

論文内容要旨

Skeletal muscle injury treatment using the Silk Elastin® injection in a rat model

(ラット骨格筋損傷モデルを用いた、シルクエラスチンゲル注射による骨格筋治療効果の検討)

Regenerative Therapy,26:180-187,2024.

主指導教員：安達 伸生 教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：砂川 融 教授

(医系科学研究科 上肢機能解析制御科学)

副指導教員：味八木 茂 講師

(広島大学病院 未来医療センター)

仲田 恭平

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

目的：

筋損傷はスポーツ損傷で頻度が高い損傷の一つである。治療方法として、臨床的には保存的加療（RICE 療法）が広く行われているが、治療に長い時間を要することや損傷部の癒痕組織形成による筋出力低下および筋損傷再発リスクなどが問題となっている。急性期の治療法として、血腫吸引やステロイド注射、PRP 注射、ESWT 療法など様々な方法で筋修復を促進する治療が報告されているが、これらの効果については一定の見解は得られていない。

本研究において筋修復促進に用いたシルクエラスチンはシルクフィブロインとエラスチン構造からなる人工タンパク質で、ゲルやシート、スポンジなど様々な材形への加工が可能なマテリアルである。また、シルクエラスチンは生体親和性が高いことでも知られており、すでに創傷治療被覆材としての効果も報告されている。

今回はシルクエラスチンゲルを筋損傷超早期に患部に注射することで、癒痕形成を抑制して骨格筋修復促進効果が得られるとの仮説のもとに、その治療効果を明らかにすることを目的とした。

方法：

In vitro では 12 週齢 SD ラットの前脛骨筋組織から抽出した線維芽細胞の平面培養に対して、異なった濃度のシルクエラスチン溶液を添加して遊走能の差を評価した。培養した線維芽細胞のプレート底部に無細胞領域を作成し、長方形の関心領域（ROI）を設定した。24 時間後と 48 時間後に ROI の中に遊走してきた線維芽細胞の面積をイメージソフト（image J）で計測した。

In vivo では 12 週齢 SD ラットの前脛骨筋にメスを用いて深さ 5 mm、幅 4 mm、長さ 6 mm の筋損傷を作製し、50 μ l の PBS、12.5%シルクエラスチンゲル、3%アテロコラーゲンゲルをそれぞれ投与した 3 群を作製した。

投与後 1 週と 4 週で組織評価を行った。筋線維短軸像を Hematoxylin-eosin 染色し、再生筋数と再生筋径を評価した。短軸像では創底部から創縁部にかけて 5 か所をランダムに選択してその平均値を算出した。筋線維長軸像では Masson Trichrome 染色を行い、筋組織に対する癒痕組織の面積比を評価した。

また、1 週モデルで癒痕組織を採取して Real time PCR を施行した。癒痕組織形成マーカーである TGF β 1 と筋再生マーカーである PAX7、MyoD の発現量を評価した。

生理学的評価として 4 週モデルで総腓骨神経刺激による再生筋の強縮力（Tetanus）と単収縮力（Twitch）を評価した。SD ラットを仰臥位で下肢を足台に固定し、総腓骨筋の持続刺激による強縮力と頻回刺激による単収縮力を計測して健側との比率を算出した。

結果：

In vitro ではシルクエラスチン無添加の状態では ROI 内へ遊走した細胞の面積に対して、シルクエラスチンを 10⁴ μ g/ml で添加した培地で有意に遊走細胞の面積が低下した。

In vivo では1週の短軸像による再生筋径と数は3群間で有意な差は認めなかった。長軸像における癒痕組織面積比評価ではアテロコラーゲン群のみ有意に癒痕組織面積比が大きい結果であった。Real time PCRによる評価ではTGF β 1の発現量がアテロコラーゲン群とシルクエラスチン群で有意に低下している結果であった。

4週の短軸像評価では再生筋の径、数ともにシルクエラスチン群が他2群に対して有意に多く、癒痕形成面積比についても同様にシルクエラスチン群が最も癒痕面積比が小さい結果であった。筋収縮力においてもシルクエラスチン群は強縮力、短収縮力比とも他2群と比較して有意な改善を認めた。

考察：

癒痕組織形成は、筋修復力を上回る大きな損傷が起きた際に生じる過剰な炎症反応や細胞遊走が原因であるとされる。その中でも癒痕組織形成に大きな役割を果たす線維芽細胞の過剰な集積は癒痕化の原因となると考えられる。過去にも線維芽細胞の遊走や接着を阻害することで癒痕形成抑制を行い、良好な組織修復を得た報告が散見されている。今回、筋損傷モデルに対するシルクエラスチンゲルの投与は4週モデルでの癒痕組織形成を抑制して、良好な組織修復を誘導した。その機序として筋欠損部へのシルクエラスチンゲルの投与が、過剰な線維芽細胞の遊走を抑制し、癒痕形成を抑制した可能性が考えられる。また筋欠損部への血腫形成を抑制することで血種内に多量に含まれる血小板などから放出されるTGF β 1を減少させたことで、線維芽細胞の過剰な働きを抑制した可能性が考えられた。

結語：

筋欠損部におけるシルクエラスチンゲル投与は、血腫形成や線維芽細胞の過剰な遊走を抑制することで良好な組織修復を促進すると考えられる。