

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792177

研究課題名(和文)低出力パルス超音波刺激を用いた早期骨再生法の開発

研究課題名(英文)Effect of low intensity pulsed ultrasound on bone formation.

## 研究代表者

小宮山 雄介(Yuske, Komiyama)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：90586471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低出力超音波パルス刺激(LIPUS)は骨芽細胞等に直接作用してその分化を促進することで、骨形成を促進することが知られている。本研究では、骨代謝の重要な担い手である骨芽細胞と破骨細胞に対するLIPUSの作用機序の解明を目指した。LIPUSは破骨細胞前駆細胞から単独刺激では分化誘導効果はないが、分化誘導刺激存在下では無刺激と比較して分化誘導を増強した。骨代謝は骨芽細胞および破骨細胞の双方からのシグナル伝達によりカップリングが起こるが、LIPUSでの骨形成促進作用には破骨細胞-骨芽細胞のシグナル伝達も重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Low intensity pulsed ultrasound stimulation is known to directly stimulate pre-osteoblastic cells to osteoblastogenesis, though increase the bone formation. In this study, we aimed to investigate the effect of LIPUS on bone metabolism, including effects on both osteoblasts and osteoclasts. LIPUS could enhance the osteoclastogenesis of pre-osteoclast under the addition of differentiation factor. Bone metabolism is understood to be controlled through signaling from both osteoblasts and osteoclasts. Osteoclast-to-osteoblast signaling may be also have important roll in the effect of bone formation by LIPUS.

研究分野：口腔外科学

キーワード：低出力超音波パルス 骨芽細胞 破骨細胞 骨代謝

## 1. 研究開始当初の背景

上顎骨急速側方拡大法は、唇顎口蓋裂を始めとする顎顔面領域の先天性形態異常に伴う不正咬合を是正する一つの手手段であり、その手術方法は多くの研究をもとにいくつかの術式に集約され、確立された。上顎骨急速側方拡大法をはじめ、顎矯正手術では後戻りが起こる事が大きな問題であり、様々な後戻り抑制方法が試されている。後戻りを抑制するにはより早期に骨癒合が起こる事が必要である。低出力パルス超音波処置 (LIPUS) は長管骨を始めとする骨折治療において骨治癒を早める事が示され、多くの研究者により骨折断端での骨形成促進能を認める事が確認されている。しかし、顎骨におけるLIPUSの有効性は未だ研究途上の段階にある。Xie LKらはウサギを用いた下顎骨の仮骨延長法モデルを作製し、LIPUS処置により骨形成促進される事を組織学的に示している (Int J Oral Maxillofac Surg.2011.40(7):730-736)。また、Watabe Hらはマウス下顎骨由来骨芽細胞を用いて、LIPUS処置により骨形成に関わる遺伝子発現が増強される事実を示している (Exp Cell Res.2011.317(18):2642-2649)。LIPUSは超音波により物質の振動をもたらす。この振動が機械的刺激となって、局所の未分化な細胞を骨芽細胞へと分化促進する事、また分化した骨芽細胞に作用して骨基質形成を促進する可能性が示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムはあきらかにされていない。

LIPUSが急性/陳旧性骨折の治療に有効である事は既に1990年代には証明されており、アメリカ合衆国においては1994年に新鮮骨折例に対して、2002年には陳旧性骨折に対しての処置にLIPUSを用いる事が認可されている。我が国では2003年に骨折治療にLIPUSを

応用する事が認可されているが、顎顔面領域での応用は臨床では我が国においても、海外においてもなされていない。

顎顔面の組織は咀嚼という日常の食生活において欠く事のできない機能を司っている。急速側方拡大法をはじめ顎骨に対する手術では術後に咬合不安定となる期間が生じ、患者の栄養管理上不利となる事も問題となる。手術後の治癒促進は、顎顔面領域に問題を抱える患者にとっては治療期間短縮する事でより早期に安定した咬合を提供できるようになる可能性が強く、実現可能性が高い治療技術として開発が望まれるものであると思われる。

近年、外科手術支援下の急速側方拡大法は比較的安全で確立した手術方法として受け入れられている。唇顎口蓋裂や顎変形症に伴う上顎低形成に伴う不正咬合の是正方法として行われている。手術方法の確立により、急速側方拡大法による不正咬合の是正は成功率の高い治療方法となったが、治療期間が長い事、また治療期間中の咬合不安定性を生じる可能性など、依然として課題を残す治療方法でもある。治療期間中に生じる問題としては骨片の移動後の後戻りがあげられる。この問題もまた、骨片の骨癒合に至る期間を短縮する事で予防する事ができると考えられる。LIPUSはすでに大腿骨を始めとする長管骨における骨折治療において骨形成促進による治療期間の短縮に寄与する事が示されている。このことからLIPUSを顎矯正手術後に応用する事で骨形成促進し、治療期間を短縮できる可能性を考え本研究の着想に至った。

## 研究

### 2. 研究の目的

顎矯正手術では、骨切り後の顎骨の不安定性から咬合関係が不安定になる事が

しばしば問題となる。本研究では、近年整形外科領域での骨折治癒において早期骨形成に貢献する事が知られている低出力パルス超音波処置 (LIPUS) を用い、顎矯正手術後の咬合安定に要する治療期間を短縮させる治療法の開発を目指す。そのために LIPUS の顎骨に対する作用機序を明らかにする。また、遺伝子治療との併用により早期に新生骨形成をもたらす治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

1) *in vitro* で骨芽細胞、破骨細胞へそれぞれの分化促進因子存在下に培養し、LIPUS を与えた場合と与えない場合でそれぞれの分化マーカー遺伝子の発現を検討した。

2) 骨芽細胞分化を ALP 染色で、破骨細胞を TRAP 染色を行い、分化時に特徴的なタンパク発現が起こるかどうかを評価した。

3) *Ex vivo* での LIPUS 効果の検討として生後 1 日齢の C57Bl/6J マウスの頭蓋骨期間培養を行い、LIPUS 刺激の有無による骨形成効果を検証した。

4) 破骨細胞分化誘導を増強する作用は当初の予想を超えた結果であったため、骨芽細胞分化に重要と考えられる因子の発現をリアルタイム RT-PCR 法で検索した。

### 4. 研究成果

1) LIPUS の破骨細胞分化促進効果について

骨芽細胞に対する LIPUS 刺激は先行研究と同様に Osteogenic medium での培養下で骨芽細胞分化を促進することが確認された。

破骨細胞に対する LIPUS 刺激では分化誘導因子である RANKL の存在下に培養した場合に LIPUS 刺激により分化誘導が増強されることが観察された。具体的には、破骨細胞の分化マーカーとして TRAP,

Ctsk, Itgb3 の発現が上昇することが認められた。また、分化した破骨細胞数も増加することが認められた。

2) *Ex vivo* での骨形成促進作用の検証

生後 1 日齢のマウス頭蓋骨を器官培養し、LIPUS 刺激の有無による骨形成状況を確認したところ、LIPUS 刺激を行なった場合に、頭蓋骨の形態が維持され、骨の厚みが増すことが確認された。この *ex vivo* 系では分化誘導因子を培養中に添加していないことから、内因性のシグナル存在下の状況で LIPUS 刺激の効果を観察していると考えられ、骨芽細胞および破骨細胞の双方に作用した結果、骨代謝回転が促進し、骨添加が起こる可能性が示唆された。この結果について、現在組織学的にさらに検討している。

3) 破骨細胞-骨芽細胞カップリング因子について

前述の結果を踏まえて、LIPUS 刺激による骨形成作用には、破骨細胞も重要な役割を果たしている可能性が予測されたため、当初の研究計画とは方向が異なるものの、破骨細胞から分泌される破骨細胞-骨芽細胞カップリング因子の存在について検討を進めていくこととした。骨芽細胞に対して発生時のスイッチング機構として働くことが考えられているヘッジホッグシグナルが先行研究により破骨細胞分化時に発現上昇することが示唆されており、本研究でもその発現を確認することとした。その結果、先行研究と同様に *Ihh*, *Shh* の発現を上昇させていることが確認され、さらに *Ptch1*, *Disp1* の発現も上昇することが確認された。この結果は、破骨細胞による骨吸収後に骨添加を促すために周囲の骨芽細胞を動員するというカップリング機構の仮説に合致するものと考え、今後さらに検討を加えて

いく予定である。

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 件)

該当ありません。

〔学会発表〕(計 1件)

1) 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術

集会, 低出力超音波パルス刺激による

破骨細胞分化促進効果について, 小宮

山 雄介, 安部 貴大, 平成 26 年 5

月 8-9 日, 東京

〔図書〕(計 件)

該当ありません。

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

該当ありません。

取得状況(計 件)

該当ありません。

〔その他〕

ホームページ等

該当ありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮山 雄介 (KOMIYAMA YUSKE)

獨協医科大学医学部口腔外科学講座・助教

研究者番号: 90586471

(2) 研究分担者

該当ありません。

(3) 連携研究者

安部 貴大 (ABE TAKAHIRO)

東京大学医学部附属病院顎口腔外科歯科

矯正歯科・講師

研究者番号: 20383250