

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12839

研究課題名(和文) 温度制御式反復温熱刺激による骨芽細胞分化誘導法の検討

研究課題名(英文) Investigation of the Induction Method for Temperature-Controlled Repeated Thermal Stimulation

研究代表者

富並 香菜子 (Tominami, Kanako)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10815351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨リモデリング過程において、骨芽細胞は非常に重要な役割を果たすことが知られている。我々は以前、培地温度を制御する独自のシステムを用い、神経分化モデル・PC12細胞に対し温度制御式反復温熱刺激(TRTS)を負荷することで神経細胞分化を誘導する方法を開発した。しかし、前骨芽細胞の骨芽細胞分化におけるTRTSの作用は全く不明であった。

そこで本研究では、上述の培地温度制御系を用い、前骨芽細胞株の骨芽細胞分化に与える影響について検討し、前骨芽細胞のTRTSのみでの骨芽細胞分化誘導が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、温度制御式反復温熱刺激(TRTS)という比較的安全な非侵襲性刺激により、骨芽細胞分化や骨再生が促進されることが示された。

この研究成果は、複雑な生体内の骨代謝制御機構を理解するための新たな学術的方法論を提案することにも繋がるものである。

また、これを応用した全く新しいアプローチによる治療法が開発されれば、骨粗鬆症など骨代謝疾患の治療やその予防に際し、副作用のない非侵襲的な選択肢が提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Osteoblasts are extremely important for bone remodeling processes.

Previously, we found a method to induce neurite outgrowth of rat PC12 cells in a temperature-controlled repeated thermal stimulation (TRTS)-dependent manner using a heating plate that is capable of controlling the medium temperature. However, few studies have examined the effect of the TRTS on the osteoblastic differentiation.

The present study investigated the effects of the TRTS on the osteoblastic differentiation in murine pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. We clarified the effects of the TRTS on growth rates, alkaline phosphatase (ALP) activity and alizarin red staining (as a marker of osteoblast maturation). These results suggest that TRTS can induce the osteoblastic differentiation in the cells and might offer an effective and novel technique for bone regeneration.

研究分野：医工学

キーワード：温熱刺激 前骨芽細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本では、骨粗鬆症等の骨関連疾患は年々増加を続け、40歳以上の日本人の10%が骨粗鬆症とされる。その内訳は男性300万人、女性980万人である (Orimo et al., 2011)。そのため、ビスホスホネート製剤を始めとした各種薬剤による予防・治療が実施されているが、薬物療法には、ビスホスホネート製剤における薬剤関連顎骨壊死の様な重篤副作用が認められることがあり、非侵襲的で副作用の少ないアプローチを用いた予防・治療法の確立が望まれている。温熱療法は、副作用の少ない安全ながん治療の開発・実践の観点から注目を受けて

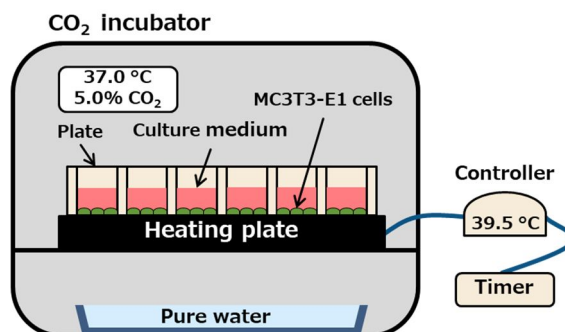


図1. 本研究における温熱刺激法の模式図

いる (Li et al., 2012)、精密な温度制御下での反復温熱刺激が分化能力を有する各種細胞に及ぼす影響を与えるかについての研究は、世界的にもこれまでほとんど行われてこなかった。

我々はこれまで、培地温度を制御する独自のシステムを用い、神経分化モデル細胞に対し温度制御式反復温熱刺激 (temperature-regulated repeated thermal stimulation、略称: TRTS) を負荷し (図1)、この刺激のみで神経細胞分化を誘導する方法を開発した (Kudo et al., 2015)。しかし、前骨芽細胞の骨芽細胞分化における TRTS の作用は全く不明であった。そこで本研究計画では、上述の培地温度制御系を用い、前骨芽細胞株の骨芽細胞分化に与える影響やその機序の解析を実施した。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、我々が神経系分化誘導において確立した TRTS による細胞分化調節技術を、前骨芽細胞の細胞分化誘導へ応用することにある。本研究計画によって、TRTS を活用した非侵襲的で副作用の少ない、画期的な骨芽細胞分化・骨再生の制御系のモデルが確立されるものと期待される。

また、代表者らが開発した TRTS による細胞分化調節技術原理は、他の細胞分化/再生誘導研究全般と融合することで、高精度細胞温度制御による非侵襲的次世代医療として、骨再生の臨床応用をも念頭においた新学術領域の創造へと発展する可能性がある。特に前骨芽細胞において TRTS のような温熱刺激による骨芽細胞分化誘導の新たな研究モデルを構築することは、複雑な生体内の骨代謝制御機構を理解するための新たな学術的方法論を提案することにも繋がるものである。

本研究により、TRTS のような安全な反復性温熱刺激を用いることで骨芽細胞分化や骨再生が促進されること等が明らかとなり、これを応用した全く新しいアプローチによる治療法が開発されれば、骨粗鬆症など骨代謝疾患に罹患している1300万人の人々の治療のみならず、今後骨代謝疾患になる可能性の高い方々にとっても、罹患する可能性を非侵襲的に副作用なく予防できるようになるものと期待できる。また骨芽細胞の分化と骨の添加が確認されれば骨欠損の再生や外傷後の骨接合面の治癒促進などに応用できる可能性も考えられる。

そこで、これまでに代表者らが神経細胞分化誘導において確立した TRTS 負荷法を元に、MC3T3-E1 前骨芽細胞の骨芽細胞分化誘導の確立を目指した。

3. 研究の方法

反復温熱刺激 TRTS による骨芽細胞の分化誘導法を確立するため、以下の方法で行った。

- (1) まず、TRTS の適切な負荷条件を明らかにするため、前駆骨芽細胞株の培養時、どの程度の温度上昇に耐えられるかを確認した。具体的には、通常培養下の前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に TRTS を負荷し、位相差顕微鏡による細胞数計測により細胞生存率を評価した。熱刺激を与えるためにヒートプレートを使用し、培養液の温度とヒートプレート表面温度の相関をモニターした。細胞増殖培地中の MC3T3-E1 細胞に対して、

3種類の温度で最大1日18時間の温熱刺激を行い、3日間未処理で放置した対照群と細胞数を比較した。セルプレート底面の付着細胞数は、0日目から3日目までを位相差画像により、対照群を基準とした相対値で評価した。

- (2) 次に、液性因子(分化誘導剤)を使用せず TRTSのみで骨芽細胞分化誘導が可能か検討した。具体的には、熱刺激を与えるためのヒートプレート表面温度を39.5°Cに固定し、10%血清入りの増殖用培地に播種した骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞は、2日後に5%血清入りの分化用培地に取り替えられ、図1に示したように TRTS 負荷を開始した。刺激時間は、1日最大18時間までの4種類(図2)のいずれかで行った。また骨形成において重要な役割を担う骨芽細胞は、分化の程度によってアルカリホスファターゼ(ALP)等の酵素が増加し、カルシウムが沈着する。従って本研究では、in vitroにおける骨芽細胞分化および石灰化に対する TRTS の影響を調査するため、骨芽細胞分化度の評価に用いられる、ALP 活性や細胞外における石灰化の評価をそれぞれ、ALP アッセイ、アリザリンレッド染色として実施し、TRTS 負荷開始後14日目・28日目に、コントロールとして分化誘導剤を使用した系と比較して評価した(図3)。

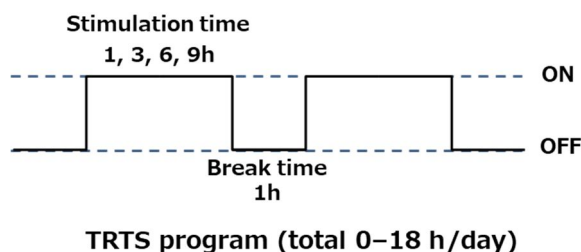


図2. 本研究における TRTS プログラム

刺激時間は、1日最大18時間までの4種類(図2)のいずれかで行った。また骨形成において重要な役割を担う骨芽細胞は、分化の程度によってアルカリホスファターゼ(ALP)等の酵素が増加し、カルシウムが沈着する。従って本研究では、in vitroにおける骨芽細胞分化および石灰化に対する TRTS の影響を調査するため、骨芽細胞分化度の評価に用いられる、ALP 活性や細胞外における石灰化の評価をそれぞれ、ALP アッセイ、アリザリンレッド染色として実施し、TRTS 負荷開始後14日目・28日目に、コントロールとして分化誘導剤を使用した系と比較して評価した(図3)。

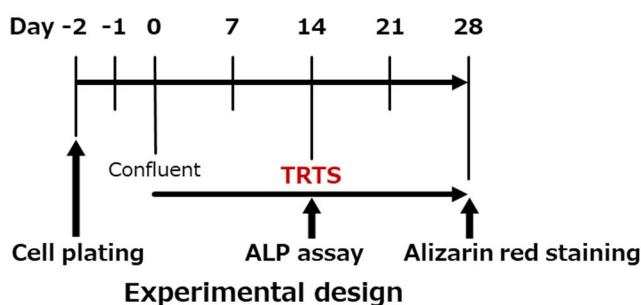


図3. TRTS による骨芽細胞分化実験誘導系の概要

4. 研究成果

- (1) 通常培養下の前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に TRTS を負荷した時、加熱プレート温度45°CのTRTS負荷では第1日目にして、42°C以上のTRTS負荷では第2日目以降、細胞死が誘発され、増殖が抑制された。これに対し、39.5°CのTRTSを負荷した場合、37°Cの培地で通常培養した陰性対照群と比較して、最大1日18時間までは細胞の増殖速度を低下させないことが確認された。
- (2) 前骨芽細胞のTRTSのみでの骨芽細胞分化誘導が可能かを検討するため、アルカリホスファターゼ(ALP)アッセイやアリザリンレッド染色を行い、ALP活性や細胞外における石灰化を評価した。その結果、39.5°CのTRTSを負荷した場合、我々の先行研究において神経細胞分化を誘導する条件の一つである1日18時間の刺激で、骨芽細胞分化誘導を有意に促進し得ることを確認した。
- (3) 前骨芽細胞の骨芽細胞分化における異なる刺激時間のTRTSの影響をより詳細に検討した。その結果、1日2時間、6時間、12時間、18時間の刺激で、それぞれ骨芽細胞分化誘導を有意に促進し得ることが分かった。一方で、骨芽細胞分化は必ずしも刺激時間に応じて促進されず、またTRTSの刺激継続が長期にわたる場合は、骨芽細胞分化に適さない可能性も明らかになった。いずれにせよ、これらの結果はTRTSがMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化を誘導可能なことを示唆するものであり、骨再生に有効な新手法の基礎となる可能性を示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kudo Tada-aki, Tominami Kanako, Izumi Satoshi, Hayashi Yohei, Noguchi Takuya, Matsuzawa Atsushi, Hong Guang, Nakai Junichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Characterization of PC12 Cell Subclones with Different Sensitivities to Programmed Thermal Stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8356 ~ 8356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21218356	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富並 香菜子、工藤 忠明、洪 光、羅 悠然、泉 哲、林 陽平、野口 拓也、松沢 厚、中井 淳一
2. 発表標題 温度制御式反復温熱刺激がMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化に与える影響
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022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	洪 光 (Hong Guang) (70363083)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	工藤 忠明 (Kudo Tada-aki) (50431606)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	林 陽平 (Hayashi Yohei) (00588056)	東北大学・加齢医学研究所・助教 (11301)	

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	泉 哲 (Izumi Satoshi) (20835368)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

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