

平成22年5月19日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791484

研究課題名 (和文) 低出力超音波パルスの破骨細胞への影響

研究課題名 (英文) Effects of osteoclasts in low-intensity pulsed ultrasound.

研究代表者

伊藤 範明 (ITO NORIAKI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40434500

研究成果の概要 (和文)：低出力超音波パルス (LIPUS) 刺激が、ラット破骨細胞の活性に与える機序の1つとして、細胞骨格に対する影響が考えられる。細胞骨格の重合を阻害してから LIPUS 刺激を与えた。その結果、細胞骨格の再重合に対して、LIPUS 照射群は非照射群よりも早い段階から再重合を促進していた。これは、LIPUS の刺激が細胞形態の変化に関与していることを示しており、メカニカルストレスとの関連が示唆された。しかし、LIPUS 照射が細胞骨格の再重合のどの部分に作用しているかは検討が必要である。

研究成果の概要 (英文)：Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) stimulation, given as one of the mechanisms of osteoclast activity in rats is considered effects on the cytoskeleton. From the cytoskeleton and inhibit polymerization LIPUS stimulation. As a result, to re-polymerization of the cytoskeleton, LIPUS irradiated group was to promote the early re-polymerization than the non-irradiated group. This, LIPUS have shown that the morphological changes involved in cell stimulation, suggesting an association with mechanical stress. However, LIPUS that acts on any part of the cytoskeleton polymerization re-irradiation should be considered.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：歯科学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：(1)低出力超音波 (2)破骨細胞 (3)メカニカルストレス (4)細胞骨格 (5)acid phosphatase 5,tartrate resistant (6) TNF receptor-associated factor 6 (7) Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor,Type3 (8) Cathepsin K

1. 研究開始当初の背景

低出力超音波パルス（以下超音波と略す）は、整形外科領域において難治性骨折治療機器として利用されており、骨折部位の治癒あるいは治療期間の短縮といった成果を得ている。本学では、この成果に着目し顎口腔領域の特にインプラント治療への応用を検討した。そこで実験動物を用いたインプラント研究の結果から、超音波が有効であることが判明しました。その当時、申請者は大学院生として実験に従事し組織切片等の観察から類骨組織や幼若な骨組織をインプラント体周囲（母床骨より離れた部位）に認め、また骨形成量も超音波を照射していない実験群と比較しても 20%程多いとの結果を得ました。この知見から、国内・国外の研究動向を検索したところ、*In vitro*の実験においては骨関連因子のマーカーの検索・石灰化の促進等、細胞の活性を促進するといった成果があることを確認した。これらの研究動向は、1.0あるいは1.5MHzの発振周波数の超音波治療器を実験に用いているものであった。一方、本学にて利用した超音波治療器は 3.0MHz の発振周波数を有する機器であり、本機器を用いて現在までに検索された事柄を比較検討することは急務であると考えた。

1.0あるいは1.5MHzの超音波治療器は整形外科領域での使用を前提とした仕様であり、顎口腔領域の使用において作用部位での減衰効果を期待し難いことが判明している。ゆえに、3.0MHzの利用は顎口腔領域での使用を活発化させ、インプラント治療をはじめとする骨再生などの一翼を担う可能性を有しており、有効性の検討を *in vivo*あるいは *in vitro*において多角的に検証する必要があった。

骨形成に有効と考えた場合、骨の改造現象を考慮する必要があると考えた。そこで今回、骨髄細胞から M-CSF と RANKL を用いて破骨細胞へ誘導を行い、超音波の照射が吸収系への影響を検討した。

2. 研究の目的

- (1) LIUPS 照射が破骨細胞前駆細胞の分化過程における個々の細胞形態にどのような影響を及ぼすかを細胞骨格に着目し蛍光観察した。さらに、細胞骨格の重合阻害を行うことで、LIPUS 照射の影響を視覚的に捕らえることを目的とした。
- (2) LIPUS 照射が破骨細胞前駆細胞の分化過程における細胞への影響として接着因子（オステオポンチン：OPN および CD44）の分泌にどのような影響を及ぼすか検討した。

- (3) LIPUS 照射が破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞に分化する際の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（以下 TRAP と略する）活性にどのような影響を及ぼすか検討した。
- (4) LIPUS 照射が破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞に分化する際に、acid phosphatase 5, tartrate resistant (Acp5)、TNF receptor-associated factor 6 (**Traf6**)、Inositol 1, 4, 5-Triphosphate Receptor, Type3 (**Itpr3**), Cathepsin K (**CtsK**) にどのような影響を及ぼすかをリアルタイム RT-PCR を用いた遺伝子学的に検討した。

3. 研究の方法

- (1) 細胞培養：本実験のすべての系で培養細胞培養：本実験のすべての系で培養システムを統一するために、ラット骨髄由来前駆破骨細胞と M-CSF および RANKL を用いて破骨細胞へ誘導するシステムを用いて行った。
- (2) 細胞骨格への影響：細胞骨格を形成しているアクチンに対して、重合阻害剤として、50mM のサイトカラシン D を 60 分間作用させ、PBS で 3 回洗浄後、通常の培地に交換し、その直後から LIUPS 照射（照射条件：発信周波数 3 MHz, 照射時間 15 分/日, 総出力 240mW）を行い、アクチンの再重合の様子はファロイジン (Alexa Fluor® 568) を用いて再重合 15 分後、30 分後、45 分後および 60 分後に蛍光観察した。
- (3) 接着因子 (OPN および CD44) への影響：細胞 (5.0×10^4 cells/ml) 培養を 12 日間行い、細胞播種 24 時間後から LIPUS (照射条件：発信周波数 3 MHz, 照射時間 15 分/日, 総出力 240mW) 照射を行った。OPN は、3 日毎に細胞培養上清を回収 (3, 6, 9 日 n=6 12 日 n=5) し、OPN ELISA KIT を用いてキット添付マニュアルに従って 450nm の吸光度にて比色定量測定を行った。また、CD44 は、細胞培養 3 日後に LIPUS 照射を行い、蛍光観察を行った。
- (4) TRAP 活性：細胞 (1.0×10^5 cells/ml, 3 日 n=8 6, 9 日 n=12 12 日 n=9) 培養を 12 日間行い、細胞播種 24 時間後から LIPUS (照射条件：発信周波数 3 MHz, 照射時間 15 分/日, 総出力 240mW) 照射を行った。3 日毎に細胞

- を回収し、TRAP & ALP KIT を用いて 405nm の吸光度にて比色定量測定を行った。なお、37°C、30 分インキュベート時の TRAP 活性を単位タンパク量あたりの比活性値として算出した。
- (5) リアルタイム RT-PCR を用いた遺伝子学的に検討：細胞 (5.0×10^4 cells/ml) 培養を 13 日間し LIPUS 照射を行い、照射後 1 時間および 24 時間で total RNA の抽出をした。acid phosphatase 5, tartrate resistant (Acp5), TNF receptor-associated factor 6 (Traf6), Inositol 1, 4, 5-Triphosphate Receptor, Type3 (Itp3) について RT-PCR にて検討したが、Itp3 に関して詳細検討を行うために、細胞培養開始から 3 日目および 6 日目に関しても LIPUS 照射後 1 時間で total RNA の抽出を行った。さらに、Cathepsin K (CtsK) については細胞培養開始から 3 日目および 6 日目に関しても LIPUS 照射後 24 時間で total RNA の抽出を行い RT-PCR にて検討した。

4. 研究成果

- (1) 細胞骨格への影響：アクチン再重合 15 分後すなわち LIPUS 照射直後の照射群 (図 1a) と非照射群 (図 1b) の比較を行うと、照射群においては、細胞全体を観察することができ、細胞周囲のアクチンリングを確認できた (図 1a, b)。この状態は、アクチン再重合 45 分後の LIPUS 非照射群 (図 1c) の形態に近い状態であった。また、アクチン再重合 45 分後すなわち LIPUS 照射 30 分後の照射群 (図 1d) では、細胞周囲のアクチンリングが活性化し始めることを観察し、さらに、アクチン再重合 60 分後すなわち LIPUS 照射 45 分後 (図 1e) では、アクチンリングが著しい活性化を認めた。アクチン再重合 60 分後の非照射群では、細胞周囲のアクチンリングは明瞭に観察できた。このことから、LIPUS 照射により細胞骨格に作用し、アクチンの再重合を促進した可能性が伺えた。すなわち、LIPUS 照射が細胞骨格を介して細胞全体への活性につながる可能性も考えられた。

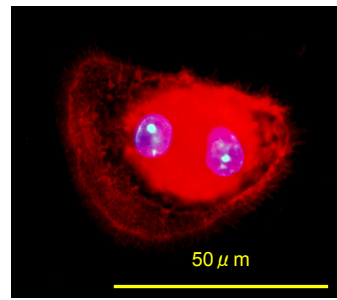


図 1 a LIPUS 照射直後での照射群

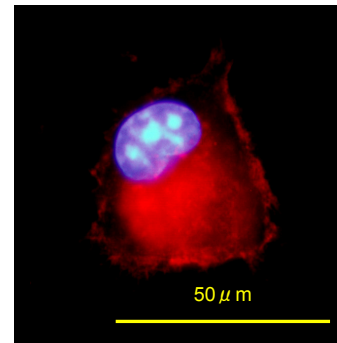


図 1 b LIPUS 照射直後での非照射群

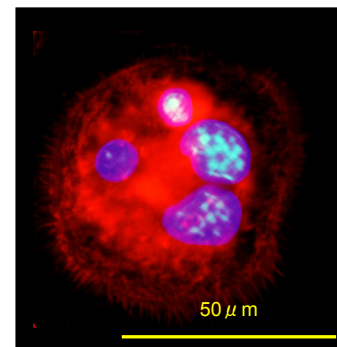


図 1 c アクチン再重合 45 分 (非照射群)

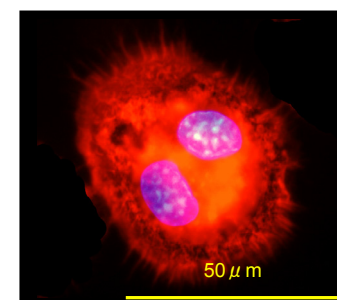


図 1 d LIPUS 照射 30 分後

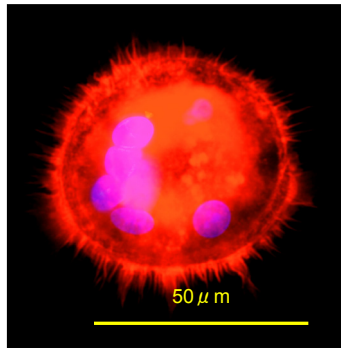


図 1 e LIPUS 照射 45 分後

- (2) 接着因子 (OPN および CD44) への影響: OPN に関しては, LIPUS 照射群およびコントロール群ともに, 3 日目から 6 日目にかけて急激な増加を認めた. 両群ともに 9 日目から減少に転じた. LIPUS 照射群は, 量的変動のピークはコントロール群より時間的に早い傾向にあったが, 有意差は認められなかった (図 2a). 一方, CD44 の局在について, LIPUS 照射群 (図 2b) では非照射群 (図 2c) に比べて, 細胞周囲へ拡大を認めた. なお, OPN と同様に 6 日目の CD44 の局在も確認を行ったが, OPN ELISA の結果からも分かるように, 3 日から 6 日にかけて急激な産生量を認め, 蛍光観察が困難であった.

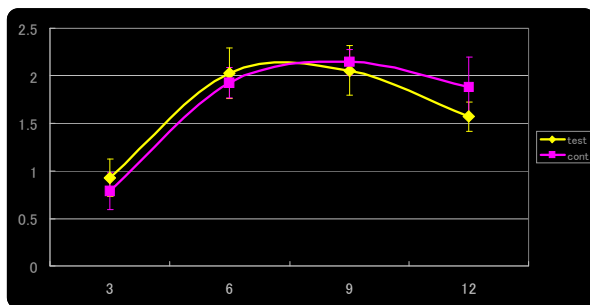


図 2 a OPN の経時的変化

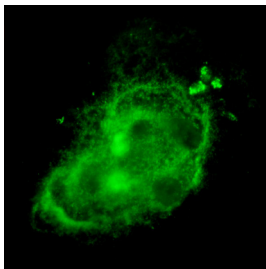


図 2 b 照射群

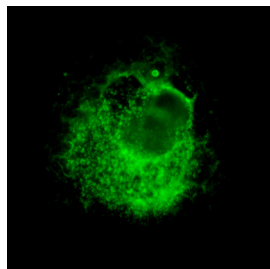


図 2 c 非照射群

- (3) TRAP 活性: LIUPS 照射群および非照射群ともに経時的に活性は上昇する傾向にあったが, 両群間で有意差は

認められなかった. このことから, 比活性値での比較において LIPUS 照射が直接的に TRAP 活性を高める要素とならないことが確認できた.

- (4) リアルタイム RT-PCR を用いた遺伝子学的に検討: Acp5 と Traf6 では照射後 24 時間で回収した群は非照射群および照射後 1 時間で回収した群に比べ低下傾向を示した. Itpr3 に関する詳細検討の結果, 6 日目では照射群と非照射群には変化を認めなかったが, 3 日目において照射群では非照射群に比べ著しく低下した. さらに, Cathepsin K (CtsK) については, 両日ともに照射群は非照射群に比べて著しく低下する傾向を示した. 以上の結果より, 破骨細胞様細胞の分化過程において, LIPUS 照射をすると照射後の早期段階から活性を抑制する傾向にある可能性が示唆された.
- (5) 考察: 形態学的手法による観察においては LIPUS 照射の刺激による形態的变化を観察することができた. このことは, LIPUS の刺激がメカニカルストレスの 1 種として細胞に作用したことを示し, そのストレスを感作することで細胞活性に結びつくのではないかと推測される. この実態を詳細に検討するために, 生化学的あるいは遺伝子学的手法を用いて行ってきたが, 細胞分化の周期や LIPUS 照射からの各条件試料を採取するまでの時間的ルール, LIPUS 照射そのもののルールを細かく設定した上での比較検討が最低条件となるが, その統一を導き検討することが困難な実験であった. すでに, 臨床応用されており良好な結果を得られているが, “何故” というカテゴリーを追及する際に in vitro における実験の条件設定を整えることは急務であり, さらに検討していく課題である.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 伊藤範明、ラット破骨細胞に及ぼす LIPUS 照射の影響、日本骨代謝学会、2009 年 7 月 24 日、大阪国際会議場
- ② 伊藤範明、ラット破骨細胞に及ぼす LIPUS 照射の影響、歯科物理刺激研究会、2008 年 3 月 28 日、九州歯科大学 病院棟 11 階大会議室

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

③

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 範明 (ITO NORIAKI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40434500