

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650129

研究課題名（和文） 超音波刺激による関節軟骨細胞活性化の可能性と危険性

研究課題名（英文） Effect of Ultrasound on Viability of Chondrocyte

研究代表者

黒木 裕士 (KUROKI HIROSHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20170110

研究成果の概要（和文）：低出力超音波パルス（LIPUS）が軟骨細胞に及ぼす影響について調べた。具体的には、LIPUSの刺激強度が軟骨細胞の matrix metalloproteinase-13 (MMP13) の mRNA 発現に及ぼす影響を解析した。ウイスター系雄ラットの膝関節から関節軟骨を採取し、この採取軟骨をコラゲナーゼ処理して軟骨細胞を単離した。軟骨細胞を単層培養して LIPUS 刺激を与えた。単層培養軟骨細胞には IL-1 ベータを無添加、100 ピコグラム/ml 添加、1000 ピコグラム/ml 添加し、0、7.5、30、120 W/cm² の強度で LIPUS 刺激を与え、mRNA を Real-time PCR で分析した。その結果、LIPUS は MMP13 mRNA を即時的に抑制した。また、その抑制は LIPUS 強度依存性に高まった。

研究成果の概要（英文）：The effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on mRNA expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP13) of chondrocyte was investigated using real-time PCR method. Chondrocytes were isolated from articular cartilage in rat knee joints (Wistar, 12 week-old). After the chondrocytes were cultured, culture medium was changed for serum free or serum free with IL-1 beta, 100 pg/ml or 1 ng/ml concentration. Then, LIPUS was applied at 0, 7.5, 30, 120 mW/cm² intensity for 20-minutes. Total RNA was extracted immediately after 1-hour incubation. LIPUS could significantly inhibit the mRNA expression of MMP13 induced by IL-1 beta at 100 pg/ml concentration in intensity-dependent manner. In conclusion, LIPUS has a possibility to inhibit mRNA expression of MMP13 in intensity-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：超音波・軟骨細胞・刺激・活性

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (Osteoarthritis: 以下 OA) は関節軟骨変性を主病変とした退行性疾患であり、痛みや関節可動域の制限を引き起こすことにより患者の日常生活活動が制限され、生活の質低下につながる疾患である。OA に対して様々な側面から治療アプローチが研究されているが未だ有効な治療方法は確立されておらず、病因の解明と治療法の確立が必要である。理学療法が OA に与える有効性は一部証明されてきているが、疼痛や主観的機能評価による検討が多く、OA 病態の主体である関節軟骨への影響についてはほとんど明らかでないのが現状である。関節軟骨は痛み受容器が存在しないため、各種物理療法や運動療法によって一時的に疼痛や運動機能の改善が認められたとしても、関節軟骨に対する影響は未知数である。また、関節軟骨は無血管組織でありその自己修復能は非常に低いとされているため⁴⁾、関節軟骨変性の早期発見と進行予防・防止が重要であると考えられることから、理学療法が関節軟骨に与える影響に対するエビデンスの構築が求められている。OA 発症・進行の要因の一つとして、関節軟骨代謝バランスの崩壊が挙げられる。関節軟骨代謝は様々な因子で調節されているが、重要な因子の一つとして機械的刺激があり、過度な機械的刺激は関節軟骨を直接的に破壊したり、軟骨破壊因子を誘導したりすることが報告されている。逆にギプス固定などによる機械的刺激の過度な減少も、代謝バランスに変調をきたし関節軟骨破壊を引き起こすことが報告されている。一方で、適度な (生理的な) 機械的刺激は関節軟骨の基質合成を促進するだけでなく、関節軟骨破壊を抑制することが報告されている。これらの知見を応用し、適度な機械的刺激を OA 治療に用いようとする試みがなされているが、*in vitro* 研究で用いられる方法論では臨床応用がこれまで困難であった。低出力超音波パルス療法 (low-intensity pulsed ultrasound: 以下 LIPUS) は、微弱な超音波を照射して組織治癒を促進する物理療法である。その作用メカニズムは完全には明らかにはなっていないが、キャビテーションや音波流による機械的刺激が主に作用すると考えられている。LIPUS は難治性骨折治療においてはよく研究されており、すでに臨床で使用されている。骨形成に関与する軟骨細胞への LIPUS の作用から、関節軟骨への影響についても研究されるよう

になってきた。しかしながら、関節軟骨治療のための LIPUS 至適強度や至適時間などは未だ不明であり、臨床応用のためには多くの課題が残されている。また、多くの研究は主要関節軟骨基質成分であるコラーゲンタイプ 2 (type 2 collagen: 以下 Col2) やアグレカン (aggrecan: 以下 ACAN) の生合成に関する報告が多く、主要関節軟骨破壊因子と考えられているマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: 以下 MMP) に対する LIPUS の影響については未だ不明である。

2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は、様々な強度の LIPUS が関節軟骨代謝に与える即時的な影響をメッセンジャー RNA (messenger ribonucleic acid: 以下 mRNA) 発現解析により明らかとし、LIPUS の OA に対する物理療法としての可能性を検討することである。

3. 研究の方法

関節軟骨代謝を非侵襲的に評価する方法は未だ確立されていないため、関節軟骨代謝への LIPUS の影響を検討するためにラット膝関節由来培養軟骨細胞を用いた。本研究は動物実験委員会の審査を受け実施した (承認番号; MedKyo11021)。

12 週齢の Wistar 系ラット左右膝関節から関節軟骨片を無菌的に採取した。4 mg/ml 濃度に調整したコラーゲナーゼ (和光純薬工業社製) 処理を 37°C で一晩行うことにより関節軟骨片の基質成分を分解し、軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞は 250 × g で 3 分間遠心分離することによってペレット状に集め、培養液 (Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12: 以下 DMEM/Ham's F12, ナカライテスク社製), 10% 仔牛血清 (fetal bovine serum: 以下 FBS, ハイクロン社製), 50 U/ml ペニシリン (ナカライテスク社製), 50 μg/ml ストレプトマイシン (ナカライテスク社製) で再懸濁し培養皿に播種した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C, 湿度 95%) 内で十分量の細胞が得られるまで培養した後、4 × 10⁵ cell/dish に調整して継代した。細胞密度が 80~90% コンフルエントに達したところで、FBS に含有されるサイトカインの影響を排除するため無血清培養液に交換し、20 時間後実験に用いた。

LIPUS 刺激装置は、sonic accelerated fracture healing system devices 2000 (以下 SAFHS2000, 帝人ファーマ社製) を用いた。すでに骨折治療において臨床的に用い

られている設定に準拠し、周波数 1.5 MHz, 繰り返し周波数 1 kHz, パルス幅 200 μ 秒, 刺激時間 20 分とし、以下の 2 つの実験を行った。

実験 1: インターロイキン-1 β 添加濃度決定のための予備的実験

OA 関節軟骨に対する LIPUS の影響を調査するため、炎症性サイトカインである組換えヒトインターロイキン-1 β (recombinant human interleukin-1 β : 以下 IL-1 β , PeproTec 社製) を添加することで培養軟骨細胞を刺激し、実験的に擬似 OA 軟骨細胞を作成した。IL-1 β 刺激によって引き起こされる炎症強度を明らかにするため、予備的実験として 0 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml 濃度の IL-1 β で 1 時間刺激し、MMP ファミリーの中でも主要な関節軟骨変性作用を有すると考えられている MMP13 の mRNA 発現レベルを解析した。実験は 2 回繰り返し、同様な結果が得られることを確認した。その結果を基に、以降の実験は 100 pg/ml もしくはさらに 10 倍高い 1000 pg/ml 濃度の IL-1 β を用いて実験した。

実験 2: LIPUS 強度の違いが培養軟骨細胞に与える影響

LIPUS 強度の違いによる培養軟骨細胞への影響を検討するため、100 pg/ml もしくは 1000 pg/ml 濃度の IL-1 β を添加した培養軟骨細胞に対して、0 (擬似刺激), 7.5, 30, 120 mW/cm² の 4 つの強度 (空間平均時間平均, spatial-average temporal-average: 以下 SATA) を用いて LIPUS 刺激し、1 時間静置後に mRNA 発現解析を行った。なお、全ての実験は 37°C にコントロールされたウォーターバス内で実施し、培養液表面からの反射波による細胞への多重照射を避ける目的で、シリコン製超音波吸収剤を被せた状態で LIPUS 刺激を行った。

mRNA 発現解析

培養軟骨細胞からの全 RNA 抽出は、RNeasy-Mini Kit (キアゲン社製) を用いて製造者のプロトコールに従って行った。抽出した全 RNA は NanoDrop2000 (Thermo scientific 社製) によりその純度を確認した後、使用するまで -80°C で保存した。逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡社製) を用いて製造者のプロトコールに従って実施し、相補的 DNA (complementary DNA, :以下 cDNA) を合成した。合成した cDNA は使用するまで -30°C で保存した。LIPUS が軟骨細胞代謝へ与える影響を mRNA

レベルで定量的に解析するため、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法 (real-time polymerase chain reaction: 以下 real-time PCR) を実施した。Real-time PCR は Applied Biosystems7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社製) を用い、PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製) にて SYBR Green1 Dye assay を実施した。各実験条件から得られた cDNA をテンプレートとして用い、1 \times PowerSYBR Green PCR Master Mix と 0.2 μ M の各遺伝子特異的プライマー (表 1), そして超純水を混合して増幅させた。混合液は 95°C で 10 分間加熱された後、DNA の変性のために 95°C で 15 秒, 伸長反応のために 60°C で 60 秒のサイクルを 40 サイクルさせて増幅された。増幅後、融解曲線を作成することでプライマーダイマーや非特異的増幅産物が発生していないことを確認した。標的遺伝子は軟骨細胞に対する異化作用と同化作用を捉えるために、関節軟骨破壊因子である MMP13 と、主要関節軟骨基質成分である Col2 と ACAN とした。内部標準遺伝子は β -actin を用いた。Real-time PCR によって得られたデータは、比較 CT 法 (comparative threshold cycle method) により相対定量した。簡潔に述べると、標的遺伝子発現量を β -actin 発現量で正規化し、さらにキャリブレーターサンプル (LIPUS 強度 0 mW/cm², IL-1 β 濃度 0 pg/ml) との比率として示した。

統計解析

全てのデータは平均値 (%) \pm 標準偏差として表した。実験 1 は、実験 1 回につきトリPLICATE で real-time PCR を実施し値を算出した (n=3)。実験 2 においては、6 回実験を繰り返しその平均値を用いた (n=6)。各群間の比較は Kruskal-Wallis test および Scheffe' s F test を用いて解析した。有意水準は 5%未満とした。

4. 研究成果

実験 1 IL-1 β 添加濃度による MMP13 mRNA 発現の変化

実験的に擬似 OA 軟骨細胞を作り出すために、0, 10, 100 pg/ml 濃度の IL-1 β を培養軟骨細胞に添加した。MMP13 mRNA 発現量は 0 pg/ml (100.0 \pm 11.1%) と比較して、10 pg/ml (82.7 \pm 6.3%) では有意な差は認められなかったが、100 pg/ml (154.6 \pm 21.6%) においては有意な発現亢進が認められた (p < 0.05)。この結果から、以降の実験は 100 pg/ml もしくはさらに 10 倍高い 1000 pg/ml 濃度の IL-1 β を用いて実験した。

実験 2 LIPUS 強度の違いが各種遺伝子発現に及ぼす影響

MMP13 mRNA 発現

IL-1 β 未添加条件においては、LIPUS 擬似照射 (100 \pm 7.3%) に対して 120 mW/cm² 強度 (76 \pm 6.4%) で有意な MMP13 mRNA 発現抑制が認められた ($p < 0.01$)。IL-1 β を 100 pg/ml 濃度で添加した条件では、LIPUS 擬似照射 (238.8 \pm 4.3%) に対して有意な LIPUS 強度依存性の MMP13 mRNA 発現抑制が認められた (7.5 mW/cm²: 213.3 \pm 3.9%, 30 mW/cm²: 188.5 \pm 3.9%, 120 mW/cm²: 168.0 \pm 6.6%, 各 $p < 0.01$)。しかしながら IL-1 β を 1000 pg/ml の濃度で添加した条件では、有意な差は認められなくなった。

Col2 mRNA 発現

IL-1 β 未添加条件においては、LIPUS 擬似照射 (100 \pm 3.0%) に対して LIPUS 強度 7.5 mW/cm² (106.3 \pm 2.7%, $p < 0.05$), 30 mW/cm² (107.5 \pm 2.7%, $p < 0.01$), 120 mW/cm² (107.3 \pm 3.4%, $p < 0.01$) いずれも有意な Col2 mRNA 発現亢進が認められた。一方、IL-1 β を 100 pg/ml 濃度で添加した条件では、LIPUS 擬似照射 (104.5 \pm 2.4%) に対して 7.5 mW/cm² 強度 (91.0 \pm 4.0%) において有意な Col2 mRNA 発現抑制が認められた ($p < 0.01$)。さらに、IL-1 β を 1000 pg/ml 濃度で添加した条件では、LIPUS 擬似照射 (106.5 \pm 13.5%) に対して 120 mW/cm² 強度 (76.1 \pm 6.4%) において有意な発現抑制が認められた ($p < 0.01$)。

ACAN mRNA 発現 (表 3)

IL-1 β 未添加条件においては、LIPUS 擬似照射 (100 \pm 3.6%) に対して LIPUS 強度 30 mW/cm² (85.3 \pm 5.9%) において有意な ACAN mRNA 発現抑制が認められた ($p < 0.01$)。IL-1 β を 100 pg/ml 濃度で添加した条件では、LIPUS 擬似照射 (102.8 \pm 5.7%) に対して LIPUS 強度 7.5 mW/cm² (86.0 \pm 5.8%, $p < 0.01$), 120 mW/cm² (91.8 \pm 6.2%, $p < 0.05$) において有意な ACAN mRNA 発現抑制が認められた。しかしながら、IL-1 β を 1000 pg/ml 濃度で添加した条件では、120 mW/cm² 強度において発現抑制される傾向は認められなかった。

その結果、LIPUS は MMP13 mRNA を即時的に抑制した。また、その抑制は LIPUS 強度依存性に高まった。さらに IL-1 ベータの濃度にも影響を受けた。LIPUS 刺激は関節軟骨を標的とする理学療法として使用できる可能性があるが今後さらなる研究が必要である。これらの成果は以下の発表論文等とし

て公表した。

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 1 件)

- ① 伊藤 明良、青山 朋樹、山口 将希、秋山 治彦、黒木 裕士: 低出力超音波パルス療法が関節軟骨代謝に与える即時的影響～異なる刺激強度を用いた研究～. 理学療法学 39, 2012 (印刷中) DOI: 該当なし

[学会発表] (計 4 件)

- ① 伊藤 明良、三浦 美樹子、青山 朋樹、土本 浩司、橋本 幸次郎、小倉 祥子、三井 裕人、石橋 誠、黒木 裕士: 関節軟骨に対する低出力超音波パルスの即時効果. 第 46 回日本理学療法学会大会. 2011. 5. 27. シーガイアコンベンションセンター (宮崎県)
- ② Akira Ito, Tomoki Aoyama, Hiroto Mitsui, Makoto Ishibashi, Shoki Yamaguchi, Xiang Kai Zhang, Hiroshi Kuroki: Low-intensity pulsed ultrasound downregulates the messenger RNA expression of the matrix metalloproteinases on an articular cartilage explants model. The 2011 World Congress on Osteoarthritis. 2011. 9. 16. Hilton San Diego Bayfront hotel (USA)
- ③ 伊藤明良、黒木裕士、張 項凱、秋山治彦: 低出力超音波パルスは軟骨細胞に対し IL-1 β によって惹起された MMP13 mRNA 発現を強度依存的に抑制する. 第 15 回超音波骨折治療研究会. 2012. 1. 21. 東京ステーションコンファレンス (東京都)
- ④ 伊藤明良、山口将希、張 項凱、青山朋樹、秋山治彦、黒木裕士: IL-1 β により惹起された MMP13mRNA 発現亢進に対する低出力超音波パルスの即時的効果. 第 25 回日本軟骨代謝学会. 2012. 3. 9. ウイルあいち (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木裕士 (KUROKI HIROSHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 20170110

(2) 研究分担者

三浦美樹子 (MIURA MIKIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 40447925

研究分担者

秋山治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60402830