

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20日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890122

研究課題名（和文）超音波パルス微細振動による基質代謝活性の制御技術を応用した顎関節軟骨再生治療

研究課題名（英文）The Regenerative Medicine in Mandibular Condylar Chondrocytes by The Application of Control Technology of Low-intensity Pulsed Ultrasound on the Matrix Metabolism

研究代表者

岩渕 泰憲（IWABUCHI YASUNORI）

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：30580906

研究成果の概要（和文）：

ラット顎関節軟骨に対する過開口刺激は、軟骨間葉層に IL-1 β の分泌を促進し、軟骨表層のヒアルロン酸と硝子軟骨層のプロテオグリカンを減少させた。一方過開口モデルラットに対する LIPUS 照射により、非照射群に比べて IL-1 β の減少、プロテオグリカンの増加が認められた。LIPUS の IL-1 β 抑制経路について、LIPUS は炎症下で integrin を活性化することにより ERK-1/2 および COX-2 の亢進を抑制し、IL-1 β を抑制するという経路が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Stimulation over the opening cartilage for temporomandibular joint in rats, promote the secretion of IL-1 β in the mesenchymal layer of cartilage, reduced the proteoglycan of hyaline cartilage layer of the surface cartilage and hyaluronic acid. By irradiation of a rat model of LIPUS for the opening over, a decrease in IL-1 β compared to the non-irradiated group, the increase in proteoglycan On the other hand was observed. Suppressor pathway for IL-1 β of LIPUS, LIPUS pathways inhibited the enhancement of COX-2 and ERK-1/2 by activating integrin under inflammation, called to suppress the IL-1 β has been suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2011 年度	730,000	219,000	949,000
年度			
年度			
年度			
総 計	1,850,000	555,000	2,405,000

研究分野：生体力学、分子生物学、再生医療

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯学、細胞・組織、シグナル伝達、移植・再生医療、再生医学

1. 研究開始当初の背景

従来の研究結果より、LIPUS 照射による

仮骨延長術後の骨再生促進や歯根吸収の抑制効果も報告されている一方、副作用はほ

とんど報告されていない。

応募者らは、出力 150 mW/cm^2 、パルスレート 20%条件の LIPUS 照射が、培養歯根膜細胞およびセメント芽細胞の増殖と基質産生を亢進することを明らかにした (Dalla-Bona D A *et al.*, *Ultrasound. Biol. Med.* 32 (2006) 943-48. ; *Arch Oral Biol*, 53 (2008) 318-23. ; Inubushi T *et al.*, *J Periodontol*, 79 (2008) 1984-90.)。骨芽細胞では、LIPUS 受容体とシグナル伝達に関する検討も進んでおり、インテグリンシグナル伝達系の関与が明らかにされている (Hsu HC *et al.*, *Cell. Signal.* 19 (2007) 2317-28.)。インテグリンファミリーは細胞表面に局在し、レセプターとして機能する他、細胞—細胞間、細胞—細胞外基質間の接着、細胞内マイクロフィラメントへの結合にも関与し、細胞内外への物理的刺激に反応して活性化することが示唆されている。実際に、セメント芽細胞を用いた我々の検討においても、LIPUS 照射によってインテグリン $\beta 1$ 、 $\beta 3$ の発現の亢進と活性化が認められた (図 2)。このように、インテグリンは細胞同士、あるいは細胞外基質への接着に関与していることから、移植治療時の移植体の定着を高めるために、インテグリンの活性化は有意義であると考えられる。

一方、関節軟骨細胞は、関節への機械的負荷を感知し、軟骨基質や潤滑物質の産生を調節することにより、潤滑や緩衝などの関節機能を維持していることが知られており、LIPUS 刺激に対しても何らかの反応を生じる可能性が高いと推察された。そこで、培養顎関節軟骨細胞に対する LIPUS の効果を検討するための予備実験を行ったところ、出力 30 mW/cm^2 、パルスレート 20%条件の LIPUS 照射により、軟骨基質の産生亢進および分解酵素活性の抑制が認められた

ことから、LIPUS には軟骨基質代謝のバランスを基質合成に向ける効果があると考えられた。また、他の細胞と同様に、インテグリンを介して LIPUS を受容している可能性が高い。しかしながら、関節に対する LIPUS 照射単独の効果により、一定以上の損傷を受けた軟骨組織を修復することは困難であると予想される。その理由として、関節軟骨は虚血管性組織であり、細胞密度も低く、元々自己修復能力に乏しいことが挙げられる。このような背景から、軟骨組織の修復のためには細胞移植による再生療法の適用が必要であることが示唆され、LIPUS 照射と細胞移植とを併用して相補的な治療効果を創出し、顎関節軟骨再生療法としての確立を目指した本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、顎関節軟骨の欠損部に対する自家培養軟骨移植における LIPUS 照射の治癒促進効果を検証し、治療術式を確立することである。そのために本研究では、傷害細胞および組織に対する LIPUS 照射の影響を検証する。第一に変形性顎関節症における主要な炎症性物質である IL-1 β を添加することにより傷害された軟骨細胞に対する LIPUS 照射の影響について検討し、さらに軟骨細胞に対する LIPUS 照射の効果が偶然ではなく、科学的根拠に基づく有効な方法であることを証明するため、インテグリンを中心とする細胞内のシグナル伝達経路を解明する。第二に、機械的外力により変形性顎関節症を誘発したラットの変形性顎関節症組織を構成する基質に対する LIPUS 照射の影響について検討する。

3. 研究の方法

1. ブタ顎関節由来培養軟骨細胞を用いた

IL-1 β 添加下の関節軟骨細胞に対する LIPUS 照射時の軟骨基質(代謝関連遺伝子)発現の検討

2. ラット過開口モデルを用いた LIPUS 照射の治癒促進効果の検討

3. ブタ顎関節由来培養軟骨細胞に対する LIPUS 照射時の軟骨基質発現の検討と IL-1 β 添加下の LIPUS によるシグナル伝達機構の解明

実験には、ブタ顎関節由来軟骨細胞を使用する。Lin らの方法 (LinYY. *et al.*, *Ann Biomed Eng*, 2009) に従い、6 ヶ月齢ブタ下顎頭軟骨層から軟骨細胞を単離・培養し、LIPUS 照射を行う。予備実験の結果から、照射条件は出力 30 mW/cm²、パルスレート 20%、照射周波数 3 MHz とする。

(1) 培養軟骨細胞における II 型コラーゲン、アグリカンなどの軟骨マーカーの遺伝子発現を現有の定量 PCR (Light cycler system) を用いて定量的に比較検討し、細胞の phenotype を確認する。細胞増殖能は、ELISA BrdU assay (Roche Diagnostics)にて検討する。

(2) インテグリン β 1、 β 3 の遺伝子発現について、定量 PCR を用いて定量評価する。また、リン酸化インテグリン β 1、 β 3 蛋白の発現について、現有の Odyssey[®] Western Blot Analyzer (LI-COR Bioscience)を用いた定量 Western blot 解析により検討する。

(3) 軟骨基質代謝に対する LIPUS 照射の効果における、インテグリン β 1、 β 3 の関与の有無を検討する。抗 β 1、 β 3 モノクローナル抗体を 20 μ g/ml 存在下で、培養軟骨細胞に対して LIPUS 照射を行い、実験 1(1)と同様の方法により、細胞増殖能および軟骨基質代謝への影響を検討

する。

(4) 骨芽細胞においては、LIPUS 照射により Cyclooxygenase-2 (COX-2) / Prostaglandin E₂ (PGE₂)産生誘導を介した基質代謝経路の活性化が示唆されている。そこで、LIPUS 照射後の軟骨細胞における COX-2 / PGE₂ 遺伝子発現および蛋白発現について、定量 PCR および ELISA 法により検討する。

(5) インテグリン β 1、 β 3 活性化後の可能性のあるシグナル伝達経路 MAPK,MEK,JNK,Akt のリン酸化の検討を行う。LIPUS 受容後の各シグナル経路の活性化について、現有の Odyssey[®] Western Blot Analyzer を用いた定量 Western blot 解析により検討する。さらに、密閉型デジタル蛍光顕微鏡により、シグナル伝達経路のリン酸化蛋白の発現をリアルタイムに蛍光観察する。さらに、主要なシグナル伝達経路として可能性のある、ILK-MEK-ERK 経路について検討を行う。ERK 経路の遮断のため、MARK/MEK1/2 kinase (MEK1/2) の阻害剤 U0126 (Sigma Aldrich) 存在下において LIPUS 照射を行い、実験 1 (1)と同様の方法により、細胞増殖能および軟骨基質代謝への影響を検討する。

研究の総括 上記の研究成績について総括を行い、LIPUS 照射が下顎頭における軟骨移植の予後に及ぼす影響を明らかにする

4. 研究成果

ラット顎関節軟骨に対する過開口刺激は、軟骨間葉層に IL-1 β の分泌を促進し、軟骨表層のヒアルロン酸と硝子軟骨層のプロテオグリカンを減少させた。一方過開口モデルラットに対する LIPUS 照射により、非照射群

に比べて IL-1 β の減少、プロテオグリカンの増加が認められた (図 1-1, 図 1-2)。

LIPUS の IL-1 β 抑制経路について、LIPUS は炎症下で integrin を活性化し、IL-1 β によって活性化されている経路の中で、とりわけ ERK-1/2 の亢進を抑制することがわかった(図 2)。

さらに、ERK1/2 の下流である COX-2 の亢進を抑制するという経路が示された(図 3)。

LIPUS のヒアルロン酸に対する作用については、徳島大学の中村、田中らによる論文があるが (引用)、LIPUS のプロテオグリカン代謝に対する直接的な作用についてはさらなる検討が必要である。

図1-1 LIPUSが軟骨基質の変化に与える影響

過開口群においては、下顎頭軟骨層におけるトリジンブルー染色はほとんど見られなかったことから、軟骨基質が減少していることが示された。一方、過開口+LIPUS照射群では、トリジンブルーによる染色が認められた(図1-1)。

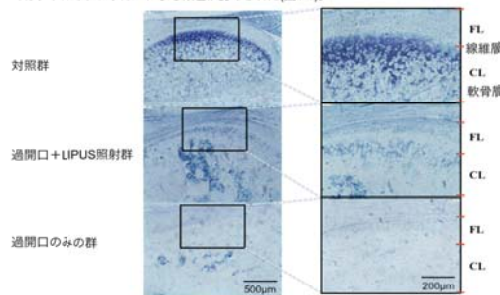


図1-1 ラット過開口モデルに対するLIPUSの影響 (トリジンブルー染色)

図1-2 LIPUSがIL-1 β の変化に与える影響

対照群ではほとんど染色されないのに対し、過開口のみの群では線維層と軟骨層の間に IL-1 β の発現分布が確認された (図1-2 赤線部分)。一方、過開口+LIPUS照射群においては IL-1 β の発現は境界部にわずかに認められるのみであった。

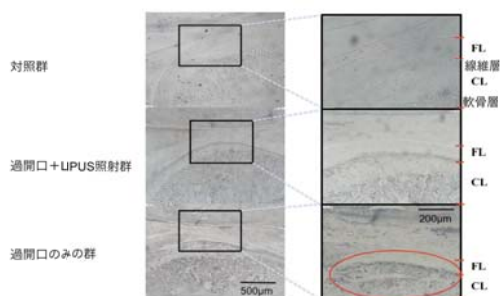


図1-2 ラット過開口モデルに対するLIPUSの影響 (IL-1 β 免疫染色)

図2 integrin β 1およびERK1/2のリン酸化に対するLIPUSの影響

LIPUS照射によるp-integrin β 1タンパク質の増加が確認された。また、US(-)群において IL-1 β 添加によるp-ERK 1/2タンパク質発現の増加と、US(+)群において照射直後のp-ERK 1/2タンパク質発現の増加、照射10-20分後にはIL-1 β 添加によるp-ERK 1/2タンパク質発現増加の抑制が確認された (図2)

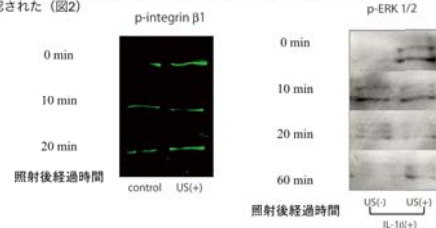


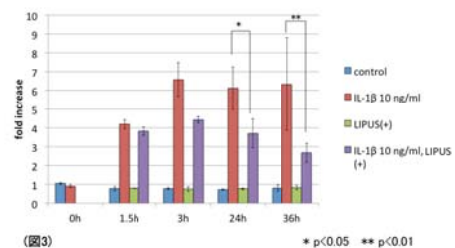
図2 下顎頭軟骨細胞に対するLIPUS照射がintegrin β 1およびERKのリン酸化に及ぼす影響

図3 IL-1 β により誘導されたCOX-2遺伝子発現に対するLIPUS照射の影響

IL-1 β (10 ng/ml)添加直後にLIPUS照射し、COX-2遺伝子発現に対するLIPUSの影響を検討した。

IL-1 β 前処置により誘導されたCOX-2遺伝子発現はLIPUS照射により抑制され、24時間後ならびに36時間後において有意に抑制された (図3)。

IL-1 β により誘導されたCOX-2遺伝子発現に対するLIPUS照射の影響



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 1 件)

1.岩淵 泰憲

退行性変性を呈する下顎頭軟骨に対する低出力超音波 (LIPUS) 照射の影響について
第 69 回日本矯正歯科学会 2010/9/28 横浜

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩淵 泰憲 (IWABUCHI YASUNORI)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：30580906

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者