

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659676

研究課題名(和文) 膝前十字靭帯再建術における骨- 靭帯結合早期治癒に関する研究

研究課題名(英文) Early tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction

研究代表者

黒坂 昌弘 (KUROSAKA, Masahiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70170115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：Statinを移植腱に局所徐放して骨新生と血管新生を促し、ACL再建術における早期に靭帯の再構築・骨-靭帯結合治癒を実現することを目的とする。  
日本白色家兎を用いてStatin含有ハイドロゲルを移植した膝前十字靭帯再建術を行い、組織学的・力学的に骨-移植腱間の内軟骨性骨化がStatin群で有意に早期にみられ、さらにmicro CTにてStatin群で骨孔の縮小が確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to test the hypothesis that enhanced angiogenesis and osteogenesis by locally applied simvastatin promotes tendon-bone healing after ACL reconstruction. Rabbits received ACL reconstruction with hamstring tendon graft and were implanted with either simvastatin-conjugated gelatin hydrogel or gelatin hydrogel alone in their bone tunnels. Histological and radiological analyses at week 2 demonstrated early tendon-bone healing with enhanced angiogenesis and osteogenesis in the simvastatin-treated group. Biomechanical testing at week 2 also demonstrated a significant increase in ultimate failure load in the simvastatin-treated group. This study suggested that local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel promotes the tendon-bone healing via its effect on both angiogenesis and osteogenesis at an early phase in a rabbit model, but does not affect biomechanical property in long-term after ACL reconstruction.

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：前十字靭帯 Statin 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は、膝のスポーツ傷害の中で最も高頻度に生じるものの一つであり、自然治癒能に乏しいために、損傷前安定膝の再獲得、後発する半月板損傷・変形性関節症防止のために関節内に作成した骨孔を経由して関節内に自家腱を移植する ACL 再建術を行うのが通常とされ、とりわけスポーツ復帰を切望する症例では必須とされている。しかし一方で、力学的ストレスに耐えうる移植腱 (特に骨 - 腱間結合) に成熟するまでに 6 ~ 12 ヶ月を要し、スポーツ復帰を妨げる主要因になっている。これらの背景により、早期復帰を目的に、早期に強度な骨 - 腱間結合治癒を獲得するための新たな手法の確立が待たれている。近年、腱・靭帯再生・修復の分野においても、細胞・成長因子・担体を 3 本柱とする組織工学的手法を用いた治療応用への期待が高まっている。

(2) Statin は HMG-CoA 還元酵素阻害薬として、血清コレステロール値を低下させる作用が知られているが、種々の細胞に対する多面的作用 (pleiotropic effects) も報告されている。

Statin の添加によって骨芽細胞における BMP-2 の発現が上昇することを *in vitro* 実験結果として報告して以降、Statin による骨密度の改善や骨折治癒の促進効果を示す動物実験がみられるようになっており、また血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞を介した血管新生促進作用も報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Statin を移植腱に局所徐放して骨新生と血管新生を促し、ACL 再建術における早期に靭帯の再構築・骨-腱間結合治癒を実現することである。本研究が実証されれば、スポーツ選手・関係者を含む ACL 損傷後に早期スポーツ復帰を切望する人々に多大なる副産をもたらすと同時に、社会貢献にもつながる。

## 3. 研究の方法

Statin の至適濃度を評価するため、各濃度下での骨芽細胞・骨髄細胞の増殖能を評価する。その結果をうけて statin 濃度を決定し、白色家兎で ACL 再建モデルを作成し、statin を内包した生体吸収性ハイドロゲルを移植腱に縫着し、移植腱とともに骨孔内に導入した群と statin を内包していないハイドロゲルを縫着した群とを作成し、術後 2 週・4 週・8 週における組織学的・力学的評価ならびに CT による骨孔評価、血管新生・骨新生評価を行う。

### (1) *in vitro* での simvastatin 至適濃度決定

*In vitro* で Statin の至適濃度を評価するため、各濃度下での骨芽細胞・靭帯細胞の増殖能を評価する。まず日本白色家兎の骨芽細胞・靭帯細胞・骨髄細胞を分離し、simvastatin 0, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/l}$  各濃度下における proliferation assay および migration assay を行う。これまで mouse 骨芽細胞への評価は完了しており、その手法は確立されている。この結果をうけて、*in vivo* での simvastatin 至適濃度を決定する。

### (2) *In vivo* ACL 再建術

次に、*in vivo* で移植実験を行う。手術は日本白色家兎をソムノペンチルの静脈麻酔により導入し、笑気、イソフルレン、酸素にて吸入麻酔による全身麻酔下で行う。関節切開により前十字靭帯を切除後、ハムストリング腱を使用した、膝前十字靭帯再建術を行う。ドリルにて大腿骨・脛骨に 2.5mm の骨孔を作製し、骨孔内に移植腱を通して両端を 4-0 エチボンド糸を用いて骨膜に固定する。以下のグループに分けて実験を行う。simvastatin 含有ハイドロゲルを移植腱に挟み、再建を完成させる。コントロール群として、ハイドロゲルのみを移植腱に挟み、再建を完成させる。simvastatin 含有ハイドロゲルは、共同研究している京都大学再生医科学研究所 生体材料

学分野 田畑研究所にて作製・提供を受ける。形状は 1cm×1cm 大のシート状で、決定された濃度の simvastatin が内包され、3 週間かけてハイドロゲルが生体吸収されながら局所徐放を行う。

### (3) 組織学的・力学的評価ならびに CT による骨孔評価

手術後、2,4,8 週においてソムノベンチル大量投与で安楽死させ、骨-移植腱の固着状態を組織学的・力学的評価ならびに CT による骨孔評価を行う。組織学的評価は H&E 染色および Movat Pentachrome 染色にて骨-移植腱間の内軟骨性骨化、Sharpy fiber の評価を術後 2 週・4 週・8 週のタイムポイントにて行う (n=6)。力学的評価は引っ張り試験 (万能力学試験機、島津) での最大破断強度、力学特性の検査を術後 8 週にて行う (n=12)。さらに、術後 8 週において骨形成の指標として骨孔径を micro CT にて評価する (n=12)。

動物愛護の立場から左右同時手術を避けるため、まず片側の手術を行い、その 4 週間または 6 週後に反対側の手術を行うことで術後 2 週・4 週・8 週のタイムポイントを同時に得ることができるようにする。

術後 2 週・4 週における組織標を用いて、オステオカルシンを用いた骨芽細胞・Isolectin を用いた血管内皮細胞の免疫組織染色を行い、単位面積当たりの osteoblast density、capillary density を定量的に評価する (n=6)。抗体の有効性・手法はすでに予備実験において確認済である。また、術後 2 週・4 週の骨孔内組織より RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により骨新生マーカー (osteocalcin, collagen 1A1, Runx2)、血管新生マーカー (CD31, VE-cadherin, VEGF) を評価する (n=6)。

## 4. 研究成果

### (1) in vitro での simvastatin 至適濃度決定

In vitro で Statin の至適濃度を評価するため、

各濃度下での骨芽細胞・靭帯細胞の増殖能を評価した。日本白色家兔の骨芽細胞・靭帯細胞・骨髄細胞を分離し、simvastatin 0, 0.1, 1, 10, 100umol/l 各濃度下における proliferation assay および migration assay を行った。図 1 のように至適濃度は 1.0-10umol/l であることが明らかとなった。

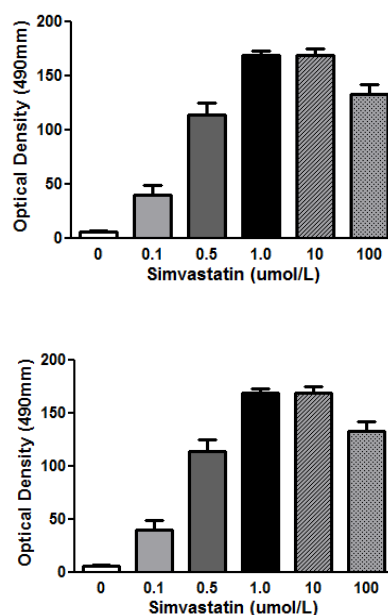


図 1 . Simvastatin の至適濃度

### (2) In vivo ACL 再建術

日本白色家兔を用いて、関節切開により前十字靭帯を切除後、ハムストリング腱を使用した、膝前十字靭帯再建術を行った (図 2)。治療群 (S 群) は simvastatin (下図) 含有ハイドロゲルを移植腱に挟み、コントロール群 (C 群) として、ハイドロゲルのみを移植腱に挟み、再建を完成させた。再建術に関してはその再現性を確認できた。

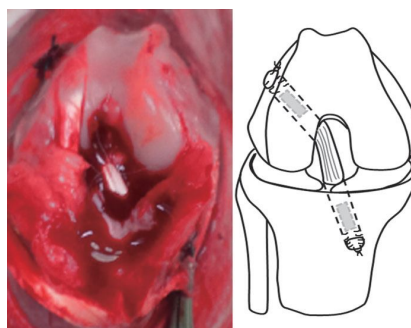


図 2 . 日本白色家兔の ACL 再建術

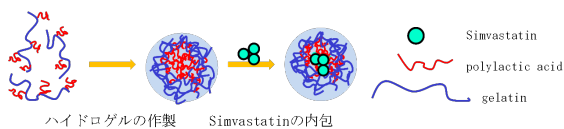


図3 . Simvastatin とハイドロゲル複合体

### (3) 組織学的・力学的評価ならびに CT による骨孔評価

組織学的 H&E 染色および Movat Pentachrome 染色にて、術後 2 週において S 群で骨-移植腱間の内軟骨性骨化が確認されたが C 群では確認されなかった。術後 4 週においては S 群で骨-移植腱間に強固な結合組織がみられたが、C 群では間隙が残存していた。また、術後 2 週における osteoblast density、capillary density 評価においては S 群に有意な血管新生効果(S 群  $112.0 \pm 6.9$  vs. C 群  $72.0 \pm 5.8/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.05$ )と骨新生効果(S 群  $495.3 \pm 32.9$  vs. C 群  $272.0 \pm 28.3/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.05$ )が確認された。

術後 8 週にける microCT による骨孔評価では、術後 2、4 週において S 群に有意な骨孔の縮小がみとめられた(2 週; S 群  $3.25 \pm 0.33$ , C 群  $4.13 \pm 0.28/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.05$ . 4 週; S 群  $1.61 \pm 0.14$ , C 群  $2.71 \pm 0.31/\text{mm}^2$ ;  $P < 0.01$ )。

引っ張り試験では術後 2 週で S 群に有意な破断強度の増加がみとめられた(S 群  $32.5 \pm 2.3$ , C 群  $21.6 \pm 3.8\text{N}$ ;  $P < 0.05$ )。

これらの効果の機序として血管新生効果を調査するため、局所の VEGF は S 群で C 群と比較して有意に発現していることを RT-PCR で確認した。さらに Block test として S 群に anti-VEGF を投与して評価すると、他の 2 群と比して有意な骨新生の減少と破断強度の低下を認めた。これらの結果より、simvastatin の局所徐放は ACL 再建術後早期に血管新生効果および骨新生効果を促し、移植腱-骨孔間の力学的強度も増強させることが示された。なかでも血管新生効果の重要性が示唆された。

## 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)

Oka S, Matsumoto T, Matsushita T, Kubo S, Sasaki H, Nishizawa Y, Matsuzaki T, Tabata Y, Kurosaka M, Kuroda R. Local administration of low dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng* 19(9-10):1233-43, 2013

[学会発表](計 1 件)

岡真也、松本知之、久保晴司、松下雄彦、佐々木宏、西澤勇一郎、松崎時夫、斉藤高志、田畑泰彦、黒坂昌弘、黒田良祐 . Simvastatin 局所徐放による前十字靭帯再建術後の移植腱-骨孔間の成熟促進効果について . 第 27 回日本整形外科基礎学術集会、10.26-27. 2012、名古屋

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

黒坂 昌弘 (KUROSAKA, Masahiro)  
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号 : 7 0 1 7 0 1 1 5

### (2)研究分担者

松本 知之 (MATSUMOTO, Tomoyuki)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 5 0 5 4 6 5 8 8

### (3) 研究分担者

松下 雄彦 (MATSUSHITA, Takehiko)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 4 0 4 6 7 6 5 0

(3) 研究分担者

黒田 良祐 (KURODA, Ryosuke)  
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号： 80379362

(3) 研究分担者

久保 晴司 (KUBO, Seiji)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 30452494  
(平成24年4月~9月まで研究に参画)