

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Possible reparative effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on injured meniscus

(低出力パルス超音波 (LIPUS) が損傷半月板に及ぼす修復効果)

釜付祐輔、青山絵理子、古松毅之、宮澤慎一、前原亜美、山中信康、西田 崇、久保田聡、尾崎敏文、
滝川正春

Journal of Cell Communication and Signaling (掲載予定)

平成 30 年 10 月 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会で発表

主 論 文

Possible reparative effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on injured meniscus

(低出力パルス超音波 (LIPUS) が損傷半月板に及ぼす修復効果)

【緒言】

半月板は主に I 型コラーゲンから成る線維軟骨であり、辺縁 1/3 (outer 領域) は血液の流入を認めるものの、残りの inner 領域は無血行野で治癒しづらく関節軟骨様の特徴を示す。我々は、CCN family member 2/結合組織成長因子 (CCN2/CTGF) が軟骨細胞の増殖・分化を促進すること、実験的変形性関節症モデルにおいて CCN2 が軟骨修復作用を示すこと、そして低出力パルス超音波 (LIPUS) 刺激により軟骨細胞において CCN2 の遺伝子発現とタンパク質産生が誘導され、アグリカンや II 型コラーゲンの遺伝子発現が亢進することを見出してきた。そこで、LIPUS により CCN2 などの軟骨修復因子が誘導されることで半月板修復が促進されると仮説をたて、LIPUS が半月板に及ぼす影響について検討した。

【対象と方法】

LIPUS 治療には、伊藤超短波社製 ST-SONIC を用いた。

In vitro 実験では、当院で施行した人工膝関節置換術患者のうち、内側型変形性膝関節症で肉眼的に損傷のない外側半月板を検体として採取し、実験に供した。ヒト半月板細胞は、inner 領域と outer 領域にわけて細断し、10%ウシ胎仔血清を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地で 37°C、CO₂ 5% で各々培養し、継代 2 代目を実験に用いた。35mm 培養容器の下方からゲルを介して 60 mW/cm² で 20 分間 LIPUS 刺激を加えた。mRNA 量は、通法に従って総 RNA を抽出し、定量 real-time PCR で測定した。CCN2 タンパク質量は、RIPA buffer で総タンパクを回収し抗 CCN2/CTGF 抗体を用いてウエスタンブロットで評価した。CCN2 ノックダウンによる影響を評価するためには、CCN2 に対する siRNA (small interfering RNA) および対照として非特異的 siRNA をそれぞれ inner 細胞にトランスフェクションした。また、LIPUS のシグナル伝達経路の解析には MEK1 阻害剤 PD98059 および p38 MAPK 阻害剤 SB203580 を用いた。細胞遊走評価は、スクラッチ法に準じて細胞播種後 90%コンフルエントに達した状態で蛍光染色 (calcein AM) し、200 μm チップ先端で間隙を作成した後に LIPUS 刺激を加え、間隙に侵入した細胞数をカウントすることにより行った。細胞増殖は、WST-1 による吸光度 (450 nm; 対照波 690 nm) にて定量した。いずれも LIPUS 非刺激群を対照とした。

In vivo 実験では、雄 SD ラット (7~12 週齢) を用い、岡山大学動物センター施設ガイドラインに沿って管理・実験を行った。LIPUS は、吸入麻酔 (イソフルラン) で鎮静後にラットを腹臥位とし、右膝外側から 60 mW/cm² で 20 分間刺激を加え、4 時間後に両膝から採取した半月板より総 RNA を抽出し、RT-PCR を行った。左膝は対照とした。また、外側半月板断裂モデルは、7 週齢ラット両膝に対して約 2 cm の前方正中切開により直視下にメスで外側半月板前方 1/3 部分に横断裂を加えて作成し、術後 7 日目から毎日 20 分間右膝にのみ LIPUS 刺激を加えた。LIPUS 刺激開始後 1~4 週でラットを安楽死させ両膝から外側半月板を回収し、肉眼的観察を行った後、サフランin-O 染色にて組織学的観察を行った。

【結果】

ヒト半月板培養細胞がコンフルエントに達した状態で LIPUS 刺激を加え 40 分後、2 時間後、6 時間後、12 時間後に mRNA レベルを測定したところ、inner 細胞では *CCN2*、*SOX9* の遺伝子発現が LIPUS 後 40 分、6 時間と二相性に上昇し、アグリカンは LIPUS 後 40 分で上昇傾向を示した。*CCN2* タンパク質は、同様に細胞がコンフルエントの状態では LIPUS 刺激後 2 時間、4 時間、6 時間で評価したところ、inner 細胞では 4 時間後、6 時間後に約 2-3 倍の増加を認めた。一方、outer 細胞では *CCN2* の遺伝子発現が LIPUS 後 40 分でのみ上昇し、*CCN2* タンパク質はわずかに上昇傾向を認めた。しかし、*CCN2* をノックダウンした inner 細胞においては、LIPUS 刺激後 40 分で *SOX9*、アグリカンの mRNA の発現上昇は抑制された。また、PD98059 50 μ M または SB203580 10 μ M を inner 細胞に添加後 1 時間で LIPUS 刺激を加え、さらにその 6 時間後に *CCN2* のタンパク質量を評価したところ、いずれの阻害薬も LIPUS による *CCN2* タンパク質産生増加を抑制した。

細胞増殖については、細胞播種翌日に 30%コンフルエントの状態では LIPUS 刺激を加え、刺激前、初回刺激後 24 時間・48 時間で比較したが、inner 細胞、outer 細胞ともに LIPUS による増殖促進効果は認められなかった。細胞遊走については、outer 細胞において有意に遊走細胞数が増加した。

一方、健常ラット半月板組織に対する LIPUS 刺激の効果を評価するため、刺激 4 時間後に両膝の mRNA レベルを比較したところ、刺激群では *Ccn2*、*Sox9*、*Col2a1*、そして *Vegf* の発現が有意に上昇し、アグリカン、*Colla2* の発現も上昇傾向を示した。

次に、外側半月板断裂モデルラットにおいて LIPUS 開始後 1 週、2 週、4 週の時点で修復機転の一つと考えられる断裂部での連続性を比較したところ、LIPUS 刺激膝(右)では LIPUS 開始後 1 週、2 週、4 週いずれの時点においても 100%であるのに対し、無治療の左膝はそれぞれ 87.5%、85.7%および 71.4%であった。組織学的評価においても、右膝は左膝と比較し LIPUS 開始 1 週間後には血管新生が豊富に誘導され、2 週間後には細胞基質産生の亢進や軟骨細胞様の細胞が散見されるようになり、4 週間後にはさらに細胞基質産生が進み断裂部での境界が不鮮明となるなど、断裂部での修復促進が確認された。

【考察】

本研究結果から、LIPUS はヒト半月板 inner 細胞および outer 細胞において *CCN2* 遺伝子発現を誘導し、inner 細胞では ERK や p38 経路を介して *CCN2* タンパク質産生が亢進することが明らかとなった。また、LIPUS はラット半月板においても *Ccn2*、*Sox9*、*Col2a1*、そして *Vegf* などの遺伝子発現を促進し、損傷した半月板修復を促進することが示唆された。

今回 *in vitro* において、inner 細胞では LIPUS により *SOX9*、*CCN2* の遺伝子発現が有意に上昇し、*COL2A1*、アグリカンは上昇傾向を認めるにとどまった。*SOX9* は軟骨分化・形成に必須因子であり、アグリカンや 2 型コラーゲンより早い段階での軟骨新生マーカーとして知られている。*CCN2* は *SOX9* の下流に位置していることが過去の報告で確認されており、LIPUS は inner 細胞においてより早い段階での軟骨新生マーカーに効果を及ぼすものと考えられる。しかし、inner 細胞において LIPUS 刺激により上昇した *SOX9* の発現が *CCN2* ノックダウンにより抑制されたことから、*CCN2* は LIPUS を介した *SOX9* の発現調整に部分的に関与している可能性も示唆され、機序の解明にはさらなる研究が必要である。また、outer 細胞においては LIPUS により細胞遊走が促進されることが確認されたが、これは LIPUS が outer 細胞の持つ線維芽細胞様の特性への作用を有することを示唆している。さらに、ラットを用いた *in vivo* 実験において、軟骨修復マーカーである *Ccn2*、軟骨分化マーカーである *Sox9* などに加え、1 型コラーゲンや血管

新生因子である *Vegf* の発現も誘導することで、半月板断裂部の修復を促進したものと考えられた。つまり、LIPUS は inner 細胞、outer 細胞それぞれの特徴を促進することで半月板修復能を高める効果を有することを示唆している。

【結論】

損傷半月板において、LIPUS 刺激により outer 領域では細胞遊走の促進や VEGF の発現によって細胞や血管が誘導され、inner 領域では軟骨分化マーカーである SOX9 や軟骨修復マーカーである CCN2 などの誘導により基質合成が亢進することで、半月板修復が促進されることが示唆された。