

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592293

研究課題名（和文） 遺伝子反応からみた口腔内磁場刺激の安全性

研究課題名（英文） Evaluation of Magnetic Stimulation on Oral Tissue by Genomic Response

研究代表者

田中 貴信 (TANAKA YOSHINOBU)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：60014271

研究成果の概要（和文）：磁場の生体に対する効果のメカニズムを探る目的で、マウス骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞と、線維芽細胞株である L929 細胞に、超低周波強磁場 0.4T、0.17Hz を曝露させた。その結果、MC3T3-E1 細胞は曝磁により、培養初期で増殖を刺激し、分化を促進するが、L929 細胞の曝磁による細胞増殖能への影響は低いことから、磁場刺激は骨形成の特異的反応に関与している可能性が認められた。またマイクロアレイによる遺伝子解析により、曝磁により変動する遺伝子群を抽出した。

研究成果の概要（英文）：This experimental study describes extremely low magnetic fields (ELMF) of 0.4T and 0.17Hz stimulated mouse osteoblast-like cell proliferation at early stage, and differentiation to mature osteoblasts, whereas fibroblasts did not show significant differences in proliferation by the exposure. These results suggested that osteoblasts have specific response on the magnetic fields, and then bone formation could be accelerated through stimulated osteoblasts by ELMF. Microarray gene analysis revealed that ELMF stimulated genes expressions were extracted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
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：補綴系歯学

キーワード：変動磁場、骨芽細胞、遺伝子発現、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

磁性アタッチメントは歯根に優しい支台装置として、一般開業医にも広く受け入れられている。使用される磁石は口腔内に設置されるキーパーと閉磁場になるように設計され、漏洩磁場による影響は少ないとされている。しかし近年、僅かな磁場でも免疫系に影響があるという報告もある。一方、変動磁場

は治療に積極的に用いられ、骨折の治療促進効果も立証されている。

これまでの我々の研究により、骨芽細胞培養系において、静磁場が骨形成を促進することが示されている。そのメカニズムは、磁場により細胞の増殖と分化に変化が起きることは様々な形で示されているが、具体的にどれ位の強さの磁場が細胞のどの部分に変化

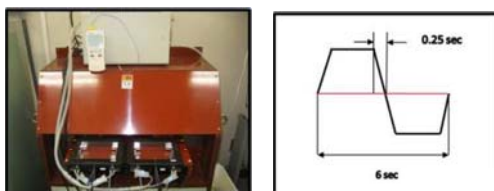
を与えるのかは未だ不明である。磁場による細胞膜電位の変化は捉えられているが、細胞全体としての変化までは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞培養系において磁場刺激による遺伝子の変化を、マイクロアレイの手法を使って調べる。磁場により起こりうる細胞の変化を、複数の遺伝子変動の結果としてとらえ、バイオインフォマティクスの手法により、細胞がどのような反応を示すのかを明らかにする。また、骨形成を担う骨芽細胞がなぜ磁場に対して促進的な変化をするのか、線維芽細胞との比較を行い、その磁場刺激に対する特性を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス骨芽細胞株である **MC3T3-E1** 細胞と、マウス線維芽細胞株である **I929** 細胞を使用した。これらの細胞を **12well-plate** に **1well** あたり 1×10^4 個となるよう播種し、**37度**、**5% CO₂** インキュベータ内で培養した。今回使用した変動磁界発生装置は、最大 **1テスラ** の磁場を **12cm** 四方の範囲に均一に発生することができ、**0~1 Hz** の周波数で変動磁界の設定が可能である。この装置を使用し、セミコンプレメントになった状態の各試料に、超低周波強磁場 **0.4T**、**0.17Hz** を **6時間** 曝露させた。



磁界発生装置とインキュベータ，台形波形。

曝磁後 **1日目**、**3日目**、**7日目**、**10日目** の **MC3T3-E1** 細胞および **I929** 細胞の細胞増殖活性を比色分析した。また、曝磁後 **3日目**、**7日目**、**10日目** の **MC3T3-E1** 細胞における骨芽細胞への分化を、アルカリフォスファターゼ (**ALP**) 活性により測定した。タンパクの定量は **Bradford** 法で行い、比色法にて測定後に総タンパク量を定量し、アルカリフォスファターゼ活性は総タンパク量で標準化した。

統計方法は **student** の **t** 検定を用い、有意水準は **5%** とした。

今回使用したマイクロアレイは、アフィメトリクス社製の **GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array** を用いた。この一枚のアレイにマウスで発現される三万個余りの遺伝子の転写産物の解析が可能である。実験には、曝磁刺激直後の対照群および曝磁群の **MC3T3-E1** 細胞から、トータル **RNA** を抽出した。次に、抽出した **RNA** サンプルの増幅及びラベリングを行い、サンプルの純度をバイオアナライザ

ーで確認した後、**45°C**、**60rpm** **16時間** ハイブリダイゼーションを行った。その後アレイの洗浄、染色を行い、スキャンを行った後、解析ソフトウェア **R 2.12.0** を用いて解析した。統計解析では、曝磁群と対照群においての遺伝子発現量について、**Student** の **t-test** を行い、統計的な有意差がある遺伝子を抽出した。また **Gene Ontology** 解析は、マイクロアレイで抽出された変動遺伝子群の遺伝子の特性や、その作用によって引き起こされる生命現象などを、カテゴリーごとに分類し、「分子機能」 **molecular function**、「生物学的機能」 **biological process**、「細胞内構成要素」 **cellular component** の3つのオントロジーに分類した。

4. 研究成果

MC3T3-E1 細胞の細胞増殖活性は、曝磁後 **3日目** で促進され、**1日目**、**7日目**、**10日目** では対照群と曝磁群との間に差は認められなかった。**I929** 細胞では、**1日目**、**3日目**、**7日目**、**10日目** のいずれに対しても対照群と曝磁群の間に差は認められなかった。

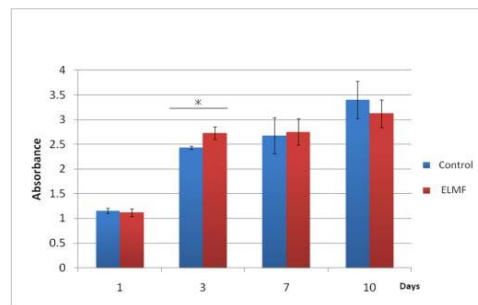


Fig. 2 MC3T3-E1 proliferation

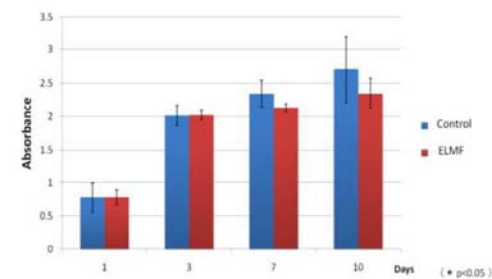


Fig. 4 I929 proliferation

また、**MC3T3-E1** 細胞の **ALP** 活性は **7日目** および **10日目** で、非曝磁群に対し有意に促進された。よって **MC3T3-E1** 細胞は曝磁により、培養初期で増殖を刺激し、分化を促進していることが示唆され、一方 **I929** 細胞の曝磁による細胞増殖能への影響は低いことが示唆された。

マイクロアレイ解析の結果、**MC3T3-E1** 細胞の曝磁の有無により、3万個余の遺伝子の中で、曝磁により **2倍以上** の変化があった遺伝

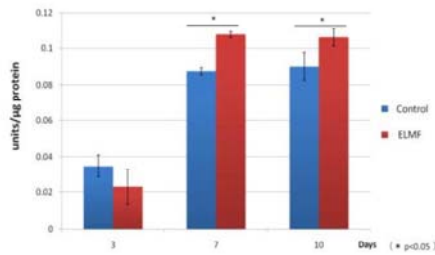
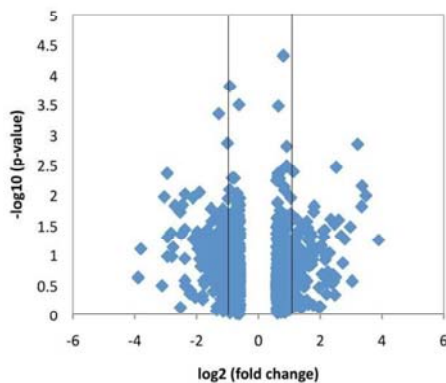


Fig. 3 MC3T3-E1 ALP activities

子は 682 個抽出できた。3 回のアレイ実験により、共に **positive** と判断された遺伝子は 167 個となった。一方、発現量が 1/2 以下になった遺伝子は 748 個で、3 回の実験で再現性の見られたものは 254 個であった。

ボルケイノプロット



Gene Ontology 解析の結果、Z score がゼロより大きく、P value が 0.05 より小さい条件を満たしたカテゴリー数は 206 個あり、このうち生物学的プロセスが 74% を占め、分子機能は 23%、細胞内構成要素は 3% であった。Z score とは該当遺伝子数が期待値からどれだけ外れているかを示した値である。Z score が大きいカテゴリーでは、有意な機能であるといえる。以下に、磁場刺激により有意に発現が促進された遺伝子群を示す。

Term	Z score	P-value
secretin receptor activity	25.438	0.00308
dolichol-phosphate-mannose synthase complex	18.153	0.00452
mannosyltransferase complex	18.153	0.00452
dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase activity	17.959	0.00461
cadmium ion transmembrane transport	17.922	0.00463
cadmium ion transport	17.922	0.00463
calcium ion import	17.922	0.00463
circadian temperature homeostasis	17.922	0.00463
detoxification of cadmium ion	17.922	0.00463
negative regulation of calcium ion import	17.922	0.00463

有意なもの多くは、セクレチンレセプターアクティビティーやカルシウムイオンインポートのような、細胞膜に関わる機能をもつ遺伝子であった。

これらのことから、磁場刺激は遺伝子レベルで変化を起こし、増殖を刺激し、分化誘導を促進していると考えられる。今後は更なる遺伝子解析を進め、磁場刺激のよる効果のメカニズムを明らかにする予定である。最後に磁場の安全性という観点においては、今回の研究からは、細胞毒性に関するデータは認められず、生物学的には為害性は少ないと考えられる。今後、磁場刺激により発現が抑制される遺伝子の解析も行い、遺伝子レベルで有害な変化が起こっていないかを検証する必要がある。

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 7 件)

- ① 岡田通夫, 中村好徳, 田中貴信: 歯冠外アタッチメントとしての有髄歯への適応. 日本磁気歯科学会雑誌, 査読有 19(1): 29-38, 2010.
- ② 岩井孝充, 宮田利清, 中村好徳, 吉原健太郎, 熊野弘一, 大野芳弘, 大野友三, 今井勢喜, 高田雄京, 田中貴信: 铸造用磁性合金で作製されたキーパーの厚径に対する吸引力の影響. 日本磁気歯科学会雑誌, 査読有, 19(1): 47-53, 2010.
- ③ 熊野弘一, 増田達彦, 中村好徳, 神原 亮, 岩井孝充, 秦 正樹, 松川良平, 大野友三, 今井勢喜, 高田雄京, 田中貴信: 三次元有限要素法を用いた磁性アタッチメントの吸引力特性について—キーパーサイズの変化が吸引力に及ぼす影響—. 日本磁気歯科学会雑誌, 査読有, 19(1): 54-60, 2010.
- ④ Nakamura Y, Shoji K, Kanbara R, Kumano H, Ando A, Iwai T, Kogiso T, Ohno Y, Takada Y, Tanaka Y: Influence of the measuring methods on the attractive force of magnetic attachments. J J Mag Dent, 査読無 19(2):10-15, 2010.
- ⑤ Iwai T, Nakamura Y, Shoji K, Masuda T, Kanbara R, Yoshihara K, Hata M, Ohno Y, Takada Y, Tanaka Y: Influence of cast magnetic alloy keeper thickness on the attractive force of a magnetic attachment. J J Mag Dent, 査読無, 19(2):16-18, 2010.
- ⑥ Kanbara R, Nakamura Y, Ando A, Kumano H, Masuda T, Sakane M, Ohno Y, Matsukawa R, Takada Y, Tanaka Y: Stress analysis of an

abutment tooth with extracoronal magnetic attachment -Introduction of nonlinear property into three-. J J Mag Dent, 査読無, 19(2):44-51, 2010.

- ⑦ Kumano H, Masuda T, Nakamura Y, Miyata T, Iwai T, Kogiso T, Ohno Y, Matsukawa R, Takada Y, Tanaka Y: Attractive force analysis of magnetic attachment using three dimensional finite element method -Influence of the keeper thickness on attractive force-. J J Mag Dent, 査読無, 19(2): 52-55, 2010.

[学会発表] (計2件)

- ① Fukuzawa R, Ozawa S, Kubo K, Sugita Y, Yoshida W, Maeda H, Tanaka Y. Effect of Magnetic Fields on Osteoblasts and Fibroblasts in vitro. The 3rd Academy of Advanced Applied Science in Oral Medicine. Tokyo, Jan 22, 2011.
- ② 福澤蘭, 尾澤昌悟, 前田初彦, 久保勝俊, 杉田好彦, 吉田和加, 田中貴信. 骨芽細胞と線維芽細胞における磁場刺激に対する反応について. 第20回日本磁気歯科学会, 名古屋, 2010年10月30, 31日.

[図書] (計2件)

- ① 尾澤昌悟, 田中貴信. スタンダード部分床義歯補綴学 第2版 藍稔 五十嵐順正編, 第23章その他の義歯 p 239-245, 学建書院 2010年9月発行.
- ② 尾澤昌悟, 田中貴信. 無歯顎補綴治療学 第2版. 細井紀雄, 平井敏博, 大川周治, 市川哲雄編. 顎義歯による治療, p294-301, 医歯薬出版, 2009年2月発行.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 貴信 (TANAKA YOSHINOBU)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 60014271

(2) 研究分担者

尾澤 昌悟 (OZAWA SHOGO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号: 50323720

中村 好徳 (NAKAMURA YOSHINOBU)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70308782