

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560205

研究課題名(和文) エピジェネティクスを介した超音波による細胞の分化制御

研究課題名(英文) Control of cell differentiation by ultrasound through epigenetic mechanisms

研究代表者

田淵 圭章 (TABUCHI, YOSHIAKI)

富山大学・研究推進機構 研究推進総合支援センター・教授

研究者番号：20322109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞と骨芽細胞が共存する魚類のウロコに対する低強度パルス超音波(LIPUS; 30 mW/cm², 20分)の照射により、破骨細胞活性化の重要な分子であるRANKL, MMP-9やカテプシンKのmRNA発現レベルが有意に上昇することが明らかとなった。また、1日1回2週間LIPUS照射したサンプルでは、骨芽細胞の酵素活性やウロコの再生比率が有意に上昇した。他方、マウス前骨芽前駆細胞において、LIPUS照射細胞では、トリメチルヒストンH3(Lys9)のタンパク質発現レベルが有意に上昇した。得られた結果は、骨関連の細胞におけるLIPUSの作用メカニズムを理解するための分子基盤になる。

研究成果の概要(英文)：Using fish scales in which osteoclasts and osteoblasts coexist, we identified that mRNA expression levels of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and cathepsin K, important molecules of osteoclast activation, were significantly increased with a single low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS; 30 mW/cm², 20 min) treatment. Moreover, 2 weeks after daily LIPUS exposure, either the osteoblastic marker enzyme activity or the regeneration rate of the scales was significantly increased in LIPUS-treated groups. In mouse preosteoblast MC3T3-E1 cells, the protein expression level of trimethyl histone H3 (Lys9) was significantly elevated in the cells treated with a single LIPUS exposure. These findings will provide a molecular basis for further understanding of the mechanisms of LIPUS in bone cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：超音波

1. 研究開始当初の背景

(1) 医療分野で幅広く利用されている超音波は、ヒトに対する安全な使用法が確立されている。一方で、低出力パルス超音波 (LIPUS) は長年骨折治療に利用されているが、その作用の分子メカニズムは不明な点が多い。

(2) DNA の塩基配列によらないエピジェネティック制御は、生体の様々な現象に必須であり、疾患との関連にも注目されている。以前、我々は LIPUS が骨の分化に関連する遺伝子群の発現を上昇させることを骨芽細胞モデルで明らかにした (Tabuchiら Int J Mol Sci, 14, 22721-, 2013)。以上より、「LIPUS がエピジェネティクスを介して細胞の分化を制御している」と考えた。

2. 研究の目的

本研究では LIPUS がエピジェネティクスを介して細胞の分化を制御しているか否かを、骨芽細胞、間葉系幹細胞と骨形成・再生の有用な魚類のウロコ (破骨細胞と骨芽細胞が共存) を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた実験 マウス骨芽細胞 MC3T3-E1, MC3T3-E1 clone 4, ヒト骨芽細胞 MG63, マウス骨髄間質細胞 ST2, ヒト繊維芽細胞 Hs68, OUMS-36 を用いた。

(2) マウス頭頂骨を用いた実験 幼若マウスの左右頭頂骨の矢状縫合部に持続的伸展刺激を負荷し (0.2 g), 3 と 6 時間後に解析を行った。

(3) 魚類を用いた実験 金魚を実験に供した。また、ゼブラフィッシュまたは金魚からウロコを取り、実験に用いた。

(4) LIPUS の照射 LIPUS 照射装置セーフス 4000J (シングルプローブ: 帝人ファーマ社), 研究用 LIPUS 照射装置 (6 プローブ: 帝人ファーマ社) を用いた。LIPUS (30 mW/cm²) を 20 分間照射 (1 日 1 回) し、一定時間後に種々の解析を行った。

(5) 網羅的遺伝子発現解析 トータル RNA を用いて、アフィメトリクス社のジーンチップシステムにより、発現する遺伝子を網羅的に検出した。得られたデータは、バイオインフォマティクスに関連するソフトウェアを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 各種培養細胞に対する LIPUS の効果の検討 細胞を 6 穴プレートで培養し、プレート下面から脱気水を挟んで LIPUS を照射した。LIPUS 照射の様子を図 1 に示す。マウス骨芽細胞 MC3T3-E1, MC3T3-E1 clone 4, ヒト骨芽細胞 MG63, マウス骨髄間質細胞

ST2, ヒト繊維芽細胞 Hs68, OUMS-36 の ERK (extra-cellular-signal regulated kinase) に対して LIPUS は活性化 (ERK のリン酸化) させる傾向を示した。Hs68 と OUMS-36 細胞の細胞増殖に対して LIPUS は増殖を促進させる作用を示し、これは培地中に含まれるウシ胎児血清の濃度が低い時に観察された。また、マウス前骨芽前駆細胞において、LIPUS 照射細胞では、トリメチルヒストン H3 (Lys9) のタンパク質発現レベルが有意に上昇した。LIPUS の効果にエピジェネティクスが関与する可能性がある。



図 1 細胞への LIPUS の照射。

(2) マウス頭頂骨において持続的伸展刺激によって誘導される遺伝子の同定 マウス頭頂骨に持続的伸展刺激 (0.2 g) を 3 または 6 時間負荷し、発現変動する遺伝子を網羅的に観察した。数多くの遺伝子の発現が変動することが示され、その中で BMP4 (bone morphogenetic protein 4) や CCN1 (cysteine rich protein 61) を含む 15 遺伝子の発現が進展刺激により上昇することを定量的リアルタイム PCR 法で確認した。

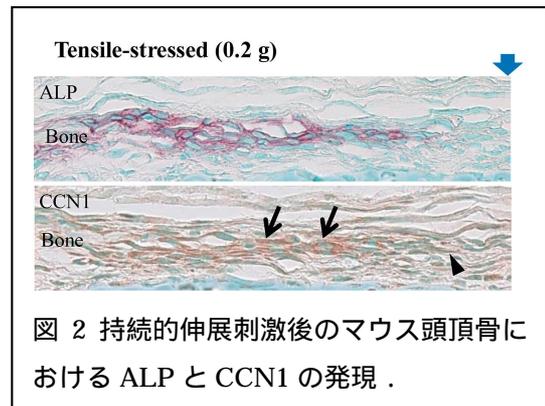


図 2 持続的伸展刺激後のマウス頭頂骨における ALP と CCN1 の発現。

また、CCN1 タンパク質が進展刺激により発現が増加することを免疫組織化学法で明らかにした。特に、このタンパク質は、ALP (alkaline phosphatase) 陽性の骨芽前駆細胞で発現レベルが高かった (図 2) (雑誌論文)。

(3) 魚類のウロコにおいて LIPUS は破骨細胞にアポトーシスを誘導する ゼブラフィッ

シュのウロコにおいて、単回 LIPUS 照射の 3 時間後に破骨細胞のマーカー酵素 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) と CTSK (cathepsin K) の mRNA レベルが有意に低下した (図 3)。一方、同じ時点で、骨芽細胞のマーカータンパク質 OCN (osteocalcin) や DLX5 (distal-less homeobox 5) の mRNA レベルは有意に増加した。

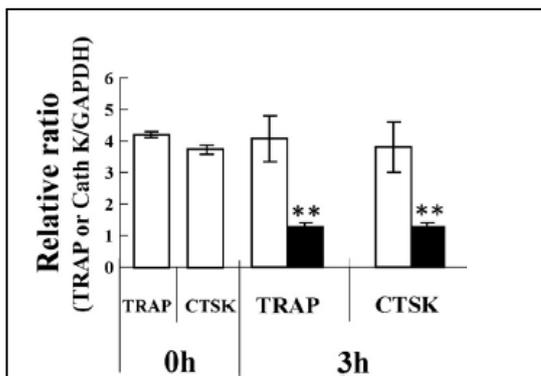


図 3 ゼブラフィッシュのウロコの遺伝子発現に対する LIPUS の作用。□: コントロール; ■: LIPUS 照射群。

次に、ゼブラフィッシュのウロコを用いて LIPUS に応答する遺伝子を網羅的に調べた結果、数多くの細胞死に関連する遺伝子の発現レベルが上昇することが判った。それらの中で、TNFRSF10A (TNF receptor superfamily member 10a) と PMAIP1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) の LIPUS による遺伝子発現の上昇は、定量的リアルタイム PCR 法で確認することができた。また、金魚のウロコに LIPUS を照射しその 3 時間後には、対照群に比べて有意に破骨細胞のアポトーシスが增加することをマーカー酵素 TRAP と DNA 断片化を検出する TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法を用いて明らかにした (図 4) (雑誌論文)。

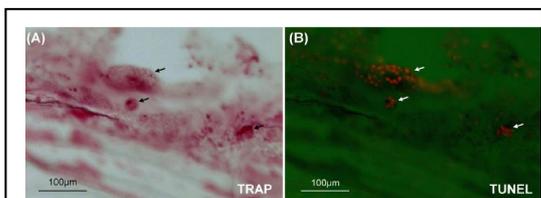


図 4 LIPUS を照射した金魚のウロコの破骨細胞におけるアポトーシスの検出。

(4)金魚のウロコの破骨細胞に対する LIPUS の効果 破骨細胞の活性化には RANK (receptor activator of NF-κB), そのリガンドである RANKL とそれらの結合を阻害する可溶性デコイ受容体である OPG

(osteoprotegerin) が関連するシグナル伝達系が重要である (図 5) LIPUS は金魚のウロコの RANK の発現には影響を与えなかったが、RANKL の発現は照射後 6 と 12 時間後に有意に増加した。一方、OPG の発現は LIPUS 暴露 6 時間後のみ発現レベルが一過性に上昇した。

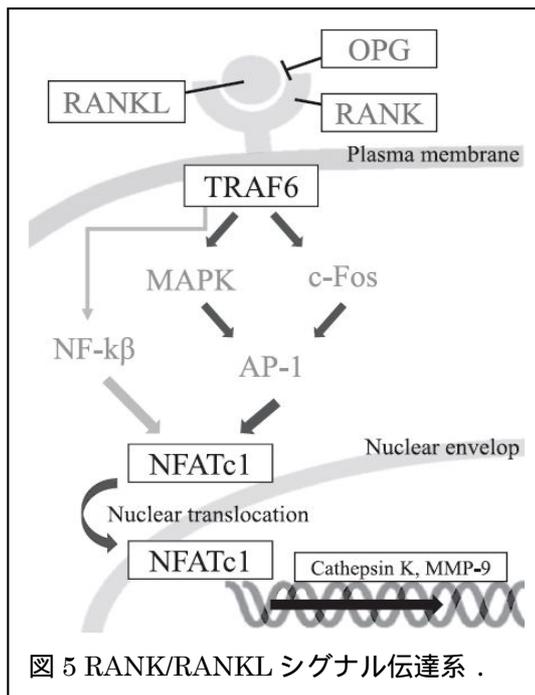


図 5 RANK/RANKL シグナル伝達系。

RANK の下流の分子である TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) と NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells 1) の mRNA 発現レベルは LIPUS 照射の 6 時間後に有意に上昇し、さらにその下流の酵素 CTSK と MMP9 (matrix metalloproteinase 9) は照射の 6 と 12 時間後に有意に上昇した。LIPUS の単回照射後、初期の段階で破骨細胞が活性化されることが示された。

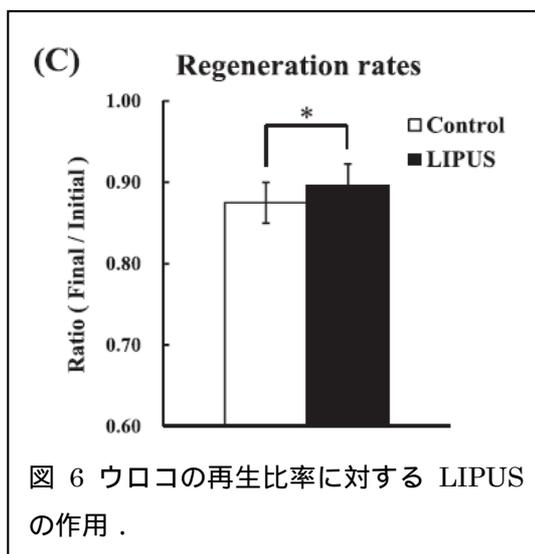


図 6 ウロコの再生比率に対する LIPUS の作用。

また、金魚の個体に 1 日 1 回 2 週間 LIPUS を連続照射したウロコのサンプルでは、破骨細胞の TRAP 活性は LIPUS により影響を受

けなかったが、骨芽細胞の ALP 酵素活性やウロコの再生比率が有意に上昇した(図 6)。LIPUS は破骨細胞と骨芽細胞を活性化し、骨の形成を促進すると考えられる(雑誌論文)。

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 3 件)

Hanmoto T, Tabuchi Y, Ikegame M, Kondo T, Kitamura KI, Endo M, Kobayashi I, Mishima H, Sekiguchi T, Urata M, Seki A, Yano S, Hattori A, Suzuki N. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts: Analysis with goldfish scales as a model of bone. Biomed Res. 2017, Vol. 38, No. 1, pp. 71-77. (査読有) doi: 10.2220/biomedres.38.71.

Suzuki N, Hanmoto T, Yano S, Furusawa Y, Ikegame M, Tabuchi Y, Kondo T, Kitamura K, Endo M, Yamamoto T, Sekiguchi T, Urata M, Mikuni-Takagaki Y, Hattori A. Low-intensity pulsed ultrasound induces apoptosis in osteoclasts: Fish scales are a suitable model for the analysis of bone metabolism by ultrasound. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2016, Vol. 195, pp. 26-31. (査読有)

doi: 10.1016/j.cbpa.2016.01.022.

Ikegame M, Tabuchi Y, Furusawa Y, Kawai M, Hattori A, Kondo T, Yamamoto T. Tensile stress stimulates the expression of osteogenic cytokines/growth factors and matricellular proteins in the mouse cranial suture at the site of osteoblast differentiation. Biomed Res. 2016, Vol. 37, No. 2, pp. 117-126. (査読有) doi: 10.2220/biomedres.37.117.

[学会発表](計 6 件)

Hanmoto T, Tabuchi Y, Ikegame M, Kondo T, Kitamura K, Endo M, Mishima H, Sekiguchi T, Urata M, Seki A, Yano S, Hattori A, Suzuki N. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts: Analysis with goldfish scales as a model of bone. The Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016, 11, 14-19, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)。

田淵圭章, 鈴木信雄, 近藤 隆。マウス

前骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 における低出力パルス超音波に応答する遺伝子のネットワーク解析。2016 年度第 25 回ソノケミストリー討論会, 2016, 10, 21-22, 富山大学黒田講堂(富山県・富山市)。

池亀美華, 田淵圭章, 河井まりこ, 山本敏男。機械的伸展刺激による組織内での骨芽細胞分化促進への CCN1/Cyr61 の関与。第 8 回日本 CCN ファミリー研究会, 2016, 8, 27, 岡山大学医学部基礎研究棟(岡山県・岡山市)。

鈴木信雄, 半本泰三, 池亀美華, 古澤之裕, 田淵圭章, 近藤 隆, 北村敬一郎, 関口俊男, 高垣裕子, 服部淳彦。低出力超音波パルスの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用: 魚のウロコを用いた解析。第 19 回 超音波骨折治療研究会, 2016, 1, 23, 品川インターシティホール(東京都・東京)。

半本泰三, 田淵圭章, 近藤 隆, 北村敬一郎, 関口俊男, 高垣裕子, 服部淳彦, 鈴木信雄。低出力超音波パルスの破骨細胞に対する作用。平成 27 年度動物学会中部支部大会, 2015, 11, 28-29, 三重大学総合研究棟メディアホール(三重県・津市)。

田淵圭章, 鈴木信雄, 近藤 隆。MC3T3-E1 前骨芽細胞様細胞における低出力パルス超音波の遺伝子応答。第 14 回超音波治療研究会, 2015, 11, 28, 高知市文化プラザかるぽーと(高知県・高知市)。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等: 富山大学・研究推進機構・研究推進支援センター・生命科学先端研究ユニット

<http://www.lsrc.u-toyama.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田淵 圭章(TABUCHI, Yoshiaki)

富山大学・研究推進機構・研究推進総合支援センター・教授

研究者番号: 20322109

(2)研究分担者

近藤 隆(KONDO, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 40143937

鈴木 信雄 (SUZUKI, Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・
教授
研究者番号：60242476

池亀 美華 (IKEGAME, Mika)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70282986

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし