

標題：LIPUS による関節軟骨破壊抑制効果

所属：1) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 2) 日本学術振興会特別研究員

著者名：伊藤明良^{1),2)}、山口将希^{1),2)}、黒木裕士¹⁾

英文標題：Protective effects of LIPUS in treatment of articular cartilage degeneration

ローマ字著者名：Akira Ito, Shoki Yamaguchi, Hiroshi Kuroki

所属の英文標記：1) Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

2) Japan Society for the Promotion of Science

キーワード英語：LIPUS、MMP13、mechanical stress

和文要旨（400 字程度）：

関節軟骨治療における低出力超音波パルス（LIPUS）の応用が模索されているが、未だその効果の詳細は解明されていない。本研究の目的は、LIPUS の関節軟骨破壊因子に対する即時的効果および骨軟骨欠損モデル動物に対する組織修復効果を検討することである。ラット培養軟骨細胞に対して IL-1 β を添加し、LIPUS を 0～120 mW/cm² 強度で照射した。1 時間後に関節軟骨破壊因子である MMP13 を中心とした mRNA の発現を解析した。その結果、IL-1 β の添加によって MMP13 の発現は有意に増加したが、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。次に、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。以上のことから、LIPUS は IL-1 β 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する可能性を有することが示唆された。また、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。

アブストラクト（英文）：

Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) has not been used clinically for treating the articular cartilage, and the detailed effects of LIPUS on the degeneration and regeneration of the articular cartilage have not been elucidated in laboratory studies. Therefore, the aim of this study was to investigate the immediate effect of LIPUS on articular cartilage degeneration factors, and the effect of this treatment on tissue repair in an animal model of osteochondral defect. Cultured chondrocytes supplemented with IL-1 β were exposed to LIPUS (0–120 mW/cm² intensities). After incubation for 1 h, mRNA expression of matrix metalloproteinase (MMP) 13 and other related gene expressions were analyzed using real-time polymerase chain reaction. Our result indicated that MMP13 mRNA was upregulated by IL-1 β ; however, the upregulation was in part repressed by LIPUS exposure. In addition, the repressive effect of LIPUS on MMP13 was higher in the chondrocytes exposed to a high-intensity LIPUS. Next, an osteochondral defect was created at the femoral groove of rats, and this defect was exposed to LIPUS. Osteochondral defects in the LIPUS group showed a greater effect than those in the sham exposure. Therefore, our results suggest that LIPUS might repress the induction of MMP13 mRNA expression induced by IL-1 β in an intensity-dependent manner, and that LIPUS might promote articular cartilage repair in an animal model of osteochondral defect.

本文

はじめに

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、靱帯、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。本稿では 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について述べ、さらに現在我々が行っている LIPUS の軟骨欠損に対する修復効果について述べたい。

LIPUS を OA 治療へ応用するための基礎的研究

平成 25 年度の国民生活基礎調査によると、関節痛は 65 歳以上の有訴者において、男性では第 4 位、女性では第 2 位と上位であり、また関節疾患は要支援および要介護となった原因疾患の第 5 位、さらに要支援となった原因疾患だけに限局すると第 1 位である。そのため、関節疾患を予防・改善することは国民の生活の質や経済的な側面などに与えるインパクトは大きいと考えられる。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[10]。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[3]、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[5]。我々は、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[1]、テンジク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[2]、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我々の知る限り無かった。そこで我々は、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[4]。その研究の一部を紹介したい。

はじめに、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。なお、本研究

は所属大学の倫理委員会の承認を得て実施した。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 β 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 μ s、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 β 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 β 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(図 1A)。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(図 1B)。以上のことから、IL-1 β 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 β 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 β アクチンを用いた。その結果、MMP13 mRNA の発現は、IL-1 β 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(図 2A)。続いて IL-1 β 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(図 2B)。しかしながら、

IL-1 β 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(図 2C)。以上のことから、LIPUS は IL-1 β 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 β 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[9]。本研究においても、LIPUS 照射は IL-1 β 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[7]、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[6]。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 41℃まで、そして 20 分後には 6℃以上上昇した(図 3A)。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(図3B)。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。

LIPUSの骨軟骨欠損に対する修復効果

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、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[8]、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介入をはじめてから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(図4)。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。

結語

LIPUSは強度依存性にMMP13 mRNAの発現を抑制し、関節軟骨破壊を一部防止する可能性があると考えられる。さらに、LIPUSは骨軟骨欠損の修復を促進する可能性がある。

謝辞

本研究の一部はJSPS特別研究員奨励費(課題番号:25・3611)、科学研究費補助金基盤研究(A)(課題番号:25242055)および挑戦的萌芽研究(課題番号:25560258)の援助を受けて実施した。

利益相反

本研究発表の一部は帝人ファーマ株式会社との共同研究によって実施された。

引用文献

- [1] Choi BH, Woo JI, Min BH, et al.: Low-intensity ultrasound stimulates the viability and matrix gene expression of human articular chondrocytes in alginate bead culture, *J Biomed Mater Res Part A*. 79A: 858–864, 2006
- [2] Gurkan I, Ranganathan A, Yang X, et al.: Modification of osteoarthritis in the guinea pig with pulsed low-intensity ultrasound treatment, *Osteoarthritis Cartilage* 18: 724–733, 2010
- [3] Honda K, Ohno S, Tanimoto K, et al.: The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes, *Eur J*

Cell Biol 79: 601–609, 2000

- [4] Ito A, Aoyama T, Yamaguchi S, et al.: Low-intensity pulsed ultrasound inhibits messenger RNA expression of matrix metalloproteinase-13 induced by interleukin-1 β in chondrocytes in an intensity-dependent manner, *Ultrasound Med Biol* 38: 1726–1733, 2012
- [5] Leong DJ, Li YH, Gu XI, et al.: Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2, *FASEB J* 25: 182–191, 2011
- [6] Leskinen JJ, Hynynen K: Study of factors affecting the magnitude and nature of ultrasound exposure with in vitro set-ups, *Ultrasound Med Biol* 38: 777–794, 2012
- [7] Li XP, Li JA, Cheng K, et al.: Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on MMP-13 and MAPKs Signaling Pathway in Rabbit Knee Osteoarthritis, *Cell Biochem Biophys* 61: 427–434, 2011
- [8] Song JQ, Dong F, Li X, et al.: Effect of treadmill exercise timing on repair of full-thickness defects of articular cartilage by bone-derived mesenchymal stem cells: an experimental investigation in rats, *PLoS One* 9:e90858, 2014
- [9] Sun HB: CITED2 mechanoregulation of matrix metalloproteinases, *Ann N Y Acad Sci* 1192: 429–436, 2010
- [10] Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al.: Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study, *J Bone Miner Metab* 27: 620–628, 2009

図表説明文

図 1 LIPUS 照射による MMP13 mRNA 発現への影響

A : LIPUS 照射 1 時間後の MMP13 mRNA 相対発現量。B : LIPUS 照射 3 時間後の MMP13 mRNA 相対発現量。n = 6、**p < 0.01。(文献 4 を一部修正して引用)

図 2 異なる LIPUS 照射強度が MMP13 mRNA 発現へ与える影響

A : IL-1 β 無添加条件における MMP13 mRNA 相対発現量。B : IL-1 β 添加条件 (100 pg/ml) における MMP13 mRNA 相対発現量。C : IL-1 β 添加条件 (1000 pg/ml) における MMP13 mRNA 相対発現量。n = 6、*p < 0.05、**p < 0.01。(文献 4 を一部修正して引用)

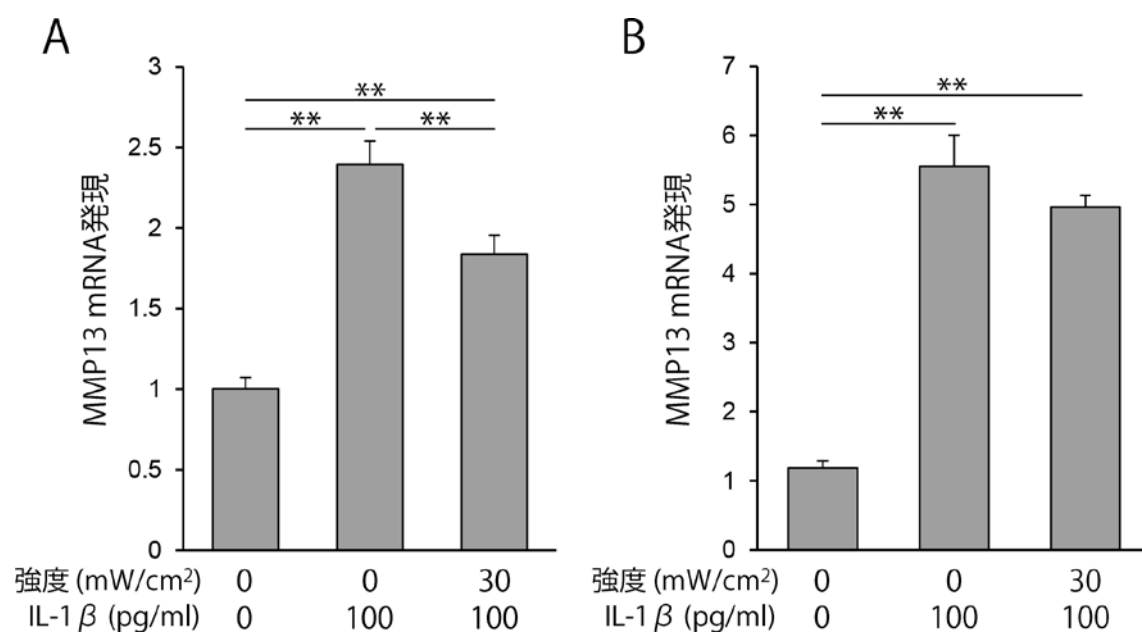
図 3 LIPUS 照射による培養液中の温度変化

A : 3.5 cm 径培養皿に対してカップリングゲルを介した LIPUS 照射による培養液中温度変化。B : 37°C 環流水中に培養皿を浸し、超音波吸収剤で被覆した条件における LIPUS 照射による培養液中温度変化。

図 4 Wakitani スコアによる関節軟骨修復評価

Ctrl : コントロール (擬似 LIPUS 照射) 群、LIPUS : 骨折治療で用いられている設定による LIPUS 照射群。n = 5、*p < 0.05。

図1



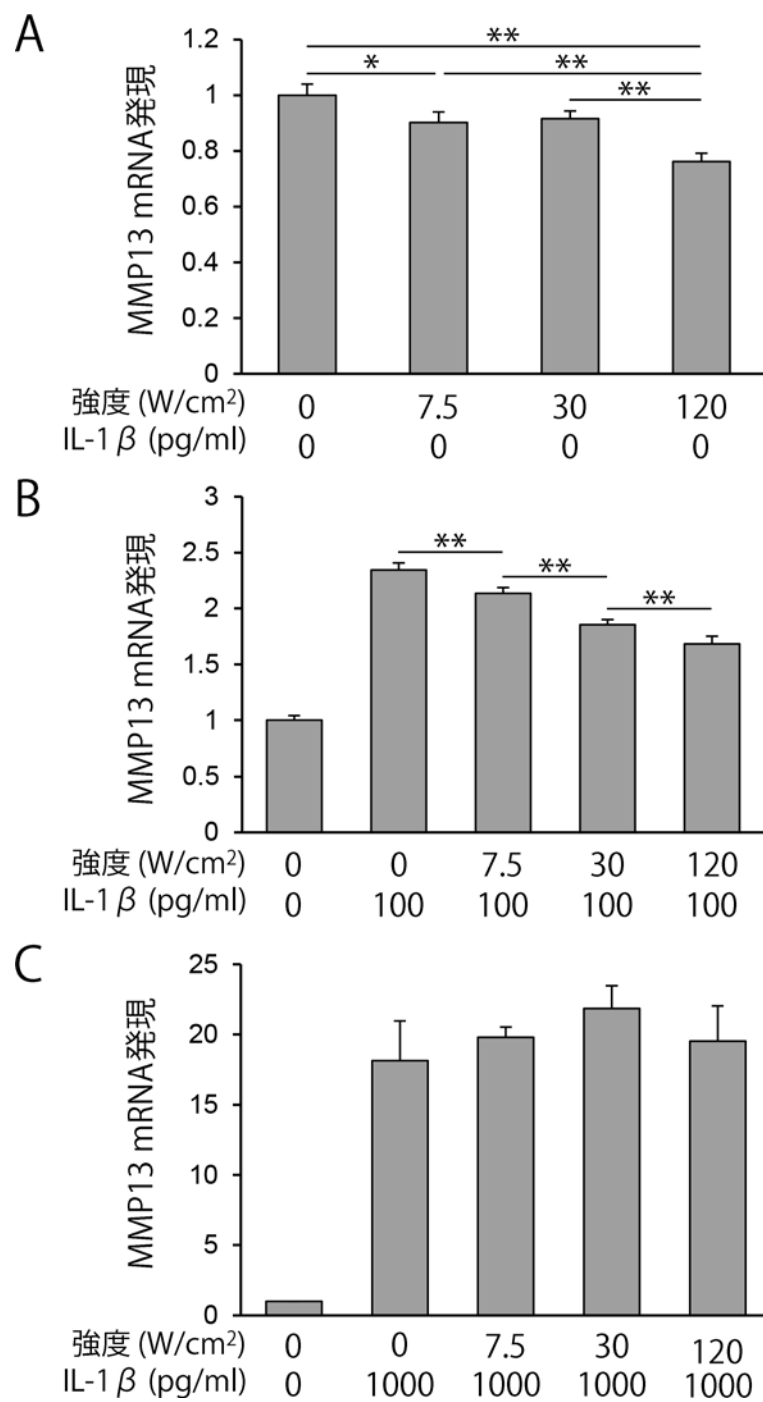


図3

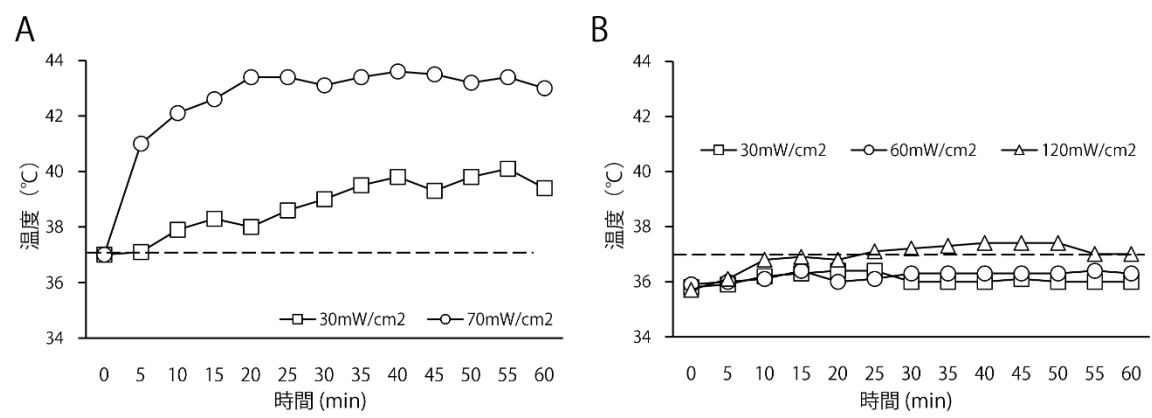


図4

