

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21300171

研究課題名（和文） 細胞内シグナル伝達解析を活用した軟骨再生を促進する超音波刺激条件の特定に関する研究

研究課題名（英文） Research on specification conditions of the ultrasonic stimulation which promote the regeneration of the cartilage using intracellular signaling analysis

研究代表者

竹内良平（RYOHEI TAKEUCHI）

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：30236442

研究成果の概要(和文): 培養軟骨細胞に対して低出力パルス超音波(LIPUS)を与え, LIPUS の繰り返し周波数(RF)および出力強度(P_o)の相異なる影響を検証し, 軟骨細胞を活性化させる LIPUS の条件を検討した。ウシ足関節より軟骨を採取し, 単離した軟骨細胞の平面培養を行った。RF と P_o の影響を検証するために RF を 50, 500, 1000Hz, P_o を 75, 150, 300mW/cm²|SATP に変化させて実験を行った。LIPUS を培養翌日より 1 日 20 分間, 毎日照射した群 (LIPUS 群), 非照射群 (Control 群) の 2 群とした。培養開始 7 日目に, Real-time RT-PCR を用いてアグリカン(AGC), II 型コラーゲン(COL2), IX 型コラーゲン(COL9)の mRNA 発現量を測定した。結果は, P_o -150 mW/cm², RF-500Hz において AGC の mRNA 発現量は LIPUS 群で Control 群の約 168% であり ($p < 0.05$), RF-500Hz においては COL9 の mRNA は約 158% であった ($p < 0.01$)。一方, RF-1000Hz, P_o -300 mW/cm² において COL9 の mRNA 発現量は LIPUS 群で Control 群の約 147% であった ($p < 0.01$)。繰り返し周波数が軟骨基質を構成するタンパクの mRNA の発現に対して影響を及ぼす可能性が示唆された。また, 出力強度の影響は一部のタンパクの mRNA のみが影響を受けやすいと考えられた。

研究成果の概要(英文): The purpose of this study is to clarify the influence of changing repetition frequency(RF) and intensity(P_o) of Low-Intensity Pulsed Ultrasound(LIPUS) for cultured bovine articular chondrocytes. Chondrocytes were obtained from the metatarso-phalangeal joints of bovine and were cultured. To analyze the effect of RF and P_o , LIPUS was exposed at RF of 50, 500, 1000Hz and at intensity of 75, 150, 300 mW/cm²|SATP. LIPUS stimulation for 20 minutes every day was applied to chondrocytes after 24 hours in culture. At the time of 7 days after culture, mRNA levels of Aggrecan(AGC), Type II collagen(COL2), and Type IX collagen(COL9) were evaluated by Real-time RT-PCR. In intensity, condition of 150 mW/cm²|SATP, the RF of 500Hz increased expression of mRNA for AGC by 168% of control ($p < 0.05$). The condition of

RF of 50Hz increased expression of mRNA for COL9 by 158% of control ($p<0.01$). RF was set to 1000 Hz and intensity was changed, Po-300 mW/cm² increased expression of mRNA for COL9 by 147% of control ($p<0.05$). These results suggested that changing of RF of LIPUS may affect expression of each mRNA of protein in the cell. In addition, the changing of intensity and RF of LIPUS may influence to some products produced by chondrocytes during culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：人工臓器工学・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

これまで関節軟骨を形成する硝子軟骨の再生は困難であるとされてきた。また変形性関節症に対しては、軟骨の変性磨耗を積極的に抑制する試みがなされてきたとは言い難い。軟骨に対する LIPUS の影響はこれまでいくつかの研究があるが、はっきりとは解明されてはいない。前述したように、申請者らは、LIPUS によって活性化される軟骨細胞内のシグナル伝達経路の一つを特定し、軟骨細胞数が安定して有意に増加することを確認した。さらに、これまでは“LIPUS は培養軟骨細胞数を増加させることはない”ということが世の定説であったが、LIPUS による三次元培養軟骨細胞数の増加を初めて証明し、この定説を覆した

経緯がある。また、LIPUS により collagen type の産生が顕著に亢進することを発見した。これまでの研究で申請者らが特定したシグナル伝達系のひとつである PI(3)Akt シグナルはアポトーシス(細胞死)を抑制する回路であることは知られているが、軟骨細胞の変性から細胞死に至るステップの解明とその予防法を探ることもできると考える。これまでの研究結果を踏まえてヒト関節軟骨の変性を抑制し、高齢者であっても軟骨が再生できる手段を新たに開発できる可能性があることを確信するに至った。

2. 研究の目的

変形性関節症の発生原因の一つに軟骨基質内に存在する小さなコラーゲンとされる

collagen の変性、消失が関わっていることが考えられる。軟骨基質を形成するコラーゲンの主体は collagen であるが、collagen は collagen の fibril を束ね、かつ軟骨細胞を軟骨基質に係留する働きもあることが最近の研究で明らかになってきたが、いまだに不明な点も多い。collagen が変性、消失すると collagen が変性し、軟骨基質が破壊されて関節症が惹起されるという仮説も成り立つ。低出力超音波 (LIPUS) に collagen の産生を亢進させる効果があることが申請者らのこれまでの研究で明らかになった。本来 LIPUS の研究は骨代謝分野でしか行われて来なかった経緯がある。LIPUS が軟骨代謝に影響を及ぼすとすれば、その照射条件は骨に対するものとは異なることは容易に想像される。本研究では、LIPUS が collagen を増やす作用機序を明らかにし、関節軟骨細胞を活性化させる条件 (繰り返し周波数や出力強度など) を特定し、関節症の発症予防に対するアプローチの一つとして将来臨床応用が可能となる新技術の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

当初はヒトの膝関節 (変形性膝関節症により人工膝関節置換術を受ける患者さんから、ご本人の承諾を得て使用することは採取することは横浜市立大学倫理委員会にて承認された) より採取した軟骨細胞を使用する予定であった。研究の初年度にヒト軟骨細胞の2次元および3次元培養を10例ほど繰り返し施行したが、培養方法が確立できなかった。理由として、変形性関節症より採取する変性軟骨は様々なサイトカインを出すことが考えられ、安定した培養細胞を作成することが困難であった。そのため、今回はウシの軟骨の2次元培養法を

使用することに変更した。

LIPUSの特徴は、超音波を一定間隔にて発生させることにある (図1)。すなわち、超音波の出力する期間と全く出力されない期間とを繰り返すことである。細胞に対する超音波刺激の作用は、超音波そのものの周波数とともに、周期的に超音波をon、offと繰り返す周波数による振動刺激による圧力効果の可能性も大きいと推測される。過去の我々の研究では、持続的な振動刺激が軟骨細胞内のインテグリンを介したシグナル伝達経路を活性化させることが判明している。超音波も振動一種であり、その軟骨に対する作用も似たものがあると判断した。

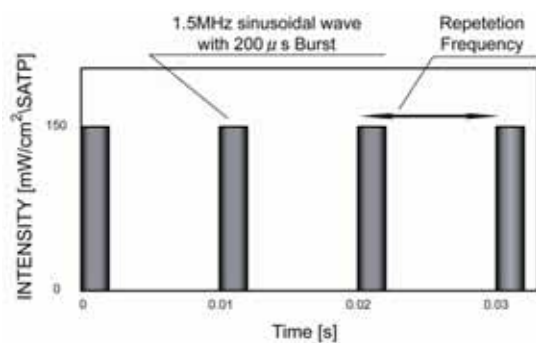


図1.

そこで以下の実験を行なった。

屠殺された翌日 (狂牛病によるウシの全頭検査により当日は入手不可能) のウシの足関節より採取した軟骨細胞を 2.0×10^6 cells づつコラーゲンゲル (CELLGEN、高研) に混合し、type 型コラーゲンスポンジ (直径10mm、厚さ2mm、高研) に陰圧下に吸着させた後に、10%FBS、アスコルビン酸、ヒアルロン酸ナトリウム (0.1 mg/ml) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO) にて24 well dish内で培養する。培養は24well plateにて行い、初期細胞数は 2×10^6 個

/wellとする。刺激装置には、細胞培養器内にて使用可能な超音波を発生させる繰り返し周波数および超音波自体の出力を変えられる超音波発生装置を使用した。図のように超音波刺激装置と培養プレート間には水を満たし、超音波の減衰率をできる限り減少させた(図2)。

1) 繰り返し周波数(RF)を変化させる実験; P_o を 150 mW/cm^2 |SATP としてRFを 50Hz, 500Hz, 1000Hzの3条件に変化させ軟骨細胞に対するLIPUSの影響を検証した。

2) 出力強度(P_o)を変化させる実験; RFを 1000Hz として P_o を 75 mW/cm^2 |SATP, 150 mW/cm^2 |SATP, 300 mW/cm^2 |SATPの条件のもとに軟骨細胞に対するLIPUSの影響を検証した。

1) 2) いずれも2次元培養軟骨細胞を4群(コントロールを含める)に分け、それぞれに毎日20分照射する。培養開始後3, 7, 10, 14, 21日後に各群よりサンプルを採取してコラゲナーゼ処理した後にクリスタルバイオレットで染色し、生存している軟骨細胞数を数えると同時に軟骨細胞の形態的变化を観察した。

collagen (COL9)、collagen (COL2)、アグリカン (AGC) のmRNAを測定する。プライマーはTaqManプロンプ(Life Technologies, Carlsbad, CA)を使用し、内部標準にはGAPDHを用いた。結果を検討して最も細胞数を増やし、軟骨基質成分を豊富にする周波数を検討した。

3) PI3K阻害剤を使用した検証; LIPUSが軟骨細胞に与える影響はインテグリンを介したMAPK経路に加えて、PI3Kに続くAkt経路も関与する可能性が大きい。

先行する実験結果よりLIPUSの最適な繰り返し周波数と出力強度を選択し、PI3K inhibitor (LY294002 ; Cell Signaling Technology, Beverly, PA) とMEK1 inhibitor (PD98059 ; Cell Signaling Technology, Beverly, PA) のAGCに対する影響を検証した。軟骨細胞に対してLIPUSを照射せず7日間培養した。7日目に、各inhibitor (Final $2\mu\text{M}$)を添加して30分培養した後に、LIPUSを20分間照射した。24時間後、再びLIPUSを20分間照射し、さらに20分後にプレートから細胞を剥離し、AGCおよびcollagen のmRNA量を検証した。

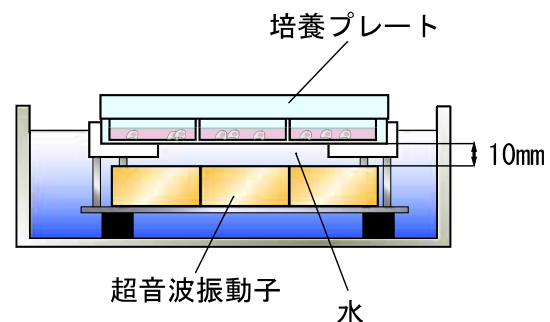


図2.

4. 研究成果

1) 軟骨細胞形態の変化

培養3日目から7日目の形態変化を位相差顕微鏡に取り付けたカメラによって撮影した。培養軟骨細胞は、培養開始4日目にはセミコンフルエント(細胞が培養面を覆

い尽くす直前)に達しており、7日目にはコンフルエント(細胞が培養面を覆い尽くす)に達していた。培養初期の細胞に比べてコンフルエントに達した細胞のほうが丸みを帯びていたが、いずれの群においてもその傾向は同様であり、超音波の有無による形態変化の大きな違いは確認できなかった(図3)。

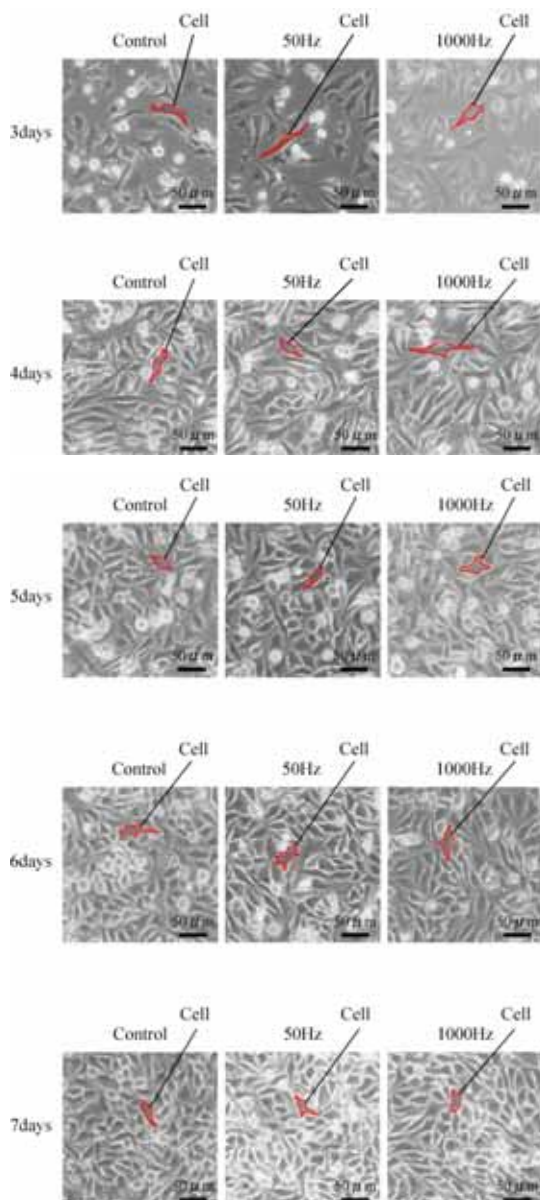


図3 .

2) 軟骨細胞数の変化

各群の細胞数を、培養開始後1, 2, 4, 7, 10日に計測した結果をグラフに示す。どの群においても経時的に細胞数が増加していたがLIPUSの有、無しによる細胞数の変化には統計学的有意差は認めなかった。

本実験条件である単層培養時の軟骨細胞への超音波刺激は、細胞増殖に影響を与えないということは、すでに検証されているためである。また本実験では繰り返し周波数(RF)の違いによる細胞増殖への影響を検証したが効果は認められなかった。これらのことより、単層培養時における軟骨細胞への超音波刺激は、その繰り返し周波数(RF)が変化しても細胞増殖に影響を与えないと考えられた(図4)。

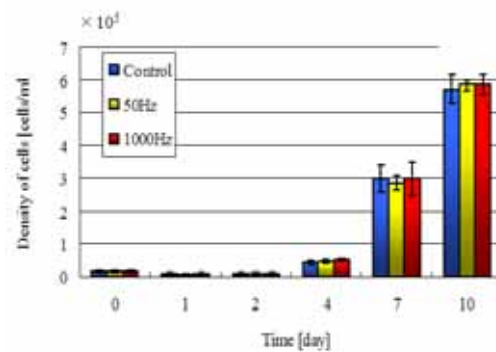


図4 .

3) LIPUS の出力強度 (Po) の変化による影響

Po を 150 mW/cm² | SATP に設定した実では、RF を変化させた場合、RF-500HzにおいてAGCのmRNA発現量はControl群の約168%であった(p<0.01)、RF-500HzにおいてはCOL9のmRNAは約158%であった(p<0.01、図5)。

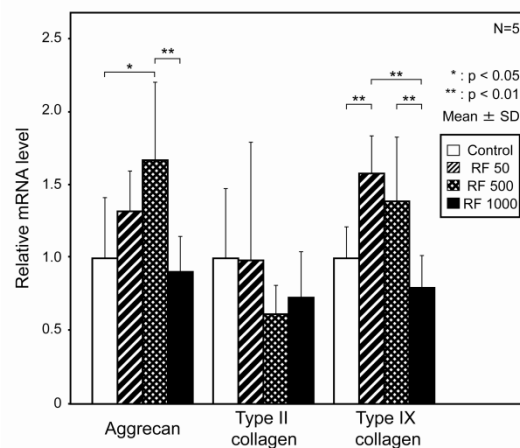


図 5 .

4) LIPUS の繰り返し周波数 (RF) の変化による影響

RF を 1000Hz に設定した Po を変化させた場合 , Po-300 において COL9 の mRNA が Control 群の約 147%であった($p < 0.01$, 図 6)。

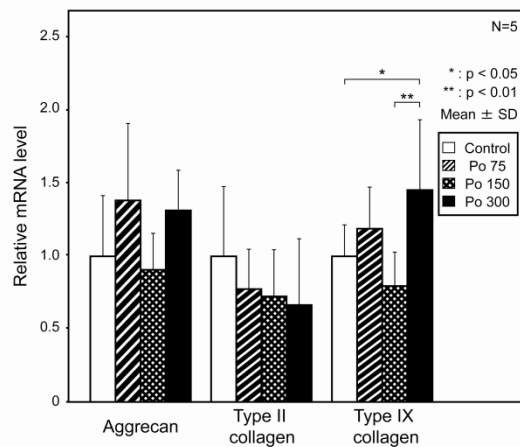


図 6 .

5) PI3K 阻害剤を使用した検証

inhibitor非添加の場合、LIPUS 照射時のアグリカンのmRNA 発現量は非LIPUS 照射群の約1.23 倍であったが($p < 0.05$) , PI3K inhibitor が添加された場合 , LIPUS によって上昇したアグリカンのmRNA の発現量はPI3K inhibitor によって減少した。

一方、MEK1 inhibitor 群では、LIPUS 照射群のアグリカンのmRNA 発現量は非LIPUS 照射群よりも多い傾向にあった。

IX 型コラーゲンのmRNA 発現量に関しては、inhibitor非添加の場合、非LIPUS 照射群とLIPUS 照射時の統計学的有意差はなかった。さらに、PI3K inhibitor、MEK1 inhibitor をそれぞれ添加した群においても、LIPUS 照射群とLIPUS 照射時のIX 型コラーゲンのmRNA 発現量に統計学的有意差はなかった。Fig.5-9において、LIPUSによ

って亢進されたアグリカンのmRNA発現量がPI3K inhibitor により減少した。この結果から、PI3K/Akt 経路を経由した機械的なシグナル伝達がLIPUS によって活性化したことが推測される。しかし、非LIPUS照射群において、PI3K inhibitor の添加の有無によってアグリカンのmRNA 発現に変化はなかったため、アグリカンmRNA 発現のシグナル伝達経路においてはPI3K/Akt 経路以外の経路とクロストークしていることも考えられた(図7)。

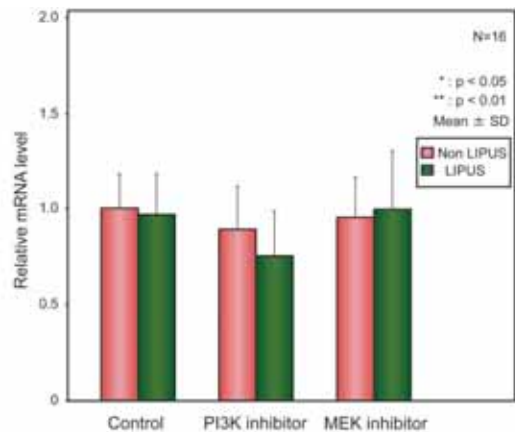
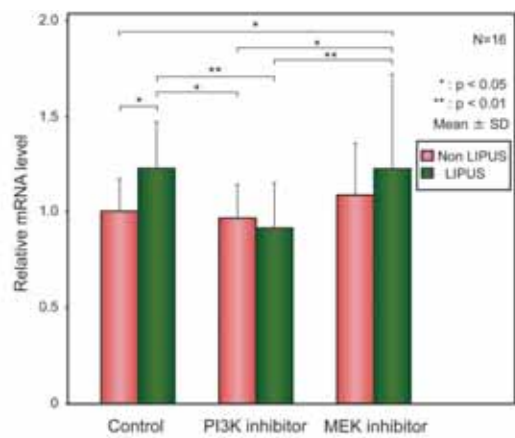


図 7 .

LIPUSによって亢進したアグリカンのmRNAはPI3K/Akt 経路を経由することが考えられる。ただし、inhibitor非添加の場合、非LIPUS照射群とLIPUS照射のIX 型コラー

ゲンのmRNA 発現量に統計学的有意差はなかったことから、LIPUS によるIX 型コラーゲンmRNA 発現量の亢進におけるシグナル伝達経路は特定できなかった。これは、各mRNAの発現に対するLIPUSの照射の実験条件が原因であると考えられる。本実験は、長期間のinhibitor 使用が細胞にとって悪影響であることを考慮し、過去の論文に記載されたWatabeらが行った骨芽細胞様細胞への連日にわたるLIPUS応答実験をもとに行った。本実験では、LIPUS を7 日目に1 度照射し、さらに翌日再度照射した。アグリカンのmRNA発現は1度のLIPUS照射による影響を受けやすく、一方IX 型コラーゲンのmRNA 発現は1 度のLIPUS 照射による影響を受けにくく、連日にわたり力学的刺激が加えられることで発現量に差が生じたのではないかと考えられる。

今回の研究の結果を模式図で表すと図8 ようになる。

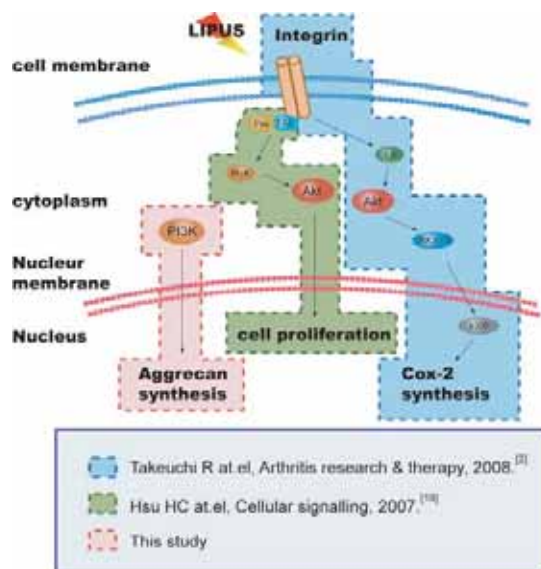


図8 .

5 . 結論

1)繰り返し周波数 50Hz,500Hz,1000Hz と出力強度 75 mW/cm²|SATP , 150 mW/cm²|SATP , 300mW/cm²|SATP を持った LIPUS を使用して、軟骨細胞に対する LIPUS の影響を検証した .

2) 出力強度を固定した場合 ,繰り返し周波数が500HzではAGC, 50HzではCOL9 がそれぞれ亢進した .

3) 繰り返し周波数を固定した場合 ,出力強度 300 mW/cm²|SATP のみが COL9 に対して影響を与えた .

4) LIPUS によって亢進した AGC の mRNA の発現は PIK inhibitor によって減少した .

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 1 件)

1) 鈴木良啓, 竹内良平, 高垣裕子, 白石俊彦, 福井厚子, 森下 信. 低出力パルス超音波の繰り返し周波数および出力強度の変化が軟骨細胞に与える影響 . 日本足の外科学会誌 . Vol. 33 (1): in press, 2012 .

[学会発表](計 2 件)

1) Y. Suzuki, R. Takeuchi, Y. M. Takagaki, T. Shiraishi, A. Fukui, S. Morishita. Influence of the difference in repetition frequency and intensity of low intensity pulsed ultrasound for cultured chondrocytes. OARSI, 2011, Sandiego, USA.

2) 鈴木良啓, 竹内良平, 高垣裕子, 白石俊彦, 福井厚子, 森下 信. 低出力パルス超音波の繰り返し周波数および出力強度の変化が軟骨細胞に与える影響 . 第 38 回日本足の外科学会 . 2011 , 奈良 .

[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：

研究者番号：

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

竹内良平（ RYOHEI TAKEUCHI ）
神奈川歯科大学・歯学部・特任教授
研究者番号：30236442

(2) 研究分担者

高垣裕子（ YUKO TAKAGAKI ）
神奈川歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：60050689

森下 信（ SHIN MORISHITA ）
横浜国立大学・環境情報工学院・教授
研究者番号：80166404

青田洋一（ YOICHI AOTA ）
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：40363824

熊谷 研（ KEN KUMAGAI ）
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：10468176

(3) 連携研究者