

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12583

研究課題名(和文)変形性関節症に対する超音波刺激の影響

研究課題名(英文)Effect of ultrasound stimulation on osteoarthritis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟骨欠損に対する、低出力超音波(LIPUS)治療と、間葉系間質細胞(MSC)関節内注入治療の併用効果について、関節軟骨修復と軟骨下骨の再組織化を検証した。関節軟骨修復はWakitaniスコアで、軟骨下骨の再組織化はマイクロCTで調べた。4週間のLIPUS照射は、欠損部の軟骨下骨骨密度を有意に増加させた。MSC関節内注入治療は軟骨修復スコアを有意に改善させた。LIPUS照射は軟骨下骨の再組織化を改善した。LIPUS照射とMSC関節内注入治療の併用は、それぞれの効果を阻害し合うことなく、軟骨修復スコアおよび軟骨下骨の再組織化を促進した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) treatment combined with mesenchymal stromal cell (MSC) injection for cartilage repair and subchondral bone reconstitution for treatment of an osteochondral defect of rats. The rats were divided into two intervention groups: without or with LIPUS irradiation. Cartilage repair was evaluated histologically based on the Wakitani cartilage repair score. Subchondral bone reconstitution was evaluated as bone volume (BV)/tissue volume (TV) by micro-computed tomography analysis. MSC injection improved the cartilage repair score, and LIPUS irradiation improved BV/TV. Combination treatment promoted both cartilage repair and BV/TV improvement. Thus, MSC injection combined with LIPUS irradiation is more effective than either treatment alone in promoting concurrent cartilage repair and subchondral reconstitution.

研究分野：リハビリテーション(理学療法)

キーワード：超音波 関節軟骨 間葉系間質細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis: 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、関節軟骨の疾患である。

この OA の発症要因としては、加齢、体重増加やメカニカルストレスの増加、遺伝的因子など多岐にわたるが、関節軟骨の損傷もそのひとつである。

関節軟骨は血管、リンパ、神経を欠くことから、一度損傷すると修復能力が乏しい組織として知られている。ごく小さな関節軟骨の損傷であっても、それがやがて拡大し、関節軟骨変性が徐々に進行すると考えられており、そのため、OA の早期発見と進行予防のための治療介入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。

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 μ s、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。

しかしこの LIPUS は関節軟骨を標的とする治療にはまだ応用されていない。

最近、LIPUS が骨芽細胞を刺激し骨折治療として効果的であることが明らかにされた。そこで代表者は平成 22~23 年度の挑戦的萌芽研究 (課題番号 22650129) を得て実験し LIPUS は軟骨細胞に対して強度依存性に MMP13 (コラーゲン分解酵素) を抑制することを見出した。

これは LIPUS により関節軟骨は保護されることを示しており、変形性関節症の治療応用に発展する可能性を示唆している。ただし

in vitro で行ったこの研究だけでなく、動物を飼育しながら LIPUS を照射する *in vivo* 研究が不足している。*in vivo* 研究では、関節軟骨病変をどのように作って研究するのか、すなわち変形性関節症モデル動物を用いるのか、軟骨損傷モデル動物を使用するのか、それとも骨軟骨欠損モデル動物にするのか等々、種々の選択肢がある。

今回我々は、骨軟骨欠損を動物に作製し、LIPUS を照射することによる影響を調べる基礎的研究として、関節軟骨および軟骨下骨の修復効果を検討する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

近年、細胞移植による関節軟骨の再生医療が期待されはじめている。

我々はこの再生医療について、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell) に注目して研究を行っている。

間葉系幹細胞は関節軟骨細胞への分化能力をもつことが知られており、骨髄や滑膜、脂肪などの生体組織から容易に採取することができるうえ、免疫寛容性、癌化の危険が低いなどの性質があることから、軟骨再生治療における有力な移植候補となり得るからである。

しかし、間葉系幹細胞治療がヒトの臨床に適用されるためには、まず動物を用いた基礎研究における検証が必要である。また間葉系幹細胞移植後のリハビリテーション介入や物理刺激介入が必要になることを見据え、その有効性・安全性を動物実験において調べる必要がある。

しかし現在、間葉系幹細胞移植とリハビリテーション介入や物理刺激介入を組み合わせる効果を検証する研究はほとんど行われていない。

そこで我々は骨軟骨欠損したラット膝関節に対し、関節軟骨細胞への分化能力をもつ間葉系幹細胞移植後に LIPUS 照射介入を行い、骨軟骨再生に及ぼす影響を検証しようと試みている。

ただし本研究では、採取して培養した細胞が、すべて間葉系幹細胞であることを証明できていないため、この細胞を、間葉系間質細胞 (Mesenchymal Stromal Cell: MSC) として定義し、この細胞移植後に LIPUS 照射介入を行い、骨軟骨再生に及ぼす影響を検証した。

3. 研究の方法

本研究は所属大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。

8 週齢雄性 Wistar 系ラット 28 匹の両側大腿骨滑車部に直径 1 mm の骨軟骨欠損を麻酔下にて作成した。この 28 匹を 4 週間自由飼

育し 12 週齢になった時点で以下の MSC 注入を行った。

別個体の 8 週齢雄性 Wistar 系ラット 3 匹の大腿骨部から骨髓を採取して培養した同種他家骨髓由来の MSC 1.0×10^6 個を、この 28 匹のラット右膝関節に注入し、左膝関節には対照膝としてリン酸緩衝液を注入した。

その後ラットを LIPUS 照射群と非照射群（偽照射群）に分け、照射群には両膝に対して週 5 回、1 日 20 分間の LIPUS 照射を行った。

ラットの膝を 4 群、すなわち、リン酸緩衝液を注入した左膝の Control 群、リン酸緩衝液を注入した左膝に LIPUS を照射する LIPUS 群、MSC を注入した右膝の MSC 群、MSC を注入した右膝に対しさらに LIPUS を照射する MSC+LIPUS (MSCL) 群に分け、LIPUS 照射介入開始から 4 週後（16 週齢になった時点で）および 8 週後（20 週齢になった時点で）左右の膝関節を摘出した。

なお LIPUS 照射には 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 μ s の条件とした。

摘出した左右の膝関節を micro-Computed Tomography（micro-CT）にて解析し、欠損修復部分の骨密度（Bone Volume/ Total volume: BV/TV）の算出を行った。

その後、摘出した膝関節を 10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 液で脱灰しパラフィン包埋後、6 μ m 厚の連続薄切切片を作り、組織評価として alkaline phosphatase (ALP) 染色による骨軟骨の石灰化を観察した。

またサフラニン O 染色、ヘマトキシリン - エオジン染色を行って Wakitani の関節軟骨修復スコア（スコア 0：完全修復～スコア 14：修復なし）で評価した。

さらに、免疫組織化学染色を行って II 型コラーゲンと I 型コラーゲンの観察を行った。具体的には染色した標本を撮像して TIFF 像 8-bit gray scale に変換して Image-J で解析した。

統計学的有意水準は 0.05 とした。

4. 研究成果

LIPUS 照射介入 4 週後（16 週齢）BV/TV は Control 群および MSC 群と比べ、LIPUS 群と MSCL 群で有意に高値を示した。組織観察では ALP 染色は各群で関節軟骨深層の石灰化軟骨領域に発現が見られたが、Control 群ではその発現が乏しいか、修復組織の大部分で発現するという 2 極化した結果が見られた。

関節軟骨修復スコアは Control 群が平均スコア 9 であったのに比べて LIPUS 群ではスコア 6、MSC 群ではスコア 5、MSCL 群ではスコア 4 であり、これら 3 群ではいずれも有意な改善が見られた。

修復組織における II 型コラーゲンの発現をエリア%で解析したところ、Control 群に比べて LIPUS、MSC、MSCL の 3 群で著明に増加が見られた。

介入 8 週後（20 週齢）では、BV/TV で各群に有意な差は見られなかった。組織観察では ALP 染色は LIPUS 群と MSCL 群の関節軟骨深層の石灰化軟骨領域に帯状の領域として観察された。

関節軟骨修復スコアは Control 群が平均スコア 8 であったのに比べて LIPUS 群ではスコア 7、MSC 群ではスコア 5、MSCL 群ではスコア 5 であり、MSC 群と MSCL 群で有意な改善が見られた。

修復組織部における II 型コラーゲンの発現をエリア・パーセントで解析したところ、Control 群に比べて LIPUS、MSC、MSCL の 3 群で著明な増加が見られた。

本研究結果より、MSC の関節内注入は関節軟骨の再生を促進し、LIPUS の照射は軟骨下骨の修復促進と、関節軟骨に対しては石灰化層の形成促進の効果があることが示唆された。

前述したように関節軟骨は自己再生が困難な組織である。そのためヒトでは、一度関節軟骨が損傷すると外科的な手術が必要となることが多く、マイクロフラクチャー法やモザイクプラスティー法、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、MSC 注入も関節軟骨の再生法、修復法のひとつとなる可能性がある。

今回この MSC 注入に LIPUS を併用したところ、MSC の関節軟骨修復の促進効果と、LIPUS の軟骨下骨の修復促進の効果は互いに阻害されることがなかった。LIPUS は、部位の異なる関節軟骨と軟骨下骨の両方に対する効果を発揮した。

したがって MSC 注入に LIPUS を付加することは、骨軟骨欠損複合体の全体の修復を一層促進する介入になると考える。

ただし LIPUS が骨軟骨欠損修復に与える機序の詳細は不明である。

LIPUS は、音響インピーダンスが異なる界面において超音波が反射する際に音波エネルギーを伝播するという原理を基に、超音波エネルギーを、骨軟骨欠損部の修復組織表面に伝搬する、修復組織内部の細胞膜表面に伝搬し、そのシグナル伝達の起点となる、修復組織の下部にある新生骨組織の界面に伝搬する、新生骨組織の細胞膜表面に伝搬し、そのシグナル伝達の起点となる等の、主として、修復に有利となる、適度なメカニカルストレスを加える効果を有すると推察される。そのメカニズム解明は今後の課題である。

すでにヒトの骨折治療で用いられている、1 回 20 分の照射時間に設定したこの LIPUS は、治療期間を今回設定した 4 週と 8 週だけでなく、より短期、あるいは長期に設定する等により、新たな方法論を提案できるまで導

くことができる可能性がある。

本研究では非常に限定された期間の結果であるため、より効果を発揮する期間を検討する必要がある。

以上、骨軟骨欠損に対する修復効果を検討する目的で、MSC を注入した動物の膝にLIPUS を照射し、その効果に着目する研究はこれまではなかったが、本研究により、骨軟骨欠損に対する MSC 移植治療において、LIPUS の併用を行うことにより関節軟骨だけでなく軟骨下骨を含めた骨軟骨複合体の修復を促進できる可能性があることが示唆された。

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 1 件)

- (1) Shoki Yamaguchi, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Momoko Nagai, Hiroataka Iijima, Junichi Tajino, Xiangkai Zhang, Wataru Kiyan, Hiroshi Kuroki. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound after Mesenchymal Stromal Cell Injection to Treat Osteochondral Defects: An In Vivo Study. *Ultrasound Med Biol*. 2016 Dec;42(12):2903-2913.doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2016.07.021. Epub 2016 Sep 3.

[学会発表](計 6 件)

- (1) Shoki Yamaguchi, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Momoko Nagai, Hiroataka Iijima, Junichi Tajino, Xiangkai Zhang, Wataru Kiyan, Hiroshi Kuroki. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound after Mesenchymal Stromal Cell Injection to Treat Osteochondral Defects: An In Vivo Study.
- (2) Shoki Yamaguchi, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Momoko Nagai, Junichi Tajino, Hiroataka Iijima, Xiangkai Zhang, Wataru Kiyan, Hiroshi Kuroki. Effect of low-intensity pulsed ultrasound after mesenchymal stromal cells injection to treat osteochondral defect. (2016.03)
- (3) 山口 将希, 青山 朋樹, 伊藤 明良, 飯島 弘貴, 長井 桃子, 太治野 純一, 張 項凱, 黒木 裕士. 骨軟骨欠損モデルラットに対する細胞移植と低出力超音波パルス治療の併用が欠損修復に及ぼす影響.

(2016.05)

- (4) Shoki Yamaguchi, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Momoko Nagai, Junichi Tajino, Hiroataka Iijima, Xiangkai Zhang, Wataru Kiyan, Hiroshi Kuroki. Efficacy of LIPUS treatment following mesenchymal stromal cell intra-articular injection in an osteochondral defect model rats. (2015.04)
- (5) Shoki Yamaguchi, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Momoko Nagai, Junichi Tajino, Hiroataka Iijima, Xiangkai Zhang, Wataru Kiyan, Hiroshi Kuroki. The effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound combined with mesenchymal stromal cell injection for cartilage regeneration in rat knee osteochondral defect model. (2015.04)
- (6) 山口 将希, 伊藤 明良, 太治野 純一, 長井 桃子, 飯島 弘貴, 張 項凱, 喜屋武 弥, 青山 朋樹, 黒木 裕士. 骨軟骨欠損モデルラットに対する間葉系間質細胞移植と低出力超音波パルス治療の併用による骨軟骨再生効果の検討 . (2015.06)

[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

- (1)http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/pt0102/
- (2)<http://kuroki-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

- (1) 研究代表者
黒木裕士 (KUROKI, Hiroshi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20170110

