

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12619

研究課題名(和文) 超音波による細胞機能制御に関するmiRNAの役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of miRNA on the control of cellular function by ultrasound

研究代表者

田淵 圭章 (Tabuchi, Yoshiaki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：20322109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低出力パルス超音波(LIPUS)の細胞応答を明らかにするために、骨芽細胞の骨分化に対するLIPUSの効果を検討した。マウス骨芽MC3T3-E1細胞に30 mW/cm<sup>2</sup>の強度で一日一回20分間LIPUSを照射した。LIPUSの連続照射は、アリザリンレッド染色により検出した骨分化を有意に上昇させた。アクチンベータに対するsiRNA処理細胞において細胞の形態学的な変化が観察された。アクチンベータの発現抑制は、LIPUSによる骨分化の誘導を消失させた。得られた成績は、BMSCsにおけるLIPUSの作用メカニズムを理解するための分子基盤になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低出力パルス超音波(LIPUS)は、骨折治癒促進効果があるがその分子機構は完全に解明されていない。LIPUSの細胞応答を明らかにするために、骨芽細胞の骨分化に対するLIPUSの効果を検討した。マウス骨芽MC3T3-E1細胞へのLIPUSの連続照射は、骨分化を有意に上昇させ、この作用の少なくとも一部にアクチンベータが関与することが判った。得られた成績は、LIPUSの作用メカニズムを理解するための重要な分子基盤になる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the cellular response to low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), the effects of LIPUS on the osteogenic differentiation in osteoblastic cells were investigated. Mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells were exposed to LIPUS (30 mW/cm<sup>2</sup> for 20 min; once a day). Repeated exposure of LIPUS significantly elevated mineralization level detected using alizarin red staining. Morphological changes were observed in the cells treated with siRNA for actin beta. The silencing of actin beta diminished the osteoblastic differentiation that was increased in the MC3T3-E1 cells by exposure to LIPUS. These findings will provide a molecular basis for further understanding of the mechanisms of LIPUS in osteoblastic differentiation.

研究分野：細胞生理学

キーワード：超音波 細胞分化 アクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低出力パルス超音波 (LIPUS) は、骨折治癒促進作用を有し、実際に臨床で使用されている。骨折治癒過程は、炎症期、仮骨形成期とリモデリング期に分けられ、各ステップで関与の程度の違いはあるが、繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞等、様々な細胞が関与することが知られている。一方で、この LIPUS の作用の分子メカニズムは不明な点が多い。近年、ノンコーディング制御性 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、遺伝子の発現を調節し様々な生命現象に関与することから、医療への応用が期待されている。

### 2. 研究の目的

本申請では、LIPUS による細胞の分化や増殖等の機能制御において miRNA がどの様に關与しているかを、骨芽細胞、間葉系幹細胞等で検討する。さらに、miRNA を含むエクソソームを介した細胞間相互作用を細胞や魚類のウロコを用いた組織モデル等で調べる。

### 3. 研究の方法

1) LIPUS 照射実験 6 ウエルプレート用の実験用超音波照射装置 (帝人ファーマ) を用いた (図

1)。LIPUS は、1 日 1 回 20 分間照射した (超音波周波数 1.5 MHz, DF: 20%, パルス繰り返し周波数: 1 kHz, 超音波有効強度: 30 mW/cm<sup>2</sup>)。

1) 培養細胞を用いた実験 骨芽細胞由来であるマウス MC3T3-E1 細胞を用いた。細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 MEM $\alpha$  培地で培養した。

2) ウロコを用いた実験 金魚からウロコを採取し、実験に用いた。

3) 動物を用いた実験 オス BALB/c マウスを実験に用いた。



図 1 LIPUS 照射装置

### 4. 研究成果

1) マウス骨芽 MC3T3-E1 細胞の細胞分化に対する LIPUS の効果

先ず、LIPUS の 20 分間照射により、培地の温度が上昇するか否かを検討した。この照射条件では、培地の温度の上昇は観察されなかった。細胞へのベータグリセロリン酸 (10 mM) とアスコルビン酸-2-リン酸 (150  $\mu$ M) の添加の 9-12 日後、細胞の石灰化やアルカリフォスファターゼ活性の上昇を伴う細胞の分化誘導が観察された。1 日 1 回 20 分間の LIPUS の細胞への照射は、対照群に比べて有意に細胞分化を促進した (図 2)。他方、MC3T3-E1 細胞への LIPUS の 1 回 20 分間照射により、細胞骨格アクチンフィラメントと細胞外基質の結合部位である焦点接着斑の数が増加することが判った。この検出には、焦点接着斑の関連タンパク質パキシリンやピンキュリンの特異的抗体を用いた。ベータアクチンのノックダウンは、siRNA (small interfering RNA) を用いて行った。興味深いことに、アクチンノックダウン細胞では、LIPUS の分化誘導促進作用が消失した (図 3)。MC3T3-E1 骨芽細胞において、LIPUS の骨形成分化促進作用にアクチン細胞骨

格系が関与することが示された。また、この LIPUS の促進作用は、その熱的な作用ではなく、メカニカルな作用によると推察される。

網羅的な遺伝子発現解析の結果、MC3T3-E1 骨芽細胞の分化の過程でオステオカルシン(Bglap) やボーンシアロプロテイン (Ibsp) の遺伝子発現が顕著に上昇することが示された。また、Bglap は、miRNA である miR-22-3p, miR-30b-3p や miR-1299 等で、Ibsp は miR-129b-3p, miR-130b-5p や miR144-3p 等で発現が制御されている可能性がある。MC3T3-E1 骨芽細胞の分化の過程で細胞外に分泌されるエクソソームを分離したが、培地中に含まれる 10% FBS が影響し、細胞分化に関するエクソソームやそれに含まれる miRNA の同定には至らなかった。また、FBS 非存在下では、MC3T3-E1 骨芽細胞の石灰化を伴う細胞分化は観察できなかった。骨芽細胞の分化に関連するエクソソームやそれにおよぼす LIPUS の効果を検討することが今後の課題である。

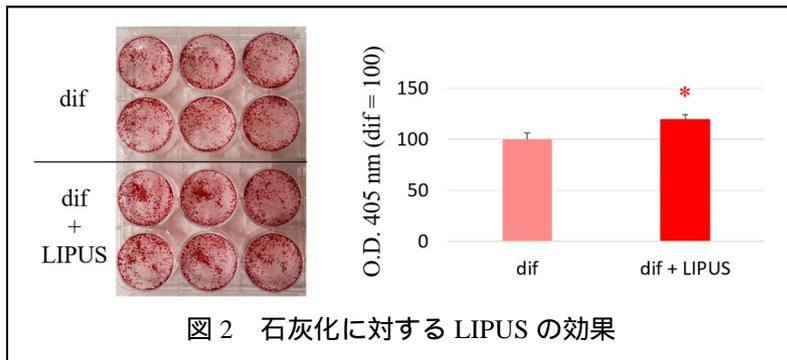


図2 石灰化に対する LIPUS の効果

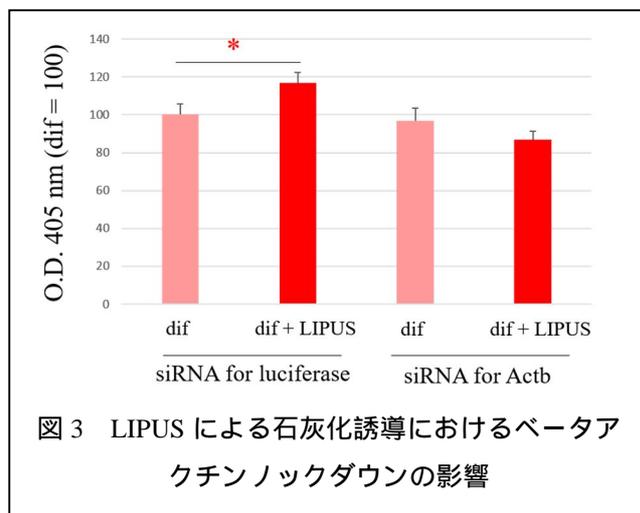


図3 LIPUS による石灰化誘導におけるベータアクチンノックダウンの影響

## 2) 金魚ウロコの骨芽細胞と破骨細胞活性に対するメカニカルストレスの影響

金魚のウロコには、骨芽細胞と破骨細胞が存在し LIPUS を含むメカニカルストレスに鋭敏に応答することが知られている。金魚のウロコに対する遠心機を用いた過重力 (3G, 24 h) は、破骨細胞の活性 (Rankl/Opg 比) を有意に抑制したが、クリノスタットを用いた疑似微小重力 (24 h) はその活性を有意に上昇させた (雑誌論文 Yamamoto et al., *Zoolog Sci*, 39: 388-396, 2022) (図 4)。一方、骨芽細胞のマーカー遺伝子発現に対して疑似微小重力は有意な抑制作用を示した。これらの成績から、疑似微小重力は破骨細胞を活性化、反対に骨芽細胞活性を抑制することが示された (雑誌論文 Yamamoto et al., *Biol Sci Space*, 36: 9-14, 2022)。ウロコモデルにおいて、微小重力の骨量低下を再現することができた。また、骨細胞のマーカー遺伝子スクレロステチンの発現を指標として、金魚のウロコにも骨細胞様の細胞が存在すること、また、微小重力によりスクレロステチンの発現が上昇することを明らかにした (雑誌論文 Yamamoto et al., *Biomed Res*, 41: 279-288, 2020)。

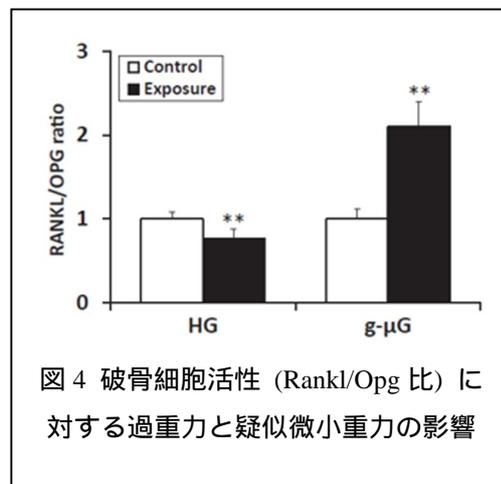


図4 破骨細胞活性 (Rankl/Opg 比) に対する過重力と疑似微小重力の影響

### 3) 老化マウスの骨代謝に対するメラトニンの効果

LIPUS には骨折治癒促進作用があることが動物モデルで確かめられている。以前我々は、4カ月齢から20カ月齢まで長期間メラトニン (15-20 mg/kg/day) を給水から摂取することにより、老化マウスの骨代謝が改善することを報告した (雑誌論文 Igarashi-Migitaka et al., *Acta Histochem*, 122:151596, 2020)。今回、前回と同様の実験条件の老化したマウスにおいて、メラトニン (15-20 mg/kg/day) の長期間摂取は、血漿中のカルシウムとマグネシウムイオン濃度を有意に上昇させ大腿骨の骨強度を増強することを明らかにした (図 5, 雑誌論文 Igarashi-Migitaka et al., *Melatonin Res*, 4: 581-591, 2021)。これらの成績は、動物モデルにおける LIPUS の効果を検討する研究の重要な情報になると考える。

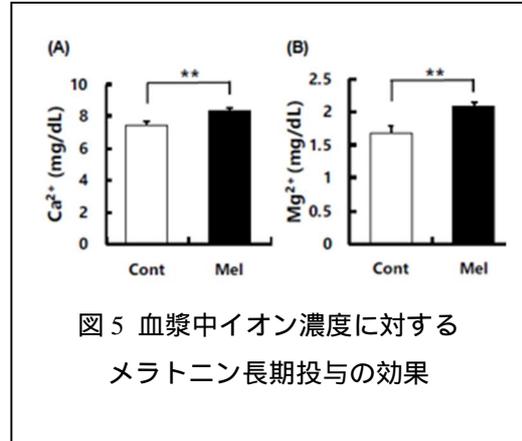


図 5 血漿中イオン濃度に対するメラトニン長期投与の効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki Nobuo, Honda Masato, Sato Masayuki, Yoshitake Shuhei, Kawabe Kimi, Tabuchi Yoshiaki, Omote Toshiki, et al.	4. 巻 234
2. 論文標題 Hydroxylated benzo[c]phenanthrene metabolites cause osteoblast apoptosis and skeletal abnormalities in fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 113401 ~ 113401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2022.113401	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Tatsuki, Ikegame Mika, Furusawa Yukihiro, Tabuchi Yoshiaki, Hatano Kaito, Watanabe Kazuki, Kawago Umi, Hirayama Jun, Yano Sachiko, Sekiguchi Toshio, Kitamura Kei-ichiro, Endo Masato, Nagami Arata, Matsubara Hajime, Maruyama Yusuke, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo	4. 巻 39
2. 論文標題 Osteoclastic and Osteoblastic Responses to Hypergravity and Microgravity: Analysis Using Goldfish Scales as a Bone Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 388 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210107	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 Yamamoto Tatsuki, Ikegame Mika, Kuroda Kohei, Kobayashi-Sun Jingjing, Hirayama Jun, Kobayashi Isao, Kawamura Ryoya, Endo Masato, Tabuchi Yoshiaki, Furusawa Yukihiro, Yachiguchi Koji, Sekiguchi Toshio, Matsubara Hajime, Yano Sachiko, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Activation of RANKL-producing cells under simulated microgravity with a three-dimensional clinostat in regenerating goldfish scales	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Sciences in Space	6. 最初と最後の頁 9 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2187/bss.36.9	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 -
1. 著者名 Kitamura Kei-ichiro, Hirayama Jun, Tabuchi Yoshiaki, Minami Takao, Matsubara Hajime, Hattori Atsuhiko, Suzuki Nobuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Glyoxal-induced formation of advanced glycation end-products in type 1 collagen decreases both its strength and flexibility in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13528	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 -

1. 著者名 Hirano Tetsushi、Suzuki Nihei、Ikenaka Yoshinori、Hoshi Nobuhiko、Tabuchi Yoshiaki	4. 巻 430
2. 論文標題 Neurotoxicity of a pyrethroid pesticide deltamethrin is associated with the imbalance in proteolytic systems caused by mitophagy activation and proteasome inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115723 ~ 115723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2021.115723	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 Feril Loreto B.、Yamaguchi Kazuki、Ikeda-Dantsuji Yurika、Furusawa Yukihiro、Tabuchi Yoshiaki、Takasaki Ichiro、Ogawa Ryohei、Cui Zheng-Guo、Tachibana Katsuro	4. 巻 48
2. 論文標題 Low-intensity ultrasound inhibits melanoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 451 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-021-01131-0	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 Tabuchi Yoshiaki、Hasegawa Hideyuki、Suzuki Nobuo、Furusawa Yukihiro、Hirano Tetsushi、Nagaoka Ryo、Hirayama Jun、Hoshi Nobuhiko、Mochizuki Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Genetic response to low intensity ultrasound on mouse ST2 bone marrow stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11812	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 Yamamoto Tatsuki、Ikegame Mika、Kawago Umi、Tabuchi Yoshiaki、Hirayama Jun、Sekiguchi Toshio、Furusawa Yukihiro、Yachiguchi Koji、Matsubara Hajime、Urata Makoto、Hattori Atsuhiko、Suzuki Nobuo	4. 巻 34
2. 論文標題 Detection of RANKL-producing cells and osteoclastic activation by the addition of exogenous RANKL in the regenerating scales of goldfish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Sciences in Space	6. 最初と最後の頁 34 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2187/bss.34.34	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 -

1. 著者名 YAMAMOTO Tatsuki, IKEGAME Mika, HIRAYAMA Jun, KITAMURA Kei-ichiro, TABUCHI Yoshiaki, FURUSAWA Yukihiro, SEKIGUCHI Toshio, ENDO Masato, MISHIMA Hiroyuki, SEKI Azusa, YANO Sachiko, MATSUBARA Hajime, HATTORI Atsuhiko, SUZUKI Nobuo	4. 巻 41
2. 論文標題 Expression of sclerostin in the regenerating scales of goldfish and its increase under microgravity during space flight	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 279 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.279	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田淵圭章, 平野哲史, 長岡 亮, 長谷川英之
2. 発表標題 マウス骨由来細胞における骨形成分化に対する低出力パルス超音波の効果
3. 学会等名 日本超音波医学会第95回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田淵圭章, 長谷川英之, 望月 剛
2. 発表標題 哺乳動物細胞における低出力パルス超音波誘導遺伝子発現に対する熱作用の関与の検討
3. 学会等名 日本超音波医学会第94回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田淵圭章, 長谷川英之, 鈴木信雄, 平野哲史, 長岡 亮, 望月 剛
2. 発表標題 骨髄間質細胞における低出力パルス超音波に対する初期応答遺伝子群の同定
3. 学会等名 日本超音波医学会第93回学術集会
4. 発表年 2020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	長谷川 英之 (Hasegawa Hideyuki) (00344698)	富山大学・学術研究部工学系・教授  (13201)	
研究分担者	鈴木 信雄 (Suzuki Nobuo) (60242476)	金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授  (13301)	
研究分担者	古澤 之裕 (Furusawa Yukihiro) (80632306)	富山県立大学・工学部・准教授  (23201)	
研究分担者	平山 順 (Hirayama Jun) (90510363)	公立小松大学・保健医療学部・教授  (23304)	

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
---------	---------