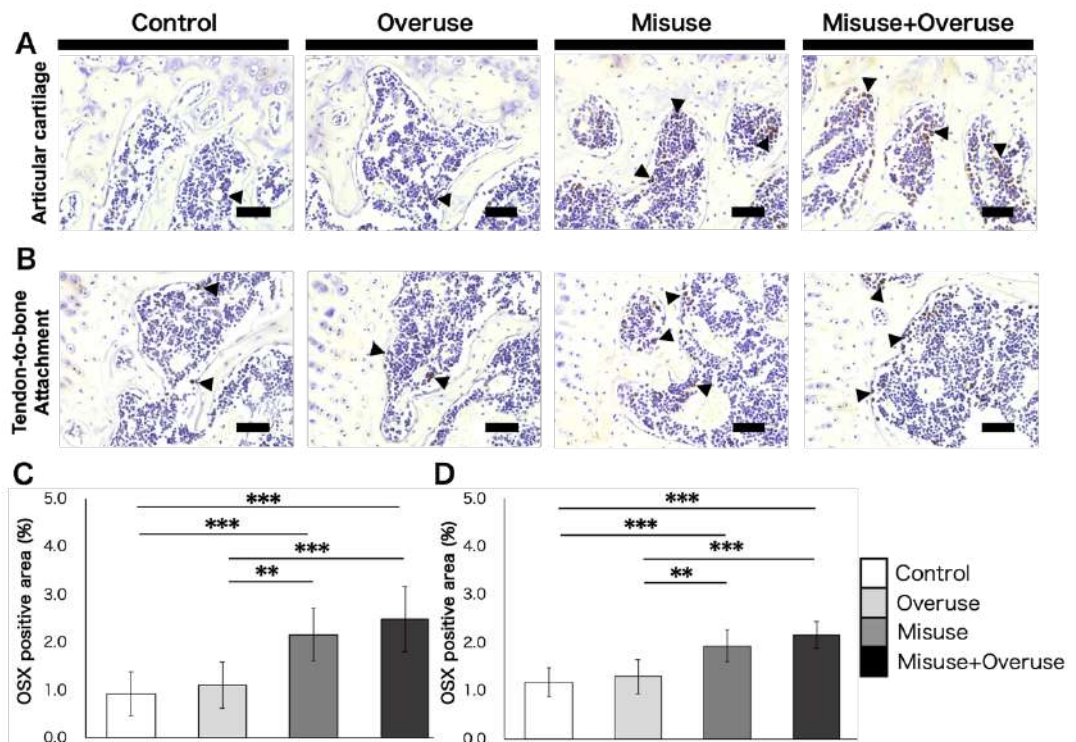


図 7： 上腕骨骨頭領域における Osterix 標識免疫組織化学染色

A: Single IHC染色を実施し得られた関節軟骨直下のSB領域組織画像。一次抗体: OSX。B: Single IHC染色を実施し得られた腱骨付着部直下のSB領域組織画像。一次抗体: OSX。A,B: 黒矢頭; OSX陽性細胞。Scale bar: 50  $\mu$ m。C: 関節軟骨直下のSB領域におけるOSX陽性領域比較。D: 腱骨付着部直下のSB領域におけるOSX陽性領域比較。C,D: すべてのデータは平均値 $\pm$ SDで示した。\*\*:  $p < .01$ , \*\*\*:  $p < .001$ 。

#### 5.4 考察

検証 I では、動作時における筋収縮タイプの優位性と運動量の影響がマウス上腕骨形成にいかなる影響を及ぼすのか検証した。結果より、上腕骨全体の形態変化は Overuse 群と Misuse 群間で著明な変化は確認されなかったため、筋収縮タイプの優位性変化が上腕骨全体の形成に影響を与えると結論付けることはできなかった。しかし部位特異的な変化として、関節面直下の SB 領域並びに Enthesis FC 領域では ALP 活性と OSX 発現が増加傾向を示し、形態変化が生じていることが巨視的観察より明らかにさ



れた。また EC 優位な運動により筋肥大も確認されたことから、筋収縮タイプの影響は骨全体の形成には大きく影響を及ぼさないものの、部位特異的な影響を及ぼしていた可能性が考えられる。

本検証では EC 優位な動作を模倣するために、多くの研究で使用されている下り坂走行を用いることで再現した。四足動物において前肢は荷重関節であり、下り坂走行の場合は身体重心が進行方向へ移動する際に重力に抗して姿勢制御を行うため、前肢により多くの床反力が加わると同時に総制動力の約 84%を前肢が担うとされている<sup>49)</sup>。また肩関節の屈筋である棘上筋は、前肢の接地から離地までの間に抗重力筋のように作用し、屈曲モーメントと筋活動の増加を引き起こす<sup>50)</sup>。齧歯類を用いた先行研究では、下り坂走行中に棘上筋は EC を誘発していることが報告されており<sup>44,51)</sup>、EC による筋 CSA の増加や腱の炎症反応が示されている<sup>52,53)</sup>。本検証では筋湿重量のみしか検証していないものの、湿重量の増加は骨格筋の肥大化を示唆している可能性が高いため、本研究で用いたトレッドミルモデルは、EC を再現するのに適したモデルであったと推察される。

骨は付与される機械的ストレスが増加すると、骨芽細胞及び骨細胞から骨モデリングに関与するサイトカインが分泌される<sup>54)</sup>。同時に、骨髄における血流量が増加することで、骨芽細胞及び骨細胞の活性化が促進され骨形成が誘発される<sup>55)</sup>。Murray ら (2001) は、馬の高強度運動により、高負荷部位の SB 厚が増加し、骨モデリングの促進並びに骨吸収が減少することを示した<sup>56)</sup>。また Li ら (2017) はラットの運動強度を下り坂に設定することで増加させ、脛骨 SB 厚の拡大及び骨密度の増加が生じるこ

とを示した<sup>57)</sup>。骨幹部の皮質骨に関しても同様に、付与される機械的ストレスの増加と長軸方向へ刺激が加わることで皮質骨厚が変化する。そのためジャンプ運動など圧縮ストレスが増加する運動後は皮質骨形成が促進されている<sup>58,59)</sup>。今回の研究結果から骨全体的な形態変化は大きく確認されなかったものの、**Misuse+Overuse** 群は **SB** 及び骨幹部領域において **Control** や **Overuse** 群よりも増加傾向を示した。これは活動量の増加かつ下り坂走行によって上肢に付与される床反力が増加したことで骨芽細胞や骨細胞の活性化が促進され骨形態変化へとつながった可能性が考えられる。

また **Enthesis FC** 領域の形態変化が生じた可能性を示唆したが、これは仮説を一部示唆する結果となった。序論にも述べた通り、**OSD** や **Sever** 病などの **Enthesis** 領域で生じる障害は一般的に **Overuse** で生じると報告されているが<sup>24)</sup>、必ずしも過剰な運動を実施しているものが発症するわけではない。臨床研究レベルでは運動中の **Misuse** が **OSD** の発症に関与している可能性があることが示されたが<sup>30)</sup>、我々の知る限り運動中の筋収縮タイプの変化と骨形成並びに **Enthesis FC** 領域の形態変化に関連性があることを証明した基礎研究は未だ報告されていない。本検証により、初めて基礎研究レベルで筋収縮タイプと **Enthesis** の形態変化の関与が示唆された。よって次なる研究としては、**Enthesis** 領域に焦点を当て、筋収縮タイプの変化に伴う機械的ストレスが **Enthesis FC** 領域に如何なる影響を及ぼすか詳細に検証することが必要不可欠であると考えた。

## 6 検証Ⅱ：運動量の変化と筋収縮タイプの変化がマウス棘上筋 Enthesis に及ぼす病理学的影響

### 6.1 背景と目的

Enthesis FC 領域は筋収縮に伴う機械的ストレスの有無によって形態変化することが知られている。Thomopoulos ら (2007) は、棘上筋をボツリヌス毒素によって麻痺させ収縮力を低下させると、Enthesis FC 領域と SB 領域が正常に発達しないことを報告している<sup>60)</sup>。さらに Shaw ら (2008) は、胎児アキレス腱 Enthesis の発生段階において、線維芽細胞が筋収縮に伴う機械的ストレスに起因して FC 細胞に変化し、正常な Enthesis 構造を形成することを明らかにした<sup>61)</sup>。Enthesis に関する研究の多くは、筋収縮の有無すなわち機械的ストレスの有無と Enthesis における FC 領域の構造変化の関係性に注目しており、機械的要因が FC 領域の形成に重要であることを報告している。しかし、運動量や骨格筋の収縮タイプの変化により機械的ストレスを増大させたモデルでの検証はほとんど報告されていない。そのため、機械的ストレスの増加が起因であるスポーツ関連性 Enthesopathy の発症機序に関しては未だ不明なことが多い。検証Ⅰにて Enthesis FC 領域の形態変化に、骨格筋収縮タイプの変化が関与している可能性を示唆したことから、検証Ⅱでは Enthesis に焦点を当て、組織学的解析、骨形態学的解析、分子生物学的解析により Enthesopathy 様の病理学的変化が生じるかどうかを検証することとした。

## 6.2 方法

### 6.2.1 倫理的配慮

本検証内容は、埼玉県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに準じて実施した（承認番号 2019-3）。なお、使用動物数は可能な限り最小限に設定した。

### 6.2.2 研究デザインと運動介入プロトコル

Slc : ICR マウス（3 週齢/雄）20 匹を Japan SLC Inc. から購入した。介入方法は検証 I と同様とし、以下の 4 群に分類した：Control (Sedentary : 図 8A) 群、Overuse (高速平地走行 : 図 8B) 群、Misuse (低速下り坂走行 : 図 8C) 群、Misuse+Overuse (高速下り坂走行 : 図 8D) 群。運動強度は検証 1 よりもやや増加させ、介入頻度は検証 1 と同様に実施した。(図 8E)。

### 6.2.3 標本採取

4 週間の運動介入終了直後に、検証 I 同様の方法で安楽死させた。左肩関節からは左棘上筋・左棘上筋腱・左上腕骨を採取し、組織学的解析・分子生物学的解析・骨形態学的解析を実施した。右肩関節からは筋-腱-Enthesis 複合体を採取し、組織学的解析を実施した

### 6.2.4 組織学的解析

採取した左棘上筋は、余分な水分を除去したのちに、ヘキサン・イソペンタン混合溶液（1 : 1）に浸潤させ、-100°C で急速凍結した。Leica CM3050S cryostat (Leica Microsystems AG, Wetzlar,

Germany) を用いて組織を 16 $\mu\text{m}$  で薄切した。切片に対しては Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を実施し、平均筋横断面積 (Cross-sectional area ; CSA) を算出し比較した。解析には Hybrid Cell Count BZ-H3C (KYENCE, Osaka, Japan) を用いた。

続いて、採取した右筋-腱-Enthesis 複合体は 4%PFA/PBS 溶液にて固定処理実施後、10%EDTA 溶液を用いて脱灰処理を実施した。その後検証 I 同様にパラフィンブロックを作成し、切片を作成した。なお、Enthesis 領域が明瞭に観察される 300 $\mu\text{m}$  の範囲を 5  $\mu\text{m}$  で薄切し、解析時に形状や角度の影響を受けないよう 100 $\mu\text{m}$  間隔の 3 切片をスライドガラス上に配置した。作成した切片に対しては脱パラフィン処理後、HE 染色並びに Toluidine-Blue (TB : pH7.0 に調整) 染色により Enthesis FC 領域を明確化した。先行研究<sup>62)</sup>にて報告されている細胞形状の特徴をもとに、FC 領域及び UFC、CFC 領域を同定し、各領域の面積を算出した。UFC と CFC 領域の各面積は、Tidemark を基準にして分画した。また UFC と CFC 領域における変化率も算出した (UFC 変化率 =  $\text{UFC}/\text{FC} \times 100$  [%] , CFC 変化率 =  $\text{CFC}/\text{FC} \times 100$  [%])。解析には画像解析ソフトウェア Fiji<sup>48)</sup>を用いた。なお、HE および TB 染色手順に関しては補足資料 1 の 13.1.1 と 13.1.2 に記した。

Enthesis における石灰化領域の標識を行うため、脱パラフィン処理を実施した切片に対し ALP 染色を実施した。Enthesis FC 領域全体に対する ALP 陽性面積比率を算出し比較を行なった。画像解析は Hybrid Cell Count BZ-H3C を使用した。なお ALP 染色手順に関しては補足資料 1 の 13.1.4 に記した。

### 6.2.5 免疫組織学的解析

IHC 染色を Enthesis FC 及び SB 領域に対して実施した。Enthesis FC 領域に対しては、軟骨標識のため Anti-collagen type II (ColII) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/200, ab34712, Abcam, MA, USA) を、炎症 / 変性 / 石灰化関連因子標識のため Anti-tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/200, bs-2081R, Bioss, MA, USA)、Anti-interleukin-6 (IL-6) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/100, ab6672, Abcam, MA, USA)、Anti-matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/200, bs-0575R, Bioss, MA, USA)、Anti-collagen type X (ColX) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/150, ab58632, Abcam, MA, USA) を一次抗体に用いて標識化した。また Enthesis SB 領域における骨芽細胞分化関連因子標識のため Anti-OSX rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/300, bs-1110R, Bioss, MA, USA) 及び Anti-runt-related transcription factor 2 (Runx2) mouse monoclonal antibody (希釈倍率 1/200, D130-3, Medical & Biological Laboratories, Tokyo, Japan) を一次抗体に使用した。解析には画像解析ソフトウェア Fiji<sup>48</sup>を使用した。TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-13、ColX に対しては単位面積あたりにおける各陽性細胞比率を、OSX、Runx2 に対しては単位面積あたりにおける各陽性面積比率を算出した。なお IHC 染色の基本手順及び使用した一次抗体に関しては補足資料 2 の 13.2.1 と 13.2.3 に記した。

### 6.2.6 骨形態学的解析

採取した左上腕骨を生理食塩水で洗浄し、4% PFA/PBS 溶液で固定処理実施後、Micro-CT Sky scan 1272 による測定を行った。測定条件及び基本的な解析手順は検証 I と同様とした。なお検証 I では上腕骨骨頭部全体を解析対象としていたが、検証 II では Enthesis FC 領域及び FC 直下の SB 領域のみを解析対象としているため、条件をやや変更した。変更点は以下に記載した。FC 領域の体積は矢状断面画像において関心領域を設定し (400 $\mu$ m 以内)、Enthesis SB 領域を含まないように算出した。SB 領域の解析は、FC 直下の SB 領域から成長板までの任意の範囲に関心領域 (400 $\times$ 500 $\times$ 500 $\mu$ m) を設定し、BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp を算出した。組性の違いに注意するため関心領域の設定は減衰係数 (Attenuation coefficient ; AC) 値に基づいて色付けされた画像に対し実施した。上腕骨骨頭部の体積は、成長板より上部の上腕骨骨頭総体積 (成長板を除く) として算出した。FC 体積は、動物個体の大きさに影響される可能性があるため、上腕骨骨頭部体積で正規化した。

### 6.2.7 分子生物学的解析

左棘上筋腱における mRNA の発現を、Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time PCR) を用いて評価した。StepOnePlus system (Applied Biosystems, CA, USA) と TaqMan Gene Expression Assays probe (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて実施した。Primer は *Tnf- $\alpha$*  (Mm00443258\_m1)、*Il-6* (Mm00446190\_m1)、*Transforming*

*growth factor-beta 1* (*Tgfb1*; Mm01178820\_m1) を使用した。Reference gene には *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*; Mm99999915\_g1) を使用し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いることで標的遺伝子の相対発現量を算出した。なお分子生物学的解析の詳細な手順と使用した Primer に関しては補足資料 3 の 13.3 に記した。

### 6.2.8 統計学的解析

すべての解析は R version 3.4.3 を用いて検証 I 同様に実施した。有意水準は 5%未満とし、すべての結果は平均値 $\pm$ SD で示し、算出した実測値は補足データ一覧に記述した。

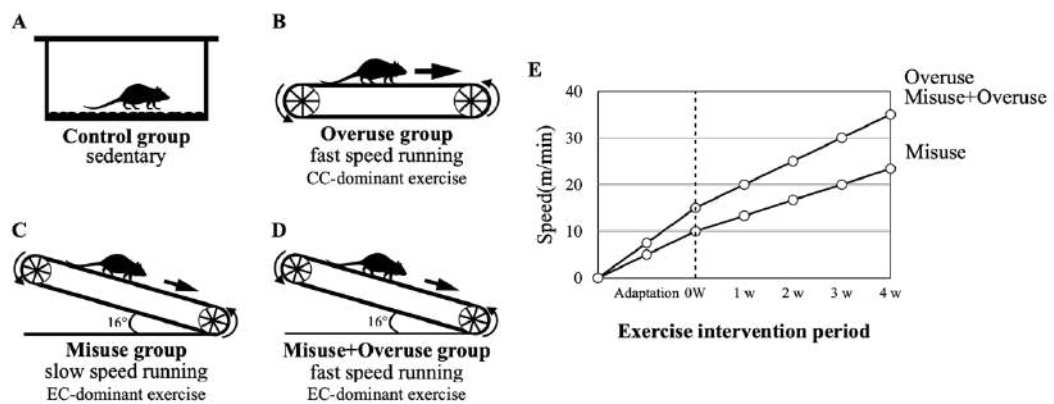


図 8： 介入群の設定と運動介入プロトコル

A: Control (Sedentary)群。ケージ内において行動を自由とした。B: Overuse (高速平地走行)群。トレッドミルの傾斜角度を $0^{\circ}$  に設定し走行させた。C: Misuse (低速下り坂走行)群。D: Misuse+Overuse (高速下坂走行)群。トレッドミルの傾斜角度を $-16^{\circ}$  に設定し、先行研究に基づき走行中棘上筋のEC活動を誘発させた。E: 運動介入走行速度の経時的変化。点線はMisuse群の速度変化を示している。実線はOveruse群及びMisuse+Overuse群の速度変化を示している。収縮タイプによる負荷量を考慮し、Overuse群とMisuse+Overuse群は、Misuse群よりも1.5倍速い速度で実施した。



## 6.3 結果

### 6.3.1 棘上筋に対する組織学的解析結果

棘上筋に対して HE 染色を行い、筋 CSA を算出した (図 9A)。結果として Control 群と Overuse 群間では有意な増加を示さなかった ( $p=.998$ )。一方で Misuse 及び Misuse+Overuse 群は Control 及び Overuse 群と比較して有意に増加した ( $p<.01$ , 図 9B)。なお、Misuse 群と Misuse+Overuse 群間に有意差は確認されなかった ( $p=.368$ )。

### 6.3.2 Enthesis 線維軟骨領域に対する組織学的解析結果

HE、TB、IHC (Col II) 染色を行い、Enthesis FC 領域の組織学的構造変化を調べた (図 10A)。まず FC 全体の領域に関して、Control 群と Overuse 群間では有意な増加を示さなかったが ( $p=.117$ )、その他群間では有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 10B)。続いて UFC 領域に関して、全群間で有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 10C)。一方 CFC 領域に関しては、Control 群と Misuse 群間で ( $p<.05$ )、また Control 及び Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意な増加が確認された ( $p<.01$ , 図 10D)。最後に CFC 領域と UFC 領域の変化率を算出し比較したところ、全群間で CFC 領域よりも UFC 領域が有意に増加することが示唆された ( $p<.05$ , 図 10E)。

HE 染色した Enthesis 周囲組織像を巨視的観察した結果、Misuse 群及び Misuse+Overuse 群では肩峰下滑液包の肥厚が観察された。しかし Control 群と Overuse 群間では著明な変化は観察されなかった。Misuse+Overuse 群では、肩峰下滑液包内に

血管新生が生じており、肩峰下滑液包炎様の病理学的変化が観察された（図 11）。

### 6.3.3 Enthesis 線維軟骨領域における炎症・変性関連因子の免疫組織化学染色結果

Enthesis FC 領域における炎症／変性関連因子の発現を確認するため TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-13 を標識する IHC 染色を実施し、単位面積当たりにおける陽性細胞比率を算出した（図 12A）。FC 領域における TNF- $\alpha$  陽性細胞比率は、Control 群と Overuse 群間では有意な変化を示さなかった（ $p=.086$ ）。一方 Control 及び Overuse 群と比較し Misuse 群は優位な増加を示し（ $p<.001$ ）、Misuse+Overuse 群は他の全群に比べ有意に増加した（ $p<.05$ , 図 12B）。続いて FC 領域における IL-6 陽性細胞比率は TNF- $\alpha$  と同様の傾向を示し、Control 群と Overuse 群間では有意な変化を示さなかった（ $p=.133$ ）。一方 Control 及び Overuse 群と比較して Misuse 群は優位な増加を示し（ $p<.001$ ）、Misuse+Overuse 群は他の全群に比べ有意に増加した（ $p<.05$ , 図 12C）。最後に FC 領域における MMP-13 陽性細胞比率に関してだが、こちらも TNF- $\alpha$  や IL-6 と同様に Control 群と Overuse 群間では有意な変化を示さなかった（ $p=.083$ ）。一方 Control 及び Overuse 群と比較して Misuse 群は有意な増加を示し（ $p<.001$ ）、Misuse+Overuse 群は他の全群に比べ有意に増加した（ $p<.001$ , 図 12D）。

#### 6.3.4 Enthesis 線維軟骨領域における石灰化関連因子の 免疫組織化学染色結果

Enthesis FC 領域における石灰化関連因子の発現を確認するため ColX を標識する IHC 染色及び ALP 染色を実施し、単位面積当たりにおける陽性細胞比率及び陽性面積比率を算出した (図 13A)。FC 領域における ColX 陽性細胞比率は、すべて群間で有意差が確認された ( $p<.01$ , 図 13B)。続いて FC 領域における ALP 陽性面積比率は、Control 群と Overuse 群間では有意な増加を示さなかった ( $p=.188$ )。一方 Control 及び Overuse 群と比較して Misuse 群は優位な増加を示し ( $p<.001$ )、Misuse+Overuse 群は他の全群に比べ有意に増加した ( $p<.001$ , 図 13C)。

#### 6.3.5 Enthesis 軟骨下骨領域における骨芽細胞分化関連 因子の免疫組織化学染色結果

Enthesis SB 領域における骨芽細胞分化関連因子の発現を確認するため OSX 及び Runx2 を標識する IHC 染色を実施し、単位面積当たりにおける陽性面積比率を算出した (図 14A)。Enthesis SB 領域における OSX 陽性面積比率は、Control 群と Overuse 群間で有意差は確認されなかった ( $p=.376$ )。一方で Misuse 及び Misuse+Overuse 群は Control 群や Overuse 群よりも有意に増加していた ( $p<.001$ , 図 14B)。続いて SB 領域における Runx2 陽性面積比率は、Control 群と Overuse 群間で有意差は確認されなかった ( $p=.211$ )。一方 Misuse 群は Control 群や Overuse 群よりも有意に増加し ( $p<.01$ )、Misuse+Overuse 群は他の全群よりも有意に増加していた ( $p<.05$ , 図 14C)。

### 6.3.6 Enthesis 線維軟骨及び軟骨下骨領域における骨形態学的解析結果

Micro-CT で撮影した上腕骨骨頭及び Enthesis FC 領域を示した (図 15A)。Control 群と Misuse+Overuse 群間でのみ上腕骨骨頭骨体積に有意な変化が確認された ( $p<.05$ , 図 15B)。また FC 領域の体積を上腕骨骨頭の体積で正規化した場合、Control 群に比べ Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意な増加を示し ( $p<.05$ )、さらに Overuse 群に比べ Misuse+Overuse 群は有意な増加を示した ( $p<.05$ , 図 15C)。正規化した FC 領域の体積変化は CFC 領域の組織学的形態変化と同様の傾向を示した。続いて Enthesis SB 領域における各測定項目では以下のような結果が得られた。BV/TV は Control 群に比べ Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.01$ )。また Overuse 群に比べ Misuse+Overuse 群は有意に増加を示した ( $p<.001$ , 図 15D)。Tb.Th は Control 群に比べ Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.05$ )。また Overuse 群に比べ Misuse+Overuse 群は有意に増加を示した ( $p<.01$ , 図 15E)。Tb.N は全群間で有意差は確認されなかった ( $p=.170$ , 図 15F)。Tb.Sp は Control 及び Overuse 群と比較し Misuse+Overuse 群で有意に減少した ( $p<.05$ , 図 15G)。

### 6.3.7 棘上筋腱に対する分子生物学的解析結果

棘上筋腱における分子生物学的変動を調査するため、標的遺伝子の mRNA 相対発現量を比較した。まず *Tnf- $\alpha$*  に関しては Control 群に対し Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意に増加

した ( $p<.05$ , 図 16A)。一方 *Il-6* に関しては全群間で有意差が確認されなかった ( $p=.206$ , 図 16B)。*Tgfb1* に関しては *Tnf- $\alpha$*  同様に Control 群に対し Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.05$ , 図 16C)。

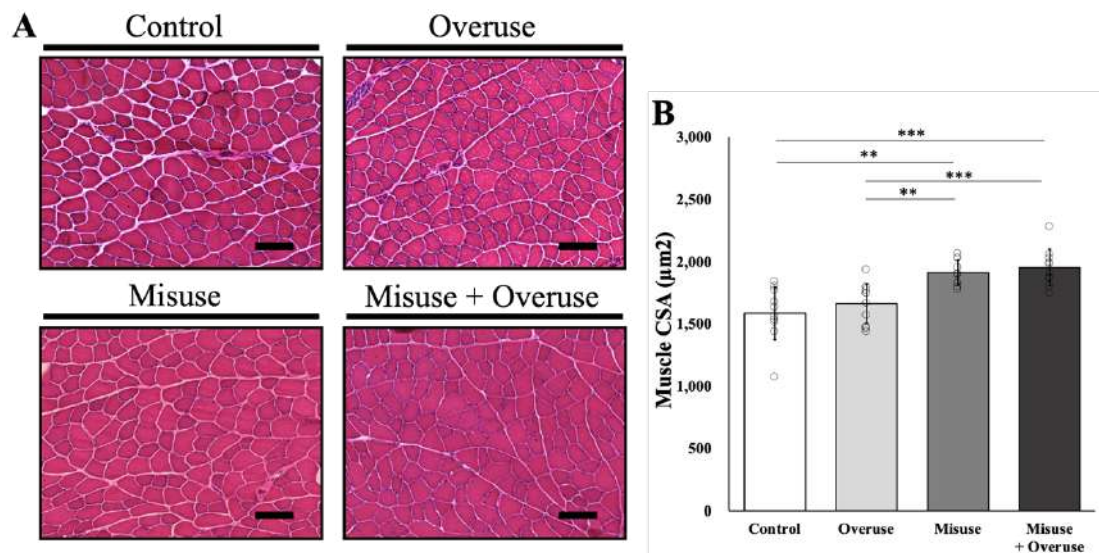


図 9： 棘上筋に対する筋横断面積の比較結果

A: 棘上筋に対するHE染色画像。Scale bar; 100µm。B: 棘上筋のCSA比較結果。すべてのデータは平均値±SDで示した。\*\*:  $p<.01$ , \*\*\*:  $p<.001$ 。

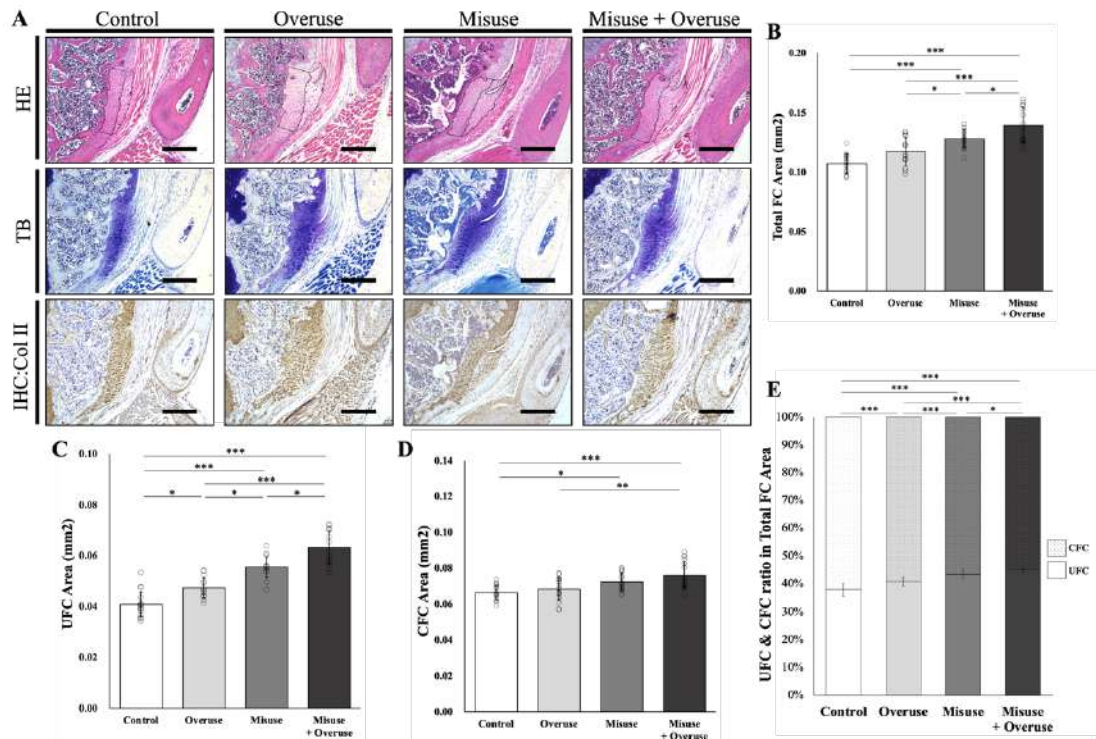


図 10： Enthesis 線維軟骨領域の組織学的形態変化

A: HE、TBおよびSingle IHC (ColIII) 染色画像。黒線: FC領域を示した。Scale bar; 300 $\mu$ m。B: FC領域全体の面積比較。C: UFC領域の面積比較。D: CFC領域の面積比較。E: UFCとCFCの面積変化率比較。すべてのデータは平均値 $\pm$ SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

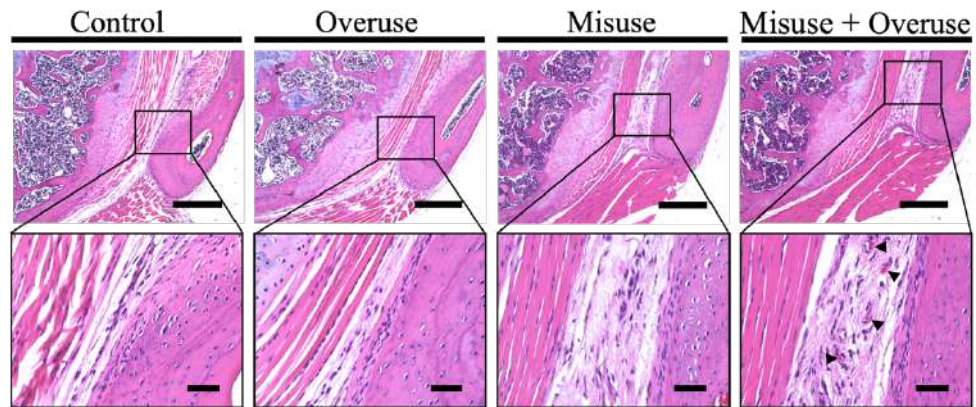


図 11： 肩峰下滑液包の組織学的変化

肩峰下滑液包に対するHE染色像。黒枠は肩峰と棘上筋腱の間に存在する肩峰下滑液包の拡大像を示した。黒矢頭：血管新生像。上段 Scale bar; 300µm、下段 Scale bar; 50µm。

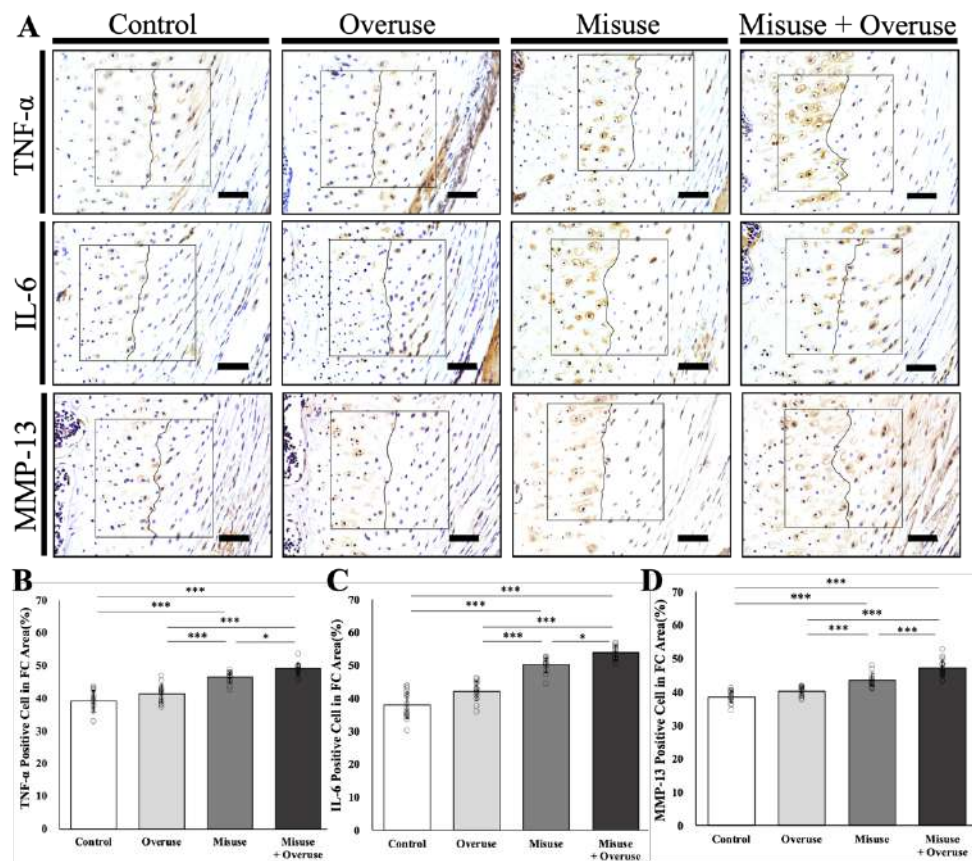


図 12： Enthesis 線維軟骨領域における炎症及び変性関連因子の発現比較

A: Single IHC染色を実施し得られたEnthesis FC領域の組織画像。一次抗体: TNF-α, IL-6, MMP-13。黒線: 関心領域 (Tidemarkを基準にCFCおよびUFC領域に分割)。Scale bar; 50µm。B: FC領域全体におけるTNF-α発現量比較結果。C: FC領域全体におけるIL-6発現量比較結果。D: FC領域全体におけるMMP-13発現量比較結果。B-D: すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ 。



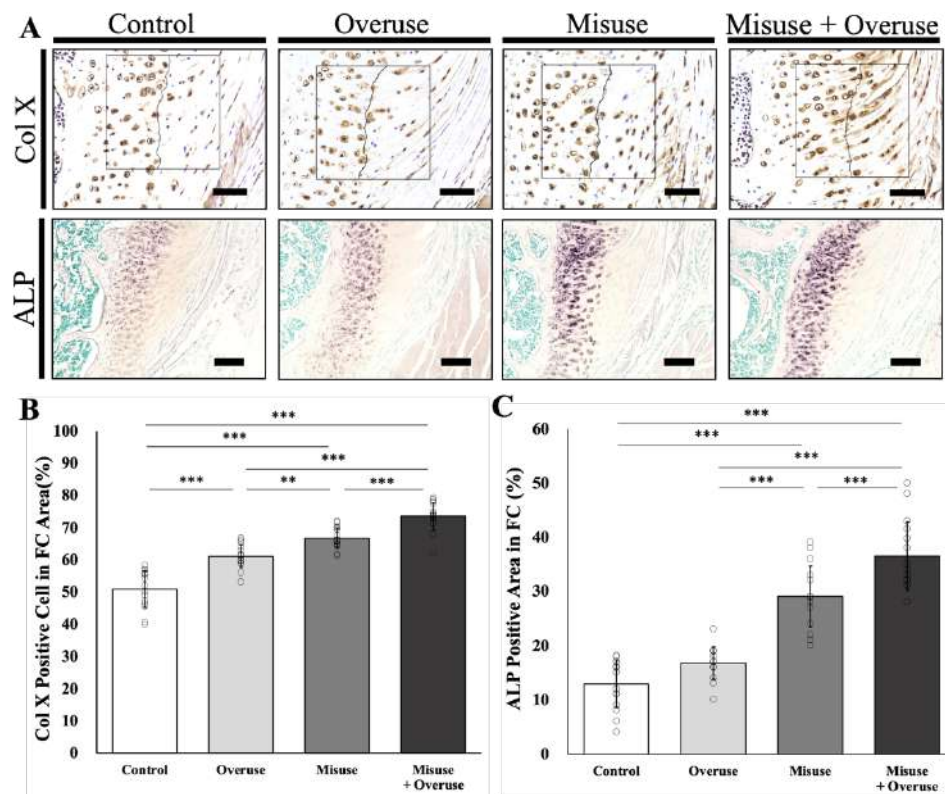


図 13: Enthesis 線維軟骨領域における石灰化関連因子の発現比較

A: Single IHC染色およびALP染色を実施し得られたEnthesis FC領域の組織画像。一次抗体: ColX。黒線: 関心領域(Tidemarkを基準にCFCおよびUFC領域に分割)。上段Scale bar; 50 $\mu$ m、下段Scale bar; 100 $\mu$ m。B: FC領域全体におけるColX発現量比較結果。C: FC領域全体におけるALP発現量比較結果。B-C: すべてのデータは平均値 $\pm$ SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。



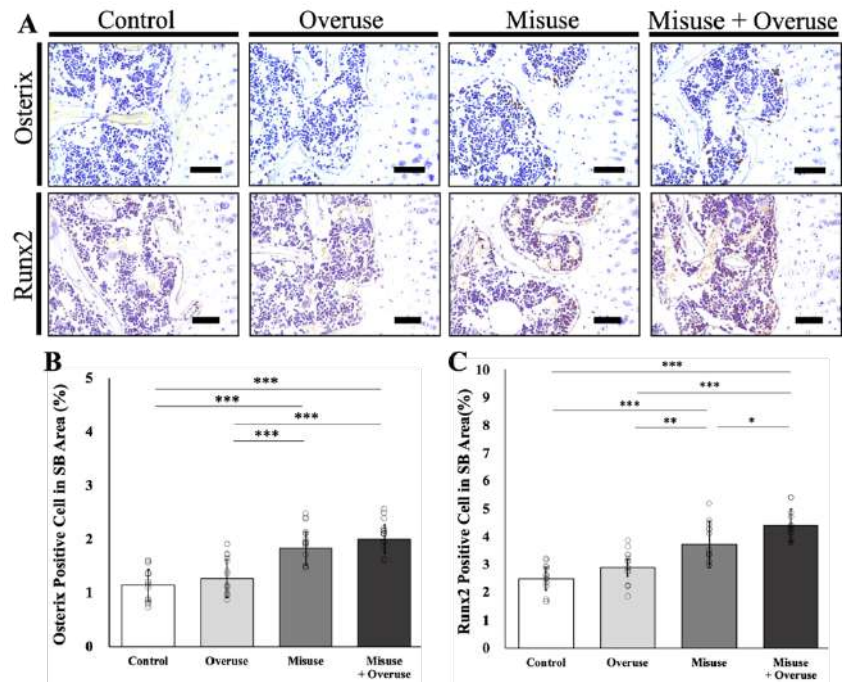


図 14： Enthesis 軟骨下骨領域における骨芽細胞分化関連因子の発現比較

A: Single IHC染色を実施し得られたEnthesis SB領域の組織画像。一次抗体: OSX、Runx2。Scale bar; 50 $\mu$ m。  
 B: Enthesis SB領域におけるOSX陽性面積比較結果。C: Enthesis SB領域におけるRunx2陽性面積比較結果。B-C: すべてのデータは平均値 $\pm$ SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

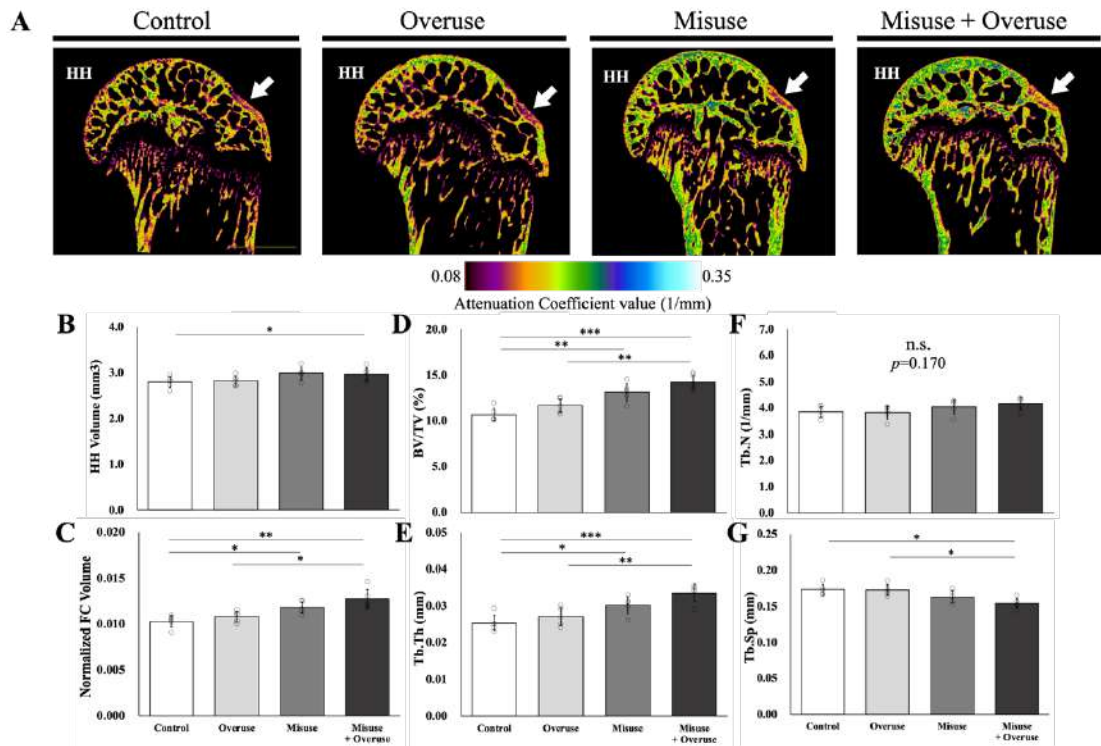


図 15: Enthesis 線維軟骨領域および軟骨下骨領域における骨形態変化

A: Micro-CTで撮影した上腕骨骨頭とEnthesis FC領域およびSB領域を示した。白矢印: Enthesis FC領域。HH: 上腕骨骨頭。B: 上腕骨骨頭全体の体積比較結果。C: 上腕骨骨頭体積で正規化したFC体積の比較結果。D: Enthesis SB領域におけるBV/TV比較結果。E: Enthesis SB領域におけるTb.Th比較結果。F: Enthesis SB領域におけるTb.N比較結果。G: Enthesis SB領域におけるTb.Sp比較結果。B-G: すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

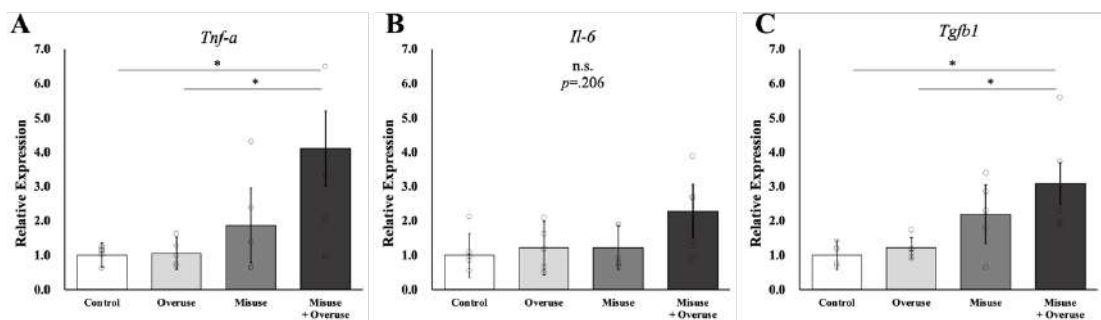


図 16: 棘上筋腱における mRNA 相対発現量の比較結果

A: *Tnf-a*を標的遺伝子としたmRNA相対発現量の比較結果。B: *Il-6*を標的遺伝子としたmRNA相対発現量の比較結果。C: *Tgfb1*を標的遺伝子としたmRNA相対発現量の比較結果。A-C: Reference geneには*Gapdh*を用いた。すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; n.s., not significant  $p > .05$ 。

## 6.4 考察

本検証結果より、EC 優位な運動は運動量に関わらず筋肉の CSA を増加させトレーニング効果を示す一方で、Enthesis FC 領域においてスポーツ関連性 Enthesopathy 様の病理学的変化を誘発した。そしてこの病理学的変化は、EC 優位な運動と Overuse の両方が組み合わされた場合により顕著な変化を示した (図 17)。

本検証では下り坂走行群において筋 CSA が増加し、腱における炎症関連因子や成長・サイトカイン関連因子の mRNA 発現量も増加していることが明らかになった。そのため検証 I の結果も踏まえると、下り坂走行は棘上筋の EC 優位な運動を確実に模倣していることが改めて検証された。

EC は、外部負荷が筋張力を超えた状態で筋が収縮するため、筋及び腱組織に過剰な引張応力が生じる。過剰な引張応力は、腱の粘弾性によって吸収されるだけでなく、直列に配置された Enthesis FC 領域にも影響を与えることが推察される。本研究では、EC によって棘上筋の肥大化が誘発され、骨格筋が発揮する最大筋張力と筋 CSA との間には正の相関関係が報告されていることから<sup>63)</sup>、EC 優位な運動群では Enthesis にかかる局所的な応力が特異的に増加した可能性が考えられる。さらに、棘上筋腱は上腕骨骨頭に対し Wrap-Around 構造を呈しているため<sup>64)</sup>、筋収縮が生じると牽引応力とともに Enthesis FC 領域付近に圧縮応力が発生する<sup>65,66)</sup>。したがって、EC 優位な運動は引張応力と圧縮応力の両方を増加させることによって、Enthesis 構造の形態変化並びに病理学的変化を誘導した可能性がある。

FC 細胞は力機械的ストレス環境に耐える様に、細胞形態や細

胞外基質を変化する特徴を有している<sup>64)</sup>。例えば FC 領域の中でも、素性の違いにより CFC と UFC で応力への感受性が異なっている。先行研究では 10%の公称応力を加えた場合、CFC は 2%しか変化しなかったのに対し、UFC は 9.7%も変化したことを報告している<sup>67)</sup>。すなわち、UFC 領域の弾性率は CFC 領域の弾性率よりも大きく、変化が生じやすい領域であることが示唆されていた。本検証結果からも UFC 領域の変化率は CFC 領域の 1.6-3.5 倍となっており、先行研究同様に UFC 領域の変化量が CFC 領域の変化量よりも大きいことを示していた。UFC 領域の素性としては大部分をアグリカンなどのプロテオグリカンや Collagen type II が占めており<sup>11,64)</sup>、圧縮応力に対して感受性が高い組織となっている。そのため EC 運動かつ Wrap-Around 構造の影響から Enthesis 内側面で圧縮応力が増加したことで、変化率の高い UFC 領域の拡大が認められた可能性が高い。また、過剰な機械的ストレスが Enthesis に付与された場合、微細損傷が生じ炎症反応が誘発される<sup>68,69)</sup>。Enthesis FC 領域で生じた炎症反応やその周囲で生じた血管新生は Enthesopathy 様の病理学的変化を誘発することはすでに脊椎関節炎関連研究において証明されている<sup>69,70)</sup>。本研究においても Enthesis FC 領域では炎症性因子が EC 優位な運動群において増加しており、また肩峰下滑液包において肥厚と血管新生が確認され、肩峰下滑液包炎が誘発されていた。これらの変化が生じた結果として、変性反応や石灰化反応などの Enthesopathy 様病理学的変化が誘発された可能性が考えられる。

過去の研究では、運動量の増加だけでは、Enthesis SB 領域に

大きな変化が生じないことが示されてきた<sup>71,72)</sup>。しかし近年は骨格筋の収縮力が麻痺などにより弱化した場合 **Enthesis SB** 領域が脆弱になることや<sup>73)</sup>、日常的な筋収縮量をわずかに増加させるだけでも、**Enthesis** 領域の面積が増加することなどが報告され<sup>74)</sup>、多くの研究者の認識が変わりつつある。今回の研究においても、**Micro-CT** 及び **IHC** 染色 (**OSX**, **Runx2**) 結果から、**EC** 優位な運動が **Enthesis FC** 領域だけでなく、**Enthesis SB** 領域にも影響を与えていることが明らかになった。これは検証 I の結果と合わせると、上腕骨全体的な骨形成に対しては筋収縮タイプ特異的な影響は生じないものの、筋収縮の影響が直接的に加わる **Enthesis** 領域においては筋収縮タイプ特異的な変化が生じることが明らかとなった。

本研究により、**Enthesopathy** 様の病理学的変化が生じる理由には、運動量の増加よりも筋収縮タイプ特異的な機械的ストレスが関与していることが新たな知見として得られた。しかし本研究だけでは、まだ **Enthesopathy** 様の病理学的変化が生じた詳細な要因が明らかとなっていない。その理由としては、検証 II では現象を明らかにすることが主な目的であったため、その際に関わる生物学的要因まで着目をしていなかったからである。より詳細な発症要因を解明するためにも、次なる研究では **Enthesis** 領域において如何なる分子の変動が生じていたのかを追求し、**Enthesopathy** 様の病理学的変化を誘導するシグナル伝達経路を特定する必要があると考えた。

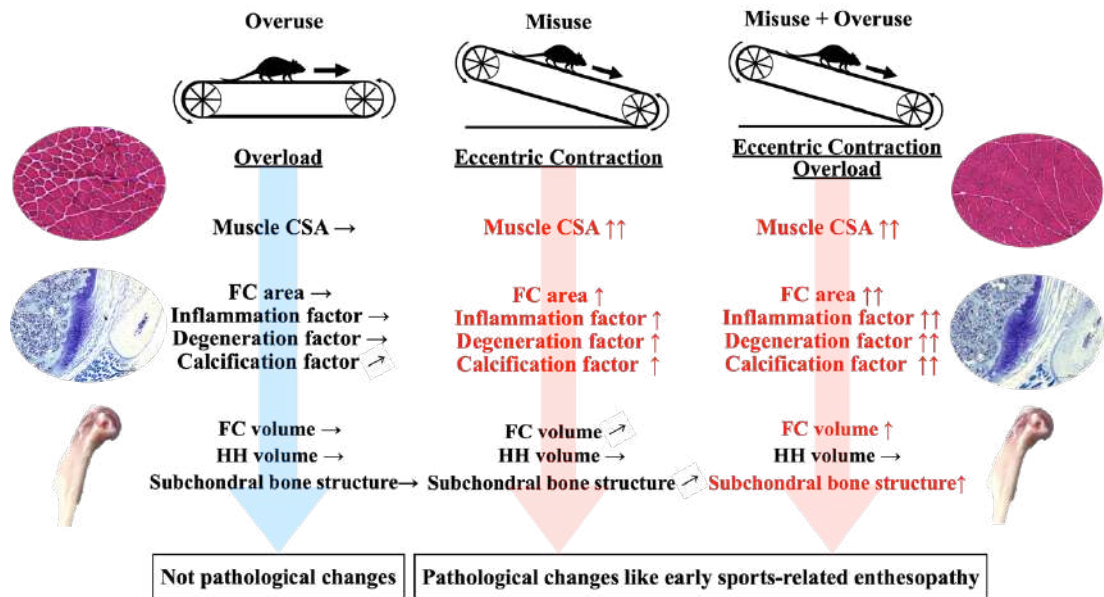


図 17： スポーツ関連性 Enthesopathy の発症要因を示した模式図

単純な過剰運動に伴う機械的ストレスの増加は、スポーツ関連性 Enthesopathy の発症に大きく影響しない。一方、EC 優位な運動に伴う機械的ストレスの増加は、スポーツ関連性 Enthesopathy 様の病理学的変化を示し、過剰運動が加わるとより顕著な病理学的変化を示す。

## 7 検証Ⅲ:マウス棘上筋 **Enthesis** の病的構造変化に影響を及ぼす分子経路の検証

### 7.1 背景と目的

**Enthesis FC** 領域の形成には、機械的要因に加え、生物学的要因として様々な分子経路の活性化も重要視されている<sup>8)</sup>。例えば胚発生の段階では、腱細胞の発生とマトリクスの組織化に必要な **basic helix-loop-helix transcription factors scleraxis (Scx)** と、軟骨形成に必要な **SRY-box transcription factor 9 (Sox9)** が、長骨形成の鋳型となる一次軟骨を形成する<sup>75,76)</sup>。その後 **TGFβ** や **Bone morphogenetic proteins (BMP)** のシグナル伝達により軟骨分化が促進され、骨隆起が形成される<sup>77,78)</sup>。特に、**BMP4** は、三角筋上腕骨付着部の骨隆起形成時に、軟骨細胞の運命を導くことに関係していると言われている<sup>79)</sup>。さらには **Enthesis FC** 領域において **Indian hedgehog (IHH)** シグナル伝達が介されることにより軟骨細胞の分化が促進され石灰化が促進されることも報告されている<sup>80)</sup>。これらの **TGFβ**、**BMP**、**IHH** シグナル伝達は、**Enthesis FC** 領域の発生過程において軟骨形成と石灰化の誘導に重要な役割を果たしているが、病的変化が生じる場合にも活性化されている。例えば、**X-linked hypophosphatemia** モデルマウスでは、**BMP** 及び **IHH** シグナルが **Enthesis FC** 領域で活性化することで、**Enthesopathy** 様の形態変化を誘発する<sup>81)</sup>。また、マウス足関節を背屈固定させることでアキレス腱 **Enthesis** への機械的ストレスを増大させたモデルでも、**Enthesopathy** 様の形態変化が生じ、**TGFβ** シグナル伝達が関与していたことが報告されている<sup>18)</sup>。さらに別疾患である変形性膝関節症では、関節軟

骨や滑膜で TGF $\beta$  や BMP 関連因子が増加し、これらのシグナル伝達経路が骨棘形成に大きく関与していたことが報告されている<sup>82,83)</sup>。また IHH が病的な靭帯骨化で高発現していたことも報告されている<sup>84)</sup>。しかし、スポーツ関連性 Enthesopathy のように運動に起因して FC 領域の形態変化が生じた場合、如何なるシグナル伝達経路が活性化されるか報告した研究は存在しない。

検証 II によってスポーツ関連性 Enthesopathy の発症に EC 優位な運動が関与していることが明らかになったが、如何なる分子経路が活性化していたのかは不明であった。そのため検証 III の目的は、スポーツ関連性 Enthesopathy 様の形態変化に寄与する分子経路を特定することとした。

## 7.2 方法

### 7.2.1 倫理的配慮

本検証内容は、埼玉県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに準じて実施した（承認番号 2020-10）。なお、使用動物数は可能な限り最小限に設定した。

### 7.2.2 研究デザインと運動介入プロトコル

基本的な介入方法に関しては検証 II と同様とした。Slc:ICR マウス（3週齢/雄）88匹を Japan SLC Inc.から購入した。1週間の環境適応後、2週間（2W：n=44）及び4週間（4W：n=44）の介入を実施した。運動介入には小動物用トレッドミルを使用し、以下の4群に分類した（図 18A）：Control（Sedentary）群、Overuse（高速平地走行）群、Misuse（低速下り坂走行）群、



Misuse+Overuse (高速下り坂走行) 群。対象関節は肩関節とし、解析対象としては棘上筋、棘上筋腱、上腕骨骨頭部及び棘上筋-腱-Enthesis 複合体とした。解析項目内容の内訳は図 18B に記載した。運動強度は検証 II と同様とした (図 18C)。介入頻度は 1 日 1 時間、週 5 日、2W 及び 4W 実施した。

### 7.2.3 標本採取

2W 及び 4W の運動介入終了直後に、検証 I II 同様の方法で安楽死させた。プロテオミクス解析、組織学的解析、分子生物学的解析、骨形態学的解析のため左棘上筋、左棘上筋腱、左 Enthesis FC 領域、左上腕骨頭及び右棘上筋-腱-Enthesis 複合体を採取した。

### 7.2.4 プロテオミクス解析

Enthesis FC 領域において発現しているタンパク質を網羅的に解析するため、レーザーマイクロダイセクション (Laser microdissection ; LMD) および液体クロマトグラフィータンデム型質量分析 (Liquid chromatograph - mass spectrometry ; LC-MS/MS) を用いたプロテオミクス解析を実施した。2W 介入群における右棘上筋-腱-Enthesis 複合体を採取後、4% PFA/PBS 溶液にて固定処理後、10% EDTA にて脱灰処理を実施した。その後パラフィンブロックに包埋し、Enthesis 線維軟骨の全領域を回収するために、10 $\mu$ m にて 40 枚/1 個体の切片を作成した。切片を Director slide (AMR, Tokyo, Japan) にのせ、脱パラフィン処理後、FC 領域を明確化するために TB 染色を実施した。染色し

た切片から LMD7000 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) にて FC 領域のみを回収した。レーザーの設定に関しては以下の通りである: Power 40、Aperture 25、Speed 20、Line spacing 8。タンパク質の抽出には Qproteome FFPE kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用した (図 19A)<sup>85)</sup>。抽出方法を簡潔に述べると、 $\beta$ -mercaptoethanol を加えた Extraction Buffer EXB によってタンパク質を抽出し (補足資料 4 の 13.4.1)、4 $\mu$ l の 0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l trypsin in 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> をサンプルに加えた。37°Cで一晩インキュベートした後、20 $\mu$ l の 5% trifluoroacetic acid (TFA) を加えてトリプシン消化を停止させた (補足資料 4 の 13.4.2)。最後に、サンプルを C-TIP T300 (AMR, Tokyo, Japan) を用いて脱塩濃縮し、真空下で乾燥させたのち、20 $\mu$ l の TFA\_A [H<sub>2</sub>O : Acetonitrile (ACN) : TFA = 98 : 2 : 0.1] に溶出した (補足資料 4 の 13.4.3)。サンプルは解析まで -80°C で保管した。なお、1 個体から得られるタンパク質の収量は極めて少ないため、2-3 個体分の切片を 1 つにまとめることで収量を増加させた。そのため解析には 1 群あたり 2-3 サンプルを使用した。準備したサンプルは Nano-advanceUHPLC (Bruker, MA, USA) と Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に Advance Captive Spray ionization source (Bruker, MA, USA) を組み合わせた装置にて分析した (図 19B)。詳細には、サンプルをトラップカラム L-column ODS 5 $\mu$ m (Chemical Evaluation and Research Institute Japan, Tokyo, Japan) にロードし、移動相 A (H<sub>2</sub>O : Formic acid = 100 : 0.1) で洗浄と濃縮・脱塩を行った。その後、分析カラム Zaplous  $\alpha$ -Pep C18 nano

HPLC column (AMR, Tokyo, Japan) を介して、5-45%の移動相 B (ACN =100) を 500nl/min の流速で 20 分かけて溶出させた。質量分析 (Mass spectrometry ; MS) の条件は以下の通りである : electrospray voltage 1.8kv、no sheath and auxiliary gas flow、ion transfer tube temperature 150°C、ion selection threshold 1000 counts。MS/MS は、ダイナミック・エクスクルージョンにより、各 MS スキャンの上位 10 個のイオンに対して行われた。すべての MS/MS スペクトルデータは、Proteome discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて同定し、検索エンジンとしては MASCOT version 2.5.1 (Matrix Science, London, UK) を使用した。検索は Swiss-Prot データベースにおけるマウスエントリに対して実施した。ペプチド質量の許容範囲は 10 ppm、フラグメント質量の許容範囲は 0.02 Da とした。トリプシンの特異性を適用し、最大 2 回のミス切断を許容した。ペプチドの修飾については、methionine oxidation、cysteine carbamidomethylation、N-formylation、including formyl (K)、formyl (R)、formyl (N-terminus) を考慮した。結果は各サンプルについて 1 回の LC-MS/MS 分析から得られた。全組織サンプルのタンパク質発現を比較するため、ラベルフリー法を用いた。なお、得られたデータに含まれるペプチドの存在量である半定量値 (Abundance) をその後の分析に採用した。血液成分並びにケラチン成分を手動で除外した上で、全サンプル (2-3 サンプル/group) で共通して発現していたタンパク質を、統計解析ソフト R にて Venn 図を作成することで抽出した。それらの分子の群間変動は半定量値を元に log<sub>2</sub> fold change (log<sub>2</sub>FC) 変

換することで比較した（図 19C）。

log<sub>2</sub>FC 変換した値は Ingenuity Pathway Analysis system（IPA：Qiagen, Hilden, Germany）にアップロードし、全群間に対する Upstream regulator analysis を実施した（図 19C）。Upstream regulator analysis は、データセットの発現変動を誘発する miRNA や転写因子などを含む上流調節分子を探索し、それらの活性化状態を予測するプログラムである（z-score>2.0 はターゲット分子が Activated されていることを示し、z-score <2.0 はターゲット分子が Inhibited されていることを示す）。比較結果より得られた上位 15 個の Activated/Inhibited 分子を列挙した。

#### 7.2.5 組織学的解析

2W 及び 4W の左棘上筋並びに右棘上筋-腱-Enthesis 複合体に対する基本的な解析方法は検証 II と同様に実施した（図 19D）。簡潔に述べると、採取した棘上筋をヘキサソール・イソペンタン混合溶液（1：1）にて急速凍結した後、Leica CM3050S cryostat を用いて組織を 10 $\mu$ m で薄切した。切片に対しては HE 染色を実施し、筋 CSA を算出し比較した。解析には Hybrid Cell Count BZ-H3C（KYENCE, Osaka, Japan）を用いた。

右棘上筋-腱-Enthesis 複合体に対しては 4%PFA/PBS 溶液にて固定処理実施後、10%EDTA 溶液を用いて脱灰処理を実施した。その後パラフィンブロックを作成し、マイクローム REM-710 を用いて 5  $\mu$ m で連続切片を作成した。組織切片を脱パラフィン処理後、TB 染色及び Safranin-O fast green（SOF）染色を使用す

ることで Enthesis FC 領域を明確化した。SOF によって赤色に染色された領域かつ細胞形状に基づいて FC 領域を同定し、画像解析ソフトウェア Fiji<sup>48)</sup>を用いて面積を算出した。また Enthesis CFC 領域の標識を行うため脱パラフィン処理を実施した切片に対し ALP 染色を実施した。Enthesis FC 領域全体に対する ALP 陽性面積を算出し比較を行なった。画像解析は Hybrid Cell Count BZ-H3C ソフトウェアを使用した。なお、染色の手順に関しては補足資料 1 の 13.1.3 と 13.1.4 に記した。

#### 7.2.6 免疫組織学的解析

2W 及び 4W 介入群に対する IHC 染色には、一次抗体として Anti-TGF $\beta$  receptor type 1 (TGFBR1) mouse monoclonal antibody (希釈倍率 1/100, sc-518086, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、Anti-BMP receptor type 1A (BMPRI1A) mouse monoclonal antibody (希釈倍率 1/100, MABS419, Merck Millipore, MA, USA)、Anti-phospho-Smad2/3 (pSmad2/3) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/200, AF3367, Affinity Biosciences, OH, USA)、Anti-phospho-Smad1/5/9 (pSmad1/5/9) rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/100, 13820S, Cell Signaling Technology, MA, USA)、Anti-TGF $\beta$ 1 mouse monoclonal antibody (希釈倍率 1/200, GTX34272, GeneTex, LA, USA)、Anti-BMP4 rabbit polyclonal antibody (希釈倍率 1/200, bs-1374R, Bioss, MA, USA)、anti-Sox9 mouse monoclonal antibody (希釈倍率 1/400, 14-9765-82, invitrogen, CA, USA)、Anti-Runx2 mouse

monoclonal antibody (希釈倍率 1/200, D130-3, Medical & Biological Laboratories, CA, USA) を使用し標識化した (図 19D)。TGF $\beta$ R1 と pSmad2/3、BMPR1A と pSmad1/5/9 の共局在細胞を検出するために、2種類の ABC キット

(VECTASTAIN Elite ABC kit Peroxidase, VECTASTAIN ABC-AP kit : Vector Laboratories, CA, USA) 及び Mouse on Mouse Immunodetection kit (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて、avidin-biotin-peroxidase / alkaline phosphatase (AP) 複合法による Double IHC 染色を実施した。その他の因子 (TGF $\beta$ 1, BMP4, Sox9, Runx2) については、avidin-biotin-peroxidase 複合法による Single IHC 染色を行った。IHC 染色画像については、FC 領域における単位面積当たりの陽性細胞比率、SB 領域における単位面積当たりの陽性面積比率を算出した。解析には画像解析ソフトウェア Fiji<sup>48)</sup>を使用した。なお、IHC 染色の染色手順および使用した一次抗体に関しては補足資料 2 の 13.2 に記した。

#### 7.2.7 分子生物学的解析

2W 及び 4W 介入群における左 Enthesis FC 領域及び左棘上筋腱における mRNA 発現を、Real-time PCR により評価した (図 19E)。StepOnePlus system と TaqMan Gene Expression Assay probe を用いて実施した。Primer は *Tgfb1* (Mm01178820\_m1)、*Bmp2* (Mm013401780\_m1)、*Bmp4* (Mm00432087\_m1)、*Collagen type II alpha 1 chain* (*Col2a1*; Mm01309565\_m1)、*Alkaline phosphatase 1* (*Alp1*; Mm00475834\_m1)、*Sox9*

(Mm00448840\_m1)、*Runx2*(Mm00501584\_m1)、*Collagen type I alpha 1 chain* (*Col1a1*; Mm00801666\_g1)、*Collagen type III alpha 1 chain* (*Col3a1*; Mm00802331\_m1) を使用した。検証Ⅲでは異なる組織間の比較も実施するため、Reference gene は介入群間、及び Enthesis FC 領域と腱の異なる組織間で発現量の変動が少ない *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1* (*Hprt1*; Mm00446968) に変更した。2<sup>-ΔΔCt</sup> 法を用いることで標的遺伝子の相対発現量を算出した。分子生物学的解析の詳細な手順と使用した Primer に関しては補足資料 3 の 13.3 に記した。

#### 7.2.8 骨及び腱の形態学的解析

2W 及び 4W 介入群から採取した左棘上筋腱-上腕骨複合体を生理的食塩水で洗浄し、4% PFA/PBS 溶液で固定処理実施後、Micro-CT Sky scan 1272 による撮影を実施した (図 19F)。検証Ⅲでは上腕骨骨頭部のみならず腱の CSA も算出するため撮影条件を以下の通りに変更した：X 線 60kVp/166μA、検出器の解像度 1632x1092、ピクセルサイズ 4μm、回転角度 0.4°/秒、フィルター アルミニウム 0.25mm。上腕骨骨頭部及び Enthesis FC 領域に対する解析方法及び解析項目は検証Ⅱと同様とした。なお、左棘上筋腱の CSA は部位 (中間部もしくは挿入部) によって異なるため、中間部における最も細い領域を測定領域とした。

#### 7.2.9 統計学的解析

すべての解析は R version 3.4.3 を用いて検証Ⅰ・Ⅱ同様に実施し、2W 及び 4W それぞれに対し一元配置分散分析を実施した。

なお、分子生物学的解析において **Enthesis FC** 領域と腱での *Col2a1* 発現量比較に関しては、**2W** および **4W** それぞれに対し、正規性検定実施後に対応のない **T** 検定を実施した。全てのデータにおける有意水準は **5%**未満とし、結果は平均値±SD で示した。算出した実測値は補足データ一覧に記述した。



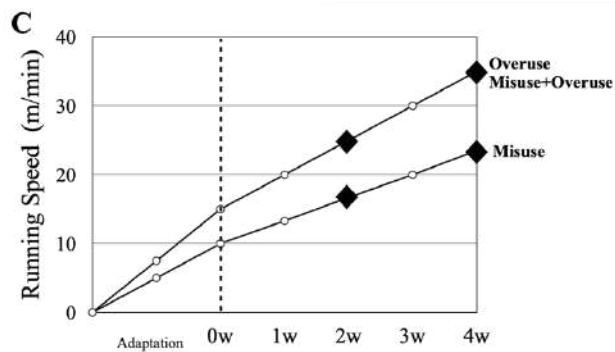
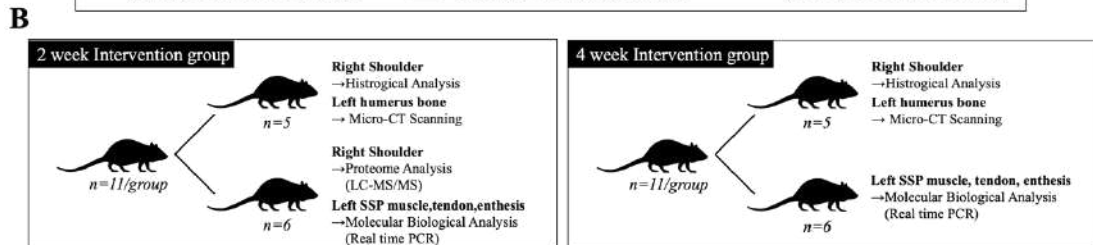
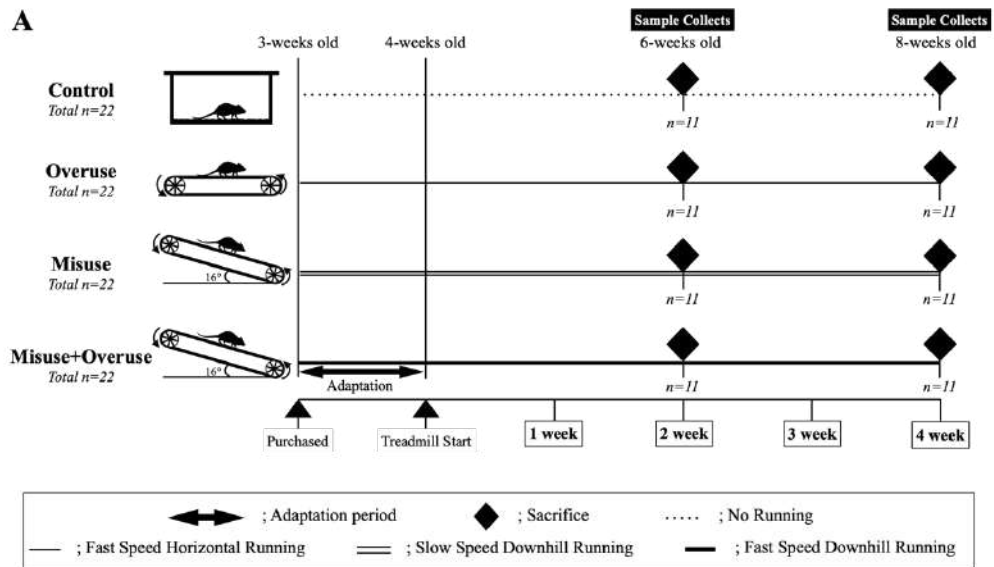


図 18： 実験デザインおよび運動介入プロトコル

A: 介入群設定と介入期間を記述した。Slc:ICRマウス88匹を2つのtimepoint(2Wおよび4W: それぞれn=44)、および4つの群に分別した。Control (Sedentary)群、 Overuse (高速平地走行)群、 Misuse (低速下り坂走行)群、 Misuse+Overuse (高速下り坂走行)群。1週間の環境適応後2Wおよび4Wの運動介入を行った。介入頻度は週5日、介入時間は1日1時間とした。B: 各マウスから採取する組織と分析する項目を記載した。C: 介入速度の段階的な変化について記載した。成長に合わせて運動強度を高めるために速度を段階的に変化させた。Overuse群とMisuse群の運動強度を同じにするために、Overuse群の介入速度はMisuse群の介入速度の1.5倍に設定した。

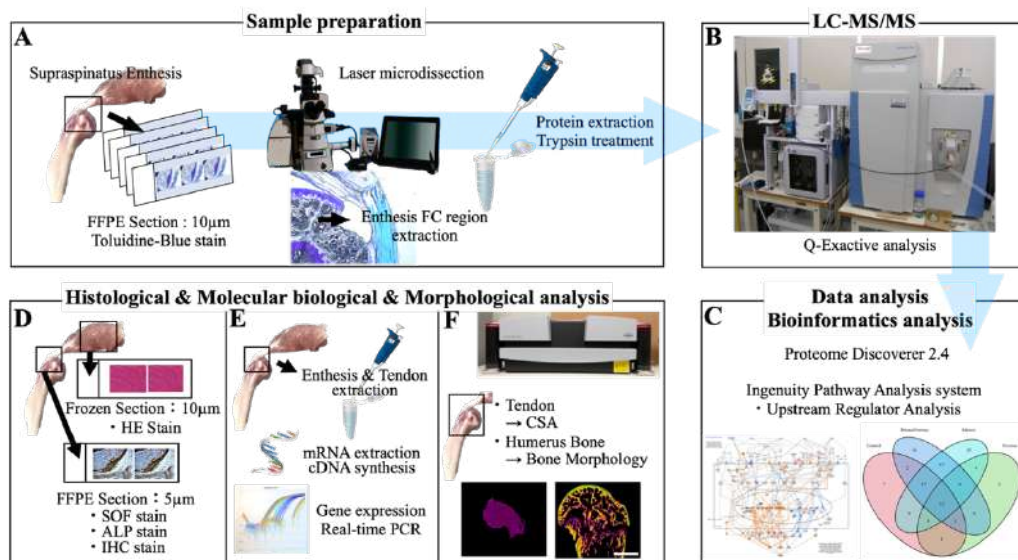


図 19： 実験方法の概略

A: プロテオミクス解析のためのサンプル調製過程を示した。10 $\mu$ mで切片を作成し、レーザーマイクロダイセクションによりEnthesis FC領域を採取した。その後、タンパク質の抽出とトリプシン処理を行った。B: サンプルをLC-MS/MSにかけ、Enthesis FC領域に発現しているタンパク質の質量分析を実施した。C: Proteome Discovererを用いてタンパク質を同定し、IPAによってActivatedまたはInhibitedと予測された因子を同定した。D: 棘上筋とEnthesis FC領域に対する組織学的分析過程を示した。E: Enthesis FC領域と棘上筋腱に対するReal-time PCRによる分子生物学的解析過程を示した。F: 棘上筋腱-骨複合体に対するMicro-CTを用いた形態学的解析過程を示した。

## 7.3 結果

### 7.3.1 棘上筋-腱複合体の組織学及び形態学的解析結果

2W 及び 4W 介入群から採取した左棘上筋に対し HE 染色を行い、CSA を算出した (図 20A)。2W 及び 4W で Control 群は Overuse 群と比較して有意差は確認されず ( $p=.932$ ,  $p=.878$ )、Misuse 群及び Misuse+Overuse 群では Control 群及び Overuse 群と比較して有意に増加していた ( $p<.01$ , 図 20B)。左棘上筋腱の CSA に関しては、2W 及び 4W とともに Control 群と比較して Overuse 群では有意差は確認されなかった ( $p=.423$ ,  $p=.839$ , 図 20C)。一方 Control 群に比べて Misuse 群と Misuse+Overuse 群で有意に増加し ( $p<.05$ )、Overuse 群に比べて Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.01$ )。

### 7.3.2 Enthesis 線維軟骨領域の組織学的解析変化

SOF 及び ALP 染色を実施し Enthesis FC 領域の組織学的構造変化を調査した (図 21A)。2W、4W 介入群ともに、Overuse 群は Control 群と比較して有意差がなかった ( $p=.933$ ,  $p=.126$ )。また 2W、4W 介入群ともに Control 群と Overuse 群間を除く全群間で有意差が確認された ( $p<.001$ , 図 21B)。

続いて Enthesis FC 領域における ALP 陽性面積比率は、2W、4W 介入群ともに Overuse 群は Control 群と比較して有意差は確認されなかった ( $p=.706$ ,  $p=.086$ )。また 2W、4W 介入群ともに Control 群と Overuse 群間、Misuse 群と Misuse+Overuse 群間を除く全群間で有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 21C)。

### 7.3.3 Enthesis 線維軟骨領域及び軟骨下骨領域の骨形態学的解析結果

Micro-CT を用いて骨形態学的解析を実施した。2W と 4W 介入群における上腕骨骨頭部及び Enthesis FC 領域の矢状断面画像を示した (図 22A)。2W では全群間で上腕骨骨頭体積に有意な差は確認されなかったが ( $p=.152$ )、4W では Control 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 22B)。上腕骨骨頭体積で正規化された FC 体積の変化に関しては、2W において Control 及び Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p<.05$ )。4W においては Control 群に比べ Misuse 及び Misuse+Overuse 群間で ( $p<.05$ )、また Overuse 群に比べ Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 22C)。続いて Enthesis FC 直下から成長板までの SB 領域にお

ける各解析項目では以下のような結果が得られた。まず BV/TV は、2W において Control 群と比較し Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.001$ )。そして 4W においては Control 群と比較し Misuse 及び Misuse+Overuse 群で ( $p<.05$ )、また Overuse 群と比較して Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.05$ , 図 22D)。Tb.Th に関しては、2W において Control 群と比較し Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.05$ )。そして 4W においては Control 及び Overuse 群と比較して Misuse+Overuse 群で ( $p<.05$ )、Overuse 群と比較して Misuse 群で有意に増加した ( $p<.05$ , 図 22E)。Tb.N に関しては、2W と 4W において全群間で有意差は確認されなかった ( $p=.180$ ,  $p=.938$ , 図 22F)。Tb.Sp に関しては、Control 群と比較して Misuse 及び Misuse+Overuse 群で ( $p<.01$ )、Overuse 群と比較して Misuse 及び Misuse+Overuse 群で有意に減少した ( $p<.05$ )。そして 4W においては、Control 群と比較して Misuse 及び Misuse+Overuse 群で ( $p<.05$ )、Overuse 群と比較して Misuse+Overuse 群で有意に減少した ( $p<.01$ , 図 22G)。

#### 7.3.4 Enthesis 線維軟骨領域に対するプロテオミクス解析結果

プロテオミクス解析は形態変化が開始された 2W のサンプルを解析した。Control 群では 118 個、Overuse 群では 101 個、Misuse 群では 219 個、Misuse+Overuse 群では 181 個のタンパク質が同定された。これらのすべてのサンプルで共通して発現していたタンパク質は 74 個であった (図 23)。これら 74 個のタン

パク質のペプチド存在量から得られた半定量値を log2FC 換算し、群間比較に用いた (図 24)。比較結果を IPA にアップロードし Upstream regulator 解析を実施した。Activated または Inhibited と予測された上位 15 因子 ( $z\ score > 2$ 、 $z\ score < -2$ ) を列挙した。まず、Control 群と Overuse 群を比較すると、Activated と予測された因子は 1 つだけであり、Inhibited と予測された因子はなかった (表 2)。Control 群と Misuse 群を比較すると、44 個の因子が Activated と予測され、10 個の因子が Inhibited と予測された (表 3)。Control 群と Misuse+Overuse 群を比較すると、58 個の因子が Activated と予測され、15 個の因子が Inhibited と予測された (表 4)。Overuse 群と Misuse 群を比較すると、31 個の因子が Activated、5 個の因子が Inhibited と予測された (表 5)。Overuse 群と Misuse+Overuse 群を比較すると、57 個の因子が Activated、15 個の因子が Inhibited と予測された (表 6)。最後に、Misuse 群と Misuse+Overuse 群を比較すると、49 個の因子が Activated、15 個の因子が Inhibited されると予測された (表 7)。Activated と予測された上位 15 因子の中には、TGF $\beta$  スーパーファミリー関連因子が多く含まれていたことから、軟骨細胞の系統分化、増殖、成熟、アポトーシス、石灰化に関わる TGF $\beta$ /BMP シグナル伝達における Smad を介した canonical 経路を標的とした。

### 7.3.5 Enthesis 線維軟骨領域及び軟骨下骨領域に対する 免疫組織化学染色結果

プロテオミクス解析並びに IPA によって特定した TGF $\beta$ /BMP-Smad シグナル伝達経路の活性化を確認するため、Enthesis FC 領域に対し Double IHC 染色を行い、陽性共局在細胞比率の算出を実施した。

まずは 2 及び 4W 介入群に対し、TGF $\beta$ R1 と pSmad2/3、BMPR1A と pSmad1/5/9 をそれぞれ二重で標識化した (図 25A)。2W 及び 4W における TGF $\beta$ R1 と Smad2/3 の陽性共局在細胞比率は、Control 群と Overuse 群間では有意差は確認されなかった ( $p=.070$ ,  $p=.244$ )。しかし、Control 群と Overuse 群間を除くその他のすべての群間で有意差が認められた ( $p<.01$ , 図 25B)。続いて 2W 及び 4W における BMPR1A と Smad1/5/9 の陽性共局在細胞比率は、TGF $\beta$ R1 と Smad2/3 同様に、Control 群と Overuse 群間では有意差は確認されなかった ( $p=.228$ ,  $p=.779$ )。しかし、Control 群と Overuse 群間を除くその他のすべての群間で有意差が認められた ( $p<.01$ , 図 25C)。また、TGF $\beta$ -Smad 経路の代表的な活性化転写因子である pSmad2/3 と、BMP-Smad 経路の代表的な活性化転写因子である pSmad1/5/9 の発現量をそれぞれ算出し、Enthesis FC 領域内における発現比率として検証した (pSmad1/5/9 / pSmad2/3)。結果として、比率は全群で 1.0 を超えていなかったため、タンパク質レベルでは TGF $\beta$ -Smad 経路の活性化が BMP-Smad 経路の活性化よりも優勢であった。しかしながら pSmad1/5/9 が、EC 優位な運動群で Control 及び Overuse 群よりも有意に増加していた ( $p<.001$ ) ことから、EC 優位な運

動を行うことで BMP-Smad 経路の活性化が促進されることが示唆された (図 25D)。

次に、2W と 4W の Enthesis SB 領域に対し TGF $\beta$ 1 と BMP4 を標識化した (図 26A)。結果として、2W と 4W の Enthesis SB 領域における TGF $\beta$ 1 の陽性面積比率は、Control 群と Overuse 群間では有意差は認められなかった ( $p=.898$ ,  $p=.711$ )。しかしながら 2W では Control 群と Overuse 群間、並びに Misuse 群と Misuse+Overuse 群間を除いた他の全群間で有意差が認められ ( $p<.05$ )、4W では、Control 群と Overuse 群間を除く他の全群間で有意差が確認された ( $p<.001$ , 図 26B)。続いて BMP4 に関して、TGF $\beta$ 1 同様に、2W と 4W の Enthesis SB 領域における BMP4 陽性面積比率は、Control 群と Overuse 群間では有意差は確認されなかった ( $p=.540$ ,  $p=.869$ )。しかしながら 2W では Control 群と Overuse 群間、並びに Overuse 群と Misuse 群間を除く他の全群間で有意差が確認され ( $p<.01$ )、4W では Control 群と Misuse 群間、Control 群と Misuse+Overuse 群間、Overuse 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 26C)。

また、TGF $\beta$ 1 の活性化が Enthesis SB 領域特異的な変化か否かを検証するため、上腕骨骨幹部領域に対しても TGF $\beta$ 1 を標識化した (図 27A)。結果として上腕骨骨幹部領域では、2W 及び 4W とともに、有意な群間差を認めなかったことから ( $p=.965$ ,  $p=.300$ , 図 27B)、TGF $\beta$ 1 の活性化は Enthesis SB 領域特異的な反応であることがわかった。

最後に TGF $\beta$ -Smad シグナル伝達経路の下流に位置する Sox9

と、BMP-Smad シグナル伝達経路の下流に位置する Runx2 の発現を Enthesis FC 領域で標識化し、比較検討を行なった(図 28A)。まず Sox9 陽性細胞比率に関して、2W 及び 4W の Control 群と Overuse 群間では有意差は確認されなかった ( $p=.057$ ,  $p=.477$ )。しかし Control 群と Overuse 群間、Misuse 群と Misuse+Overuse 群間を除いた他の全群間で有意差が確認された ( $p<.001$ )。4W では Control 群と Overuse 群間を除いた他の全群間で有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 28B)。続いて Runx2 陽性細胞比率に関しては、Sox9 同様に 2W 及び 4W における Control 群と Overuse 群間では有意差は確認されなかった ( $p=.875$ ,  $p=.989$ )。しかし Control 群と Overuse 群間、Misuse 群と Misuse+Overuse 群間を除く他の全群間で 2W 及び 4W とともに有意差が認められた ( $p<.01$ , 図 28C)。最後に陽性細胞の局在を観察した結果、2W では Sox9 が FC 領域全体に認められたが、4W では CFC 領域には陽性細胞が認められず、UFC 領域から腱の方向へ発現領域が拡大していた。また、Runx2 に関しては 2W 及び 4W とともに Tidemark から UFC 領域の近位部に局在していた(図 28A)。

### 7.3.6 Enthesis 線維軟骨領域及び棘上筋腱に対する分子生物学的解析結果

Enthesis FC 領域と棘上筋腱の分子生物学的変化を調査するため、*Tgfb1*、*Bmp2*、*Bmp4*、*Alp1*、*Col2a1*、*Sox9*、*Runx2*、*Colla1*、*Col3a1* の相対発現量を比較した(図 29A,B)。まず Enthesis FC 領域における TGF $\beta$  及び BMP シグナル伝達経路の活性化を調べるため、2W 及び 4W における TGF $\beta$  及び BMP 標的遺伝子の



mRNA 発現を確認した (図 29A)。結果として、Enthesis FC 領域では、TGF $\beta$  シグナル伝達経路の標的遺伝子である *Tgfb1*、*Col2a1*、*Sox9* の発現量は EC 優位の運動群で増加する傾向にあった。特に Misuse+Overuse 群では 2W 並びに 4W において Control や Overuse 群と比較して有意に増加していた ( $p<.05$ )。BMP シグナル伝達経路の標的遺伝子である *Bmp2*、*Bmp4*、*Alp1*、*Runx2* の発現量も EC 優位な運動群で増加し、2W では Control 群や Overuse 群に比べ Misuse+Overuse 群で有意に増加していた ( $p<.05$ )。また 4W では *Bmp2*、*Alp1*、*Runx2* が Control 群と比較し Misuse+Overuse 群で有意に増加した ( $p<.05$ )。Runx2 のみ Overuse 群と Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p<.05$ )。また *Bmp4* のみ全群間で有意差が確認されなかった ( $p=.609$ )。

次に棘上筋腱における *Tgfb1*、*Colla1*、*Col3a1* の mRNA 相対発現量を比較した (図 29B)。結果として *Tgfb1* に関しては、2W における Control 群と Overuse 群間に有意差を認めず ( $p=.113$ )、EC 優位な運動群は Control 群や Overuse 群よりも有意に増加していた ( $p<.001$ )。また 4W においては Control 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意差が確認された ( $p<.01$ )。続いて *Colla1* に関しては、2W における Control 群と Misuse+Overuse 群間、並びに Overuse 群と Misuse+Overuse 群間、Misuse 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意な減少が確認された ( $p<.05$ )。4W では全群間で有意差は認められなかった ( $p=.209$ )。続いて *Col3a1* に関して、2W では全群間で有意差は認められず ( $p=.739$ )、4W では Control 群と Misuse+Overuse

群間、並びに Overuse 群と Misuse+Overuse 群間でのみ有意な減少が確認された ( $p<.05$ )。

Enthesis FC 領域における mRNA レベルでの TGF $\beta$ /BMP 比を算出したところ、2W の *Bmp2/Tgfb1* 比率は Misuse+Overuse 群で  $1.93\pm 0.457$  であり、Control 群よりも有意に高かった ( $p<.05$ )。また 2W の *Bmp4/Tgfb1* 比率に関しても Misuse+Overuse 群で  $1.78\pm 0.378$  であり Control 群よりも有意に高かった ( $p<.05$ )。4W での *Bmp2/Tgfb1* と *Bmp4/Tgfb1* 比率に関しては全群間で有意差が確認されなかった ( $p=.982$ ,  $p=258$ , 図 29C)。

棘上筋腱における mRNA レベルでの *Col3a1/Col1a1* 比率を算出したところ、2W の *Col3a1/Col1a1* 比率は Misuse+Overuse 群で  $2.60\pm 0.591$  であり、他群よりも有意に高かった ( $p<.01$ )。また 4W の *Col3a1/Col1a1* 比率は Misuse 群で  $1.57\pm 0.20$ 、Misuse+Overuse 群で  $1.71\pm 0.229$  であり、Control 群に比べ Misuse 群及び Misuse+Overuse 群間で ( $p<.01$ )、また Overuse 群に比べ Misuse+Overuse 群間で有意差が確認された ( $p<.05$ , 図 29D)。

最後に今回のサンプル採取方法の妥当性を検証するため、軟骨の主要な細胞外基質である *Col2a1* の発現を、2W 及び 4W Control 群の FC 領域及び棘上筋腱で検証した。結果として棘上筋腱では *Col2a1* は有意に発現していないことが確認された ( $p<.001$ , 図 29E)。よって採取した FC 領域と棘上筋腱は確実に分離されていることが証明された。

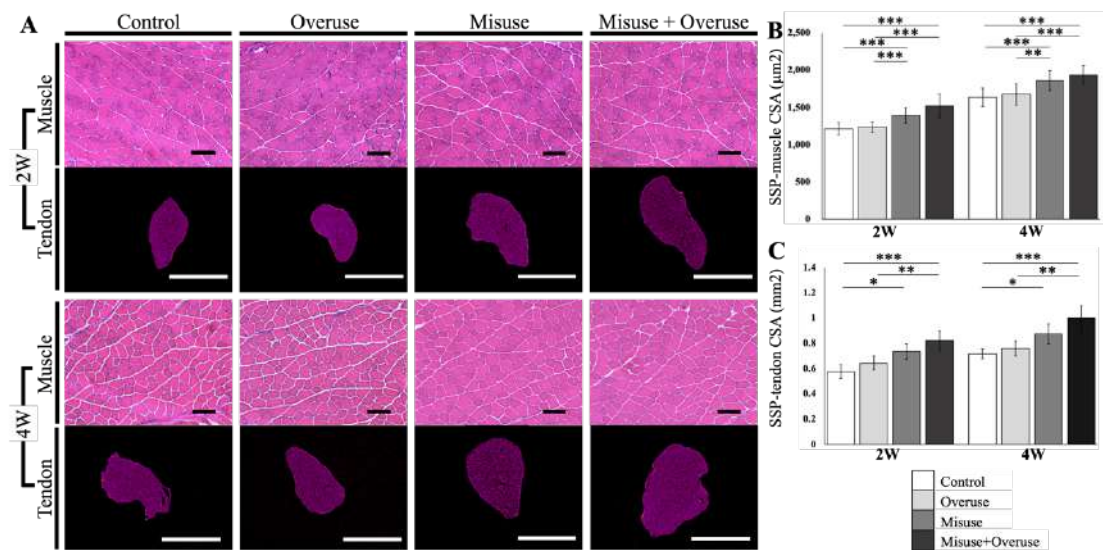


図 20： 棘上筋-腱複合体の組織および形態学的変化

A: 棘上筋および棘上筋腱の横断画像を示した。棘上筋組織像に対してはHE染色を実施した。腱の横断画像はMicro-CTを用いて撮影した。筋組織像Scale bar; 100µm、腱横断画像Scale bar; 1mm。 B: 棘上筋のCSA比較結果。 C: 棘上筋腱のCSA比較結果。 B-C:すべてのデータは平均値±SDで示した。 \*,  $p<.05$ ; \*\*,  $p<.01$ ; \*\*\*,  $p<.001$ 。

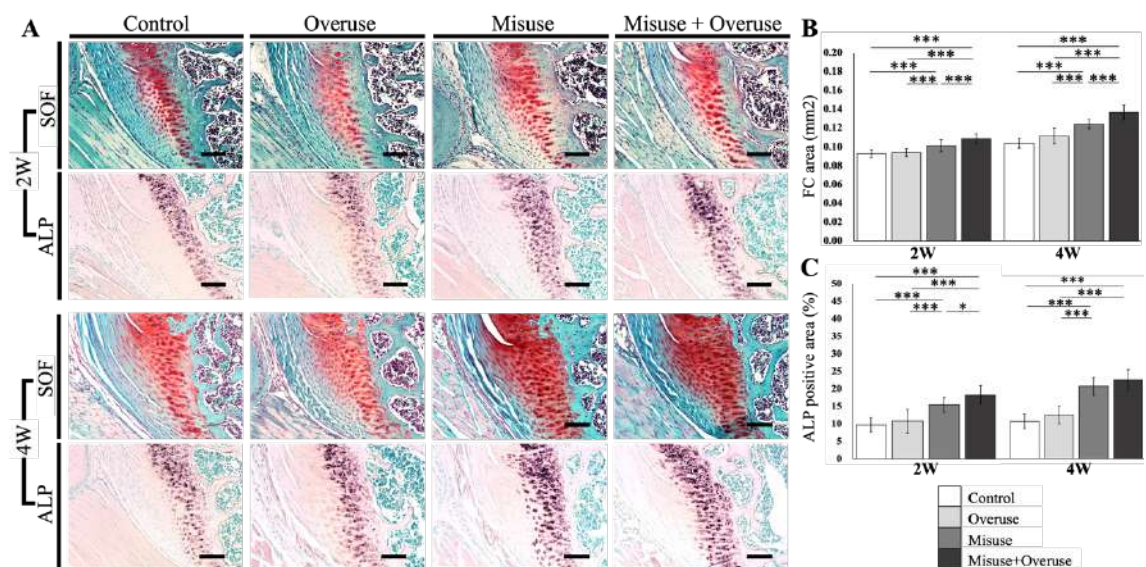


図 21： Entthesis 線維軟骨領域における組織学的構造変化

A: SOF染色画像およびALP染色画像を示した。 Scale bar; 100µm。 B: Entthesis FC領域の比較結果。 C: Entthesis FC領域におけるALP陽性面積比率の比較結果。 B-C:すべてのデータは平均値±SDで示した。 \*,  $p<.05$ ; \*\*,  $p<.01$ ; \*\*\*,  $p<.001$ 。

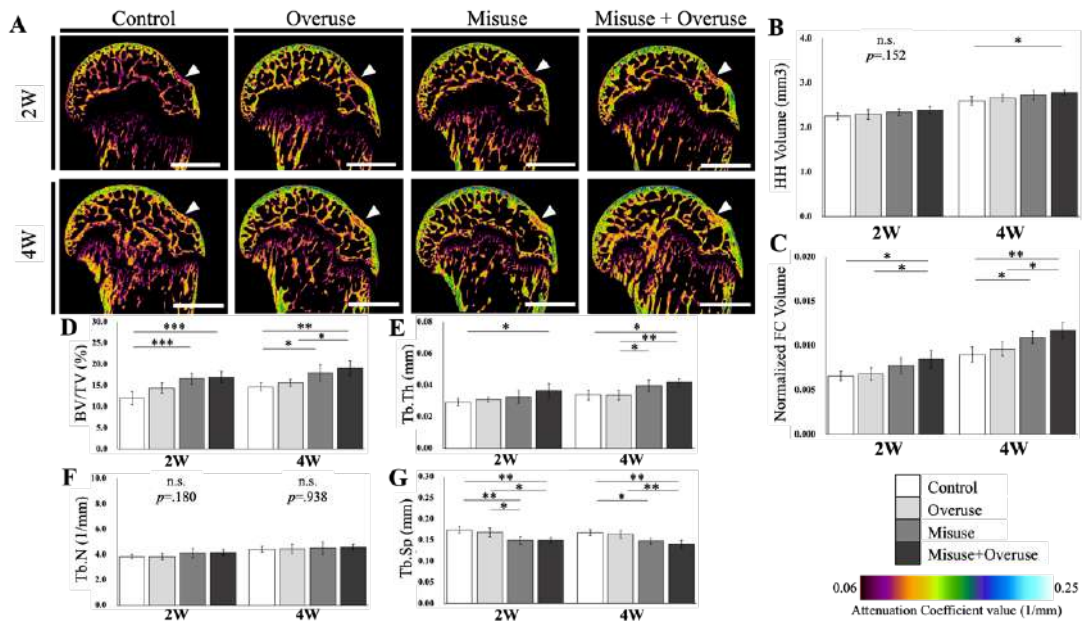


図 22： Enthesis 線維軟骨領域及び軟骨下骨領域における骨形態学的変化

A: Micro-CTで撮影された上腕骨骨頭部とEnthesis FC領域の矢状断面像を示した。AC値に基づきカラーマッピングした。白矢印: Enthesis FC領域。HH: 上腕骨骨頭。Scale bar: 1mm。B: 上腕骨骨頭部体積の比較結果。C: 上腕骨骨頭部体積で正規化されたFC体積の比較結果。D: Enthesis SB領域のBV/TV比較結果。E: Enthesis SB領域のTb.Th比較結果。F: Enthesis SB領域のTb.N比較結果。G: Enthesis SB領域のTb.Sp比較結果。B-G: すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ 。

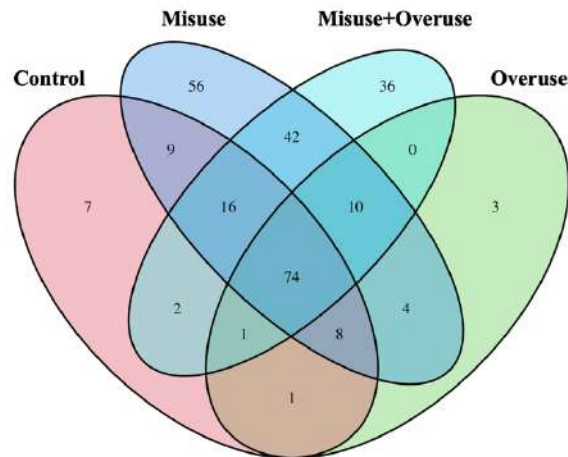


図 23： 各群で同定されたタンパク質数の Venn 図比較

Control群では118個、Overuse群では101個、Misuse群では219個、Misuse+Overuse群では181個のタンパク質が同定された。74個のタンパク質がすべてのサンプルで共通して発現していた。

No.	Accession	Gene Name	Description	Abundance Average			Log <sub>2</sub> Fold Change					
				Control	Onense	Misuse/Overuse	Control vs Misuse	Onense vs Misuse	Misuse vs Misuse/Overuse			
1	D3Z7H8	Cip2	Centriole intermediate layer protein 2 OS=Mus musculus	11424534.78	2098611.41	42176232.55	0.87815811	2.187821532	5.206222907	4.328064396	3.048041975	
2	E07777	Ched1	Chondroectodermal-like protein OS=Mus musculus	553519.458	638973.6267	31273332.34	0.200106051	0.200106051	4.521587262	2.29212389	4.2175131	2.02328022
3	O08692	Ngp	Neutrophilic granule protein OS=Mus musculus	300048.147	409979.25	17662334.15	0.42326079	0.42326079	1.25755392	0.820387843	2.772114597	1.951726754
4	O35744	Col3	Collagen-like protein 3 OS=Mus musculus	1129342.74	3192900.7	4801790.5	1.494940416	1.494940416	4.484438002	0.580662148	2.980191894	2.394560598
5	O55276	Ched	Chondroectodermal-like protein OS=Mus musculus	7947980.83	15321938.5	39186151.7	0.948871024	0.948871024	5.498888888	1.324078847	4.55112675	3.19046528
6	P0202	Gal2	Asparagine aminotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus	21264760.17	1191929.291	14792852.1	2.48674269	2.48674269	6.43764601	0.311584848	3.95490332	3.64540844
7	P06151	Ldha	L-lactate dehydrogenase K chain OS=Mus musculus	3316548.022	760260.307	1341660.93	1.19506604	1.19506604	4.083786023	0.818799042	2.871219428	2.829460388
8	P07214	Sparc	SPARC OS=Mus musculus	659024.603	1343007.04	3998937.5	1.04594913	1.04594913	4.348138266	1.562068574	3.802141353	2.240072778
9	P07310	Cim	Creatine kinase M-type OS=Mus musculus	288450.418	923180.686	11902881.0	1.76500029	1.76500029	5.22487625	0.30280465	3.49818218	3.19823252
10	P07356	Ama2	Amyrin A2 OS=Mus musculus	1870987.263	354659.045	50009533.7	0.92262029	0.92262029	5.31655155	0.45783927	4.395734926	3.897650999
11	P07724	Alb	Albumin OS=Mus musculus	4108283.5	4817426.3	13281238.7	0.223376463	0.223376463	5.282076653	1.46305592	5.03594959	3.37049449
12	P07759	Serpin3k	Serine protease inhibitor A3 OS=Mus musculus	3789517.49	2848915.293	98130240.0	-0.411601439	-0.411601439	4.35465774	1.784284857	4.98259179	3.18374428
13	P08249	Mef2	Myocyte bHLH transcription factor OS=Mus musculus	1265835.721	213897.709	525337.94	0.760145887	0.760145887	4.93002441	1.293547466	4.06888254	2.71638788
14	P08103	Pf4	Protein disulfide-isomerase OS=Mus musculus	2754636.037	5019396.955	13514516.07	1.19673855	1.19673855	5.537800794	1.416751015	4.80055296	3.06324283
15	P09242	Alpl	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isoenzyme OS=Mus musculus	7645335.73	1346693.346	3300654.64	0.80633001	0.80633001	2.822370725	2.10081906	1.254448759	4.391553839
16	P10107	Ama1	Amyrin A1 OS=Mus musculus	1135868.418	1985859.49	5179121.27	0.80997831	0.80997831	4.192128659	1.38310831	3.966294828	2.803964656
17	P10126	Eef1a1	Elongation factor 1 OS=Mus musculus	8818269.837	8747694.99	25974578.33	2.1049388	2.1049388	4.571776399	1.570125661	4.588769105	3.018643544
18	P11087	Col4a1	Collagen alpha 1(I) chain OS=Mus musculus	7283351.78	5400785.27	7974956.55	0.43429981	0.43429981	3.19497344	0.52224401	3.625827495	3.06340474
19	P11247	Mpo	Myeloperoxidase OS=Mus musculus	574604.947	123832.027	18571520.7	1.21445021	1.21445021	5.249462386	0.54321972	4.095427864	3.594005339
20	P11276	Fnl	Fibrinogen OS=Mus musculus	1370096.4	3101098	7747006.4	1.21528333	1.21528333	5.19229944	1.28411965	3.87795894	2.89380019
21	P13020	Gsn	Gelsolin OS=Mus musculus	5706493.978	8065242	3719435.56	0.578849956	0.578849956	5.301386701	2.704314293	4.729535711	2.89704283
22	P14206	Rea	40S ribosomal protein S4 OS=Mus musculus	1063310.744	7233643.777	22941408.23	16.1690543	16.1690543	3.333400116	1.66518377	4.482367838	2.817094916
23	P16858	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus	3829454.478	5106705.04	13848943.4	0.97551911	0.97551911	4.199121911	1.27546276	4.224602861	2.976566585
24	P17142	Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Mus musculus	2124205.153	353817.054	9025358.503	0.78538663	0.78538663	2.087061133	1.32846727	4.375108516	3.046617898
25	P17151	Tpi1	Triose phosphate isomerase OS=Mus musculus	1154926.818	2443180.731	8619938.40	1.08999159	1.08999159	4.466724848	1.818916537	3.28576548	1.46694982
26	P19324	Serp1n1	Serpin H1 OS=Mus musculus	588808.027	970439.25	27690786.33	0.72174138	0.72174138	5.273905868	1.512674555	4.45233383	3.08967779
27	P20029	Hspa5	Endoplasmic reticulum chaperone BP OS=Mus musculus	241004.898	225761.1	92588763.7	-0.89447832	-0.89447832	5.413095331	2.039040225	5.507574152	3.411339277
28	P20029	Vim	Vimentin OS=Mus musculus	34183142.33	38371848	123493196.1	1.152661488	1.152661488	5.07590023	1.688844055	4.908716801	3.228327769
29	P21460	Ces3	Cystatin C OS=Mus musculus	42417706.2	94460354.3	193744201	1.13946849	1.13946849	5.51340278	0.97554167	4.373875929	3.98834258
30	P21550	Erb3	ErbB receptor tyrosine kinase OS=Mus musculus	1196270.532	489759.517	6103111.83	1.882829226	1.882829226	5.455838419	0.8270887	3.67729623	3.194381533
31	P21956	Mif68	Lactadherin OS=Mus musculus	3566699.51	5273982.67	12277668.6	5.4329182	5.4329182	1.783427254	3.328978363	3.374676338	2.14551109
32	P24369	Pf4	Protein disulfide-isomerase OS=Mus musculus	1410128.844	227311.215	5919398.657	0.688845587	0.688845587	5.022409339	1.38076499	4.31098576	2.89381177
33	P27173	Pela3	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Mus musculus	1579500.023	2317694.054	9052121.701	0.953221719	0.953221719	5.831836031	1.96262249	5.278407832	3.31344582
34	P28481	Col2a1	Collagen alpha 1(I) chain OS=Mus musculus	3076867.6	36921933.07	70470294.27	0.82627141	0.82627141	3.348175653	0.925254763	3.49580364	2.56526886
35	P28653	Bgn	Biglycan OS=Mus musculus	3037474.73	4413177.37	14888909.02	0.535645488	0.535645488	5.61447719	1.517963397	5.006041081	3.542767694
36	P28654	Don	Decorin OS=Mus musculus	4435188.367	20074614.63	24082949.7	0.32907113	0.32907113	5.61447719	1.848381562	5.43380634	3.5844278
37	P29788	Vtn	Vitronectin OS=Mus musculus	543492.824	4414807.213	10933322.77	0.27135958	0.27135958	3.621492263	1.268471658	3.89715283	2.888681392

図 24-1: 74 個のタンパク質の log<sub>2</sub> fold change による群間比較

全サンプルで発現していた74個のタンパク質を羅列した。半定量値(Abundance)は各群で平均値を算出した。平均値をlog<sub>2</sub> fold change (log<sub>2</sub>FC) 換算し群間比較を行った。赤印: log<sub>2</sub>FC > 0、青印: log<sub>2</sub>FC < 0。

No.	Accession	Gene Name	Description	Abundance Average			Log2 Fold Change					
				Control	Overdose	Misuse/Overuse	Control vs Misuse	Control vs Misuse/Overuse	Overdose vs Misuse	Overdose vs Misuse/Overuse	Misuse vs Misuse/Overuse	
38	P3125	S100a9	Protein S100-A9 OS=Mus musculus	2937938.5	4872110.33	4709719.19	1.524571037	3.278448014	3.286387466	2.453871676	2.915300208	
39	P35441	Thbs1	Thrombospondin-1 OS=Mus musculus	1273470.471	1454079.34	2637857.94	1.457227361	4.372929459	1.265868718	4.181188976	2.237528938	1.117627873
40	P40142	Tki	Transketolase OS=Mus musculus	1781694.343	2142739.837	4656868.313	1.004091975	0.266206203	1.386110228	2.93736101	1.199404025	2.237528938
41	P48206	Anxa5	Anexin A5 OS=Mus musculus	5194066.027	6520041.723	19492363.22	19932545.65	0.237367035	1.576223879	5.236999293	1.249259844	4.909320259
42	P48768	Lima	Prelamin-A/C OS=Mus musculus	3920396.321	3357870.673	1910831.566	22365266.65	-0.252111159	2.283129206	5.834161541	2.510340365	6.0593727
43	P50008	Fmod	Fibronectin OS=Mus musculus	2761645.73	4723982.64	10778996.6	1570145.257	0.781394517	1.96852015	1.188497498	5.0331003	3.864407832
44	P51342	Mern1	Carilage matrix protein OS=Mus musculus	1581482.369	1750542.74	2812924.945	3895197.9	0.164865355	0.686845118	0.5271585763	1.1440604659	0.819020806
45	P52460	Pkm	Private kinase PKM OS=Mus musculus	5992192.67	847451.133	26072304.7	19491269.25	0.50057038	5.02300218	1.62157701	4.5234318	2.90196479
46	P56460	Atp5f1b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus	4777000.453	1017884.26	16379836.54	144198439.1	1.100417635	1.789482385	0.68686225	3.24410088	3.138409353
47	P60710	Acb	Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus	61864399.47	54651397.57	18493224.1	81027742	-0.178851044	1.579815428	3.11234602	1.78666472	2.131419175
48	P62806	H4c1	Histone H4 OS=Mus musculus	9610988.64	11512388.5	1949031.27	171109007	0.269446375	1.02012473	4.154603681	0.75968709	3.893887005
49	P62889	Rpl0	60S ribosomal protein L30 OS=Mus musculus	221625.727	47394.8857	112151463	1072904.25	1.106592454	2.3420823	5.313893321	1.23561577	3.171651091
50	P62894	Uts5	Utriquilin-6 OS=ribosomal protein 44 OS=Mus musculus	3610205.438	3574890.33	11384736.5	82681397	-0.010180007	1.6095255	4.827427096	1.671125258	2.86046546
51	P63071	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus	3155949.51	5150203.943	9677489.27	7819063.175	0.767161108	1.616766931	4.83161104	0.910050583	3.014294133
52	P82198	Tefb	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Mus musculus	656659.6095	1163592.737	257178.887	61867220.25	0.825368647	1.969449385	6.357883684	1.144180339	4.888336699
53	Q01149	Col2a2	Collagen alpha 2(I) chain OS=Mus musculus	12088637	101338089.2	171211928	2129659479	-0.248501125	0.580165558	4.14489143	0.756666683	3.826763858
54	Q01653	Vcp	Transferrin receptor endoplasmic reticulum ATPase OS=Mus musculus	512675.1871	799737.084	2054237.93	13412343.25	0.641480711	2.002486213	4.70372424	1.381006501	4.067891713
55	Q02788	Col6a2	Collagen alpha 2(VI) chain OS=Mus musculus	34688426.4	60787116.49	13497202	178882434.4	0.711109177	1.96014463	5.88413655	1.249035514	4.977004748
56	Q02825	Alp11a	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus	4504397.79	8872892.353	121513402.7	1047966133	0.97906494	4.50472749	0.45942818	3.592006294	3.108363448
57	Q04457	Col6a1	Collagen alpha 1(VI) chain OS=Mus musculus	5297211.6	7747281.63	226755443	260367768	0.546800774	2.07832316	5.61917411	1.594141542	5.074843335
58	Q05306	Col10a1	Collagen alpha 1(X) chain OS=Mus musculus	1036870.577	1593398.037	2307201.658	22356249	0.582971164	1.187585474	4.493927081	0.93888831	3.841629917
59	Q05722	Col9a1	Collagen alpha 1(IX) chain OS=Mus musculus	2279109.693	2163992.033	4363711.1	31942004	-0.074471542	0.9370105068	3.80891256	1.01188021	3.883687702
60	Q05793	Hspg2	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Mus musculus	1343146.464	1590198.988	9423993.95	8284180.34	0.2683849	2.78265081	5.946674001	2.57581911	2.871807492
61	Q06647	Col12a1	Collagen alpha 1(XII) chain OS=Mus musculus	2211985.27	32911442	6414170.4	631966888	0.573760679	1.538489596	4.930835359	0.96278919	4.3300791
62	Q061282	Acan	Aggrecan core protein OS=Mus musculus	8135699.277	15688384.49	3939498.113	3440921.25	0.94735894	2.75650001	5.40238459	1.328150462	4.454026119
63	Q061594	Fbn1	Fibrillin-1 OS=Mus musculus	2827411.819	2653824.879	1272295556	112302041	-0.10741613	2.168224942	5.306647821	2.27241072	5.41408913
64	Q062000	Ogn	Meccan OS=Mus musculus	2795136.623	3019029.93	185172054	91271087	0.11166257	2.47937651	6.284610722	2.36671394	6.184444645
65	Q062059	Vcan	Versican core protein OS=Mus musculus	1463948.383	2389363.701	1159451198	2297711575	0.694954538	2.8686766	3.72890201	2.29114202	3.277934745
66	Q64415	H2bc3	Histone H2B type 1-B OS=Mus musculus	9681132.13	110415882.3	23683189.7	249018736	0.18970136	1.30877205	4.80043467	1.11907845	4.500342107
67	Q64523	H2afz0	Histone H2A type 2-C OS=Mus musculus	76737636	8041387.47	20372794	138176032	0.221029804	1.40834509	4.17043102	1.187647005	3.94421198
68	Q64739	Col12a2	Collagen alpha 2(XII) chain OS=Mus musculus	1938771.441	4266736.423	53050972	113840105	1.13842556	4.904845388	1.415807873	3.766132842	2.550300699
69	Q64954	Srrp2	Small repeat-containing protein SRRP2 OS=Mus musculus	769441.8723	126164.536	123893303	170417.267	0.65610397	0.68213925	4.008396461	5.77653676	3.863933137
70	Q92111	Tf	Serotransferrin OS=Mus musculus	3365667.326	3096868.922	12908083.3	148420175	-0.12826977	1.938087659	5.63207467	2.071866356	5.5627244
71	Q92FPM4	Clec3a	C-type lectin domain family 3 member A OS=Mus musculus	3574417.813	7595487.33	13939991.33	44681254	1.794542524	3.889494005	0.707008984	2.556452502	1.849446217
72	Q91633	Plp1p	Phraglin OS=Mus musculus	12468889.34	18897081.48	6088251.94	7397303125	0.599989388	2.2883194	3.889494005	1.638894559	5.289599911
73	Q91045	Hsp101	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 OS=Mus musculus	11933977.49	2506021.117	55676715	3685763215	0.971968899	2.22050955	4.9482516	1.244026761	3.970856261
74	Q9R066	Comp	Carilage oligomeric matrix protein OS=Mus musculus	6594683.833	7679559.523	2735138247	17088145.65	0.273905059	2.072110962	4.715420007	1.834210032	4.47520238

図 24-2 : 74 個のタンパク質の log2 fold change による群間比較

全サンプルで発現していた74個のタンパク質を羅列した。半定量値(Abundance)は各群で平均値を算出した。平均値をlog2 fold change (log2FC) 換算し群間比較を行った。赤印: log2FC>0、青印: log2FC<0。



表 2 : IPA の upstream regulator 解析によって Activated/Inhibited と予測された上位 15 因子 : Control vs Overuse

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
CSF2	cytokine	Activated	2	0.000257	Chi3/Chi4,LDHA,MPO,TPII

表 3 : IPA の upstream regulator 解析によって Activated/Inhibited と予測された上位 15 因子 : Control vs Misuse

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
CCR2	G-protein coupled receptor	Activated	3.742	5.57E-21	BGN,Chi3/Chi4,COL12A1,COL6A1,COL6A2,DCN,FBN1,FN1,HSPG2,OGN,PRELP,SPARC,TGFB1,THBS1,VCAN
TGFB1	growth factor	Activated	3.546	1.09E-13	Acan,ALB,ANXA2,BGN,CKM,COL12A1,COL2A1,COL6A1,COL6A2,COMP,CST3,DCN,EEF1A1,ENO3,FBN1,FN1,GSN,HSPA5,HSPG2,LDHA,PKM,SERPINA3,SERPINH1,SPARC,TGFB1,THBS1,VCAN,VIM
HIF1A	transcription regulator	Activated	3.091	0.00000106	BGN,FN1,GAPDH,H2AC20,HSPA5,LDHA,PKM,PPIA,THBS1,TPII,VIM
NFE2L2	transcription regulator	Activated	2.784	0.0000828	FN1,LMNA,PDIA3,PPIB,SERPINA3,TKT,TPH1,VCP
IGF1	growth factor	Activated	2.677	2.26E-09	Acan,BGN,COL2A1,DCN,FN1,GAPDH,HAPLN1,HSPA5,LDHA,PKM,TF,TGFB1,THBS1,VIM
OSM	cytokine	Activated	2.661	0.00000101	ALB,ANXA1,ANXA2,CKM,COL2A1,COL6A1,FN1,HSPA5,S100A9,SERPINA3,VIM
IL15	cytokine	Activated	2.626	0.000000951	ANXA1,ENO3,GAPDH,HSPA8,LDHA,OGN,PDIA3,PKM,TKT,TPII
CCN2	growth factor	Activated	2.606	2.95E-08	Acan,COL10A1,COL2A1,DCN,FN1,HAPLN1,SPARC
CEBPA	transcription regulator	Activated	2.596	0.00000892	ALB,ANXA1,COL10A1,GAPDH,HSPA5,MPO,S100A9,THBS1,VCAN
BMP2	growth factor	Activated	2.561	0.00000472	Acan,ALPL,COL10A1,COL2A1,FN1,SPARC,VCAN
EGF	growth factor	Activated	2.519	8.52E-08	DCN,EEF1A1,FN1,LDHA,PPIB,S100A9,SERPINA3,SPARC,TF,THBS1,VCAN,VIM
Tgf beta	group	Activated	2.51	8.06E-11	BGN,COL10A1,COL12A1,COL6A2,DCN,FN1,HSPG2,SPARC,TGFB1,THBS1,VIM,VTN
IL10RA	transmembrane receptor	Activated	2.449	0.000372	DCN,FBN1,FN1,HSPA8,OGN,SPARC
TGFBR1	kinase	Activated	2.433	0.00000263	Acan,BGN,FMOD,FN1,TGFB1,VIM
CSF1	cytokine	Activated	2.428	6.34E-09	Chi3/Chi4,FN1,GOT2,HSPA5,LDHA,MPO,PKM,SPARC,THBS1,TPII
estrogen receptor	group	Inhibited	-2.63	0.0000109	ANXA1,COL12A1,COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC,VIM
BDNF	growth factor	Inhibited	-2.449	0.00000591	ANXA2,ANXA5,HSPA5,S100A9,SERPINH1,SPARC,THBS1,VIM
PRKAA2	kinase	Inhibited	-2.387	0.00000306	ALB,FN1,HSPA5,LDHA,P4HB,VIM
PSMB11	peptidase	Inhibited	-2.236	0.0000367	CHAD,COL6A1,COL6A2,THBS1,VCAN
RICTOR	other	Inhibited	-2.236	0.00163	ATP5F1A,ATP5F1B,RPL30,RPSA,Uba52
CLPP	peptidase	Inhibited	-2.236	0.00000161	ATP5F1A,ATP5F1B,GAPDH,MDH2,TKT
TSC2	other	Inhibited	-2.219	0.000124	ANXA1,ANXA2,GSN,HSPA5,PRELP
Alpha catenin	group	Inhibited	-2.201	0.0000339	BGN,COL6A1,COL6A2,S100A9,VIM
ARHGAP31	other	Inhibited	-2	0.00000299	COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC
CUL3	enzyme	Inhibited	-2	0.0000221	Acan,COL2A1,HAPLN1,S100A9

表 4 : IPA の upstream regulator 解析によって Activated/Inhibited と 予測された上位 15 因子 : Control vs Misuse+Overuse

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
CCR2	G-protein coupled receptor	Activated	4	4.27E-24	BGN,Chil3/Chil4,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,DCN,FBNI,FNI,HSPG2,OGN,PRELP,SPARC,TGFBI,THBS1,VCAN
TGFB1	growth factor	Activated	3.817	1.53E-14	Acan,ALB,ANXA2,BGN,CKM,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL6A1,COL6A2,COMP,CST3,DCN,EEF1A1,ENO3,FBNI,FNI,GSN,HSPA5,HSPG2,LDHA,PKM,SERPINA3,SERPINH1,SPARC,TGFBI,THBS1,VCAN,VIM
PRL	cytokine	Activated	3.107	4.09E-13	ACTB,ANXA2,ANXA5,COL1A1,COL1A2,CST3,DCN,FNI,MFGE8,P4HB,RPSA,SERPINA3,SPARC,VIM
HIF1A	transcription regulator	Activated	3.091	0.00000225	BGN,FNI,GAPDH,H2AC20,HSPA5,LDHA,PKM,PP1A,THBS1,TPI1,VIM
OSM	cytokine	Activated	2.979	3.21E-08	ALB,ANXA1,ANXA2,CKM,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL6A1,FNI,HSPA5,S100A9,SERPINA3,VIM
NFE2L2	transcription regulator	Activated	2.952	0.0000204	COL1A1,FNI,LMNA,PDIA3,PP1B,SERPINA3,TKT,TPI1,VCP
Tgf beta	group	Activated	2.878	6.25E-13	BGN,COL10A1,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL6A2,DCN,FNI,HSPG2,SPARC,TGFBI,THBS1,VIM,VTN
TGFBR1	kinase	Activated	2.804	4.13E-10	Acan,BGN,COL1A1,COL1A2,FMOD,FNI,TGFBI,VIM
CCN2	growth factor	Activated	2.785	1.74E-09	Acan,COL10A1,COL1A1,COL2A1,DCN,FNI,HAPLN1,SPARC
SP1	transcription regulator	Activated	2.734	0.0000157	ALPL,ATP5F1B,COL1A1,COL1A2,COL2A1,FNI,HSPA5,PKM,SPARC,VIM
IL15	cytokine	Activated	2.626	0.00000186	ANXA1,ENO3,GAPDH,HSPA8,LDHA,OGN,PDIA3,PKM,TKT,TPI1
CEBPA	transcription regulator	Activated	2.596	0.00000235	ALB,ANXA1,COL10A1,COL1A1,COL1A2,GAPDH,HSPA5,MPO,S100A9,THBS1,VCAN
ZEB1	transcription regulator	Activated	2.592	3.76E-10	COL1A1,COL1A2,FNI,RPL30,TF,TGFBI,THBS1,VIM
BMP2	growth factor	Activated	2.575	2.5E-09	Acan,ALPL,COL10A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,FNI,MATN1,SPARC,VCAN
Insulin	group	Activated	2.573	2.18E-12	ACTB,ALB,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FNI,HSPA5,HSPA8,LDHA,MDH2,P4HB,PKM,PP1A,PP1B,TGFBI,THBS1
PSMB11	peptidase	Inhibited	-2.646	0.00000155	CHAD,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,THBS1,VCAN
estrogen receptor	group	Inhibited	-2.63	0.0000174	ANXA1,COL12A1,COL6A1,COL6A2,FNI,SPARC,VIM
Alpha catenin	group	Inhibited	-2.602	0.00000138	BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,S100A9,VIM
BDNF	growth factor	Inhibited	-2.449	0.0000101	ANXA2,ANXA5,HSPA5,S100A9,SERPINH1,SPARC,THBS1,VIM
CUL3	enzyme	Inhibited	-2.449	2.24E-08	Acan,COL2A1,COL9A1,HAPLN1,MATN1,S100A9
PRKAA2	kinase	Inhibited	-2.387	0.00000465	ALB,FNI,HSPA5,LDHA,P4HB,VIM
FAS	transmembrane receptor	Inhibited	-2.236	0.00141	ANXA2,BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FBNI
RICTOR	other	Inhibited	-2.236	0.00223	ATP5F1A,ATP5F1B,RPL30,RPSA,Uba52
CLPP	peptidase	Inhibited	-2.236	0.00000229	ATP5F1A,ATP5F1B,GAPDH,MDH2,TKT
CR1L	other	Inhibited	-2.236	7.13E-08	BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FBNI
MYOCD	transcription regulator	Inhibited	-2.219	0.00000968	COL1A1,COL1A2,COL2A1,FNI,VCAN
TSC2	other	Inhibited	-2.219	0.000174	ANXA1,ANXA2,GSN,HSPA5,PRELP
NR4A1	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.061	0.00000372	ATP5F1A,ATP5F1B,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,ENO3,MDH2,PDIA3
PRKG1	kinase	Inhibited	-2	0.00000351	COL1A1,FNI,MPO,THBS1
ARHGAP31	other	Inhibited	-2	0.00000398	COL6A1,COL6A2,FNI,SPARC



表 5 : IPA の upstream regulator 解析によって Activated/Inhibited と予測された上位 15 因子 : Overuse vs Misuse

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
CCR2	G-protein coupled receptor	Activated	3.606	4.17E-19	BGN,COL6A1,COL6A2,DCN,FBN1,FN1,HSPG2,OGN,PRELP,SPARC,TGFBI,THBS1,VCAN
TGFB1	growth factor	Activated	3.105	2E-10	Acan,ALB,BGN,COL6A1,COL6A2,COMP,DCN,EEF1A1,FBN1,FN1,GSN,HSPA5,HSPG2,PKM,SERPINA3,SERPINH1,SPARC,TGFBI,THBS1,VCAN,VIM
HIF1A	transcription regulator	Activated	2.928	7.32E-08	BGN,FN1,GAPDH,H2AC20,HSPA5,PKM,PPIA,THBS1,TP11,VIM
NFE2L2	transcription regulator	Activated	2.784	0.0000113	FN1,LMNA,PDI3,PI3K,SERPINA3,TKT,TP11,VCP
Tgf beta	group	Activated	2.652	1.29E-09	BGN,COL6A2,DCN,FN1,HSPG2,SPARC,TGFBI,THBS1,VIM,VTN
OSM	cytokine	Activated	2.511	0.000316	ALB,ANXA1,COL6A1,FN1,HSPA5,SERPINA3,VIM
TGFBR1	kinase	Activated	2.433	5.13E-08	Acan,BGN,FMOD,FN1,TGFBI,VIM
AR	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	2.425	0.000272	GSN,HSPA5,SERPINA3,TF,THBS1,VCAN,VIM
TCR	complex	Activated	2.425	0.0000251	HSPA5,MDH2,P4HB,RPL30,RPSA,SERPINA3,TP11
PRL	cytokine	Activated	2.421	9.53E-10	ACTB,ANXA5,DCN,FN1,MFGE8,P4HB,RPSA,SERPINA3,SPARC,VIM
IL6	cytokine	Activated	2.412	0.00000151	ALB,ANXA1,BGN,COMP,DCN,FN1,HSPA5,SERPINA3,TF,THBS1,VIM
TGFB2	growth factor	Activated	2.39	0.00000302	COL6A2,FMOD,FN1,HSPG2,THBS1,VCAN
IGF1	growth factor	Activated	2.363	8.02E-09	Acan,BGN,DCN,FN1,GAPDH,HAPLN1,HSPA5,PKM,TF,TGFBI,THBS1,VIM
IL10RA	transmembrane receptor	Activated	2.236	0.000778	DCN,FBN1,FN1,OGN,SPARC
IL15	cytokine	Activated	2.224	0.0000749	ANXA1,GAPDH,OGN,PDI3,PKM,TKT,TP11
estrogen receptor	group	Inhibited	-2.433	0.0000243	ANXA1,COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC,VIM
PSMB11	peptidase	Inhibited	-2.236	0.0000098	CHAD,COL6A1,COL6A2,THBS1,VCAN
BDNF	growth factor	Inhibited	-2.236	0.0000992	ANXA5,HSPA5,SERPINH1,SPARC,THBS1,VIM
PRKAA2	kinase	Inhibited	-2.177	0.0000138	ALB,FN1,HSPA5,P4HB,VIM
ARHGAP31	other	Inhibited	-2	0.00000101	COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC

表 6 : IPA の upstream regulator 解析によって Activated/Inhibited と 予測された上位 15 因子 : Overuse vs Misuse+Overuse

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
CCR2	G-protein coupled receptor	Activated	4	4.27E-24	BGN,Chil3/Chil4,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,DCN,FBN1,FN1,HSPG2,OGN,PRELP,SPARC,TGFB1,THBS1,VCAN
TGFB1	growth factor	Activated	3.817	1.53E-14	Acan,ALB,ANXA2,BGN,CKM,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL6A1,COL6A2,COMP,CST3,DCN,EEF1A1,ENO3,FBN1,FN1,GSN,HSPA5,HSPG2,LDHA,PKM,SERPINA3,SERPINH1,SPARC,TGFB1,THBS1,VCAN,VIM
PRL	cytokine	Activated	3.107	4.09E-13	ACTB,ANXA2,ANXA5,COL1A1,COL1A2,CST3,DCN,FN1,MFGE8,P4HB,RPSA,SERPINA3,SPARC,VIM
HIF1A	transcription regulator	Activated	3.091	0.00000225	BGN,FN1,GAPDH,H2AC20,HSPA5,LDHA,PKM,PPIA,THBS1,TP11,VIM
OSM	cytokine	Activated	2.979	3.21E-08	ALB,ANXA1,ANXA2,CKM,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL6A1,FN1,HSPA5,S100A9,SERPINA3,VIM
NFE2L2	transcription regulator	Activated	2.952	0.0000204	COL1A1,FN1,LMNA,PDIA3,PP1B,SERPINA3,TKT,TP11,VCP
Tgf beta	group	Activated	2.878	6.25E-13	BGN,COL10A1,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL6A2,DCN,FN1,HSPG2,SPARC,TGFB1,THBS1,VIM,VTN
TGFBR1	kinase	Activated	2.804	4.13E-10	Acan,BGN,COL1A1,COL1A2,FMOD,FN1,TGFB1,VIM
CCN2	growth factor	Activated	2.785	1.74E-09	Acan,COL10A1,COL1A1,COL2A1,DCN,FN1,HAPLN1,SPARC
SP1	transcription regulator	Activated	2.734	0.0000157	ALPL,ATP5F1B,COL1A1,COL1A2,COL2A1,FN1,HSPA5,PKM,SPARC,VIM
IL15	cytokine	Activated	2.626	0.00000186	ANXA1,ENO3,GAPDH,HSPA8,LDHA,OGN,PDIA3,PKM,TKT,TP11
CEBPA	transcription regulator	Activated	2.596	0.00000235	ALB,ANXA1,COL10A1,COL1A1,COL1A2,GAPDH,HSPA5,MPO,S100A9,THBS1,VCAN
ZEB1	transcription regulator	Activated	2.592	3.76E-10	COL1A1,COL1A2,FN1,RPL30,TF,TGFB1,THBS1,VIM
BMP2	growth factor	Activated	2.575	2.5E-09	Acan,ALPL,COL10A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,FN1,MATN1,SPARC,VCAN
Insulin	group	Activated	2.573	2.18E-12	ACTB,ALB,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FN1,HSPA5,HSPA8,LDHA,MDH2,P4HB,PKM,PPIA,PP1B,TGFB1,THBS1
PSMB11	peptidase	Inhibited	-2.646	0.00000155	CHAD,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,THBS1,VCAN
estrogen receptor	group	Inhibited	-2.63	0.0000174	ANXA1,COL12A1,COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC,VIM
Alpha catenin	group	Inhibited	-2.602	0.00000138	BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,S100A9,VIM
BDNF	growth factor	Inhibited	-2.449	0.0000101	ANXA2,ANXA5,HSPA5,S100A9,SERPINH1,SPARC,THBS1,VIM
CUL3	enzyme	Inhibited	-2.449	2.24E-08	Acan,COL2A1,COL9A1,HAPLN1,MATN1,S100A9
PRKAA2	kinase	Inhibited	-2.387	0.00000465	ALB,FN1,HSPA5,LDHA,P4HB,VIM
FAS	transmembrane receptor	Inhibited	-2.236	0.00141	ANXA2,BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FBN1
RICTOR	other	Inhibited	-2.236	0.00223	ATP5F1A,ATP5F1B,RPL30,RPSA,Uba52
CLPP	peptidase	Inhibited	-2.236	0.00000229	ATP5F1A,ATP5F1B,GAPDH,MDH2,TKT
CR1L	other	Inhibited	-2.236	7.13E-08	BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FBN1
MYOCD	transcription regulator	Inhibited	-2.219	0.00000968	COL1A1,COL1A2,COL2A1,FN1,VCAN
TSC2	other	Inhibited	-2.219	0.000174	ANXA1,ANXA2,GSN,HSPA5,PRELP
NR4A1	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.061	0.000000372	ATP5F1A,ATP5F1B,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,ENO3,MDH2,PDIA3
PRKG1	kinase	Inhibited	-2	0.00000351	COL1A1,FN1,MPO,THBS1
ARHGAP31	other	Inhibited	-2	0.00000398	COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC

表 7 : IPA の upstream regulator 解析によって Activated/Inhibited と予測された上位 15 因子 : Misuse vs Misuse+Overuse

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
CCR2	G-protein coupled receptor	Activated	3.873	1.77E-22	BGN,Chil3/Chil4,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,DCN,FBN1,FN1,HSPG2,OGN,PRELP,SPARC,TGFB1,THBS1
TGFB1	growth factor	Activated	3.695	5.09E-14	Acan,ALB,ANXA2,BGN,CKM,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL6A1,COL6A2,COMP,CST3,DCN,EEF1A1,ENO3,FBN1,FN1,GSN,HSPA5,HSPG2,LDHA,PKM,SERPINA3,SERPINH1,SPARC,TGFB1,THBS1,VIM
PRL	cytokine	Activated	3.107	2.72E-13	ACTB,ANXA2,ANXA5,COL1A1,COL1A2,CST3,DCN,FN1,MFGE8,P4HB,RPSA,SERPINA3,SPARC,VIM
HIF1A	transcription regulator	Activated	3.091	0.00000168	BGN,FN1,GAPDH,H2AC20,HSPA5,LDHA,PKM,PP1A,THBS1,TPI1,VIM
OSM	cytokine	Activated	2.979	2.27E-08	ALB,ANXA1,ANXA2,CKM,COL1A1,COL1A2,COL2A1,COL6A1,FN1,HSPA5,S100A9,SERPINA3,VIM
NFE2L2	transcription regulator	Activated	2.952	0.0000163	COL1A1,FN1,LMNA,PDIA3,PP1B,SERPINA3,TKT,TPI1,VCP
Tgf beta	group	Activated	2.878	4.16E-13	BGN,COL10A1,COL12A1,COL1A1,COL1A2,COL6A2,DCN,FN1,HSPG2,SPARC,TGFB1,THBS1,VIM,VTN
TGFBR1	kinase	Activated	2.804	3.29E-10	Acan,BGN,COL1A1,COL1A2,FMOD,FN1,TGFB1,VIM
CCN2	growth factor	Activated	2.785	1.39E-09	Acan,COL10A1,COL1A1,COL2A1,DCN,FN1,HAPLN1,SPARC
BMP2	growth factor	Activated	2.744	0.00000483	Acan,ALPL,COL10A1,COL1A1,COL1A2,COL2A1,FN1,SPARC
SP1	transcription regulator	Activated	2.734	0.0000122	ALPL,ATP5F1B,COL1A1,COL1A2,COL2A1,FN1,HSPA5,PKM,SPARC,VIM
IL15	cytokine	Activated	2.626	0.00000143	ANXA1,ENO3,GAPDH,HSPA8,LDHA,OGN,PDIA3,PKM,TKT,TPI1
ZEB1	transcription regulator	Activated	2.592	3E-10	COL1A1,COL1A2,FN1,RPL30,TF,TGFB1,THBS1,VIM
Insulin	group	Activated	2.573	1.37E-12	ACTB,ALB,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FN1,HSPA5,HSPA8,LDHA,MDH2,P4HB,PKM,PP1A,PP1B,TGFB1,THBS1
IGF1	growth factor	Activated	2.483	3.77E-11	Acan,BGN,COL1A1,COL1A2,COL2A1,DCN,FN1,GAPDH,HAPLN1,HSPA5,LDHA,PKM,TF,TGFB1,THBS1,VIM
estrogen receptor	group	Inhibited	-2.63	0.0000145	ANXA1,COL12A1,COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC,VIM
Alpha catenin	group	Inhibited	-2.602	0.000000114	BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,S100A9,VIM
PSMB11	peptidase	Inhibited	-2.449	0.00000262	CHAD,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,THBS1
BDNF	growth factor	Inhibited	-2.449	0.0000082	ANXA2,ANXA5,HSPA5,S100A9,SERPINH1,SPARC,THBS1,VIM
PRKAA2	kinase	Inhibited	-2.387	0.00000395	ALB,FN1,HSPA5,LDHA,P4HB,VIM
FAS	transmembrane receptor	Inhibited	-2.236	0.00122	ANXA2,BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FBN1
RICTOR	other	Inhibited	-2.236	0.00197	ATP5F1A,ATP5F1B,RPL30,RPSA,Uba52
CLPP	peptidase	Inhibited	-2.236	0.00000199	ATP5F1A,ATP5F1B,GAPDH,MDH2,TKT
CUL3	enzyme	Inhibited	-2.236	0.000000784	Acan,COL2A1,COL9A1,HAPLN1,S100A9
CR1L	other	Inhibited	-2.236	6.19E-08	BGN,COL1A1,COL1A2,COL6A1,FBN1
TSC2	other	Inhibited	-2.219	0.000152	ANXA1,ANXA2,GSN,HSPA5,PRELP
PTP4A1	phosphatase	Inhibited	-2.157	4.08E-09	ANXA5,COL6A1,COL6A2,EEF1A1,PKM,SPARC,TKT,VIM
NR4A1	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.061	0.000000292	ATP5F1A,ATP5F1B,COL1A1,COL1A2,COL6A1,COL6A2,ENO3,MDH2,PDIA3
PRKG1	kinase	Inhibited	-2	0.00000314	COL1A1,FN1,MPO,THBS1
ARHGAP31	other	Inhibited	-2	0.00000356	COL6A1,COL6A2,FN1,SPARC

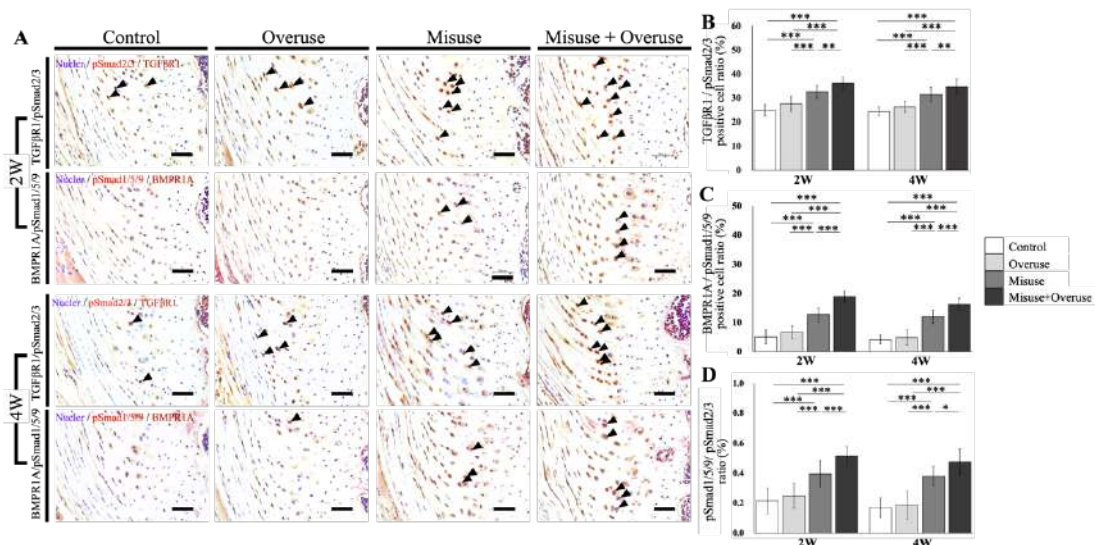


図 25 : Enthsis 線維軟骨領域における TGFβ/BMP シグナル伝達経路の二重免疫組織化学染色結果

A: Double IHCを実施し得られたEnthesis FC領域の組織画像。一次抗体: TGFβR1、pSmad2/3、BMPR1A、pSmad1/5/9。DAB(茶色)発色: TGFβR1、BMPR1A。AP(赤)発色: pSmad2/3、pSmad1/5/9。黒矢頭: 陽性共局在細胞を示した。Scale bar: 50μm。B: TGFβR1 / pSmad2/3陽性共局在細胞比率の比較結果。C: BMPR1A/pSmad1/5/9陽性共局在細胞比率の比較結果。D: pSmad1/5/9 / pSmad2/3比率の比較結果。B-D:すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

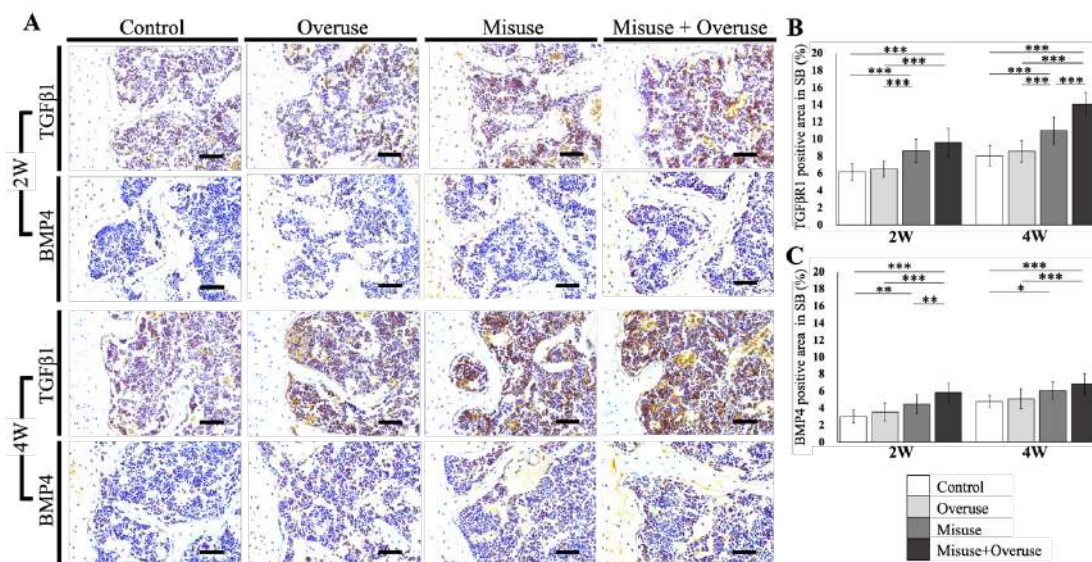


図 26 : Enthsis 軟骨下骨領域における TGFβ1 及び BMP4 の免疫組織化学染色結果

A: Single IHC染色を実施し得られたEnthesis SB領域の組織画像。一次抗体: TGFβ1、BMP4。DAB(茶色)発色: TGFβ1、BMP4。Scale bar: 50μm。B: 単位面積あたりにおけるTGFβ1陽性面積比率の比較結果。C: 単位面積あたりにおけるBMP4陽性面積比率の比較結果。B-C:すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

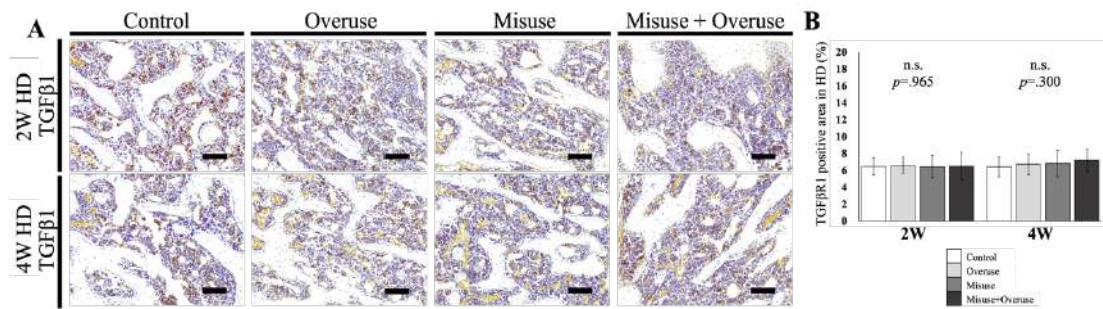


図 27： 上腕骨骨幹部領域における TGFβ1 の免疫組織化学染色結果  
 A: Single IHC染色を実施し得られた上腕骨骨幹部(HD)領域の組織画像。一次抗体: TGFβ1。DAB(茶色)発色: TGFβ1。Scale bar: 50μm。B: 単位面積あたりにおけるTGFβ1陽性面積比率の比較結果。データは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

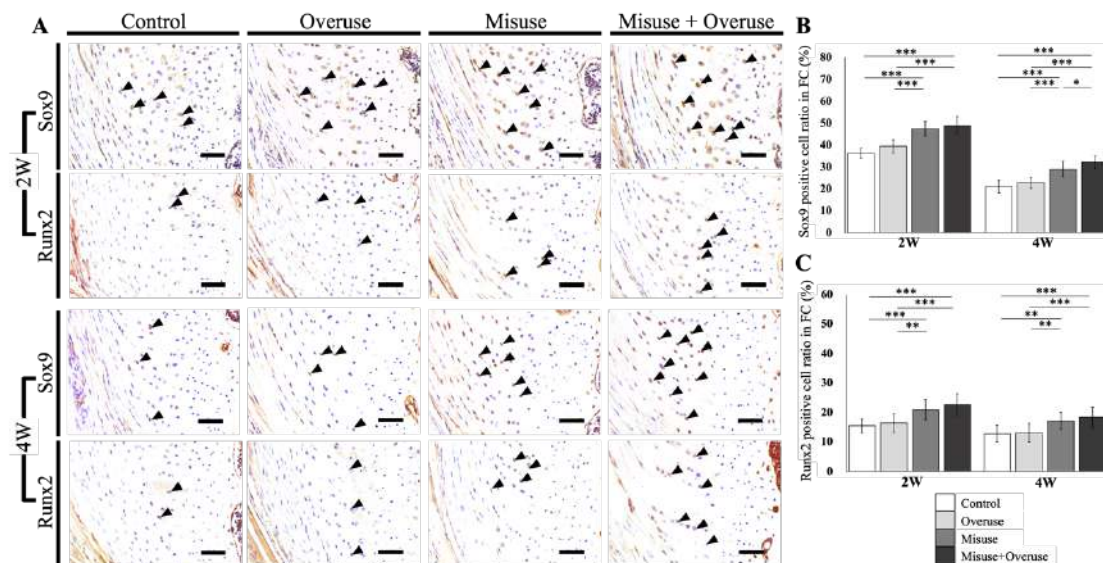


図 28： Enthesis 線維軟骨領域における Sox9 及び Runx2 の免疫組織化学染色結果

A: Single IHC染色を実施し得られたEnthesis FC領域の組織画像。一次抗体: Sox9、Runx2。DAB(茶色)発色: Sox9、Runx2。Scale bar: 50μm。B: 単位面積あたりにおけるSox9陽性細胞比率の比較結果。C: 単位面積あたりにおけるRunx2陽性細胞比率の比較結果。B-C: すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。



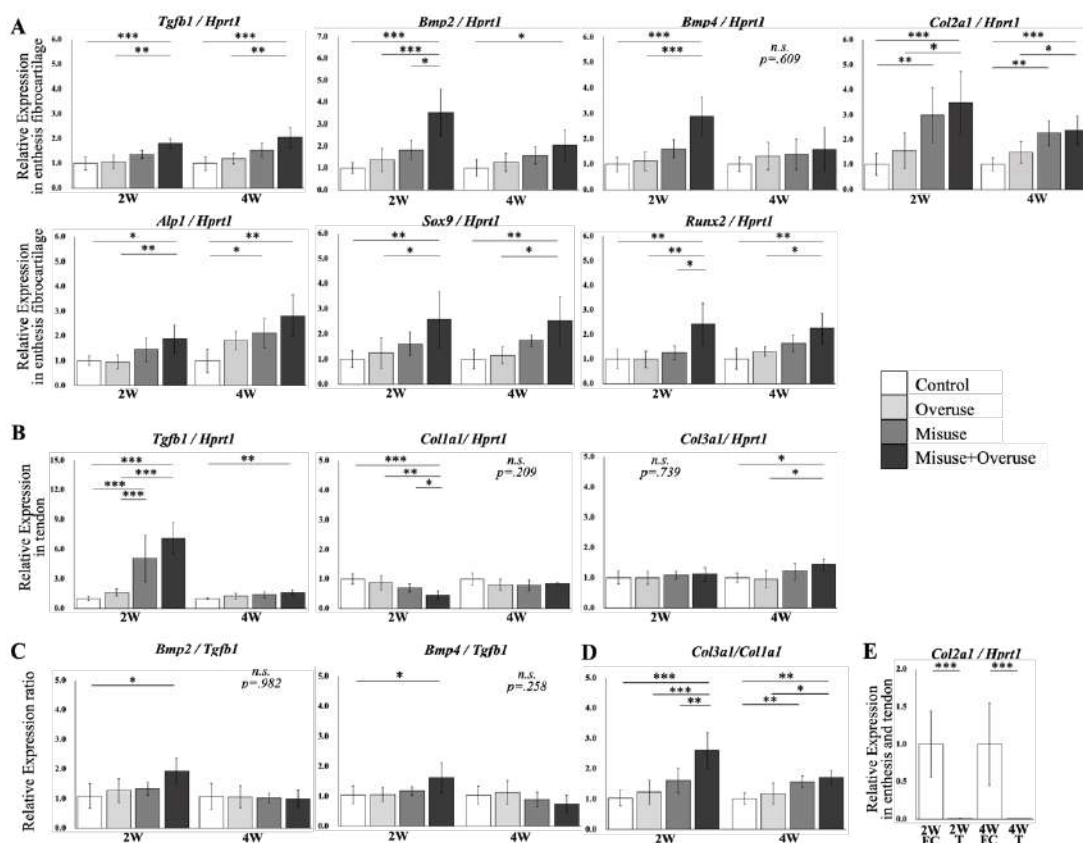


図 29 : Enthesis 線維軟骨領域及び棘上筋腱における mRNA 発現比較結果

A: Enthesis FC領域におけるTGFβ及びBMPシグナル伝達経路標的遺伝子のmRNA相対発現量を比較した。Primer: *Tgfb1*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Alp1*, *Col2a1*, *Sox9*, *Runx2*。B: 棘上筋腱における遺伝子のmRNA相対発現量を比較した。Primer: *Tgfb1*, *Col1a1*, *Con3a1*。C: Enthesis FC領域における*Bmp2*及び*Bmp4*の*Tgfb1*に対する相対発現比率比較結果。D: 棘上筋腱における*Col3a1*と*Col1a1*相対発現比率比較結果。E: Enthesis FC領域及び棘上筋腱における*Col2a1*の相対発現比較結果。A-E: Reference geneは*Hprt1*を用いて正規化した。2<sup>-ΔΔCt</sup>法を用いて相対発現量を算出した。すべてのデータは平均値±SDで示した。\*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ 。

#### 7.4 考察

検証Ⅲにより、改めて EC 優位の運動が成長期マウス棘上筋及び腱組織の肥大化と Enthesis FC 領域の過形成に関与していることが明らかになった。さらに、プロテオーム解析、IHC 解析、分子生物学的解析により、TGFβ スーパーファミリー (TGFβ-Smad 及び BMP-Smad 経路) 伝達経路の活性化が、スポーツ関連性 Enthesopathy 様の病的構造変化に対する標的経路となり得ることが明らかとなった。

まずは棘上筋-腱複合体に関して、これは検証Ⅱのデータ同様に EC 優位な動作条件において形態変化が誘発された。今回使用した下り坂走行によって EC を誘発するモデルはすでに多くの研究において使用されており、EC 優位な動作に伴い筋 CSA 並びに腱 CSA が拡大することは証明されている<sup>44,53)</sup>。EC は収縮タイプの中でも筋腱組織内で生じる機械的ストレスが非常に高く、骨格筋及び腱の肥大化を誘発する<sup>28)</sup>。しかし今回の研究では腱の機械的特性を検証していないため、棘上筋腱損傷後の肥大変化のように組成が乏しい状態で機械的ストレスに抵抗するための見かけ上の肥大化を図ったのか<sup>44)</sup>、もしくは単純に腱組織が強化されたのかは不明である。しかし本検証では、腱における *Colla1* mRNA が EC 優位な運動群で減少し *Tgfb1* の増加並びに *Col3a1* が *Colla1* より優勢となっていた。これは先行研究にて下り坂走行を 26.8m/min で 1 時間と高強度走行をさせたラットの mRNA 解析結果 (*Col1* 発現が Sedentary 群よりも減少し、*Col3* 発現が Sedentary 群よりも増加) に類似しており<sup>86)</sup>、Tendinopathy のような腱障害が誘発された状態にあったと推察される。しかし本検証は組織採取のタイミングが運動直後であったため、Collagen が分解への移行段階であった可能性も考えられる。Collagen の合成は激しい運動後 24 時間以降でピークを迎え、24 時間以内は分解が優勢であると報告されている<sup>87)</sup>。そのため採取するタイミングが 24 時間以降であれば、異なる結果が生じていた可能性がある。

また本検証においても検証Ⅱ同様に FC 領域の形態変化が生じた。そしてこの形態変化に関連する分子経路としては TGF $\beta$  スー

パーファミリーの TGF $\beta$ -Smad 経路と BMP-Smad 経路の活性化が関与しており、EC 優位な運動に Overuse が加わると BMP-Smad 経路の活性化が増加することが証明された。TGF $\beta$  は、発生や細胞外基質のリモデリング機序、また細胞の増殖や分化、組織修復など、多くの生物学的プロセスに関与する多機能サイトカインであり、骨・軟骨・腱などに広く発現する因子である<sup>88-90)</sup>。軟骨組織内では、細胞外基質タンパク質の産生を促進し、軟骨細胞の最終分化を防ぐ役割を有する<sup>91)</sup>。腱組織内では、圧縮応力と一致して Enthesis FC 領域の新生に影響を与える因子である<sup>79,80)</sup>。一方で、腱の微小損傷の修復に関与したり、腱細胞を誘導する因子であったりと、発現する組織部位によって機能が変化する因子である<sup>81,82)</sup>。最近の研究では、SB 領域での TGF $\beta$  の過剰発現が、Enthesopathy 様の病態変化を引き起こすことや<sup>18)</sup>、骨棘形成における軟骨内骨化機構の初期段階で TGF $\beta$  が発現していること<sup>83)</sup>、また膝関節における滑膜での TGF $\beta$  の過剰発現が膝 OA の誘導因子であることなどが明らかになっている<sup>82)</sup>。したがって、TGF $\beta$  は発現部位だけでなく、発現量にも依存する因子であると考えられる。また、骨破壊に伴って骨表面から放出される TGF $\beta$  は、Ca (2+) の発現を減弱させることで筋力低下を誘導することが示されており<sup>96)</sup>、隣接組織間のクロストークを直接もしくは間接的に担う因子であることが示唆されている。BMP は、骨格形成や血管リモデリングなど、胚発生の様々な側面を含み、骨軟骨形成に重要な役割を果たしている<sup>97)</sup>。例えば SB 領域では、骨芽細胞の分化促進や骨形成に関与している<sup>98)</sup>。また、軟骨領域においては、軟骨新生や軟骨の保護・再生、軟骨



細胞の最終分化の促進などに関与している<sup>99)</sup>。したがって、骨形成や石灰化の促進<sup>100)</sup>、さらには軟骨内骨化にも重要な役割を果たしている<sup>101)</sup>。そして BMP シグナルの調節不全は、進行性骨化性線維異形成症の誘発など、骨代謝異常を引き起こすことが明らかになっている<sup>102)</sup>。

本研究では、EC 優位の運動群において、2W 及び 4W の腱-Enthesis FC 領域で *Tgfb1* mRNA が増加する傾向にあり、組織学的解析により、FC 領域、特に腱に近い UFC 領域で TGF $\beta$ -Smad シグナルが活性化していることが確認された。また、TGF $\beta$  の下流因子で軟骨形成に必須な *Sox9* と軟骨基質成分である *Col2a1* が、分子生物学的解析と IHC 解析により活性化されていた。これは 2W と短期的な運動であっても、FC 領域に EC 特異的な圧縮応力の増加の結果、生物学的反応として TGF $\beta$  シグナルが活性化され、軟骨合成が促進されたのではないかと考えられる。また、EC により微小損傷を受けた腱において TGF $\beta$  が増加したことで、Enthesis UFC 領域にクロストークが生じた可能性も推察できる。TGF $\beta$  と同様に、BMP シグナルも EC 優位の運動群では FC 領域で増加していた。特に組織学的解析では、活性化しているのは Tidemark 周辺であり、BMP の下流で石灰化を誘導する Runx2 も Tidemark から UFC 領域にかけて増加していた。分子生物学的解析では、骨隆起形成に関与する *Bmp2* と *Bmp4* が EC 優位の運動で顕著に増加し、その mRNA レベルは *Tgfb1* の 2 倍近くであった。Tidemark はミネラル化が乏しい UFC 領域と、ミネラル化が促進される CFC 領域を分画する線状の領域である<sup>10)</sup>。したがって、Tidemark 周辺で BMP-Smad シグナルが活性化さ

れたことにより、EC 特異的に増加した機械的ストレスに反応して、石灰化の促進が引き起こされたのではないかと考えられる。これは石灰化促進因子である *Alp* の mRNA 発現が増加していることや、組織学的に ALP 陽性領域が増加していることから推察される。BMP シグナルは、石灰化を誘導する IHH シグナルとのクロストークが示唆されている<sup>90,91)</sup>。しかし本検証においては、IHH 関連因子がプロテオーム解析や IPA の上位 15 因子に含まれていなかったため、検討していない。先行研究では ALP や *Runx2* も IHH シグナルの影響を受けることが示されているため、今後は追加検証する必要性が十分にある。またいくつかの先行研究では、Enthesis SB 領域で TGF $\beta$  が過剰活性した場合、間葉系幹細胞の誘導と血管新生が促進され<sup>105)</sup>、間接的に破骨細胞の過剰発現や骨髓腔の拡大を誘導することで Bone marrow lesions のような病態を引き起こすことが示されている<sup>106)</sup>。またこの変化に伴い CFC 領域に血管が侵入することで CFC 領域の増加と骨棘形成が誘導されることが明らかになっている<sup>18)</sup>。しかし本研究の組織像や骨形態像では、2W および 4W とともに血管侵入像や骨髓腔の拡大は認められず、むしろ骨形成が促進されていた。したがって、骨髓からのこれら因子のシグナル伝達や血管侵入が本検証結果を引き起こしたとは考えにくい。検証 II において UFC 領域が CFC 領域よりも高い割合で増加し、比率変化が生じていたことから (図 10E)、スポーツ関連性 Enthesopathy 様の形態変化は骨髓からの影響よりも、筋及び腱からの影響で生じることが明らかとなった。

## 8 総合的考察

本検証 I-III 全体を通し、スポーツ関連性 **Enthesopathy** 様の病態変化には、単純な運動量の増加は影響を及ぼさず、動作中における筋収縮タイプの優位性によって変化することが明らかとなった。またこの病理学的変化のうち形態変化に関しては **TGF $\beta$**  スーパーファミリーにおける **TGF $\beta$ -Smad** 経路及び **BMP-Smad** 経路が大きく関与していることが新たに明らかとなった。

**Enthesis** の形態変化が生じる過程としては、一般的に軟骨内骨化によって生じると考えられてきた<sup>14,22,107</sup>)。軟骨内骨化とは、軟骨細胞の増殖が生じたのち、細胞の肥大化およびアポトーシスが亢進し、同時に血管新生が誘導されることで軟骨内から骨形成が生じていく<sup>22,108</sup>)。この過程は特にリウマチ性疾患など、過剰な炎症並びに骨破壊が進み骨髄などから血管新生が生じやすい病態、また成長板など直下に骨髄が存在する場合に表現される。一方で、**Enthesopathy** 様の病態は軟骨内骨化と類似しているものの、そのメカニズムは異なるとの報告も近年注目されている<sup>80,109-112</sup>)。これら報告の多くは **Enthesopathy** が必ず誘発する X 連鎖低リン酸血症 (XLH) モデルマウスの研究や発生段階を観察する研究で中心に検証されている。**Enthesis** 領域における細胞増殖、さらにはプロテオグリカンや **Col2** の腱方向への増加、**ALP** 活性の増加、**BMP** や **IHH** シグナルの活性化によって定義できる病態とされている<sup>110</sup>)。そもそもの **Enthesis** における形態変化は一般的に想定される軟骨内骨化産物(血管新生や骨形成)によるものではなく、**CFC** の増加、すなわち石灰化の促進が要因であると報告している研究もある<sup>109</sup>)。 **Enthesis** における軟骨前駆細胞

(Scx+/Sox9+)が分化する際、FC領域における細胞はCol1+細胞からCol1+細胞/Col2+細胞へ、最後にCol2+/ColX+細胞へと変化する<sup>80,113)</sup>。そしてColXに加えALPの活性化が同時に生じることによって石灰化が促進される<sup>80)</sup>。ALP活性はCFC領域からTidemark周囲で活性化し、UFC領域へ広がっていく。すなわちEnthesopathy様の形態変化が生じる場合、UFCの腱方向への合成と、CFC領域並びにTidemark周囲の石灰化が同時に進行することで生じると考えられる。本研究においても、MisuseおよびMisuse+Overuse群にて線維軟骨領域の体積増加、SOF染色性の増加、*Col2a1*遺伝子の増加、ColX・ALP活性化並びに*Alp*遺伝子の増加、BMPシグナル伝達経路の活性化が生じていた。一方で骨破壊や血管侵入、細胞のクラスター化は確認されなかった。すなわち、本研究結果で生じたEnthesopathy様の形態変化は軟骨内骨化が生じていたというよりも、FC領域における石灰化の促進による形態変化が生じたと考察することができる。

本論文全体における結果として最も注目すべき点は、高速平地走行を行うOveruse群と低速下り坂走行を行うMisuse群間の多くの項目で有意差が確認されたことにある。ECが発揮する関節トルクは、CCやICが発揮するトルクの約1.2~2倍と報告されている<sup>34,35)</sup>。そのため本研究では、運動強度を設定する際に、Misuse群の走行速度をOveruse群の約66%に設定した。その結果介入期間中の総走行距離は、Overuse群とMisuse+Overuse群が27km(平均22.5m/min)、Misuse群が18km(平均15m/min)となった。予測最大酸素消費量(%VO<sub>2</sub>max)を実際には計測できていないものの、齧歯類であるWister系ラットを用いた先行

研究に基づき算出した結果、各群の%VO<sub>2</sub>maxはOveruse群で約64%、Misuse群で約64%、Misuse+Overuse群で約80%であった<sup>114)</sup>。これまで認識されていたように、全身的身体活動量がスポーツ関連性Enthesopathyの発症に寄与するのであれば、Overuse群とMisuse群間で有意差が生じることはなく、どちらも病理学的変化を生じる可能性があった。しかし検証Ⅱ、Ⅲの結果より同じ負荷量として設定したOveruse群及びMisuse群間で多くの項目で有意差が確認され、Misuse群はEnthesopathy様の病理学的変化を誘発していた。すなわち、スポーツ関連性Enthesopathyの発症に運動量は大きく影響を及ぼす因子ではなく、動作時における筋収縮タイプの優位性が発症に影響を及ぼす要因であることが示唆された。

この基礎研究結果は臨床的にも非常に有益な結果である。これまでOSDは大腿四頭筋のOveruseが発症要因であるとされてきたが、同時期におけるSinding-Larsen-Johansson病や有痛性膝蓋骨分離も同様に大腿四頭筋のOveruseが発症要因であると報告されている。また好発時期は異なるが、ジャンパー膝も同様である<sup>115)</sup>。他の疾患ではシンスプリント（過労性脛骨骨膜炎）や有痛性外脛骨障害は後脛骨筋のOveruseによって発症すると報告されている<sup>18,104)</sup>。しかし病態として異なるこれら疾患が対象筋のOveruseだけで生じるとされ、さらに治療方法も同じであることに対しては多くの臨床家が疑問を抱いてきた。本研究結果からMisuse+Overuse群で最も増悪しているため、発症にOveruseが関わることは否定できないが、根本の問題としてはEC優位となってしまう身体のマルアライメントや動作パターン

など、**Misuse** の存在が多くあると推察される。動物実験では上記疾患モデルが存在しないため検証が困難である。しかし本研究によって示した内容はスポーツ関連性 **Enthesopathy** に対する治療介入が対症療法による **Overuse** の改善だけではなく、根源となりうる **Misuse** の探索と改善が最も重要であることを強調する新規的なデータとなった。これは今後の治療介入コンセプトのパラダイムシフトへと繋がる貴重な報告である。

## 9 研究限界と今後の展望

本検証全体にはいくつかの研究限界があった。最も重大な問題は腱-Enthesis に対する力学強度の検証ができなかった点にある。EC 運動は骨格筋や腱組織を肥大化させるが、多くの場合肥大化した腱の素性は乏しく、力学的強度が弱化している<sup>44)</sup>。また Enthesis においても Enthesopathy のような形態及び変性変化が生じた場合は同部の強度が落ちることが予測される。そのためこれまで明らかにしてきた組織及び形態学的変化が機能として如何なる変化を誘発しているかは不明である。実験プロトコルの確立を早急に行い、今後データを追加する必要がある。また本検証結果によって生じた病理学的変化は、Enthesopathy の初期段階であり後期までは至っていない問題がある。スポーツ関連性 Enthesopathy の発症初期段階は、炎症反応や疼痛の出現が主であり大きな形態変化は誘発されないが、後期になると骨棘形成が生じ、最終的には骨剥離へと至る<sup>24)</sup>。我々の結果は、CFC 領域の増加や FC 領域の炎症・変性因子の増加などの病理学的変化が認められ、Enthesis SB 領域にも変化は認められたが、骨棘形成や骨剥離は認められなかった。その理由としては、今回対象とした筋肉の大きさが関係している可能性が考えられる。棘上筋は他の筋肉に比べ EC の再現性が非常に高いが、体積や収縮力が小さいため、病理学的・構造的変化は大きな筋肉の Enthesis で観察される変化よりも小さくなる可能性が高い。しかしながら大腿四頭筋はマウスの重心や四足歩行の影響を受け、運動条件を変化させるだけでは EC の再現性が悪く、これらの筋肉を標的にするのは不適切であると考えている。電気刺激を用いて EC を誘導する

ことも可能であるが、麻酔下で行わなければならないため運動による周期的な負荷を再現することができない問題がある。したがって、今回生じた病理学的変化は動物種や骨格筋のサイズによって制限されている可能性があり、すべての動物種並びに部位が異なる Enthesopathy に適用できるかどうかは現時点では提言できない。またもう一つの理由として、介入期間の影響も考えられる。本論文では、スポーツ関連性 Enthesopathy の好発期である若年期での変化を検証するため、対象マウスも若年期だけの介入を実施した（マウス性成熟期間：4-8 週齢）。介入期間をより長くすることで骨棘形成までの変化を誘発することが可能であったかもしれないが、性成熟期以降の影響も加わるため介入期間の限界があった。そのため本検証内容は骨軟骨組織が脆弱な若年期には適応可能であるが、性成熟期以降の Enthesopathy に適応できるかは不明である。今後解析対象の週齢を性成熟期以降にし、同様の変化が生じるかどうかを検証する必要がある。また本検証内容は、分子経路の特定の際に Smad を介する canonical 経路を検証したが、本来 TGF $\beta$  および BMP は Smad を介さない non-canonical 経路(代表例：p38 mitogen-activated protein kinase 経路)も存在する。本検証では後者の経路を検証していないため、EC 優位な運動により canonical 経路のみが活性化したのか、もしくは non-canonical 経路も活性化していたのかは明らかでない。今後両方の経路を解析することで EC 優位な運動がどちらの経路を活性化しやすいのか明らかにすることも必要であると考えている。

本研究を臨床応用するためには、まだ検証すべき点がいくつか



存在する。まず **Misuse** を改善することが必要であると述べたが、治療方法として **EC** 優位な運動から通常 (**CC** 優位な) 運動に変更した場合、**Enthesis** では如何なる変化が生じるのかはまだ不明である。仮説としては **Enthesis** に付与される機械的ストレスが減少するため、**BMP-Smad** 経路の活性化が減弱し、石灰化誘導が抑制されるため形態変化は誘発されないと考えている。この仮説に関しては現在検証中であるため、今後発表をしていく予定である。また本研究は全て若年期を対象としているため性成熟期以降の検証は行っていない。**Enthesopathy** は若年期で好発するものの、時には青年期や老齢期で発症するものも存在する。そのため本研究同様の結果が、青年期にも当てはまるのかどうかを検証する必要がある。全ての年代で同様の結果が得られた場合は動作時の筋収縮タイプは悪化因子として強調できる可能性がある。しかし年代ごとに異なる結果が得られた場合は、骨の成熟度や組織の脆弱性によって変化する可能性を示唆できる。現状マウス性成熟期以降かつ骨成長が停滞し始める 8-12 週齢に対し、同様のプロトコルで検証中である。一部明らかとなった結果としては若年期マウス(4-8 週齢)の **Enthesis** 形態変化に比べ、性成熟期以降(8-12 週)の **Enthesis** 形態変化の方が変化率は少なく、むしろ腱組織に **EC** の影響が及んでいる可能性を示唆している。さらに詳細な検証を加えることで、年代別の **Enthesopathy** 発症要因解明、さらには **Tendinopathy**(腱炎)の病態理解にも発展できる可能性がある。上記の動物実験研究により一定の見解が得られた場合は、その後臨床研究も並行して進めていく必要があると考えている。スポーツ障害の疾患別に罹患者の動作特徴を抽出し、

生じている **Misuse** および骨形状の観点から発症要因の特定を行なっていく。また介入研究も今後実施することで、治療方法の確立を検討している。例えば **OSD** に対する治療として、これまでは安静や対象筋肉のストレッチなど対症療法が主であったが、大腿四頭筋の **Misuse** を誘導する上位要因に骨盤の後傾、すなわち腰椎の前弯不足や、脊柱起立筋などの腰部周囲筋の筋力低下が生じている可能性が考えられる。これらに対し治療介入を行うことで **Misuse** が改善され、症状の根本的な緩和を図ることができるかと仮説を立てている。動物実験にて同様の検討を行い、病理学的な変化が誘導されないことを検証した上で実施していく予定である。

以上のように、詳細な **Enthesopathy** 発症要因の解明並びに治療方法の確立に至るまでは、さらに研究を重ねる必要がある。しかしながら、本検証内容によって明らかにされた事実はスポーツ関連性 **Enthesopathy** 発症メカニズムの解明につながる大きな一歩となった。今後研究をより発展させ、スポーツ障害に苦しむ若年者の助けとなれるよう尽力していく。

## 10 結語

本論文は、スポーツ関連性 Enthesopathy 発症要因の解明に向け、マウスを用いた基礎実験を行なった。動作時における運動量の増加と筋収縮タイプの優位性変化が、マウス上腕骨と棘上筋-腱-Enthesis 複合体に如何なる変化を誘発するのかについて検証した。検証の結果、以下の結論を導き出した。

- (1) マウス上腕骨全体の骨形成に対しては、運動量の増加も、筋収縮タイプの優位性も大きく関与しない。
- (2) 単純な運動量の増加 (Overuse) に伴う機械的ストレスの増加は、Enthesopathy 様の病的変化を誘導しない。また筋腱組織に対して軽微な肥大化を促進するものの、有意差が生じるほどではない。
- (3) EC 優位な運動に伴う機械的ストレスの増加は、Enthesopathy 様の病理学的変化を誘導し、さらに Overuse が加わることでより顕著な変化を誘導する。また筋腱組織の肥大化を誘導する。
- (4) Enthesopathy 様病理学的変化のうち、構造変化を誘導する分子経路に TGF $\beta$  スーパーファミリー (TGF $\beta$ -Smad, BMPs-Smad 経路) の活性化が関与している可能性がある。

これまでスポーツ関連性 Enthesopathy の主な発症要因は Overuse であり、運動量の増加が問題であると提言されてきた。しかし本研究により、単純な運動量の増加は Enthesopathy 様の病理学的変化を誘導する要因ではないことが示唆され、新たに動作時における EC 優位な運動が Enthesopathy の誘発因子となり得ることを証明した。

## 11 謝辞

本論文の主査、副査として、御指導ならびに御鞭撻賜りました埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 検査技術科学専攻 廣渡祐史教授、埼玉県立大学 保健医療福祉学部 作業療法学科 石岡俊之准教授、そして神戸大学大学院 保健学研究科 保健学専攻 森山英樹教授に深甚たる謝意を表します。

本研究の指導補助として、御指導賜りました埼玉県立大学 保健医療福祉学部 共通教育科 田中健一教授、ならびに埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 国分貴徳准教授に心から感謝の意を表します。

所属研究室では、本研究遂行にあたり協力を頂きました埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 村田健児助教授、大学院生の峯岸雄基さんをはじめ、岡優一郎さん、加納拓馬さん、高畠啓さん、高橋花奈さん、米野萌恵さん、荒川航平さんに深謝いたします。そして、5年間の大学院生活を支えてくれた家族に感謝致します。

最後に、埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科長 金村尚彦教授には、博士課程前後期にわたり一貫して指導教員を勤めていただきました。そして本研究の遂行にあたり、終始多大なる御指導ご鞭撻を賜りました。心から感謝の意を表します。

## 12 引用文献

1. 文部科学省. 第1期 スポーツ基本計画. 文部科学省(2012): 1-56
2. 文部科学省. 第2期 スポーツ基本計画. 文部科学省(2017): 1-62.
3. 笹川スポーツ財団. スポーツライフ・データ:スポーツライフに関する調査報告書. 笹川スポーツ財団(2020):29-39.
4. Wojtys EM. Sports Injury Prevention. *Sports Health* (2017);9(2):106-107.
5. 戸祭正喜. 特集 成長期のスポーツ外傷とスポーツ障害: 小児の運動器の発育とスポーツ障害. *関節外科 基礎と臨床* (2020);39(2):6-13.
6. 中嶋 寛之. スポーツ整形外科とは-スポーツにおける外傷・傷害. 中嶋 寛之. *スポーツ整形外科学*, 南江堂, 東京都 (1987):2-5
7. Zaricznyj B, Shattuck LJM, Mast TA, Robertson RV, D'elia G. Sports-related injuries in school-aged children. *Am J Sports Med*(1980);8(5):318-324.
8. Apostolakos J, Durant TJS, Dwyer CR, Russell RP, Einreb JH, Alaei F, Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Mazzocca AD. The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. *Muscles. Ligaments Tendons J* (2014);4(3):333-342.
9. Shaw HM, Benjamin M. Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise.

- Scand J Med Sci Sports (2007);17(4):303–315.
10. Benjamin M, Kumai T, Miltz S, Boszczyk BM, Boszczyk AA, Ralphs JR. The skeletal attachment of tendons-tendon “entheses”. *Comp Biochem Physiol* (2002);133(4):931–945.
  11. Lu HH, Thomopoulos S. Functional attachment of soft tissues to bone: development, healing, and tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* (2013);15(1):201–226.
  12. Angeline ME, Rodeo SA. Biologics in the management of rotator cuff surgery. *Clin Sports Med* (2012);31(4):645–663.
  13. Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthritis at entheses and related sites. *J Anat* (2001);199(5):503–526.
  14. Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M. Structure and histopathology of the insertional region of the human achilles tendon. *J Orthop Res* (1995);13(4):585–593.
  15. McGonagle D, Marzo-Ortega H, O’Connor P, Gibbon W, Hawkey P, Henshaw K. Histological assessment of the early enthesitis lesion in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* (2001);61(6):534–537.
  16. Mariotti V, Facchini F, Belcastro MG. Enthesopathies-proposal of a standardized scoring method and

- applications. *Coll Antropol* (2004);28(1):145–159.
17. Petra H, Sébastien V. Enthesopathies: Test of the reproducibility of the new scoring system based on current medical data. *Slov antropológia* (2007);10(1):51–57.
  18. Wang X, Xie L, Crane J, Zhen G, Li F, Yang P, Gao M, Deng R, Wang Y, Jia X, Fan C, Cao X. Aberrant TGF- $\beta$  activation in bone tendon insertion induces enthesopathy-like disease. *J Clin Invest* (2018);128(2):846–860.
  19. Almekinders LC, Weinhold PS, Maffulli N. Compression etiology in tendinopathy. *Clin Sports Med* (2003);22(4):703–710.
  20. Wilder RP, Sethi S. Overuse injuries: Tendinopathies, stress fractures, compartment syndrome, and shin splints. *Clin Sports Med* (2004);23(1):55–81.
  21. Benjamin M, McGonagle D. Entheses: Tendon and ligament attachment sites. *Scand J Med Sci Sports* (2009);19(4):520–527.
  22. Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Miltz S. Where tendons and ligaments meet bone: Attachment sites ('enthese') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat* (2006);208(4):471–490.
  23. Adirim TA, Cheng TL. Overview of injuries in the young athlete. *Sport Med* (2003);33(1):75–81.

24. Launay F. Sports-related overuse injuries in children. *Orthop Traumatol. Surg Res* (2015);101(1):S139–S147.
25. Popovich RM, Gardner JW, Potter R, Kanapik JJ, Jones BH. Effect of rest from running on overuse injuries in army basic training. *Am J Prev Med* (2000);18(3 SUPPL):147–155.
26. Fahlström M, Lorentzon R, Alfredson H. Painful conditions in the achilles tendon region: A common problem in middle-aged competitive badminton players. *Knee Surgery Sport Traumatol Arthrosc* (2002);10(1):57–60.
27. Faulkner JA. Terminology for contractions of muscles during shortening, while isometric, and during lengthening. *J Appl Physiol* (2003);95(2):455–459.
28. Hody S, Croisier JL, Bury T, Rojister B, Leprince P. Eccentric muscle contractions: Risks and benefits. *Front Physiol* (2019); 10:536.
29. Faulkner JA, Brooks SV, Opiteck JA. Injury to skeletal muscle fibers during contractions: Conditions of occurrence and prevention. *Phys Ther* (1993);73(12):911–921.
30. Watanabe H, Fujii M, Yoshimoto M, Abe H, Toda N, Higashiyama R, Takahira N. Pathogenic Factors Associated With Osgood-Schlatter Disease in Adolescent Male Soccer Players: A Prospective Cohort Study.



- Orthop J Sport Med (2018);6(8):1–8.
31. 山田英司. 運動連鎖から見た下肢スポーツ障害: 膝スポーツ理学療法と運動連鎖. *J Chem Inf Model* (2013);30(3): 261–267.
  32. Mcleod TCV, Bay RC, Parsons JT, Sauers EL, Snyder AR. Recent injury and health-related quality of life in adolescent athletes. *J Athl Train* (2009);44(6):603–610.
  33. Ishihara K, Taniguchi H. Fatmax as an index of aerobic exercise performance in mice during uphill running. *PLoS One* (2018);13(2):1–15.
  34. Lerman I, Harrison BC, Freeman K, Hewett TE, Allen DL, Robbins J, Leinwand LA. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J Appl Physiol* (2002);92(6):2245–2255.
  35. Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Fleshner MR, Henriksen EJ, O'Leary DS, Parks CM, Poole DC, Ra'anan AW, Sheriff DD, Toth LA. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. *Am J Vet Res* (2007);68(6):583–583
  36. Lindén C, Alwis G, Ahlborg H, Gardsell P, Valdimarsson O, Lundgren SS, Besjakov J, Larlsson MK. Exercise, bone mass and bone size in prepubertal boys: One-year data from the pediatric osteoporosis prevention study. *Scand J Med Sci Sports* (2007);7(4):340–347.

37. Peng Z, Tuukkanen J, Väänänen KH. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* (1994);9(10):1559–1564.
38. Jones HH, Priest JD, Hayes WC, Tichenor CC, Nagel DA. Humeral hypertrophy in response to exercise. *J Bone Jt Surg* (1997);59(2):204–208.
39. Hamann N, Kohler T, Müller R, Brüggemann GP, Niehoff A. The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcif Tissue Int* (2012); 90(5):429–437.
40. Hawkins SA, Schroeder ET, Wiswell RA, Jaque SV, Marcell TRJ, Costa K. Eccentric muscle action increases site-specific osteogenic response. *Med Sci Sports Exerc* (1999);31(9):1287–1292.
41. Evans WJ, Cannon JG. The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. *Exerc Sport Sci Rev* (1991);19:99–125.
42. Hubal MJ, Ingalls CP, Allen MR, Wenke JC, Hogan HA, Bloomfield SA. Effects of eccentric exercise training on cortical bone and muscle strength in the estrogen-deficient mouse. *J Appl Physiol* (2005);98(5):1674–1681.
43. Hessel AL, Lindstedt SL, Nishikawa KC. Physiological mechanisms of eccentric contraction and its

- applications: A role for the giant titin protein. *Front Physiol* (2017);8:1–14.
44. Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elb Surg* (2000);9(2):79–84.
  45. Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1983); 54(1):80–93
  46. Franchi M V, Reeves ND, Narici M V. Skeletal muscle remodeling in response to eccentric vs. concentric loading: Morphological, molecular, and metabolic adaptations. *Front Physiol* (2017);8:447.
  47. Gravel D, Bélanger AY, Richards CL. Study of human muscle contraction using electrically evoked twitch responses during passive shortening and lengthening movements. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* (1987);56(6):623–627.
  48. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* (2012);9(7):676–682.

49. Lee DV. Effects of grade and mass distribution on the mechanics of trotting in dogs. *J Exp Biol* (2011);214(3):402–411.
50. Cullen KL, Dickey JP, Brown SHM, Nykamp SG, Bent LR, Thomason JJ, Moens NMM. The magnitude of muscular activation of four canine forelimb muscles in dogs performing two agility-specific tasks. *BMC Vet Res* (2017);13(1):68.
51. Tucker JJ, Riggin CN, Connizzo BK, Mauck RL, Steinberg DR, Kuntz AF, Soslowsky LJ, Bernstein J. Effect of overuse-induced tendinopathy on tendon healing in a rat supraspinatus repair model. *J Orthop Res* (2016);34(1):161–166.
52. Millar NL, Wei AQ, Molloy TJ, Boner F, Murrell GAC. Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *J Bone Joint Surg Br* (2009);91(3):417–424.
53. Tsumiyama W, Oki S, Takamiya N, Umei N, Shimizu ME, Ono T, Otsuka A. Induction of muscle hypertrophy in rats through low intensity eccentric contraction. *J Phys Ther Sci* (2014); 26(10):1623–1625.
54. Frost HM. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *Anat Rec* (1987);219(1):1–9.
55. Marenzana M, Arnett TR. The key role of the blood supply to bone. *Bone Res* (2013);1:203–215.
56. Murray RC, VEDI S, Birch HL, Lakhani KH, Goodship

- AE. Subchondral bone thickness, hardness and remodelling are influenced by short-term exercise in a site-specific manner. *J Orthop Res* (2001);19(6):1035–1042.
57. Li Z, Liu SY, Xu L, Xu SY, Ni GX. Effects of treadmill running with different intensity on rat subchondral bone. *Sci Rep* (2017);7(1):1–10.
58. Vlachopoulos D, Barker AR, Ubago-Guisado E, Williams CA, Gracia-Marco L. The effect of a high-impact jumping intervention on bone mass, bone stiffness and fitness parameters in adolescent athletes. *Arch Osteoporos* (2018); 13(1):128.
59. Ju YI, Sone T, Ohnaru K, Choi HJ, Fukunaga M. Differential effects of jump versus running exercise on trabecular architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. *J Appl Physiol* (2012);112(5):766–772.
60. Thomopoulos S, Kim HM, Rothermich SY, Biederstadt C, Das Rosalina, Galatz LM. Decreased muscle loading delays maturation of the tendon enthesis during postnatal development. *J Orthop Res* (2007);25(9):1154–1163.
61. Shaw HM, Vázquez OT, McGonagle D, Bydder G, Santer RM, Benjamin M. Development of the human Achilles tendon enthesis organ. *J Anat* (2008);13(6):718–724.

62. Kanazawa T, Gotoh M, Ohta K, Shiba N, Nakamura K. Novel characteristics of normal supraspinatus insertion in rats: An ultrastructural analysis using three-dimensional reconstruction using focused ion beam/scanning electron microscope tomography. *Muscles Ligaments Tendons J* (2014);4(2):182–187.
63. Maughan RJ. Relationship between muscle strength and muscle cross-sectional area implications for training. *Sport. Med* (1984);1(4):263–269.
64. Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments—an adaptation to compressive load. *J Anat* (1998); 193:481–494.
65. Wakabayashi I, Itoi E, Sano H, Shibuya Y, Sashi R, Minagawa H, Kobayashi M. Mechanical environment of the supraspinatus tendon: A two-dimensional finite element model analysis. *J Shoulder Elb Surg* (2003);12(6):612–617.
66. Seki N, Itoi E, Shibuya Y, Wakabayashi I, Sano H, Sashi R, Minagawa H, Yamamoto N, Abe H, Kikuchi K, Okada K. Mechanical environment of the supraspinatus tendon: Three-dimensional finite element model analysis. *J Orthop Sci* (2008);13(4):348–353.
67. Moffat KL, Sun WHS, Pena PE, Chahine NO, Doty SB, Ateshian GA, Hung CT, Lu HH. Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone

- interface. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008);105(23):7947–7952.
68. Cava G. Enthesitis-traumatic disease of insertions. *J Am Med Assoc* (1959);169(3):254–255.
69. Jacques P, McGonagle D. The role of mechanical stress in the pathogenesis of spondyloarthritis and how to combat it. *Best Pract Res Clin Rheumatol* (2014);28(5):703–710.
70. Kehl AS, Corr M, Weisman MH. Enthesitis: New insights into pathogenesis, diagnostic modalities, and treatment. *Arthritis Rheumatol* (2016);68(2):312–322.
71. Zumwalt A. The effect of endurance exercise on the morphology of muscle attachment sites. *J Exp Biol* (2006); 209:444–454.
72. Rabey KN, Green DJ, Taylor AB, Begun DR, Richmond BG, McFarlin SC. Locomotor activity influences muscle architecture and bone growth but not muscle attachment site morphology. *J Hum Evol* (2015);78:91–102.
73. Deymier AC, Schwartz AG, Cai Z, Daulton TL, Pasteris JD, Genin GM, Thomopoulos S. The multiscale structural and mechanical effects of mouse supraspinatus muscle unloading on the mature enthesis. *Acta Biomater* (2019);83:302–313.
74. Karakostis FA, Jeffery N, Harvati K. Experimental

- proof that multivariate patterns among muscle attachments (entheses) can reflect repetitive muscle use. *Sci Rep* (2019);9:16577.
75. Sugimoto Y, Takimoto A, Akiyama H, Kist R, Scherer G, Nakamura T, Hiraki Y, Shukunami C. Scx+/Sox9+ progenitors contribute to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament. *Development* (2013);140(11): 2280–2288.
76. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* (2002);16(21):2813–2828.
77. Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, et al. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFB signaling are essential for tendon formation. *Dev* (2009); 136(8):1351–1361.
78. Blitz E, Viukov S, Sharir A, Shwartz Y, Galloway JL, Pryce BA, Johnson RL, Tabin CJ, Schweitzer R, Zelzer E. Bone ridge patterning during musculoskeletal assembly is mediated through SCX regulation of Bmp4 at the tendon-skeleton junction. *Dev Cell* (2009);17(6):861–873.
79. Blitz E, Sharir A, Akiyama H, Zelzer E. Tendon-bone attachment unit is formed modularly by a distinct pool



- of Scx-and Sox9-positive progenitors. *Dev* (2013);140(13):2680–2690.
80. Dymont NA, Breidenbach AP, Schwartz AG, Russell RP, Aschbacher-Smith L, Liu H, Hagiwara Y, Jiang R, Thomopoulos S, Butler DL, Rowe DW. Gdf5 progenitors give rise to fibrocartilage cells that mineralize via hedgehog signaling to form the zonal enthesis. *Dev Biol* (2015); 405(1):96–107.
81. Liu ES, Martins JS, Zhang W, Demay MB. Molecular analysis of enthesopathy in a mouse model of hypophosphatemic rickets. *Dev* (2018);145(15):163519.
82. K.Murata, Kokubun T, Onitsuka K, Oka Y, Kano T, Morishita Y, Ozone K, Kuwabara N, Nishimoto J, Isho T, Takayanagi K, Kanemura N. Controlling joint instability after anterior cruciate ligament transection inhibits transforming growth factor-beta-mediated osteophyte formation. *Osteoarthr Cartil* (2019);27(8):1185-1196.
83. van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthr Cartil* (2007);15(3):237–244.
84. Sugita D, Yayama T, Uchida K, Kokubo Y, Nakajima H, Yamagishi A, Takeura N, Baba H. Indian hedgehog signaling promotes chondrocyte differentiation in enchondral ossification in human cervical ossification of

- the posterior longitudinal ligament. *Spine(Phila Pa 1976)* (2013);38(22): E1388-1396.
85. Geoui T, Urlaub H, Plessmann U, Porschewski P. Extraction of proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using the qproteome extraction technique and preparation of tryptic peptides for liquid chromatography/mass spectrometry analysis. *Curr Protoc Mol Biol* (2010);10(27):1–12.
86. Xu SY, He Y Bin, Deng SY, Liu SY, Xu L, Ni GX. Intensity-dependent effect of treadmill running on rat Achilles tendon. *Exp Ther Med* (2018);15(6):5377–5383.
87. Magnusson SP, Langberg H, Kjaer M. The pathogenesis of tendinopathy: Balancing the response to loading. *Nat Rev Rheumatol* (2010);6(5):262–268.
88. Gumucio JP, Sugg KB, Mendias CL. TGF- $\beta$  superfamily signaling in muscle and tendon adaptation. *Exerc Sport Sci Rev* (2015);43(2):93–99.
89. Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* (1997);390(6659):465–471.
90. Kim HM, Galatz LM, Das R, Havlioglu N, Rothermich SY, Thomopoulos S. The role of transforming growth factor beta isoforms in tendon-to-bone healing. *Connect Tissue Res* (2011);52(2):87–98.
91. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van

- den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthr Cartil* (2009);17(12):1539–1545.
92. Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol* (1989);115:267–293.
93. Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG. Mechanical loading and TGF- $\beta$  regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys* (1997);342(2):203–211.
94. Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sport Med* (2003);33(5):381–394.
95. Kaji DA, Howell KL, Balic Z, et al. 2020. TGF $\beta$  signaling is required for tenocyte recruitment and functional neonatal tendon regeneration. *eLife* (2020);9:e51779.
96. Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, Chiechi A, Wright JE, Umanskaya A, Niewolna M, Trivedi T, Charkhzarrin S, Khatiwada P, Wronska A, Haynes A, Benassi MS, Witzmann FA, Zhen G, Wang X, Cao X, Roodman GD, Marks AR, Guise TA. Excess TGF- $\beta$  mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat Med* (2015);21(11):1262–1271.
97. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody

- M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* (2014);1(1):87–105.
98. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* (2016);4:16009.
99. Reddi AH. Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: Noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res* (2001);3(1):1–5.
100. Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng* (2013);6(8):32–52.
101. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Dev* (2009);136(7):1093–1104.
102. Kaplan FS, Xu M, Seemann P, Connor JM, Glaser DL, Carroll L, Delai P, Fastnacht-Urban E, Forman SJ, Gillessen-Kaesbach G, Hoover-Fong J, Köster B, Pauli

- RM, Reardon W, Zaidi SA, Zasloff M, Morhat R, Mundlos S, Groppe J, Shore EM. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. *Hum Mutat* (2009);30(3):379–390.
103. Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *J Orthop Res* (2001);19(1):18–25.
104. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and lhh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Dev* (2001);128(22):4523–4534.
105. Zhen G, Cao X. 2014. Targeting TGF $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* 35(5):227–236.
106. Zhen G, Cao X. Targeting TGF $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* (2014);35(5):227–236.
107. Benjamin M, Ralphs JR. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* (2000) 196:85–130.

108. Benjamin M, Rufai A, Ralphs JR. The mechanism of formation of bony spurs (enthesophytes) in the Achilles tendon. *Arthritis Rheum* (2000);43(3):576.
109. Karaplis AC, Bai X, Falet JP, Macica CM. Mineralizing enthesopathy is a common feature of renal phosphate-wasting disorders attributed to FGF23 and is exacerbated by standard therapy in hyp mice. *Endocrinology* (2012);153(12):5906–5917.
110. Liang G, Katz LD, Insogna KL, Carpenter TO, Macica CM. Survey of the Enthesopathy of X-Linked Hypophosphatemia and Its Characterization in Hyp Mice. *Calcif Tissue Int* (2009);85(3):235–246.
111. Liu ES, Martins JS, Zhang W, Demay MB. Molecular analysis of enthesopathy in a mouse model of hypophosphatemic rickets. *Dev* (2018);145(15).
112. Jensen PT, Lambertsen KL, Frich LH. Assembly, maturation, and degradation of the supraspinatus enthesis. *J Shoulder Elb Surg* (2018);27(4):739–750.
113. Galatz L, Rothermich S, VanderPloeg K, Petersen B, Sandell L, Thomopoulos S. Development of the Supraspinatus Tendon-to-Bone Insertion: Localized Expression of Extracellular Matrix and Growth Factor Genes. *J Orthop Res* (2007);25(12):1621–1628.
114. Qin F, Dong Y, Wang S, Xu M, Wang Z, Qu C, Yang Y, Zhao J. Maximum oxygen consumption and

- quantification of exercise intensity in untrained male Wistar rats. *Sci Rep* (2020);10(1):1–8.
115. Draghi F, Danesino GM, Coscia D, Precerutti M, Pagani C. Overload syndromes of the knee in adolescents: Sonographic findings. *J Ultrasound* (2008);11(4):151–157.
116. Omev ML, Micheli LJ. Foot and ankle problems in the young athlete. *Med Sci Sports Exerc* (1999);31(7):S470–S486.

## 13 補足資料

### 13.1 補足資料 1

#### 13.1.1 Hematoxylin & Eosin (HE) 染色

#### 13.1.2 Toluidine-Blue (TB) 染色

Hematoxylin & Eosin (HE) 染色			Toluidine-Blue (TB) 染色		
脱パラフィン	キシレン	5min	脱パラフィン	キシレン	5min
	キシレン	5min		キシレン	5min
	キシレン	5min		キシレン	5min
	100% エタノール	3min		100% エタノール	3min
	90% エタノール	3min		90% エタノール	3min
	80% エタノール	3min		80% エタノール	3min
	70% エタノール	3min		70% エタノール	3min
HE染色	流水	1min	TB染色	流水	1min
	ヘマトキシリン溶液	10min		0.05% トルイジンブルー (pH7.0) 溶液	10min
	流水	1min		流水	1min
	エオジン溶液	10min			
脱水	80% エタノール	3min	脱水	80% エタノール	3min
	90% エタノール	3min		90% エタノール	3min
	100% エタノール	3min		100% エタノール	3min
透徹	キシレン	3min	透徹	キシレン	3min
	キシレン	3min		キシレン	3min
封入			封入		

#### 13.1.3 Safranin-O fast green (SOF) 染色

Safranin-O fast green (SFO) 染色		
脱パラフィン	キシレン	5min
	キシレン	5min
	キシレン	5min
	100% エタノール	3min
	90% エタノール	3min
	80% エタノール	3min
	70% エタノール	3min
SFO染色	流水	1min
	ヘマトキシリン溶液	10min
	流水	3min
	0.1% ファストグリーン溶液	5min
	1% 酢酸溶液	15sec
	5% サフランニン-O溶液	5min
	流水	10sec
脱水	100% エタノール	5min
	100% エタノール	5min
	100% エタノール	5min
乾燥	37°Cインキュベーター	1min
透徹	キシレン	3min
	キシレン	3min
封入		



13.1.4 Tartrate resistant acid phosphatase /  
Alkaline phosphatase (TRAP/ALP) 染色

Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) / Alkaline phosphatase (ALP) 染色		
脱パラフィン	キシレン	5min
	キシレン	5min
	キシレン	5min
	100% エタノール	3min
	90% エタノール	3min
	80% エタノール	3min
	70% エタノール	3min
TRAP染色	流水	1min
	洗浄(DW)	3min
	TRAP混合染色液 ※1	30min
	洗浄(DW)	3min
ALP染色	0.1mol/L AMPD-HCL溶液	10min
	ALP基質液	90min
対比染色	洗浄(DW)	3min
	核染色試薬	5sec
	洗浄(DW)	3min
乾燥	37°Cインキュベーター	5min
透徹	キシレン	3min
	キシレン	3min
封入		
※1: TRAP混合染色液 (酒石酸溶液(x10):酸性ホスファターゼ基質液A:酸性ホスファターゼ基質液B=10:90:1)		

なおALP染色のみ実施する場合は、TRAP染色過程並びに0.1mol/L AMPD-HCL溶液はスキップした。

## 13.2 補足資料 2

### 13.2.1 Single 免疫組織化学 (IHC) 染色手順

Single Immunohistochemistry (IHC) 染色 Mouse			Single Immunohistochemistry (IHC) 染色 Rabbit		
脱パラフィン	キシレン	5min	脱パラフィン	キシレン	5min
	キシレン	5min		キシレン	5min
	キシレン	5min		キシレン	5min
	100% エタノール	3min		100% エタノール	3min
	90% エタノール	3min		90% エタノール	3min
	80% エタノール	3min		80% エタノール	3min
	70% エタノール	3min		70% エタノール	3min
抗原賦活化処理	洗浄 (PBS)	3min x2	抗原賦活化処理	洗浄 (PBS)	3min x2
	Proteinase K溶液	15min		Proteinase K溶液	15min
内因性HRP抑制	洗浄 (PBS)	3min x2	内因性HRP抑制	洗浄 (PBS)	3min x2
	BLOXALL blocking solution	10min		BLOXALL blocking solution	10min
ブロッキング	洗浄 (PBS)	3min x2	ブロッキング	洗浄 (PBS)	3min x2
	M.O.M. Mouse IgG Blocking Reagent	1 h		5%Normal Goat Serum	30min
一次抗体反応	洗浄 (PBS)	3min x2	一次抗体反応	一次抗体溶液	Over Night
	M.O.M. Diluent	5min			
	一次抗体溶液	Over Night			
二次抗体反応	洗浄 (PBS)	3min x2	二次抗体反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	M.O.M. Biotinylated Anti Mouse IgG Reagent	10min		ビオチン化二次抗体溶液	30min
増感反応	洗浄 (PBS)	3min x2	増感反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	ABC-HRP法	30min		ABC-HRP法	30min
発色(茶)	洗浄 (PBS)	3min x2	発色(茶)	洗浄 (PBS)	3min x2
	DAB溶液	1min		DAB溶液	1min
対比染色	洗浄 (PBS)	3min x2	対比染色	洗浄 (PBS)	3min x2
	25%ヘマトキシリン溶液	10min		25%ヘマトキシリン溶液	10min
透徹	キシレン	3min	透徹	キシレン	3min
	キシレン	3min		キシレン	3min
封入			封入		

### 13.2.2 Double 免疫組織化学 (IHC) 染色手順

<b>Double Immunohistochemistry (IHC) 染色</b>		
脱パラフィン	キシレン	5min
	キシレン	5min
	キシレン	5min
	100% エタノール	3min
	90% エタノール	3min
	80% エタノール	3min
	70% エタノール	3min
抗原賦活化処理	洗浄 (PBS)	3min x2
	Proteinase K溶液	15min
内因性HRP/AP抑制	洗浄 (PBS)	3min x2
	BLOXALL blocking solution	10min
1因子目		
ブロッキング	洗浄 (PBS)	3min x2
	5%Normal Goat Serum	30min
一次抗体反応	一次抗体溶液	Over Night
二次抗体反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	ビオチン化二次抗体溶液	30min
増感反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	ABC-HRP法	30min
発色(茶)	洗浄 (PBS)	3min x2
	DAB溶液	1min
2因子目		
ブロッキング	洗浄 (PBS)	3min x2
	M.O.M. Mouse IgG Blocking Reagent	1 h
一次抗体反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	M.O.M. Diluent	5min
	一次抗体溶液	Over Night
二次抗体反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	M.O.M. Biotinylated Anti Mouse IgG Reagent	10min
増感反応	洗浄 (PBS)	3min x2
	ABC-AP法	30min
発色(赤)	洗浄 (PBS)	3min x2
	AP substrate kit Vector Red	10min
対比染色	洗浄 (PBS)	3min x2
	25%ヘマトキシリン溶液	10min
透徹	キシレン	3min
	キシレン	3min
封入		

### 13.2.3 使用した一次抗体

検証 I					
名称	Host	Clonality	希釈倍率	会社	製品コード
Osterix (OSX)	Rabbit	Polyclonal	1/300	Bioss Antibodies	bs-1110R
検証 II					
名称	Host	Clonality	希釈倍率	会社	製品コード
Collagen type II (Col II)	Rabbit	Polyclonal	1/200	Abcam	ab34712
Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	Rabbit	Polyclonal	1/200	Bioss Antibodies	bs-2081R
Interleukin-6 (IL-6)	Rabbit	Polyclonal	1/100	Abcam	ab6672
Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)	Rabbit	Polyclonal	1/200	Bioss Antibodies	bs-0575R
Collagen type X (Col X)	Rabbit	Polyclonal	1/150	Abcam	ab58632
Osterix (OSX)	Rabbit	Polyclonal	1/300	Bioss Antibodies	bs-1110R
Runt related transcription factor 2 (Runx2)	Mouse	Monoclonal	1/200	Medical & Biological Laboratories	D130-3
検証 III					
名称	Host	Clonality	希釈倍率	会社	製品コード
phospho Smad 2/3 (pSmad2/3)	Rabbit	Polyclonal	1/200	Affinity Biosciences	AF3367
phospho Smad 1/5/9 (pSmad1/5/9)	Rabbit	Polyclonal	1/100	Cell Signaling Technology	13820S
Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)	Rabbit	Polyclonal	1/200	Bioss Antibodies	bs-1374R
Transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1)	Mouse	Monoclonal	1/200	GeneTex	GTX34272
Transforming growth factor beta receptor 1 (TGF $\beta$ R1)	Mouse	Monoclonal	1/100	Santa Cruz Biotechnology	sc-518086
Bone morphogenetic protein receptor type I A (BMPRI A)	Mouse	Monoclonal	1/100	Merck Millipore	MABS419
SRY-box transcription factor 9 (Sox9)	Mouse	Monoclonal	1/400	invitrogen	14-9765-82
Runt related transcription factor 2 (Runx2)	Mouse	Monoclonal	1/200	Medical & Biological Laboratories	D130-3

### 13.3 補足資料 3

#### 13.3.1 ISOGEN による RNA 抽出並びに RNA 精製手順

1. サンプルを採取後 RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen, CA, USA) に浸潤し -20°C で 1 週間保存した。
2. 実体顕微鏡下で Microsurgery knife を用いて棘上筋・棘上筋腱・Enthesis FC 領域を採取した。なお、FC 領域は骨髄が含まれないように注意しながら削り出した。
3. 2µl チューブに各サンプル、ISOGEN (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) 400µl、ジルコニアビーズを加え、TissueLyser にセットした。
4. 組織を 50Hz で 5 分間破碎し、氷上で 1 分間冷却した後、さらに 50Hz で 5 分間破碎した。
5. ジルコニアビーズを除去後、室温にて 5 分間静置した。
6. 200µl のクロロホルムを添加し、30 秒間激しく攪拌した。
7. 4°C 環境下で 15 分間、12000g で遠心操作した。
8. 上層にある水層を新しいチューブに移動後、3µl の Ethachinmate (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) と水層の 0.8 倍量の 2-propanol を添加し転倒混和した。その後 4°C 環境下で一晩静置した。
9. 4°C 環境下で 15 分間、12000g で遠心操作した。
10. 沈澱しているペレット以外の上清を除去した。
11. 沈澱ペレットに 1ml の 70% エタノールを添加し混和後、4°C 環境下で 5 分間、12000g で遠心操作した。
12. ペレット以外の上清を除去し、室温で 10 分間乾燥させた
13. ペレットに対し UltraPure DEPC Treated Water (Thermo

Fisher Scientific, MA, USA)を 15 $\mu$ l 添加することで RNA を溶出した。

14. RNA 溶出液に対し混入ゲノム DNA を除去するため DNase (TaKaRa Biotechnology, Shiga, Japan) 処理を実施した。反応液は以下のように調整した。

DNase I 反応液	
RNA溶出液	15 $\mu$ l
10 X DNase I Buffer	2 $\mu$ l
Recombinant Dnase I (Rnase-free)	1 $\mu$ l
Rnase Inhibitor	0.5 $\mu$ l
UltraPure DEPC Treated Water	1.5 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

15. 反応液を RNA 溶出液に添加し 37 $^{\circ}$ C インキュベーター内で 30 分間静置した。
16. 混入ゲノム DNA の除去及び RNA 精製を行うため、RNA 溶出液と DNase I 混合液に RNAClean XP (Beckman Coulter, CA, USA) を 36 $\mu$ l 添加した。30 秒間の攪拌後室温にて 5 分間静置することで DNA 断片を磁性ビーズに結合させた。
17. 磁気プレート上に移動し 10 分間静置した。その後アスピレーターにて上清を除去した。
18. 磁気プレート上で 70%エタノール 200 $\mu$ l を添加後 30 秒間静置し再度上清を除去した。70%エタノール洗浄を合計 3 回実施した。洗浄後は室温にて 10 分間乾燥させた
19. 磁気プレートから降ろし、UltraPure DEPC Treated Water を添加し攪拌した。
20. 磁気プレート上で再度静置し、精製された RNA サンプルを含む上清を新しいチューブに移動した。

### 13.3.2 High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit を用いた cDNA 合成手順

1. High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, CA, USA) を解凍し、溶液を攪拌後、反応液を以下のように調整した。

High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit 反応液	
10 X RTBuffer	2.0 $\mu$ l
25 X dNTP Mix (100mM)	0.8 $\mu$ l
10 X RT Random Primer	2.0 $\mu$ l
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0 $\mu$ l
UltraPure DEPC Treated Water	3.2 $\mu$ l
RNA抽出液	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

2. Thermal Cycler Palm-Cycler を使用し以下のプログラムで cDNA の合成を行なった。

Thermal Cycling Condition		
Step1	25°C	10min
Step2	37°C	120min
Step3	85°C	5min
Step4	4°C	$\infty$

3. 合成した cDNA は直ちに -80°C で保存し、解析時には再解凍・再攪拌して使用した。
4. 逆転写反応によって得られた cDNA を鋳型とし、Real time PCR を用いて標的遺伝子の mRNA 相対発量を比較した。
5. Real time PCR は StepOnePlus system (Applied Biosystems, CA, USA) と TaqMan Gene Expression Assays probe (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて実施した。なお反応溶液に関しては以下の通りに調整した。

Real-Time PCR 反応液	
TaqMan Fast Advansed Master Mix	10 $\mu$ l
UltraPure DEPC Treated Water	7 $\mu$ l
Reference gene primer	1 $\mu$ l
Targed gene primer	1 $\mu$ l
Sample cDNA	1 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

6. 調整した溶液を 96-well プレートに添加し、室温にて遠心操作した。気泡が取り除かれたことを確認し、StepOnePlus system に設置した。
7. PCR は Fast mode (95°C で 20 秒、60°C で 20 秒サイクル) にて合計 45cycle 実施した。
8. 解析方法は  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法を用いて Reference gene に対する標的遺伝子の相対的発現量を群間比較した。

### 13.3.3 使用した Primer

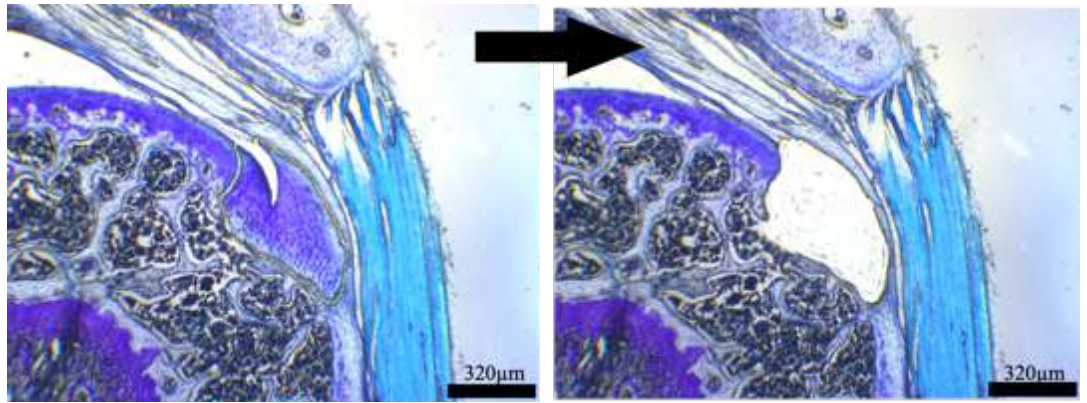
検証 II		
遺伝子名	製品番号	VIC/FAM
<i>Tumor necrosis factor-alpha (Tnfa)</i>	Mm00443258-m1	FAM
<i>Interleukin-6 (Il-6)</i>	Mm00446190-m1	FAM
<i>Transforming growth factor-beta 1 (Tgfb1)</i>	Mm01178820-m1	FAM
<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)</i>	Mm99999915-g1	VIC-PL
検証 III		
遺伝子名	製品番号	VIC/FAM
<i>Transforming growth factor-beta 1 (Tgfb1)</i>	Mm01178820_m1	FAM
<i>Bone morphogenetic protein-2 (Bmp2)</i>	Mm01340178_m1	FAM
<i>Bone morphogenetic protein-4 (Bmp4)</i>	Mm00432087_m1	FAM
<i>Collagen type II alpha 1 chain (Col2a1)</i>	Mm01309565_m1	FAM
<i>Alkaline phosphatase 1 (Alp1)</i>	Mm00475834_m1	FAM
<i>SRY-box transcription factor 9 (Sox9)</i>	Mm00448840_m1	FAM
<i>Runt-related transcription factor 2 (Runx2)</i>	Mm00501584_m1	FAM
<i>Collagen type I alpha 1 chain (Col1a1)</i>	Mm00801666_g1	FAM
<i>Collagen type III alpha 1 chain (Col3a1)</i>	Mm00802331_m1	FAM
<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1)</i>	Mm00446968_m1	VIC-PL



## 13.4 補足資料 4

### 13.4.1 Qproteome FFPEkitを用いたタンパク質抽出過程

1. 10 $\mu\text{m}$ にて40枚/1個体の切片を作成した。
2. 切片を Director slide (AMR, Tokyo, Japan) にのせ、脱パラフィン処理後、FC領域を明確化するためにTB染色を実施した。
3. 染色した切片から LMD7000 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) にて FC領域のみを 0.5 $\mu\text{l}$  チューブに回収した。



4. 回収したサンプルに Extraction Buffer EXB と  $\beta$ -mercaptoethanol 混合液 (94 : 6) を 50 $\mu\text{l}$  添加し混和した。
5. 氷上で 5 分間冷却し、泡立たないように再度混和した。
6. サンプルが入ったチューブを 100 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間インキュベートした。
7. サンプルが入ったチューブを Thermomixer を用いて 80 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間、750rpm でインキュベートした。
8. サンプルが入ったチューブ 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間インキュベートした。
9. 4 $^{\circ}\text{C}$ 環境下で 15 分間 14000g の遠心操作を実施し、抽出し

たタンパク質が含まれている上澄を 1.5ml チューブに移し替えた。

10. 抽出したタンパク質溶液を Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。
11. 200 $\mu$ l の methanol を抽出タンパク質溶液に添加し 10 秒間混和した。その後 10 秒間 9000g で遠心操作した。
12. 50 $\mu$ l のクロロホルムを抽出タンパク質溶液に添加し 10 秒間混和した。その後 10 秒間 9000g で遠心操作した。
13. 150 $\mu$ l の HPLC-grade の H<sub>2</sub>O を抽出タンパク質溶液に添加し 10 秒間混和した。その後 1 分間 9000g で遠心操作した。
14. 遠心操作により 3 層（上層：水層、中間層：タンパク質、下層：有機層）に分離させたのち、上層のみ除去した。
15. 150 $\mu$ l の methanol を添加し 10 秒間混和した。その後 2 分間 9000g で 2 回遠心操作した。
16. 沈澱したペレット以外の上澄みを全て除去した。
17. 沈澱したペレットを 1ml のエタノールで洗浄し、その後 2 分間 9000g で遠心操作した。その後 2 回に分けてエタノールを全て除去した。

#### 13.4.2 タンパク質消化過程

1. 沈澱したペレットを 10 $\mu$ l の 1% RapiGest SF (Nihon Waters, Tokyo, Japan) in 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> で溶解した。
2. 10 $\mu$ l の 50mM Dithiothreitol(DTT:Merck, Tokyo, Japan) in 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を添加し、Thermomixer を用いて 37°C で 1 時間、950rpm で攪拌した。
3. 10 $\mu$ l の 100mM iodoacetamide(IAA:Sigma-Aldrich, MO, USA) in 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を添加し Thermomixer を用いて 37°C で 1 時間、950rpm で再度攪拌した。なお 10 分ごとにチューブを個別で混和した。
4. 90 $\mu$ l の 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を添加した。
5. 4 $\mu$ l の 0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l trypsin (Promega, WI, USA) in 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を添加した。
6. 37°C 環境下で一晩インキュベートした。
7. 20 $\mu$ l の 5%(v/v) trifluoroacetic acid(TFA:Sigma-Aldrich, MO, USA) を添加して trypsin による消化を停止した。
8. Thermomixer を用いて 37°C で 1 時間、950rpm で再度攪拌した。
9. 24°C 環境下で 30 分間 13000rpm の遠心操作を実施した。
10. Trypsin 処理をされたペプチドを含む上澄みを新しいチューブに移し替え Speedvac evaporator を用いて真空乾燥させた。

### 13.4.3 C-TIP を用いた脱塩濃縮過程

1. 真空乾燥させたサンプルに対し、TFA\_A [H<sub>2</sub>O : Acetonitrile (ACN) : TFA = 98 : 2 : 0.1] 溶液を添加し、超音波洗浄機によってサンプルを溶出させた。
2. C-TIP T300 (AMR, Tokyo, Japan) を 2ml チューブの蓋に突き刺し、そこに試薬 [H<sub>2</sub>O : ACN : Acetic acid (AA) = 20 : 80 : 0.5] を 10 $\mu$ l 添加した。
3. 24 $^{\circ}$ C環境下で 15 秒間 1500g の遠心処理を実施し、試薬 A をフィルターに通した。
4. 続いて C-TIP に試薬 B (H<sub>2</sub>O : ACN : AA = 96 : 4 : 0.5) を 10 $\mu$ l 添加した。
5. 24 $^{\circ}$ C環境下で 15 秒間 1500g の遠心処理を実施し、試薬 B をフィルターに通した (フィルター中の溶液を試薬 A から試薬 B に置換することでペプチドを吸着可能な状態にした)。
6. C-TIP にサンプル溶液を 10 $\mu$ l 添加し、24 $^{\circ}$ C環境下で 15 秒間 1500g の遠心処理を実施した。この作業を数回繰り返した。
7. 洗浄のため試薬 B を C-TIP に添加し、24 $^{\circ}$ C環境下で 15 秒間 1500g の遠心処理を実施した。
8. C-TIP が突き刺さっているチューブの蓋を TPX 製 1.5ml チューブ (Hitech, Tokyo, Japan) にはめこみ、サンプルを溶出するために試薬 A を再度 C-TIP に 10 $\mu$ l 添加した。
9. 24 $^{\circ}$ C環境下で 15 秒間 1500g の遠心処理を実施し、サンプルを溶出した。8.9 の作業を 2 回繰り返した。

10. C-TIP が刺さっているチューブの蓋を外し、TPX 製 1.5ml チューブにサンプルが溜まっている状態にした。
11. Speedvac evaporator を用いて真空乾燥させた
12. 乾燥したサンプルに TFA\_A [H<sub>2</sub>O : Acetonitrile (ACN) : TFA = 98 : 2 : 0.1] 溶液を添加し超音波洗浄機によってサンプルを溶出させた。
13. 最後にオートサンプラー用の小瓶にサンプル溶液を移し替え、LC-MS/MS 解析に回した。

## 14 データ一覧

検証 1					
図4	B	C	D	E	F
Control	32.578±2.798	0.074±0.007	3.953±0.177	0.176±0.017	0.029±0.003
Overuse	33.884±1.580	0.084±0.004	3.996±0.238	0.169±0.008	0.031±0.002
Misuse	36.733±2.183	0.085±0.009	4.203±0.336	0.147±0.013	0.034±0.002
Misuse+Overue	37.008±1.899	0.093±0.008	4.403±0.63	0.145±0.012	0.037±0.002
図5	B	C	D	E	
Control	1.705±0.060	0.679±0.055	38.417±4.640	0.156±0.007	
Overuse	1.716±0.075	0.711±0.045	41.424±1.632	0.170±0.008	
Misuse	1.759±0.044	0.743±0.045	42.305±3.060	0.174±0.007	
Misuse+Overue	1.750±0.053	0.817±0.039	46.731±1.862	0.186±0.009	
図7	C	D			
Control	0.918±0.465	1.173±0.300			
Overuse	1.101±0.489	1.296±0.353			
Misuse	2.151±0.544	1.932±0.328			
Misuse+Overue	2.483±0.685	2.153±0.277			

検証2

図9	B
Control	1584.8±211.4
Overuse	1661.7±158.9
Misuse	1913.0±99.1
Misuse+Overue	1953.9±144.9

図10	B	C	D	E (UFC rate)	E (CFC rate)
Control	0.107±0.008	0.040±0.005	0.066±0.004	37.98±2.31	62.02±2.31
Overuse	0.117±0.010	0.047±0.004	0.068±0.006	40.76±1.72	59.24±1.72
Misuse	0.128±0.008	0.055±0.004	0.072±0.005	43.45±1.61	56.55±1.61
Misuse+Overue	0.139±0.014	0.063±0.007	0.077±0.008	45.20±0.95	54.80±0.95

図12	B	C	D
Control	39.12±3.28	38.04±4.03	38.53±1.74
Overuse	41.36±2.70	42.24±2.87	40.30±1.28
Misuse	46.42±1.65	50.25±2.13	43.51±2.89
Misuse+Overue	48.98±1.86	53.94±2.04	37.15±2.55

図13	B	C
Control	50.95±5.95	12.93±4.42
Overuse	61.03±3.71	16.80±2.95
Misuse	66.71±3.16	29.07±5.65
Misuse+Overue	73.49±4.40	35.27±6.39

図14	B	C
Control	1.12±0.22	2.48±0.48
Overuse	1.29±0.29	2.89±0.55
Misuse	1.74±0.21	3.72±0.67
Misuse+Overue	1.94±0.14	4.41±0.57

図15	B	C	D	E	F	G
Control	2.797±0.120	0.0103±0.0006	10.651±0.764	0.025±0.002	3.931±0.223	0.173±0.008
Overuse	2.819±0.102	0.0108±0.0006	11.641±0.814	0.027±0.003	3.815±0.264	0.172±0.008
Misuse	2.985±0.135	0.0118±0.0006	13.100±0.953	0.029±0.002	4.038±0.264	0.163±0.008
Misuse+Overue	2.966±0.144	0.0127±0.0010	14.191±0.778	0.003±0.002	4.063±0.402	0.154±0.007

図16	A	B	C
Control	1.00±0.36	1.00±0.64	1.00±0.42
Overuse	1.06±0.47	1.21±0.78	1.21±0.31
Misuse	1.85±1.08	1.22±0.64	2.19±0.85
Misuse+Overue	4.10±1.09	2.28±0.78	3.09±0.61

検証3

図20	B	C
2W Control	1212.2±87.3	0.58±0.06
2W Overuse	1233.0±72.6	0.64±0.06
2W Misuse	1394.3±102.9	0.74±0.06
2W Misuse+Overue	1519.2±155.1	0.82±0.06
4W Control	1635.3±126.9	0.72±0.04
4W Overuse	1672.9±145.9	0.76±0.06
4W Misuse	1859.1±132.8	0.87±0.08
4W Misuse+Overue	1938.7±125.3	1.00±0.10

図21	B	C
2W Control	0.093±0.004	9.76±2.13
2W Overuse	0.094±0.004	10.80±3.32
2W Misuse	0.101±0.006	15.49±2.02
2W Misuse+Overue	0.109±0.006	18.28±2.63
4W Control	0.107±0.005	11.29±2.27
4W Overuse	0.111±0.008	13.23±2.67
4W Misuse	0.124±0.005	21.88±2.70
4W Misuse+Overue	0.137±0.006	23.78±3.10

図22	B	C	D	E	F	G
2W Control	2.251±0.084	0.0066±0.0005	12.04±1.52	0.029±0.002	3.830±0.161	0.174±0.008
2W Overuse	2.290±0.114	0.0068±0.0007	14.39±1.17	0.031±0.002	3.836±0.253	0.168±0.011
2W Misuse	2.345±0.076	0.0078±0.0009	16.61±1.29	0.033±0.004	4.113±0.341	0.149±0.009
2W Misuse+Overue	2.391±0.068	0.0085±0.0010	16.95±1.29	0.036±0.004	4.149±0.225	0.149±0.007
4W Control	2.594±0.098	0.0090±0.0009	14.63±0.92	0.034±0.003	4.403±0.228	0.168±0.008
4W Overuse	2.654±0.067	0.0096±0.0008	15.59±0.84	0.034±0.003	4.444±0.361	0.163±0.010
4W Misuse	2.721±0.101	0.0109±0.0007	18.02±1.93	0.040±0.003	4.499±0.520	0.148±0.007
4W Misuse+Overue	2.779±0.052	0.0117±0.0009	19.11±1.77	0.042±0.002	4.552±0.245	0.140±0.009

図25	B	C	D
2W Control	24.90±2.46	5.08±2.30	0.21±0.09
2W Overuse	27.62±3.14	6.66±2.12	0.25±0.08
2W Misuse	32.6±2.71	12.7±2.42	0.39±0.09
2W Misuse+Overue	36.06±2.43	18.83±1.74	0.52±0.06
4W Control	24.42±1.86	4.11±1.55	0.17±0.07
4W Overuse	26.31±2.23	4.88±2.52	0.19±0.09
4W Misuse	31.43±3.02	11.95±2.31	0.38±0.07
4W Misuse+Overue	34.69±3.23	16.27±2.05	0.48±0.08

図26	B	C
2W Control	6.16±1.02	3.01±0.78
2W Overuse	6.48±0.95	3.53±1.05
2W Misuse	8.60±1.33	4.50±1.12
2W Misuse+Overue	9.60±1.62	5.82±1.06
4W Control	8.02±1.23	4.79±0.72
4W Overuse	8.55±1.23	5.08±1.15
4W Misuse	10.96±1.57	6.06±1.01
4W Misuse+Overue	14.02±1.37	6.80±1.27

図27	B
2W Control	6.48±0.90
2W Overuse	6.63±0.95
2W Misuse	6.40±0.95
2W Misuse+Overue	6.52±0.93
4W Control	6.46±0.68
4W Overuse	6.75±1.18
4W Misuse	6.81±0.82
4W Misuse+Overue	7.20±1.27



検証3

図28	B	C						
2W Control	36.09±2.38	15.39±2.42						
2W Overuse	39.32±2.91	16.30±3.15						
2W Misuse	47.4±3.26	20.9±3.43						
2W Misuse+Overue	48.84±4.10	22.57±3.70						
4W Control	21.04±2.93	12.66±2.82						
4W Overuse	22.68±2.51	13.02±3.15						
4W Misuse	28.92±3.57	17.05±2.90						
4W Misuse+Overue	32.02±2.92	18.30±3.42						

図29 A	<i>Tgfb1</i>	<i>Bmp2</i>	<i>Bmp4</i>	<i>Col2a1</i>	<i>Alp1</i>	<i>Sox9</i>	<i>Runx2</i>
2W Control	1.00±0.27	1.00±0.24	1.00±0.29	1.00±0.44	1.00±0.18	1.00±0.34	1.00±0.39
2W Overuse	1.05±0.28	1.36±0.53	1.13±0.37	1.56±0.72	0.95±0.28	1.25±0.60	0.99±0.34
2W Misuse	1.36±0.18	1.82±0.44	1.62±0.35	2.98±1.11	1.46±0.48	1.61±0.48	1.26±0.28
2W Misuse+Overue	1.81±0.19	3.52±1.07	2.89±0.76	3.48±1.27	1.87±0.57	2.57±1.10	2.43±0.83
4W Control	1.00±0.28	1.00±0.38	1.00±0.29	1.00±0.25	1.00±0.47	1.00±0.39	1.00±0.42
4W Overuse	1.18±0.22	1.24±0.42	1.32±0.54	1.49±0.43	1.82±0.37	1.15±0.34	1.30±0.21
4W Misuse	1.53±0.31	1.57±0.39	1.40±0.60	2.27±0.49	2.11±0.58	1.73±0.22	1.65±0.32
4W Misuse+Overue	2.05±0.41	2.03±0.72	1.59±0.85	2.38±0.57	2.81±0.85	2.52±0.97	2.25±0.62

図29 B	<i>Tgfb1</i>	<i>Coll1</i>	<i>Col3a1</i>
2W Control	1.00±0.20	1.00±0.17	1.00±0.21
2W Overuse	1.60±0.38	0.87±0.25	1.00±0.21
2W Misuse	5.08±2.33	0.70±0.14	1.08±0.12
2W Misuse+Overue	7.12±1.54	0.45±0.14	1.11±0.22
4W Control	1.00±0.09	1.00±0.20	1.00±0.16
4W Overuse	1.24±0.28	0.82±0.19	0.95±0.29
4W Misuse	1.37±0.28	0.79±0.20	1.22±0.28
4W Misuse+Overue	1.62±0.24	0.87±0.06	1.44±0.19

図29 C/D	<i>Bmp2/Tgfb1</i>	<i>Bmp4/Tgfb1</i>	<i>Col3a1/Coll1</i>
2W Control	1.09±0.42	1.05±0.30	1.03±0.25
2W Overuse	1.27±0.40	1.06±0.24	1.23±0.39
2W Misuse	1.33±0.21	1.18±0.14	1.62±0.41
2W Misuse+Overue	1.93±0.46	1.62±0.50	2.60±0.59
4W Control	1.07±0.43	1.40±0.29	1.02±0.19
4W Overuse	1.05±0.37	1.13±0.40	1.19±0.34
4W Misuse	1.03±0.16	0.89±0.24	1.57±0.20
4W Misuse+Overue	1.00±0.29	0.75±0.29	1.71±0.23

図29 E	<i>Col2a1</i>
2W FC	1.00±0.44
4W FC	1.00±0.56
2W Tendon	0.008±0.004
2W Tendon	0.002±0.001



Article

## Effect of Various Types of Muscle Contraction with Different Running Conditions on Mouse Humerus Morphology

Kaichi Ozone <sup>1,2</sup>, Yuichiro Oka <sup>1</sup>, Yuki Minegishi <sup>1,2</sup>, Takuma Kano <sup>1</sup>, Takanori Kokubun <sup>3</sup>, Kenji Murata <sup>3</sup> and Naohiko Kanemura <sup>3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Graduate Course of Health and Social Services, Graduate School of Saitama Prefectural University, Saitama 343-8540, Japan; 2191002a@spu.ac.jp (K.O.); 2191001s@spu.ac.jp (Y.O.); 2291004n@spu.ac.jp (Y.M.); 2191003x@spu.ac.jp (T.K.)  
<sup>2</sup> Research Fellowship for Young Scientists, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo 102-0083, Japan  
<sup>3</sup> Department of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Saitama 343-8540, Japan; kokubun-takanori@spu.ac.jp (T.K.); murata-kenji@spu.ac.jp (K.M.)  
 \* Correspondence: kanemura-naohiko@spu.ac.jp; Tel.: +81-48-971-0500

**Abstract:** How various types of muscle contraction during exercises affect bone formation remains unclear. This study aimed to determine how exercises with different muscle contraction types affect bone morphology. In total, 20 mice were used and divided into four groups: Control, Level, Down Slow, and Down. Different types of muscle contraction were induced by changing the running angle of the treadmill. After the intervention, micro-computed tomography (Micro-CT), tartrate-resistant acid phosphatase/alkaline phosphatase (ALP) staining, and immunohistochemical staining were used to analyze the humerus head, tendon-to-bone attachment, and humerus diaphyseal region. Micro-CT found that the volume ratio of the humeral head, the volume of the tendon-to-bone attachment region, and the area of the humeral diaphyseal region increased in the Down group. However, no difference was detected in bone morphology between the Level and Down Slow groups. In addition, histology showed activation of ALP in the subarticular subchondral region in the Down Slow and Down groups and the fibrocartilage region in the tendon-to-bone attachment. Moreover, Osterix increased predominantly in the Down Slow and Down groups. Overall bone morphological changes in the humerus occur only when overuse is added to EC-dominant activity. Furthermore, different type of muscle contractile activities might promote bone formation in a site-specific manner.

**Keywords:** exercise; muscle contraction; bone; tendon-to-bone attachment



**Citation:** Ozone, K.; Oka, Y.; Minegishi, Y.; Kano, T.; Kokubun, T.; Murata, K.; Kanemura, N. Effect of Various Types of Muscle Contraction with Different Running Conditions on Mouse Humerus Morphology. *Life* **2021**, *11*, 284. <https://doi.org/10.3390/life11040284>

Academic Editors: Hugues Portier and Stéphane Pallu

Received: 20 February 2021

Accepted: 24 March 2021

Published: 27 March 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/>).

### 1. Introduction

Bones play a very important role in the musculoskeletal system because they function as a lever for muscle contraction and promotion of joint movement. Exercises induce a beneficial increase in bone density during tissue maturation in growing children [1] and contribute to protection from age-related bone diseases, such as osteopenia and osteoporosis [2]. Sports activities promote bone formation, and the dominant hand humerus of a tennis player may have a larger bone circumference than the non-dominant humerus [3]. Bones cause hyperplasia when excessive mechanical stress is applied. Many in vivo animal models of various movement types, such as running, jumping, free-fall landing, and swimming, have been developed to identify the modes of movement that cause optimal bone formation [4–7]. For example, studies using treadmills found that bone formation was promoted in the group that performed flatland running [8,9].

Mechanical stress is constantly generated during exercises, and the amount of exercise is an important factor that determines the increase or decrease of mechanical stress. In the studies using the treadmill, running speed and its frequency have been often analyzed. However, it should be noted that the muscle contraction type is one of the factors that affect mechanical stress during exercises. There are roughly three types of muscle contraction,

i.e., Concentric Contraction (CC), Isometric Contraction (IC), and Eccentric Contraction (EC), and CC or EC always occurs during exercise. It is known that CC has a small amount of mechanical stress because the directions of joint movement and muscle contraction are the same, while EC has a large amount of mechanical stress because the directions of joint movement and muscle contraction are opposite [10]. Therefore, when verifying the effect of mechanical stress due to exercise, it is necessary to consider not only the amount of activity but also the muscle contraction type. One clinical study found that EC-dominated training increased bone mineral density levels [11], and another study using small animals also demonstrated that an EC-dominant mode of exercise promoted femoral bone formation [12]. However, these studies did not use active exercises, and they focused only on the lower limbs in quadrupeds but not on the upper limbs, which are load joints. Moreover, very few studies have investigated the effects of changes in muscle contraction type during movement on bone-related disorders. Notably, recent evidence suggests that bone-related disorders, such as Osgood-Schlatter disease, can be caused by the misuse of the body during performance [13]. This misuse may reflect changes in muscle contraction types. Therefore, clarifying the effect of stress on bone formation based on different muscle contraction types may help elucidate the onset mechanism of sports disorders.

The purpose of this study was to examine how various types of muscle contraction associated with different running conditions affect mouse humerus morphology using microcomputer tomography (Micro-CT) and histological analysis. Because bone growth is not reflected in mature individuals, we decided to use growing mice in this study.

## 2. Materials and Methods

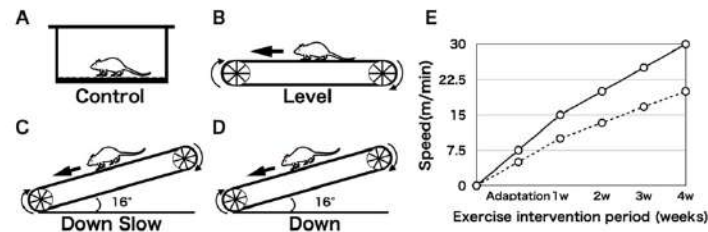
According to the exercise conditions that have already been established, mice were subjected to exercises that change the muscle contraction types. The following sections detail the experimental design and materials and methods.

Regarding this research, 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: 2019-3).

### 2.1. Experimental Design and Exercise Intervention Protocol

Twenty male Slc:ICR mice aged 3 weeks were purchased from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). After a 1-week adaptation period, a 4-week exercise intervention was performed. All mice were individually housed in plastic cages at  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a 12-h light/dark cycle. A small treadmill was used for the exercise intervention, and the mice were assigned to four groups: Control (non-running; Figure 1A) group, Level (level land running (fast speed); Figure 1B) group, Down Slow (downhill running (slow speed); Figure 1C) group, and Down (downhill running (fast speed); Figure 1D) group. Based on a previous study [14], we changed the muscle contraction type using the inclination angle of the treadmill (downhill running imitates EC of the target muscle, and level land running imitates a mixture of CC and EC of the target muscle). The shoulder joint was the target joint, and we analyzed the humeral head, supraspinatus tendon-to-bone attachment region, and humeral diaphyseal region. As EC produces approximately 1.2–2 times more joint torque and force than CC and IC, the load in the Down Slow group increases when the exercise is performed at the same speed as that in the Level group [15,16]. The running speed was adjusted for the Level and Down groups so that it was 1.5 times faster than that in the Down Slow group (Figure 1E). The exercise intervention lasted for 1 h per day and 5 days per week for 4 weeks.





**Figure 1.** Grouping and exercise intervention protocol. (A) Control group: free movement in the cage, non-running intervention. (B) Level group: running on the level land and fast speed running intervention. (C) Down Slow group: running downhill and slow running speed intervention. The predominance of eccentric contraction (EC) during running exercise increases. (D) Down group: running downhill with the same intervention speed as that in the Level group. The predominance of EC during running exercise increases. (E) Temporal changes in exercise intervention speed. The solid line shows changes in exercise velocity in the Level and Down groups. The dotted line shows changes in exercise velocity in the Down Slow group. Considering exercise intensity, the Level and Down groups were subjected to interventions at a rate 1.5 times faster than that in the Down Slow group.

## 2.2. Specimen Collection

Immediately after all exercise interventions were completed, the body mass of the mice was measured (Table 1). The animals were then euthanized by professional cervical dislocation under deep anesthesia with 2–4% isoflurane. To confirm the effect of exercise on the target muscle, the left supraspinatus muscle was peeled off from the scapula, and the wet muscle mass of the entire supraspinatus muscle was measured (Table 1). The left humerus and right shoulder joint were collected for bone morphological and histological analyses.

**Table 1.** Overall Body Mass and Wet Mass of the Supraspinatus Muscle.

Group	Body Mass (g)	Muscle Wet Mass (mg)	Normalized Value (mg/g)
Control	35.4 ± 1.02	46.0 ± 4.90	1.30 ± 0.12
Level	35.6 ± 1.02	50.0 ± 6.32	1.40 ± 0.17
Down Slow	36.8 ± 0.75	62.0 ± 4.00 <sup>*‡</sup>	1.68 ± 0.08 <sup>*‡</sup>
Down	37.4 ± 1.02 <sup>†</sup>	64.0 ± 4.90 <sup>†§</sup>	1.70 ± 0.09 <sup>†§</sup>

Data are shown as mean ± SD. <sup>\*</sup> Control vs. Down Slow group,  $p < 0.05$ . <sup>†</sup> Control vs. Down group,  $p < 0.05$ . <sup>‡</sup> Level vs. Down Slow group,  $p < 0.05$ . <sup>§</sup> Level vs. Down group;  $p < 0.05$ .

## 2.3. Bone Morphological Analysis

The collected left humerus was washed with physiological saline and fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h. Micro-CT (Sky scan 1272, BRUKER, MA, USA) scan was subsequently performed ( $n = 5/\text{group}$ ). The measurement condition of X-ray, detector resolution, pixel size, and rotation angle pitch were 60 kV/165  $\mu\text{A}$ , 2452 × 1640, 5  $\mu\text{m}$ , and 0.5°/sec, respectively. Subsequently, using a dedicated visualization application (CTvox; BRUKER, MA, USA), the measured data were converted into three-dimensional data and analyzed in each group; subsequent analysis was performed using an analysis application (CT Analyzer; BRUKER, MA, USA).

Humeral head regions were distinguished from the perfect cartilage tissue based on a certain threshold (bone: 60–200). The threshold was not changed between individuals. The cancellous bone region above the growth plate (excluding the growth plate) was used as the analysis region. The region of interest (ROI) was set using a free pen to include the entire humeral head in the sagittal section image, and the following analysis items were calculated: bone volume ratio (BV/TV), trabecular number (Tb.N), trabecular

thickness (Tb.Th), and trabecular separation (Tb.Sp). In addition, for the analysis of the tendon-to-bone attachment region, which is the fibrocartilage region (including calcified fibrocartilage), the threshold was set at 60–100 to distinguish between complete cartilage and complete cortical bone. The ROI was set at the tendon-to-bone attachment region using a free pen on the sagittal section image. The range of the supraspinatus attachment (400  $\mu\text{m}$ ) was set as the analysis area, and its volume was calculated.

Next, for the analysis of the humeral diaphyseal region, the part 2 mm below the lower end of the surgical neck of the humerus was analyzed. Since the humeral diaphyseal region is the perfect cortical bone, the threshold was set at 100–200. The analysis items included the total cross-sectional area (Tt.Ar), cortical bone area (Ct.Ar), cortical bone area/total cross-sectional area (Ct.Ar/Tt.Ar), and cortical bone thickness (Ct.Th). The results of Ct.Th might differ depending on the analysis part. Therefore, the thickest part, the thinnest part, and the opposite side of the thickest area in the cortical bone circumference in the analysis section were used as measurement criteria, and the average value was calculated and compared.

#### 2.4. Histological Analysis

The collected right shoulder joint was fixed with 4% paraformaldehyde solution for 48 h. Subsequently, decalcification treatment was carried out with a 10% ethylenediaminetetraacetic acid solution over 2 weeks. After decalcification, the tissue was embedded in paraffin. A paraffin block was then prepared using a paraffin embedding block making device (Tissue Tech TEC™ Plus; Sakura Seiki Co., Ltd., Tokyo, Japan), and the block was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until section preparation. All tissues were sliced at 5  $\mu\text{m}$  thickness using a microtome REM-710 (Yamato Kohki Industrial Co., Saitama, Japan). After deparaffinization, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells and alkaline phosphatase (ALP) activation were evaluated with a TRAP/ALP staining kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan). After deparaffinization, the slice was washed with distilled water. Then, a mixture of tartaric acid solution, acid phosphatase substrate solution A, and acid phosphatase substrate solution B (ratio: 10:90:1) was reacted in a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  incubator for 30 min. Subsequently, the slice was washed again with distilled water and infiltrated with a 0.1 mol/L 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3 propanediol-hydrochloric acid solution for 10 min. It was then reacted with an alkaline phosphatase premix substrate solution for 90 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in an incubator. After washing again with distilled water, the slice was finally incubated with nuclear staining reagent for 5 s for counterstaining. Macroscopic observations were performed to analyze the histological images in the articular cartilage region and the tendon-to-bone attachment region.

In addition, immunohistochemical (IHC) staining was performed for the humeral head to label osteoblast differentiation marker Osterix (OSX) to evaluate the dynamics of osteoblasts. First, tissue sections were washed three times for 5 min with a PBS (pH, 7.4) solution. For the antigen activation treatment, a Proteinase K (Worthington Biochemical Co., NJ, USA)/distilled water solution (0.2 mg/mL) was added dropwise onto the sections and incubated for 15 min. After washing with PBS (three times for 5 min), endogenous peroxidase was inactivated by incubating the sections in 0.3% hydrogen peroxide/methanol solution for 30 min. After washing again with PBS (three times for 5 min), sections were blocked with 5% normal goat serum/PBS solution and were then incubated with anti-Osterix (OSX) rabbit polyclonal antibody (1:300 dilution, bs-1110R, Bioss, MA, USA) overnight at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The streptavidin-biotin-peroxidase complex technique was then performed at room temperature using an ABC kit (Vector Laboratories, CA, USA). After washing with PBS (three times for 5 min), sections for immunohistochemical analysis were stained using diaminobenzidine (Agilent Technologies, CA, USA), and counterstaining of the nuclei was performed with 25% Mayer's hematoxylin. Image analysis software Fiji [17] was used to analyze IHC-stained images. The analysis areas were the tendon-to-bone attachment subchondral bone region and the subchondral bone region of the articular surface, where a load is easily applied, and the area of positive cells per unit area was calculated.



### 2.5. Statistical Analysis

All analyses were performed using R version 3.4.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The Shapiro–Wilk test was used to determine the normality of distribution for each dataset, and normality was recognized in all analyses. One-way analysis of variance was performed after conducting the normality test. Tukey's honestly significant difference method was used for posthoc analysis. A  $p$ -value of  $< 0.05$  was considered significant. All results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## 3. Results

The comparison results of different groups that received exercise intervention are shown below. Bone morphological results were classified by the humerus head region and the humerus diaphyseal region. The histological analysis result is shown only for the humeral head region.

### 3.1. Body and Muscle Mass Comparison Results

The results of comparisons of body mass after all interventions, wet mass of the supraspinatus muscle, and wet mass of the muscle corrected by the body mass are shown in Table 1. Regarding body mass, a significant difference was detected only between the Control and Down groups ( $p < 0.05$ , Table 1). In addition, the supraspinatus muscle wet mass was significantly different between the Control and Down Slow groups, between the Control and Down groups, between the Level and Down Slow groups, and between the Level and Down groups ( $p < 0.05$ , Table 1). After normalizing the wet muscle mass by body mass and calculating the relative value, significant differences were still confirmed between the Control and Down Slow groups, between the Control and Down groups, between the Level and Down Slow groups, and between the Level and Down groups ( $p < 0.05$ , Table 1).

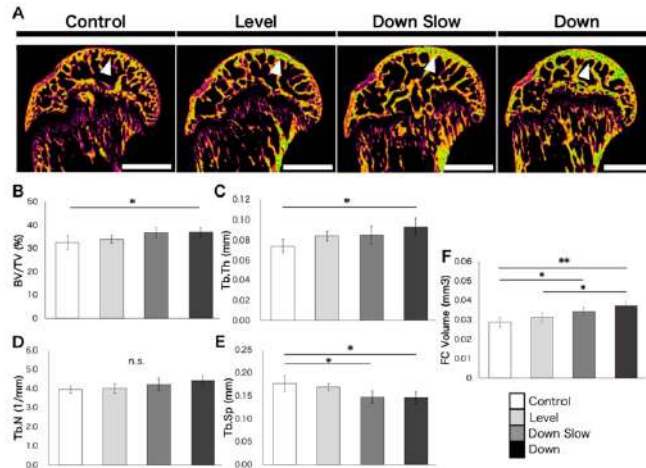
### 3.2. Bone Morphological Results

#### 3.2.1. Humeral Head and Tendon-to-Bone Attachment Regions

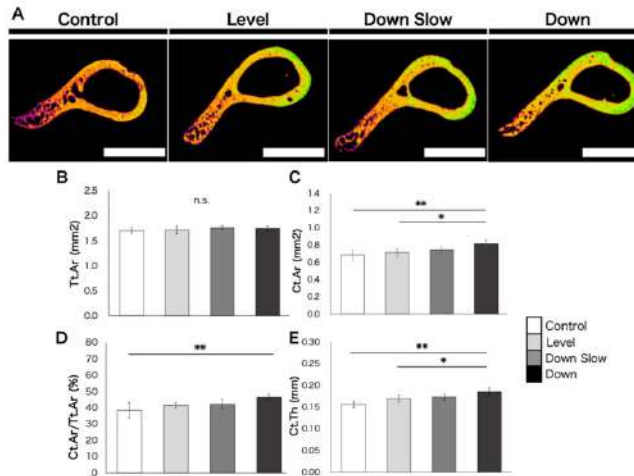
The humeral head region imaged by Micro-CT is shown in Figure 2A. Significant differences in BV/TV and Tb.Th were detected only between the Control and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 2B,C). No significant difference was found in Tb.N between all groups ( $p = 0.09$ , Figure 2D). Moreover, significant differences in Tb.Sp were found between the Control and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 2E) and between the Level and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 2E). The most significant difference in the FC volume of the supraspinatus tendon-to-bone attachment region was detected between the Control and Level groups ( $p < 0.01$ , Figure 2F), followed by differences between the Control and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 2F) and between the Level and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 2F). Macroscopic observation showed that the subchondral bone region on the humeral joint surface (white arrowhead) appeared to increase in all intervention groups compared to the Control group. There was also a difference in the subchondral bone region among the exercise groups; the Down Slow group showed an increasing tendency than the Level group, and the Down group showed an increasing tendency than the Down Slow group.

#### 3.2.2. Humeral Diaphyseal Region

The humeral diaphyseal region imaged by Micro-CT is shown in Figure 3A. Tt.Ar was not significantly different among all groups ( $p = 0.53$ , Figure 3B). However, significant differences in Ct.Ar were found between the Control and Down groups ( $p < 0.01$ , Figure 3C) and between the Level and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 3C). Therefore, a significant difference in Ct.Ar/Tt.Ar was observed only between the Control and Down groups ( $p < 0.01$ , Figure 3D). Furthermore, Ct.Th significantly differed between the Control and Down groups ( $p < 0.01$ , Figure 3E) and between the Level and Down groups ( $p < 0.05$ , Figure 3E).



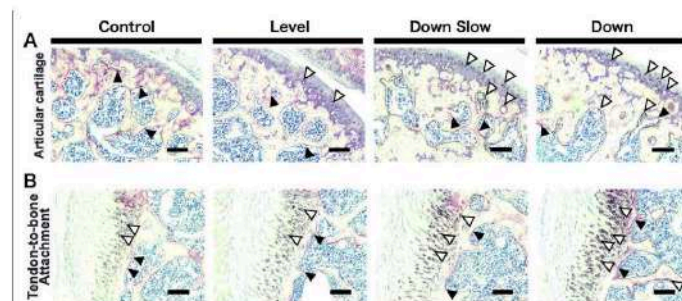
**Figure 2.** Bone morphological changes in the humeral head region. (A) Micro-CT image of the humeral head in each group. Scale bar, 1 mm. White arrowhead, the subchondral bone region on the humeral head joint surface. (B) Comparison results of the bone volume ratio (BV/TV) in the head of the humerus. (C) Comparison results of the trabecular thickness (Tb.Th) in the head of the humerus. (D) Comparison results of trabecular number (Tb.N) in the head of the humerus. (E) Comparison results of trabecular separation (Tb.Sp) in the head of the humerus. (F) Morphology comparison results in the supraspinatus tendon-to-bone attachment fibrocartilage (FC) region. (B–F) Data are shown as mean ± SD. \*,  $p < 0.05$ . \*\*,  $p < 0.01$ .



**Figure 3.** Bone morphological changes in the humeral diaphyseal region. (A) Micro-CT image of the humeral diaphyseal in each group. Scale bar, 1 mm. (B) Comparison results of the total cross-sectional area (Tt.Ar) in the humeral diaphyseal. (C) Comparison results of the cortical bone area (Ct.Ar) in the humeral diaphyseal. (D) Comparison results of the cortical bone area/total cross-sectional area (Ct.Ar/Tt.Ar) in the humeral diaphyseal. (E) Comparison results of cortical bone thickness (Ct.Th) in the humeral diaphyseal. (B–E) Data are shown as mean ± SD. \*,  $p < 0.05$ . \*\*,  $p < 0.01$ . n.s.,  $p > 0.05$ .

### 3.3. Histological Results in the Humeral Head Region

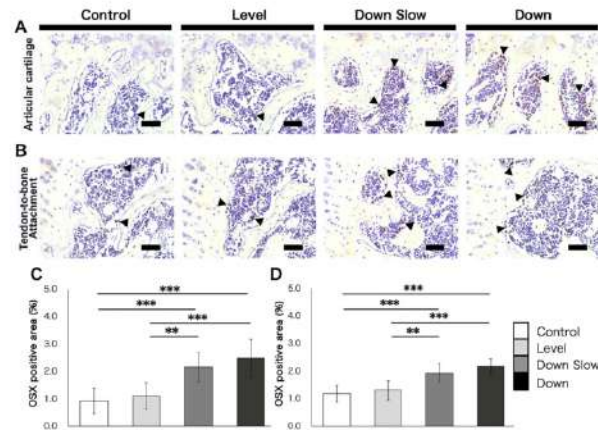
TRAP/ALP staining was performed for the humeral head, and macroscopic observation was conducted. In the articular cartilage region, TRAP-positive cells showed no changes in all groups. ALP active cells were almost not detected in the Control group but were observed in the articular cartilage region in the Level group. In the Down Slow and Down groups, ALP active cells were found not only in the articular cartilage region but also in the subchondral region, and the osteogenic reaction was also detected. Enlargement of the subchondral bone region was found as the osteogenic reaction increased (Figure 4A). In addition, similar to the observation results in the articular cartilage, in the tendon-to-bone attachment region, TRAP-positive cells showed no changes in all groups. ALP-active cells were almost not found in the subchondral bone region but were detected in the calcified fibrocartilage region of the tendon-to-bone attachment region. Although no changes in ALP activation were observed between the Control and Level groups, ALP was activated more in the Down Slow and Down groups than in the other groups (Figure 4B).



**Figure 4.** Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)/alkaline phosphatase (ALP) double staining and macroscopic observations in the humeral head region. **(A)** TRAP/ALP double stained images in the articular cartilage region. **(B)** TRAP/ALP double stained images in the tendon-to-bone attachment region. **(A,B)** Black arrowhead: TRAP-positive cells. White arrowhead: ALP active cells. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

OSX-labeled IHC staining was performed for the humerus head (Figure 5). The OSX-positive areas in the articular cartilage subchondral bone region were  $0.92\% \pm 0.47$  in the Control group,  $1.10\% \pm 0.49$  in the Level group,  $2.15\% \pm 0.54$  in the Down Slow group, and  $2.48\% \pm 0.69$  in the Down group (Figure 5A). Significant differences were observed between the Control and Down Slow groups ( $p < 0.001$ ; Figure 5C), the Control and Down groups ( $p < 0.001$ ; Figure 5C), the Level and Down Slow groups ( $p < 0.01$ ; Figure 5C), and the Level and Down groups ( $p < 0.001$ ; Figure 5C). The OSX-positive areas in the tendon-to-bone attachment subchondral bone region were  $1.17\% \pm 0.30$  in the Control group,  $1.30\% \pm 0.35$  in the Level group,  $1.93\% \pm 0.33$  in the Down Slow group, and  $2.15\% \pm 0.28$  in the Down group (Figure 5B). Significant differences were found between the Control and Down Slow groups ( $p < 0.001$ ; Figure 5D), the Control and Down groups ( $p < 0.001$ ; Figure 5D), the Level and Down Slow groups ( $p < 0.01$ ; Figure 5D), and the Level and Down groups ( $p < 0.001$ ; Figure 5D).





**Figure 5.** Immunohistochemical (IHC) staining of the humeral head region (OSX labeling). (A) IHC-stained images in the articular cartilage subchondral bone region. (B) IHC-stained images in the tendon-to-bone attachment subchondral bone region. (A,B) Black arrowhead: OSX-positive cells. Scale bar: 50  $\mu$ m. (C) Comparisons of the OSX positive area in the articular cartilage subchondral bone region. (D) Comparisons of the OSX positive area in the tendon-to-bone attachment subchondral bone region. (C,D) Data are shown as mean  $\pm$  SD. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

#### 4. Discussion

This study clarified the effects of different exercise-associated muscle contraction types on the humeral head and humeral diaphyseal of mice by bone morphological and histological analyses. Our hypothesis was that the effect of exercises on bone during growth depends on the type of muscle contraction during movement, and that significant changes occur regardless of the amount of exercises, especially in the EC-dominated group. However, the bone morphology analysis found that only the volume of the tendon-to-bone attachment region and Tb.Sp in the humeral head showed significant changes in the Down Slow and Down groups, and the Down Slow group did not show any specific changes in other items. In addition, histological analysis demonstrated site-specific changes in the loaded articular cartilage subchondral bone region, and OSX, a marker of osteoblast differentiation, was confirmed at similar sites. Interestingly, there were no major changes between the control and level groups.

In this study, total travel distances during the intervention period were about 27 km in the Level and Down groups and about 18 km in the Down Slow group. The average running speeds were 22.5 m/min in the Level and Down groups and 15 m/min in the Down Slow group. Although the average intensity was moderate, the speed gradually increased with age; the exercise intensity was limited to the extent so that no mice dropped out after one hour of running (maximum 30 m/min at eight weeks of age). In addition, although the running speed differed between the Level and Down Slow groups, the exercise intensity was almost the same considering the effect of torque [15,16]. Therefore, if there are significant differences between these groups, the muscle contraction type might have an effect.

In the overall humeral head, the number of trabecular bones in the subchondral bone region was not affected in the Down group compared with the other groups, and the expansion of trabecular thickness and the narrowing of the trabecular space were promoted in the Down group, thereby leading to an increased bone volume ratio. A characteristic change was observed in the subchondral bone region just below the articular surface, which is predicted to be loaded, and this region was thickened in the Down Slow and Down groups compared with the Level group. Another characteristic change

was found in the tendon-to-bone attachment region, which significantly increased in the Down Slow and Down groups compared with the Control group and significantly differed between the Down and Level groups. The same tendency was obtained from histological observations; in the Down Slow and Down groups, an increase in ALP active cartilage cells and a positive osteogenic reaction in the subchondral bone region (localized to the articular cartilage region under load) were confirmed, and the number of OSX-positive cells, which are markers of differentiation into osteoblasts, increased. The width of the subchondral bone also increased in the Down Slow and Down groups compared to the Control and Level groups. ALP activity is positive not only in cartilage calcification but also in mature osteoblasts [18], and OSX is positive when preosteoblasts differentiate into mature osteoblasts [19]. These findings may indicate that osteoblasts increased in the subchondral bone region, and bone formation was promoted. In addition, ALP activation tended to increase in the fibrocartilage area of the tendon-to-bone attachment region in the Down Slow and the Down groups, indicating that the calcification reaction in the fibrocartilage area is promoted; this finding is similar to the volume result of the tendon-to-bone attachment region in the bone morphological analysis. Promotion of calcification reaction in the fibrocartilage area may have been caused by an increase in OSX in the subchondral bone region. In fact, past studies have also confirmed overexpression of OSX in the subchondral bone region of tendon-to-bone attachment when the tendon-to-bone attachment region causes pathological ossification [20]. Furthermore, in the diaphyseal region, Ct.Ar/Tt.Ar showed a significant increase in the Down group compared to the Control group. In detail, although no significant difference was confirmed in Tt.Ar in all groups, Ct.Ar and Ct.Th were significantly increased in the Down group compared with the Control and Level groups. In other words, the cortical bone area and width increased in the total cross-sectional area of the bone in the Down group. Despite no significant difference, the change in the Down Slow group showed the same tendency as that in the Down group.

The forelimbs of quadrupeds are load-bearing joints; when traveling downhill, ground reaction force (GRF) of the forelimbs increases, and the forelimbs account for approximately 84% of the total braking impulse during downhill running [21]. When the amount of mechanical stress applied to bone increases, a pressure electric potential is generated on the bone surface, and cytokines involved in bone remodeling are secreted from a complex composed of osteoblasts and bone cells. At the same time, increased blood flow in the bone directly and jointly promotes osteoblast activation and bone formation [22,23]. Although the blood flow in the bone did not be determined in this study, it was confirmed that changes in osteoblasts were significantly increased in the Down Slow and Down groups. Thus, it is highly possible that the same phenomenon occurred. Moreover, it has also been demonstrated that simply increasing the amount of exercise load changes the thickness of the subchondral bone. For example, Murray et al. showed that high-intensity exercise in horses resulted in increased subchondral bone thickness, enhanced bone modeling, and decreased bone resorption at high-load sites [24]. In addition, the same result was found in an experiment that imitated high-intensity exercise by running downhill [25]. It is known that the cortical bone in the normal bone stem becomes thicker with growth, and the thickness of the cortical bone adapts to the stress and increases when stress in the long axis direction is applied. Therefore, bone formation is promoted after exercises, such as jumping exercises, in which pressure stimulation increases [26,27]. Based on our present findings, the Down group, which had high-intensity exercise conditions, showed a significant change in bone morphology compared to the other groups. Therefore, it is possible that bone morphology in the Down group changed significantly due to increases in longitudinal mechanical stress and accompanied GRF and excessive exercise conditions that promoted the activation of osteoblasts and osteocytes.

This study set such conditions that EC, which shows a muscle hypertrophy effect by carrying out downhill running, became dominant [28]. The wet mass of the muscle corrected by the body mass increased significantly in the Down Slow and Down groups



compared to the other groups, indicating that the muscles have become hypertrophied. It is known that exercise in EC causes muscle hypertrophy, and the tension exerted to the bone increases as the muscles become hypertrophied [29]. Since there was a significant difference between the Level and Down slow groups in which the exercise intensity was adjusted, it is possible that the tension applied to the bone was higher in the Down slow group than in the Level group even with low-load EC exercise. In fact, many studies have shown that muscle volume affects bone formation, and reducing mechanical stress through hind limb suspension and paralysis promotes muscle volume and bone atrophy. Conversely, bone hyperplasia occurs by increasing muscle volume using a model lacking myostatin [30–32]. Similarly, the mechanical stress associated with muscle contraction is essential for formation of tendon-bone attachment regions and promotion of mineralization, and they are not normally formed when the mechanical stress is attenuated in conditions, such as paralysis [33,34]. Taken together, increased mechanical stress due to different running conditions and contraction types can lead to hypertrophy of the target muscle, thereby promoting humerus bone formation and increased volume of tendon-to-bone attachment regions.

Unfortunately, the results of this study did not completely support our initial hypothesis. No bone morphological changes were observed between the Level and Down Slow groups, although they showed muscle hypertrophy. Therefore, we can not conclude from this study that changes in muscle contraction type affect bone morphology regardless of the amount of exercise. However, when observed by site, the subchondral bone region tended to expand in the region where the load was likely to be applied, and it was confirmed that the ALP activity and expression of Osterix (a marker of osteoblast differentiation) increased. Similar results were obtained in the tendon-bone attachment region, suggesting that molecular fluctuations might occur in a site-specific manner, although there is no morphological change.

In this study, we confirmed changes in the humerus due to changes in the muscle contraction type. This study suggests that the tendon-to-bone attachment region may change in a muscle contraction type-specific manner; this is a very valuable clinical result. Osgood-Schlatter and Sever diseases are disorders of the tendon-to-bone attachment region and have been recognized to be caused by muscle overuse, especially in young sports activists [35]. In recent years, clinical studies have demonstrated that misuse of the body during movement may be involved in the onset of Osgood-Schlatter and Sever diseases, but basic research has not reported any related evidence. In this study, bone morphological changes occurred, in addition to ALP activity and OSX expression, which promote bone formation, in the group (Down) that was overused and mimicked EC. However, the volume of the fibrocartilage region increased slightly, and the OSX expression and ALP activity were significantly increased even in the group with low amount exercise and imitating EC (Down Slow) compared to the other groups. Therefore, the morphological change of the tendon-to-bone attachment region may be due to the change of the muscle contraction type rather than overuse. In the future, focusing on changes in the tendon-to-bone attachment region and clarifying the relationship between muscle contraction type and bone formation in more detail may help elucidate the pathogenic mechanism of sports disorders.

This study has some limitations. First, this study focused on bone morphological analysis and histological analysis, and we did not determine whether increased mechanical stress leads to molecular and gene changes. In addition, although the muscle mass was measured, the amount of mechanical stress actually applied was unknown because the muscle tension test could not be performed. Furthermore, we could not determine whether the bone morphological changes are functionally strong. Therefore, future studies are needed to further clarify the relationship between muscle contraction types and bone formation by muscle tension test, molecular biological analysis, and dynamic bone formation measurement. To our knowledge, very few studies have determined the association between muscle contraction types and bone formation during exercise. Particularly, changes in the

tendon-to-bone attachment region have not been analyzed to date. This study provides additional data on the mechanisms underlying exercise-associated bone changes.

## 5. Conclusions

This study found that when EC was induced by running downhill, muscle mass tended to increase. In addition, we observed bone morphology changes in the head of humerus, tendon-to-bone attachment region, and diaphyseal region of the humerus and an increase in osteoblasts. However, when a mixture of EC and CC was induced in the Level group, no change was shown. Furthermore, EC-dominated slow movement (Down Slow) tended to increase muscle mass and osteoblasts but did not change bone morphology. Our findings demonstrate that overall bone morphological changes in the humerus occur only when overuse is added to EC-dominant activity, and EC activity might promote bone formation in a site-specific manner, even at a low load.

**Author Contributions:** Conceptualization: K.O. and N.K.; methodology: K.O., Y.O., Y.M., T.K. (Takuma Kano), T.K. (Takanori Kokubun), and K.M.; validation: K.O.; formal analysis: K.O.; investigation: K.O.; writing—original draft preparation: K.O.; writing—review and editing: N.K.; visualization: K.O.; supervision: N.K.; project administration: N.K.; funding acquisition: K.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was partially funded by the Sasakawa Scientific Research Grant from The Japan Science Society (Grant number: 2019-6004).

**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: 2019-3).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to acknowledge the members of the Fundamental Science lab, Saitama Prefectural University, for their assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Lindén, C.; Alwis, G.; Ahlborg, H.; Gardsell, P.; Valdimarsson, O.; Stenevi-Lundgren, S.; Besjakov, J.; Karlsson, M.K. Exercise, bone mass and bone size in prepubertal boys: One-year data from the pediatric osteoporosis prevention study. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2007**, *17*, 340–347. [\[CrossRef\]](#)
- Peng, Z.; Tuukkanen, J.; Väänänen, K.H. Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res.* **1994**, *9*, 1559–1564. [\[CrossRef\]](#)
- Jones, H.; Priest, J.; Hayes, W.; Tichenor, C.C.; Nagel, D. Humeral hypertrophy in response to exercise. *J. Bone Jt. Surg.* **1977**, *59*, 204–208. [\[CrossRef\]](#)
- Yeh, J.K.; Aloia, J.F.; Chen, M.M.; Tierney, J.M.; Sprintz, S. Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. *J. Bone Miner. Res.* **1993**, *8*, 1117–1125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Umemura, Y.; Ishiko, T.; Yamauchi, T.; Kurono, M.; Mashiko, S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12*, 1480–1485. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Welch, J.M.; Weaver, C.M.; Turner, C.H. Adaptations to free-fall impact are different in the shafts and bone ends of rat forelimbs. *J. Appl. Physiol.* **2004**, *97*, 1859–1865. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Simkin, A.; Leichter, I.; Swissa, A.; Samueloff, S. The effect of swimming activity on bone architecture in growing rats. *J. Biomech.* **1989**, *22*, 845–850. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, X.; Aoki, H.; Fukui, Y. Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. *Biomed. Mater. Eng.* **2004**, *14*, 53–59. [\[PubMed\]](#)
- Hagihara, Y.; Nakajima, A.; Fukuda, S.; Goto, S.; Iida, H.; Yamazaki, M. Running exercise for short duration increases bone mineral density of loaded long bones in young growing rats. *Tohoku J. Exp. Med.* **2009**, *219*, 139–143. [\[CrossRef\]](#)
- Hody, S.; Croisier, J.L.; Bury, T.; Rogister, B.; Leprieux, P. Eccentric muscle contractions: Risks and benefits. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 536. [\[CrossRef\]](#)
- Hawkins, S.A.; Schroeder, E.T.; Wiswell, R.A.; Jaque, S.V.; Marcell, T.J.; Costa, K. Eccentric muscle action increases site-specific osteogenic response. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1999**, *31*, 1287–1292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



12. Hamann, N.; Kohler, T.; Müller, R.; Brüggemann, G.P.; Niehoff, A. The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcif. Tissue Int.* **2012**, *90*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Watanabe, H.; Fujii, M.; Yoshimoto, M.; Abe, H.; Toda, N.; Higashiyama, R.; Takahira, N. Pathogenic Factors Associated With Osgood-Schlatter Disease in Adolescent Male Soccer Players: A Prospective Cohort Study. *Orthop. J. Sports Med.* **2018**, *6*, 2325967118792192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Armstrong, R.B.; Ogilvie, R.W.; Schwane, J.A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **1983**, *54*, 80–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Franchi, M.V.; Reeves, N.D.; Narici, M.V. Skeletal muscle remodeling in response to eccentric vs. concentric loading: Morphological, molecular, and metabolic adaptations. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 447. [[CrossRef](#)]
16. Gravel, D.; Bélanger, A.Y.; Richards, C.L. Study of human muscle contraction using electrically evoked twitch responses during passive shortening and lengthening movements. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **1987**, *56*, 623–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]
18. Sugawara, Y.; Suzuki, K.; Koshikawa, M.; Ando, M.; Iida, J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, *88*, 262–269. [[CrossRef](#)]
19. Zhang, C.; Tang, W.; Li, Y.; Yang, F.; Dowd, D.R.; MacDonald, P.N. Osteoblast-specific transcription factor Osterix increases vitamin D receptor gene expression in osteoblasts. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26504. [[CrossRef](#)]
20. Wang, X.; Xie, L.; Crane, J.; Zhen, G.; Li, F.; Yang, P.; Gao, M.; Deng, R.; Wang, Y.; Jia, X.; et al. Aberrant TGF- $\beta$  activation in bone tendon insertion induces enthesopathy-like disease. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 846–860. [[CrossRef](#)]
21. Lee, D.V. Effects of grade and mass distribution on the mechanics of trotting in dogs. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 402–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Frost, H.M. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *Anat. Rec.* **1987**, *219*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Marenzana, M.; Amett, T.R. The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Res.* **2013**, *1*, 203–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Murray, R.C.; Vedi, S.; Birch, H.L.; Lakhani, K.H.; Goodship, A.E. Subchondral bone thickness, hardness and remodelling are influenced by short-term exercise in a site-specific manner. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*, 1035–1042. [[CrossRef](#)]
25. Li, Z.; Liu, S.Y.; Xu, L.; Xu, S.Y.; Ni, G.X. Effects of treadmill running with different intensity on rat subchondral bone. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10. [[CrossRef](#)]
26. Vlachopoulos, D.; Barker, A.R.; Ubago-Guisado, E.; Williams, C.A.; Gracia-Marco, L. The effect of a high-impact jumping intervention on bone mass, bone stiffness and fitness parameters in adolescent athletes. *Arch. Osteoporos.* **2018**, *13*, 128. [[CrossRef](#)]
27. Ju, Y.L.; Sone, T.; Ohnaru, K.; Choi, H.J.; Fukunaga, M. Differential effects of jump versus running exercise on trabecular architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *112*, 766–772. [[CrossRef](#)]
28. Soslowsky, L.J.; Thomopoulos, S.; Tun, S.; Flanagan, C.L.; Keefer, C.C.; Mastaw, J.; Carpenter, J.E. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J. Shoulder Elb. Surg.* **2000**, *9*, 79–84. [[CrossRef](#)]
29. Tsumiyama, W.; Oki, S.; Takamiya, N.; Umei, N.; Shimizu, M.E.; Ono, T.; Otsuka, A. Induction of muscle hypertrophy in rats through low intensity eccentric contraction. *J. Phys. Ther. Sci.* **2014**, *26*, 1623–1625. [[CrossRef](#)]
30. Nagaraja, M.P.; Risin, D. The current state of bone loss research: Data from spaceflight and microgravity simulators. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 1001–1008. [[CrossRef](#)]
31. Wamers, S.E.; Sanford, D.A.; Beckera, B.A.; Bainb, S.D.; Srinivasana, S.; Grossa, T.S. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* **2006**, *38*, 257–264. [[CrossRef](#)]
32. Elkasrawy, M.N.; Hamrick, M.W. Myostatin (GDF-8) as a Key Factor Linking Muscle Mass and Skeletal Form. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2010**, *10*, 56–63.
33. Thomopoulos, S.; Kim, H.-M.; Rothermich, S.Y.; Biederstadt, C.; Das, R.; Galatz, L.M. Decreased Muscle Loading Delays Maturation of the Tendon Enthesis during Postnatal Development. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 1154–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Schwartz, A.G.; Lipner, J.H.; Pasteris, J.D.; Genin, G.M.; Thomopoulos, S. Muscle loading is necessary for the formation of a functional tendon entheses. *Bone* **2013**, *55*, 44–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Launay, F. Sports-related overuse injuries in children. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **2015**, *101*, S139–S147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]