

損傷靭帯に対するエラスチンの効果

The Effect of Elastin for Injured Ligament

○ 晝河政希 (三重大) 片山真悟 (三重大) 佐藤辰哉 (三重大) 三浦良浩 (三重大)
 海野宏至 (三重大) 鈴木慶亮 (三重大) 白土絵里 (林兼産業) 長谷川正裕 (三重大)
 宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大)

Masaki HIRUKAWA, Mie University, Shingo KATAYAMA, Mie University, Tatsuya SATO, Mie University,
 Yoshihiro MIURA, Mie University, Hiroshi UNNO, Mie University, Yoshiaki SUZUKI, Mie University,
 Eri SHIRATSUCHI, Hayashikane Sangyo Co.,Ltd., Masahiro HASEGAWA, Mie University,
 Keiichi MIYAMOTO, Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie University

Abstract: When ligament was injured, reconstructive surgery is carried out. The method is transplant of the artificial ligament or autotransplantation of the tendon. However, these method have problems of strength or the biocompatibility after the surgery. We focused on the elastin which is a major component of the elastic fiber and ligament. In this study, we prepared the rabbit model that the knee ligament ruptured and investigated the influence on healing reaction by the elastin. As a result, it showed that the gene and protein expression of collagen and elastin is increased by the elastin. In addition, coefficients of elasticity increased in comparison with control. These data suggested that elastin was effective for the healing of injured ligament.

Key Words: Elastin, Collagen, Ligament, Real-time PCR

1. 緒言

近年、スポーツ等の運動時に起こる無理な動きや加齢、肥満が原因となって靭帯に負荷がかかり、靭帯損傷が起こるケースが多くなっている。また、前十字靭帯 (ACL) などの関節内靭帯は血管が乏しいという環境下に存在しているため、周囲からの修復が望めず、損傷した状態で長期間放置すると退縮するという報告もある⁽¹⁾。我々はこれまでの研究結果より、靭帯基質であるエラスチンを *in vivo* で培養靭帯細胞へ添加することで、コラーゲン I 型や III 型、エラスチンなどの基質や、靭帯マーカーであるテノモジュリンの産生が促進されることを明らかにしてきた。さらに、エラスチンペプチドを添加した際には靭帯細胞の骨芽化を抑制し、アイソタイプ型エラスチンを添加した際には骨分化が促進することもわかった⁽²⁾。そこで本研究では、靭帯損傷の動物モデルを作製し、*in vivo* におけるエラスチンの効果を検証した。

2. 方法

2-1 靭帯損傷動物モデルの作製

ジャパニーズホワイトラビット (12w、メス) の内側側副靭帯 (MCL) を鈍的損傷させ、経口投与または 1 週間ごとに注射による局所投与を行い、術後 6 週間、12 週間で靭帯サンプルを採取した。経口投与ではコントロール (通常餌) 群とエラスチン群、局所投与ではコントロール (生理食塩水) 群、エラスチンペプチド群、アイソタイプ型エラスチン群を作製した。また、正常 (非手術: non-operation) 群も作製した。(各群 5 羽以上)

2-2 Real-time PCR

採取した靭帯サンプルを患部、端部に切り分け、mRNA 発現解析を行った。結果は正常群の値を 1 とした相対発現量として算出した。

2-3 組織染色

採取した靭帯サンプルを患部、端部に切り分け、凍結切片を作製し、HE 染色、EVG 染色、免疫蛍光染色によって

評価した。

2-4 力学試験

靭帯サンプルを大腿骨、脛骨とともに採取し、MCL 以外の組織を取り除き、靭帯部分の厚さ、自然長、幅、骨接合部面積、全長を測定した。また、関節を応力歪測定装置に固定し、弾性率測定および破断強度測定を行った。

3. 結果

3-1 Real-time PCR

局所投与において組織患部では、エラスチン投与によりコラーゲン I 型は 2 倍程度の発現を示し、特にアイソタイプ型エラスチン投与群ではコントロール群に比較し、有意に発現が増加した。(Fig.1, $p < 0.05$)

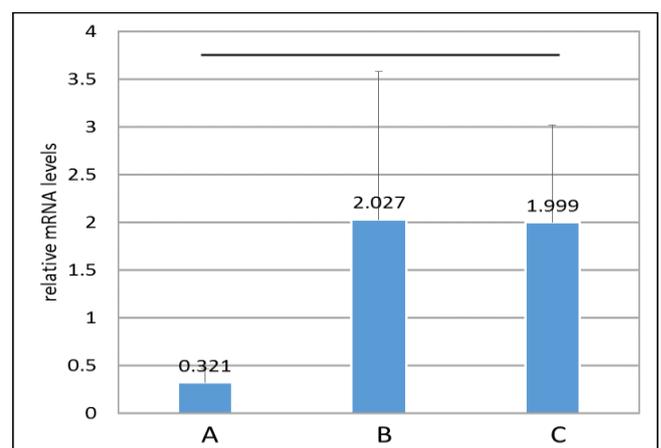


Fig.1 Collagen type I expression (6week, ruptured region)

A) Control, B) Elastin peptide, C) Isotype Elastin

また、エラスチンの発現もエラスチンの投与により発現が増加しており、アイソタイプ型エラスチン投与群ではコ

コントロール群と比較して有意な差が見られた。(Fig.2, $p<0.05$)

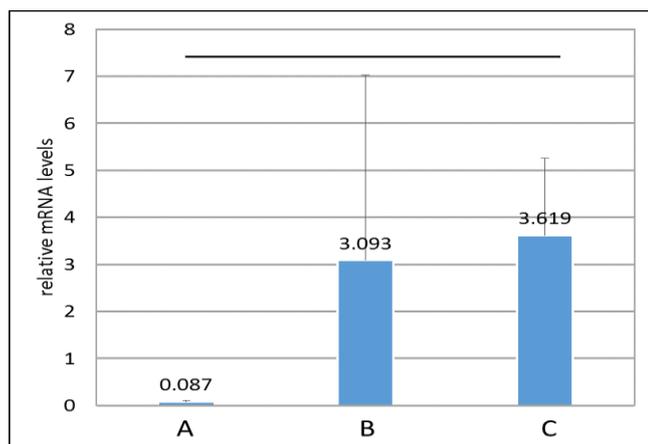


Fig.2 Elastin expression (6week, ruptured region)
A) Control, B) Elastin peptide, C) Isotype Elastin

3-2 組織染色

免疫蛍光染色の結果、エラスチンの投与によりコラーゲン I 型の発現増加が示された。(Fig.3, scale bar: 250um) 画像の輝度解析より、コントロール群と比較してエラスチンペプチド群では 3.9 倍、アイソタイプ型エラスチン群では 3.6 倍を示した。

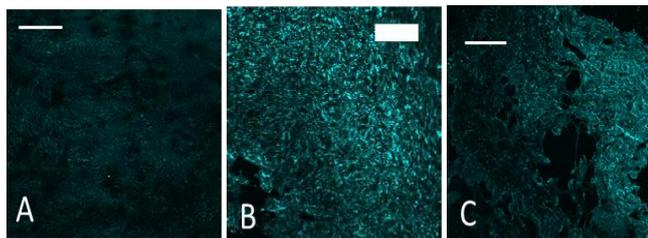


Fig.3 Collagen type 1 expression (6week, ruptured region)
A) Control, B) Elastin peptide, C) Isotype Elastin

また、エラスチンの投与によりエラスチンの発現量も増加していることが示された。(Fig.4, scale bar: 250um) 画像の輝度解析より、コントロール群と比較してエラスチンペプチド群では 1.3 倍、アイソタイプ型エラスチン群では 4.6 倍を示した。

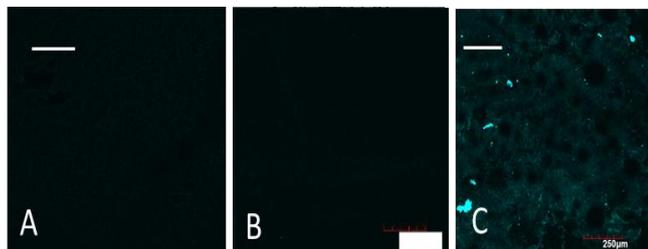


Fig.4 Elastin expression (6week, ruptured region)
A) Control, B) Elastin peptide, C) Isotype Elastin

3-3 力学試験

MCL の弾性率を測定した結果、エラスチン投与により、正常群ほど高い値ではないが、コントロール群と比較してエラスチンペプチド群では 1.8 倍、アイソタイプ型エラス

チン群では 2 倍を示し、有意に上昇していることが確認できた。(Fig.5, $p<0.01$)

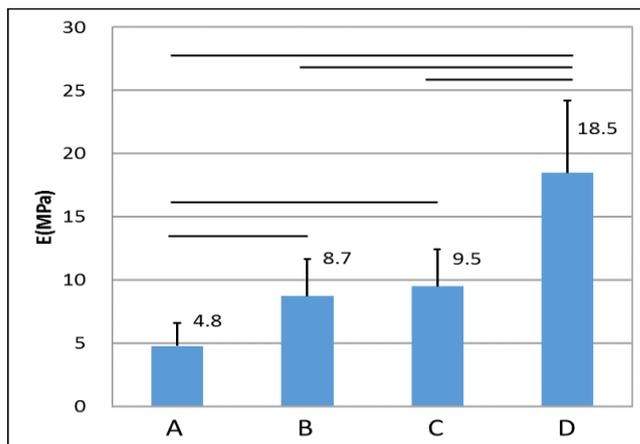


Fig.5 Elastic modulus (6week)
A) Control, B) Elastin peptide, C) Isotype Elastin,
D) non-operation

4. 考察

4-1 エラスチン投与による mRNA・タンパク発現への影響

まず、mRNA 発現解析によって得られた結果より、エラスチンペプチド、アイソタイプ型エラスチンの局所投与により靭帯基質であるコラーゲン I 型とエラスチンの遺伝子発現が上昇することが示され、さらにアイソタイプ型エラスチンの投与では有意な差が得られた。このことより、投与されたエラスチンが靭帯細胞に認識され、基質産生が促されたことが示唆された。染色結果からも、エラスチン投与によりタンパク量が増加したと考えられるため、これらの発現は一致していると思われる。

4-2 エラスチン投与による弾性率への影響

エラスチンペプチド、アイソタイプ型エラスチンをそれぞれ局所投与することによって、コントロールと比較し有意に弾性率が上昇した。このことより、エラスチンは損傷靭帯の治癒反応を助け、組織修復を促すことが示された。しかし、正常群ほどの弾性率を示していないため、6 週間ではまだ治癒過程の途上であることが考えられる。

5. 結論

本研究によって、エラスチンの *in vivo* での靭帯に対する効果が確認出来た。また、エラスチンの投与は損傷靭帯に対し、治癒反応を促進するように働くため、治療法として有効であると考えられる。

6. 参考文献

- (1) Erik Attia, et al, Patterns of gene expression in a rabbit partial anterior cruciate ligament transection model: The potential role of mechanical forces. *Am J Sports Med.* 2010;38:348.
- (2) 水谷直紀, 細胞外基質と動的培養による人工靭帯再生技術の開発. 平成 21 年度 三重大学大学院工学研究科修士論文, 2010