

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791455

研究課題名 (和文) パルス電磁場刺激がヒト骨髓間葉性幹細胞の骨形成に与える研究

研究課題名 (英文) Research on pulsing electromagnetic fields in human marrow mesenchymal stem cell

研究代表者

木村 和代 (Kimura Kazuyo)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：70382497

研究成果の概要：本研究は整形外科領域の難治性骨折に対してすでに臨床応用されているパルス電磁場刺激装置を用い、骨形成の始まりを担う骨髓間葉性幹細胞への影響を調べた。細胞外基質の90%を占めるコラーゲンと創傷部位（骨折したところの傷口）に多く認められるTGF- $\beta$ という増殖因子の存在により骨形成に関わるBMPという遺伝子の発現が上昇し、パルス電磁場の骨形成への関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科理工系歯学

キーワード：パルス電磁場刺激 骨髓間葉性幹細胞 骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔インプラント法においてインプラント埋入に先立ち骨幅を確保するため上顎洞底部を挙上するサイナスリフトやオンレイグラフトにより骨増生をすることが盛んに行われている。

(2) 骨移植材料は徐々に吸収し骨量の経時的維持は困難であり、ウシ由来の人工歯凍結乾燥の感染への危険性は否定できない。

(3) 未分化間葉性幹細胞で骨形成を促進させるのに最適な微少環境を作製し、整形外科領域ですでに難治性骨折に対し骨癒合促

進効果のあるパルス電磁場を用い、人為的に骨のリモデリングを操作できるようになれば、近未来における生活環境の多様化（家庭用デジタル製品や携帯電話の使用）に伴う様々な障害に対処するための基礎的なデータとなり、歯科の分野においても骨増生を必要とする部位に安全で可及的短期の骨再生を促し、患者の QOL の向上に貢献できると考えた。

## 2. 研究の目的

難治性骨折に臨床応用され骨癒合促進効果が報告されているパルス電磁波の骨形成のメカニズムを明らかにするため、パルス電磁場が創傷治癒に近い培養環境下（細胞外基質、増殖因子の存在下）の骨髄間葉性幹細胞の骨形成に関わる遺伝子にどのように影響するかを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

実験に用いる細胞は正常ヒト骨髄より採取されたヒト間葉性幹細胞（hMSC, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA）である。hMSC細胞は専用培養キット（BioWhittaker）を用い、37℃、湿度100%、5%CO<sub>2</sub>-95%空気の条件下で培養した。

### (2) パルス電磁場刺激 (PEMFs)

hMSC細胞は直径 60 mmのculture dish に  $4 \times 10^3/cm^2$  の密度で播種し、6 時間放置後、理研式パルス電磁場発生装置を用い、磁場強度 0.3 mT、周波数 100Hz、パルス幅 25  $\mu$  sec の条件で刺激し 1 時間後から 96 時間後まで経時的に与えた。

### (3) 骨創傷部に近似した培養環境への検討

(2) に加え、hMSC は細胞播種 6 時間放置後に、TGF- $\beta$ （BioSource International, Inc.）を濃度依存的（0.1、1、10 ng/ml）に添加しその後 6 時間のパルス電磁場刺激を与えた条件についても検討した。

### (4) RT-PCR analyses

パルス電磁場刺激後、TRIzol Reagent (Gibco BRL, MD, USA) を用い、total RNA を抽出し、Oligo(dT)12-18Primer (Gibco BRL) を用いて逆転写により cDNA を作製する。その後、cDNA を鋳型として、RT-PCR 法により骨形成に関与する遺伝子（collagen, Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin, TGF- $\beta$ , BMP-2）を観察し遺伝子発現に与える影響を検討した。また、明らかな差を認めた遺伝子に関して、cDNA を鋳型として、Realtime PCR 法（Light Cycler™ 使用：Roche Molecular Biochemicals, Germany）にて増幅し、定量的に観察した。

#### 4. 研究成果

これまでに研究者は骨形成を促進する目的で整形外科領域の難治性骨折に対し骨癒合促進効果のあるパルス電磁場刺激 (PEMFs) の応用を考え、細胞培養を用いた実験的研究を行ってきた。ヒト骨髄間葉性幹細胞にパルス電磁場刺激 (PEMFs) を行い骨形成性蛋白の oateopontin (OPN) 、 osteonectin (ON) 、 osteocalcin (OCN) 遺伝子発現の経時的な変化 (PEMFs 後 12、24、48、72、92 時間後に RNA 抽出) を観察した。ON と OCN 遺伝子発現は経時的な変化がなかった。OPN は他と比較して遺伝子発現は微量であり経時的な変化もなかった。PEMFs による影響も同様に遺伝子発現に変化を認めなかった。他に TGF- $\beta$  ファミリーに属し骨芽細胞の分化マーカーでもある BMP-2 遺伝子発現においても検討した。結果、TGF- $\beta$  の存在により濃度依存的に遺伝子発現の上昇を認めた。また、骨組織の基質蛋白の主たるものである type I collagen の存在により BMP-2 遺伝子発現の上昇を認めた。さらに PEMFs により BMP-2 遺伝子発現が抑制された。これは type I collagen が存在しない条件でも同様の効果を認めた。

パルス電磁場刺激の骨創傷部での影響を想定し、骨髄間葉性幹細胞への影響を観察した。この際、創傷部では様々な成長因子が放出されるが、その中で最も多いものの1つである TGF- $\beta$  に着目し、TGF- $\beta$  存在下での影響

について検索した。骨芽細胞の前駆細胞である骨髄間葉性幹細胞 (hMSC) を用いた。パルス電磁場を与える前に以前研究者が培養実験を行っていた骨芽細胞との定常状態時の遺伝子発現の比較検討を行った。検索したすべての遺伝子発現は hMSC で観察され、骨芽細胞を比較すると TGF- $\beta$  以外に検討した遺伝子発現量ではいずれも hMSC の方が増加していたが、TGF- $\beta$  の遺伝子発現量は hMSC の方が極めて微量であった。そのため、TGF- $\beta$  存在下でのパルス電磁場の影響を poly-L-lysine 培養皿と type I collagen 培養皿上で比較検討した。その結果、BMP-2 遺伝子発現において、パルス電磁波無刺激群で poly-L-lysine 培養皿と type I collagen 培養皿上いずれにおいても TGF- $\beta$  0.1、1 ng/ml 添加で変化が認められなかったものの 10 ng/ml 添加では無添加と比較して、発現量は poly-L-lysine 培養皿上で 16 倍、type I collagen 培養皿上で約 8 倍になっていた。いずれにおいてもパルス電磁場刺激により BMP-2 遺伝子発現上昇の抑制効果が明らかであった。

これらによりパルス電磁場刺激の *in vitro* での造血系細胞への影響は分化の程度、type I collagen の存在やその量などにより変化し、骨髄間葉性幹細胞に関わるパルス電磁場刺激の骨形成促進機序には BMP-2 の遺伝子発

現上昇に関与していることが示唆された。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 和代 (Kimura Kazuyo)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号 : 70382497