

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560258

研究課題名(和文)超音波療法による変形性関節症の改善可能性

研究課題名(英文)Possibility of therapeutic use of ultrasound for the treatment of osteoarthritis

研究代表者

黒木 裕士(Kuroki, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20170110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養軟骨細胞に対してIL-1 を添加し、LIPUSを照射した。IL-1 の添加によってMMP13の発現は有意に促進されたが、LIPUS照射はその発現上昇の抑制効果を示し、その抑制効果はLIPUS強度が高い程大きかった。ラット大腿骨滑車面に骨軟骨欠損を作成し、LIPUS照射を実施した。骨軟骨欠損部へのLIPUS照射は、擬似照射と比較して軟骨修復を促進した。LIPUSはIL-1 によって惹起されたMMP13 mRNA発現を強度依存性に即時的に抑制した。LIPUSは骨軟骨欠損モデルラットの関節軟骨修復を促進する可能性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) has applied for the cultured chondrocyte supplemented with IL-1beta. MMP13 mRNA was up-regulated by IL-1beta, however, the up-regulation was in part repressed by LIPUS exposure. The repressive effect of LIPUS on MMP13 was higher in the higher LIPUS intensity. An osteochondral defect was created at femoral groove of rat, and then LIPUS exposure was performed. LIPUS exposure at the osteochondral defect was more promoted the repair than the sham exposure. Therefore, it was suggested that LIPUS might repress the induction of MMP13 mRNA expression induced by IL-1beta in an intensity-dependent manner, and also suggested that LIPUS might promote the articular cartilage repair on the animal model of the osteochondral defect.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：超音波 低出力 パルス 関節軟骨 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

低出力超音波パルス (Low-intensity pulsed ultrasound: LIPUS) は、その名の通り非常に低出力な超音波をパルス状に照射する治療装置である。LIPUS を用いた研究では、骨折治癒促進効果に関する研究が先行しており、強度 30 mW/cm² (spatial- and temporal-average)、周波数 1.5 MHz、繰り返し周波数 1.0 kHz、パルス幅 200 μs、照射時間 20 分/日という条件下において、動物実験およびランダム化比較試験での臨床研究により骨折治癒促進効果とその安全性が確認されている。また近年では、LIPUS を骨折治療だけでなく、筋、靭帯、腱、そして関節軟骨などの治療にも応用できないか検討がなされるようになってきた。我々は、関節軟骨に対する LIPUS の効果に着目して研究を推進している。そこで LIPUS を変形性関節症 (osteoarthritis: OA) 治療へ応用するための基礎的研究として、軟骨細胞への影響を調べ、骨軟骨欠損に対する修復効果を検討する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

関節疾患の代表ともいえる OA は、本邦において症状を伴うもので膝関節に限定しても、およそ 780 万人にも及ぶことが推測されている。しかしながら、関節軟骨は血管、リンパ、神経を欠き、一度損傷すると自己再生は困難であると考えられている。そのため、OA の早期発見と進行予防が重要であると考えられている。

OA は関節軟骨の変性を主病変として、疼痛や関節可動域制限を引き起こし、日常生活活動の障害につながる疾患である。これまで保存的治療により、OA の症候に対する一定の効果は報告されているが、病態の本質である関節軟骨に対する影響に関してはあまり検討がなされていない。OA の症候と関節軟骨の変性状態は必ずしも一致しないということから、仮に保存的治療により症候の改善が得られたとしても、関節軟骨の変性を助長させてしまっている可能性は排除できない。そのため、関節軟骨自体への保存的治療の効果検討が必須であると考えられている。

関節軟骨に過度な機械的刺激や外傷などが加わることで、インターロイキン-1 (interleukin-1: IL1) などの炎症性サイトカインが誘導され、さらにそれらは軟骨破壊因子であるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) やアグレカナーゼである A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) の産生を引き起こし、関節軟骨破壊が生じると考えられている。これまでの保存療法では、筋力強化や日常生活指導などによって、この過度な機械的刺激を軽減することに主に着目されてきたが、これに

さらに加えて、関節軟骨破壊因子を直接的に抑制することができれば、より効果的な OA 進行予防が得られるのではないかと考えられる。これまで、過度な機械的刺激や、あるいは逆に刺激が全くない状態では MMP の発現が亢進し、関節軟骨破壊や変性が進行することが報告されているが、一方で適度な機械的刺激であれば MMP の発現が抑制され、関節軟骨破壊・変性が抑制されることが報告されている。そこで LIPUS 刺激が関節軟骨にとって適度な機械的刺激となり、MMP の発現を抑制し得るのではないかと仮説を立てた。関節軟骨変性に対する LIPUS の効果に関する先行研究では、LIPUS はウサギ由来の軟骨細胞の MMP1 mRNA の発現を抑制したという *in vitro* の研究や、テングネズミおよびウサギ OA モデルの MMP13 産生を抑制したという *in vivo* 研究が報告されているが、LIPUS の即時的な関節軟骨破壊因子に対する影響や、LIPUS の強度の違いがそれらに与える影響に関して検討した報告は知る限り無かった。そこで、関節軟骨破壊因子に対する LIPUS の即時的効果を、様々な強度で検討した。

3. 研究の方法

本研究は所属大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

骨折治療ですでに用いられている LIPUS のパラメーターを用いて、主要な関節軟骨破壊因子である MMP13 に与える影響を検討した

12 週齢の Wistar 系雄性ラットの膝関節から関節軟骨を摘出し、初代軟骨細胞を採取した。その後、単層培養にて 3 - 4 継代培養増殖させた後、OA の擬似病態を惹起させるため、IL-1 を 100 pg/ml 添加する群と添加しない群を設け、その直後から LIPUS を照射した。LIPUS は SAFHS2000 (帝人ファーマ社製) を用い、強度 30 mW/cm²、周波数 1.5 MHz、繰り返し周波数 1.0 kHz、パルス幅 200 μs、照射時間 20 分という条件で照射した。照射 1 時間後と 3 時間後に total RNA を回収し、real-time PCR にて mRNA の発現を定量解析した。標的遺伝子は主要な関節軟骨破壊因子である MMP13 とし、内部標準化遺伝子としてアクチンを用いた。その結果、LIPUS 刺激から 1 時間後において、MMP13 の発現は IL-1 を添加することで有意に高まったが、LIPUS 照射はその発現上昇を有意に一部抑制した。しかしながら、LIPUS 刺激から 3 時間後には、LIPUS による抑制効果は認められなくなった。以上のことから、IL-1 によって惹起された MMP13 mRNA は、骨折治療で用いられている 30 mW/cm² 強度の LIPUS によって抑制され得ること、そしてその効果の持続時間は 3 時間よりも短い可能性が本実験条件において示唆された。

つづいて LIPUS 強度の違いが与える影響を検討した。上記同様に軟骨細胞を採取し、培

養後、IL-1 を添加しない群、100 pg/ml 添加する群、さらに 1000 pg/ml 添加する群を設け、添加直後から LIPUS を照射した。照射条件は上記同様だが、強度のみ 0 (擬似照射)、7.5、30、120 mW/cm² の 4 条件を設けた。LIPUS 照射による差が認められた 1 時間静置後に total RNA を回収し、real-time PCR にて mRNA の発現解析を行った。標的遺伝子は MMP13 の他に、MMP の抑制因子である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 および TIMP2 と、関節軟骨の主要な基質成分である II 型コラーゲンおよびアグリカンとした。内部標準化遺伝子には アクチンを用いた。

4. 研究成果

その結果、MMP13 mRNA の発現は、IL-1 を添加しない条件では LIPUS 照射によってわずかな抑制が認められた。続いて IL-1 を 100 pg/ml 濃度で添加すると、MMP13 の発現が惹起され、さらに LIPUS 照射によって強度依存性の抑制が認められた。しかしながら、IL-1 を 1000 pg/ml 濃度で添加した条件においては、LIPUS 強度間において有意な差は認められなくなった。

以上のことから、LIPUS は IL-1 によって惹起された MMP13 mRNA 発現を強度依存性に即時的に抑制し得ること、そしてその抑制効果は IL-1 の濃度に影響を受けることが示唆された。また、TIMP 1、TIMP 2、および II 型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現は、LIPUS 照射による顕著な影響は認められなかった。

先行研究では、圧縮刺激などの適度な機械的刺激は、詳細なメカニズムは未だに不明であるものの、MMP の発現を抑制すると報告している。本研究においても、LIPUS 照射は IL-1 によって惹起された MMP13 の mRNA 発現を抑制したことから、LIPUS による機械的刺激も先行研究と同様な作用を示したことが推察される。また、0~120 mW/cm² 強度の間においては、強度が強い程 MMP13 の抑制効果が高い可能性が示唆された。本研究では用いた機器の限界から、120 mW/cm² 以上の強度を検討していないが、今後より幅広い強度を用いて検討する必要があると考えている。また、Li らは LIPUS による MMP13 抑制機序として ERK1/2 や p38 などの MAPKs の活性化を阻害することが一部関与していると報告しており、本研究においても Li らと同様な機序が関わっている可能性があるが、本研究ではこのようなメカニズムまで踏み込んで解析できていないため、今後の課題となる。

これまで LIPUS 刺激は軟骨分化の促進や基質産生の促進、さらには基質の剛性を高めるといった報告が in vitro 研究にて数多く報告されているが、本研究においては II 型コラーゲンやアグリカンの mRNA 発現に与える影響は認められなかった。この相違に関して、

Leskinen らは in vitro 研究においては LIPUS 照射による温度上昇に注意すべきであることを報告している。我々も予備実験において、LIPUS による温度上昇を確認した。特にカップリングゲルを介して照射すると、30 mW/cm² 強度でも 20 分で約 1℃、40 分で約 3℃ も上昇し、さらに 70 mW/cm² では 5 分で 4℃ まで、そして 20 分後には 6℃ 以上上昇した。確かに生体に LIPUS を照射しても温度上昇はほとんど生じないが、このように in vitro 条件では温度上昇が容易に生じてしまうことが明らかとなった。そこで温度上昇を抑制するために、37℃ の環流水に培養プレートの底を浸し、さらにプレートの蓋からの超音波の跳ね返りを防ぐために、シリコン製の超音波吸収剤で被覆した。そうすることで、120 mW/cm² 強度で照射したとしても 1℃ 以内の温度変化に留まる事を確認した。

次に、このような温度上昇を抑制した条件下において LIPUS の基質産生能を検討した。実験群は、コントロールとして 37℃ 環流水に浸すのみの群、LIPUS 群として LIPUS 照射を 37℃ で実施する群、さらには 40℃ 群、LIPUS プラス 40℃ 群、43℃ 群、そして LIPUS プラス 43℃ 群を設けた。LIPUS 照射は 30 mW/cm² で 20 分間とし、1 時間静置した後に mRNA の発現解析を行った。その結果、LIPUS 照射単独では II 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA 発現は変動しなかったが、温度上昇によって亢進されることが確認された。本研究では mRNA レベルでしか解析しておらず、蛋白レベルの情報がないことや、長期的な影響については解析していないため、厳密な結論には言及できないが、in vitro 研究においては必ず温度変化に注意する必要があると考えられた。

関節軟骨は自己再生が困難な組織のため、一度損傷すると外科的な手術が必要となる。マイクロフラクチャー法やモザイクプラスチック法、また近年では自家培養軟骨細胞移植術などが施行されているが、我々はこの手術後に関節軟骨の再生をより促進する方法はないかと考えている。先行研究では、トレッドミル走行運動によって軟骨修復が促進されることが報告されており、適切な機械的刺激の導入による効果だと推察されている。しかしながら、LIPUS が骨軟骨欠損修復に与える影響の詳細は未だ不明である。そこで本研究では、骨軟骨欠損モデルラットに対して LIPUS 刺激を行い、関節軟骨修復が促進されるかどうかを検討した。方法は、8 週齢の Wistar 系ラット大腿骨滑車面に 1 mm 径の骨軟骨欠損を作成し、欠損作成 4 週間後から、LIPUS を擬似照射するコントロール (Ctrl) 群と、LIPUS を骨折治療で用いられている設定で 20 分間を週 5 回照射する LIPUS 群の 2 群にランダムに振り分け、4 週間の介入を行った。そして、欠損作成から 8 週間後 (LIPUS 介入をはじめから 4 週間後) に膝サンプルを回収し、Wakitani スコアを用いて半定量的

に修復を評価したところ、Ctrl 群よりも LIPUS 群の方が有意にスコアの改善が認められた。以上のことから、LIPUS 刺激は骨軟骨欠損の修復を促進する可能性があることが示唆された。しかしながら本研究は非常に短期的な結果であるため、より長期的で詳細な効果検討が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Tajino J, Iijima H, Zhang X, Kiyan W, Kuroki H. Does Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Treatment Affect Cartilage Regeneration in Osteochondral Defect Model Rat? J Orthop Trauma. 2015 May;29(5):S2. doi:10.1097/01.bot.0000462952.87235.3d.

黒木 裕土、関節に対する物理的刺激を用いたリハビリテーション 基礎研究の視点から、査読無、理学療法学 41 巻 8 号 Page706-708(2014.12)

伊藤 明良、黒木 裕土、低出力超音波パルス(LIPUS)は軟骨破壊因子を抑制する、査読無、物理療法科学、21 巻 Page17-20(2014.07)

〔学会発表〕(計 4 件)

Shoki Yamaguchi, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Momoko Nagai, Hirotaka Iijima, Junichi Tajino, Xiangkai Zhang, Wataru Kiyan, Hiroshi Kuroki. The effect of low intensity pulsed ultrasound treatment combined with mesenchymal stromal cell injection for cartilage regeneration in a knee osteochondral defect model of rats. 査読有、OARSI 2015.

伊藤明良、山口将希、黒木裕土、LIPUS による関節軟骨破壊抑制効果、第 42 回日本生体電気・物理刺激研究会(2015.03)

山口将希、青山朋樹、伊藤明良、長井桃子、太治野純一、飯島弘貴、張項凱、喜屋武弥、黒木裕土、低出力超音波パルスは骨軟骨欠損モデルラットの軟骨再生に影響を及ぼすか？ 査読有、第 18 回超音波骨折治療学会(2015.01)

伊藤明良、黒木裕土、戦略的物理療法 低出力超音波パルス(LIPUS)は、軟骨破壊因子を抑制する、査読有、第 21 回日本物理療法学会学術大会 (2013.10)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kuroki-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒木裕土 (KUROKI, Hiroshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20170110