

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11922

研究課題名(和文) GFPラットとの血管吻合ラット抜歯窩骨欠損修復部位の超音波刺激による骨髄細胞動員

研究課題名(英文) Accelerated recruitment of bone marrow cells to the repair site in the parabiosed rat by LIPUS

研究代表者

竹内 良平 (Takeuchi, Ryohei)

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：30236442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨の再生に不可欠な細胞供給を促進するため、損傷部位に低出力超音波パルス照射を行うことにより遠隔の骨髄からも細胞を損傷部にリクルートするメカニズムを研究した。ヘテロGFPラットと同腹仔の野生型ラットを結合した末梢循環共有モデル(parabiosis rat)を作製し、両側にβ-TCPディスクを埋植、野生型ラットのディスクに超音波を照射した。その結果非照射側のβ-TCPディスクにもコントロール群より多いGFP陽性細胞と血管の浸潤がみられ、炎症性のM1マクロファージから、抗炎症性・免疫抑制性のM2マクロファージへの移行が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低出力超音波の照射は骨折治癒期間を約40%短縮することが知られ、国内でも標準治療として用いられている。我々は、これまでに、治癒の促進が局所の細胞の活性化、サイトカイン産生ばかりでなく骨髄細胞の循環を通じて全身性にも誘導されることを示した。これは、炎症の制御が健康寿命に大きな役割を持つことが判明した現在広範な応用価値を示唆するもので、詳細なメカニズムの理解は、薬に頼らない医療の突破口としての可能性を約束する。

研究成果の概要(英文)：It is essential to have enough cells for bone regeneration. We have reported LIPUS exposure of fractured femur and tooth extraction socket recruit cells for regeneration through peripheral blood vessels from the remote sites to the wound in mice and rats, respectively (Kumagai, Takeuchi et al., 2011 and Hidaka et al., 2015). In this study, we confirmed LIPUS exerted its anabolic action not only locally but also systemically on the implanted beta-TCP discs in the back of rats, which were not directly treated with LIPUS and elucidated the molecular mechanisms. Message expression and (immuno-)histochemical localization of proteins and cells using antibodies against M1 and M2 macrophage, and cytokines showed the involved entities. In the discs of LIPUS-untreated parabiosed rat, we observed invaded cells including M2 macrophages and blood vessels present in numbers between those of the LIPUS-exposed and the control rats. We were able to present the systemic effect of LIPUS.

研究分野：整形外科

キーワード：骨折治癒 低出力超音波 力学刺激 全身性効果 液性因子

1. 研究開始当初の背景

骨欠損における骨再生には細胞供給が不可欠である。我々は、大腿骨骨折部に LIPUS 照射を行い、遠隔の細胞が損傷部にリクルートされて骨再生に加わることを、GFP マウスと野生型マウスを結合した末梢循環共有モデルで報告した (熊谷・竹内ら 2011)。一方ラット抜歯窩モデルでは、抜歯窩歯槽骨に LIPUS 照射を行うと、遠隔の下肢の骨髄細胞が大きく変化しており、骨再生に必須のサイトカインや生理活性物質等の液性因子が産生された結果全身の骨髄細胞に働く可能性を報告した (日高ら 2015)。LIPUS による局所の力学的刺激の伝達は、炎症が起きた組織部位局所の細胞応答に留まらず、全身性に骨再生促進作用を示すと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 主にビスフォスフォネート製剤を投与された患者で抜歯後に発症して細菌感染を伴って難治性の高い骨吸収抑制薬関連顎骨壊死のモデルラットを作製し、抜歯後の LIPUS 照射が全身性に及ぼすと予想される発症予防効果の細胞生物学的詳細を明らかにすること、

(2) GFP ラットと野生型ラットを並体結合して末梢循環を共有させたモデルラットを作製し、顎骨壊死の場合とは異なり患部の細胞が骨髄には直接のアクセスを持たないよう、両側のラットの背部皮下に β -TCP ディスクを埋植した。その後実験群の野生型ラットのディスクには LIPUS 照射を行い、対側である GFP ラットから照射側 (野生型) ラットの β -TCP ディスクへ誘導される細胞およびもたらされる全身性の効果を検証すること、を目的とした。

3. 研究の方法

課題 (1) 業績 Hidaka et al., 2019 を参照

課題 (2) ヘテロ GFP ラットと同腹仔の野生型ラットを体重の近い同腹仔同士のペアに分け、Kumagai, Takeuchi らの方法に従って、2 匹を外科的に並体結合する末梢循環共有モデルを作製した。先行する実験では、SD ラット (野生型) の同腹仔を用いて同様のモデルを作成した (方法 1)。1 週間後に対照群を含む全ラットの背部皮下に、夫々 3 個ずつの β -TCP 多孔体ディスク型人工骨 (パイロット社製 13mm ϕ \cdot 1mm 厚) を移植し、当日から 2 週間、LIPUS 照射実験群の左側野生型ラットの頭部寄りのディスク 2 個に、業績 Hidaka et al., 2019 に記されたとおりの条件で週 5 日 20 分間の LIPUS 照射を行った。並体結合 1 週間後には、片側末梢血管に注入した蛍光タンパク質が、30 分以内に約 30% の濃度で対側にも見いだされ、十分な共有の成立していることが示された。なお並体結合させた 2 匹の動物では、結合部分の皮下組織や筋肉、炎症部位に微小血管が形成され、血液の循環が共有されることが知られている。げっ歯類が最適ではあるが、parabiosis intoxication と呼ばれる突然死 (蒼白化、貧血、脱水等を伴う) が、結合後 1-2 週間で 20% ほどの片側に起きることが報告されている。歴史的には以下のように発展してきた：

1863 Bert: 外科的処置として実験動物に導入された

1908 Sauerbruch & Heyde: “parabiosis “ と命名された

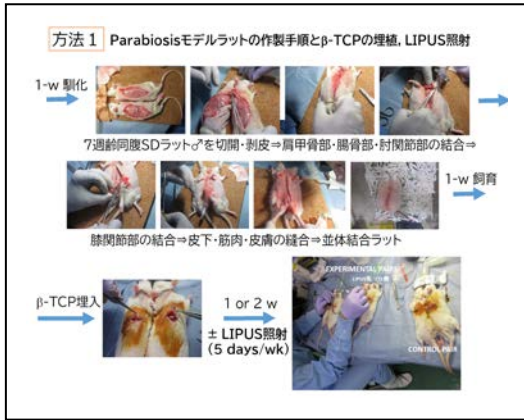
1909 Rous: 発癌抵抗性は共有されないと報告された

1969 Knudsen: 高血圧誘発が共有されると報告された

1969 Coleman: レプチン (後年の命名) が正常と db マウス間で伝達された

2013 Loffredo: 加齢マウスの心肥大が若齢マウスの GDF11 で正常化された

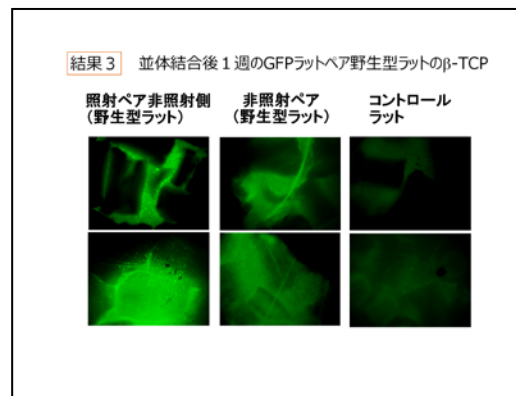
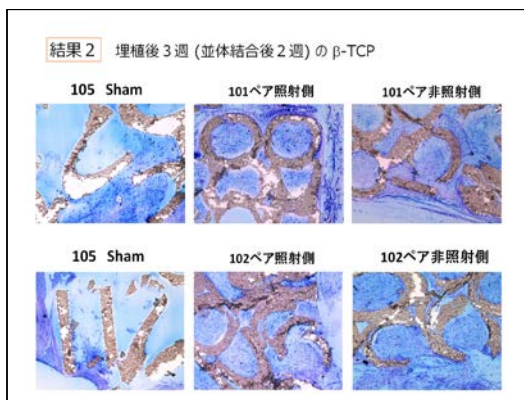
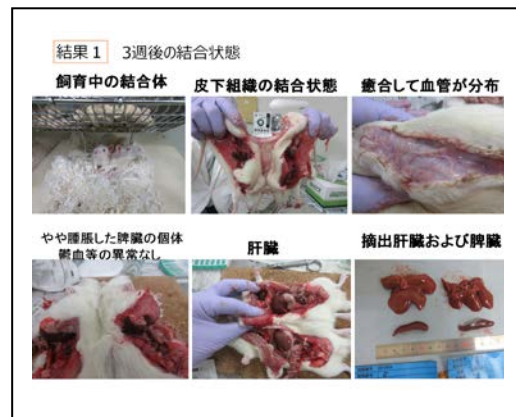
GFP ラットから対側 (野生型) ラットの β -TCP ディスクへ誘導された細胞については、キーエンス社オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X にて観察、記録した。もたらされる全身性の効果判定は、Hidaka et al., 2019 に記された通りに行った。



4. 研究成果

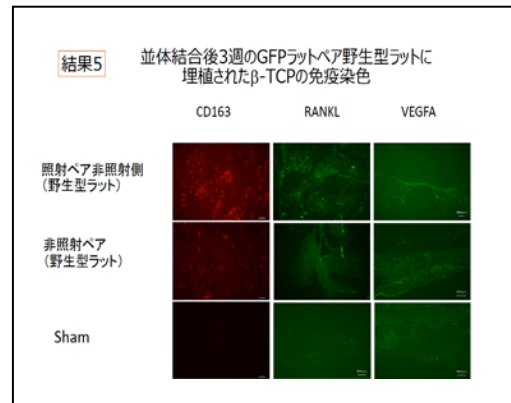
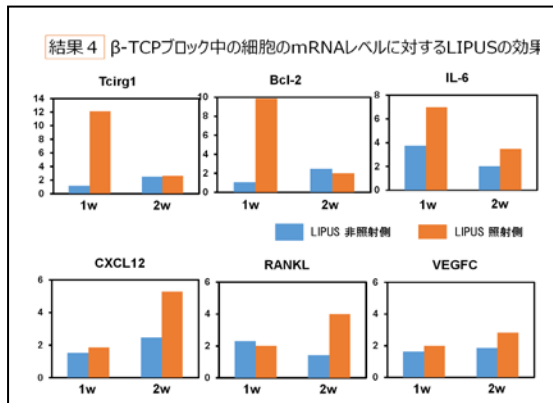
本研究では、骨の再生に不可欠な細胞供給を促進するため、損傷部位にLIPUS（低出力超音波パルス）照射を行うことにより遠隔の骨髄から細胞を損傷部にリクルートするメカニズムを研究した。課題（1）の成果については業績Hidaka et al., 2019を参照のこと。課題（2）では、並体結合したラットの背部皮下に β -TCP多孔体ディスク型人工骨を埋植し、片側野生型ラットのディスクにLIPUS照射を行った結果、先行して作製した同腹仔SDラット同士の結合体で肝脾腫を認める個体が出たものの、作製した末梢循環共有モデル系は解析可能と判断された。

一方GFPラットと同腹仔の野生型ラットとの結合では途中死亡が多く（25%），parabiosis intoxicationを起し易い要素が想定された。生存個体について、3週後の結合状態を結果1に示す。照射ペアの非照射側の β -TCPディスクでは、照射側より少ないがコントロール群よりは多いGFP陽性細胞の浸潤がみられた（結果2・結果3）。回収した β -TCP人工骨ディスク内の細胞において、非照射のコントロールを1としたRT-PCRの結果の比較からも（結果4），照射ペアの非照射側にLIPUSの効果がみられていることが結論された。LIPUSの液性因子



を介した効果，すなわち照射された局所だけでなく全身性にも骨再生促進作用が示されるメカニズムとして，埋入された β -TCPに対する炎症性の応答が先行することを示すIL-6（約4倍），TNF- α （data not shown）の増加が照射1週後の時点でみられたが，照射2週までには減少していた（結果4）。逆にCXCL12やRANKL, VEGFなどは，2週で増加がみられた。

創傷部位には、当初炎症が惹起されて炎症反応を司る M1 マクロファージなどが誘導されるが、治癒の進行につれて細胞の構成は変化し、炎症性の M1 マクロファージから、抗炎症性・免疫抑制性の M2 マクロファージへと変換されることが知られている。LIPUS 照射により M2 誘導性の IL-4 や Gal-3 (Mac-2; M2 特異的, data not shown) などが発現することは、M2 マクロファージのマーカー CD163 が免疫染色されたことと合致し (結果 5)。これらの多くは照射ペアの非照射側 (野生型) にも確認された。



以上、損傷部位に LIPUS (低出力超音波パルス) 照射を行うことにより遠隔の骨髄からも損傷部に骨の再生に不可欠な細胞供給が促進されるが、その際に有効な液性因子に関しては、特に PGE2 を始めとした生理活性物質が LIPUS 照射により大きく促進されること、末梢の骨髄細胞に EP2/EP4 受容体依存性に働いていることを課題 (1) で報告した (業績 Hidaka et al., 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤間 保晶, 竹内 良平, 大澤 克成	4. 巻 46
2. 論文標題 Hybrid closed wedge high tibial osteotomy(HCWHTO)の手術ピットフォール	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Orthopaedic Society of Knee, Arthroscopy and Sports	6. 最初と最後の頁 611-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sawaguchi T, Takeuchi R, Nakamura R, Yonekura A, Akiyama T, Kerstan M, Goldhahn S:	4. 巻 28(1)
2. 論文標題 Outcome after treatment of osteoarthritis with open-wedge high-tibial osteotomy with a plate: 2-year results of a Japanese cohort study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Surgery	6. 最初と最後の頁 2309 - 4990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2309499019887997	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hidaka K, Mikuni-Takagaki Y, Fujita M, Seki A, Ito Y, Kumagai K, Takeuchi R	4. 巻 33S2
2. 論文標題 Systemic Effect of LIPUS on B-TCP-(tri-calcium-phosphate) Ceramic Discs Subcutaneously Implanted in the Dorsal Aspect of Rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Trauma	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/01.bot.0000602540.27662.b1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuko Mikuni-Takagaki, Kouki Hidaka, Shinichiro Kuroshima	4. 巻 32
2. 論文標題 Medication Related Osteonecrosis of the Jaw: Basic Research and Clinical Practice for Prevention and Treatment by Ultrasound/Laser Pulsation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Trauma	6. 最初と最後の頁 S3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/01.bot.0000542214.31778.55	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kouki Hidaka, Yuko Mikuni-Takagaki, Satoko Wada-Takahashi, Makiko Saita, Ryota Kawamata, Takenori Sato, Akira Kawata, Chihiro Miyamoto, Yojiro Maehata, Hirotaka Watabe, Nobuyuki Tani-Ishii, Nobushiro Hamada, Shun-suke Takahashi, Shinji Deguchi, Ryohei Takeuchi	4. 巻 45
2. 論文標題 Low-Intensity Pulsed Ultrasound Prevents Development of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-Like Pathophysiology in a Rat Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ultrasound Med Biol.	6. 最初と最後の頁 1 - 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高垣裕子, 日高恒輝, 大谷茉衣子, 河田 亮, 竹内良平
2. 発表標題 並体結合 (parabiosis) ラットの背部皮下に埋植した -TCPディスクに及ぼす低出力超音波パルスLIPUSの全身性効果
3. 学会等名 第55回神奈川歯科大学学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高垣裕子, 日高恒輝, 藤田茉衣子, 関あずさ, 伊藤由広, 熊谷研, 竹内良平
2. 発表標題 皮下に埋植した -TCPディスクへの低出力超音波パルス(LIPUS)照射による全身性の骨再生効果
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidaka K, Mikuni-Takagaki Y, Wada-Takahashi S, Saita M, Kawamata R, Sato T, Kawata A, Miyamoto C, Maehata, Y, Watabe H, Tani-Ishii N, Hamada N, Takahashi S-S, Deguchi S, Takeuchi, R
2. 発表標題 Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Prevents Development of BRONJ-like Pathophysiology in Rat Alveolar Bone Defect Induced by Tooth Removal after Alendronate and Porphyromonas Gingivalis Challenges.
3. 学会等名 American Soc Bone Miner Res 2018 Annual Meeting, Montreal, Canada (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日高恒輝, 高垣裕子, 藤田茉衣子, 関あずさ, 伊藤由広, 熊谷 研, 竹内良平:
2. 発表標題 ラットの背部皮下に埋植した b-TCPディスクに及ぼすLIPUSの全身性効果Systemic Effect of LIPUS on b-TCP-(tri-calcium-phosphate) ceramic discs subcutaneously implanted in the dorsal aspect of rat.
3. 学会等名 第22回超音波骨折治療研究会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高恒輝, 竹内良平, 高垣裕子
2. 発表標題 アップデートシンポジウム US6-3 非侵襲的な力学的刺激を用いたステージ0 BRONJ病態進展の予防
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidaka K, Miyamoto C, Wada-Takahashi1 S, Kawamata R, Kawata A, Maehata Y, Saita M, Sato T, Watabe H, Tani-Ishii N, Takahashi S-S, Hamada N, Deguchi S, Mikuni-Takagaki Y, Takeuchi R
2. 発表標題 Therapeutic ultrasound prevents delayed healing of socket, possibly BRONJ, humorally.
3. 学会等名 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高垣裕子, 日高恒輝, 黒嶋伸一郎, 竹内良平, 岩淵博史
2. 発表標題 物理的刺激を利用した薬剤関連顎骨壊死MRONJの臨床・基礎研究の現状と予防・治療戦略
3. 学会等名 第21回超音波骨折治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内良平
2. 発表標題 膝周囲骨切り術の利点と欠点そしてピットフォール
3. 学会等名 島根整形外科医学会講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内良平
2. 発表標題 膝関節周囲骨切り術の歴史と未来
3. 学会等名 お茶の水運動器疾患セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内良平
2. 発表標題 膝骨切り術に関する世界の現状と展望
3. 学会等名 第37回膝関節フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	熊谷 研 (Kumagai Ken) (10468176)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	川股 亮太 (Kawamata Ryota) (40329199)	神奈川歯科大学・歯学部・診療科教授 (32703)	
研究 分担者	高垣 裕子 (Mikuni-Takagaki Yuko) (60050689)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	
研究 分担者	日高 恒輝 (Hidaka Kouki) (90760041)	神奈川歯科大学・歯学部・助手 (32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関