学 位 論 文 内 容 の 要 約

愛知学院大学

甲　　第　669　号	論文提出者　　山口　大輔

論　文　題　目

骨形成条件下の培養骨髄細胞に低出力超音波パルスを照射したときの遺伝子応答

図、表、写真を使用した学術論文の投稿を予定しており、不利益が生じるため全文の公表を不可とし、「内容を要約したもの」を公表する。

Ⅰ．緒言

低出力超音波パルス（low-Intensity Pulsed Ultrasound：以下LIPUSと略す）は骨組織の治癒を促進させることを目的として整形外科領域で多く使用されている。LIPUSによる骨折の治癒促進の作用はDuarteにより初めて報告された。そしてHeckmanら、Kristiansenら、Mayrらは新鮮骨折症例に対して無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験を行った。そして、これらの結果のメタアナリシスから､LIPUSの照射により骨折の治癒が促進できると結論されている。

一方、歯科領域においても骨の治癒に関係する報告を認める。例えば、口腔インプラントがオッセオインテグレーションを獲得するまでの治癒期間は、下顎では３ヵ月、上顎では６ヵ月が必要となりインプラント治療に要する治療期間を長くしている。 そこで、治癒期間を短縮するためにインプラント体の表面改質、あるいは即時荷重法や早期荷重法などの術式の改変が試みられてきた。さらに近年､LIPUSのインプラント治療への応用が注目され、埋入後のインプラント周囲の骨治癒が促進できる可能性が指摘されている。例えば、Tanzerらは犬の頸骨に埋入した多孔性チタンインプラントにLIPUS照射すると､多孔中への骨の増生が促進することを報告した。また藤井らは、犬の顎骨に埋入したチタンインプラント周囲にLIPUSを照

射すると骨形成が促進されることを報告している。さらに李は、Rat の大腿骨にインプラントを埋入し、LIPUS の照射がインプラント埋入後の骨治癒の初期において骨-チタン結合を促進することを報告している。

LIPUS を用いた *in vitro* の研究では、Kokubu らが LIPUS が培養骨芽細胞へ与える効果を初めて検討し、骨芽細胞の COX-2 産生を介してプロスタグランジン E_2 を誘導することを報告した。その後 Sena らは、Rat 骨髄由来細胞に LIPUS を照射すると c-jun、c-myc、COX-2 の m-RNA が発現上昇することを報告し、城所らは Rat から採取した骨髄組織から骨芽細胞様細胞を分化させる際に LIPUS を照射すると骨芽細胞様細胞の分化や石灰化が促進されることを報告した。このように、LIPUS が骨の治癒を促進する生物学的な機序を明らかにした報告は多数あるが、遺伝子発現を網羅的に示した報告は少なく、詳細は明らかとは言えない。そこで本研究は、骨形成条件下の培養骨髄細胞に LIPUS を照射したときの遺伝子発現について cDNA マイクロアレイ法による網羅的解析を行い、 LIPUS が骨芽細胞様細胞の表現型に及ぼす機序について探索することを目的として実験を行った。

Ⅱ．材料および方法

８週齢・雄・SD ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞を、15％ FBS、10^{-8} M デキサメタゾン、50 mg/ml L-アスコルビン酸、10 mM β-グリセロリン酸塩をα-MEM に添加した培養液に懸濁し、培養皿に播種した。培養３日目から、周波数 3.0 MHz、パルス幅２msec、パルス周期 10 msec、出力 40 mW/cm^2

のLIPUS を1日あたり15分間、7日間照射した。LIPUSを照射した群をLIPUS照射群とし、LIPUS を照射しない群をコントロール群とした。培養４、７、10 日目に細胞増殖試験と Sirius Red 染色を行った。また培養 10、14、21 日目に Alizarin Red S 染色を行った。さらに、培養 10 目の培養細胞を回収し、Total RNA を抽出した。100 ng の Total RNA から cRNA を精製し、マイクロアレイスライドにハイブリダイゼーションさせた。洗浄後に、マイクロアレイスポットを読み取り、イメージ解析ソフトでシグナル値を検出し、マイクロアレイ解析ソフトを用いて網羅的に解析を行った。LIPUS 照射群とコントロール群のシグナル強度について、t 検定により有意差($p<0.05$)があり、かつシグナル強度比が 2.0 倍以上の遺伝子を抽出した。その後、抽出した遺伝子のうち LIPUS 処理群で発現が上昇した遺伝子について Gene Ontology (GO) 解析を行った。得られた Entity List に対し、各遺伝子のアノテーションから Natural Language Processing (NLP) により検索した相互作用情報を利用し、ネットワーク構築を行った。特徴的な GO term として抽出された遺伝子について Real-time PCR 法により遺伝子発現量を確認した。

Ⅲ．結果および考察

１．細胞増殖能について

LIPUS照射群ではコントロール群と比較して培養７日目において細胞数の減少が確認された。これは骨芽細胞様細胞の分化が進み、細胞増殖が停止したためであると考える。

２．コラーゲン生成量について

コラーゲン生成量は培養 10 日目において Control 群よりも LIPUS 照射群において有意に多く認められた。定量に用いた Sirius Red は collagen typeⅠと collagen typeⅢを敏感に検出する。骨芽細胞前駆細胞では collagen typeⅢが検出され、骨基質の約 90％は collagen typeⅠである。したがって LIPUS の照射により骨芽細胞様細胞の分化が促進したことを裏づける結果であるといえる。

３．石灰化の評価について

Alizarin Red S染色においては培養10、14、21日目においてLIPUS照射群はControl群よりも有意に染色面積が広くなった。LIPUSを照射すると、石灰化結節の形成が増加するということが確認された。

４．遺伝子発現の網羅的解析について

１）骨芽細胞の分化マーカーの発現

培養10日目のLIPUS照射群でOsteocalcinとOsteopontinの遺伝子発現の上昇が認められた。Osteocalcinは非コラーゲン性タンパク質の10～20％を占めており成熟骨芽細胞で産生され、骨組織の中で細胞外基質に沈着するため骨芽細胞の分化マーカーとして用いられている。また、Osteopontin

は骨芽細胞や破骨細胞の骨表面へ接着することが報告されている。したがって、LIPUS照射により、骨芽細胞様細胞の分化が促進されたことを遺伝子レベルで確認できたといえる。

２）骨細胞マーカーの発現

骨細胞に特異的に発現する遺伝子としてdentin matrix acidic phosphoprotein 1 (Dmp1), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), SOST, fibroblastic growth factor 23 (FGF23), phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX)が知られている。このうち本研究ではDmp1, MEPE, PHEX の発現がLIPUS照射により上昇した。Dmp1 は骨芽細胞には発現せず、骨細胞で産生される非コラーゲン性骨基質タンパク質である。生体内では負に荷電し、Ca^{2+}結合能を介して骨の石灰化に関与する。MEPE はDmp1同様非コラーゲン性骨基質タンパク質であり、カテプシンBによって分解され acidic, serine and aspartic acid-rich motif (ASARM) と呼ばれるペプチドを分泌する。ASARMは、その後リン酸化され、石灰化を抑制する。PHEXは基質蛋白質が同定されていないが、近年、FGF23の発現抑制因子であることが証明された。また、MEPEはPHEXと結合し、カテプシンBによる分解を抑制する役割も報告されている。したがって、LIPUSの照射により骨芽細胞様細胞が骨細胞へと分化が進みつつある時期を捉えたと解釈できる。

３）コラーゲン関連遺伝子の発現

細胞外基質成分であるコラーゲンの架橋形成が、コラーゲンの生成量やその後の石灰化過程に関与していることが報告され、架橋の生物学的な重要性が認識されている。遺伝子レベルにおいてはlysyl oxidase（Lox），collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1), collagen type XI, alpha 2 (Col11a2)の発現上昇が認められた。このうちLoxは、コラーゲンの架橋形成において重要な酵素である。Cthrc1は骨芽細胞を介した骨形成に促進的に制御する。さらに、Col11a2は骨端軟骨の成長に関係すると報告されている。以上の結果からLIPUS照射により生成量が増加されたコラーゲンは、生理的架橋の形成が促進している可能性が示唆される。

４）細胞接着に関する遺伝子の発現

細胞接着に関する遺伝子として thrombospondin 1（Thbs1），cell adhesion molecule 1 (Cadm1)の発現上昇が認められた。Thbs1 は細胞外基質タンパク質であり細胞の接着因子として機能し、インテグリンなどの細胞膜受容体と結合している。また、Cadm1 は間葉系幹細胞による骨形成量と強い正の相関を示したことが報告されている。これらの遺伝子の発現が上昇したことは、LIPUS の刺激が細胞接着を促す働きがある可能性を示す。

５）その他の細胞外基質に関する遺伝子の発現

carboxypeptidase Z（CPZ）は培養細胞とヒトの組織において酵素活性化している細胞外基質に存在しているが成長板軟骨細胞においてwntシグナル伝達経路に結合し、さらにその経路を活性化しているという報告があ

る。またleucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (LGR4) はWnt/β-カテニンおよびWnt/PCP経路を介してR-spondinシグナルを伝達しているといわれている。このことからLIPUSの刺激がCPZ, LGR4を介してWntシグナル伝達経路が活性化されている可能性が考えられる。一方Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の阻害分子であるdickkopf homolog 1 (Dkk1)の発現も上昇している。またtissue inhibitor of metalloproteinase (Timp1)の発現上昇が認められた。Timp1は細胞外基質の分解に関与するmatrix metalloproteinase (MMP)の内因性インヒビターであり、細胞外基質成分の分解を効果的にコントロールされることがよく知られている。

６）神経伝達物質に関する遺伝子の発現

神経伝達物質として知られているgalanin prepropeptide (Gal)の発現上昇が認められた。Gal は摂食調整や視床下部において成長ホルモンの分泌制御機能が明らかになっている。また、骨折後の骨芽細胞様細胞においてGalの発現を測定したところ、発現量が多くなることや、GalがTNFαやIL-1βの産生を抑制し、その結果骨形成を促進させるという報告がある。本実験でLIPUS照射によりGalの発現が増加し炎症性サイトカイン産生が抑制されることで骨芽細胞の分化が促進している可能性が示唆される。

Ⅳ. 結論

（内容の要約）

No. 8

愛知学院大学

骨形成条件下の培養骨髄細胞にLIPUSを照射した群としない群の遺伝子発現について網羅的解析を行った結果、以下の結論を得た。すなわち、LIPUSの照射により、

1. 石灰化の足場となる細胞外基質に関連する遺伝子の発現が上昇した。
2. 骨芽細胞の分化マーカーと骨基質特異的マーカーの発現が上昇していることが確認され、骨芽細胞から骨細胞へ分化が促進することが示唆された。