

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591667

研究課題名（和文） 物理刺激による骨芽細胞の応答メカニズムの解明
—メカニカルストレスと微弱電流刺激

研究課題名（英文） Analysis of response mechanism of osteoblast by physical stimulation
-mechanical stress and electrical stimulation

研究代表者 金 郁ちよる（Kim Wook-Cheol）

京都府立医科大学大学院医学研究科 運動器機能再生外科学（整形外科教室）・准教授
研究者番号：50244603

研究成果の概要（和文）：われわれは骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に対して交流電気刺激を行い、その反応を MAPK（mitogen-activated protein kinase）のリン酸化を指標として検証した。20 分間の交流電気刺激により、MAPK の中で ERK および p38 のリン酸化は無刺激群よりも有意に上昇した。骨芽細胞の電気刺激に対する応答メカニズムの一部が解明され、有用なメカニカルストレスの条件や刺激方法の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We conducted an alternating current electrical stimulation to the osteoblastic cell line MC3T3-E1, and examined the phosphorylation of MAPK (mitogen-activated protein kinase) as an indicator. By the AC electrical stimulation for 20 min, phosphorylation of ERK and p38 (MAPK) was increased significantly than the non-stimulated group. Part of the response mechanism for electrical stimulation of osteoblasts been elucidated, the establishment of stimulus conditions and methods of useful mechanical stress can be expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，整形外科

キーワード：細胞・組織，シグナル伝達，生体分子，再生医学，医療・福祉

1. 研究開始当初の背景

現在整形外科領域において、骨折形態が多様化している一方、早期の ADL の改善と治療期間の短縮が切望されている。そこで、患者の肉体的・精神的苦痛の緩和を目的として、早期に骨癒合を獲得することが喫緊の課題となっている。さらに超高齢化社会を迎え、重度の骨粗鬆症に伴う脆弱性骨折も増加し、

寝たきりと医療費の増大は大きな社会問題になっている。これらの課題に対し薬物療法だけでなく非侵襲的な物理刺激によって、損傷された骨組織の修復促進や廃用性の骨萎縮を防ぐ手法を確立することは、社会に対する貢献度が高い。

われわれの研究グループでは、骨圧電気現象（ピエゾ電流）と電氣的仮骨の発見（保田，

1953年)以来 *in vivo* および主に臨床例で電気刺激法を用いた骨成熟促進効果を検証し、患者に供与してきた。この電氣的刺激などの物理刺激を用いた骨癒合促進法は、低侵襲で簡便に施行可能で、費用対効果が高いため、本邦のみならず欧米を含めて発展してきた。現在、パルス電磁場刺激 (Bassett, 1974)、オステオトロン療法 (Brighton, 1981)、超音波刺激 (Duarte, 1983) など多様化し、その有効性が報告されているが、効果は一様ではない。

こうした、電気物理刺激の効果が一様でないのは、細胞分子レベルの刺激応答が解明されていないことが理由の一つと考えられる。近年、宇宙飛行において無重力空間での骨量減少や、長期臥床患者での骨代謝動態が研究され、細胞レベルでは重力からの影響をメカニカルストレス (シェアストレス、伸張刺激、静水圧、電流刺激など) と捉えた研究が行われている。荷重などの力学的負荷により皮質骨の微小構造は変形し、その変形に伴い骨細胞の収まっている骨小腔内の組織液などに流れが生じ、その組織液の流れが骨芽細胞などの骨構成細胞の細胞膜表面にメカニカルストレスとして働くと考えられている。メカニカルストレスが細胞環境において、細胞の成熟・分化に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある (Rubin, 2006)。しかし、未だ電気刺激をメカニカルストレスと考えた研究はない。われわれは、電気刺激が細胞レベルでは組織液中のイオンに作用し、イオンの反復する流れがメカニカルストレスと同様に細胞に作用していると考えた。また反対にメカニカルストレスにより、イオンを含む細胞形態が変化することでイオンの動きが生じ電流が生じている。つまり電流とメカニカルストレスと相互作用していると考えられる。そこでメカニカルストレスの研究手法を利用し、交流電気刺激による細胞応答の研究手法に応用しようと考えた。

われわれの研究協力者はシェアストレスにおいて MAPK (mitogen-activated protein kinase) の一つの ERK (extracellular signal-regulated kinase) が活性を促進され、この応答に ATP および P2X7 レセプターが関与していることを報告した (Okumura, 2008)。ERK のリン酸化 (p-ERK) は骨芽細胞が細胞外環境の変化を感受したことを示しており、*in vivo* でも骨代謝においても重要な働きをしていることが報告されている (Ge, 2007)。そこで、交流電気刺激の細胞応答を、まず骨芽細胞における ERK の活性化で検証す

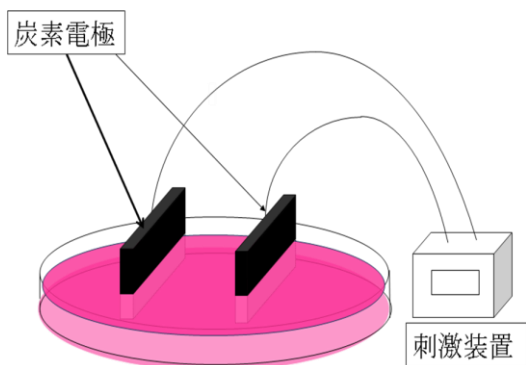
ることとした。

2. 研究の目的

骨組織に対する電気刺激効果の研究には微弱直流電流を用いられ、骨折の骨成熟促進効果が *in vivo* および *in vitro* の実験で確認された (1986, Matsunaga)。しかし、陽極での酸化還元反応があることや、効果の電極による偏在などがあり、臨床応用は限られてきた。われわれは陽極酸化のない微弱交流電気刺激を使用している。交流電気刺激は安全性が高く、機器の周波数・電圧を簡便に調節することが可能で、*in vivo* の実験や臨床応用を行っている。骨以外に、神経や腱修復の再生医療分野にも用いられている (Sisken, 1984)。しかし、細胞分子レベルの電気刺激のメカニズムの解明は、基礎的な知見にとどまらず、これまでブラックボックス化されていた電気刺激の骨成熟促進効果の解明に大きな門戸を開くこととなる。電気刺激法を用いた骨成熟促進効果は本邦発の業績であるが、電気刺激を細胞がどのように (何を介して) 感受し、どのように細胞内シグナルとして伝達され、細胞が活性化されるのかは未だ明らかではない。近年メカニカルストレスに関する骨代謝研究では欧米が先行しており、この分野で本邦も立ち遅れてはいけない。そこで、交流電気刺激をメカニカルストレスの一つと考え、実験を計画した。予備実験で MC3T3-E1 細胞 (骨芽細胞) に交流電気刺激を行った結果 (図 1)、Western-blot 法で ERK のリン酸化を検出した (図 2)。また、MEK1/2 (MAPK/ERK kinase) 阻害剤である U0126 を用いた抑制実験でも著明な抑制を認めた。これは、交流電気刺激が骨芽細胞にストレスを与え、それに対して骨芽細胞が反応していることを示している。本研究では、交流電気刺激の骨芽細胞における至適条件と分化・増殖効果、および細胞内応答を解明する。これが明らかになれば、*in vitro* での交流電気刺激による骨成熟促進効果の検証を一步進んだ形で行うことができる。そのみでなく、電気刺激の細胞応答メカニズムが解明でき、宇宙飛行による骨量減少などの骨代謝動態の解明も可能となる。また交流電気刺激は微弱であり侵襲がなく利用しやすいため、超高齢化社会に伴った骨量減少を薬物からのみでなく、交流電気刺激を用いて防ぐことも可能となるであろう。

3. 研究の方法

(1) 至適な交流電気刺激条件の確立



φ 3.5cm dishに入れた継代3日目のMC3T3-E1細胞の培養液に、交流電気刺激装置を用い刺激する。刺激装置は、臨床応用され厚生省から認可されたMES（エムイーシステム）社製（規格：定電流： $30 \pm 6\mu\text{A}$ ，周波数 $2 \pm 0.4\text{Hz}$ ，負荷抵抗 $0-60\text{k}\Omega$ ）を用いる。炭素電極および固定機器は、心筋細胞などの実験的モデル（Burstein, 2007）で使用されているION OPTICS社製を用いる。本実験系でも同様に、MC3T3-E1（骨芽細胞様細胞）を用いて細胞に直接刺激を与えるのではなく、培養液中に交流電気刺激を与えることにより、細胞を刺激する点が特徴である。in vivoで実際に創外固定のピンを介して交流電流をかけた場合、骨組織内でも抵抗が少ない組織液を介して電流が生じていることを想定している。

① ERKを指標にした交流電気刺激の至適条件の解明

ERKのリン酸化は、30秒間のシェアストレスにより刺激後5分で活性化し、30分で脱リン酸化すると報告された（Okumura, 2008）。刺激定電流出力や刺激時間を変化させ、刺激後のERKのリン酸化を指標としWestern Blot法で検出し、各群間を比較する。ERK活性を指標として最も効果的な出力と時間を検討する。



② 交流電気刺激による骨芽細胞の増殖・分化に与える影響の解明

細胞播種後2日目、3日目に交流電気刺激を行い、10%ホルマリンで固定する。HoechstNo. 33258で染色後、蛍光顕微鏡で細胞数を測定し細胞の増殖能を評価する。また、細胞播種後3日目から7日目までの細胞に毎日一定時間の交流電気刺激を行い、またALP（アルカリフォスファターゼ）活性を分化の

指標にして骨細胞の分化への影響を評価する。

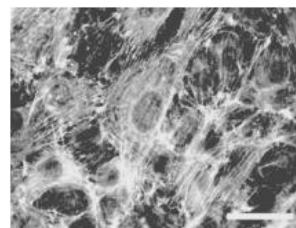
(2) 骨芽細胞の交流電気刺激に対する応答メカニズムの検証

① 交流電気刺激による細胞内Ca濃度の変化を検証

継代3日目の骨芽細胞を用いて、交流電気刺激後の細胞内Ca濃度の変化を蛍光色素のfura 2-AMにより検出する。励起波長340nm/380nmで3秒毎に交互に励起して両蛍光強度の変化をイメージ解析ソフト（Metafluor）により解析し、細胞内Ca濃度の変化と対応づける。

② 細胞の骨格系に与える影響を指標にした刺激条件の解明

交流電気刺激後に経時的に細胞を固定して刺激後のactin stress fiberの形成をローダミンファロイジンで染色して観察する。刺激の程度によるstress fiberへの影響を解明する。



無刺激での stress fiber

③ 交流電気刺激による ERK 活性化に骨格系 (actin fiber) が関与しているかどうかの検証

交流電気刺激の2時間前にactin重合阻害剤（Cytochalasin B）による処理を行う。その後、2時間は細胞に刺激を与えない状態に保ってインキュベーター内で静置する。至適な交流電気刺激を行って、ERKの活性化に対する阻害剤の影響を検証する。

④ 交流電気刺激による ATP 濃度変化の検証

交流電気刺激後で培養液中の、ATP濃度をATP Bioluminescence assay kitを用いて検証する。ATPが細胞内伝達に影響していればATPの受容体としてP2レセプター（purinergic receptor）の関与も考えられるため、阻害剤を使用して受容体の同定も進める。

(3) 間葉系幹細胞への交流電気刺激

① 間葉系幹細胞への刺激応答の検証

骨芽細胞で行ってきた、交流電気刺激を間葉系幹細胞に与え、同様にERK活性を評価し

細胞が交流電気刺激に対し応答しているかを検証する。ERK で細胞応答を検出できない場合は、他の MAPK (c-Jun N-terminal kinase や P38 kinase) で検出する。

② 交流電気刺激による間葉系幹細胞への骨芽細胞分化誘導効果の検証

ALP 活性や osteopontin 活性を指標に、交流電気刺激の分化誘導効果を検証する。

③ 応答メカニズムの検証

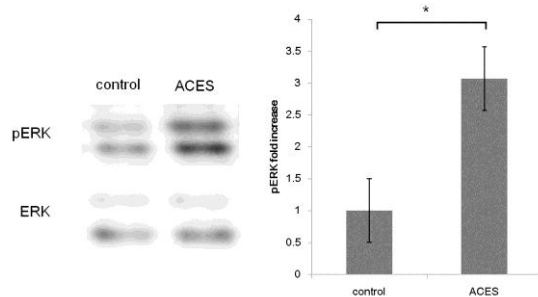
骨芽細胞と同様に細胞内 Ca 濃度や ATP 濃度を測定し、Ca, ATP の関与を検証する。Ca の応答に関しては阻害剤を用い、Ca チャネルの検証を行う。ATP の関与を検証できた場合、P2 レセプターの関与を骨芽細胞と同様に考え、受容体の同定も行う。

4. 研究成果

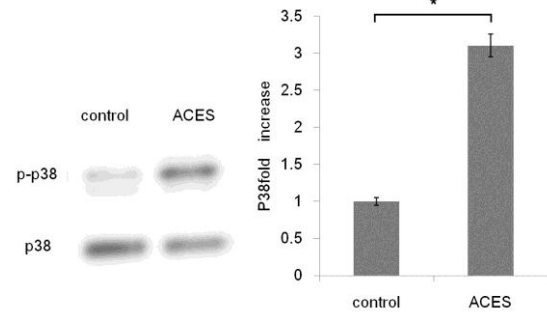
20 分間の ACES を MC3T3-E1 細胞に行った。ACES 群およびコントロール群において細胞の生存状態を比較するため、Mito Tracker RED CMXRos を用いて刺激後 1 日の細胞を染色した。ACES に対する細胞応答を検証するために、pERK と p-p38、および pJNK をウエスタンブロッティングで検出し、コントロール群の density を基準とし、定量化した。ERK のリン酸化抑制剤の U0126 および骨格系阻害剤の cytochalasin D を用い、ERK のリン酸化抑制実験を行った。

ACES を 20 分間行い、1 日経過した細胞において、ACES 群とコントロール群では、細胞の生存に変化を認めなかった。

pERK について、ACES 群はコントロール群に比べ増加した。定量化を行うと、ACES 群はコントロール群に対して 3.1 倍に増加し、統計学的有意差を認めた。

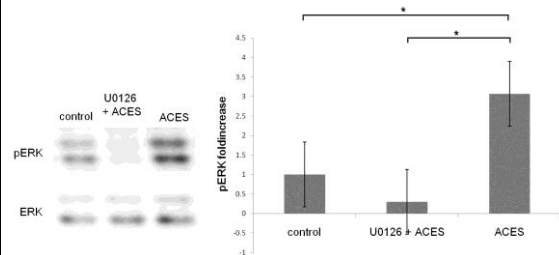


同様に p-p38 についても ACES 群はコントロール群に対して 3.1 倍に増加し、統計学的有意差を認めた。

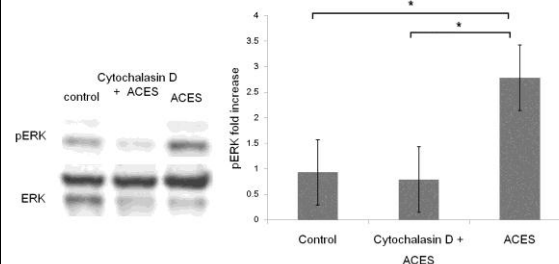


一方で、pJNK については、ACES 群とコントロール群の間で、有意差を認めなかった。

U0126 を用いた抑制実験では、コントロール群に比べ、ACES 群で pERK は増加したが、ACES 群に U0126 を加えると、pERK の増加は抑制された。定量化を行うと、ACES 群はコントロール群に対して 3.0 倍であったが、U0126 を加えた ACES 群は、コントロール群に対して 0.29 倍に減少した。コントロール群と ACES 群、および U0126 を加えた ACES 群と ACES 群との間で統計学的有意差を認めた。



cytochalasin D を用いた抑制実験では、コントロール群に比べ、ACES 群で pERK は増加したが、ACES 群に cytochalasin D を加えると、pERK の増加は抑制された。定量化を行うと、ACES 群はコントロール群に対して 2.7 倍であったが、cytochalasin D を加えた ACES 群は、コントロール群に対して 0.79 倍に減少した。コントロール群と ACES 群および cytochalasin D を加えた ACES 群と ACES 群との間で統計学的有意差を認めた。



この実験では、ACES に対する細胞応答を検証するために、20 分間の ACES を MC3T3-E1 細胞に行った。ACES 後 1 日の細胞で、ACES 群とコントロール群において、細胞の生存に変化を認めなかった。pERK と p-p38、および pJNK

のリン酸化をウエスタンブロッティングで検出し ACES 群とコントロール群を比較し、定量化した。さらに ERK のリン酸化阻害剤 U0126 および骨格系阻害剤 cytochalasin D を加え、pERK を検出した。ACES 群ではコントロール群と比べ、pERK および p-p38 の増加を認めたが pJNK の増加は認めなかった。U0126 および cytochalasin D によって ACES 群における pERK の増加は抑制された。

電気や超音波など物理療法を用いた補助療法が新鮮骨折や仮骨延長、および難治性の偽関節に対して行われてきた。しかしながら同じ骨癒合を促進する治療ではあるが、それぞれの病態はかなり異なる。異なる状況下で、至適な電気刺激条件を求めるためには、まず、in vitro で細胞応答を明らかにする必要がある。そこで、今回は骨芽細胞を用い、in vitro における電気刺激によって生じる細胞応答の解明を試みた。

今回われわれは、MC3T3-E1 細胞に ACES を行うため、すでに心筋細胞で電気刺激に用いられている実験系の刺激機器を応用して、新たな装置を考案した。設置した ACES 装置は臨床応用されているものを用い、ACES を加えた。われわれは ACES を臨床では、24 時間施行しているが、in vitro では短時間で反応を生じると考えた。実際、反応時間の短い MAPK を用い、20 分の ACES によって ERK のリン酸化を検出することができ、刺激時間は 20 分とした。交流刺激の特徴は、極性が変化するため、電極上での電気分解が回避できることである。実際に、ACES を行い 1 日経過しても、ACES 群とコントロール群において、細胞の生存に変化を認めなかった。この考案した刺激装置は、6 サンプルを同時に刺激が可能で、同条件での細胞の比較が可能であった。

MAPK は細胞の分化、増殖、およびアポトーシスを制御している。mechanical stress の研究において、MAPK の活性は、引き続いて生じる細胞応答のため重要な細胞内伝達経路の一つとして位置づけられている。また、MAPK は定量的に評価も行うことができ、刺激条件を変更したときの ACES の至適条件の解明に、有用な指標になると考えた。

今回、ACES により 3 種の MAPK のうち、pERK および p-p38 の増加を認めた。他の mechanical stress の研究では、cyclic stretch により periodontal ligament cell において pERK および pJNK の増加、oscillatory fluid flow により MG63 cell において、pERK および pJNK の増加を認め、同様の oscillatory fluid flow では MC3T3-E1 細胞において pERK および p-p38 の増加を認めたと報告されている。これらの結果からも、細胞種の違いの影響もあるが、mechanical stress が異なると、それぞれ固有の反応が存在する。われわれの結果は、同じ MC3T3-E1

細胞を使った You らの oscillatory fluid flow による反応と同様の結果であり、ACES が oscillatory fluid flow と同様の細胞内伝達経路および細胞応答を生じた可能性がある。また、Liu らは MG63 cell において、cyclic uniaxial compressive や tensile strain による ERK の活性化に骨格系などが関与していることを報告している。われわれの結果からも、cytochalasin D により ACES による pERK の増加は抑制されたため、ACES による ERK の活性化には骨格系の関与も考えられる。mechanical stress による細胞応答については、基質産生や細胞増殖、さらには細胞内伝達経路である MAPK、受容などについての報告がある。今後は、ACES の作用機序をより明確にするため、MAPK 以外の細胞内伝達経路にも注目する必要がある。

骨に荷重が加わると、骨組織の変形が生じ、細胞レベルでは shear forces が生じるだけでなく、細胞外液の液流と圧変化が生じ、その結果 strain および pressure が細胞に直接加わると考えられている。細胞形態の変化によって、凹側にマイナス、凸側にプラス電気の膜電位が細胞体に生じ、さらに細胞外液流の変化により生じた流動電流 (streaming potential) によって周囲からも電気刺激が生じ、electrical fields が細胞内外から作用すると考えられる。われわれは、ACES を骨芽細胞に加え、細胞応答が増幅されたことを細胞内伝達経路の MAPK で定量的に検出し、ACES の作用機序の一部を明らかにした。今後、mechanical stress の研究を応用し、in vitro における様々な状況下での電気刺激による MAPK の反応を評価することが、基礎的な電気刺激の至適刺激条件を解明への手法のひとつとなるだろう。

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 2 件)

① 金 郁喆, 吉田隆司, 山田尚武, 西田敦士, 河本浩栄, 平島淑子, 久保俊一, 生体交流電気刺激の基礎と臨床, 日生体電気物理刺激研究会誌, 査読有, 25 巻, 2011, 1-11

<http://search.jamas.or.jp/index.php>

② 西田敦士, 金 郁喆, 吉田隆司, 岡 佳伸, 山田尚武, 日下部虎夫, 久保俊一, 仮骨成熟評価における脛骨単位抵抗値の測定, 日創外固定骨延長会誌, 査読有, 23 巻, 2012, 99-103

<http://search.jamas.or.jp/index.php>

[学会発表] (計 6 件)

① 山田尚武, 金 郁喆, 奥村 弥, 吉田隆司, 岡 佳伸, 西田敦士, 張 京, 松田賢一, 河

田光博, 久保俊一, 交流電気刺激による骨芽細胞の応答メカニズムの解明, 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010. 10. 14. -15, 京都

②西田敦士, 金 郁喆, 吉田隆司, 岡 佳伸, 山田尚武, 久保俊一, 仮骨成熟評価における脛骨単位インピーダンス値の測定, 第 24 回日本創外固定・骨延長学会, 2011. 2. 12, 札幌

③吉田隆司, 金 郁喆, 細川元男, 山田尚武, 塚田 誠, 西田敦士, 張 京, 久保俊一, 創外固定器で治療した長管骨の骨成熟過程におけるインピーダンス値と単位抵抗値の検討, 2011. 2. 12, 札幌

④金 郁喆, 吉田隆司, 山田尚武, 西田敦士, 河本浩栄, 平島淑子, 久保俊一, 生体交流電気刺激の基礎と臨床, 第 38 回日本生体電気・物理刺激研究会 (特別講演), 2011. 3. 5, 文京区

⑤金 郁喆, 生体電気刺激の歴史と生体電気物理刺激の現況, 第 85 回日本整形外科学会学術総会 (シンポジウム), 2012. 5. 18, 京都

⑥吉田隆司, 金 郁喆, 細川元男, 山田尚武, 中瀬雅司, 西田敦士, 横関弘一, 久保俊一, 交流電気刺激—骨形成促進効果とインピーダンス値の応用—, 第 40 回日本生体電気・物理刺激研究会 (シンポジウム), 2013. 3. 9, 京都

[図書] (計 1 件)

①金 郁喆, 吉田隆司, 山田尚武, 金芳堂, 生体電気・物理刺激による骨・軟部組織修復法, 2013, 299 (86-89)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 郁ちよる (Kim Wook-Cheol)
京都府立医科大学大学院医学研究科
運動器機能再生外科学
(整形外科学教室)・准教授
研究者番号: 50244603