

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06646

研究課題名(和文)LIPUSによって再生された骨の骨質に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文)The effects of the bone quality on bones regenerated by LIPUS

研究代表者

間中 総一郎(MANAKA, Soichiro)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：00754954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスとして用いた低出力超音波(Low-intensity pulsed ultrasound)刺激を骨芽細胞に与え、LIPUS刺激が骨芽細胞の骨形成におけるコラーゲン代謝に及ぼす影響を細胞生物学的・分子生物学的に解明する事を目的とした。

結果、LIPUS刺激によりI型コラーゲンの発現増加と、MMP-1、3および13の発現減少を認めた。しかし、MMP-2とTIMPsに影響を及ぼさなかった。以上より、LIPUS刺激は骨芽細胞のATP-P2X7受容体を介してコラーゲン代謝を合成に傾ける事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, when osteoblasts were given low-intensity pulsed ultrasound stimulation used as a mechanical stress, we aimed to clarify the effect of LIPUS stimulation on collagen metabolism in osteoblastic bone formation from cell biology and molecular biology.

Our results demonstrated that LIPUS induced the gene and protein expression of type I collagen, whereas it reduced MMP-1, 3 and 13. In addition, LIPUS didn't affect the both expression of MMP-2 and TIMPs. These results suggest that LIPUS promotes osteogenesis through the ATP-P2X7 receptors in osteoblasts during collagen synthesis.

研究分野：歯周病学

キーワード：低出力超音波(LIPUS) 骨質 コラーゲン(collagen) MMP TIMP

1. 研究開始当初の背景

(1) 低出力超音波 (Low-intensity pulsed ultrasound; LIPUS) は超音波出力が $100\text{mW}/\text{cm}^2$ 未満のものを示しており、非侵襲的に骨組織の治癒を促進させるということが知られています。実際には、この LIPUS を使用した骨折の臨床治療法においては、保険適応治療として臨床応用されています。さらに、最近では 3D プリンターを用いて作成したギプスに LIPUS 自体を組み込み、毎日 20-30 分間の LIPUS 刺激を適応する事で、骨折の治癒を促進させる製品も開発されています。LIPUS の詳細な作用機序などは不明な点が多い事が現状ですが、音響放射力や音響直進力のような直接的かつ間接的効果による機械的刺激が主に作用していると考えられています。

(2) 私達の研究グループでは、*in vitro* において、骨芽細胞への LIPUS 刺激は骨形成関連転写因子 (Runx2 や Dlx5 など) の遺伝子およびタンパクの発現上昇を介して、骨形成が促進される事を報告しています (Ikeda et al., *Life Sci* 2006, Takayama et al., *Life Sci* 2007)。さらに、間中は、継続的な LIPUS 刺激が、骨芽細胞による細胞外 ATP 産生を促進し、P2X7 receptor の活性化を介して、骨芽細胞の分化および骨形成を促進させる事を明らかにしています (Manaka et al., *FEBS letter* 2015)。

(3) ヒトの骨組織には、カルシウムとコラーゲンがそれぞれ乾燥重量で約 50%程度が含有されています。特に、骨コラーゲンは骨強度と骨質に影響を及ぼしている重要な分子であり、骨粗鬆症などの全身疾患とも深く関連しています。骨のコラーゲン分子は細胞外に分泌された後、コラーゲン架橋 (善玉架橋 = 成熟架橋) と呼ばれる構造が形成され、コラーゲン線維の強度発現に作用しています。また、AGEs (advanced glycation endproducts; 糖化最終産物) は、タンパク質が糖化反応した成果物の総称であり、骨のコラーゲン分子の AGE 化は無秩序な架橋 (悪玉架橋 = 老化架橋) を形成させ、骨のしなやかさが失われ、骨強度を低下させる事を報告しています (Saito, *CLINICIAN* 2006)。しかしながら、継続的な LIPUS 刺激によって形成された骨における骨基質中のコラーゲンの AGE 化との関連性を示した報告は見つからず、詳細なメカニズムは未だ明らかにされていません。

(4) そこで、本研究においては、LIPUS 刺激が骨芽細胞の骨形成におけるコラーゲン代謝およびコラーゲン分子の架橋構造に及ぼす影響を細胞生物学的および分子生物学的に解明する事を目的として、本研究を企図しました。

2. 研究の目的

低出力超音波 (LIPUS) は、医科および歯科領域において骨誘導などに用いられているメカニカルストレス (mechanical stress) の一種です。また、骨強度は骨密度と骨質によって決定され、特に、骨組織に含まれるコラーゲン分子が強度因子である骨質に重要な役割を果たすと言われていています。この骨コラーゲンの架橋構造が生理的、あるいは非生理的に作用する事で、骨質の強度は作用しています。その一方では、LIPUS は非侵襲的に骨形成を促進させます。しかしながら、メカニカルストレスとして LIPUS を使用し、骨芽細胞への LIPUS 刺激で誘導された骨形成が、コラーゲンの架橋構造に及ぼす影響についての詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていません。そこで、間中は、*in vitro* において、骨芽細胞の骨形成におけるコラーゲン代謝およびコラーゲン分子の架橋構造に及ぼす LIPUS 刺激の影響を細胞生物学的および分子生物学的に検討し、それらを制御する pathway についても解明する事を目的とし、本研究を企図しました。

3. 研究の方法

骨芽細胞にはマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) または、マウス頭蓋冠より分離・培養した骨芽細胞を使用しました。骨芽細胞を 6 穴プレート内へ 1.0×10^4 cells/well になる様に播種後に、低出力超音波装置として OSTEOTRON D² (伊藤超短波株式会社製) を使用して、1 日 30 分間の LIPUS 刺激 (発振周波数 3.0MHz および超音波出力 $30\text{mW}/\text{cm}^2$) を継続的に (3、7 および 14 日間) 付与し、刺激後の骨芽細胞および培養上清をそれぞれ回収し、コラーゲンおよびコラーゲン代謝に関連する因子 (マトリックスメタロプロテアーゼ【matrix metalloproteinase; MMP-1、2、3 および 13】、マトロプロテアーゼ組織インヒビター【tissue inhibitor of metalloproteinase; TIMP-1 および 2】) を、遺伝子発現は real-time PCR 法で、タンパク発現は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法または Western blotting 法で確認しました。また、コラーゲンの架橋構造に及ぼす影響については、コラーゲン中の AGEs 量を定量する事によって評価しました。さらに、LIPUS によって増加するコラーゲン発現の制御機構を分子生物学的および細胞生物学的に検討しました。そして、その制御機構を解析するために、ATP 関連受容体である P2X7 receptor の選択的アンタゴニスト (A438079) および shRNA で作成した P2X7 receptor のノックダウン細胞 (shP2X7r) を使用して、それぞれの MMPs および TIMPs の遺伝子およびタンパクの両発現についての pathway の解析も行いました。

4. 研究成果

(1) P2X7 receptor の選択的アンタゴニスト (A438079) を用いた際の MMP-1、3 および 13 の遺伝子およびタンパク発現

まず、real-time PCR 法による MMPs の遺伝子発現を示します。MMP-1 および 3 では培養 3 日と 7 日目で、MMP-13 では培養 7 日と 14 日目で、LIPUS 刺激群は control 群と比較してそれらの発現を有意に減少させました。その一方で、A438079 と LIPUS 刺激併用群では、LIPUS 刺激群と比較してそれらの発現を有意に増加させました。

次に、ELISA 法による MMPs のタンパク発現を示します。尚、タンパク発現は影響が認められた MMP-1、3 および 13 について検討しました。その結果、遺伝子発現と同様に、タンパク発現でも LIPUS 刺激群は control 群と比較してそれらの発現を有意に減少させました。その一方で、A438079 と LIPUS 刺激併用群では LIPUS 刺激群と比較してそれらの発現を有意に増加させました。

(2) P2X7 receptor の選択的アンタゴニスト (A438079) を用いた際の MMP-2 および TIMP-1、2 の遺伝子発現

real-time PCR 法による MMP-2 および TIMP-1、2 の遺伝子発現を示します。LIPUS 刺激は MMP-2 および TIMP-1、2 の遺伝子発現には影響を及ぼしませんでした。そのため、タンパク発現については検討しませんでした。

(3) shRNA で作成した P2X7 receptor のノックダウン細胞 (shP2X7r) を用いた際の MMP-1、3 および 13 の遺伝子およびタンパク発現

更に、sh RNA を用いて sh P2X7r をトランスフェクションし、P2X7 受容体ノックダウン細胞 (shP2X7r) を作成し、同様に、LIPUS 刺激が MMP-1、3 および 13 の遺伝子発現に対する P2X7 受容体に及ぼす影響を検討しました。尚、コントロール細胞 (sh control) は刺激の影響を受けないランダムな塩基配列をトランスフェクションし、作成しました。その結果、P2X7 receptor の選択的アンタゴニスト (A438079) を加えたものと同様に、LIPUS 刺激群は sh control 群と比較して、MMP-1、3 および 13 の発現を有意に減少させました。その一方で、P2X7 受容体ノックダウン細胞 (shP2X7r) と LIPUS 刺激併用群では、コントロール細胞 (sh control) と LIPUS 刺激併用群と比較してそれらの発現を増加させました。

次に、ELISA 法による MMPs のタンパク発現を示します。尚、タンパク発現は影響が認められた MMP-1、3 および 13 について検討しました。その結果、遺伝子発現と同様に、タンパク発現でも LIPUS 刺激群は sh control 群と比較してそれらの発現を有意に減少させました。その一方で、P2X7 受容体

ノックダウン細胞 (shP2X7r) と LIPUS 刺激併用群では、コントロール細胞 (sh control) と LIPUS 刺激併用群と比較してそれらの発現を増加させました。

(4) shRNA で作成した P2X7 receptor のノックダウン細胞 (shP2X7r) を用いた際の MMP-2 および TIMP-1、2 の遺伝子発現

real-time PCR 法による MMP-2 および TIMP-1、2 の遺伝子発現を示します。LIPUS 刺激は MMP-2 および TIMP-1 の遺伝子発現には影響を及ぼしませんでした。その一方で、TIMP-2 では培養 7 日目で、LIPUS 刺激群は sh control 群と比較して遺伝子発現を有意に増加させました。

(5) 結論および考察

継続的な LIPUS 刺激は P2X7 受容体を介して、MMP-1、3 および 13 の遺伝子およびタンパク発現を有意に減少させた事を示唆しました。しかし、LIPUS 刺激は MMP-2 の遺伝子発現には影響を及ぼしませんでした。以上の事から、LIPUS 刺激は骨芽細胞の ATP-P2X7 受容体を介してコラーゲン代謝合成に傾ける事が示唆されました。

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 4 件)

Soichiro Manaka, P2X7 receptor mediates collagen synthesis induced by LIPUS. 102th Anniversary Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, 2016/09/13, San Diego (USA)

間中総一郎、LIPUS 刺激は骨芽細胞の ATP-P2X7 受容体を介してコラーゲン代謝を促進する、第 25 回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2016/08/20、日本大学歯学部 1 号館大講堂 (東京都・千代田区)

間中総一郎、低出力超音波刺激は P2X7 受容体を介して骨芽細胞のコラーゲン代謝を促進する、第 59 回春季日本歯周病学会学術大会、2016/05/21、かごしま県民交流センター・宝山ホール (鹿児島文化

センター) (鹿児島県・鹿児島市)

Soichiro Manaka, Low-intensity pulsed ultrasound promotes osteogenesis through the P2X7 receptor in osteoblasts during collagen synthesis. 45th Annual Meeting & Exhibition of the American Association for Dental Research, 2016/03/18, Los Angeles (USA)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間中 総一郎 (MANAKA, Soichiro)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：00754954

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()