

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861311

研究課題名(和文) 軟骨再生における荷重負荷の影響について

研究課題名(英文) Knee loading stimulates healing of mouse cartilage defects.

研究代表者

西村 明展 (Nishimura, Akinobu)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10508526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：圧負荷が軟骨再生に与える影響を検討した。マウス膝関節にドリルを用いて全層欠損モデルを作成し、1Nの強度、5Hzの頻度、5分間で圧負荷を週に5日間かけた。術後2週間、4週間の組織で、圧負荷をかけた群はかけなかった群より軟骨修復が良好であった。In vitroでマウス細胞株ATDC5を使用し、ポンプで0.001MPa, 0.01MPaの圧負荷を1時間かけてreal time PCRで軟骨分化に関する遺伝子を調査したが、有意な発現増加はみられなかった。適度な圧負荷は軟骨再生を促す可能性が動物実験にて示されたが、このメカニズム解明のため、in vitroで様々な条件を検討し必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of loading stress for mouse cartilage defects. We made a cartilage defects on left patella groove by using 0.5 mm handy drill, cartilage defect holes were made. On day 3 after surgery, we started knee loading and did that 5days a week. Knee loading load, frequency and duration were 1N, 5Hz, and 5 min respectively. On day 14 and day 28, we sacrificed mice and picked up left femurs. Cartilage repairs of loading group are significant better than those of non-loading group both on day 14 and on day 28. We used an original pressure system using by a pump in order to give chondrocytes some pressure (0.001MPa, 0.01MPa) for 1 hour. Upregulations of anabolic genes such as type II collagen, aggrecan and SOX9 were not seen on loaded chondrocyte. Knee loading can promote cartilage repair on mouse cartilage defects model, but we have to examine in vitro studies with various condition in order to elucidate that mechanism.

研究分野：関節外科、スポーツ医学

キーワード：軟骨再生 荷重負荷刺激 軟骨欠損 変形性膝関節症 knee loading

1. 研究開始当初の背景

2007年より、日本は超高齢社会を迎え、いかにして健康で元気な(介護の必要のない)高齢者の割合を増やすかが以前に増して重要な課題となっている。平成19年国民基礎調査において変形性関節症を代表とした関節疾患は介護原因の12.2%を占め、要支援・要介護原因の第4位となっている。変形性関節症の代表である変形性膝関節症(以下、膝OA)は単純X線上で40歳以上では女性62.4%、男性42.6%が罹患しているとされており、この調査が行われた平成17年度の年齢別人口構成に当てはめると本邦の膝OA患者数は2530万人(男性860万人、女性1670万人)になると報告されている。つまり、変形性関節症を予防することは介護に至る高齢者を減少させるものと考えられる。一方、変形性関節症の大きな危険因子として外傷を代表とした軟骨損傷が強く影響していると考えられている。若年期のスポーツ障害などで軟骨損傷を生じた場合、10年程度の経過で変形性関節症に至ると考えられる。従って、関節軟骨損傷を修復する方法があれば、スポーツ障害の治療法となるのみならず、変形性関節症患者を減らすことができ、結果として高齢者の介護予防に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

現在、我が国において、比較的小さな軟骨障害に対する手術方法としてドリリング、マイクロフラクチャー法などの骨髄刺激法が行われている。この方法は軟骨下骨を削り出血させることで骨髄中の間葉系細胞を動員し修復を得る方法である。骨髄刺激法では、術後早期の過度の荷重負荷は collagenases や gelatinases を活性化させ、軟骨再生を障害する可能性が考えられる。一方、ギプスなどで固定をしてしまうと関節軟骨の維持に悪影響を及ぼすとされており、適度な負荷が軟骨細胞に必要であることが示唆される。実際に、骨形成の領域において、マウスの脛骨骨損傷モデルでは膝関節外側から適度な荷重負荷を与えることで、骨形成を促進させることが報告されており、これは骨髄内圧の変化と Wnt シグナルを介して anabolic な作用が骨形成を導いたものと結論づけている。

軟骨組織においても、骨組織と同様に適度な負荷を与えることにより、その再生を促せる可能性が考えられる。本研究ではマウスの骨髄刺激法モデルを作成し、どの程度の荷重刺激を与えることが軟骨再生に最適であるのか、不適であるのかを組織学的に調査する。また、軟骨細胞株を使用し、in vitro でも軟骨再生に関与する遺伝子レベルの変化を観察する。

3. 研究の方法

①マウス膝関節軟骨損傷に対する骨髄刺激法モデルの確立

9週齢の C57/BL6 マウス(オス)を使用した。手術は2%イソフルレンで吸入麻酔を行った。軟骨全層欠損の作成法は Okamura らの報告に準じて、内側傍膝蓋切開にて膝蓋骨を外側に反転して膝関節を展開し、膝蓋大腿関節の大腿骨関節面に 0.5mm 径のマイクロドリルを用いて徒手的にドリリングを行った。対照群(CN群)としてそれぞれ9匹ずつ、荷重群(Load群)としてそれぞれ8匹ずつ使用した。

②マウス膝関節骨髄刺激法モデルへの荷重刺激

反復荷重刺激は ElectroForce ロードフレームシステム(Bose社)を使用した。術翌日よりマウスを2%イソフルレンでの麻酔下に、この荷重刺激装置を用いて荷重刺激を与えた。荷重負荷は5Hzで5分間行い、1Nの力で行った。刺激は週に5日間行い、屠殺する術後2週、4週まで刺激を継続した。

③組織学的検討

術後2,4週間でマウスを頸椎脱臼法にて屠殺し、刺激を与えた部分の関節軟骨を含む大腿骨を採取した。得られた組織をヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)およびサフラニンO染色で染色した。軟骨修復の評価法はサフラニンO染色を行った切片を利用して Modified WAKITANI score を用いて評価した。

④in vitroでの圧負荷

マウス軟骨細胞株である ATDC5 を使用した。10%FBS 含有 DMEM/F12 の培養液を用いて、インキュベーター(37°C、5%CO₂)で培養を行う。80%コンフルエントとなった状態で培養液を serum free に変更し、細胞に圧負荷をかけた。細胞への圧負荷はペリスタポンプ(Atto社)を用いて行い、その負荷は0.001MPa、0.01MPaで行った。負荷をかける時間は1時間とし、その30分後に細胞を回収した。

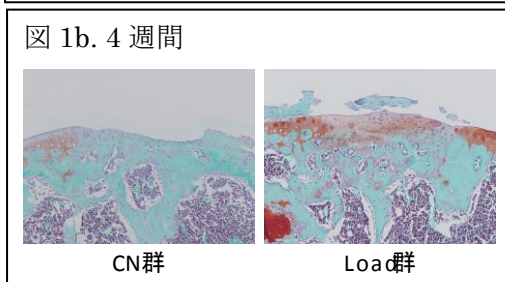
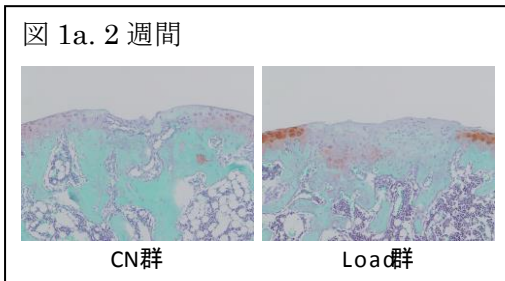
⑤リアルタイムPCRでの検討

前述の圧負荷後の細胞から mRNA を ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて抽出し、1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche社)を用いて cDNA 作成した。cDNA を作成後に SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems社)を用いて定量的に評価を行った。調査する mRNA は II 型コラーゲン、aggrecan、Sox9 を行った。また、ハウスキーピングジーンには GAPDH を用いて各データを標準化し、比較した。

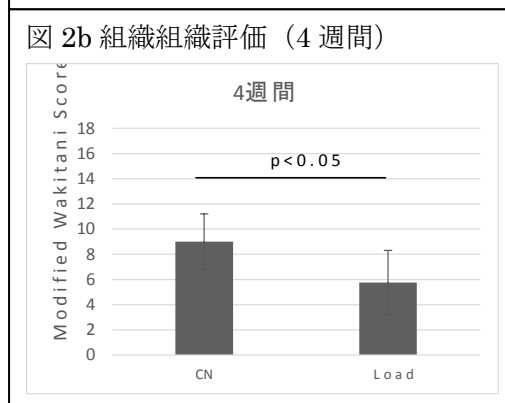
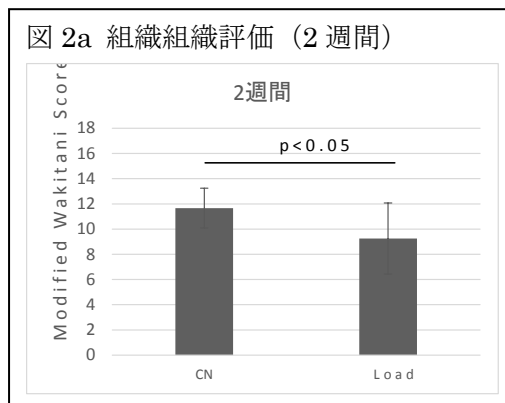
4. 研究成果

①マウス膝関節骨髄刺激法モデルへの荷重刺激効果

2週間の圧負荷刺激(図1a)、4週間の圧負荷刺激(図1b)の各群のサフランin O染色の組織像を示す。



Modified WAKITANI score では2週間の荷重負荷ではCN群が 11.7 ± 1.6 であるのに対し、Load群が 9.3 ± 2.8 とCN群の値が有意に高く(図2a. $p < 0.05$)、CN群がLoad群に比べ、軟骨の修復が悪かった。また、4週間の荷重負荷の組織結果においてもCN群が 9.0 ± 2.3 であるのに対し、Load群が 5.7 ± 2.5 とCN群の値が有意に高く(図2b. $p < 0.05$)、CN群がLoad群に比べ、軟骨の修復が悪かった。



②in vitroでの遺伝子発現

II型コラーゲン、aggrecan、Sox9のいずれの遺伝子においてもin vitroでの圧負荷(0.01MPa、0.001MPaとも)では有意な発現量の増加を見ることは出来なかった。過去の3次元培養での報告ではanabolicな遺伝子の発現の上昇を認めていたり、単層培養でもshear flow stressでMMP13などのcatabolicな遺伝子の発現の低下などが認めていたりすることから、圧の強度・負荷時間・培養方法など条件を再度検討し、さらなる研究が必要であるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Nishimura A, Fukuda A, Kato K, Fujisawa K, Uchida A, Sudo A. Vascular safety during arthroscopic all-inside meniscus suture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 査読有、23849975-980, 2015
doi:10.1007/s00167-013-2774-7.
2. Nishimura A, Akeda K, Kato K, Asanuma K, Yamada T, Uchida A, Sudo A. Osteoporosis, vertebral fractures and mortality in a Japanese rural community. *Mod Rheumatol.* 査読有、24(5):840-843, 2014
doi:10.3109/14397595.2013.866921
3. Hamamura K, Chen A, Nishimura A, Tanjung N, Sudo A, Yokota H. Predicting and validating the pathway of Wnt3a-driven suppression of osteoclastogenesis. *Cell Signal.* 査読有、26(11):2358-2369, 2014
doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.018.
4. Nishimura A, Akeda K, Kato K, Asanuma K, Yamada T, Uchida A, Sudo A. Osteoporosis, vertebral fractures and mortality in a Japanese rural community. *Mod Rheumatol.* 査読有、24(5):840-843, 2014
doi:10.3109/14397595.2013.866921.
5. Nishimura A, Kato K, Fukuda A, Nakazora S, Yamada T, Uchida A, Sudo A. Prevalence of hallux valgus and risk factors among Japanese community dwellers. *J Orthop Sci.* 査読有、19(2):194-197, 2014
doi:10.1007/s00776-012-0284-y.
6. 明田 浩司, 加藤 俊宏, 松峯 昭彦, 長谷川 正裕, 若林 弘樹, 辻井 雅也, 浅沼 邦洋, 松原 孝夫, 西村 明展, 中村 知樹, 村田 耕一郎, 今西 隆夫, 森本 亮, 榊原 紀彦, 笠井 裕一, 須藤 啓広 脊椎椎体骨折の追跡コホート調査 既存骨骨折が新規骨折の発生様式に与える影響

- Journal of Spine Research. 査読有、5(2):145-150, 2014
7. 西村 明展, 加藤 公, 須藤 啓広 検診からわかる整形外科疾患 骨粗鬆症 臨床整形外科. 査読有、49(10):849-852, 2014
 8. 加藤 公, 西村 明展 スポーツ外傷・障害の診療 最近の話題から 東海関節. 査読有、6:39-48, 2014
 9. 須藤 啓広, 西村 明展 【骨粗鬆症診療の地域連携】 骨粗鬆症の疫学からみた地域社会 骨粗鬆症治療. 査読有、13(3):181-185, 2014
 10. 加藤 俊宏, 北村 綱為, 深間内 誠, 松田 和道, 西村 明展, 加藤 公, 福田 亜紀, 藤澤 幸三 股関節手術後の Wii Fit Plus を用いたバランストレーニングの取り組み 東海スポーツ傷害研究会会誌. 査読有、32:41-43, 2014
 11. 加藤 公, 西村 明展 【スポーツに整形外科医はどうかかわるか】 健康スポーツに対して ロコモティブシンドロームに果たすスポーツ整形外科医の役割 関節外科. 査読有、33(12):1332-1335, 2014
 12. 西村 明展, 加藤 公, 福田 亜紀, 須藤 啓広 超音波ガイド下腱内視鏡挿入の有用性 日本整形外科超音波学会会誌. 査読有、25(1):23-27, 2014
 13. 伊東 直也, 西村 明展, 中空 繁登, 福田 亜紀, 加藤 公, 須藤 啓広 アキレス腱断裂の治療におけるアンケート 保存か手術か 中部日本整形外科災害外科学会雑誌. 査読有、57(39):571-572, 2014
 14. 西村 明展, 加藤 公, 福田 亜紀, 須藤 啓広 踵骨骨嚢腫に対するリン酸カルシウムペースト充填術の切開法と鏡視下法との比較 JOSKAS. 査読有、39(2):484-485, 2014
 15. 福田 亜紀, 中空 繁登, 西村 明展, 加藤 公, 藤澤 幸三 スポーツ少年団員におけるドーピングに対する意識調査 臨床スポーツ医学. 査読有、31(7):703-706, 2014
 16. Morimoto R, Akeda K, Iida R, Nishimura A, Tsujii M, Obata S, Kasai Y, Uchida A, Sudo A. Tissue renin-angiotensin system in the intervertebral disc. Spine (Phila Pa 1976). 査読有、38(3):E129-36, 2013 doi:10.1097/BRS.0b013e31827b8c89.
 17. Ishiguro S, Asano N, Yoshida K, Nishimura A, Wakabayashi H, Yokochi A, Hasegawa M, Sudo A, Maruyama K. Day zero ambulation under modified femoral nerve block after minimally invasive surgery for total knee arthroplasty: preliminary report. J Anesth. 査読有、27(1):132-4, 2013 doi: 10.1007/s00540-012-1479-2.
 18. 西村 明展, 加藤 公, 福田 亜紀, 藤澤 幸三, 須藤 啓広 ロコモ 25 と骨粗鬆症、変形性膝関節症、運動機能の関係 第 8 回旧宮川村検診結果より 日本整形外科学スポーツ医学会雑誌. 査読有、33 巻 1 号 :97-100, 2013
 19. 柿本 拓也, 西村 明展, 福田 亜紀, 加藤 公, 須藤 啓広 鷺足部に遊離体を形成した女子サッカー部員の 1 例 整形外科. 査読有、64 巻 3 号:245-247, 2013
- [学会発表] (計 18 件)
1. 西村明展, 加藤公, 中空繁登, 福田亜紀, 須藤啓広 腱内視鏡が有効であった外傷後後脛骨筋腱炎の 1 例、第 21 回 東海関節鏡研究会、平成 27 年 1 月 17 日、ウイックあいち (愛知)
 2. 西村明展, 中空繁登, 加藤公, 須藤啓広 外反母趾はロコモティブシンドロームの原因となりうるか?、第 39 回足の外科学会、平成 26 年 11 月 11-14 日、シーガイアコンベンションセンター (宮崎県)
 3. 西村明展, 松峯昭彦, 長谷川正裕, 若林弘樹, 榊原紀彦, 宮本憲, 明田浩司, 淺沼邦洋, 辻井雅也, 宮崎晋一, 中村和樹, 加藤公, 須藤啓広, 外反母趾が運動機能に与える影響—旧宮川村検診より—、第 29 回日本整形外科基礎医学会、平成 26 年 10 月 9-10 日、城山観光ホテル (鹿児島)
 4. 福田亜紀, 中空繁登, 伊東直也, 西村明展, 加藤公, 藤澤幸三 小・中・校生におけるドーピングに対する意識調査、第 24 回日本臨床スポーツ医学会学術集会、平成 25 年 10 月 25-26 日、市民会館崇城大学ホール (熊本市)
 5. 中空繁登, 西村明展, 福田亜紀, 加藤公, 藤澤幸三 鏡視下切除を行った Os subtibiale の 2 例 第 24 回日本臨床スポーツ医学会学術集会、平成 25 年 10 月 25-26 日、市民会館崇城大学ホール (熊本市)
 6. 伊東直也, 西村明展, 加藤公, 福田亜紀, 中空繁登, 須藤啓広 アキレス腱断裂の治療におけるアンケート調査、第 121 回中部日本整形外科災害外科学会学術集会、平成 25 年 10 月 3-4 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
 7. 西村明展, 加藤 公, 福田亜紀, 藤澤幸三, 須藤啓広 解剖学的 2 重東前十字靭帯再建術の CT MPR 像を用いた大腿骨孔拡大の検討、第 39 回日本整形外科学スポーツ医学会学術集会、平成 25 年 9 月 13-14 日、ウイックあいち (名古屋市)
 8. 西村明展, 加藤 公, 福田亜紀, 須藤啓広 骨粗鬆症、椎体骨折と運動機能の関係-旧宮川村検診結果より- 第 39 回日本整形外科学スポーツ医学会学術集会、平成 25 年 9 月 13-14 日、ウイックあいち

- (名古屋市)
9. 西村明展、加藤 公、須藤啓広、福田亜紀 腱内視鏡挿入時の超音波補助の有用性 第 25 回日本整形外科超音波学会、平成 25 年 7 月 6 日、ウェスティンナゴヤキャッスル (名古屋市)
 10. 長谷川正裕、宮本 憲、西村明展、松井佑梨世、若林弘樹、須藤啓広 Patient Specific Instrumentation を用いた TKA の術中術後評価、第 5 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会、平成 25 年 6 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
 11. 西村明展、加藤 公、福田亜紀、須藤啓広 踵骨骨嚢腫に対するリン酸カルシウム骨ペースト充填術の鏡視下法と Open 法との比較 第 5 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会、平成 25 年 6 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
 12. 長谷川正裕、若林弘樹、西村明展、宮本憲、須藤啓広 MIS TKA、第 86 回日本整形外科学会学術総会、平成 25 年 5 月 23-26 日、広島グリーンアリーナ (広島市)
 13. 西村明展、松峯昭彦、長谷川正裕、若林弘樹、明田浩司、浅沼邦洋、辻井雅也、里中東彦、松原孝夫、加藤 公、須藤啓広 地域在住高齢者に対するロコモ 25 とロコモティブシンドロームとの関係第 86 回日本整形外科学会学術総会、平成 25 年 5 月 23-26 日、広島グリーンアリーナ (広島市)
 14. 加藤俊宏、明田浩司、西村明展、松峯昭彦、長谷川正裕、若林弘樹、辻井雅也、浅沼邦洋、松原孝夫、中村知樹、須藤啓広 脊椎椎体骨折の追跡調査—既存骨折に対する新規骨折の発生様式—、第 86 回日本整形外科学会学術総会、平成 25 年 5 月 23-26 日、広島グリーンアリーナ (広島市)
 15. 森本亮、明田浩司、辻井雅也、西村明展、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広 椎間板における組織レニン-アンギオテンシン系の発現とその意義 第 86 回日本整形外科学会学術総会、平成 25 年 5 月 23-26 日、広島グリーンアリーナ (広島市)
 16. 西村明展、加藤 公、福田亜紀、中空繁登、須藤啓広 一般高齢者における外反母趾の疫学調査—旧宮川村コホート研究より— 第 120 回中部日本整形外科災害外科学会学術集会、平成 25 年 4 月 5-6 日、和歌山県民文化会館 (和歌山市)
 17. Akinobu Nishimura, Kazunori Hamamura, Masahiro Hasegawa, Akihiro Sudo, and Hiroki Yokota. Salubrinal Suppresses Cartilage Degeneration in a Murine Knee Osteoarthritis Model. ORS2015 2015. 3. 26-3. 31 (Lasvegas, USA)

18. Akeda K, Kato T, Nishimura A, Murata K, Sudo A. Effect of prevalent vertebral fractures on the occurrence pattern of new vertebral fractures -A population-based cohort study- 40th The International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting. May 13-17, 2013 (Arizona, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 西村 明展 (Nishimura Akinobu)
 三重大学・医学研究科・講師
 研究者番号：10508526

(2) 研究分担者 ()
 研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
 研究者番号：