

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650303

研究課題名(和文)超音波によるエピジェネティック制御の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of epigenetic regulation by ultrasound

研究代表者

田淵 圭章(TABUCHI, Yoshiaki)

富山大学・生命科学先端研究センター・准教授

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、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：低出力パルス超音波(LIPUS)は、骨折治癒に対する補助治療として広く利用されている。我々は、網羅的な遺伝子発現解析技術を用いて、1回、20分間のLIPUS(1.5 MHz, 30 mW/cm²)を作用させたマウス骨芽細胞において、骨の形態に関連する数多くの遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。得られた結果は、骨芽細胞におけるLIPUSの作用メカニズムの分子基盤を解明する一助になる。

研究成果の概要(英文)：Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) has been used extensively as an adjuvant to fracture healing. We identified many up-regulated genes that were associated with bone morphology in mouse osteoblast cells treated with a single 20-min LIPUS (1.5 MHz, 30 mW/cm²) using global-scale gene expression analyzing technologies. These results obtained here should help to further clarify the molecular basis of the mechanisms of the LIPUS response in osteoblast cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波

1. 研究開始当初の背景

(1)2003年のヒトゲノムの解読によりヒトの設計図は明らかになった。一方、同一のゲノムを有する細胞が機能の異なる様々な細胞に成熟・分化するのは、DNAの塩基配列によらないエピジェネティックな遺伝子発現制御の存在によるところが大きい。このエピジェネティックな遺伝子発現制御は、個体発生やがん、老化等、多種多様な生命現象をつかさどっている。また、エピジェネティック異常は種々の病態を引き起こすことから、近年、エピジェネティクスは非常に注目されている。

(2)超音波は、超音波探査や洗浄にいち早く実用応用され、近年、その技術は医療分野、物質の創製や環境分野に至るまで幅広く応用されている。医療分野で超音波は診断に必須の技術で、また、骨折治療、集束超音波治療、結石破壊、白内障の手術、血栓溶解等、治療にも利用され、ヒトに対する安全かつ有効な使用法が確立されている。

(3)他方、最近、超音波による遺伝子導入、遺伝子制御された細胞死誘導、遺伝子発現変化の誘導等が明らかとなった。さらに、最近、我々は、超音波によってDNA二本鎖切断を引き起こすことを世界に先駆けて証明した。

(4)また、以前からある種の超音波が骨の形成を促進することが示されており、実際に臨床の場で骨折治療に低出力パルス超音波(LIPUS)が使用されている。セーフスは世界初の超音波骨折治療器で、サッカーのデビッド・ベッカム選手や野球の松井秀喜選手が骨折治療のために使用して注目された。なお、この効果を裏付ける成績が培養骨関連細胞で報告されている。これまでのところ、超音波に関しては、診断に関する研究報告は多いが、超音波の影響を分子や細胞レベルで検討した報告は少ない。本研究のテーマである、超音波の生体への作用をエピジェネティクスの観点から研究した報告はない。

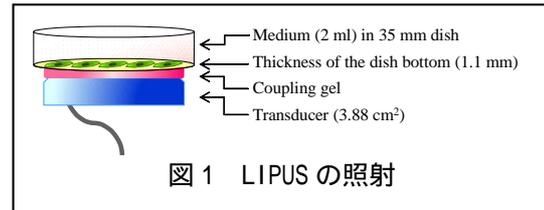
2. 研究の目的

(1)本研究では、超音波がエピジェネティクスにどのような影響を及ぼすのか、さらに、超音波によりエピジェネティック制御ができるか否かを骨芽細胞や間葉系幹細胞の細胞分化と関連させて、分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞培養 骨芽細胞研究に多用されている骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。細胞は、10%ウシ胎児血清を含む MEM 培地中で、37℃で培養した。細胞を分化させる時、MEM 培地に 10%ウシ胎児血清、0.3 mM L-アスコルビン酸と 10 mM β-グリセロリン酸を添加し、14日間培養した。

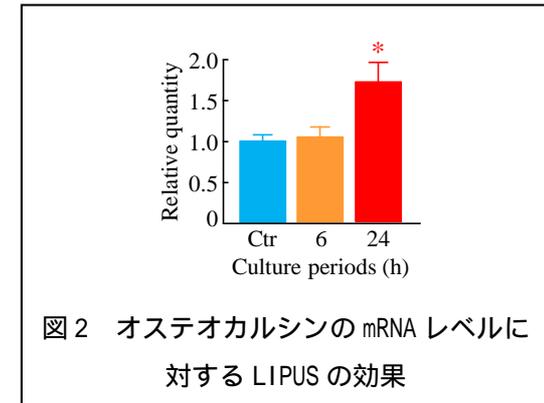
(2)超音波照射 LIPUS 照射には、セーフス 4000J (帝人ファーマ社)を用いた。図 1 に示す様に、分化させた MC3T3-E1 細胞を 35 mm シャーレで培養し、カップリングゲルを介して、下部から超音波を 20 分間 (1.5 MHz, 30 mW/cm²) 照射した。照射後、細胞は 37℃で培養した。



(3)網羅的遺伝子発現解析 細胞からトータル RNA を分離し、ジーンチップシステムを用いて、発現変動する遺伝子を網羅的に調べた。得られたデータは、さらに、バイオインフォマティクスツールを用いて解析した。

4. 研究成果

(1)細胞増殖とマーカー遺伝子発現に対する LIPUS の効果 MC3T3-E1 に LIPUS を照射した時、本刺激は細胞の増殖やアルカリフォスファターゼ活性(骨芽細胞分化マーカー)に影響を及ぼさなかった。一方、骨芽細胞の分化マーカータンパク質であるオステオカルシンの mRNA レベルが有意に増加した(図 2)。他の分化のマーカーであるオステオポンチンの mRNA レベルに対して、LIPUS は影響を与えなかった。



響を及ぼさなかった。一方、骨芽細胞の分化マーカータンパク質であるオステオカルシンの mRNA レベルが有意に増加した(図 2)。他の分化のマーカーであるオステオポンチンの mRNA レベルに対して、LIPUS は影響を与えなかった。

(2)LIPUS が影響を及ぼす遺伝子の網羅的解析 ジーンチップシステムを用いた DNA マイクロアレイ解析により、LIPUS 照射細胞において 1.5 倍以上発現が増加する 38 遺伝子と減少する 37 遺伝子、合計 75 遺伝子が明らかとなった(図 3)。次に、バイオインフォマティクスツールを用いて、発現変動する遺伝子の機能解析と遺伝子ネットワーク解析を行った。増加する 38 遺伝子の中には、骨格筋の機能や発達、細胞の移動、結合組織の機能や発達等に関連する遺伝子が含まれた。興味深いことに、これらの遺伝子の集団から機能

的な連関が考えられる遺伝子ネットワークが構築できた。この中には, Dmp1, Fbn1, Igf2, Lum, Mmp13 と Thbs1 遺伝子が含まれ, これらの遺伝子は骨の形態に関連するものであった。また, 減少する 37 遺伝子の集団からも遺伝子ネットワークが得られ, Id1, Id2, Id3 と Krt14 遺伝子が含まれた。この遺伝子ネットワークの機能は, 遺伝子発現, 細胞周期および結合組織の機能と発達等であった。次に, リアルタイム定量的 PCR を用いて, 遺伝子の発現変動を確認した。増加する遺伝子は, Ahr, Cd200, Egr3, Gas6, Htra1, Igf2, Lum, Matn4, Mylk, Nrep, Omd, Thbs1, Tunc1 と Znhit6, 減少する遺伝子は, Id1, Id2 と Id3 を選択した。マイクロアレイ解析から得られたこれらの遺伝子発現の増加と減少がリアルタイム定量的 PCR システムを用いた実験でも確認することが出来た。LIPUS は, 骨折治療に使用され, 治癒日数が有意に減少する。LIPUS が数多くの遺伝子の発現, 特に骨に関する遺伝子の発現に影響を及ぼし, 骨折治癒促進に働いているのかもしれない(雑誌論文番号)。

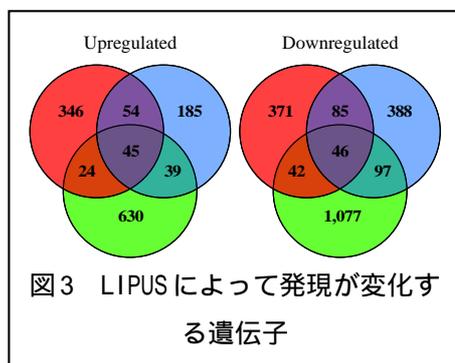


図3 LIPUSによって発現が変化する遺伝子

(3)LIPUS の効果における ERK の役割 LIPUS の効果に ERK が関与するか否かを検討した。LIPUS の細胞への照射により, 時間依存的にリン酸化 ERK の発現レベルが上昇し, 6 時間後が最もそのレベルが高かった。一方, ERK の阻害剤である U0126 の存在下では, LIPUS による活性化が顕著に阻害された(図4)。今

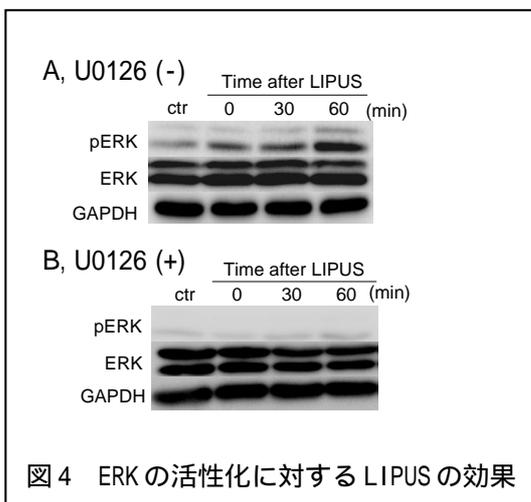


図4 ERK の活性化に対する LIPUS の効果

後, 遺伝子発現と ERK の関係を精査する必要

がある。

(4)ヒストンの修飾に対する LIPUS の作用の検討 エピジェネティクスとヒストンの修飾との間には密接な関連がある。ヒストンの修飾に対する LIPUS の効果を検討した。メチル化ヒストン H3 (Lys 4), H3 (Lys 9), H3 (Lys 27), H3 (Lys 36), アセチル化ヒストン H3 (Lys 9)と H3 (Lys 27)の発現レベルをウエスタンブロット法で評価した。その結果, トリメチルヒストン H3 (Lys 4), H3 (Lys 9)と H3 (Lys 36: 図5) およびモノメチルヒストン H3 (Lys 27)の発現レベルが LIPUS 照射によって上昇した。超音波がヒストンの修飾に影響を与えて, 遺伝子発現を変化させ細胞に対して様々な効果をおよぼしている可能性が考えられた。

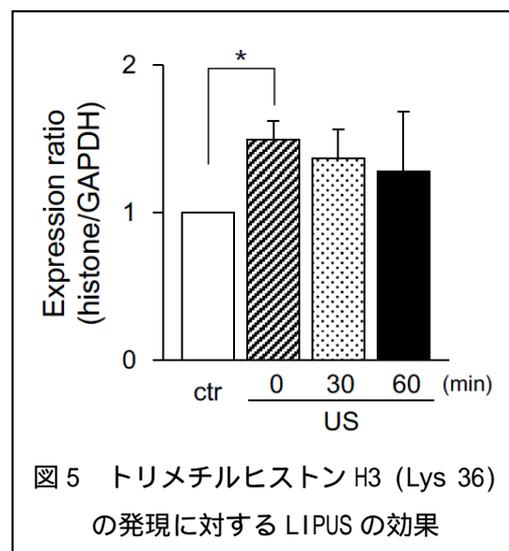


図5 トリメチルヒストン H3 (Lys 36) の発現に対する LIPUS の効果

以上より, 骨芽細胞に対して LIPUS の一回 20 分間の照射により, 数多くの遺伝子の発現が変動することを明らかにした。また, 本刺激により, ERK が活性化され, 同時に, 幾つかのヒストンの修飾レベルが変化することも見出した。これらの現象の間にはどのような関連があるのかをさらに詳しく調べることにより, 超音波とエピジェネティクスとの関係が明らかになると考えられる。

(5)本課題に関連する研究成果 超音波には様々な生物学的な効果があることが知られている。LIPUS (0.3~0.4 W/cm²)によって DNA の二本鎖切断が誘発されることを明らかにした(雑誌論文番号)。また, LIPUS (0.3 W/cm²) によって誘導される細胞死に DNA-PK が重要な役割を担っていることを証明した(雑誌論文番号)。LIPUS (0.4 W/cm²) によって ATR 依存的に Chk1 が活性化され, これは LIPUS によるアポトーシスに関与していることを明らかにした(雑誌論文番号)。

ハイパーサーミアは, がん治療の補助的な療法として臨床で使用されている。本研究で用いた DNA マイクロアレイとパイオインフォマティクスツールを用いて, ハイパーサーミ

アやマイルドハイパーサーミアによって発現変動する遺伝子を明らかにした(雑誌論文番号)).

温度感受性 SV40 大型 T 抗原遺伝子導入トランスジェニック動物は、機能を保持した不死化細胞株の樹立に非常に有用である。本遺伝子を導入したトランスジェニックラットから上皮機能を保持した口腔上皮細胞株 ROE2 の樹立に成功した。この細胞株は、超音波の機能を評価する有用なモデルになる可能性がある(雑誌論文番号)。

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9件)

Tabuchi Y, Wada S, Ikegame M, Kariya A, Furusawa Y, Hoshi N, Yunoki T, Suzuki N, Takasaki I, Kondo T, Suzuki Y, Development of oral epithelial cell line ROE2 with differentiation potential from transgenic rats harboring temperature-sensitive simian virus40 large T-antigen gene, *Exp. Anim.*, 2014, Vol. 63, No. 1, pp. 31-44 (査読あり)

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1538/expanim.63.31>

Tabuchi Y, Sugahara Y, Ikegame M, Suzuki N, Kitamura K, Kondo T, Genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in MC3T3-E1 preosteoblast cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, No. 11, pp. 22721-22740 (査読あり)

DOI: 10.3390/ijms141122721.

Kariya A, Tabuchi Y, Yunoki T, Kondo T, Identification of common gene networks responsive to mild hyperthermia in human cancer cells, *Int. J. Mol. Med.*, 2013, Vol. 32, No. 1, pp. 195-202 (査読あり)

DOI: 10.3892/ijmm.2013.1366.

Tabuchi Y, Furusawa Y, Kariya A, Wada S, Ohtsuka K, Kondo T, Common gene expression patterns responsive to mild temperature hyperthermia in normal human fibroblastic cells, *Int. J. Hyperthermia*, 2013, Vol. 29, No. 1, pp. 38-50 (査読あり)

DOI: 10.3109/02656736.2012.753163.

Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Hassan MA, Tabuchi Y, Nomura T, Kondo T, Ultrasound activates ataxia telangiectasia mutated- and rad3-related (ATR)-checkpoint kinase 1 (Chk1) pathway in human leukemia Jurkat cells, *Ultrason. Sonochem.*, 2012, Vol. 19, No. 6, pp. 1246-1251 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.04.003.

Furusawa Y, Fujiwara Y, Hassan MA, Tabuchi Y, Morita A, Enomoto A, Kondo T, Inhibition of DNA-dependent protein kinase promotes ultrasound-induced cell death including apoptosis in human leukemia cells, *Cancer Lett.*, 2012, Vol. 322, No. 1, pp. 107-112 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.020.

Tabuchi Y, Wada S, Furusawa Y, Ohtsuka K, Kondo T, Gene networks related to the cell death elicited by hyperthermia in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells, *Int. J. Mol. Med.*, 2012, Vol. 29, No. 3, pp. 380-386 (査読あり)

DOI: 10.3892/ijmm.2011.862.

Furusawa Y, Fujiwara Y, Campbell P, Zhao QL, Ogawa R, Hassan MA, Tabuchi Y, Takasaki I, Takahashi A, Kondo T, DNA double-strand breaks induced by cavitation mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines, *PLoS One*, 2012, Vol. 7, No. 1, pp. e29012 (査読あり)

DOI: 10.1371/journal.pone.0029012.

Furusawa Y, Tabuchi Y, Wada S, Takasaki I, Ohtsuka K, Kondo T, Identification of biological functions and gene networks regulated by heat stress in U937 human lymphoma cells, *Int. J. Mol. Med.*, 2011, Vol. 28, No. 2, pp. 143-151 (査読あり)

DOI: 10.3892/ijmm.2011.702.

[学会発表](計2件)

Tabuchi Y, Sugahara Y, Ikegame M, Suzuki N, Kitamura KI, Kondo T, Identification of genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in mouse preosteoblast cells, *Int. Conference on Biomed. Ultrasound 2013*, 2013, 10, 22-23, Taipei

田淵圭章, 菅原有希, 池亀美華, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 近藤 隆, MC3T3-E1 前骨芽細胞様細胞において低出力パルス超音波に応答する遺伝子の同定, 第12回超音波治療研究会, 2013, 11, 30, 東京

[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

<http://www.lsrc.u-toyama.ac.jp/mgrc/html/laboratory.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 圭章 (TABUCHI, Yoshiaki)
富山大学・生命科学先端研究センター・准教授
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

和田 重人 (WADA, Shigehito)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：50303219

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