



Local Administration of Simvastatin Stimulates Healing of an Avascular Meniscus in a Rabbit Model of a Meniscal Defect

Zhang, Shurong

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6721号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006721>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Local Administration of Simvastatin Stimulates Healing of an Avascular Meniscus in a Rabbit Model of a Meniscal Defect

シンバスタチン局所投与は家兎半月板欠損モデルにおいて無血行野領域の半月治癒を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

整形外科学

指導教員：黒田 良祐教授

張樹蓉

背景

半月板損傷はスポーツ選手にしばしば起こる損傷である。半月板は辺縁から血行を供給されているが中央付近は血行が乏しい硝子軟骨様細胞から成り立つといった組織学的特徴がある。このため、無血行野の半月板は自己治癒能力が低く、半月板縫合術後には再断裂がしばしばみられることが以前より知られており、半月板の修復を促す治療の開発を要する。

HMG-CoA 還元酵素抑制剤の一つであるシンバスタチンは高脂血症治療薬として広く臨床で使用されている。近年、整形外科領域では、シンバスタチン投与による骨形成促進効果、骨折治癒促進効果、椎間板由来細胞の軟骨様形質の促進、変形性関節症進行抑制効果などさまざまな薬理効果が報告され、半月治療への応用が期待される。

シンバスタチンは臨床で用いられていることを踏まえると、シンバスタチンを治療に応用することにおいて利点があるが、一方で関節内への到達に関しては経口投与では大量投与を要し、それによる副作用が懸念される。シンバスタチン含有ハイドロゲルはシンバスタチンの局所徐放を可能とし、その有効性が報告されている。過去には、シンバスタチン含有ハイドロゲルによる骨折治癒促進や前十字靱帯再建モデルにおける骨髄結合の促進効果が報告されている。しかしながら半月治癒に関する効果は未だ調べられていない。

目的

本研究の目的はシンバスタチン局所投与による家兎半月板欠損モデルにおいて無血行野の半月治癒を促進効果を検討することである。

方法

シンバスタチン含有ハイドロゲルはポリ乳酸より加工したハイドロゲルとシンバスタチンを混合して過去に報告されている濃度に準じて 50 mg/mL になるように作成した。

日本白色家兎（体重 3.0-3.3 kg）を用いて半月板欠損モデルを作成（計 30 回）。バイオブリーパンチを用いて両膝の内側半月板前節部無血管領域に直径 1.5mm の円柱形半月欠損部を作成。片膝の半月板欠損部にシンバスタチン含有ハイドロゲルを投与、もう片膝にはシンバスタチンとシンバスタチン非含有のハイドロゲルのみを投与し、シンバスタチン投与群とコントロール群に分けて評価した。動物実験は神戸大学の動物実験委員会の承認の下に行った。

まず、術後 4、8、12 週で内側半月板を採取して組織学的に評価した。組織学的評価として、組織学的スコアリングにより欠損部新生組織を定量及び定性評価した。定量評価はサフラニン-0 染色にて、新生組織比率 [Occupation Ratio (OR)、新生組織面積/欠損部面積] と及びサフラニン-0 陽性染色された組織比率 [safranin 0 staining occupation ratio (SOR)、サフラニン-0 陽性組織面積/新生組織面積] を評価した。定性評価は、(1) 修復組織の欠損部周囲との結合、(2) 線維性軟骨の有無、(3) サフラニン-0 染色の染色性の 3 点を評価した。

さらに、免疫染色にて I 型コラーゲン (COL1)、II 型コラーゲン (COL2)、BMP-2、BMP-7 の発現を調べた。

また、術後 12 週の半月板新生組織を用い、福井大学工学部で作成した半球形のインデンターにて新生組織弾性率を計測し、力学的評価を行った。押し込みの条件

は予備実験で得た条件より、深さ 0.5-mm、0.1 mm/s、保持期間 30 秒、緩和期間 240 秒として行った。

さらに、家兎半月板を採取し、半割して inner 領域と outer 領域に分けた後に inner 領域のみより細胞を単離して培養。0.5μM シンバスタチン投与群後 4、8 時間後に細胞を回収し、RNA を採取して遺伝子変化を調べた。また、シンバスタチンの長期投与の影響をしらべるために、培養液中に 0.5μM シンバスタチンを含む群を含まない群に分けて培養し、7 日間後と 14 日間後に細胞を回収して評価を行った。長期間培養の実験系においては細胞の脱分化を防止のために、alginate beads を用いて三次元培養した。遺伝子変化に評価には real-time PCR にて *COL1A2*, と *COL2A1*, *BMP-2*, *BMP-7* の遺伝子発現の変化を評価した。

結果

組織学的定量的評価において、術後 4 週では、両群間に OR, SOR 共に有意差はみとなかったが、術後 8、12 週で、シンバスタチン投与群ではコントロール群と比して OR と SOR は有意に高値となり、シンバスタチン投与群で修復が促進される傾向をみとめた。組織学的定性的評価においても、同様に、術後 4 週では、両群間に有意差はみとなかったが、術後 8、12 週で、シンバスタチン投与群ではコントロール群と比して有意に高値となり、シンバスタチン投与群において、より、新生組織の増生とプロテオグリカンの増加が促進されることが示唆された。

免疫染色ではシンバスタチン投与群の新生組織と欠損組織周囲には *COL1*, *COL2*、*BMP-2*, *BMP-7* の強い発現をみとめた。

また、シンバスタチン投与群の半月板新生組織の弾性率は非投与群と比して有意に高値を示したが、正常半月と比しては有意に低値であった。

一方、半月由来細胞において、シンバスタチン投与により、4 時間、8 時間、7 日、14 日後において *BMP-2*, *BMP-7* の有意な発現増加をみとめた。また、7 日、14 日後で *COL1A1* と *COL2A1* の上昇をみとめた。

考察

シンバスタチンハイドロゲルを用いたシンバスタチンの局所投与により、家兎半月板欠損モデルにおいて半月板の修復が促進される傾向をみとめた。また、半月板由来細胞ではシンバスタチン単回刺激による *COL1A1* や *COL2A1* の上昇はみとめなかったが、長期間培養の実験系ではシンバスタチン投与により、*COL1A1* や *COL2A1* の上昇をみとめた。一方 *BMP-2*, *BMP-7* の発現の上昇を全てのタイミングポイントでみとめた。

近年、動物モデルにおいて *BMP-7* による半月修復促進効果が報告されており、また、軟骨細胞や椎間板細胞においては *BMP-2* を介した細胞外基質の合成促進効果や骨形成促進効果が報告されている。これらのこととふまると、シンバスタチン投与による *BMP* 産生の上昇を介したパラクライン効果が半月板治癒促進に寄与した可能性がメカニズムの一つとして考えられた。今後はより詳細な検討が必要である。

結語

家兎半月板欠損モデルにおいて、シンバスタチン局所投与により、半月板無血野の再生を促進する効果をみとめた。シンバスタチンによる *BMP-2*, *BMP-7* の発現増加が修復促進のメカニズムの一つとして示唆された。シンバスタチン局所投与が今後、臨床的に半月板損傷にたいする有用な治療方法になる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2623 号	氏名	張樹蓉
論文題目 Title of Dissertation	<p>Local Administration of Simvastatin Stimulates Healing of an Avascular Meniscus in a Rabbit Model of a Meniscal Defect</p> <p>シンバスタチン局所投与は家兔半月板欠損モデルにおいて無血行野領域の半月治癒を促進する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>眞英成</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>眞及謙昌</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>勝二郁夫</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

半月板の無血行野は自己治癒能力が低く、半月板縫合術後には再断裂がしばしばみられることが以前より知られている。このため、半月板の修復を促す治療の開発を要する。

HMG-CoA還元酵素抑制剤の一つであるシンバスタチンは高脂血症治療薬として広く臨床で使用されている一方、近年、様々な薬理効果が報告され、半月治療への応用が期待される。しかしながら半月治療に関する効果は未だ調べられていない。

本研究では家兔半月板欠損モデルにおいてシンバスタチン含有ハイドロゲルによる無血行野の半月治癒の促進効果を検討した。

対象と方法

シンバスタチン含有ハイドロゲルは過去に報告されている方法に準じて作成した。日本白色家兔を用いて半月板欠損モデルを作成。半月板欠損部にシンバスタチン含有ハイドロゲルもしくはシンバスタチン非含有のハイドロゲルのみを投与し、シンバスタチン投与群とコントロール群に分けて評価した。

術後4、8、12週で半月板を採取して組織学的に定性及び定量評価した。また、免疫染色にてI型コラーゲン(COL1)、II型コラーゲン(COL2)、BMP-2、BMP-7の発現を調べた。

さらに術後12週で欠損部の新生組織弾性率を計測し、力学的評価を行った。

一方、家兔半月板より細胞を単離し、シンバスタチン投与群後4時間、8時間後に遺伝子変化を調べた。また、培養液中にシンバスタチンを含む群を含まない群に分けて培養し、7日と14日後に評価を行った。

結果

組織学的定量および定性的評価において、術後8、12週で、シンバスタチン投与群ではコントロール群と比して有意に高値となり、シンバスタチン投与群で修復が促進される傾向をみとめた。免疫染色ではシンバスタチン投与群の新生組織と欠損組織周囲にはCOL1、COL2、BMP-2、BMP-7の強い発現をみとめた。

また、シンバスタチン投与群の半月板新生組織の弾性率は非投与群と比して有意に高値を示した。

一方、半月由来細胞において、シンバスタチン投与により、4時間、8時間、7日、14日後においてBMP-2、BMP-7の有意な発現増加をみとめた。また、7日、14日後でCOL1A1とCOL2A1の上昇をみとめた。

考察及び結論

シンバスタチンハイドロゲルを用いたシンバスタチンの局所投与により、家兎半月板欠損モデルにおいて半月板の修復が促進される傾向をみとめた。また、半月板由来細胞においてシンバスタチン刺激により BMP-2, BMP-7 の発現の上昇をみとめた。近年、他の動物モデルにおいて BMP-7 による半月修復促進効果が報告されており、また、軟骨細胞や椎間板細胞においては BMP-2 を介した細胞外基質の合成促進効果が報告されている。これらのことより、シンバスタチン投与による BMP 産生の上昇を介したパラクライン効果が半月板治癒促進に寄与した可能性がメカニズムの一つとして示唆された。

本研究は臨床で高脂血症治療薬として使用されているシンバスタチンを含有する、シンバスタチン含有ハイドロゲルによる、半月板治癒促進効果を調べ、その有用性を家兎半月板欠損モデルにおいて証明した。また、その治癒促進効果のメカニズムとして BMP の経路を介した生物学的效果を明らかにした。本研究は新たな治療方法の可能性について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。