

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890162

研究課題名(和文)微小振動刺激による骨形成促進作用のメカニズム解明に関する研究

研究課題名(英文)The study on mechanism elucidation for the effects of small vibration stimuli on bone formation

研究代表者

河野 高志 (Kono, Takashi)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：70636068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：振動刺激による骨形成促進作用は近年注目を集めているが、そのメカニズムについて言及したものは少ない。そこで本研究では遺伝子発現量の解析によって、そのメカニズムの一端を解明することを目的とした。

ラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞に対して高周波・低振幅の微小振動刺激を行ったところ、骨形成促進因子の有意な増加、および骨形成抑制因子の有意な減少が認められた。

しかし、マウス骨細胞株MLO-Y4を用いて同様の振動刺激を与えたところ、有意に発現が変化した遺伝子は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The effects of small vibration stimuli on bone formation have been reported. The present in vitro study assessed the effect of low-magnitude, high-frequency (LMHF) vibration stimuli for bone formation on gene expression.

In the rat osteoblast-like cells, LMHF vibration stimuli can enhance the bone formation by increasing some factors which accelerate bone formation and decreasing the factor which inhibits bone formation.

However, in the mouse osteocyte (MLO-Y4), no gene significantly changed between control group and vibration group.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：インプラント 振動刺激 骨形成促進

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療はその高い成功率から欠損補綴治療の主要な選択肢の一つとして確立されている。しかし、一般的には3~6か月程度の免荷期間を要する上、インプラント埋入に先駆けて抜歯や骨移植等の治療を行った場合はこれらの治癒を待たなければならず、治療期間が長期におよぶ点が大きな欠点となっている。埋入後即時荷重などの方法で治療期間の短縮が図られているが、十分な骨量・骨質や高度な技術が必要であるため、広く適応可能な手技による治療期間の短縮が求められている。

一方、骨組織は機械的刺激に対する感受性が高く、増負荷によって骨形成が促進され、逆に減負荷によって吸収されることが知られている。中でも微小な振動刺激による適度なメカニカルストレスは骨組織の治癒促進が期待でき、例えば超音波による振動刺激が骨形成を促進することは過去に報告(Hadjiargyrou et al, 1998)され、整形外科において骨折治療に臨床応用されている。

今回その微小振動のひとつである高周波・低振幅の振動刺激(Low-Magnitude High-Frequency vibration: LMHF 振動刺激)に着目した。歯科領域における骨欠損治療では整形外科領域と比較して骨片の接触状態や血流量など創部の条件が悪いことを考慮し、超音波よりも減衰が少なく、より深部組織への到達が期待できる LMHF 振動のほうが有利であると考えたためである。

LMHF 振動刺激の効果については羊大腿骨の海綿骨密度上昇(Rubin et al, 2001)、羊脛骨の骨折治癒促進(Goodship et al, 2009)、ラット脛骨のインプラント周囲骨治癒促進(Ogawa et al, 2011)など様々な報告がなされており、我々もラットの抜歯窩治癒促進に寄与することを見出し、報告している。(Kono et al, The effect of low-magnitude, high-frequency vibration stimuli on the bone

healing of rat incisor extraction socket. Journal of Biomechanical Engineering, Volume 134, Issue 9, 091001, 2012)

しかしながら、そのメカニズムについては骨細胞と骨芽細胞にメカニカルストレスを受容するメカノセンサーが存在し、ストレスによって発現した遺伝子が骨芽細胞の増殖および分化を誘導するとされているが、詳細は明らかになっていない。特に LMHF 振動刺激に応答する遺伝子発現については、これまでに報告されていない。メカニズムの解明を行うことで、より効果的な刺激方法を検討すると共に、臨床応用へ向けたより強固なエビデンスを得ることができると考えられる。また、その結果は治療期間の短縮につながり、患者の QOL 向上に寄与すると考えられる。

そこで本研究では、メカニズムの解明という観点から LMHF 振動刺激が遺伝子発現へ与える影響を検討することとした。

2. 研究の目的

培養実験において、LMHF 振動刺激によって発現が誘導される遺伝子を検討し、LMHF 振動刺激による骨形成促進効果のメカニズムの一端を解明すること。

3. 研究の方法

(1) まず当研究室で培養方法が確立されているラット骨髄由来骨芽細胞様細胞を用いて実験を行った。

ラット脛骨より骨髄細胞を採取し、分化誘導培地にて骨芽細胞へ分化誘導を行った。Alkaline Phosphatase 染色にて分化を確認した後、コントロール群と振動群に分類し、振動群には LMHF 振動刺激を与えた。刺激条件は先に行った動物実験の結果を参考に周波数 50Hz、振幅 0.2mm p-p、加速度 1.0G、1hour/day、1weeks とした。刺激後に total RNA の抽出、cDNA の合成を行い、real time RT-PCR array 法を用いて骨形成に關与する 84 遺伝子について発現量の定量的解析を行

った。

(2) 次にメカニカルストレス受容の主とされている骨細胞における反応を検討するためにマウス骨細胞株 ML0-Y4 を用いて実験を行った。

刺激条件について再度検討を行うために、これまでの実験結果や過去の文献を参考とし、vib1(周波数 50Hz ,振幅 0.05mm p-p , 加速度 0.25G ,1hour/day) ,vib2(周波数 50Hz , 振幅 0.2mm p-p , 加速度 1.0G , 1hour/day) vib3 (周波数 50Hz , 振幅 0.2mm p-p , 加速度 1.0G , 20min/day) の 3 群の比較を行った。3 日間刺激を行った後、real time RT-PCR array法を用いて骨形成に関与する 84 遺伝子について発現量の定量を行った。

実験の結果および過去の文献より振動刺激の条件を 1 群 (周波数 50Hz , 振幅 0.2mm p-p , 加速度 1.0G , 20min/day) とし、非振動のコントロール群との 2 群についてマイクロアレイ法による遺伝子発現の定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 解析の結果、実験群における遺伝子発現量がコントロール群と比較して、1.5 倍以上に増加したものの、あるいは 1/2 以下に減少したものの一部を[表 1]に示す。

[表 1]

骨形成に関与する遺伝子の発現量		
遺伝子名	コントロール群	振動群
TGF- 1	1	2.03
SMAD 1	1	1.82
BMP- Receptor 1B	1	1.72
SMAD 4	1	1.69
SMAD 2	1	1.51
TGF- Receptor 2	1	1.50
BMP 3	1	0.44
Sclerostin	1	0.39

結果より、TGF- /Smad シグナル伝達経路に関与する TGF- receptor2 , Smad2 , 4 の増加が見られた。このシグナル伝達経路は標的遺伝子の発現を調節することで細胞の増殖や

分化に多彩な作用を示し、骨形成に促進的に作用することが知られている。さらに、TGF- 1 の発現亢進も見られることから、TGF- による Smad シグナリングはオートクリン的に作用していることが示唆された。加えて、BMP も TGF- と同様に Smad を介したシグナリングトランスダクションが知られているが、今回の解析ではこの経路に促進的に作用する BMP receptor-1B と Smad1 の発現亢進が見られた。その他には Sclerostin および BMP3 の発現低下が見られるが、Sclerostin は BMP family と、BMP3 は BMP receptor と結合することで、BMP/Smad シグナル伝達経路を抑制することが知られている。また、Sclerostin は間葉系幹細胞から軟骨細胞と脂肪細胞への分化を抑制し骨芽細胞と骨細胞への分化を促進する作用で知られる Wnt シグナル伝達経路の阻害因子としての作用などもあり、このような骨形成抑制因子が振動刺激によって減少することで、結果として骨形成が促進されているものと考えられる。なお、Sclerostin は力学的負荷反応のメディエーターとされており、過去の文献では機械的刺激を受容した骨細胞によって Sclerostin が抑制されるという本研究の結果と類似する報告もされている。

(2)

実験結果の一部を[表 2]に示す。

[表 2]

各刺激条件における遺伝子発現量 (Ct値)			
遺伝子名	vib1	vib2	vib3
TGF- 1	27.336	26.441	26.688
SMAD 4	28.241	26.283	26.795
SMAD 2	30.247	28.109	28.391
TGF- receptor2	30.531	28.227	28.912
BMP 3	33.849	33.657	33.130
Sclerostin	32.332	31.372	31.247

[表 2]は Ct 値を示しており、数値が大きいほど発現遺伝子量が少ないことを示す。結果より各群間にてあまり差は見られなかった。今回の実験では LMHF 振動の刺激の大

きさ（強さ）や時間を変化させて実験を行ったが、それによって結果はあまり左右されないことが示唆された。

過去の文献や の結果を踏まえ、刺激条件を周波数 50Hz, 振幅 0.2mm p-p, 加速度 1.0G, 20min/day とし、非振動のコントロール群と比較した。マイクロアレイ法にて網羅的に遺伝子発現を解析した結果、n 数が少ないという問題はあるものの、LMHF 振動刺激によって有意に発現が変化した遺伝子は見られなかった。

条件が異なるものの、ラット・プライマリー骨芽細胞では有意差が見られたが、マウス・セルライン骨細胞では有意差が見られないという結果となった。しかし、一般的には骨細胞がメカニカルストレスの主な受容細胞とされており、今後はプライマリーの骨細胞を用いた検討が必要と考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

河野 高志 他, 「高周波・低振幅の微小振動刺激が骨形成能に与える影響」, 公益社団法人日本補綴歯科学会 第 121 回学術大会 (課題口演), 2012.5.26, 横浜, 神奈川県 (課題口演賞受賞)

Takashi Kono et al, “The effect of low-magnitude, high-frequency vibration stimuli on gene expression of rat osteoblast-like cells”, 22nd Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration (Poster Presentation), 2013.10.17-19, Dublin, Ireland

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 高志 (KONO, Takashi)

九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 インプラント・義歯補綴学分野

研究者番号: 70636068