

膝前十字靱帯の治癒メカニズムの解明
～膝関節内組織は治癒に貢献し得るのか～

埼玉県立大学大学院
保健医療福祉学研究科
博士論文

2023年3月

保険医療福祉学研究科 学籍番号 2191003

加納拓馬

目次

<u>1</u>	<u>発表論文・関連学会一覧</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>略語一覧</u>	<u>2</u>
<u>3</u>	<u>緒言</u>	<u>3</u>
3.1	ACL 損傷の疫学	3
3.2	臨床での ACL 損傷に対する治療法.....	3
3.3	ACL の自己治癒能と保存療法の適応基準	5
3.4	完全損傷 ACL の治癒メカニズム	6
<u>4</u>	<u>研究 1：完全損傷 ACL の断端部架橋結合に、膝関節内組織は関与するか</u> 9	
4.1	研究目的および仮説	9
4.2	方法.....	9
4.2.1	倫理的配慮.....	9
4.2.2	研究デザイン	9
4.2.3	モデル作成方法.....	10
4.2.4	組織学的解析	11
4.2.5	分子生物学的解析	13
4.2.6	MCT 解析.....	14
4.2.7	統計解析	15
4.3	結果.....	15
4.3.1	組織学解析結果.....	15

4.3.2	分子生物学解析結果.....	16
4.3.3	MCT 結果.....	19
4.4	考察.....	34
4.4.1	研究限界.....	36
5	<u>研究 2 : NF-KB 阻害による完全損傷 ACL 自己治癒能の影響.....</u>	38
5.1	<u>背景と目的.....</u>	38
5.2	<u>方法.....</u>	38
5.2.1	倫理的配慮.....	38
5.2.2	研究デザイン.....	38
5.2.3	モデル作成方法.....	39
5.2.4	分子生物学的解析.....	39
5.2.5	組織学的解析.....	40
5.2.6	生体力学的解析.....	41
5.2.7	統計解析.....	42
5.3	<u>結果.....</u>	42
5.3.1	分子生物学解析結果.....	42
5.3.2	組織学解析結果.....	43
5.3.3	生体力学解析結果.....	43
5.4	考察.....	54
5.4.1	研究限界.....	57

6	研究3：脂肪幹細胞由来エクソソームは、完全損傷 ACL の自己治癒能を促進しうるか	58
6.1	研究目的および仮説	58
6.2	方法	58
6.2.1	倫理的配慮	58
6.2.2	研究デザイン	59
6.2.3	モデル作成方法	59
6.2.4	組織学的解析	59
6.2.5	生体力学的解析	60
6.2.6	統計解析	60
6.3	結果	61
6.3.1	組織学解析結果	61
6.3.2	生体力学解析結果	61
6.4	考察	70
6.4.1	研究限界	72
7	総括	73
8	謝辞	75
9	引用文献	76

10 発表論文..... 103



1 発表論文・関連学会一覧

発表論文

- 1) Influence of the site of injury on the spontaneous healing response in a rat model of total rupture of the anterior cruciate ligament, Takuma Kano et al. *Connective Tissue Res.*1;11(4): 303.2021. doi : 10.1080/03008207.2021.1889529.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33588658/>

発表関連学会

- 1) 前十字靭帯損傷後のマクロファージ極性変化が自己治癒力に及ぼす影響. 加納拓馬, 村田健児, 岡優一郎, 小曾根海知, 峯岸雄基, 川端空, 森下佑里, 金村尚彦. 第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2022 年 3 月 (オンライン).
- 2) 前十字靭帯損傷後 12 時間以内に治癒応答は活性化する. 加納拓馬, 峯岸雄基, 森下佑里, 村田健児, 岡優一郎, 小曾根海知, 川端空, 小島拓真, 寺田秀伸, 高須千晴, 金村尚彦. 第 10 回日本運動器理学療法学会学術大会. 2022 年 9 月 (オンライン)

2 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）．

ACL	Anterior cruciate ligament
CAM	Controlled Abnormal Joint Movement
ACLT	Anterior Cruciate Ligament Transection
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
HE	Hematoxylin-Eosin
IHC	Immunohistochemistry
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HIF	Hypoxia-inducible factor
SMA	α -smooth muscle actin
PBS	Phosphate buffered saline
ABC	Avidin - Biotinylated enzyme Complex
PCR	Polymerase Chain Reaction
TNFR	Tumor Necrosis Factor
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
Il1r1	Interleukin 1 Receptor Type 1
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
MSC	Mensenchymal stem cell

3 緒言

3.1 ACL 損傷の疫学

膝前十字靭帯 (Anterior Cruciate Ligament : ACL) は、膝関節の内在性靭帯の一種であり、大腿骨に対する脛骨の前方剪断力・回旋運動を制御することで正常な膝関節運動に貢献する¹⁶⁾。ACL 損傷は米国で年間 40 万件以上発生する下肢関節外傷の一つであり²⁻⁴⁾、痛み・関節不安定性・膝崩れなどの症状により日常生活動作を制限する。従来 ACL 損傷は若年アスリートに頻発するスポーツ障害であったが、近年では中高年世代の健康運動志向の高まりから中年以降の世代での損傷率が増加し^{2,5)}、治療法に対して多様な選択肢が求められている。

3.2 臨床での ACL 損傷に対する治療法

臨床場面における ACL 損傷は、1837 年に Adams R によって初めて報告され、後に Bonnet A, Stark J によって保存療法が試みられたが、損傷 ACL の自己治癒は得られなかった⁶⁾。それから約 200 年経過した現在においても、標準治療として自家腓移植による外科的再建術が用いられているが、今日に至るまで ACL 損傷後療法について様々な治療法が考案されてきた。

ACL 損傷後の観血的療法について、古くは 1895 年に A.W.Mayo Robson らが、損傷 ACL の 2 つの断端を縫合する一次修復術を報告し、良好な術後成績が得られ、その後も同様の報告が続いた⁶⁾。しかし 1966 年に O'Donoghue らが、犬を対象に一次修復術を行い、術後 4 週時点における靭帯強度が正常靭帯のわずか 10% 程度であることを報告した⁷⁾。さらに Feagin らは一次修復術を受けた患者の追跡研究で、術後 5 年経過時点で大多数の患者において関節不安定感・痛みを認めたと報告したことから⁸⁾、一次修復術を用いる治療の妥当性に対して懐疑

的な目が向けられるようになった。ACL 再建術についての初めての報告は、1917 年 Ernest W, Hey Groves らによって、腸脛靭帯を用いた自家腱移植が報告された⁹⁾。その後、1935 年には Campbell らにより大腿骨・脛骨へ骨孔を作成し膝蓋腱を用いた手法、1970 年代には非解剖学的再建法が流行し、1980 年代に入ると関節内 ACL 再建法が第一線で用いられた⁹⁾。現在では ACL の解剖学的走行を基に大腿骨・脛骨に骨孔を作成し、ハムストリングス・膝蓋腱を用いる手法が用いられており、ACL 損傷に対する標準治療に位置づけられている⁹⁾。しかし、再建靭帯強度の脆弱性によって再断裂例が多いことや、二次的な変形性膝関節症の発症率が高いこと等の問題点も残存している。そのため最近では、従来の ACL 再建術に再生医療技術をハイブリットした **Bridge-Enhanced ACL Repair** 法が考案され、良好な治療成績を納めたと報告されている¹⁰⁾。

ACL 損傷後の保存療法は、観血的治療法と比較して関節内組織の損傷・変性リスク、関節不安定感が高いとされている⁶⁾。また保存治療の目的は、膝関節不安定性の機能回復を主目的¹⁰⁾としており、ACL の自己治癒を目的としていない。一方で、臨床研究では完全損傷 ACL 患者が、保存療法にて自己治癒したとする報告も散見される。Costa-Pas ら¹¹⁾、Nawabi ら¹²⁾、Napoli ら¹³⁾、Malanga ら¹⁴⁾は、ACL 完全損傷者に対し特別な装具療法・リハビリテーションを処方せず、偶発的に自己治癒が得られたと報告した。Fujimoto ら¹⁵⁾、Kurosaka ら¹⁶⁾、Ihara ら¹⁷⁾は、共通して装具療法を用いることで完全損傷 ACL の自己治癒が得られたと報告した。これら装具療法を用いた報告において、Ihara らは、装具を用いる重要性や装具に求められる機能について「ACL 損傷に起因する関節の不安定さを制御することや、生理的なメカニカルスト

レスにより膝関節に対して力学情報を付加することが重要である」と述べている。実際、Ihara らが作成した Kyuro 装具は、コイルスプリングハウジングを利用して軟部組織を把持しているため、関節運動に伴う軟部組織の形状変化に対して適応するため、膝関節の動的制動能力が高い^{17,18)}。しかし、臨床治療成績が安定しないことや適応基準が不明瞭な点など課題も多く、現在でも普及していないのが現状である。

3.3 ACL の自己治癒能と保存療法の適応基準

1966 年に O'Donoghue らが、犬を対象に保存的治療法を試みたが、完全断裂では ACL は治癒しないことを明らかにした⁷⁾。このような背景から、ACL 損傷に対する観血的治療法の発展に関わる研究が推進された。一方で、“なぜ ACL は自己治癒しないのか？”という課題に ACL 研究のフォーカスは当てられ、これまでに多くの研究者が、ACL が治癒しない原因について調査している。その原因としてコラゲナーゼ活性¹⁹⁾、損傷後の血液供給の不足²⁰⁾、分子生物学的応答^{21,22)}など多くの関節包内因子が報告された。また近年になり、Murray らは²³⁾、損傷 ACL の断端が滑液中に浮遊することで、血餅が洗流され安定しないことを指摘した。すなわち、ACL が存在する”関節包内ではあるが、滑膜に覆われるため滑膜外である”という特殊な環境が、治癒するための足場 (scaffold) の形成に影響し、ACL の自己治癒を妨げていると述べている。これに対して Woo らは、同じ膝関節に存在する内側側副靭帯が自己治癒するのに対して²⁴⁾、ACL が自己治癒しない原因として、「内側側副靭帯の役割である膝関節外反制動は損傷後も ACL によって代償されるが、ACL の役割である脛骨の前方制動は、他の組織では代償されない」ことを明示し、初めて関節包外からの因子が治癒に及ぼす影響を考察している^{24,25)}。そこで 2016

年に我々はラットを対象とした基礎研究において ACL 損傷後の異常関節運動を関節包外から制動するモデル (Controlled Abnormal Joint Movement : CAM モデル) を作成し, 完全損傷 ACL モデルで ACL の自己治癒を達成したと報告した²⁶⁻²⁹⁾.

この基礎研究の成果を臨床へ Translate するためには, 解決すべき課題がある. その課題の一つとして, ACL 損傷後の保存的治療法を適応すべき基準が不明瞭である点が挙げられる. これまでの報告では, 若年者で予後不良であると報告されているが¹⁸⁾, その他の基準については皆無である. そこで我々は, 多くの ACL 損傷が大腿骨近位部と靭帯中間部で発生³⁰⁻³⁴⁾していることに着眼し, ACL 損傷の発生部位に基づく適応基準を基礎研究から明らかにした (発表論文 1). 臨床における ACL 損傷者に対する初診時スクリーニング検査には, ラックマンテストや前方引き出しテストなどの徒手的評価が用いられ, 磁気共鳴画像による画像診断にて確定診断に至る. 特に画像診断では ACL の損傷部位についての情報を得ることが可能である. 我々の報告の中で²⁹⁾, 損傷後 12 週時点における治癒 ACL の力学特性は, 再建 ACL と比較して十分な強度を再獲得している³⁵⁻³⁷⁾. この結果は, 動物種の違いはあるものの, いかなる部位で生じた ACL 損傷においても保存的治療法が適応となる可能性を示唆している.

3.4 完全損傷 ACL の治癒メカニズム

これまでの臨床及び基礎の既報研究により, 膝関節の異常運動を制御することによって, 完全損傷した ACL が自己治癒に導かれることは明らかである^{15-17,26,27,29,38)}. この一連の現象のメカニズムについて, Nishikawa ら, Morishita らは CAM モデルと ACL 非治癒モデル (Anterior Cruciate Ligament Transection; ACLT モデル) の損傷後急

性期（損傷後 1/3/5 日時点）の治癒応答の違いを指摘した^{27,38}。ACLT モデルと比較して CAM モデルでは，異化因子である Matrix metalloproteinase-13 mRNA 発現量が減少し，異化同化バランス（Matrix metalloproteinase - 13 / Tissue inhibitor of metalloproteinase-1）に違いがあること，血管形成因子である platelet-derived growth factor (PDGF) - β mRNA 発現量が高発現していたことを報告した。また損傷 ACL 断端部の組織学的変化でも，CAM モデルでは ACL 断端部と関節内組織（膝蓋下脂肪体・滑膜組織）が結合する組織像が観察されたのに対して，ACLT モデルでは損傷 ACL の断端部が上後方へ退縮する組織像を観察した。これらの報告から，CAM—ACLT モデル間で，ACL 損傷後 24 時間以内に，①ACL 実質部の分子生物学的治癒応答に違いが生じていること，②損傷 ACL の断端部の組織学的挙動に違いが生じること，③ACL 損傷後の断端同士の架橋結合に，関節内組織が関与することが明らかとなった。これらの現象を総合的に鑑みると，ACL 損傷後 24 時間以内に炎症応答が活性化し，ACL 実質部のみでなく，ACL 実質部と関節内組織の相補的な修復機構によって，ACL の自己治癒が達成している可能性が示唆される。

現在，ACL 損傷患者へ保存療法を適応した場合に，装具装着期間は 11 ヶ月間要すると報告されている²⁹。また実験動物を対象とした CAM モデルにおいて，完全損傷 ACL が正常靭帯比の 50%程度の力学強度を得るまでには 8 週間の期間を要する^{20,36,37}。臨床と基礎研究で動物種や期間の違いはあるものの，完全損傷した ACL が治癒するまでには一定の期間を要することは共通している。当然ながら損傷した ACL の力学強度が再獲得されるまでの治癒期間は，ACL 組織の脆弱性を認めるため，患部管理不良により再断裂率が高くなることや，装具装着による患者の心因

的ストレスが増加する。そして、これらの多面的リスクは患者の生活の質を低下させる。そのため、損傷した ACL の治癒を促進し、より良質に治癒が達成されるような治療法を提供する必要があるが、現在までに、ACL の治癒を促進する治療法は確立できていない。その原因の一つとして、完全損傷 ACL の治癒メカニズムが解明されていないことが挙げられ、どのような手段を用いて、どの時期に、どのような頻度・量で、治療を施すべきか全くわからない現状にある。

そこで本研究の全体概要として、研究 1 では、ACL 損傷急性期において断端部が架橋結合するまでのメカニズムを、膝関節内組織に着眼して検証した。研究 2 では、研究 1 で得られた結果を基にして、NF- κ B シグナル阻害による ACL 損傷後の治癒応答の変化について検証した。研究 3 では、脂肪幹細胞由来エクソソームを用いて完全損傷 ACL の治癒促進が可能であるかを検証した。ACL の治癒メカニズムを解明することは、ACL 損傷患者の治癒を促進する治療法の開発に繋がり、より多くの患者に対して保存療法を提供できる可能性がある。また患者毎の社会的背景に応じた適切な治療法を患者自ら選択することを可能にする。

以上の背景から本研究の目的は、完全損傷 ACL の治癒メカニズムを、CAM モデルを用いて実験的に明らかにし、損傷 ACL の治癒を促進する治療法を開発する上での基礎となるデータを提示することである。

4 研究1：完全損傷 ACL の断端部架橋結合に，膝関節内組織は関与するか

4.1 研究目的および仮説

結合組織の修復機構には創傷部の血管新生・血流供給が炎症応答反応の1つとして生じる．その重要性は，膝内側側副靭帯やアキレス腱損傷等で報告されており^{20,39,40}，我々の先行研究においても³⁸，ACL の治癒過程で，ACL 断端部と血管形成に富む膝蓋下脂肪体／滑膜組織が結合する組織像を観察している．低血管新生は酸素や成長因子など代謝的に必要な栄養素を減少させ，靭帯断端部の結合遅延や架橋結合不全を招く原因となる．これらの背景から，ACL 損傷後の治癒応答には，膝関節内組織による ACL 損傷部への血流供給が関与している可能性が考えられる．したがって，本研究の目的は，ACL 損傷後急性期の膝関節内の組織学的動態を調査し，膝関節内組織が ACL の治癒及び架橋結合に関与しているかを明らかにすることである．

4.2 方法

4.2.1 倫理的配慮

本研究内容は，埼玉県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て，動物実験基本計画書並びに動物実験ガイドラインに準じて実施した（承認番号 2021-7）．なお，動物倫理に配慮し，使用動物数は可能な限り最小限に設定した

4.2.2 研究デザイン

Wistar 系ラット（12 週齢／雄）76 匹を，無作為に CAM モデル・ACLT モデルに振り分けた．ACL 損傷急性期における膝関節内組織の治癒応答

を検証するために、組織学（各モデル作成後 1・3・6・12・24 時間及び 3 日後 各 n=10）・分子生物学（各モデル作成後 12 時間後 n=12）・血管形態学（各モデル作成後 7 日後 n=2）分析を用いて解析した。

4.2.3 モデル作成方法

イソフルラン(Mylan Seiyaku Ltd, Tokyo, JPN)にて吸入麻酔後、三種混合麻酔薬（ドミツール 10ml (Nippon Zenyaku Kohgyo Co. , Ltd. Fukushima, JPN), ドルミカム注射液 10mg (Astellas Pharma Inc., Tokyo, JPN), ベトルファール®5mg (Meiji Seika Pharma Co. , Ltd. Tokyo, JPN) と生理食塩水を調合量 25ml において、それぞれ 1.875ml, 2ml, 2.5ml, 18.625ml の割合で調合)を体重 100g あたり 0.5ml 皮下に投与し、深麻酔処置を行った。麻酔下にて電気バリカンを用いて左後肢を除毛処理し、イソジンで消毒を行った。その後、左後肢の膝蓋骨外側の皮膚を No.10 メス刀にて縦切し、皮下組織をクーパー剪刀にて剥離した。その後、膝蓋腱外側の関節包を縦切し、マイクロ剪刀を関節包内に刺入し、ACL を切断した。ACL 切断後は徒手的に脛骨前方引き出しを行い、確実に ACL が切断されているか確認した。ACL 切断後は、ETHIBOND*EXCEL 4-0 (Ethicon End-Surgery Japan, 東京, 日本)にて関節包の縫合を行った。その後、歯科用ドリル (NSK アルチメイト XL, 株式会社ナカニシ, 栃木, 日本) を用いて、脛骨粗面内側下部から外側に向かって骨孔を作成した。ドリルにはエラスチールバーラウンド 1HP-2 (株式会社松風, 京都, 日本) を使用した。骨孔作成後、骨孔から大腿骨顆部後面にナイロン縫合糸エプル 3-0 (株式会社秋山作製所, 東京, 日本) を通し、膝関節 90° 屈曲位の状態でナイロン糸を骨孔部で男結びした。その後、徒手的に脛骨の前方引き出しを行い、CAM モデルでは脛

骨前方移動が制動されていること， ACLT モデルでは脛骨前方移が制動されていないことを確認した．生理食塩水にて，関節周囲の洗浄を行った後， ETHIBOND*EXCEL 4-0 にて皮膚の縫合を行い， イソジン液にて消毒を行った．最後に拮抗薬として，メデトミジン拮抗薬（アンチセダン®10ml（Nippon Zenyaku Kohgyo Co., Ltd. Fukushima , JPN）（0.5ml/100g）を，背部に皮下投与した．全ての動物は，温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55\pm 5\%$ に設定された部屋で飼育され，12 時間明暗サイクルで，固形飼料と水は自由摂食，運動は制限しない環境で飼育した．

4.2.4 組織学的解析

1) 組織採取～切片作成

各群の対象ラットを脱血処置により安楽死させ，組織学的検討用に左後肢の膝関節を採取した．採取した膝関節は，4%パラホルムアルデヒドで48時間固定，10% ethylenediaminetetraacetic acid で約45日間室温にて脱灰処理，スクロース置換を行い，ティシュー・テック O.C.T Compound（サクラファインテックジャパン株式会社，東京，日本）にて包埋後， -80°C の Deep Freezer で保存した．凍結包埋したサンプルは，凍結切片作製装置 クリオスター NX70（Thermo Scientific, MA, USA）にて膝関節内側から矢状面方向に $14\mu\text{m}$ に薄切し， -25°C の Freezer にて保存した．

2) Hematoxylin Eosin（HE）染色

損傷 ACL の断端部，及び関節内組織の挙動を観察するために，HE 染色を実施した．染色には，ティシュー・テック マイヤーヘマトキシリン（サクラファインテックジャパン株式会社，東京，日本）溶液とティシュー・テック エオジン（サクラファインテックジャパン株式会社，東京，

日本) を原液で使用した。

3) Oilred O 染色

膝蓋下脂肪体の局在性を調査するために、Oilred O 染色を実施した。染色には、Oil Red O (株式会社富士フイルム和光純薬, 大阪, 日本), 2-プロパノール (株式会社 Nacalai tesque, 京都, 日本) を用いた。核染色には、蒸留水で希釈した 25% ティッシュ・テック マイヤーヘマトキシリン溶液を用いた。

4) Immunohistochemistry (IHC) 染色

タンパク質局在性を観察するため IHC 染色を行った。一次抗体には、vascular endothelial growth factor (VEGF) -A polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, BS-4572R ; Bioss 社, USA), Hypoxia Inducible Factor (HIF) -1 α polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, BS-0737R ; Bioss 社, USA), Cluster of Differentiation (CD) 68 polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, ab125212 ; Abcam 社, UK), CD206 polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, 18704-1-AP ; proteintech 社, USA), α -smooth muscle actin (SMA) polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, 18704-1-AP ; proteintech 社, USA) を、それぞれ Phosphate-buffered saline (PBS) で希釈して用いた。二次抗体には、ヤギ由来抗ラビット IgG 抗体を用いた (VECTOR LABORATORIES, CA, USA)。増感反応は、VECTAIN ABC Rabbit IgG Kit を用いて Avidin - Biotinylated enzyme Complex (ABC) 法を行った。発色は、ヒストファイン DAB 基質キット (株式会社ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本) を用いた。その後、ヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。なお陰性対照には一次抗体の代わりに PBS を用いた。

また CD206/CD68 陽性率を計算するために、損傷 ACL の大腿骨側・脛骨側断端部を対象に無作為に 6 領域を選択した。各領域の細胞総数に対する CD68/CD206 陽性細胞率を算出し、CD68 に対する CD206 陽性率を求めた。

4.2.5 分子生物学的解析

1) Microarray 解析

ACL 実質部，膝蓋下脂肪体を対象として，国立研究開発法人物質材料研究機構分子・物質合成プラットフォームへ解析委託し実施した。CAM 群と ACLT 群の遺伝子発現値の解析結果を基に，以下の条件で遺伝子の絞り込みを行った。各群の発現遺伝子平均値の 2 群間比較にて，CAM 群に対する ACLT 群の遺伝子発現比 (fold change) が 0.5 以下または 2 以上として評価した。マイクロアレイの結果から，DAVID Bioinformatics Resources Functional Annotation Tool を用いてクラスタリング解析，オントロジー解析，及びパスウェイ解析を行った。

2) Real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction

ACL 実質部，膝蓋下脂肪体における 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® Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific, MA, USA) を用いて実施した。

Primer は Interleukin 1 receptor, type I (IL1R; Rn00565482_m1), TNFR (Rn01492828_g1), hypoxia-inducible factor 1 (Hif1a ; Rn01472831_m1), NF- κ B (Rn00595794_m1), vascular endothelial

growth factor A (VEGFA; Rn01511602_m1) 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。分子生物学的解析に使用した Primer に関して以下に記した。

遺伝子名	製品番号	VIC/FAM
interleukin 1 receptor, type I	Rn00565482_m1	FAM
lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	Rn01492828_g1	FAM
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Rn01472831_m1	FAM
TRAF family member-associated NFKB activator	Rn00595794_m1	FAM
vascular endothelial growth factor A	Rn01511602_m1	FAM

4.2.6 μ CT 解析

プライムテック inc. へ解析委託し実施した。対象ラットを腎動脈以降の腹部大動脈にカテーテルを設置し、腹部大静脈を切開して灌流液（ヘパリン含有生理食塩水）で十分に脱血した。その後、造影剤 MV-122 Microfil silicone rubber injection compounds yellow kit B（使用量 15ml）を用いて全身に還流し静脈から造影剤が流出するのを確認した。造影剤を滞留させるために血管を結紮し、4℃で一晩固定した。両膝関節を対象に、高性能 X 線マイクロ CT 装置 DELPet μ CT100（DELBio 株式会社，東京，日本）を用いて、空間分解能は 45 μ m で膝関節包内の血管造影を実施した。対象領域（Region of interest : ROI）は、大腿骨・脛骨の関節包付着部に沿って設定した。解析方法は、計測された ROI 内で検出された血管量 (mm^3) を、ROI 容積 (mm^3) で除して正規化した。その後、個体差を是正するために、正常膝関節（対側肢）に対する対象膝関節に

における ROI 内の血管量を算出した。

4.2.7 統計解析

全ての統計解析は、jamovi Version1.6.23.0 (<https://www.jamovi.org/>) を用いて実施した。組織学、分子生物学に関するデータに対して、正規性を示し、等分散性を認めるデータに対しては、Student t 検定を用いた。正規分布を示さないデータに対しては、Wilcoxon rank sum 検定を用いた。全ての有意水準は、 $p=0.05$ とした。

4.3 結果

4.3.1 組織学解析結果

CAM 群は、ACL 断端部が引き合うように配列し、時間経過とともに断端部間隙を架橋する組織像を観察した。損傷直後から損傷後 3 時間時点では、断端間部に脂肪組織の局在性を認め、膝蓋下脂肪体が損傷 ACL 断端間部を埋める様子を認めたが、以降、脂肪組織の局在性は認めず、滑膜様線維芽細胞を含む組織へ置換されている。一方、ACLT 群では、損傷後 6 時間時点まで、CAM 群の ACL 断端部の挙動に違いは認めていないが、損傷後 12 時間経過時点で大腿骨側レムナントが後上方へ退縮する様子を認め、以降、断端部間が拡大している。また、ACL 断端部間の脂肪組織の局在性は、損傷直後から認めなかった (図 1・図 2)。

ACL 断端部のマクロファージ ($M\phi$) 極性変化は、M1・M2 phenotype Maker (CD68) 及び M2 phenotype Maker (CD206) を用いて、CD68 陽性細胞数に対する CD206 陽性細胞率 (以下; M2 細胞陽性率) を算出することにより調査した。損傷後 1 時間時点では、M2 陽性細胞率にモデル間に差は認めなかったが、脛骨断端部/大腿骨断端部ともに損傷後

6 時間時点以降で ACLT 群と比較して CAM 群での M2 陽性細胞率は高く, その傾向は損傷後 24 時間まで継続した(大腿骨断端部 Post 6hours; $p=0.01$, 12hours; $p<0.01$, 24hours; $p<0.01$, 3days; $p<0.01$, 脛骨断端部 post 6hours; $p<0.01$, 12hours; $p<0.01$, 24hours; $p<0.01$). また ACLT 群では, ACL 脛骨側断端部と比べて ACL 大腿骨断端部のほうが, M2 陽性細胞率は低い傾向にあったが (post 12hours; $p<0.01$), ACLT 群の損傷後 6 時間時点における M2 陽性細胞率のみ大腿骨側断端部の方が高かった ($p=0.01$) (図 3 図 4 図 5).

損傷 ACL 断端部の血管新生状態は, HIF-1 α 陽性細胞数に顕著な違いは認めず, CAM 群, ACLT 群ともに断端部の細胞は濃染されていた (図 6). 一方, VEGF は, ACLT 群と比較して CAM 群では断端部が損傷後 24 時間時点においても濃染される様子が観察された(図 7). α -SMA は, 両群ともに損傷早期から断端部細胞が濃染される組織像を認め, その傾向は継続した (図 8)

4.3.2 分子生物学解析結果

1) MicroArray 解析

CAM モデルと ACLT モデル間で, ACL 断端部の挙動に組織学上違いが生じた Time point を採用し, ACL 実質部と膝蓋下脂肪体を対象に解析を実施した. プローブ総数は 45,598 個で, 全体比較をするために Normalize 処理した 8 サンプルのシグナル強度が測定されてかつ最大値と最小値の差が 1 以上のプローブ 16,571 個について階層的クラスタリングを実施した. また 4 サンプルそれぞれについて $n=2$ であるため, 2 つの発現値が存在し, かつお互いに 2 倍以下のシグナル強度のときにその平均値を再現性あるデータとして採用した. このデータについても同

様にプローブ 3,174 個について階層的クラスタリングを行った。ACLT 群における ACL と膝蓋下脂肪体の遺伝子発現パターンは最も近似していた。ACLT 群における ACL/膝蓋下脂肪体と CAM 群における膝蓋下脂肪体の遺伝子発現パターンは近似していた。CAM 群における ACL の遺伝子発現パターンは、独立していた (図 9)。

MicroArray により得られたデータを、DAVIT Bioinformatics Resources ; Functional Annotation Tool を用いて、GenBank を識別子とし、Ontology 解析・Pathway 解析を実施した。Ontology 解析では、ACLT 群と比較して CAM 群の ACL 実質部で、2 つの生物学的プロセス (cellular response to interleukin-1 , positive regulation of transcription, DNA-templated) が up-regulate し、初期炎症応答における遺伝子発現パターンに違いを認めた。down-regulation は認めなかった。Pathway 解析では、5 パスウェイで up-regulate し、特に PI3K-AKT, IKK-NF- κ B パスウェイの関連因子の発現が多かった。一方、down-regulation するパスウェイは認めなかった。

膝蓋下脂肪体では、ACLT 群と比較して CAM 群で 14 の生物学的プロセス (negative regulation of apoptotic process, positive regulation of transcription, DNA-templated, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, axon guidance, negative regulation of transcription, DNA-templated, angiogenesis, xenobiotic transport, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, positive regulation of cell migration, apoptotic process, negative regulation of epithelial cell differentiation, regulation of transcription, DNA-templated) が up-regulate し、抗アポトーシス、転写活性、細胞活性における遺伝子発現

パターンに違いを認めた。一方, 11 の生物学的プロセス (inflammatory response, aging, necroptotic signaling pathway, positive regulation of apoptotic process, cellular response to interleukin-1, cellular response to interferon-gamma, vascular smooth muscle cell proliferation, circadian rhythm, response to nutrient levels, cellular response to tumor necrosis factor, kidney development) が down-regulation し, 主に炎症応答に対する遺伝子発現パターンに違いを認めた。Pathway 解析では, up-regulate, down-regulation とともに認めなかった (図 10)。

2) Real time PCR 解析

MicroArray 解析から, ACL 実質部の PI3K-AKT, IKK-NF- κ B パスウェイ関連の遺伝子発現因子が多かったこと, また膝蓋下脂肪体の抗アポトーシス関連因子の発現を多く認めたことから, 本実験でのターゲットパスウェイを IKK-NF- κ B 経路に定め, 下記の遺伝子発現量について, 比較検討した。

各群の ACLT 実質部と膝蓋下脂肪体における分子生物学的応答の違いを調査するために, Interleukin 1 receptor, type I (IL1R; Rn00565482_m1), TNFR (Rn01492828_g1), hypoxia-inducible factor 1 (Hif1a ; Rn01472831_m1), NF- κ B (Rn00595794_m1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA; Rn01511602_m1) の相対発現量を比較した。ACL 実質部では, ACLT 群と比較して CAM 群で解析した全因子 mRNA 発現量で有意差を認めなかった。膝蓋下脂肪体では, ACLT 群と比較して CAM 群で HIF-1 α , および NF- κ B mRNA が優位に発現増加した ($p=0.038$, $p<0.001$) (図 11 図 12)。

4.3.3 μ CT 結果

CAM 群では、膝関節における ROI 容積 142.92mm^3 、総血管量 308128.99mm^3 、総血管量／ROI 容積 2156.02mm 、正常膝関節比率が 106.92% だった。ACLT 群では、膝関節における ROI 容積 145.37mm^3 、総血管量 364158.10mm^3 、総血管量／ROI 容積 2504.98mm 、正常膝関節比率が 95.03% だった（図 13 図 14）。 $n=1$ のため統計的処理は実施せず。

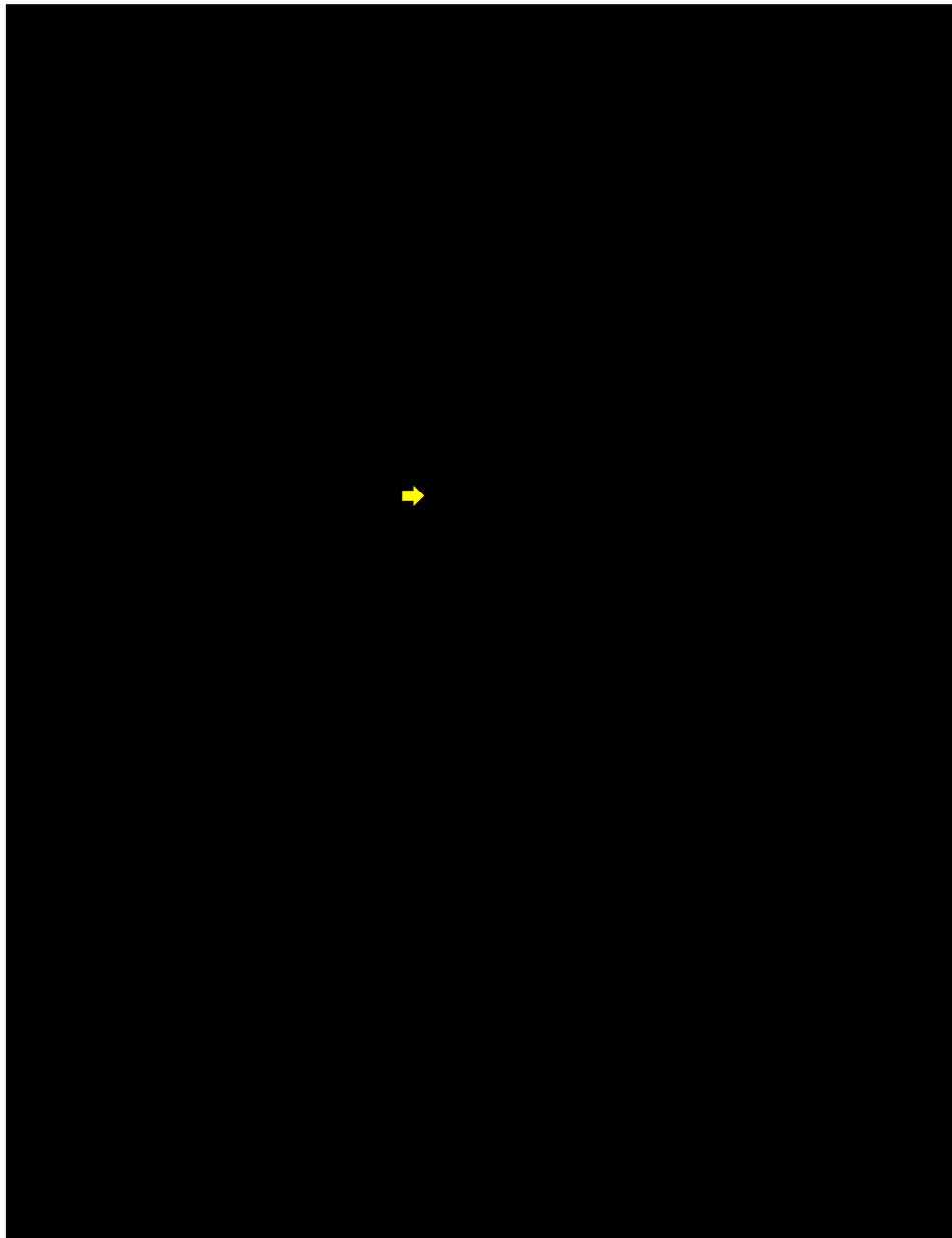


図 1 ACL 損傷急性期における ACL 断端部の動態変化

ACL 損傷後における ACL 断端部の動態変化を HE 染色した組織像を示す。黒矢印：ACLT 群における大腿骨側断端部が後上方へ退縮する組織像。黄矢印：CAM 群における ACL 断端間隙に関節内組織が侵入する組織像。スケールバー500 μ m。

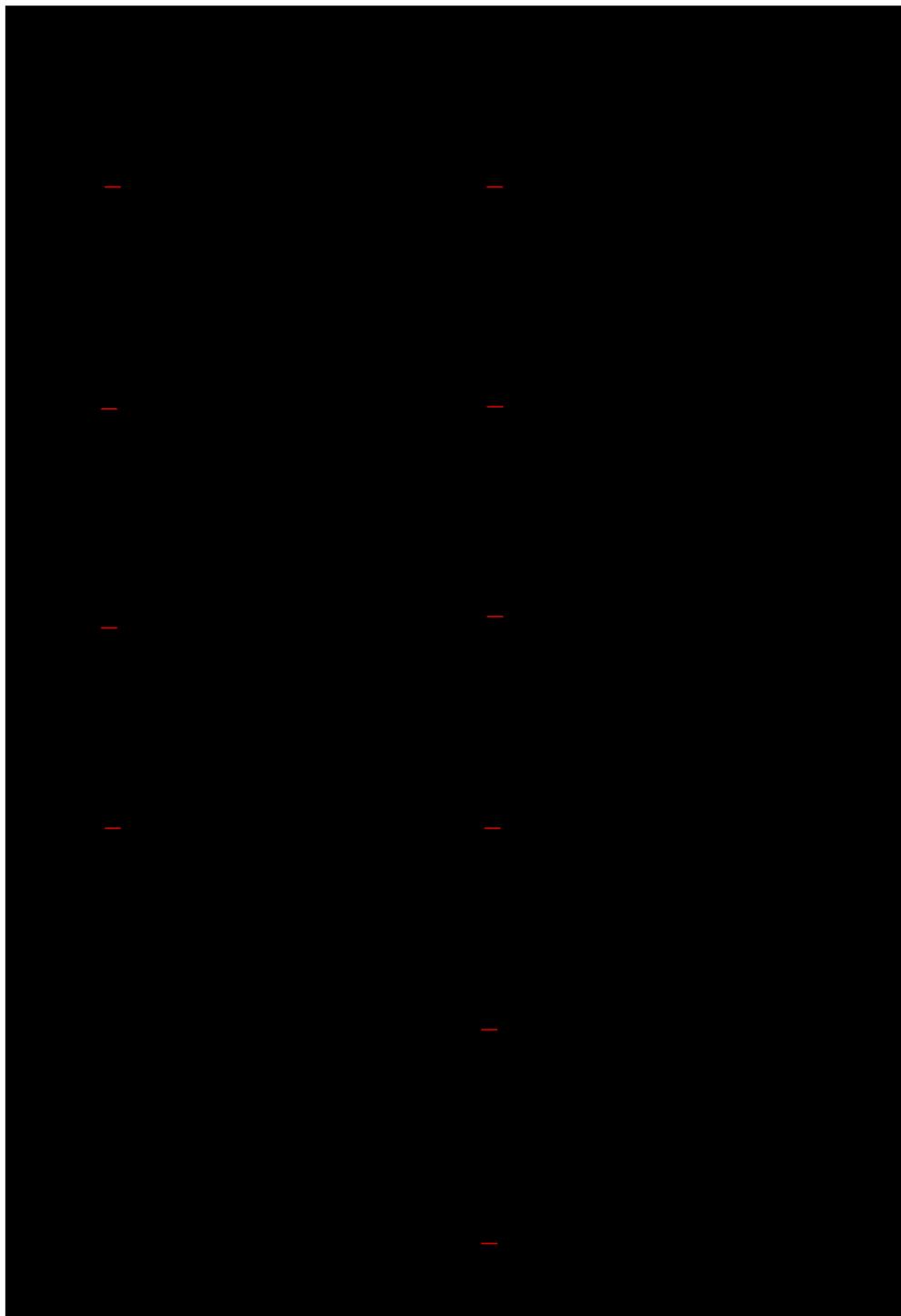


図 2 ACL 損傷急性期における膝蓋下脂肪体の局在性
ACL 損傷後の膝蓋下脂肪体の局在性を示す. Oilred O 染色像. スケール
バー 黒 : $50\mu\text{m}$ 赤 : $500\mu\text{m}$.

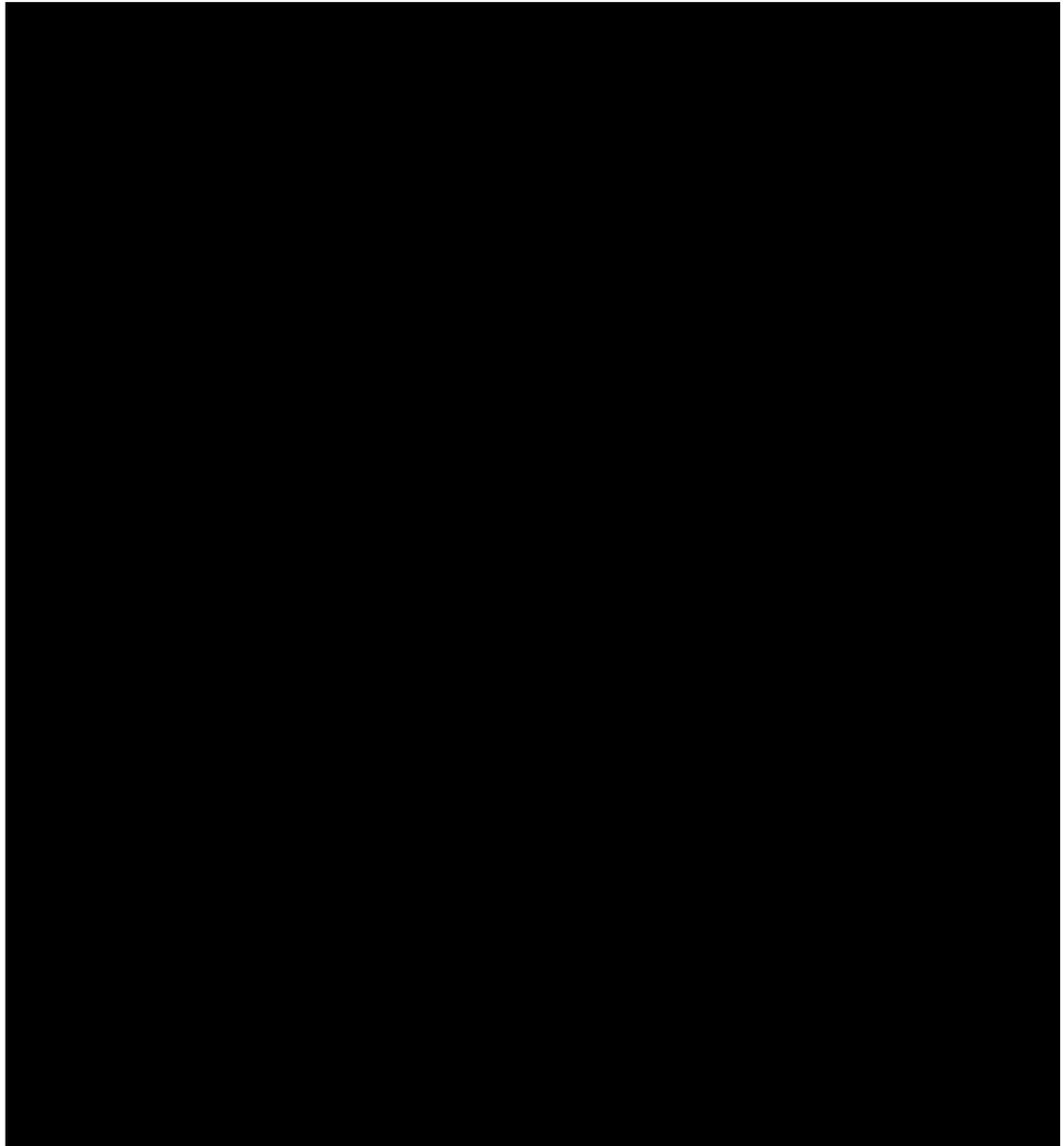


図 3 ACL 損傷後の大腿骨側断端部における M ϕ 極性
M ϕ 特異的マーカー CD68, M2 ϕ 特異的マーカー CD206 IHC 染色像を
示す. 時間経過とともに CD68・CD206 ともに CAM 群で核が濃染され,
ACLT 群では未染色性 (紫色) を認める. 黒矢印: 陽性細胞. スケールバ
ー: 50 μ m.

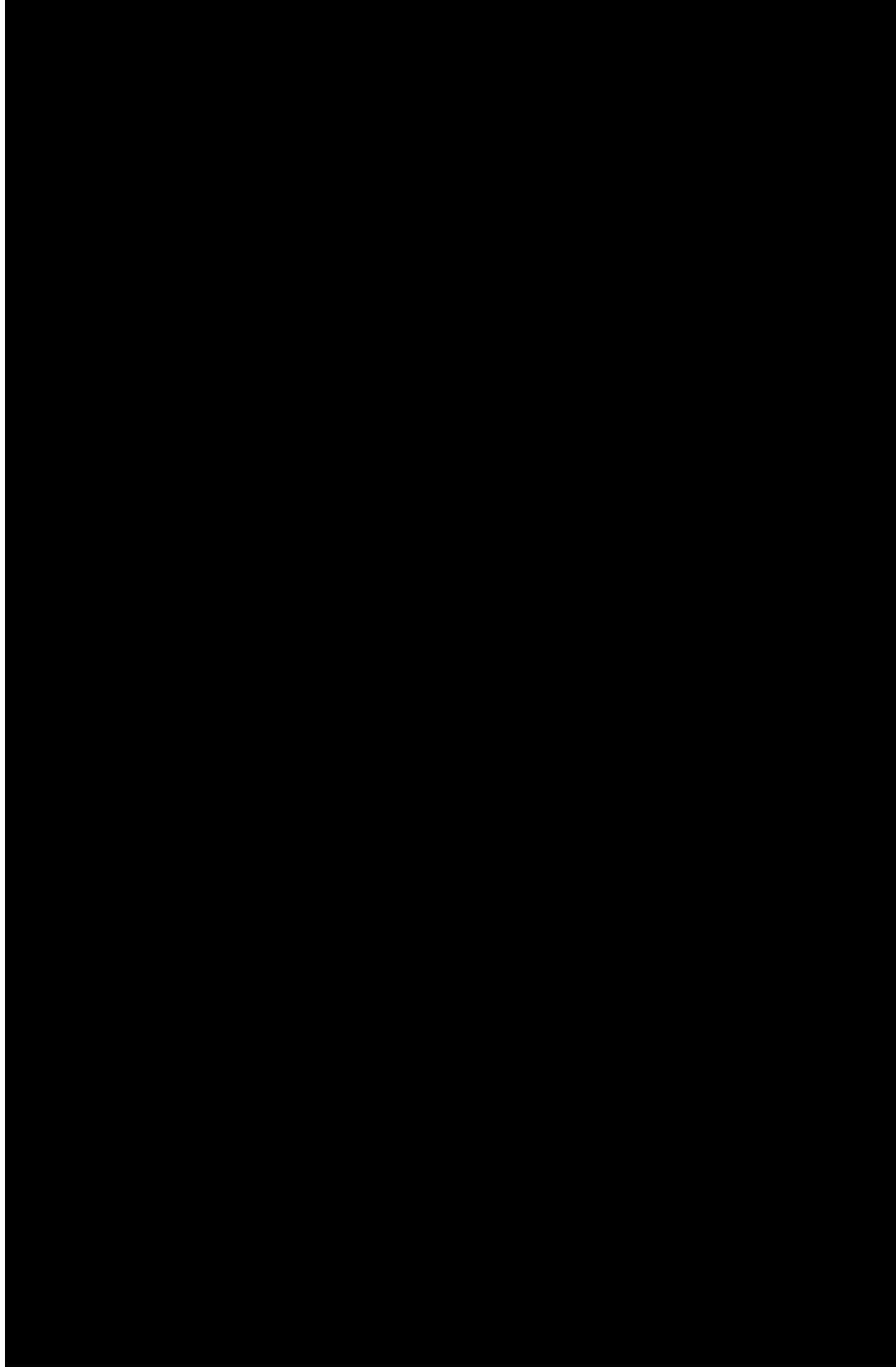


図 4 ACL 損傷後の大腿骨・脛骨側断端部における M ϕ 極性時間的变化
CD68 に対する CD206 陽性細胞率を示す。損傷後 6 時間以降で、ACLT
群と CAM 群の群間に有意差認める。

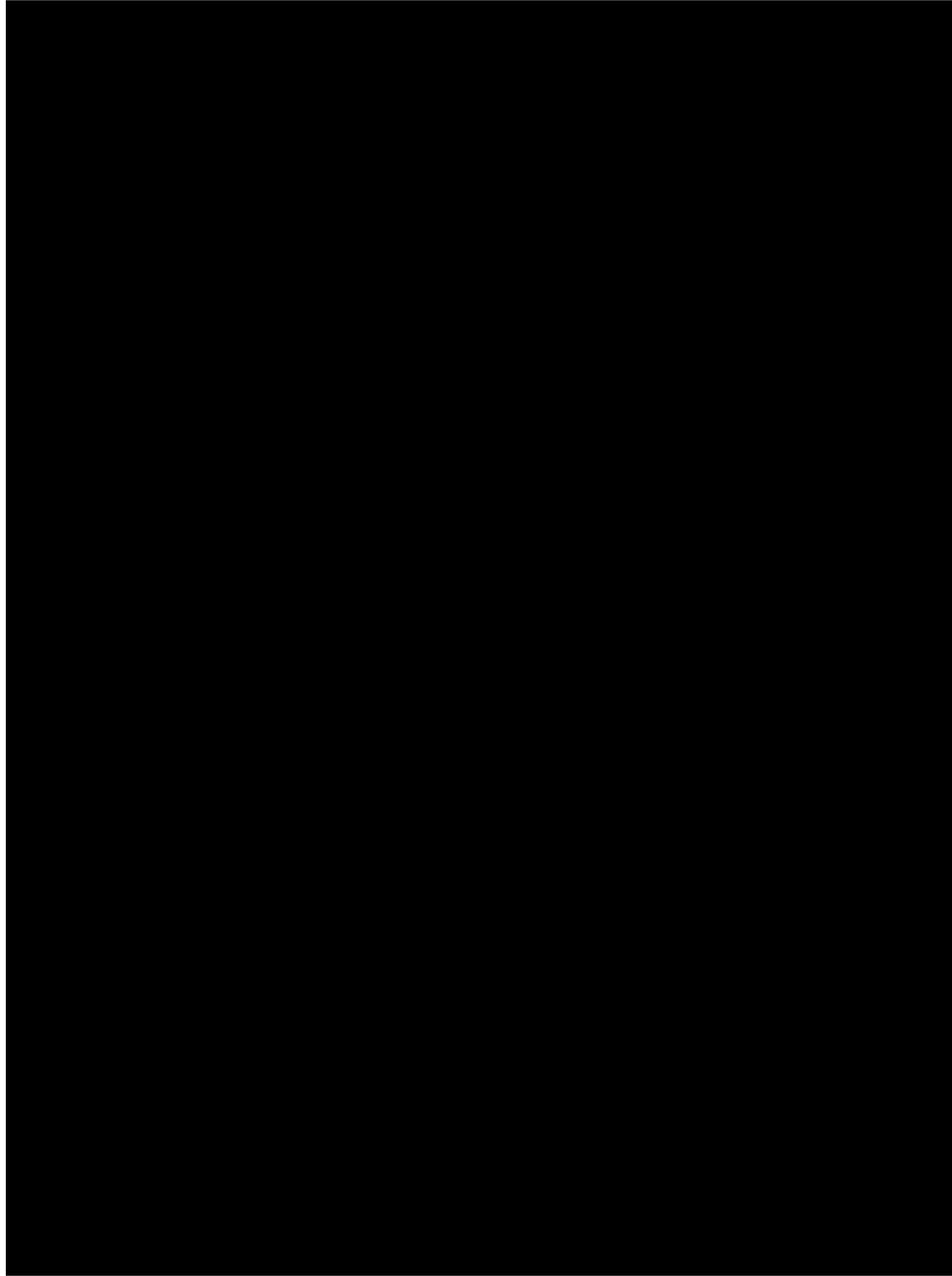


図 5 ACL 損傷後のモデル毎の大腿骨・脛骨側断端部における
M ϕ 極性の時間的变化

CD68 に対する CD206 陽性細胞率を示す。ACLT 群では損傷後 6・12 時間
間で有意差を認めたが、CAM 群では認めなかった。

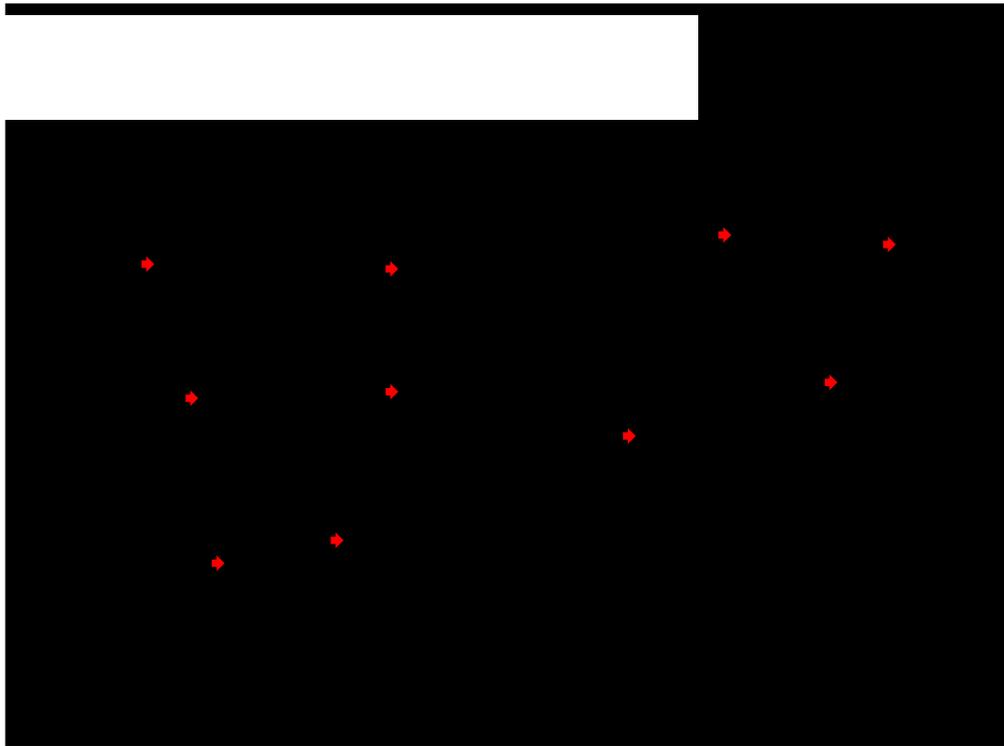


図 6 ACL 損傷後の大腿骨側断端部における HIF-1 α 染色像
低酸素誘導性因子 HIF-1 α IHC 染色像を示す。損傷後 1 時間から群間で細胞染色性に顕著な違いは認めなかった。赤矢印：陽性細胞。スケールバー：50 μ m。右上図は解析対象領域を示す（大腿骨側断端部を示し、断端部縁に沿って線引き）。



図 7 ACL 損傷後の大腿骨側断端部における VEGFA 染色像
血管内皮増殖因子 VEGFA IHC 染色像を示す。損傷後 12・24 時間時点
では ACLT 群と比較して CAM 群で濃染される組織像を認めた(黒矢印)。
スケールバー：50 μ m. 右上図は解析対象領域を示す(大腿骨側断端部を
示し，断端部縁に沿って線引き)。

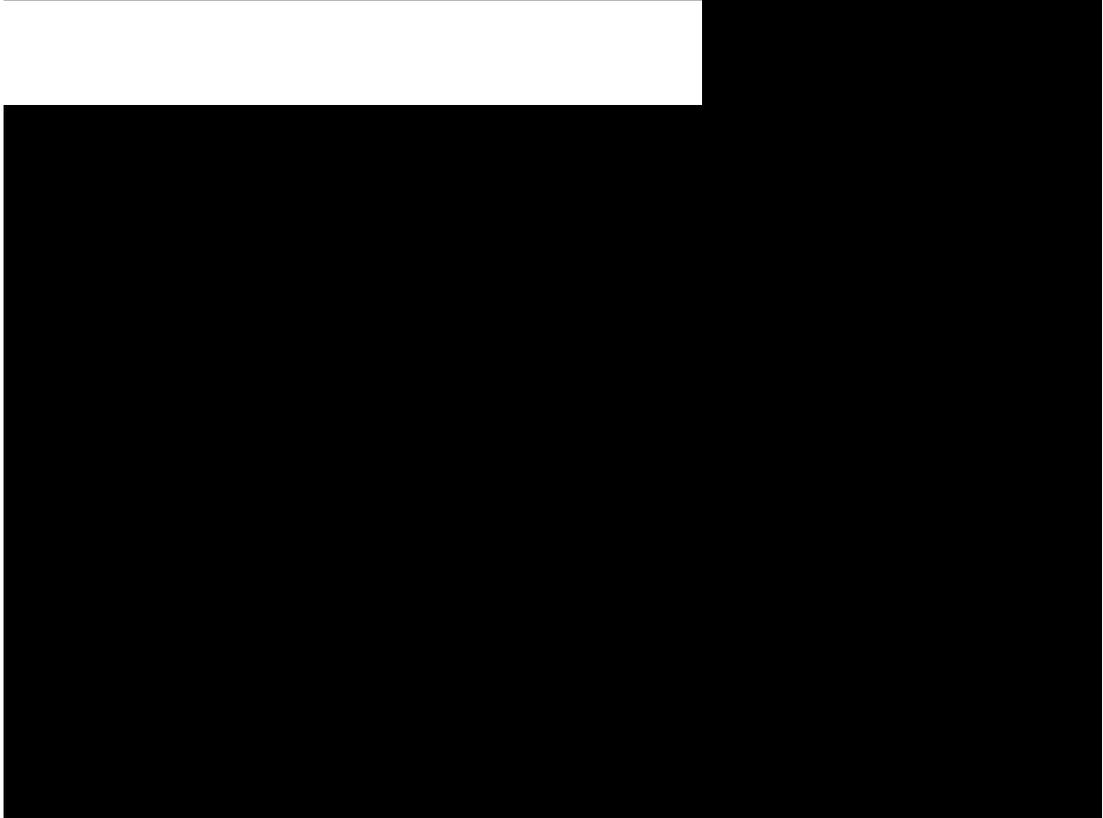


図 8 ACL 損傷後の大腿骨側断端部における α -SMA 染色像
 α -SMA IHC 染色像を示す。損傷後直後から ACLT 群・CAM 群ともに断端部で高い陽性細胞率を認めた（黒矢印）。スケールバー：50 μ m。右上図は解析対象領域を示す（大腿骨側断端部を示し，断端部縁に沿って線引き）。

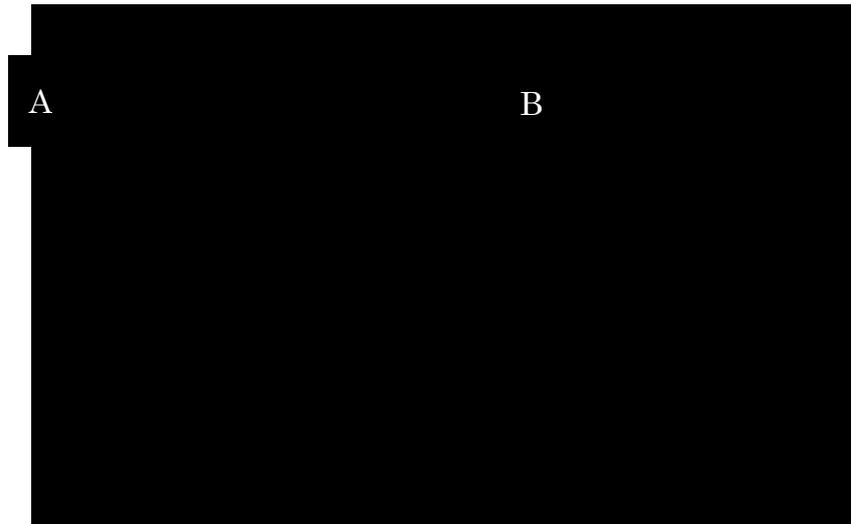


図 9 MicroArray 解析から得られた再現性のあるデータを対象とした
階層的クラスタリング解析

A : 全サンプルを対象に階層的クラスタリング解析した結果を示す。ACLT 群, CAM 群における各サンプル同士の遺伝子発現パターンが最も近似していた。ACLT 群と CAM 群の膝蓋下脂肪体同士が近似し, ACLT 群の ACL が次に近似していた。CAM 群の ACL は独立していた。B : 同一群の同一サンプルを包含し, 階層的クラスタリング解析を実施した結果を示す。ACLT 群における ACL と膝蓋下脂肪体の遺伝子発現パターンは最も近似していた。ACLT 群における ACL/膝蓋下脂肪体と CAM 群における膝蓋下脂肪体の遺伝子発現パターンは近似していた。CAM 群における ACL の遺伝子発現パターンは, 独立していた。

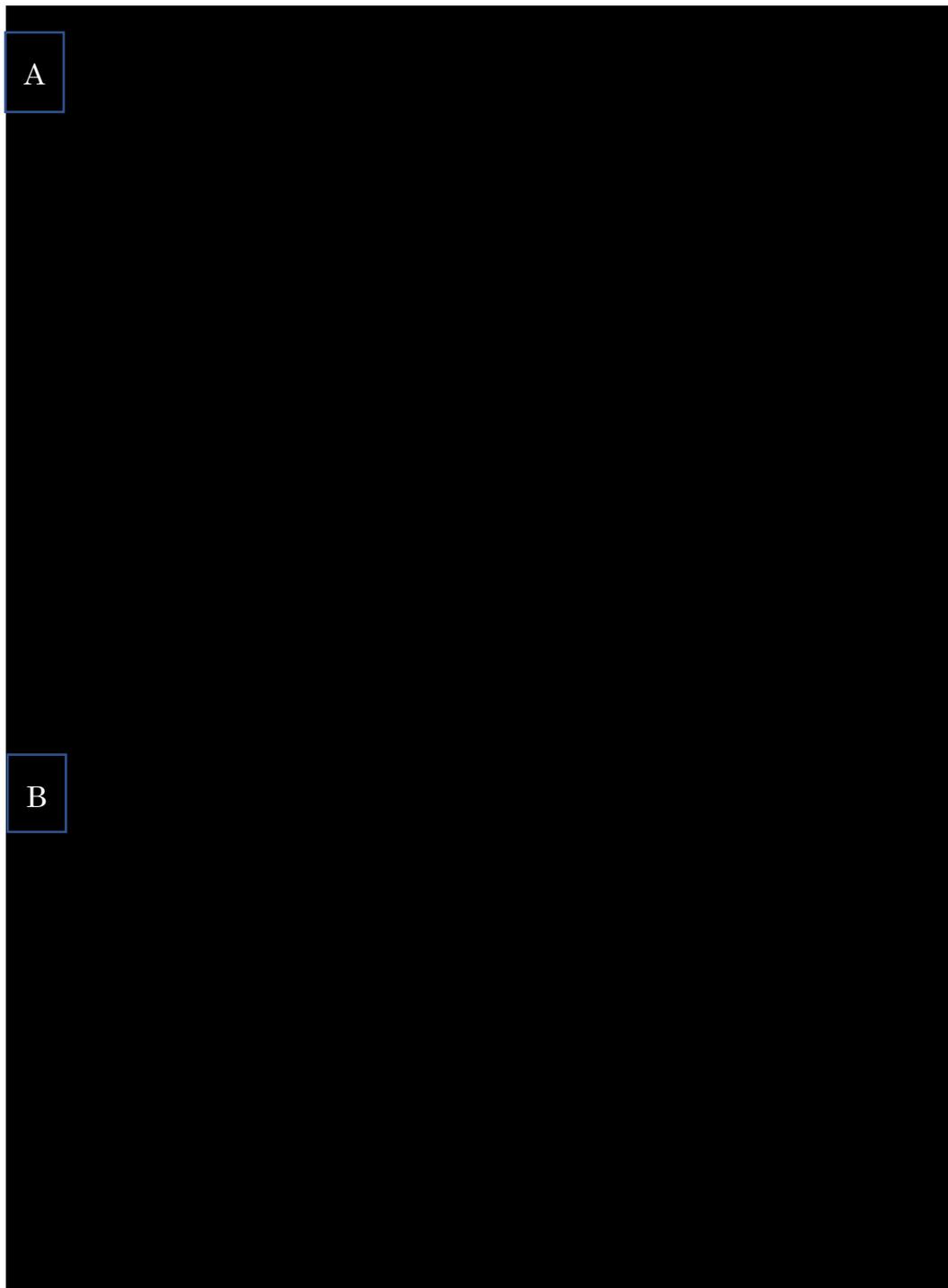


図 10 MicroArray 解析における Ontology 解析・Pathway 解析
A: ACL 実質部・膝蓋下脂肪体実質部を対象とした Ontology 解析 (Gene Ontology Term). B: ACL 実質部・膝蓋下脂肪体実質部を対象とした Pathway 解析 (KEGG)



図 11 ACL 実質部を対象とした Realtime-PCR 解析

損傷後 12 時間時点における ACL 実質部の遺伝子相対発現量を示す。CAM 群と ACLT 群で遺伝子発現量に有意差は認めなかった。全てのデータは平均値±SD 値で示した。（縦軸単位：Fold）

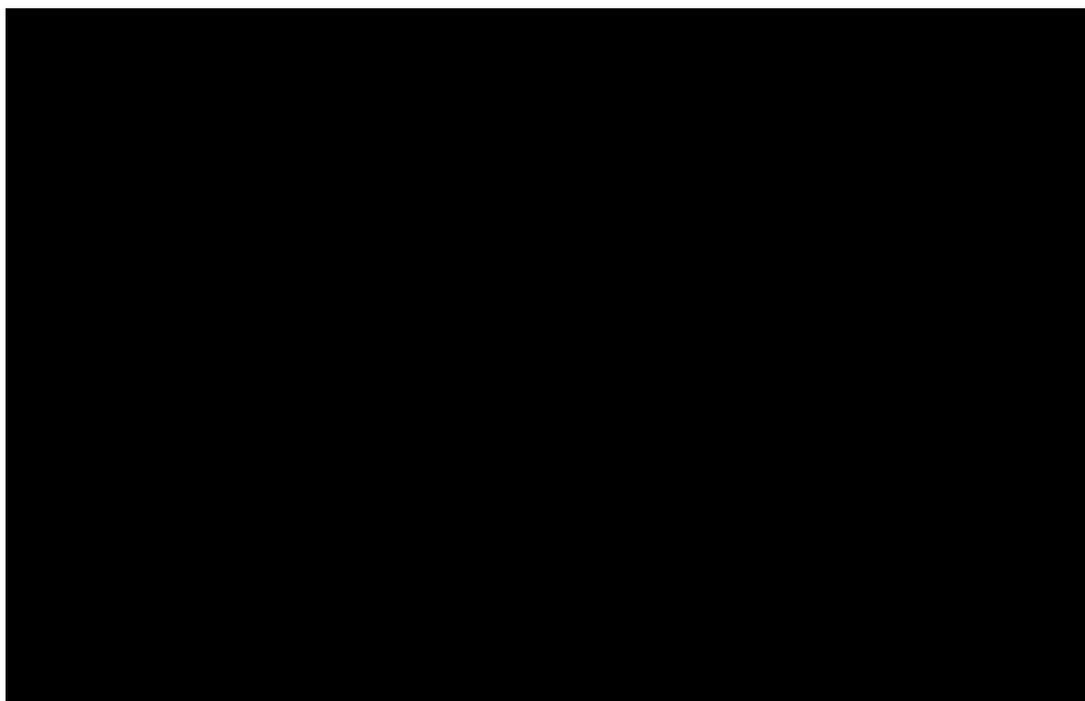


図 12 膝蓋下脂肪体を対象とした Realtime-PCR 解析

損傷後 12 時間時点における ACL 実質部の遺伝子相対発現量を示す。CAM 群と ACLT 群で、HIF-1 α 、NF- κ B mRNA 発現量に有意差を認めた（各 $p=0.038, p<0.001$ ）。全てのデータは平均値 \pm SD 値で示した。（縦軸単位：Fold）



図 13 μ CT による血管量解析

A: 膝関節包内の ROI 範囲を抽出し, 3D 化した画像を示す. B: 計測された ROI 内で検出された血管量を ROI 容積で除して正規化し, 対側肢に対する対象膝関節における ROI 内の血管量を算出した結果を示す. ROI における総血管量は, 正常膝に対して CAM 群で 106.92%, ACLT 群で 95.03%だった.

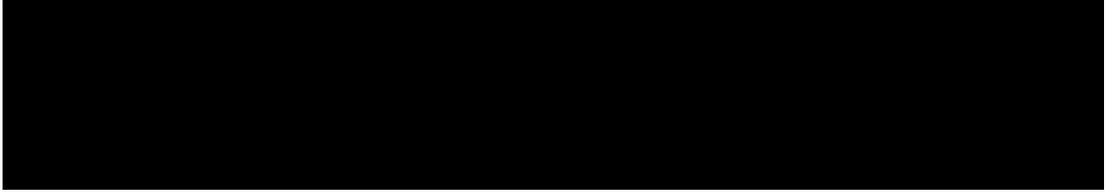


図 14 μ CT による血管量測定データ

μ CT 解析から得られたデータを示す。総血管量に対する ROI 容積、個体差の影響を是正するために、総血管量を ROI 容積で除した後に、正常膝との比率を算出した。左から ROI 容積、総血管量、総血管量/ROI 容積、正常比率を表す。

4.4 考察

研究1では、損傷後6時間以降におけるACL断端部のCD206陽性細胞率、及び損傷後12時間以降におけるACL断端部の挙動変化にモデル間で差異を認めた。したがってACL損傷後12時間以内に膝関節内で生じる治癒応答の違いが、損傷ACLの自己治癒能に関与している可能性が示唆された。ACL損傷後12時間以内に膝関節内で生じた現象に着目すると、損傷急性期の膝関節内組織の挙動変化の違いを認めた。具体的には、CAM群ではACL断端間部に脂肪組織の局在を認めた一方、ACLT群では認めなかった。そのため、モデル間でACLの治癒応答の違いを生んだ要因の一つとして、膝関節内組織である膝蓋下脂肪体の関与が示唆された。近年、脂肪組織と創傷治癒の関連性について報告されている。Shookらは、脂肪組織が創傷治癒の過程において脱分極し、M ϕ 活性を促進する脂肪酸を放出した後に、筋線維芽細胞へ分化転換することで、創傷治癒を促進すると報告している⁴¹⁾。また筋線維芽細胞は、膝内側側副靭帯の治癒過程でも多数存在し、収縮力を初期の肉芽組織に伝えることで創傷の閉鎖を促進し、靭帯修復に重要な役割を果たす^{22,42,43)}。本研究においても、ACL断端部のM ϕ 活性が観察されていること、ACL断端部の α -SMA(筋線維芽細胞特異的マーカー)陽性細胞が多いことを考慮すると、ACL損傷後の膝関節内において、ACL断端部に膝蓋下脂肪体由来の脂肪組織が増殖することで、ACLの治癒を促進している可能性がある。また損傷部への血流供給の観点からみても、膝蓋下脂肪体がACL断端部に貢献している可能性が考えられる。従来からACLに治癒不全が生じる原因は乏血管性組織であることが指摘されてきたが²⁹⁾、我々のCAMモデルを用いた先行研究では、損傷したACLは断端同士が再結合するのではなく、膝関節内組織(膝蓋下脂肪体/滑膜組織)と結合する

様子を観察している²⁹⁾。膝蓋下脂肪体は豊富な毛細血管を持つ組織であるため、損傷した ACL の断端部に代替的に血流供給の役割を担っている可能性がある。膝蓋下脂肪体を対象として ACL 損傷後 12 時間時点における分子生物学分析を実施したところ、炎症、抗アポトーシス、血管新生に関与する NF- κ B 及び、低酸素誘導因子である HIF-1 α mRNA 発現量が CAM 群で有意に増加していたことから、膝蓋下脂肪体が ACL 断端部への血管新生、および血流・栄養供給を担っていた可能性は高い。また損傷 ACL 断端部において M2 ϕ 比率が高かったことから、M2 ϕ の血管新生、抗炎症作用による作用も勘案される。更に ACL 損傷後 7 日時点での総血管量は、ACLT 群と比較して CAM 群で増加していた分析結果からも仮説を支持する結果となっている。CAM 群では ACLT 群と比較して、膝蓋下脂肪体における炎症、アポトーシス、ネクローシス関連遺伝子の発現抑制を認めたことから、ACLT 群では持続的に細胞死が生じることで、血管形成能が低下したと考えられる。

また本研究で確認された脂肪組織が ACL 断端間に侵入する現象は、ACLT 群では認めなかったが、CAM 群では認めた。ACL 断端部の CD206 陽性細胞率を、脛骨側・大腿骨側断端部ごとに着眼して見ると、ACLT 群では脛骨側で高い陽性率を維持していたことがわかる。一方で、CAM 群では脛骨側と大腿骨側断端部間に差は認めなかった。また過去に我々が、ACL の損傷部位に着眼し治癒能力を検証した結果では、大腿骨近位部で血管形成・細胞活性ともに優れていたにも関わらず、ACL 中央部損傷モデルの方が ACL の力学的強度は優れていた⁴¹⁻⁴⁴⁾。これらの事象から、膝蓋下脂肪体組織が断端部に遊走し作用するか否かは、大腿骨側の断端と、脛骨側の断端の物理的な距離に依存する可能性がある。ACLT モデルのように膝蓋下脂肪体と大腿骨側断端部の距離が延長した場合には脂

肪組織が遊走できず，ACL 線維芽細胞のアポトーシスを生じさせることで，治癒不全につながる可能性が示唆された。

また本研究では分子生物学解析より，ACL 実質部での遺伝子発現量の違いは検出されなかった。In vitro 研究において ACL と Medial Collateral Ligament 細胞の細胞活性や細胞増殖能を検証した研究では，ACL 細胞の治癒能力が乏しいことを指摘する報告も多い⁴⁴⁻⁴⁷⁾。しかし，本研究結果を鑑みると，“ACL 実質部自体の治癒能力”と“損傷した ACL が治癒するか否か”には直接的な関連はなく，“ACL 損傷に起因する異常関節運動の制動”と“膝蓋下脂肪体”が媒介することで，ACL の保存的治癒が達成されたと考えられる。

研究 1 のまとめとして，ACL の治癒応答は，損傷後 12 時間以内に活性化し，モデル間での治癒応答の差を生じさせることが新たに明らかとなった。またこの治癒過程には，関節内組織である膝蓋下脂肪体の関与が考えられ，そのメカニズムには NF- κ B シグナルを通じた血管新生・抗アポトーシス作用が貢献している可能性が示唆された ($p<0.001$)。このため検証 2 では，ACL 損傷急性期から架橋形成されるまでの治癒過程において，NF- κ B を標的としたシグナルを阻害することで，ACL の治癒能力に影響が生じるのかを検証することとした。

4.4.1 研究限界

本研究結果を解釈するには，いくつか考慮すべき点がある。1つ目として，ACL 損傷方法が，臨床的損傷を模倣できていない点が挙げられる。臨床場面では，膝関節に異常に伸長ストレスが生じることで ACL が断裂する。これに対して，本研究では，外科的に関節包を切開して剪刀を用いて断裂しているため ACL 断端部の形状が治癒に及ぼす影響について

検証できない。2つ目に、本研究は *in vivo* 実験であるため、治癒過程における ACL 実質部と膝蓋下脂肪体の相互的作用についての解釈には限界がある。これを立証するためには、今後、*in vitro* での追加検証が必要である。3つ目に、本研究ではモデル間で ACL 損傷後の膝蓋下脂肪体の局在性に違いを認めたが、この違いが発生した要因については言及できない。これを解析するためには、膝蓋下脂肪体を対象とした分子生物学的解析及び *in vitro* 解析を追加で検証していく必要がある。

5 研究2：NF- κ B 阻害による完全損傷 ACL 自己治癒能の影響

5.1 背景と目的

研究1の結果から、ACL 損傷後の架橋結合には NF- κ B シグナルが関与する可能性が考えられた。NF- κ B シグナルは、炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子、酵素を含む多数の異なる遺伝子を制御する炎症性シグナル伝達経路である。NF- κ B は、炎症反応の応答としてアポトーシスを制御し、血管新生を刺激する。また NF- κ B のアップレギュレーションは、靭帯・腱損傷後のコラーゲン沈着、M ϕ 増員や ACL 線維芽細胞の細胞増殖能の向上を導く。検証 I では、CAM モデルと ACLT モデル間で、NF- κ B 遺伝子発現量に違いを認めたことから、研究2では、CAM モデルを対象に、NF- κ B シグナルの阻害因子を膝関節内に投与することで、損傷 ACL の治癒過程がどのような変化を生じさせるのかを検証することとした。

したがって、本研究の目的は、完全損傷 ACL の自己治癒能に、NF- κ B シグナルが関与するのかを検証することである。

5.2 方法

5.2.1 倫理的配慮

本研究内容は、埼玉県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て、動物実験基本計画書並びに動物実験ガイドラインに準じて実施した（承認番号 2021-7）。なお、動物倫理に配慮し、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

Wistar 系ラット（12 週齢／雄）40 匹を、CAM モデルに生理食塩水を

投与する群 (Control 群), CAM モデルに NF- κ B 阻害剤を投与する群 (Inhibit 群) の 2 群に振り分けた. 膝関節内への NF- κ B 阻害剤投与に関して, BMS-345541 (Chemscene LLC, NJ, USA) を生理食塩水で 500 μ M 濃度に溶解調整した. 膝関節内投与は, 週 3 回/50 μ l で実施し, モデル作成から 3 週間後まで投与を継続した. 両群の完全損傷 ACL の治癒状態を, 組織学 (モデル作成から 2/4/6 週間後 各 n=3)・分子生物学 (モデル作成から 2 週間後 各 n=6) 分析を用いて解析し, 治癒 ACL の物質特性に関して生体力学 (モデル作成から 8 週間後 各 n=5) 分析を用いて解析した. 生体力学解析における Intact 群には, 対側下肢を用いた. なお, Control 群の分子生物学解析に用いたラット 1 匹は飼育期間中に死亡した.

5.2.3 モデル作成方法

CAM モデル作成方法は, 「5.2.3 モデル作成方法」と同様の実験プロトコルにて実施した.

5.2.4 分子生物学的解析

ACL 実質部, 膝蓋下脂肪体における mRNA の発現を, Real-time PCR を用いて評価した. 実験手順, Reference gene, 相対定量法は, 5.2.5 分子生物学的解析 ; 2) Real-time reverse transcription polymerase chain reaction と同様の実験プロトコルにて実施した. Primer は Interleukin 1 receptor, type I (IL1R; Rn00565482_m1), TNFR (Rn01492828_g1), hypoxia-inducible factor 1 (Hif1a ; Rn01472831_m1), NF- κ B (Rn00595794_m1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA; Rn01511602_m1) を使用した. 分子生物学的解析に使用した Primer に

関して以下に記した.

遺伝子名	製品番号	VIC/FAM
interleukin 1 receptor, type I	Rn00565482_m1	FAM
lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	Rn01492828_g1	FAM
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	Rn01472831_m1	FAM
TRAF family member-associated NFKB activator	Rn00595794_m1	FAM
vascular endothelial growth factor A	Rn01511602_m1	FAM

5.2.5 組織学的解析

組織採取～切片作成は、「5.2.4 組織学的解析 1)組織採取～切片作成」と同様の実験プロトコルにて実施した.

1) HE 染色

損傷 ACL の治癒状態, 及び関節内組織の動態を調査するために実施した. 実施方法は, 5.2.4 組織学的解析 2) HE 染色と同様の実験プロトコルにて実施した.

2) IHC 染色

タンパク質局在観察のため IHC 染色を行った. 一次抗体には, VEGF-A polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, bs-4572R ; Bioass 社, USA), HIF-1 α polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, BS-0737R ; Bioass 社, USA), PDGF-B polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, ab178409 ; Abcam 社, UK), α -SMA polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, GTX100034 ; GeneTex 社, USA) を, それぞれ PBS で希釈して用いた. 以降の方法は, 5.2.4 組織学的解析 3)IHC 染色と同様の実験プロトコ

ルにて実施した.

3) Picro-Sirius Red 染色

損傷 ACL の治癒領域における I 型・III 型コラーゲン組織の局在性を調査するために行った. Picrosirius Red Stain Kit (コスモ・バイオ株式会社.東京.日本)を用いて, メーカー推奨のプロトコールに沿って実施した.

工程	時間
蒸留水リンス	5min×3set
溶液A	2min
蒸留水リンス	5min×3set
溶液B	60min
溶液C	2min
70%ethanol	45sec
脱水・透徹封入	

5.2.6 生体力学的解析

1) サンプル採取

各群の対象ラットを, 組織採取と同様の処置で安楽死させた. その後, 各群, 生体力学的検討用に両後肢の大腿骨-ACL-脛骨複合体を採取した. それ以外の関節包, 膝蓋下脂肪体, 後十字靭帯, 内側・外側側副靭帯, 内側・外側半月板, 筋は切除した. 採取した大腿骨-ACL-脛骨複合体は, 採取後すぐに生理食塩水に浸したガーゼで包み, 引張試験を実施した.

2) 引張試験

採取した大腿骨-ACL-脛骨複合体を, 引張試験の 1 時間前に自然解凍し, 引張試験機・UniVert (オレンジサイエンス株式会社, 神奈川, 日本) に設置した. その後, 大腿骨顆部と脛骨高原を, カスタムメイドした治具に固定した (図 5). 引張方向は, ACL 線維束に沿う方向に設定した.

試験プロトコールは、室温下で、試験中は組織の乾燥を防ぐために生理食塩水を噴霧した。予荷重は 0.1N，引張速度は 5mm/min に設定し，破断強度 (Load to failure) (N)，破断時変位量 (Displacement) (mm) をコンピューターで測定し，得られた値をもとに応力-歪み曲線を作成し，剛性 (Stiffness) (N/mm) を算出した。

5.2.7 統計解析

全ての統計解析は，jamovi Version1.6.23.0 (<https://www.jamovi.org/>) を用いて実施した。分子生物学分析に関するデータに対して，正規性を示し，等分散性を認めるデータに対しては，Student t 検定を用いた。生体力学分析に関するデータに対して，正規性を示し，等分散性を認めるデータに対しては，一元配置分散分析を実施し，事後検定として Games-Howell 検定を用いた。全ての有意水準は， $p=0.05$ とした。

5.3 結果

5.3.1 分子生物学解析結果

各群の ACL 実質部と膝蓋下脂肪体における分子生物学的応答の違いを調査するために，Interleukin 1 receptor, type I (IL1R; Rn00565482_m1)，TNFR (Rn01492828_g1)，hypoxia-inducible factor 1 (Hif1a ; Rn01472831_m1)，NF- κ B (Rn00595794_m1)，vascular endothelial growth factor A (VEGFA; Rn01511602_m1) の相対発現量を比較した。

ACL 実質部では，Control 群と比較して Inhibitor 群で解析した全因子 mRNA 発現量で有意差を認めなかった。膝蓋下脂肪体では，Control 群と比較して Inhibitor 群で Il1r1，TNFR，HIF-1 mRNA が優位に発現増加したが (各 $p < 0.001$ ， $p < 0.001$ ， $p = 0.003$ ， $p = 0.028$)，VEGFA

mRNA は、有意に発現減少した($p = 0.028$) (図 15・図 16).

5.3.2 組織学解析結果

Control 群, Inhibitor 群ともに損傷後 2 週時点で ACL 断端部が関節内組織と結合し, 連続性を認め, 損傷領域には I・III 型コラーゲンの局在性を認めた. しかし Inhibitor 群では Control 群と比較して, 治癒靭帯が繊弱な組織であり, 関節内組織 (膝蓋下脂肪体・滑膜組織) の細胞増殖量も少ない組織像を観察した. また治癒靭帯領域では, Control 群では経時的に I 型コラーゲンが多く観察された一方で, Inhibitor 群では I 型コラーゲンの局在性に変化はなかった (図 17 図 18).

VEGF・ α -SMA を対象とした IHC 結果から, 損傷後 2 週時点で Control 群では幼若な血管が形成され, 損傷後 6 週時点では血管径サイズが肥大する様子を観察した. 一方 Inhibitor 群では損傷後 4 週時点まで幼若な血管が観察され, 損傷後 6 週時点で Control 群における 2 週時点での血管形態と類似した血管が観察された. また Control 群, Inhibitor 群ともに, 損傷後 6 週時点においても VEGF・ α -SMA が血管内皮組織で濃染された組織像を観察した (図 19 図 20). HIF-1 α を対象とした IHC 染色では, 両群間の染色性に違いは認めなかった. PDGFA を対象とした IHC 染色では, 損傷後 2 週時点において PDGF 陽性細胞が, Inhibitor 群で Control 群と比較して少ない傾向が観察された. 損傷後 4・6 週時点における染色性には差は認めなかった (図 21 図 22).

5.3.3 生体力学解析結果

破断強度 (Load to failure) は, Inhibitor 群は, Control 群と比較して有意に低値であり ($p = 0.037$), Intact 群と比較して Control 群,

Inhibitor 群は有意に低値であった (各 $p < 0.001$, $p < 0.001$). 破断時変位量 (Displacement) は, Inhibitor 群と比較して Intact 群で有意に高値であった ($p = 0.011$). 剛性 (Stiffness) は, Control 群, Inhibitor 群は Intact 群と比較して有意に低値であった (各 $p = 0.029$, $p = 0.007$) (図 23).



図 15 ACL 実質部を対象とした Realtime-PCR 解析

損傷後 2 時間時点における ACL 実質部の遺伝子相対発現量を示す。Control 群と Inhibitor 群で遺伝子発現量に有意差は認めなかった。全てのデータは平均値±SD 値で示した。(縦軸単位: Fold)

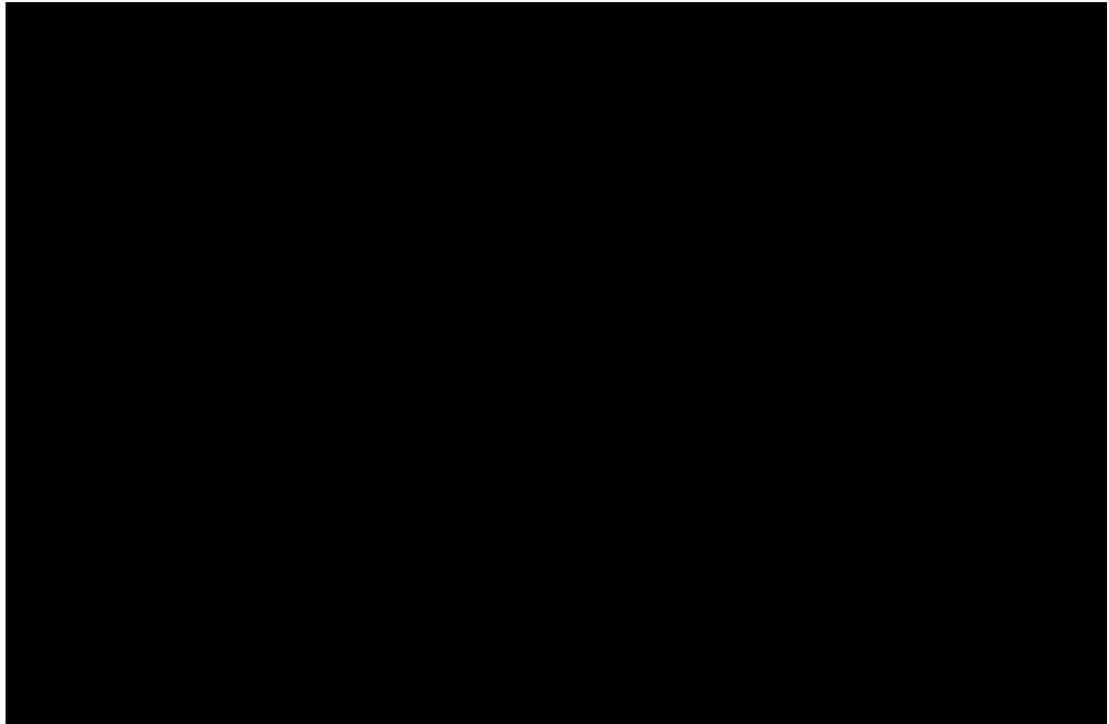


図 16 膝蓋下脂肪体を対象とした Realtime-PCR 解析

損傷後 2 時間時点における ACL 実質部の遺伝子相対発現量を示す。Control 群と Inhibitor 群で IL1R, TNFR, HIF-1 α , VEGFA mRNA 発現量に有意差を認めた (各 $p < 0.001$, $P < 0.001$, $P = 0.003$, $P = 0.028$)。全てのデータは平均値 \pm SD 値で示した。(縦軸単位: Fold)

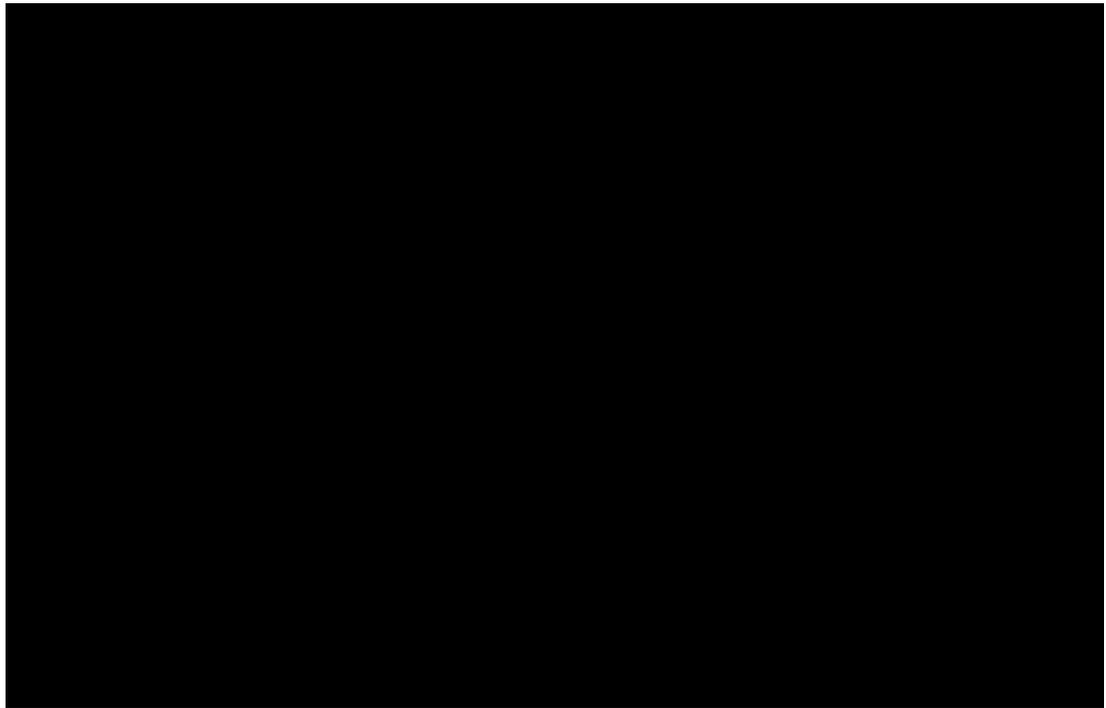


図 17 ACL 損傷後の治癒動態

ACL 損傷後における治癒動態を HE 染色した組織像を示す. Control 群, Inhibitor 群ともに連続性は認めしたが, Control 群と比較して Inhibitor 群では膝蓋下脂肪体の増殖量が少なく, 治癒領域に菲薄な組織を認めた (黒矢印). スケールバー $500 \mu\text{m}$.



図 18 治癒領域における膠原組織の局在性

Picro-Sirius Red 染色像を示す。Control 群, Inhibitor 群ともに I 型・III 型コラーゲンの局在性は認めるが, Control 群で I 型コラーゲン局在性を広範囲で認める。緑は III 型コラーゲン, 黄色は I 型コラーゲンを示す。スケールバー 黒 : $500 \mu\text{m}$ 白 : $50 \mu\text{m}$ 。

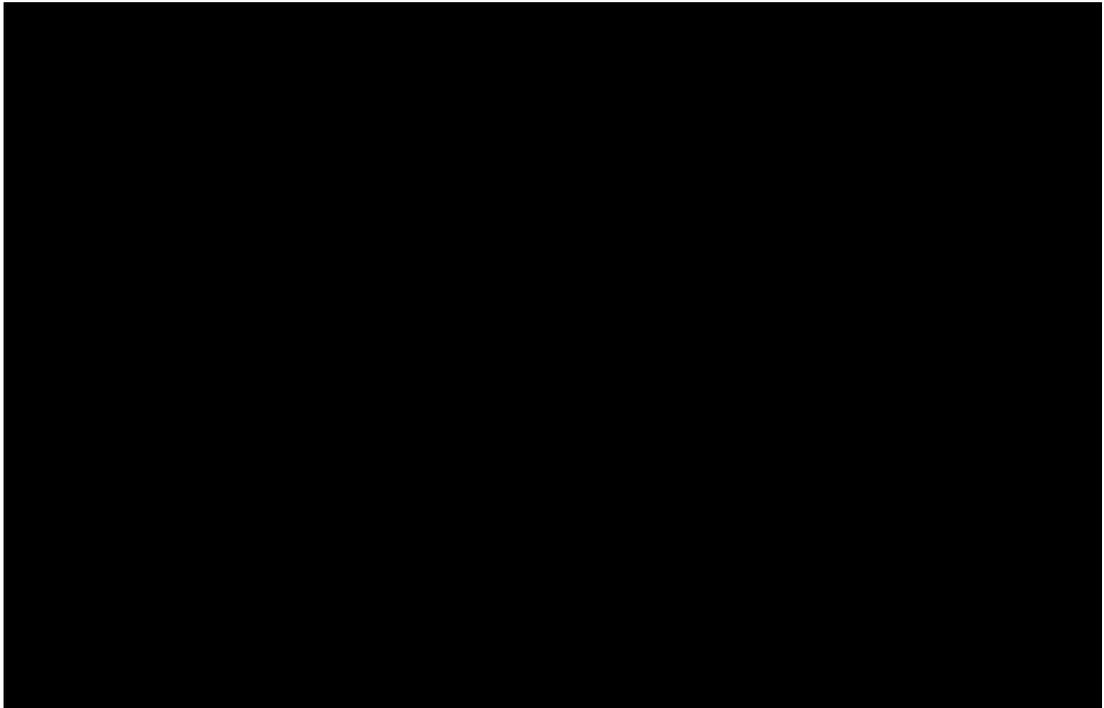


図 19 ACL 損傷後の治癒領域における VEGFA 染色像

血管内皮増殖因子 VEGFA IHC 染色像を示す。Control 群では、損傷後 2 週間時点で血管新生を認めたが、Inhibitor 群では損傷後 6 週時点で類似した血管新生を認めた。黒矢印は血管新生部を示す。スケールバー：50 μ m.

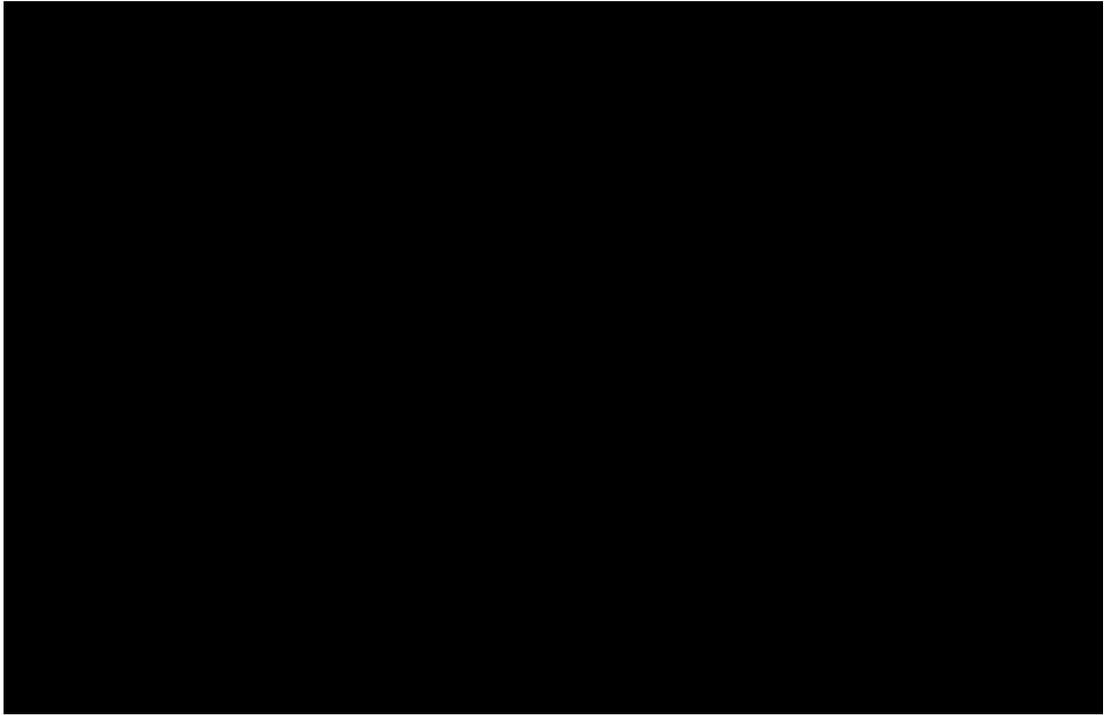


図 20 ACL 損傷後の治癒領域における α -SMA 染色像

α -SMA IHC 染色像を示す。両群ともに経時的に血管周囲の平滑筋アクチン部の染色性を認め、Control 群で血管径が大きいことを認めた（黒矢印）。治癒領域部の細胞は、Control 群では濃染されているが、Inhibitor 群では認めなかった（赤矢印）。スケールバー：50 μ m。

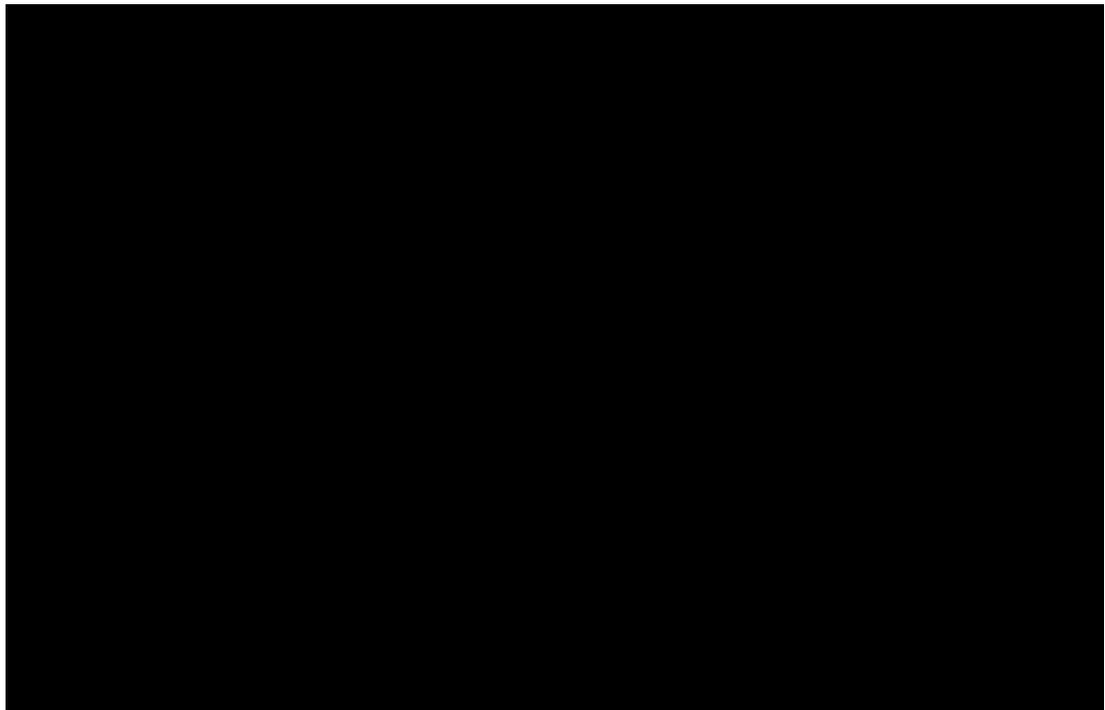


図 21 ACL 損傷後の治癒領域における PDGF-B 染色像

PDGF-B 染色像を示す。Control 群では損傷後 2 週時点から濃染されている組織像を観察し、損傷後 6 週時点まで観察した。Inhibitor 群では、Control 群と比較して染色性は認めなかった（黒矢印）。スケールバー：
50 μ m.

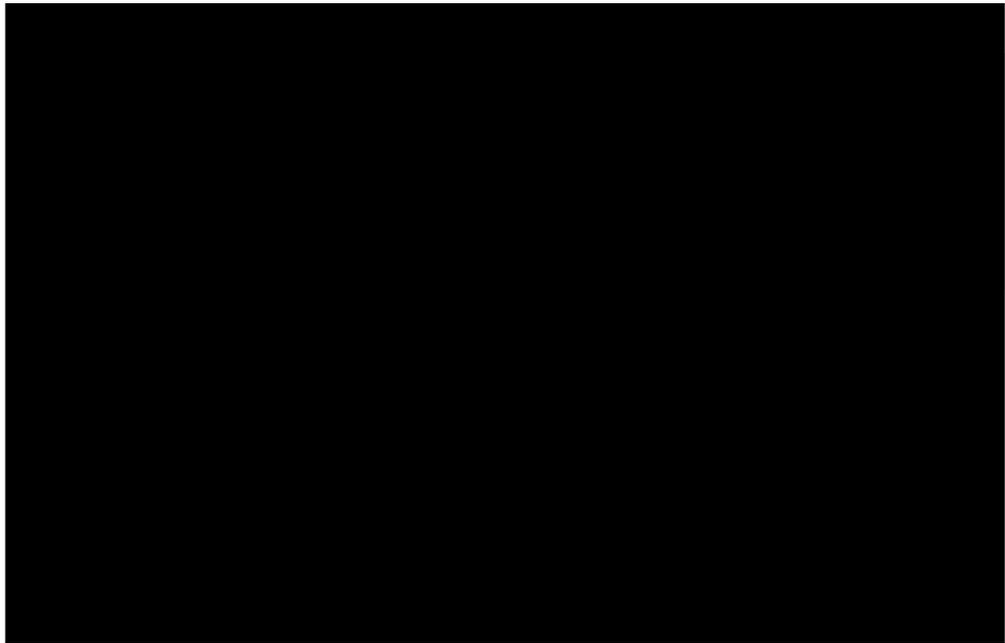


図 22 ACL 損傷後の治癒領域における HIF-1 α 染色像

HIF-1 α 染色像を示す. Control 群, Inhibitor 群で染色性に違いは認めなかった. スケールバー : 50 μ m.

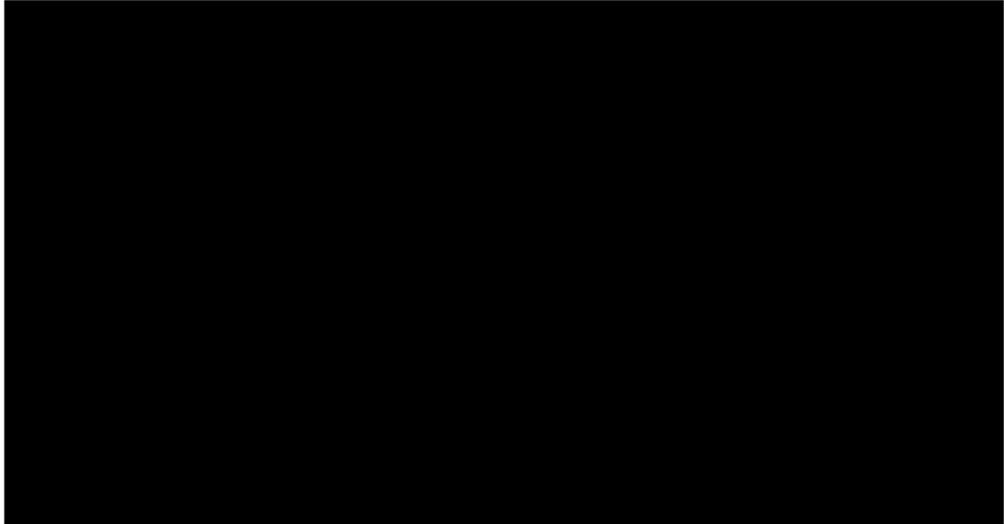


図 23 治癒 ACL の生体力学的解析

治癒 ACL の生体力学的解析の結果を示す。破断強度は、Control 群と Inhibitor 群で有意差を認めた ($p=0.037$)。全てのデータは平均値±SD 値で示した。

5.4 考察

研究2では、NF- κ B阻害(BMS-345541)を、ACL損傷後の膝関節内へ投与することで、損傷ACLの治癒応答への影響を調査した。NF- κ Bは、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子の一つであり、急性および慢性炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの生理現象に関与している。本研究では、Inhibitor群ではControl群と比較して、治癒ACL領域の血管新生能、コラーゲン合成能が低く、治癒ACLの力学強度が脆弱であることが明らかとなった。本研究におけるControlモデルとInhibitorモデルの違いはNF- κ B阻害薬の投与の有無である。分子生物学的解析では膝蓋下脂肪体における遺伝子発現量の違いは認められたが、ACL実質部では認めなかった。また組織学解析では、ACL損傷後の膝関節内において膝蓋下脂肪体の増殖度に違いを認めた。そのため、ACL損傷後の治癒応答の違いを生んだ要因としては、NF- κ B阻害薬が膝蓋下脂肪体への作用を通じて、間接的にACLの治癒応答不全を生じさせた可能性が高い。先行研究では、急性屈筋腱障害と修復モデルでNF- κ Bシグナルが活性化され、I型・III型コラーゲン発現が増加し、筋線維芽細胞とM ϕ が増加すると示されている^{48,49}。一方、腱細胞のNF- κ Bシグナルを阻害すると、腱治癒過程における腱細胞の増殖とアポトーシスが減少し、線維組織の形成と炎症が減少するとも報告されている⁵⁰。腱や筋線維芽細胞は、炎症後の治癒段階で典型的なNF- κ Bシグナルの活性化を維持し、ヒト腱癒痕組織では継続的なNF- κ B活性化を認めている。すなわち、NF- κ Bシグナルは、腱損傷急性期では免疫応答、組織再生に貢献し、治癒段階では腱線維化の進行を促進することを示している⁴⁸。本研究では、損傷直後からNF- κ B阻害薬を投与していたことから、膝関節内の免疫応答低下による炎症の蔓延化、及びコラーゲン産生・

合成能が低下し、ACLの治癒不全につながったと考えられる。また近年の再生医療の領域では、靭帯細胞、腱細胞、骨細胞など間葉系組織に分化可能な間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）が注目を集めている⁵¹⁾。ACL損傷患者を対象とした研究では、膝関節内におけるMSCが、正常膝と比較して100倍以上存在する⁵²⁾。MSCは、炎症抑制効果、細胞増殖促進効果、血管新生促進効果などをもつサイトカイン・増殖因子を分泌し、パラクラインを介して組織修復を支持する⁵³⁾。特に脂肪組織由来MSCは、結合組織の修復促進^{54,55)}、損傷した関節軟骨の再生促進作用がある^{56,57)}。これらのMSCは、NF- κ Bシグナルを通じて血管新生を促進することから^{58,59)}、本研究で用いたNF- κ B阻害薬は、膝蓋下脂肪体に存在する幹細胞の作用を抑制することで、ACLの治癒能力を低下させた可能性も考えられる。

本研究におけるBMS-345541の投与計画について、該当薬剤を靭帯損傷モデル及び靭帯細胞に投与した先行研究は、筆者が渉猟した限り認めなかった。Murahashiらは、20-30g C57BL/6Jマウスを対象に、BMS-345541を0.5 μ M～5 μ Mで調整10ml膝関節腔内へ投与したところ、変形性膝関節症の発症を抑制し、ヒト軟骨細胞の培地へ同濃度で阻害薬を投与すると、NF- κ B発現量を抑制していることを確認している⁶⁰⁾。本研究での対象動物はWistar系雄性ラットであり、C57BL/6Jマウスと比較して体重が10倍程度あることから、膝関節腔内容積はマウス比1000倍に定めた。またACL損傷急性期では膝関節が腫脹するため、投与量を少量にコントロールする必要があると判断したため、本研究では、投与量50 μ l, mol濃度500 μ Mに設定した。これにより先行研究と同様の薬剤作用効果を担保した。また投与頻度について、ACL損傷後に損傷ACLの断端部同士が結合し、治癒領域にI型・III型Collagenの局在

性を認めているのは、損傷後 4 週時点が最短である²⁹⁾。本研究では、損傷 ACL の断端部が膝蓋下脂肪体との結合を介した後に、ACL 同士が結合すると仮説立てていることから、損傷急性期における膝蓋下脂肪体の作用を継続的に抑制する必要があった。また先行研究より本実験で用いた投与頻度により NF- κ B 作用を抑制できることが明らかとなっていたこと⁶⁰⁾、研究 1 の結果から、膝蓋下脂肪体の作用には NF- κ B シグナルが関与することが証明されたことから本実験の投与濃度・頻度を計画した。

通常、NF- κ B は細胞質に存在する I κ B タンパク質と結合し不活性化されているが、I kappa B kinase (IKK) α/β から構成される IKK 複合体の活性化により、I κ B タンパク質がリン酸化され、NF- κ B が核内移行することで転写を開始する。IKK α は、炎症応答に対して M ϕ の NF- κ B 活性化を制限し、炎症抑制に寄与するが⁶¹⁾、本研究で使用した BMS-345541 は IKK α/β 高選択性阻害剤であるため炎症抑制作用が阻害された可能性がある。そのため損傷後 2 週時点での膝蓋下脂肪体における IL1R, TNFR mRNA 発現量が有意に増加したと考えられる。また M ϕ からの VEGF 発現は NF- κ B 依存的であるため⁶²⁾、VEGF mRNA 発現量低下が生じたと示唆される。一方で、非酸素濃度依存的経路において NF- κ B シグナル下流因子に位置する HIF-1 α mRNA 発現量は増加した。この要因として、別カスケードで HIF-1 α を制御する酸素濃度依存的経路の関与が示唆される⁶³⁾。炎症組織は免疫細胞の浸潤や代謝亢進によって酸素消費され低酸素状態に陥るため⁶⁴⁾、低酸素応答としてプロリン水酸化酵素 (PHD) -HIF 経路を介して HIF-1 α mRNA 発現量が増加した可能性がある。損傷後 2 週時点での膝蓋下脂肪体において、NF- κ B mRNA 発現量にモデル間で有意差は認めなかったが、上記背景を考慮す

ると、適切に膝関節内組織で阻害薬が作用したと考えられる。

従来の研究では、ACL 実質部の治癒能力に着眼して検証していた。しかし、ACL 損傷後の治癒応答には関節内組織、特に膝蓋下脂肪体が関与することで、断端同士が架橋結合し、治癒領域への血流供給、コラーゲン産生・合成を達成し、このメカニズムには NF- κ B シグナルが関与している可能性が示された。これに対して研究 2 では、膝関節腔内へ IKK α/β 複合体阻害薬を投与することで、膝蓋下脂肪体を介して完全損傷 ACL の自然治癒力を抑制することを明らかにした。研究 1・2 から ACL の治癒応答には膝蓋下脂肪体が関与することが証明された。そのため臨床における ACL 損傷後治療を促進する方法としては、膝蓋下脂肪体の機能を促進する方法を検証する必要があった。このため研究 3 では、ACL 損傷膝の膝蓋下脂肪体に多数存在する脂肪幹細胞に着目して ACL の治癒応答を検証することとした。

5.4.1 研究限界

本研究の結果を解釈するにあたり考慮すべき点がある。1 つ目として、本研究では、阻害薬の関節内投与を実施しない群 (Sham 群) を用意していないため、マイクロシリンジを用いた関節内投与による影響については検証できていない。2 つ目に、BMS-345541 の効果作用について、*in vitro* 検証を実施していないため、使用濃度が適切であったか検証できていない。しかし先行研究にて 100 μ M 濃度で阻害作用が十分に立証されていることから、本研究で使用した阻害薬濃度については適切であったと考えられる⁶⁵⁾。

6 研究3：脂肪幹細胞由来エクソソームは、完全損傷 ACL の自己治癒能を促進しうるか

6.1 研究目的および仮説

完全損傷 ACL に対する保存療法を臨床応用する上では、より確実に、より力学強度が優れた ACL へ再生させることが重要である。そのためには、損傷 ACL の治癒を促進する治療法を確立する必要がある。研究1・2の結果から、完全損傷 ACL の治癒応答には、関節内組織（膝蓋下脂肪体）が関与し、治癒 ACL の治癒状態に影響を与えることがわかった。このため、研究3では膝蓋下脂肪体に着目して、完全損傷 ACL の治癒を促進する治療法について検証することとした。

ACL 損傷後の膝蓋下脂肪体には、多数の MSC が存在しており、これらの脂肪由来 MSC は、未分化状態でパラクラインを介して組織修復の促進、修復部位へホーミング、また修復組織への細胞へ分化することで再生を促すと報告されている⁵²⁾。MSC は、未分化状態でパラクラインを介して組織修復の促進、修復部位へホーミング、また修復組織への細胞へ分化することで再生を促すと報告されている⁵³⁾。また近年では、MSC から分泌されるエクソソームにも、MSC と同様の治療効果があることが報告されている⁶⁶⁾。本研究では、臨床への応用を想定し、脂肪細胞と比較して、より簡易的に扱える脂肪幹細胞由来エクソソームを用いることで、完全損傷 ACL の治癒を促進しうるのかを検証することとした。

6.2 方法

6.2.1 倫理的配慮

本研究内容は、埼玉県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て、動物実験基本計画書並びに動物実験ガイドラインに準じて実施した（承認番

号 2022-07). なお, 動物倫理に配慮し, 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

Wistar 系ラット (12 週齢/雄) 28 匹を, CAM モデルに PBS を投与する群 (Control 群), CAM モデルにヒト脂肪幹細胞由来エクソソームを投与する群 (Exo 群) の 2 群に振り分けた. 膝関節内への Exosomes 投与に関して, Phicello&Phisome (株式会社フコク, 埼玉, 日本) を用いて 50^{10} particles/mL に調整した. 膝関節内投与は, マイクロシリンジを用いて週 1 回/40 μ l で実施し, モデル作成から屠殺まで投与を継続した. 両群の完全損傷 ACL の治癒状態を, 組織学 (モデル作成から 2/4/6 週間後 各 n=3)・生体力学 (モデル作成から 8 週間後 各 n=5) 分析を用いて解析した. 生体力学解析における Intact 群には, 対側下肢を用いた.

6.2.3 モデル作成方法

CAM モデル作成方法は, 「5.2.3 モデル作成方法」と同様の実験プロトコルにて実施した.

6.2.4 組織学的解析

組織採取～切片作成は, 「5.2.4 組織学的解析 1)組織採取～切片作成」と同様の実験プロトコルにて実施した.

2) HE 染色

損傷 ACL の治癒状態, 及び関節内組織の動態を調査するために実施した. 実施方法は, 5.2.4 組織学的解析 2) HE 染色と同様の実験プロトコ

ルにて実施した.

2) IHC 染色

タンパク質局在観察のため IHC 染色を行った. 一次抗体には, VEGF-A polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, bs-4572R ; BioSS 社, USA), HIF-1 α polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, BS-0737R ; BioSS 社, USA), PDGF-B polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, ab178409 ; Abcam 社, UK), α -SMA polyclonal antibody (希釈率 1 : 1000, GTX100034 ; GeneTex 社, USA) を, それぞれ PBS で希釈して用いた. 以降の方法は, 5.2.4 組織学的解析 3)IHC 染色と同様の実験プロトコルにて実施した.

3) Picro-Sirius Red 染色

損傷 ACL の治癒領域における I 型・III 型コラーゲン組織の局在性を調査するために行った. 「6.2.4 組織学的解析; 3)Picro-Sirius Red 染色」と同様の実験プロトコルにて実施した.

6.2.5 生体力学的解析

「6.2.6 生体力学的解析」と同様の実験プロトコルにて実施した.

6.2.6 統計解析

全ての統計解析は, jamovi Version 1.6.23.0 (<https://www.jamovi.org/>) を用いて実施した. 生体力学分析に関するデータに対して, 正規性を示し, 等分散性を認めるデータに対しては, 一元配置分散分析を実施し, 事後検定として Games-Howell 検定を用いた. 全ての有意水準は, $p=0.05$ とした.

6.3 結果

6.3.1 組織学解析結果

Control 群, Exo 群ともに損傷後 2 週時点で, ACL 断端部と関節内組織が結合し, 架橋結合する組織像を観察した. 損傷後 2 週時点では, 損傷領域の組織像は菲薄であるのに対して, 両群ともに時間経過とともに組織が成熟する組織像を観察している. 特に損傷後 6 週時点における Exo 群は, ACL の走行に沿って膠原線維が配向している様子を認めている (図 24). また治癒領域のコラーゲン局在性を調査すると, Control 群では損傷後 2 週時点で III 型コラーゲンが観察され, 損傷後 6 週時点で I 型コラーゲンがわずかに観察されるのに対して, Exo 群では損傷後 II 週時点で I 型コラーゲンの局在性を認め, 時間経過とともに I 型コラーゲンが濃染される組織像を観察している (図 25). VEGF・ α -SMA を対象とした IHC 染色では, Control 群・Exo 群に血管形成能・ α -SMA 陽性細胞染色像に顕著な差は認めなかったが (図 26 図 27), 血管新生は Exo 群で多く認めた. また治癒領域部の細胞は, 両群ともに, 損傷後 6 週時点で α -SMA で濃染されていた. 低酸素状態の指標である HIF-1 α を対象とした IHC 染色像では, 損傷後 2 週時点における Control 群で濃染されている様子を認めた (図 29). PDGF を対象とした IHC 染色像を見ると, Control 群では損傷後 6 週時点で細胞が濃染されているのに対して, Exo 群では損傷後 2 週時点で強い染色性を認めている (図 28).

6.3.2 生体力学解析結果

破断強度 (Load to failure) は, Control 群, Exo 群は Intact 群と比較して有意に低値であり (各 $p<0.01$, $p<0.01$), Ex 群は Control 群と比較して高値の傾向があった ($p=0.054$). 破断時変位量 (Displacement)

は、Exo 群、Intact 群は、Control 群と比較して有意に高値であった（各 $p=0.001$, $p=0.015$ ）。剛性（Stiffness）は、Control 群、Exo 群は Intact 群と比較して有意に低値であった（各 $p<0.01$, $p<0.01$ ）（図 30）。



図 24 ACL 損傷後の治癒動態

ACL 損傷後における治癒動態を HE 染色した組織像を示す. Control 群, Exo 群ともに連続性は認めた. スケールバー 500 μ m.



図 25 治癒領域における膠原組織の局在性

Picro-Sirius Red 染色像を示す。Control 群, Exo 群ともに I 型・III 型
コラーゲンの局在性は認めるが, Exo 群で I 型コラーゲン局在性を広範
囲で認める。緑は III 型コラーゲン, 黄色は I 型コラーゲンを示す。スケ
ールバー 黒 : $500\ \mu\text{m}$ 白 : $50\ \mu\text{m}$ 。



図 26 ACL 損傷後の治癒領域における VEGFA 染色像
血管内皮増殖因子 VEGFA IHC 染色像を示す。黒矢印は血管新生部を示す。スケールバー：50 μ m.

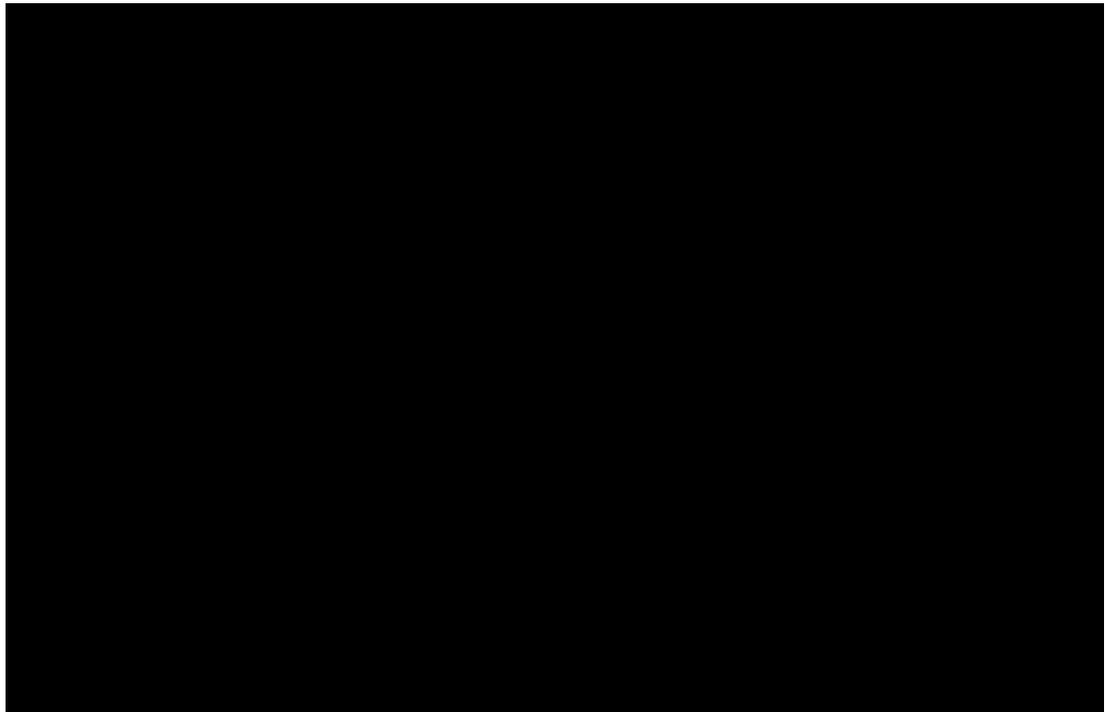


図 27 ACL 損傷後の治癒領域における α -SMA 染色像

α -SMA IHC 染色像を示す。血管周囲の平滑筋アクチン部の染色性を認め、Exo 群で血管径が大きいことがわかる（黒矢印）。治癒領域部の細胞は、両群ともに、損傷後 6 週時点で濃染されていた（赤矢印）。スケールバー：50 μ m.



図 28 ACL 損傷後の治癒領域における PDGF-B 染色像

PDGF-B 染色像を示す。Control 群では損傷後 6 週時点で細胞が濃染されているのに対して，Exo 群では損傷後 2 週時点で強い染色性を認めた（黒矢印）。スケールバー：50 μ m。

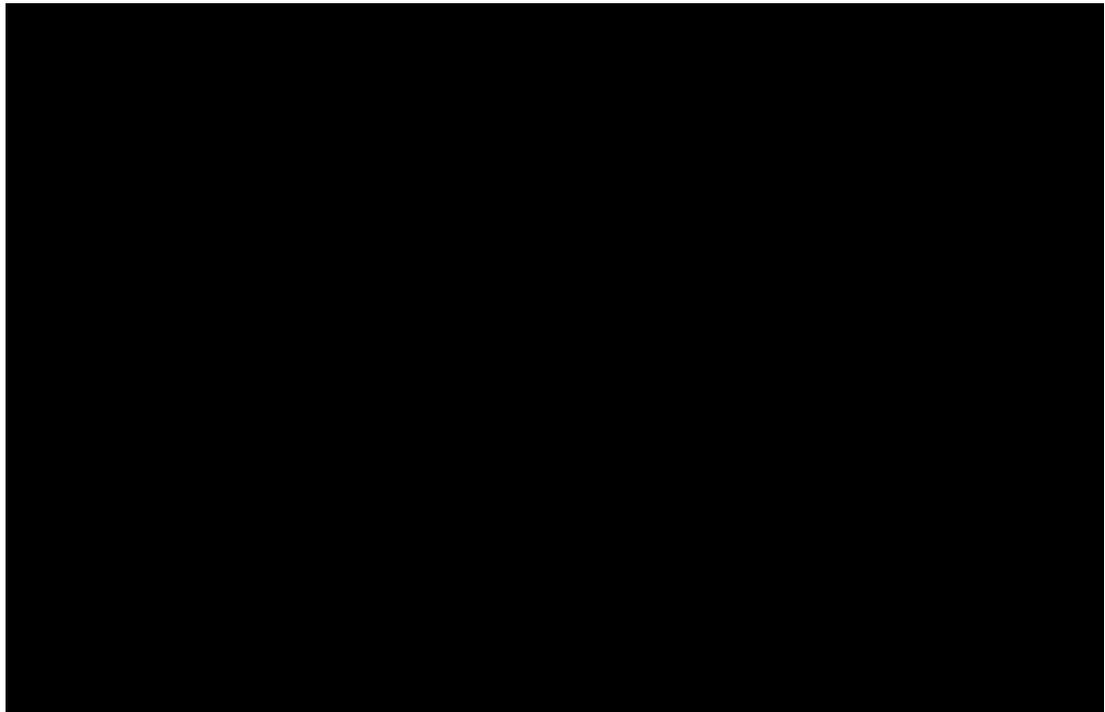


図 29 ACL 損傷後の治癒領域における HIF-1 α 染色像

HIF-1 α 染色像を示す. Control 群, Exo 群で染色性に違いは認めなかった. スケールバー : 50 μ m.

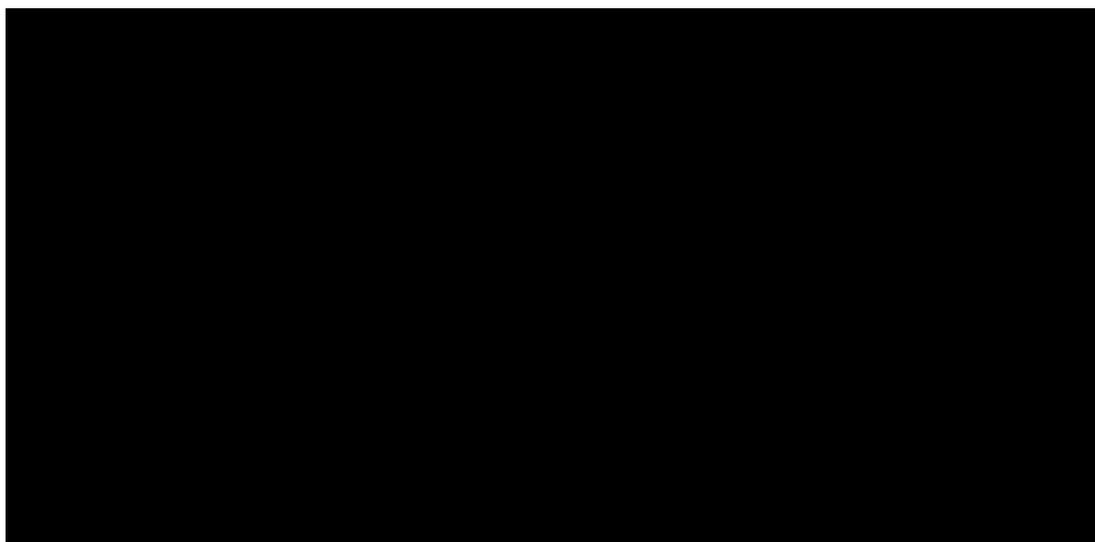


図 30 治癒 ACL の生体力学的解析

治癒 ACL の生体力学的解析の結果を示す。破断強度は, Exo 群が Control 群より強い傾向があった ($p=0.054$)。全てのデータは平均値 \pm SD 値で示した。

6.4 考察

研究3では、脂肪幹細胞由来エクソソームが、完全損傷 ACL の治癒に与える影響について検証した。筋骨格組織障害に対する間葉系幹細胞由来エクソソームの治療効果については、肩関節腱板損傷⁶⁷⁻⁷³⁾、アキレス腱損傷^{74,75)}、膝関節軟骨損傷⁷⁶⁻⁷⁸⁾、再建 ACL^{79,80)}、皮膚創傷⁸¹⁻⁸³⁾、心筋⁸⁴⁾などに応用され、一定の治療効果が報告されている。これらの研究の多くで、脂肪幹細胞由来エクソソームは損傷初期において M1 から M2 へ M ϕ 極性を変化させることにより、Interleukin -10、Transforming Growth Factor - β などの多くの抗炎症因子を高発現させ、局所炎症を抑制し、再生と修復を促進すると報告されている。本研究では、損傷後 2 週時点で Exo 群において PDGF 陽性細胞を多く認め、Control 群において HIF-1 α が濃染されていた。これらはエクソソームが損傷急性期から ACL 損傷領域へ作用することにより、Exo 群で治癒応答が促進された可能性を示すものである。また幹細胞由来エクソソームが、アポトーシス減少の誘導^{85,86)}や、損傷部への血管新生を促すことにより損傷組織の治癒を促進したとする報告⁸⁷⁻⁸⁹⁾、また骨髄由来幹細胞エクソソームが細胞の増殖、遊走及び移動能力を促進し、損傷部の修復を促すことも明らかとなっている⁷¹⁾。実際に、ACL 再建膝へ脂肪幹細胞由来エクソソームを投与した先行研究では、移植グラフト、骨孔部において多くの M2 ϕ が検出され、組織学的・生体力学的に改善したと報告されている⁸⁰⁾。本研究において、Exo 群では Control 群と比較して損傷急性期における免疫応答が活性化し、Transforming Growth Factor - β や PDGF などの成長因子の放出、血管新生が促進されたことで、治癒領域における I 型コラーゲン局在領域が増加した可能性がある。

本研究では治癒 ACL の力学強度に関して、Exo 群は Control 群と比べ

て最大破断強度は強い傾向があった ($p=0.053$)。再建 ACL や肩関節腱板組織を対象とした力学解析では、同様にエクソソームを投与した群で力学強度が優れていることを報告している^{69,71-73,79,80,90}。これらの研究では、損傷部へのエクソソームの投与方法について様々な方法が用いられている。エクソソーム含有液が流れないようにハイドロゲルで安定させて投与する方法⁸⁰や、エクソソームと M ϕ の共培養後、M2 ϕ へ極性変化させてから投与する方法⁹⁰が報告されている。また ACL 再建モデルの投与頻度を見ると、週 1 回経時的に関節内投与し力学的強度の改善を認めている⁸⁰。ACL 再建靭帯の場合は、グラフトの再靭帯化には宿主細胞の増殖及び再血流化までに時間を要するために、力学強度は再建直後から一度弱化した後に再度向上する。そのため、長期間に渡って、経時的にエクソソームを投与する必要がある。一方で、ACL 損傷の場合は、損傷急性期からの治癒応答を促進することが非常に重要であったと考えられ、損傷初期に頻回かつ多量に関節内投与することで、急性損傷後の炎症反応が早期に抑制され、損傷組織の再生が促進される可能性が示唆された。したがって、ACL 損傷後に保存療法を適応するモデルでは、損傷急性期に頻回かつ大量にエクソソームを投与するのが、より適した投与方法であった可能性がある。また過去の我々の先行研究と本研究結果を比較すると、治癒 ACL の破断強度は、Exo 群は通常の CAM 群と比較して劣っていた (正常靭帯比)⁴⁹。マイクロシリンジを用いて関節内へエクソソームを投与する際に、繰り返し膝関節包内に微細炎症を誘発し異化作用が働いたことで、ACL の治癒を阻害した可能性はある。ただ本研究は、ACL 損傷に対してエクソソームを用いて保存的に治癒を促進しようとした世界で初めての研究である。そのため今後も投与方法及び投与量・頻度については検証を繰り返し、治癒を促進する最適な治療方法

を提示する必要がある。

6.4.1 研究限界

本研究の結果を解釈するにあたり考慮すべき点がある。1つ目は、生体力学解析には、Control群、Exo群、Intact群の3群比較を実施したが、関節投与のないSham群を用いていない。そのため、関節内投与の影響を推し量ることはできない。2つ目として、本研究では損傷後8週時点でのみ生体力学的解析を行っているため、治癒ACLの経時的な力学的強度の変化については検証できていない。3つ目として、本研究では治癒ACLの力学的強度をin vitroでのみ解析しており、脛骨の前方引き出しに対する制動力などin vivoでの解析を行っていないため、膝関節機能に対して治癒ACLがどの程度貢献していたかを言及できない点が挙げられる。すなわち本研究結果より得られた治癒ACLの力学的強度の値は、in vivoにおける脛骨の前方剪断力に対して同程度作用するのかに関しては言及できない。

7 総括

本論文では、完全損傷 ACL の治癒メカニズムを紐解くために、CAM モデルを用いて関節内組織に着目して解析を実施した。その結果、損傷 ACL の断端部同士の架橋結合及び治癒能力に、膝蓋下脂肪体が NF- κ B シグナルを介して関与する可能性を新たに示した。

研究 1 では、ACL 損傷急性期に着眼し、損傷 ACL 断端部が架橋結合するまでのメカニズムを組織学・分子生物学的・血管形態学解析により明らかにした。その結果、損傷した ACL の架橋結合には、膝蓋下脂肪体が関与し、M ϕ 極性変化を通じて ACL 断端部の免疫応答を活性化することを明示した。ACL 損傷後の膝蓋下脂肪体には多くの MSC が包含されること⁵²⁾、また MSC が M ϕ に働きかけることで M1 ϕ から M2 ϕ へ極性変化を生じさせると報告⁸⁷⁻⁸⁹⁾されていることから、そのメカニズムの妥当性が支持された。また μ CT を用いた血管形態学解析では ACL 損傷後の膝関節包内の血管量を解析し、CAM 群において関節包内に活発に血管新生され、損傷 ACL の断端部と膝蓋下脂肪体が結合することで、膝蓋下脂肪体を介して ACL 断端部へ血流・栄養供給を行っている可能性を示した。また、この一連のメカニズムには、遺伝子網羅的解析により NF- κ B シグナルが関与する可能性を示した。

そのため研究 2 では完全損傷 ACL の治癒メカニズムに対する NF- κ B の役割について、CAM モデルを対象に、NF- κ B 阻害薬を用いて ACL の治癒応答を検証した。その結果、NF- κ B 阻害薬が膝蓋下脂肪体への作用を介して、ACL の治癒能力を阻害しうる可能性を示した。NF- κ B が免疫応答及び幹細胞の作用の制御因子であることから、この妥当性は支持される。

研究 3 では、脂肪幹細胞由来エクソソームが、完全損傷 ACL の治癒応

答を促進しうるかを組織学・生体力学的解析により明らかにした。その結果、脂肪幹細胞由来エクソソームを投与したほうが、損傷した ACL の治癒が促進される傾向があることを示した。しかし、投与する方法・量・頻度・タイミングなど、更なる検証が必要である。

今後の展望としては、ACL 損傷に対する保存療法を臨床応用するために、大きく 3 つのステップを構築する必要があると考えている。1 つ目は、本稿に引き続き、損傷 ACL をより短期間で良質な治癒に導く最適な方法を確立することである。本研究では、脂肪幹細胞由来エクソソームを用いて膝関節内へ投与したが、想定していた力学強度は得られなかった。このため、投与方法及び使用薬剤などを再考して、更に検証していく必要がある。本検証では検証していないが、治癒 ACL の膝関節機能への貢献度も合わせて検証することで、二次的な変形性膝関節症の発症リスク等も予防できる可能性があると考えている。そして 2 つ目には、Kyuro 装具と同等以上の機能を有した装具を開発することである。Kyuro 装具が開発されたのは、1990 年前後であり、全てが義肢装具士による手作業で作成されている。今後臨床での普及を考えると、安定した技術提供や供給量を確保することは困難となるため、人工知能を搭載し、年齢・性別・形態学的特徴量を入力するだけで、各患者に最適化した装具機能を有する装具を開発していくべきである。そして 3 つ目には、臨床実装・社会実装する上で協力いただける医療期間と提携することである。患者の流れとして、ACL 損傷患者は受傷後、医療機関を受診し診察を受けるため、医師から保存療法を提案・推奨していただく必要がある。そのため、ACL 損傷者に対する保存療法を臨床普及させていくために、より多くの医療機関及び医師と提携しながら推進していく必要があると考えている。

8 謝辞

本論文は、筆者が埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究科博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

本論文の審査に関して、本論文を御高覧頂き、貴重な御助言を頂いた同学濱口豊太教授，松下誠教授，神戸大学 生命・医学系保健学域 森山英樹教授に心より感謝の意を表します。

同学今北英高教授，田中健一教授には指導補助教員として，本研究に関する御助言を頂戴いたしました。心よりお礼申し上げます。本稿を終えるにあたり実験全般で指導を賜りました同学村田健児助教には謹んで感謝の意を表します。また実験を進める際に多くのご協力をいただきました金村尚彦研究室，村田健児研究室メンバーの方々，大学院生活にご理解いただきました職場の皆様，学生生活を陰ながら支え応援してくれた家族，友人に深く感謝いたします。

最後に，同学学部時代より担任教員としてお世話になり，博士前期，博士後期過程を通じて，面倒ばかりかけていた私に寄り添い，最後まで丁寧なご指導を賜りました指導教官である同学 金村尚彦 教授に甚大なる謝意と敬意を表します。

9 引用文献

1. Duthon, V. B. *et al.* Anatomy of the anterior cruciate ligament.
Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. **14**, 204–213 (2006).
2. Renstrom, P. *et al.* Non-contact ACL injuries in female athletes:
An International Olympic Committee current concepts statement
- Deel 2. *Sport en Geneeskunde* Preprint at
<https://doi.org/10.1136/bjsm.2008.048934> (2008).
3. Dahm, D. L. *et al.* Reconstruction of the anterior cruciate
ligament in patients over 50 years. *J. Bone Joint Surg. Br.* **90**,
1446–1450 (2008).
4. Vavken, P. & Murray, M. M. Treating anterior cruciate ligament
tears in skeletally immature patients. *Arthroscopy - Journal of
Arthroscopic and Related Surgery* (2011)

doi:10.1016/j.arthro.2010.11.062.

5. Figueroa, D. *et al.* Anterior cruciate ligament reconstruction in patients over 50 years of age. (2014)

doi:10.1016/j.knee.2014.08.003.

6. *The ACL-Deficient Knee.* (Springer London). doi:10.1007/978-1-4471-4270-6.

7. O'donoghue, D. H., Rockwood, C. A., Jr, Frank, G. R., Jack, S. C. & Kenyon, R. Repair of the Anterior Cruciate Ligament in Dogs. *JBJS* 48, 503 (1966).

8. Feagin, J. A. & Curl, W. W. Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study.

9. *The ACL handbook: Knee biology, mechanics, and treatment.*

(Springer, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-0760-7.

10. Murray, M. M. *et al.* The Bridge-Enhanced Anterior Cruciate Ligament Repair (BEAR) Procedure: An Early Feasibility Cohort Study. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* (2016)

doi:10.1177/2325967116672176.
11. Prof, A. *et al.* Spontaneous Healing of Complete ACL Ruptures.
12. Nawabi, D. H., Patel, R. V., Hall-Craggs, M. & Haddad, F. S.

MRI-confirmed tear and spontaneous healing of the anterior cruciate ligament. *Injury Extra* (2006)

doi:10.1016/j.injury.2005.09.024.
13. Napoli, A. *et al.* MRI findings in spontaneous healing of ACL ruptures. Our experience. doi:10.1594/ecr2016/C-0464.

14. Malanga, G. A., Giradi, J. & Nadler, S. F. The spontaneous healing of a torn anterior cruciate ligament. *Clin. J. Sport Med.* (2001) doi:10.1097/00042752-200104000-00010.
15. Fujimoto, E., Sumen, Y., Ochi, M. & Ikuta, Y. Spontaneous healing of acute anterior cruciate ligament (ACL) injuries - Conservative treatment using an extension block soft brace without anterior stabilization. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* (2002) doi:10.1007/s00402-001-0387-y.
16. Kurosaka, M., Yoshiya, S., Mizuno, T. & Mizuno, K. Spontaneous healing of a tear of the anterior cruciate ligament. A report of two cases. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **80**, 1200–1203 (1998).

17. Ihara, H., Miwa, M., Takayanagi, K. & Nakayama, A. Acute Torn Meniscus Combined With Acute Cruciate Ligament Injury
Second Look Arthroscopy After 3-Month Conservative Treatment.
CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH
Number 307, 146–154.
18. Ihara, H. & Kawano, T. Influence of Age on Healing Capacity of Acute Tears of the Anterior Cruciate Ligament Based on Magnetic Resonance Imaging Assessment. *J. Comput. Assist. Tomogr.* (2017) doi:10.1097/RCT.0000000000000515.
19. Amiel, D., Billings, E. & Harwood, F. L. Collagenase activity in anterior cruciate ligament: protective role of the synovial sheath. *J. Appl. Physiol.* **69**, 902–906 (1990).

20. Bray, R. C., Leonard, C. A. & Salo, P. T. Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J. Orthop. Res.* (2003) doi:10.1016/S0736-0266(03)00078-0.
21. Attia, E., Brown, H., Henshaw, R., George, S. & Hannafin, J. a. Patterns of gene expression in a rabbit partial anterior cruciate ligament transection model: the potential role of mechanical forces. *Am. J. Sports Med.* **38**, 348–356 (2010).
22. Menetrey, J. *et al.* α -Smooth muscle actin and TGF- β receptor i expression in the healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Injury* (2011) doi:10.1016/j.injury.2010.07.246.

23. Murray, M. M. & Fleming, B. C. Biology of anterior cruciate ligament injury and repair: Kappa delta ann doner vaughn award paper 2013. *J. Orthop. Res.* **31**, 1501–1506 (2013).
24. Woo, S. L. Y., Inoue, M., McGurk-Burleson, E. & Gomez, M. A. Treatment of the medial collateral ligament injury: II: Structure and function of canine knees in response to differing treatment regimens. *Am. J. Sports Med.* (1987)
doi:10.1177/036354658701500104.
25. Savio, B. *et al.* The Effects of Transection of the Anterior Cruciate Ligament on Healing of the Medial Collateral Ligament
A BIOMECHANICAL STUDY OF THE KNEE IN DoGs*.
26. Kokubun, T. *et al.* Effect of Changing the Joint Kinematics of

Knees With a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the
Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a
Rat Model. *Am. J. Sports Med.* 2900–2910 (2016)

doi:10.1177/0363546516654687.

27. Nishikawa, Y. *et al.* Effects of controlled abnormal joint movement on the molecular biological response in intra-articular tissues during the acute phase of anterior cruciate ligament injury in a rat model. *BMC Musculoskelet. Disord.* **19**, (2018).
28. Kokubun, T. *et al.* Key Determinants of Anterior Cruciate Ligament Spontaneous Healing. *Journal of Osteoporosis and Physical Activity* (2017) doi:10.4172/2329-9509.1000208.
29. Kano, T., Kokubun, T., Murata, K., Oka, Y. & Ozone, K. Influence

of the site of injury on the spontaneous healing response in a rat model of total rupture of the anterior cruciate ligament. *Connect. Tissue Res.* 00, 1–13 (2021).

30. Sherman, M. F., Lieber, L., Bonamo, J. R., Podesta, L. & Reiter,

I. The long-term followup of primary anterior cruciate ligament repair Defining a rationale for augmentation*.

31. Achtnich, A. *et al.* Acute Proximal Anterior Cruciate Ligament

Tears: Outcomes After Arthroscopic Suture Anchor Repair Versus

Anatomic Single-Bundle Reconstruction. *Arthroscopy - Journal*

of Arthroscopic and Related Surgery (2016)

doi:10.1016/j.arthro.2016.04.031.

32. Remer, E. M. *et al.* Anterior Cruciate Ligament Injury: MR

Imaging Diagnosis and Patterns of Injury¹.

33. Brody, J. M., Lin, H. M., Hulstyn, M. J. & Tung, G. A. Lateral Meniscus Root Tear and Meniscus Extrusion with Anterior Cruciate Ligament Tear 1.
34. Eggli, S. *et al.* Dynamic intraligamentary stabilization: novel technique for preserving the ruptured ACL. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* (2015) doi:10.1007/s00167-014-2949-x.
35. Ng, G. Y., Oakes, B. W., Deacon, O. W., Mclean, I. D. & Lampard, D. Biomechanics of Patellar Tendon Autograft for Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament in the Goat: Three-Year Study. *Journal of Orthopaedic Research The Journal of Bone and Joint Surgery* **13**, 602–608 (1995).

36. Viateau, V. *et al.* Biological and biomechanical evaluation of the ligament advanced reinforcement system (LARS AC) in a sheep model of anterior cruciate ligament replacement: A 3-month and 12-month study. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* **29**, 1079–1088 (2013).
37. Tohyama, H., Beynnon, B. D., Johnson, R. J., Renström, P. A. & Arms, S. W. The effect of anterior cruciate ligament graft elongation at the time of implantation on the biomechanical behavior of the graft and knee. *Am. J. Sports Med.* (1996)
doi:10.1177/036354659602400508.
38. Morishita, Y., Kanemura, N., Kokubun, T., Murata, K. & Takayanagi, K. Acute molecular biological responses during

spontaneous anterior cruciate ligament healing in a rat model.

Sport Sci. Health **15**, 659–666 (2019).

39. Zhang, F. *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor on

rat Achilles tendon healing. *Plast. Reconstr. Surg.* **112**, 1613–

1619 (2003).

40. Yuge, S. *et al.* Mechanical loading of intraluminal pressure

mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of

F-BAR proteins. *Nat. Commun.* **13**, 2594 (2022).

41. Shook, B. A. *et al.* Dermal Adipocyte Lipolysis and Myofibroblast

Conversion Are Required for Efficient Skin Repair. *Cell Stem*

Cell **26**, 880-895.e6 (2020).

42. Faryniarz, D. A., Chaponnier, C., Gabbiani, G., Yannas, I. V. &

Spector, M. Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction. *J. Orthop. Res.* **14**, 228–237 (1996).

43. Serini, G. & Gabbiani, G. MINIREVIEW Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation.
44. Murakami, H., Shinomiya, N., Kikuchi, T., Yoshihara, Y. & Nemoto, K. Upregulated expression of inducible nitric oxide synthase plays a key role in early apoptosis after anterior cruciate ligament injury. *J. Orthop. Res.* **24**, 1521–1534 (2006).
45. Geiger, M. H., Green, M. H., Monosov, A., Akeson, W. H. & Amiel,

D. AN IN VITRO ASSAY OF ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT (ACL) AND MEDIAL COLLATERAL LIGAMENT (MCL) CELL

MIGRATION. *Connect. Tissue Res.* **30**, 215–224 (1994).

46. Nagineni, C. N., Amiel, D., Green, M. H., Berchuck, M. &

Akeson, W. H. Characterization of the Intrinsic Properties of the

Anterior Cruciate and Medial Collateral Ligament Cells: An In

Vitro Cell Culture Study. *Journal of Orthopardir Rr srarch* **10**,

(1992).

47. Xie, J. *et al.* Differential expressions of lysyl oxidase family in

ACL and MCL fibroblasts after mechanical injury. *Injury* (2013)

doi:10.1016/j.injury.2012.08.046.

48. Best, K. T., Lee, F. K., Knapp, E., Awad, H. A. & Loiselle, A. E.

Deletion of NFKB1 enhances canonical NF- κ B signaling and

increases macrophage and myofibroblast content during tendon

healing. *Sci. Rep.* **9**, 10926 (2019).

49. Pakshir, P. & Hinz, B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication.

Matrix Biol. **68–69**, 81–93 (2018).

50. Chen, S. *et al.* RelA/p65 inhibition prevents tendon adhesion by modulating inflammation, cell proliferation, and apoptosis. *Cell Death Dis.* **8**, e2710 (2017).

Death Dis. **8**, e2710 (2017).

51. Lim, J. K. *et al.* Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior

cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy - Journal of*

Arthroscopic and Related Surgery (2004) doi:10.1016/S0749-

8063(04)00653-X.

52. Morito, T. *et al.* Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology* (2008) doi:10.1093/rheumatology/ken114.
53. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–2749 (2007).
54. Zhou, S. *et al.* Source and hub of inflammation: The infrapatellar fat pad and its interactions with articular tissues during knee osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **40**, 1492–1504 (2022).
55. Uysal, C. A., Tobita, M., Hyakusoku, H. & Mizuno, H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair:

Biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J. Plast.*

Reconstr. Aesthet. Surg. (2012) doi:10.1016/j.bjps.2012.06.011.

56. Desando, G. *et al.* Intra-articular delivery of adipose derived

stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an

experimental rabbit model. *Arthritis Res. Ther.* (2013)

doi:10.1186/ar4156.

57. Pers, Y.-M. *et al.* Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based

Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-

Escalation Trial. *Stem Cells Transl. Med.* (2016)

doi:10.5966/sctm.2015-0245.

58. Anderson, J. D. *et al.* Comprehensive Proteomic Analysis of

Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of

Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. *Stem Cells*

34, 601–613 (2016).

59. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G. & Tredget, E. E. Mesenchymal stem

cells enhance wound healing through differentiation and

angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2648–2659 (2007).

60. Murahashi, Y. *et al.* Intra-articular administration of I κ B α

kinase inhibitor suppresses mouse knee osteoarthritis via

downregulation of the NF- κ B/HIF-2 α axis. *Sci. Rep.* **8**, 16475

(2018).

61. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V. & Karin, M. IKK α

limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the

resolution of inflammation.

62. Kiriakidis, S. *et al.* VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpa and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J. Cell Sci.* **116**, 665–674 (2003).
63. Watts, E. R. & Walmsley, S. R. Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity. *Trends Mol. Med.* **25**, 33–46 (2019).
64. Malkov, M. I., Lee, C. T. & Taylor, C. T. Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines. *Cells* **10**, (2021).
65. Burke, Pattoli, Gregor & Brassil. BMS-345541 is a highly selective inhibitor of IkB kinase that binds at an allosteric site of

the enzyme and blocks NF- κ B-dependent transcription in mice.

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. (2003).

66. Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F. & Ochiya, T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics* **13**, 1637–1653 (2013).
67. Zhang, X. *et al.* Loading Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Into a Traditionally Designed Rotator Cuff Patch: A Potential Strategy to Enhance the Repair of Chronic Rotator Cuff Tear Associated With Degenerative Changes. *Am. J. Sports Med.* **50**, 2234–2246 (2022).
68. Huang, Y. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote rotator cuff tendon-bone healing by promoting

angiogenesis and regulating M1 macrophages in rats. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 496 (2020).

69. Zhang, X. *et al.* Adipose Stem Cell–Derived Exosomes Recover

Impaired Matrix Metabolism of Torn Human Rotator Cuff

Tendons by Maintaining Tissue Homeostasis. *Am. J. Sports Med.*

49, 899–908 (2021).

70. Borges, F. T. *et al.* TGF- β 1-Containing exosomes from injured

epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative

responses and fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 385–392 (2013).

71. Wang, C., Song, W., Chen, B., Liu, X. & He, Y. Exosomes Isolated

From Adipose-Derived Stem Cells: A New Cell-Free Approach to

Prevent the Muscle Degeneration Associated With Torn Rotator

Cuffs. *Am. J. Sports Med.* **47**, 3247–3255 (2019).

72. Fu, G., Lu, L., Pan, Z., Fan, A. & Yin, F. Adipose-derived stem cell exosomes facilitate rotator cuff repair by mediating tendon-derived stem cells. *Regen. Med.* **16**, 359–372 (2021).

73. Wang, C., Zhang, Y., Zhang, G., Yu, W. & He, Y. Adipose Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Chronic Rotator Cuff Tendinopathy by Regulating Macrophage Polarization: From a Mouse Model to a Study in Human Tissue. *Am. J. Sports Med.* **49**, 2321–2331 (2021).

74. Zhang, M. *et al.* Tendon stem cell-derived exosomes regulate inflammation and promote the high-quality healing of injured tendon. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 402 (2020).

75. Shi, Y. *et al.* Exosomes derived from bone marrow stromal cells (BMSCs) enhance tendon-bone healing by regulating macrophage polarization. *Med. Sci. Monit.* **26**, (2020).
76. Zhao, C. *et al.* Exosomes from adipose-derived stem cells promote chondrogenesis and suppress inflammation by upregulating miR-145 and miR-221. *Mol. Med. Rep.* **21**, 1881–1889 (2020).
77. Wong, K. L. *et al.* Intra-Articular Injections of Mesenchymal Stem Cell Exosomes and Hyaluronic Acid Improve Structural and Mechanical Properties of Repaired Cartilage in a Rabbit Model. *Arthroscopy* **36**, 2215-2228.e2 (2020).
78. Jin, Y. *et al.* Therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes on osteoarthritis. *J. Cell. Mol. Med.*

25, 9281–9294 (2021).

79. Li, Z. *et al.* BMSC-derived exosomes promote tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction by regulating M1/M2 macrophage polarization in rats. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 295 (2022).

80. Xu, J. *et al.* Infrapatellar fat pad mesenchymal stromal cell-derived exosomes accelerate tendon-bone healing and intra-articular graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am. J. Sports Med.* 3635465211072227 (2022)
doi:10.1177/03635465211072227.

81. Kim, H. *et al.* Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. *Adv. Sci. Lett.* **6**,

(2019).

82. Hu, L. *et al.* Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci. Rep.* **6**, 32993 (2016).

83. Jiang, T., Wang, Z. & Sun, J. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cutaneous wound healing mediates through TGF- β /Smad signaling pathway. *Stem Cell Research and Therapy* **11**, (2020).

84. Działo, E. *et al.* WNT3a and WNT5a transported by exosomes activate WNT signaling pathways in human cardiac fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

85. Cheng, X. *et al.* Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 261–276 (2018).
86. Liu, Y. *et al.* MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle* **17**, 2411–2422 (2018).
87. Nakamura, Y. *et al.* Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* **589**, 1257–1265 (2015).
88. Otsu, K. *et al.* Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* **113**, 4197–4205

(2009).

89. Rosenberger, L. *et al.* Stem cell exosomes inhibit angiogenesis and tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
90. Chamberlain, C. S. *et al.* Exosome-educated macrophages and exosomes differentially improve ligament healing. *Stem Cells* **39**, 55–61 (2021).

10 発表論文



Influence of the site of injury on the spontaneous healing response in a rat model of total rupture of the anterior cruciate ligament

Takuma Kano, Takanori Kokubun, Kenji Murata, Yuichiro Oka, Kaichi Ozone, Kohei Arakawa, Yuri Morishita, Kiyomi Takayanagi & Naohiko Kanemura

To cite this article: Takuma Kano, Takanori Kokubun, Kenji Murata, Yuichiro Oka, Kaichi Ozone, Kohei Arakawa, Yuri Morishita, Kiyomi Takayanagi & Naohiko Kanemura (2021): Influence of the site of injury on the spontaneous healing response in a rat model of total rupture of the anterior cruciate ligament, Connective Tissue Research, DOI: [10.1080/03008207.2021.1889529](https://doi.org/10.1080/03008207.2021.1889529)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03008207.2021.1889529>



Published online: 04 Mar 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 9



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=icts20>



Influence of the site of injury on the spontaneous healing response in a rat model of total rupture of the anterior cruciate ligament

Takuma Kano^{a,b,c}, Takanori Kokubun^d, Kenji Murata^d, Yuichiro Oka^a, Kaichi Ozono^a, Kohei Arakawa^a, Yuri Morishita^a, Kiyomi Takayanagi^d, and Naohiko Kanemura^d

^aGraduate Course of Health and Social Services, Graduate School of Saitama Prefectural University, Koshigaya, Japan; ^bDepartment of Rehabilitation, Soka Orthopedics Internal Medicine, Soka, Japan; ^cDepartment of Rehabilitation, Yatsuka Orthopedics Internal Medicine, Soka, Japan; ^dDepartment of Physical Therapy, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Japan

ABSTRACT

Aim: The healing ability of the anterior cruciate ligament (ACL) injury is very poor; however, it has recently been shown to undergo self-healing with conservative treatments. In this study, we evaluated the influence of the site of injury on the healing process after complete transverse tear of ACL using a rat model.

Materials and Methods: A total of 58 skeletally mature Wistar rats were randomly assigned to various ACL injury groups: controlled abnormal movement-mid-portion (CAM-MP), controlled abnormal movement-femoral side (CAM-FS), ACL transection-mid-portion (ACL-MP), or ACL transection-femoral side (ACL-FS) injury groups. The ACL was completely transected in the mid-portion in the ACL-MP and CAM-MP groups, and on the femoral side in the ACL-FS and CAM-FS groups. Both CAM groups underwent extra-articular bracing to control for abnormal tibial translation. The animals were allowed full cage activity until sacrifice postoperatively for histological and biomechanical assessment.

Results: Significant differences were found in the ratios of residual ligament lengths between the CAM-MP and CAM-FS groups, demonstrating the validity of each model. Spontaneous healing of the injured ACL was observed in the CAM-MP and CAM-FS groups but not in the ACL-MP and ACL-FS groups. The mechanical strength of the healing ACL did not differ between the CAM-MP and CAM-FS groups 8 weeks after injury; however, the former had better mechanical strength than the latter 12 weeks after the injury.

Conclusion: ACL injuries in the mid-portion and on the femoral side may be treated with conservative therapy for spontaneous healing.

ARTICLE HISTORY

Received 11 June 2020
Accepted 8 February 2021

KEYWORDS

Anterior cruciate ligament;
spontaneous healing;
indication criteria; injury site

Introduction

Anterior cruciate ligament (ACL) injury is common in many sports, particularly among younger athletes^{1,2}. Recently, middle-aged individuals have increased their activity levels, and this has caused an increase in the ACL injury rate for this population^{1,3}. As ACL injuries become more frequent in patients of varying age groups, varying treatment options are required; surgical reconstruction is often selected as the sole treatment choice. The establishment of a non-surgical, spontaneously healing treatment for ACL injuries would be beneficial for all patient types.

Our laboratory recently performed a rat study (the CAM model) in which, for ACL mid-portion injuries, spontaneous healing was achieved by creating a novel model that controls abnormal joint movement after injury from the outside of the joint capsule^{4,5}. In this

model, the mechanical properties of the healed ACL were about 50% those of normal ligaments⁴. In previous clinical study, Ihara et al. reported that, in patients with completely ruptured ACLs, spontaneous healing was achieved by conservative treatment with bracing^{6,7}. Conservative treatment currently used aims to maintain knee joint function through bracing and exercise; this treatment is not expected to facilitate spontaneous healing of the ruptured ACL. By contrast, we aimed to establish a conservative treatment model that facilitates spontaneous healing of a completely ruptured ACL. To date, however, it remains unknown for which type of ACL injuries conservative treatment can be applied.

Diagnostic imaging provides information about ACL injury sites⁸⁻¹³; van der List et al.¹⁴ reported that 53% of ACL injuries occur in the mid-portion of the ligament

and 43% occurred on the femoral side. Previous studies reported spontaneous healing only for ACL mid-portion injuries. Murray et al. reported differences in cell proliferative responses depending on the site of the ACL injury, which may affect the application of conservative treatments that we expect to facilitate spontaneous healing of the ACL^{15,16}.

The purpose of this study was to determine the influence of ACL injury site on the spontaneous healing response in completely ruptured ACLs. Specifically, we used two types of CAM models: one with ACL injury at the mid-portion and the other at the femoral side. We evaluated healing using histological analysis and by measuring the mechanical strength of the healing ACL. By clarifying these details, we can determine whether our conservative therapy for spontaneous healing is indicated based on injury site obtained from diagnostic imaging at the first clinical examination.

Materials and methods

Experimental design

All experiments were approved by the Saitama Prefectural University Animal Experiment Ethics Committee (permit no. 29-7) and was performed in accordance with their Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. We used a total of 58 mature, 12-week-old Wistar male rats weighing 260–310 g (Japan SLC, Shizuoka, Japan). The rats were randomly assigned to one of the following injury groups: controlled abnormal movement-mid-portion (CAM-MP), controlled abnormal movement-femoral side (CAM-

FS), ACL transection-mid-portion (ACLT-MP), or ACL transection-femoral side (ACLT-FS). The animals were allowed full cage activity, and the room temperature was maintained at 23 ± 2 °C with a 12-hour light-dark cycle. To elucidate the spontaneous healing response, we compared the ACLs of the CAM-MP and CAM-FS groups histologically at 4, 6, and 8 weeks ($n = 5$, each group), as well as biomechanically at 8 and 12 weeks ($n = 6$, each group) postoperatively (Figure 1).

Surgical procedure

The surgical procedures were as described in our previous study⁴. Animals were anesthetized via intraperitoneal injection (combination anesthetic: medetomidine, 0.375 mg/kg; midazolam, 2.0 mg/kg; and butorphanol, 2.5 mg/kg). Parapatellar arthrotomy was performed on the left hind limb to expose the ACL. For the ACLT-MP and CAM-MP groups, we inserted both scissor blades into the joint capsule and transected at the mid-portion of the ACL. For the ACLT-FS and CAM-FS groups, we inserted a single scissor blade into the joint capsule and transected on the femoral side with a knee flexion of 90° while loading with a forward withdrawal force. The joint capsule and parapatellar fascia were closed with a running suture. Next, a 1-mm-diameter steel head was drilled into the medial aspect of the tibial tuberosity in the mediolateral direction. Precise positioning of this bone hole was critical to avoid the patellar tendon and joint capsule yet still penetrate a sufficient amount of bone. To control for anterior tibial translation, a double 3-0 nylon suture

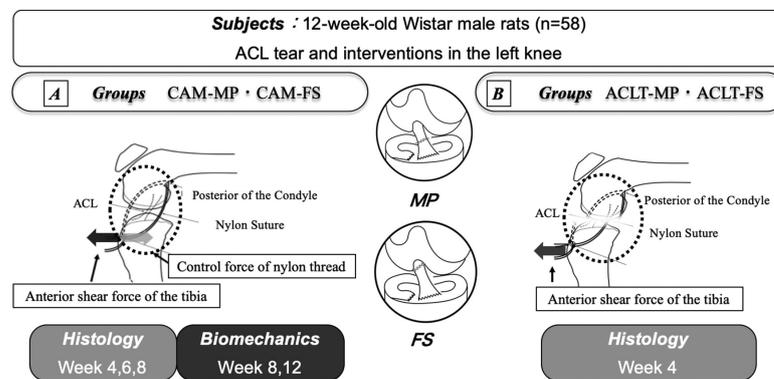


Figure 1. Flowchart showing the allocation of rats in the study. (A) CAM, Controlled Abnormal Movement model (B) ACLT, anterior cruciate ligament transection; MP, midportion rupture; FS, femoral side rupture.

was placed through the tibial bone hole posterior to the condyle of the distal end of the femur, and then it was tied to the joint to prevent anterior tibial translation. The skin was closed with running and interrupted sutures. In the ACLT-MP and ACLT-FS groups, the same procedure was performed until the dual 3-0 nylon suture was placed through the tibial ostia behind the condyle at the distal end of the femur; however, for these groups, we did not control for tibial anterior movement. All animals were allowed unrestricted cage movement immediately after surgery.

Histological evaluation

The ACL healing response was evaluated histologically at 4, 6, and 8 weeks. At each time point, five animals from each group were retrieved and fixed as a whole in 4% paraformaldehyde. After fixation, all tissues were decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) at 4 °C for 5–6 weeks. The tissues were infiltrated with a PBS containing sucrose (10%, 4 h; 15%, 4 h; and 20%, 12 h) at 4 °C and embedded in an optimal cutting temperature compound for flash freezing (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan). Longitudinal cryosections 14-mm thick along the sagittal plane were obtained, mounted on slides, and maintained at –80 °C. The cryosections were hematoxylin and eosin (H&E) stained to observe the general and macroscopic morphologic characteristics of the healing ACL.

Validation of model validity

To create two models of injury site, the injured sites for each group were evaluated. Two random H&E stained sagittal plane sections were analyzed from each rat in both the CAM-MP and CAM-FS groups, for a total of ten sections. All measurements were made using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

The following the procedures were used: 1) the total length of the ACL was determined by measuring the length from the origin of the femur to the attachment of the tibia; 2) the length of each tibia and femur remnant was measured from the origin of the femur to the boundary between normal tissue and healing tissue; and 3) we calculated the ratio (remnant ratio) of each tibia and femur remnant length to the total ACL length (remnant ratio = remnant length/total length of ACL × 100). Measurements were conducted at two points: the leading and trailing edges of the ACL (Figure 2).

Immunohistochemistry staining

To determine whether the healing tissue was a truly healing ACL or scar tissue, immunohistochemistry staining with collagen type I (Col I) and type III (Col III) was performed at weeks 4, 6, and 8. The slides were dried at room temperature for approximately 30 minutes. Thereafter, IHC staining was performed for protein localization observation. For the primary antibody, PBS-diluted anti-collagen type I rabbit polyclonal antibody (dilution ratio 1: 2500, 20,141; Novotec, Reuver, The Netherlands) and anti-collagen type III rabbit polyclonal antibody (dilution ratio 1: 1500, 20,341; Novotec) were used. A goat-derived anti-rabbit IgG antibody was used as a secondary antibody (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). For the sensitization reaction, the ABC method was carried out using a VECTAIN ABC Rabbit IgG Kit (Vector Labs). For coloring, the ENVISION + kit/HRP (DAB) (Dako Japan Co., Ltd., Kyoto, Japan) was used. Counterstaining was then performed using hematoxylin. PBS was used as a negative control.

Biomechanical investigation

The rats were sacrificed at 8 or 12 weeks postoperatively, and the ACLs were subjected to biomechanical testing (n = 6 for each group), according to the procedure used in previous our study⁴. All soft tissues, including scar tissue in the joint space of the knee and infrapatellar fat pad but excluding the ACL, were removed with the patellar tendons; the sutures were also removed. The limbs were placed in an electromechanical material testing machine (AG-100KNI; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The femoral condyles and tibial plateau were locked using the original jig. In this manner, the femur and tibia moved with the loading, as they were not fixed, and the loading direction was aligned with the ACL fibers. The biomechanical testing protocol was based on a report by Palmes et al.¹⁷; all tests were performed at room temperature, and a saline solution was sprayed to prevent dehydration of the specimens during testing. Each specimen was preloaded (0.5 N) and failed under uniaxial tension (5 mm/min). The load to failure (N) and grip-to-grip displacement (mm) were continuously recorded by a computer, and the load-deflection curve was created based on the values. All strength properties of the ligaments were calculated from that part of the nearly linear load-deflection curve¹⁸. Stiffness was calculated by dividing the load to failure (N) by the grip-to-grip displacement (mm) of the ligament.

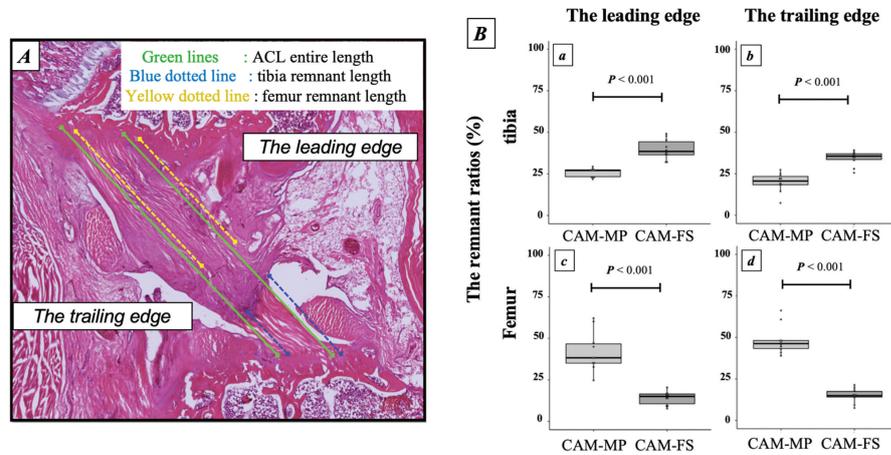


Figure 2. (A) Verification method of model effectiveness. The procedure for measurements are as follows: 1.) Measure the total length of the ACL by measuring the length from the origin of the femur to the attachment of the tibia; 2.) measure the length of each tibia and femur remnant (blue, yellow dotted line each) from the origin of the femur to the boundary between normal tissue and healing tissue; and, 3.) calculate the ratio (remnant ratio) of each tibia and femur remnant length to total ACL length (remnant ratio = remnant length/total length of ACL × 100). Measurements were conducted at two points: the leading and trailing edges of the ACL. (B-a,b) The CAM-MP group showed significantly lower values than the CAM-FS group in the tibial remnant ratio of the leading edge and the trailing edge. (B-c,d) The CAM-MP group showed significantly higher values than the CAM-FS group in the femoral remnant ratio of the leading edge and the trailing edge.

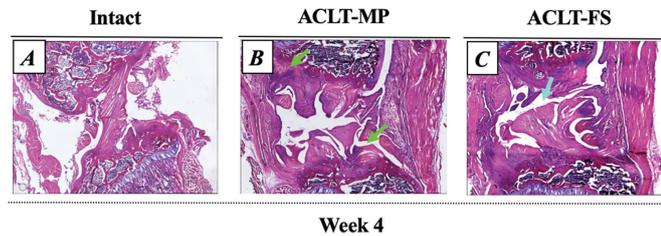


Figure 3. Histological differences between intact and non-healing anterior cruciate ligaments (ACLs). Photomicrographs show longitudinal sections of the ACL stained with hematoxylin and eosin: (A) intact ACL, (B) non-healing ACL of ACLT-MP (Green arrow point to the remnants), (C) non-healing ACL of ACLT-FS (Cyan arrow point to the remnants). ACLT-MP, anterior cruciate ligament transection-mid-portion; ACLT-FS, anterior cruciate ligament transection-femoral side. Scale bar: 500 μm.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS 21.0 J for Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Data were tested for normality and homogeneity using the Shapiro–Wilk test and Levene test, respectively. For histological analysis, the Mann–Whitney U test was used to compare the remnant ratios between the CAM-MP and CAM-FS

groups. For biomechanical analysis, one-way analysis of variance was performed for comparison between groups 8 and 12 weeks post-injury. The Tukey or Games–Howell post-hoc test was used according to the homogeneity test. Comparison of biomechanical data 8 and 12 weeks post-injury within the same group was confirmed using a two-

way analysis of variance and the main effect and interaction were confirmed; the Turkey post-hoc test was used. All significance levels were set at $p < 0.05$.

Results

Model validity analysis

The remnant ratios of the tibia and femur were significantly longer in the CAM-FS group than in the CAM-MP group ($p < 0.001$ for each) at both the leading and trailing edges (Figure 2b).

Histological analysis

Continuity of the ligament tissue was not observed on the H&E stained images, even 4 weeks after the injury in the ACLT-MP and ACLT-FS groups, which were the joint controlling and non-adaptive models (total, $n = 10$; per group, $n = 5$). In the ACLT-MP group, the bifurcated end was displaced such that it swirled backwards and the femoral-tibial remnant between the stumps was enlarged. In the ACLT-FS group, the stump of the tibial remnant spread out in a fan-like manner (Figure 3).

In the CAM-MP and CAM-FS groups, which were adapted for joint controlling models, the injured ACLs

spontaneously healed at all examined time points after injury (4, 6, and 8 weeks) (total, $n = 30$; per group, $n = 5$) (Figure 4, 5). In both groups, the healing area at 4 weeks after injury was filled with dense tissue consisting of immature cells of small cell size with unclear cell contours. At 6 weeks after injury, cell contours are clear, and the cell size is large (Figure 6). The fibrous tissue and nuclei in the area of healing exhibited a disorderly orientation with respect to the running direction of the ACL; this was unlike the histological images of normal ACL, which exhibited a regular orientation along the running direction of the ligament. In the CAM-MP group at 4 weeks after injury, the infrapatellar fat pad and synovial membrane ahead of the ACL proliferated and invaded the area of healing; however, in the CAM-FS group, a similar phenomenon was observed 6 weeks after injury (Figure 7). Immunohistochemical staining revealed the localization of collagen type I and III in the area of healing for both the CAM-MP and CAM-FS groups 4, 6, and 8 weeks after injury (Figure 4, 5, 7).

Biomechanical analysis

In the biomechanical test, load to failure (N), displacement (mm), and stiffness (N/mm) were investigated at

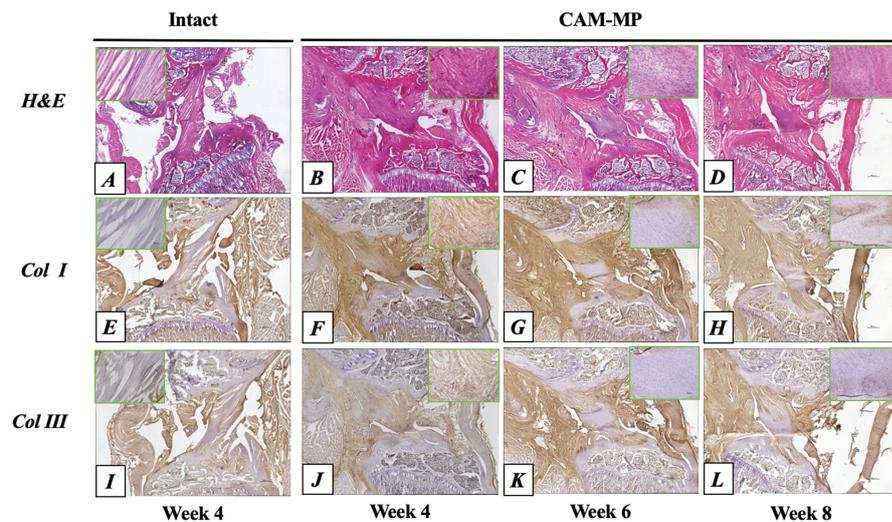


Figure 4. Histological changes of healing ACL in CAM-MP. Tissue continuity of the ACL was observed at all Timepoints (B, C, D). In immunohistochemical staining, collagen types I and III were observed between the stumps of the injured ACL (healing area) (F, G, H, J, K, L). CAM-FS, controlled abnormal joint movement mid-portion. Scale bar: 500 μ m (Magnified image: 50 μ m).

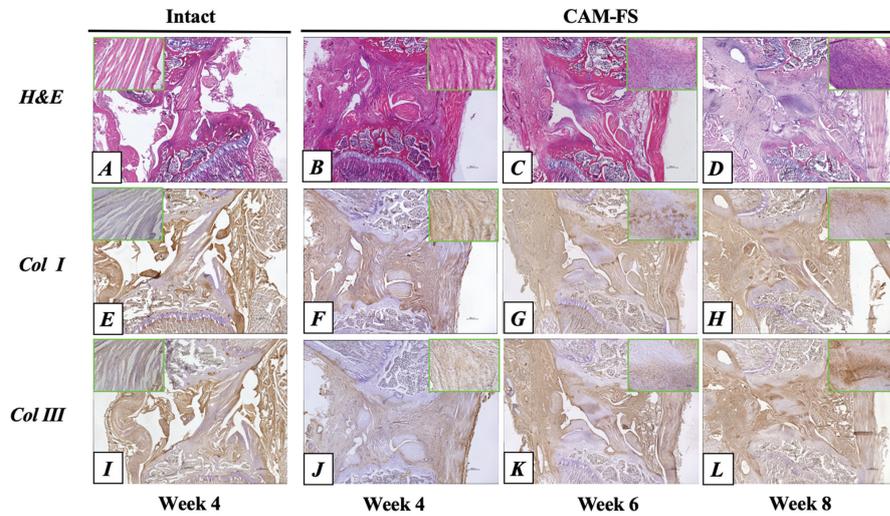


Figure 5. Histological changes of healing ACL in CAM-MP. Tissue continuity of the ACL was observed at all Timepoints (B, C, D). In immunohistochemical staining, collagen types I and III were observed between the stumps of the injured ACL (healing area) (F, G, H, J, K, L). CAM-FS, controlled abnormal joint movement mid-portion. Scale bar: 500 μ m (Magnified image: 50 μ m).

8 and 12 weeks after the injury (total, $n = 24$; per group, $n = 6$).

Eight weeks after injury

Load to failure was not significantly different between the CAM-MP (16.4 ± 3.7 N) and CAM-FS (16.9 ± 3.7 N) groups; however, both groups failed at significantly lower loads than did the control group (24.5 ± 1.5 N) ($p = 0.005$, $p = 0.007$, respectively). Displacement was not significantly different between the CAM-MP (1.8 ± 0.2 mm) and CAM-FS (2.0 ± 0.3 mm) groups; however, both groups had significantly higher displacement than the control group (1.5 ± 0.1 mm) ($p = 0.003$, $p < 0.001$, respectively). Stiffness was not significantly different between the CAM-MP (9.5 ± 3.0 N/mm) and CAM-FS (8.3 ± 1.0 N/mm) groups; however, both groups were significantly less stiff than the control (16.6 ± 1.8 N/mm) ($p = 0.036$, $p = 0.026$, respectively) ($n = 6$ for each group) (Figure 8).

Twelve weeks after injury

Load to failure was significantly higher in the CAM-MP group (24.4 ± 3.4 N) than the CAM-FS group (18.3 ± 4.0 N) ($p = 0.021$); however, the loads to failure in the CAM-MP and CAM-FS groups were

significantly lower than that of the control group (31.2 ± 2.8 N) ($p = 0.009$, $p < 0.001$, respectively). Displacement were not significantly different between the CAM-MP group (1.7 ± 0.3 mm), CAM-FS group (1.5 ± 0.4 mm), and control group (1.4 ± 0.1 mm). Stiffness was not significantly different between the CAM-MP group (14.3 ± 2.6 N/mm) and CAM-FS group (13.2 ± 3.4 N/mm); however, both groups were significantly less stiff than the control group (22.7 ± 3.1 N/mm) ($p = 0.001$, $p = 0.001$, respectively) (per group, $n = 6$) (Figure 8).

Comparison of data over time in the same group

Significant differences were found in the load to failure and stiffness for the CAM-MP and control groups. These values were significantly higher at 12 weeks than at 8 weeks after injury (control group: $p = 0.016$, $p = 0.004$, respectively; CAM-MP group: $p = 0.003$, $p = 0.042$, respectively) (Figure 9).

Discussion

We investigated how the injury site affects the ACL spontaneous-healing ability using the previously reported CAM model⁴. We observed histological evidence of spontaneous healing in both the mid-portion

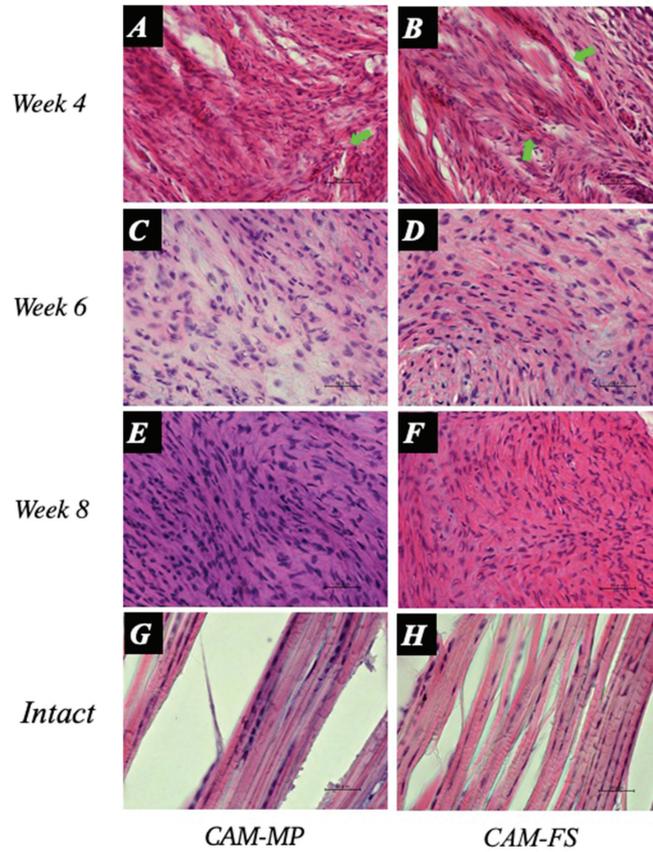


Figure 6. A high-magnification image of the healing area of CAM-MP/CAM-FS. Cells contour of healing area at 4 weeks post-injury in both groups is not clear as compared to normal, the 6 weeks after injury cells contour is clarified. The green arrow indicates the blood cell part. The green arrow points to the blood cell area. Scale bar: 50 μ m.

injury group and the femur-side injury groups. However, the mechanical properties of the healed ACL were higher in the CAM-MP than in the CAM-FS group at 12 weeks post-injury. We focused on the site of the ACL injury and demonstrated for the first time that conservative treatment for spontaneous healing is possible not only for mid-portion injuries, but also for injuries on the femoral side.

In the healing area of the ACL in both the CAM-MP and CAM-FS groups, small and immature cells were noted, and the nuclei of many cells adopted an ovate

shape. Disordered orientation differing from that of the ACL running direction was observed in the collagen fibers and nuclei. In both groups, the infrapatellar fat pad and synovial membrane invaded the injured area. These features are similar to that of the healing process of injured ACLs reported previously^{4,19}. Kokubun et al. demonstrated that, in the spontaneous healing model of complete ACL injuries, cells clustered in the healing area, as well as collagen fibers and nuclei, showed irregular orientation⁴. Hefti et al. reported that, in the conserved healing model of partial ACL injuries, oval

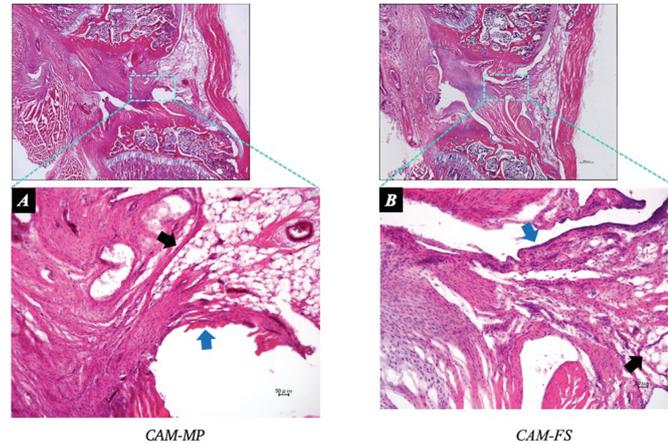


Figure 7. A histological image of adipocytes and synovial cells bound to injured tissue. A: CAM-MP: HE stained image 4 weeks after injury. B: CAM-FS: HE stained image 6 weeks after injury. Blue arrows indicate synovial cells. Black arrows indicate adipocytes. Scale bar: 50 μ m.

cells were densely populated in the area of healing, and the collagen fibers and nuclei had an irregular orientation¹⁹. Conversely, in the preserved healing model of the completely ruptured MCL, oval cells are densely packed in the area of healing, and the collagen fibers and nuclei become regularly oriented along the normal ligament running direction²⁰⁻²². The reason for this difference may be due to a change in the mechanical stress occurring in the healing ligaments. King reported that the collagen orientation in ligaments and the distortion of cell orientation were observed after joint fixation and they also reported that mechanical stress was necessary to maintain ligament homeostasis²³. In the CAM model, because the anterior translation of the tibia is controlled, elongation stress, which is originally loaded on the ACL, cannot occur. By contrast, in the healing model of medial collateral ligament (MCL) complete injury, because knee joint movement is not controlled by a brace, partial physiological elongation stress is applied for the healed MCL. This difference is presumed to have influenced the difference in fibrous tissue/cell orientation in the healing ligament. In other words, for the orientation of the collagen fibers and nuclei in the healing ACL to become similar to that of the normal ACL, a mechanical stress load that includes extension stress is required.

In this study, IHC was performed using collagen as a target in order to confirm that the tissue filled in the

cross-linked area is not a scar tissue but a pre-ligament tissue. As a result, type I and III collagen were confirmed in the healing area of both groups, and the healing area tissue was confirmed to be healing ligament tissue. The extracellular matrix of the ligament consists mainly of type I collagen. In the healing process after injury, type III collagen is predominantly produced in the early phase, with type I collagen later becoming dominant²⁴⁻²⁶. In this study, type I and type III collagen were recognized in the healing site in both the CAM-groups at 4 to 8 weeks after injury. These findings indicate that the tissues in the healing site were in the proliferation to remodeling phase of the ligament healing process²⁶.

The mechanical properties of the healing ACL in both CAM-MP and CAM-FS groups were significantly inferior to that of the control. The load to failure of the healed ACL was 74% and 69% 8 weeks after injury, and 78% and 59% 12 weeks after injury in the CAM-MP and CAM-FS groups, respectively, of that of the control. Many studies analyzing the mechanical properties of reconstructed ACLs have been reported^{26,27}. Tohyama et al. reported the biomechanics of an ACL reconstruction model using patellar tendon grafts for canines²⁸. The load to failure and stiffness of the reconstructed ACL 18 months postoperatively were 18% and 33% of those of the normal ACL, respectively. Ballock et al. examined the mechanical properties of reconstructed ACLs in rabbits²⁹, using the same method as Tohyama et al. As a result, the load to failure

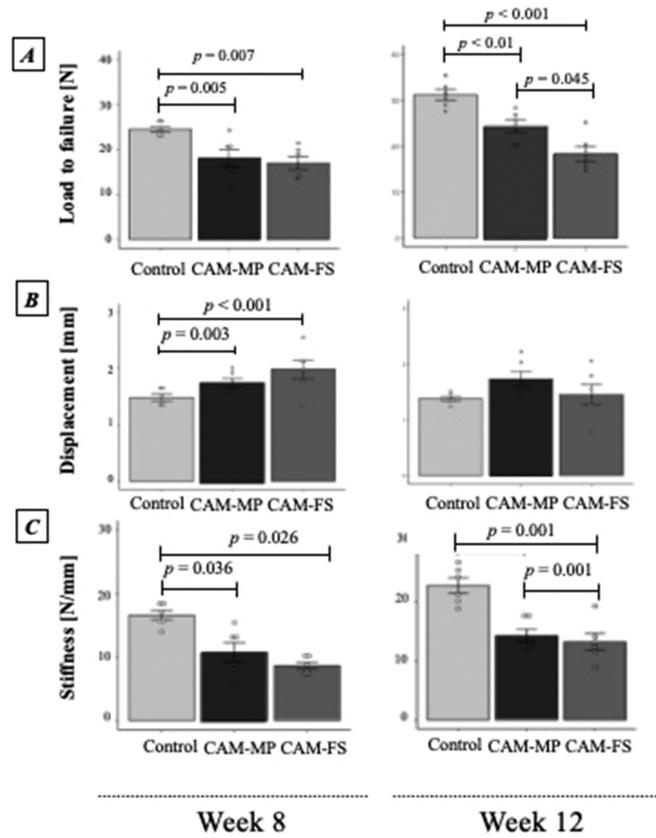


Figure 8. Biomechanical properties of the healing of anterior cruciate ligament (ACL). Bar graph showing results of biomechanical analysis in ACL, CAM-MP, and CAM-FS groups at week 8 and 12 after injury: (A) load to failure, (B) displacement from grip to grip, and (C) stiffness. In the bar graph, the ratio of mechanical strength of the healing ACL of each group to the control group is shown.

and stiffness of the reconstructed ACLs at 52 weeks postoperatively were 11% and 13% that of normal ACLs, respectively. This suggests that the mechanical properties of the healed ACL achieved by conservative treatment exceed those of the reconstructed ACL. Conservative treatment for spontaneous healing may also be applicable to patients with both femur-side and mid-portion ACL injuries.

In the CAM-MP group, the mechanical properties of healed ACLs at 12 weeks significantly increased both in terms of load to failure and stiffness when compared to that at week 8 (135% and 134%, respectively). Conversely, in the CAM-FS group, only stiffness

significantly increased (153%). These results suggest that ligament repair can be achieved earlier in the ACLT-MP group than in the ACLT-FS group, suggesting the need to optimize the rehabilitation protocol for each injury site. Nguyen et al. demonstrated a phenomenon in which the stump of an ACL with a femoral side tear reattached to the surrounding joint tissue; in those cases, the attachment site had characteristics similar to that of the healing process of the MCL³⁰. Although this study reported dysplasia of the injured ACL, it essentially suggests that the stump of an injured ACL in the proximal part of the femur has potential healing ability. Furthermore, considering

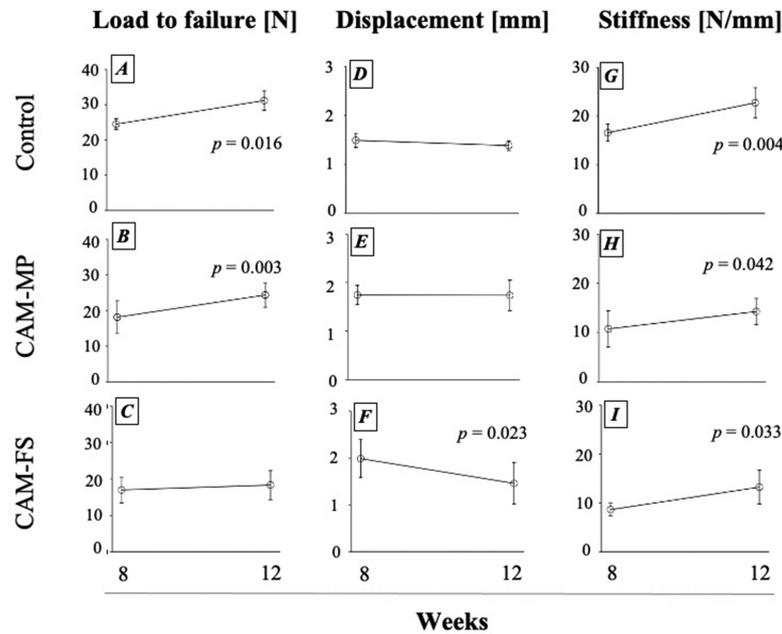


Figure 9. Biomechanical properties of healing ACL over 8 and 12 weeks time course. (A, B, C) Load to failure was significantly higher at 12 weeks than at 8 weeks in the control and CAM-MP (ANOVA, post-hoc Turkey test, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $n = 6$ knees). (D, E, F) Displacement was significantly lower at week 12 than at week 8 in the CAM-FS (ANOVA, post-hoc Turkey test, $P < 0.05$, $n = 6$ knees). (G, H, I) Stiffness was significantly higher at 12 weeks than at 8 weeks in all groups (ANOVA, post-hoc Turkey test, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $n = 6$ knees).

that the femoral side region of the ACL is more vascularized compared to the midportion of the ligament³¹, and the cellular activity of the ACL is elevated¹⁵, the femoral side region may be a more suitable environment for ligament healing. In the present study, the load to failure in the CAM-FS group did not improve with the passage of time.

The difference between the CAM-MP and CAM-FS models used in this study was only the injury site. Focusing on the surrounding tissue in the joint capsule, the synovial tissue covers the entire ACL, whereas the infrapatellar fat body is anterior to the ACL. Histological analysis showed that the infrapatellar fat pad and synovium invaded the injured area in both groups. Previous studies showed adipose-derived stem cells (a type of mesenchymal stem cell) to be involved in the repair of ligament, tendon, and cartilage tissues³¹⁻³⁵. Although the effect of the infrapatellar fat body on the healing ability of the damaged ACL is

unknown, some properties of the infrapatellar fat body may influence the mechanical properties of the healed ACL. In particular, the CAM-MP group may have some advantages in terms of ligament repair because the physical distance between the injury site and the infrapatellar fat body is less than that of the CAM-FS group. It will be necessary to investigate the role of intra-articular tissues such as the patellar fat body in the future. Nevertheless, we believe that the results of the present study provide a basis on which to establish adoption criteria for conservative treatment of ACL injuries in terms of the site of injury.

Limitations

There are several limitations in this animal experimental study. First, there is a possibility that the morphology of the injured ACL stump had differentiated in the CAM-MP and CAM-FS groups due to modeling; however, this

difference cannot influence healing ability. This is technically difficult to verify with small animals such as rats; therefore, future study is needed using larger animals. Second, considering that the biomechanical analysis was performed at only 2 time points after injury (8 and 12 weeks), we cannot make inferences regarding long-term changes in the mechanical properties of the healing ACL. It cannot be determined whether the mechanical strength of the healing ACL in the CAM-MP and CAM-FS groups changes over longer periods. Therefore, it is necessary to extend the analysis period further and investigate improvements in mechanical strength for the CAM-MP and CAM-FS groups. Third, the mechanical strength of the healing ACL was only analyzed *ex vivo*; an *in vivo* analysis, such as analysis of the braking force against forward withdrawal of the tibia, was not conducted. In addition, in this study, the tensile speed was 0.5 mm/min, but the tensile speed changes because of deformation stress (strain rate dependence). In addition, in this study, the tensile speed is 0.5 mm/min, but the tensile speed changes due to deformation stress (strain rate dependence). Thus, the contribution of the healing ACL to knee joint function could not be clearly verified. Fourth, there is a difference in the walking form between the rat and the human. Both are similar in that they walk alternately. However, while the rat is in the knee flexion position during walking, the human is in the knee extension position. As future research, it is necessary to examine large animals such as pigs and sheep that walk in the knee joint extension position. Fifth, since this research is a basic medical research targeting animals, it is difficult to apply the results of this research to humans as it is. This is because there are differences in knee kinematics, kinematics, and regenerative ability between humans and rats. Sixth, although the biomechanical properties differed between CAM-MP and CAM-FS, the details of this difference cannot be clarified because the healing mechanism of ACL has not been clarified. Further investigation is needed on this point.

In conclusion, we determined that conservative therapy is indicated for spontaneous healing in ACL injury cases, even with varied injured sites. In addition, although the mechanical strength of the healing ACL after femur-side injury was inferior to that of the healing ACL after injury to the ligament mid-portion, the mechanical strength of the former was better than that of the surgically reconstructed ACL. Taken together the data suggest that, ACL injuries in both the mid-portion and the femoral side may be treated with conservative therapy and there may be spontaneous healing. Rehabilitation protocols after injury need to be optimized according to injury site.

Acknowledgments

We would like to thank the members of the Basic Science Laboratory at the Saitama Prefectural University for their cooperation.

Disclosure statement

No potential conflict of interest is reported by the authors.

Funding

This work was supported by a Saitama Prefectural University Research (SPUR) Grant.

References

1. Renstrom P, Ljungqvist A, Arendt E, Beynonn B, Fukubayashi T, Garrett W, Georgoulis T, Hewett TE, Johnson R, Krosshaug T, Mandelbaum B, Micheli L, Myklebust G, Roos E, Roos H, Schamasch P, Shultz S, Werner S, Wojtys E. Non-contact ELACL injuries in female athletes: an International Olympic Committee current concepts statement. *Br J Sports Med.* 2008;42(6):394–412. doi:10.1136/bjsm.2008.048934.
2. Vavken P, Murray MM. Treating anterior cruciate ligament tears in skeletally immature patients. *Arthroscopy.* 2011;27(5):704–716. doi:10.1016/j.arthro.2010.11.062.
3. Figueroa D, Figueroa F, Calvo R, Vaisman A, Espinoza G, Gili F. Anterior cruciate ligament reconstruction in patients over 50 years of age. *Knee.* 2014;21(6):1166–1168. doi:10.1016/j.knee.2014.08.003.
4. Kokubun T, Kanemura N, Murata K, Moriyama H, Morita S, Jinno T, Ihara H, Takayanagi K. Effect of changing the joint kinematics of knees with a ruptured anterior cruciate ligament on the molecular biological responses and spontaneous healing in a rat model. *Am J Sports Med.* 2016;44(11):2900–2910. doi:10.1177/0363546516654687.
5. Nishikawa Y, Kokubun T, Kanemura N, Takahashi T, Matsumoto M, Maruyama H, Takayanagi K. Effects of controlled abnormal joint movement on the molecular biological response in intra-articular tissues during the acute phase of anterior cruciate ligament injury in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19(1):175. doi:10.1186/s12891-018-2107-6.
6. Ihara H, Kawano T. Influence of age on healing capacity of acute tears of the anterior cruciate ligament based on magnetic resonance imaging assessment. *J Comput Assist Tomogr.* 2017;41(2):206–211. doi:10.1097/RCT.0000000000000515.
7. Ihara H, Miwa M, Takayanagi K, Nakayama A. Acute torn meniscus combined with acute cruciate ligament injury second look arthroscopy after 3-month conservative treatment. *Clin Orthop Relat Res Number.* 1994;307:146–154.
8. Achtnich A, Herbst E, Forkel P, Metzloff S, Sprenger F, Imhoff AB, Petersen W. Acute proximal anterior cruciate ligament tears: outcomes after arthroscopic suture

- anchor repair versus anatomic single-bundle reconstruction. *Arthroscopy*. 2016;32(1):2562–2569. doi:10.1016/j.arthro.2016.04.031.
9. Brody JM, Lin HM, Hulstyn MJ, Tung GA. Lateral meniscus root tear and meniscus extrusion with anterior cruciate ligament tear I. *Radiology*. 2006;239(3):805–810. doi:10.1148/radiol.2393050559.
 10. Eggli S, Kohlhof H, Zumstein M, Henle P, Hartel M, Evangelopoulos DS, Bonel H, Kohl S. Dynamic intraligamentary stabilization: novel technique for preserving the ruptured ACL. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(4):1215–1221. doi:10.1007/s00167-014-2949-x.
 11. Remer EM, Fitzgerald SW, Friedman H, Rogers LF, Hendrix RW, Schafer MF. Anterior cruciate ligament injury: MR imaging diagnosis and patterns of injury. *Radiographics*. 1992;12(5):901–915. doi:10.1148/radiographics.12.5.1529133.
 12. Rubin DA, Kettering JM, Towers JD, Britton CA. MR imaging of knees having isolated and combined ligament injuries. *AJR Am J Roentgenol*. 1998;170(5):1207–1213. doi:10.2214/ajr.170.5.9574586.
 13. Sherman MF, Lieber L, Bonamo JR, Podesta L, Reiter I. The long-term followup of primary anterior cruciate ligament repair defining a rationale for augmentation. *Am J Sports Med*. 1991;19(3):243–255. doi:10.1177/036354659101900307.
 14. van der List JP, Mintz DN, DiFelice GS. The location of anterior cruciate ligament tears: a prevalence study using magnetic resonance imaging. *Orthop J Sport Med*. 2017;5(6):2325967117709966. doi:10.1177/2325967117709966.
 15. Murray MM, Bennett R, Zhang X, Spector M. Cell outgrowth from the human ACL in vitro: regional variation and response to TGF- β 1. *J Orthop Res*. 2002;20(4):875–880. doi:10.1016/S0736-0266(01)00156-5.
 16. Murray MM, Spector M. Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells. *J Orthop Res*. 1999;17(1):18–27. doi:10.1002/jor.1100170105.
 17. Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, Langer M, Budny T, Probst A. Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *J Orthop Res*. 2002;20(5):939–946. doi:10.1016/S0736-0266(02)00032-3.
 18. Probst A, Palmes D, Freise H, Langer M, Joist A, Spiegel HL. A new clamping technique for biomechanical testing of tendons in small animals. *J Invest Surg*. 2000;13(6):313–318. doi:10.1080/089419300750059352.
 19. Hefli FL, Kress A, Fasel J, Morscher EW. Healing of the transected anterior cruciate ligament in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(3):373–383. doi:10.2106/00004623-199173030-00008.
 20. Chamberlain CS, Crowley E, Vanderby R. The spatio-temporal dynamics of ligament healing. *Wound Repair Regen*. 2009;17:206–215. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00465.x.
 21. Frank C, Woo SL-Y, Amiel D, Harwood F, Gomez M, Akeson W. Medial collateral ligament healing: a multidisciplinary assessment in rabbits. *Am J Sports Med*. 1983;11(6):379–389. doi:10.1177/036354658301100602.
 22. Le GMPH, Eggerer J, Sciore P, Reno C, Vignon E, Otterness I, Hart DA. Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol*. 2000;19(5):431–441. doi:10.1016/S0945-053X(00)00093-7.
 23. King JB. The lower extremity and spine in sports medicine. *Br J Sport Med*. 1986;20(4):188. doi:10.1136/bjism.20.4.188.
 24. Amiel D, Frank CB, Harwood FL, Akeson WH, Kleiner JB. Collagen alteration in medial collateral ligament healing in a rabbit model. *Connect Tissue Res*. 1987;16(4):357–366. doi:10.3109/03008208709005620.
 25. Attia E, Brown H, Henshaw R, George S, Hannafin JA. Patterns of gene expression in a rabbit partial anterior cruciate ligament transection model: the potential role of mechanical forces. *Am J Sports Med*. 2010;38(2):348–356. doi:10.1177/0363546509348052.
 26. Chamberlain CS, Crowley EM, Kobayashi H, Eliceiri KW, Vanderby R. Quantification of collagen organization and extracellular matrix factors within the healing ligament. *Microsc Microanal*. 2011;17(2):779–787. doi:10.1017/S1431927611011925.
 27. Ng GY, Oakes BW, Deacon OW, Mclean ID, Lampard D. Biomechanics of patellar tendon autograft for reconstruction of the anterior cruciate ligament in the goat: three-year study. *J Orthop Res J Bone Jt Surg*. 1995;13(4):602–608.
 28. Tohyama H, Beynon BD, Johnson RJ, Renström PA, Arms SW. The effect of anterior cruciate ligament graft elongation at the time of implantation on the biomechanical behavior of the graft and knee. *Am J Sports Med*. 1996;24(5):608–614. doi:10.1177/036354659602400508.
 29. Ballock RT, Woo SL, Lyon RM, Hollis JM, Akeson WH. Use of patellar tendon autograft for anterior cruciate ligament reconstruction in the rabbit: a long-term histologic and biomechanical study. *J Orthop Res*. 1989;7(4):474–485. doi:10.1002/jor.1100070404.
 30. Nguyen DT, Ramwadhoebe TH, Van Der Hart CP, Blankevoort L, Tak PP, Van Dijk CN. Intrinsic healing response of the human anterior cruciate ligament: an histological study of reattached ACL remnants. *J Orthop Res*. 2014;32(2):296–301.
 31. Toy BJ, Yeasting RA, Morse DE, McCann P. Arterial supply to the human anterior cruciate ligament. *J Athl Train*. 1995;30(2):149–152.
 32. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini I, Parrilli A, Veronesi F, Fini M, Giardino R, Facchini A, Grigolo B. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):R22. doi:10.1186/ar4156.
 33. Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH. Enhancement of tendon graft osteointegration using

- mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2004;20(9):899–910.[doi:10.1016/S0749-8063\(04\)00653-X](https://doi.org/10.1016/S0749-8063(04)00653-X).
34. Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology*. 2008;47(8):1137–1143.[doi:10.1093/rheumatology/ken114](https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken114).
35. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012;65(12):1712–1719.[doi:10.1016/j.bjps.2012.06.011](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2012.06.011).