

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01353

研究課題名(和文) 超音波による細胞分化・増殖制御：エピゲノムの役割解明

研究課題名(英文) Control of cell differentiation and proliferation by ultrasound: elucidation of the role of epigenome

研究代表者

田淵 圭章 (Tabuchi, Yoshiaki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：20322109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低出力パルス超音波(LIPUS)の初期細胞応答を明らかにするために、骨髄間質細胞(BMSCs)の最初期遺伝子(IEGs)の発現に対するLIPUSの効果を検討した。マウス由来のST2 BMSCsに25 mW/cm²の強度で20分間LIPUSを照射した。LIPUSの1回照射は、有意かつ一過性にFosとEgr1を含むIEGsの発現を誘導した。また、ERK2のリン酸化レベルを有意に上昇させた。MAPKK/ERK経路の阻害剤U0126は、LIPUSで誘導されたFosとEgr1の発現を有意に阻害した。得られた成績は、BMSCs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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低出力パルス超音波(LIPUS)は、骨折治癒を促進する効果があるがその分子機構は完全に解明されていない。本研究では、その治癒過程に関与する骨髄間質細胞を用いてLIPUSの効果を検討した。今回、LIPUSが初期細胞応答に係わる遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。得られた成績は、LIPUSの骨折治癒促進のメカニズムを解明するための一助になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the early cellular response to low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), the effects of LIPUS on the expression of immediate-early genes (IEGs) in bone marrow stromal cells (BMSCs) were evaluated. Mouse ST2 BMSCs were treated with LIPUS (25 mW/cm² for 20 min). A single exposure of LIPUS significantly and transiently increased the expression levels of IEGs including Fos and Egr1. LIPUS exposure also significantly increased the phosphorylation level of ERK2. U0126, an inhibitor of MAPK/ERK, significantly prevented LIPUS-induced expression of Fos and Egr1.

These findings will provide a molecular basis for further understanding of the mechanisms of LIPUS in BMSCs.

研究分野：細胞生理学

キーワード：超音波 遺伝子応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低出力パルス超音波 (LIPUS) は骨折治療に有効利用されている。患部に LIPUS というメカニカルストレスを付与することで、組織や細胞が元々持っている治癒能力が亢進するためと考えられる。骨折治癒過程は、炎症期、仮骨形成期とリモデリング期に分けられ、各ステップで関与の程度の違いはあるが、繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞等、様々な細胞が重要な役割を演じている。しかしながら、この安全で有効な LIPUS の作用の分子メカニズムは不明な点が多い。近年、様々な生命現象において、ゲノムによらないエピゲノム遺伝子発現制御に注目が集まっている。

2. 研究の目的

本申請では、LIPUS による細胞の分化や増殖の制御においてエピゲノムがどの様に関与しているかを、骨芽細胞、間葉系幹細胞等で検討する。さらに、この作用を魚のウロコを用いた組織モデル等で調べる。

3. 研究の方法

1) 培養細胞を用いた実験 間葉系幹細胞の一つであるマウス骨髄間質細胞 ST2 を用いた。また、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞やヒト口腔扁平上皮がん由来の HSC-3 細胞を用いた。

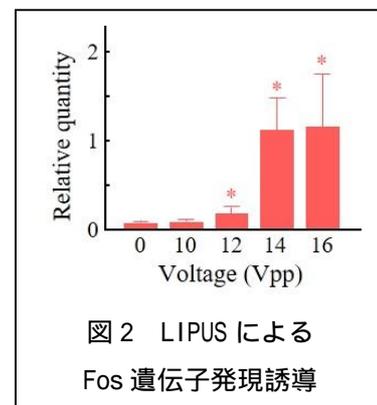
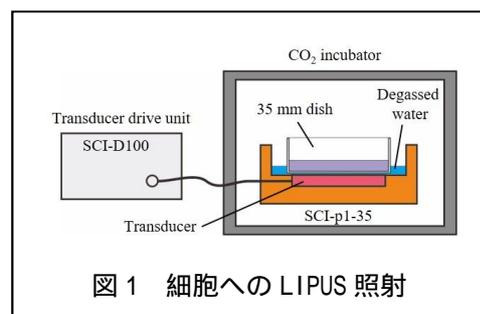
2) 魚類を用いた実験 金魚からウロコを採取し、実験に用いた。

4. 研究成果

1) マウス骨髄間質細胞 ST2 の最初期遺伝子発現に対する LIPUS の効果

マウス骨髄間質細胞 ST2 を 35 mm シャーレに蒔き、超音波発生装置 (SCI-D100, MU 研究所) に接続した超音波照射器 (SCI-p1-35, MU 研究所) を用いて、シャーレの下面から LIPUS を 20 分間照射した (超音波周波数: 1.11 MHz, DF: 20%, パルス繰り返し周波数: 1 kHz, 印加電圧: 10-16 Vpp) (図 1)。ハイドロフォンを用いた計測により、印加電圧 10, 12, 14 と 16 Vpp の時、各々 12, 17, 25 と 34 mW/cm² の音圧を示した。

ST2 細胞への LIPUS 照射の 30 分後、LIPUS はその強度に依存して 12 Vpp から最初期遺伝子 (immediate early genes, IEGs) のメンバーである *Fos* 遺伝子の発現を上昇させた (図 2)。LIPUS, 14 Vpp の時、培養液の温度は 35 から 38 に上昇したが、*Fos* 遺伝子発現は 38 の温熱負荷により影響を受けなかった。LIPUS の *Fos* 遺伝子発現の上昇には、熱効果は影響しないと結論した。以下の実験では 14 Vpp の印加電圧の LIPUS を使用した。LIPUS は、*Fos* 遺伝子に加えて、他の IEGs である



Jun, *Egr1* や *Ptgs2* の遺伝子の発現を誘導した。一方, LIPUS は細胞の増殖, 細胞の総タンパク量や骨芽細胞の分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性に影響を与えなかった。LIPUS を照射した細胞では, MAP キナーゼに属する ERK リン酸化レベルが上昇し, この上昇はその阻害剤 U0126 により抑制された。また, *Fos* と *Egr1* の発現誘導は, ERK 阻害剤 U0126 の前処置

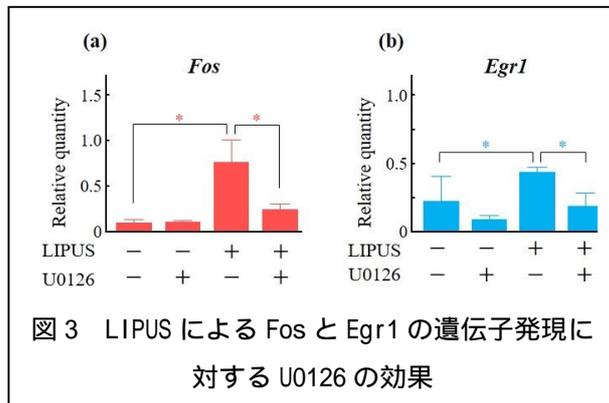


図3 LIPUS による Fos と Egr1 の遺伝子発現に対する U0126 の効果

により有意に抑制された (図3)。マウス骨髄間質細胞 ST2 において, LIPUS 照射により速やかに IEGs 遺伝子の発現が誘導され, この誘導に ERK が関与することが明らかとなった。骨折治療には, 30 mW/cm² 程度の LIPUS が用いられている。また, 200 mW/cm² 以下の強度の LIPUS ではキャピテーションは起こらないと考えられている。今回得られた成績は, 骨折治療に利用されている同程度の強度 (25 mW/cm²) であり, キャピテーションや熱作用ではない LIPUS のメカニカルストレスにより起こった現象であると考えている (雑誌論文 Tabuchi et al., *J Med Ultrason*, 47: 193-201, 2020)。現在, 網羅的な遺伝子発現解析の手法を用いて, LIPUS に応答する IEGs を含む遺伝子の全貌を解明する研究を進めている。この遺伝子発現とエピゲノムとの関連を明らかにすることが今後の課題である。

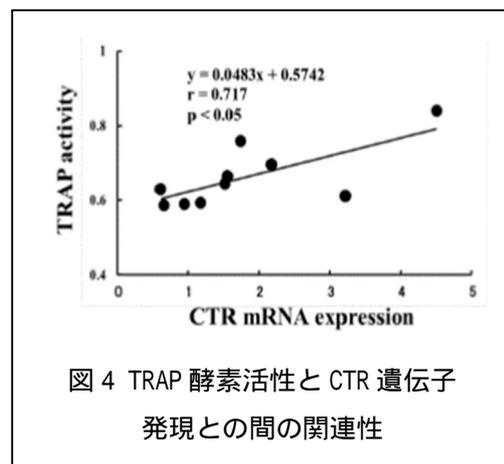


図4 TRAP 酵素活性と CTR 遺伝子発現との間の関連性

2) 金魚ウロコのカルシトニン受容体 (CTR) 遺伝子のクローニングと発現解析

金魚のウロコのカルシトニン受容体遺伝子をクローニングした。その CTR は 502 個のアミノ酸をコードし, メダカの CTR と約 58% の相同性を示した。また, 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性と CTR 遺伝子発現の間には正の相関があることが示された (図4)。金魚のウロコは, 骨芽細胞と破骨細胞を有し, 超音波を含む物理化学的なストレスに鋭敏に反応する。CTR は, 破骨細胞の活性を反映する良いマーカー遺伝子であると考えられる (雑誌論文 Ikari et al, *Int J Zool Inv*, 4: 1-10, 2018)。また, 金魚うろこの再生過程において RANKL, Ephrin-Eph と Wnt10b が重要な役割を演じていることを明らかにした (雑誌論文 Tazaki et al., *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 225: 46-58, 2018)。

3) 熱ショックタンパク質 Hsp70 を核内へ輸送する Hikeshi の役割解析

超音波の効果を理解する時, それに係わる熱作用を慎重に考慮しなければならない。熱ショックタンパク質 (HSPs) である Hsp70 はシャペロン作用を有し, 熱を含む様々なストレスにより発現誘導される。また, 細胞が熱ストレスを感知した時, Hsp70 は速やかに細胞質から核へ移行する。近年, 熱ストレス負荷条件下において Hsp70 の核移行のキャリアタンパク質とし

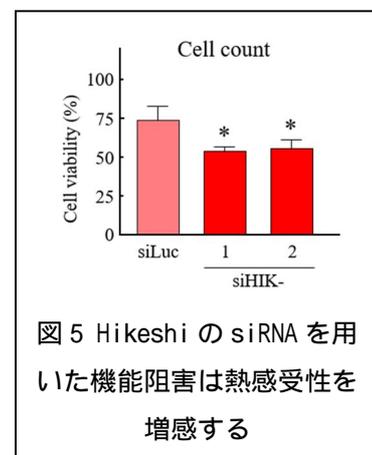


図5 Hikeshi の siRNA を用いた機能阻害は熱感受性を増感する

て Hikeshi が同定された . Hikeshi の siRNA を用いた機能阻害は , ヒト口腔扁平上皮がん由来の HSC-3 細胞において Hsp70 の核内移行を阻害し , 熱に対する感受性を上昇させた (図 5) . 熱ストレスに対して , 核内に移行した Hsp70 が細胞保護的に機能していると考えられる . この成績は , LIPUS 研究の重要な情報になる (雑誌論文 Tabuchi et al. , *Int J Mol Med* , **46**: 58-66 , 2020) . また , Hsp70 のコシャペロン BAG3 の増殖抑制作用に関連する遺伝子群を明らかにした (雑誌論文 Furusawa et al. , *Mol Med Rep* , **18**: 4138-4146 , 2018) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tabuchi Y, Hasegawa H, Suzuki N, Furusawa Y, Hirano T, Nagaoka R, Takeuchi SI, Shiiba M, Mochizuki T	4. 巻 47
2. 論文標題 Low-intensity pulsed ultrasound promotes the expression of immediate-early genes in mouse ST2 bone marrow stromal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Ultrason	6. 最初と最後の頁 193-201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10396-020-01007-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 YOSHIAKI TABUCHI, KEITA MAEKAWA, MISAKO TORIGOE, YUKIHIRO FURUSAWA, TETSUSHI HIRANO, SATSUKI MINAGAWA, TATSUYA YUNOKI, ATSUSHI HAYASHI	4. 巻 46
2. 論文標題 HIKESHI silencing can enhance mild hyperthermia sensitivity in human oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Med	6. 最初と最後の頁 58-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijmm.2020.4591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Furusawa Yukihiro, Yunoki Tatsuya, Hirano Tetsushi, Minagawa Satsuki, Izumi Hironori, Mori Hisashi, Hayashi Atsushi, Tabuchi Yoshiaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of genes and genetic networks associated with BAG3?dependent cell proliferation and cell survival in human cervical cancer HeLa cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4138-4146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.9383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tazaki Yuya, Sugitani Kayo, Ogai Kazuhiro, Kobayashi Isao, Kawasaki Haruki, Aoyama Takafumi, Suzuki Nobuo, Tabuchi Yoshiaki, Hattori Atsuhiko, Kitamura Kei-ichiro	4. 巻 225
2. 論文標題 RANKL, Ephrin-Eph and Wnt10b are key intercellular communication molecules regulating bone remodeling in autologous transplanted goldfish scales	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology	6. 最初と最後の頁 46 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2018.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikari Takahiro, Sekiguchi Toshio, Urata Makoto, Furusawa Yukihiro, Ikegame Mika, Kinoshita Yasuko, Kitamura Kei-ichiro, Nakabayashi Itsuko, Horita Motoshi, Tabuchi Yoshiaki, Hattori Atsuhiko, Srivastav Ajai K, Suzuki Nobuo	4. 巻 4
2. 論文標題 Sequencing and Expression Analysis of Calcitonin Receptor in the Scales of Goldfish, <i>Carassius auratus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Zoological Investigations	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田淵圭章, 鈴木信雄
2. 発表標題 生体組織に対する超音波照射の影響とその応用.
3. 学会等名 日本超音波医学会第92回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵圭章, 長谷川英之, 鈴木信雄, 平野哲史, 長岡 亮, 竹内真一, 椎葉倫久, 望月 剛
2. 発表標題 マウスST2骨髄間質細胞の最初期遺伝子発現に対する低出力パルス超音波の効果
3. 学会等名 日本超音波医学会第92回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月 剛, 田淵圭章, 長岡 亮, 長谷川英之
2. 発表標題 ニードル型ハイドロホンを用いたPetri dish内の音圧分布測定.
3. 学会等名 日本超音波医学会第92回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵圭章
2. 発表標題 熱ストレスに対する細胞応答.
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第36回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵圭章, 長谷川英之, 鈴木信雄, 平野哲史, 長岡 亮, 望月 剛
2. 発表標題 低出力パルス超音波に対する初期応答遺伝子群の同定.
3. 学会等名 第18回日本超音波治療研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵圭章, 轟 勇人, 鈴木信雄, 平野哲史, 竹内真一, 椎葉倫久, 近藤 隆, 長谷川英之
2. 発表標題 マウスMC3T3-E1前骨芽細胞様細胞に対する低出力パルス超音波の効果
3. 学会等名 日本超音波医学会第91回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵圭章, 轟 勇人, 鈴木信雄, 平野哲史, 竹内真一, 椎葉倫久, 長谷川英之
2. 発表標題 低出力パルス超音波の細胞応答
3. 学会等名 平成30年度第4回アコースティックイメージング研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵圭章, 長谷川英之, 藤森沙月, 鈴木信雄, 竹内真一, 椎葉倫久, 近藤 隆, 望月 剛
2. 発表標題 マウスST2骨髄間質細胞の細胞増殖と骨芽細胞分化に対する低出力パルス超音波の効果
3. 学会等名 日本超音波医学会第90回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Todoroki Y, Hasegawa H, Shiiba M, Takeuchi S, Kondo T, Tabuchi Y
2. 発表標題 Measurement of ultrasonic pressure distribution in cell culture container
3. 学会等名 The 12th Toin International Symposium on Biomedical Engineering
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	長谷川 英之 (Hasegawa Hideyuki) (00344698)	富山大学・学術研究部工学系・教授 (13201)	
研究 分担者	星 信彦 (Hoshi Nobuhiko) (10209223)	神戸大学・先端融合研究環・教授 (14501)	
研究 分担者	鈴木 信雄 (Suzuki Nobuo) (60242476)	金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池亀 美華 (Ikegame Mika) (70282986)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	古澤 之裕 (Furusawa Yukihiro) (80632306)	富山県立大学・工学部・講師 (23201)	