



# Osteogenic activities of human fracture haematoma-derived progenitor cells are stimulated by low intensity pulsed ultrasound in vitro

長谷川, 巧実

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2010-06-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4488

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004488>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 長谷川 巧実  
博士の専攻分野の名称 博士（医学）  
学 位 記 番 号 博い第 4488 号  
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
学位授与の日付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Osteogenic activities of human fracture haematoma-derived progenitor cells are stimulated by low intensity pulsed ultrasound in vitro

(多分化能を持つ骨折血腫細胞の骨分化能への低出力超音波パルス(LIPUS)の効果)

審 査 委 員

主 査 教 授 田原 真也  
教 授 丹生 健一  
教 授 南 康博

## [緒言]

骨折を生じた場合、骨折部は炎症期、修復期、再造型期という一連の生体修復反応の連鎖過程を経て治癒する。骨折が起こった直後から始まる炎症期は骨膜、骨皮質および骨髄の損傷を認め、骨折部の転位が大きい場合には周辺の筋肉や血管の損傷も認める。その結果として骨折部を中心に血腫が形成され、骨折間隙を埋める。また、血腫は骨膜の断裂したところから骨外の軟部組織の中にも拡大し、びまん性に骨折部の周辺を取り巻く。過去の報告により、この血腫には様々な Growth Factor (platelet-derived growth factor, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor など) やサイトカイン (IL-1, IL-6) が含まれ、骨折治癒の各過程において重要な働きをしていることは広く知られている。しかし、血腫内に存在する細胞については詳細な検討がなされていなかった。

骨折の観血的治療時には解剖学的整復を行うのに視覚的に障害となる骨折血腫を搔爬、破棄していたが、以前に、我々は、骨折部にできた血腫を観血的骨接合術の際に一部採取し、そこから細胞を分離培養し、細胞解析およびこれらの細胞の多分化能について調査した結果、長管骨骨折血腫中の細胞(骨折血腫細胞)が多分化能を有し、骨髄中の間葉系幹細胞と同様に多分化能を有することを証明している(J Bone Joint Surg [Br] 2007;89-B:133-138)。つまり、骨折血腫細胞を含む骨折血腫が骨折治癒過程において重要である。

一方、低出力超音波パルス(LIPUS)は、1983年に Duarte が報告して以来、骨形成や軟骨形成を促進し、骨折治癒期間や入院期間が短くなるなど、様々な臨床的効果が示されている。しかし、LIPUS の効果を検討する研究の中で様々な細胞が使用されているが、人の細胞を使用した研究は少なく、実際の骨折した組織の細胞(骨折血腫細胞)を使用した研究はない。さらに、実際にヒトの骨折において LIPUS がどのように作用し、骨折治癒がどのようなメカニズムで促進されるかについて現段階では詳細に解明されていない。そこで今回我々は、骨折治癒過程初期において、LIPUS が骨折血腫細胞に作用することで骨癒合が促進されると仮定し、骨折血腫細胞の骨分化能に対する LIPUS の作用を検討したので報告する。

## [方法]

対象は事前に承諾を得た骨折患者 8 人で年齢は 16-41 歳(平均 24.6 歳)。骨折部位は脛骨 5 例、鎖骨 1 例、腓骨 2 例。骨折後 2-10 日(平均 6 日)の時点で採取した骨折血腫(湿重量: 0.4~2.0、平均 1.1g)を用いた。これをメスにて細分化し、phosphate buffered saline にて洗浄し、標準培地 ( $\alpha$ -MEM/10%FBS/2mM:L-glutamine) で培養し、骨折血腫細胞を分離した。分離した細胞を 6well plate に  $5 \times 10^4$ /well で播種後、subconfluent になった時点から、Dexamethasone, beta-glycerol phosphate, Ascorbate-phosphate を標準培地に添加した骨分化培地にて骨分化誘導を行った。control(非照射)群、2日、4日、7日、14日、28日 LIPUS 照射群(出力 30mW/cm<sup>2</sup>、周波数 1.5MHz、繰り返し周波数 1.0KHz、パースト幅 200  $\mu$  sec、20 分間/日)に対して、サンプルを回収した。

### 1.増殖能の比較検討

2日、4日、7日非照射、照射群において、0.05% trypsin-0.02% EDTA 溶液を用いて、骨折血腫細胞を遊離させ、cell countを行い、比較検討した。

### 2.骨分化能の比較検討

#### 1.alkaline phosphatase (ALP) 酵素活性

SenoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit を用いて、cell layer 中の p-nitrophenol を測定した。同様に BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Co, Rockford, IL)を用いて、蛋白を測定し、ALP 酵素活性を補正した。

#### 2.osteocalcin 濃度

測定 24 時間前に  $10^{-8}$  mol/l  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$  を培養液に加え、上清中の osteocalcin を Gla-OC Competitive enzyme immunoassay (EIA) Kit (TaKaRa, Shiga, Japan)にて測定した。

#### 3. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)による mRNA の発現

RT-PCR による mRNA (bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), runt related gene 2 (Runx2), Osterix (OSX), parathyroid hormone receptor (PTH-R))の発現を測定した。また、geneglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の band intensity で割り、上記発現の強度を補正した。

#### 4.alizarin red S 染色

28 日非照射、照射群において、alizarin red S 染色を行い、その色素を 10% etylpyridinium chloride で抽出し、吸光度計にて測定し、比較検討した。

すべての測定結果は Stat View-J 4.5 software (HULINKS Inc., Tokyo, Japan)で、5%の有意差検定を行った。

## [結果]

ALP 酵素活性は、2日、4日、7日、14日 LIPUS 照射群で有意に高値を示した。Osteocalcin 濃度は 4日、7日、14日、28日 LIPUS 照射群で有意に高値を示した。RT-PCR (BSP, OPN, Runx2, OSX, PTH-R)はいずれも 2日、4日、7日、14日、28日 LIPUS 照射群で有意に高値を示した。alizarin red S 染色では 28日 LIPUS 照射群で有意に高値を示し、著明に石灰化していた。cell count では、2日、4日、7日において、両群に有意な差はなかった。

## [考察]

今回、我々は初めてヒトの骨折血腫細胞において LIPUS が骨分化を促進することを *in vitro* で証明した。ALP 酵素活性、Osteocalcin 濃度、RT-PCR (BSP, OPN, Runx2, OSX, PTH-R), alizarin red S 染色で、いずれも LIPUS 照射群が有意に高値を示し、骨折血腫細胞の骨分化能は LIPUS によって上昇すると考えられた。骨形成促進に関する LIPUS の作用機序は未だ詳細には解明されていないが、本研究により、骨折治癒過程において、LIPUS が血腫細胞に作用し、骨癒合などの促進に関与している可能性が示唆された。また、Runx2 や OSX の発現の上昇により、骨形成が促進する可能性が示された。

LIPUS による増殖能の影響については、未だ議論の余地のあるところだが、本研究においては、cell count では、有意な差はなかったことから、骨折血腫細胞の増殖能は LIPUS による影響を受けないことが示された。

現在、骨折治療において、実際に LIPUS が使用されており、その臨床的効果は十分に示されている。この *in vitro* 研究により、ヒトの骨折治癒促進作用に対する LIPUS の作用機序の一部が解明されたと考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1979 号	氏 名	長谷川 巧実
論文題目 Title of Dissertation	Osteogenic activities of human fracture haematoma-derived progenitor cells are stimulated by low intensity pulsed ultrasound in vitro 多分化能を持つ骨折血腫細胞の骨分化能への低出力超音波パルス (LIPUS) の効果		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	田原真也	
	副 査 Vice-examiner	南 康博	
	副 査 Vice-examiner	丹生 健一	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【緒言】骨折を生じた場合、骨折部は炎症期、修復期、再造型期という一連の生体修復反応の連鎖過程を経て治癒する。骨折が起こった直後から始まる炎症期は骨膜、骨皮質および骨髄の損傷を認め、その結果として骨折部を中心に血腫が形成され、骨折間隙を埋める。また、血腫は骨膜の断裂したところから骨外の軟部組織の中にも拡大し、びまん性に骨折部の周辺を取り巻く。過去の報告により、この血腫には様々な Growth Factor やサイトカインが含まれ、骨折治癒の各過程において重要な働きをしていることは広く知られている。しかし、血腫内に存在する細胞については詳細な検討がなされていなかった。

骨折の観血的治療時には解剖学的修復を行うのに視覚的に障害となる骨折血腫を掻爬破棄していたが、以前に、申請者らのグループは、骨折部にできた血腫を観血的骨接合術の際に一部採取し、そこから細胞を分離培養し、細胞解析およびこれらの細胞の多分化能について調査した結果、長管骨骨折血腫中の細胞（骨折血腫細胞）が多分化能を有し、骨髄中の間葉系幹細胞と同様に多分化能を有することを証明している(J Bone Joint Surg [Br] 2007;89-B:133-138)。つまり、骨折血腫細胞を含む骨折血腫が骨折治癒過程において重要である。

一方、低出力超音波パルス(LIPUS)は、1983年に Duarte が報告して以来、骨形成や軟骨形成を促進し、様々な臨床的効果が示されている。しかし、LIPUSの効果を検討する研究の中で様々な細胞が使用されているが、人の細胞を使用した研究は少なく、実際の骨折した組織の細胞（骨折血腫細胞）を使用した研究はない。さらに、実際にヒトの骨折においてLIPUSがどのように作用し、骨折治癒がどのようなメカニズムで促進されるかについて現段階では詳細に解明されていない。そこで今回、申請者らのグループは、骨折治癒過程初期において、LIPUSが骨折血腫細胞に作用することで骨癒合が促進されると仮定し、骨折血腫細胞の骨分化能に対するLIPUSの作用を検討した。

【材料及び方法】 対象は事前に承諾を得た骨折患者8人で年齢は16-41歳(平均24.6歳)。骨折部位は脛骨5例、鎖骨1例、腓骨2例。骨折後2-10日(平均6日)の時点で採取した骨折血腫(湿重量:0.4~2.0、平均1.1g)を用いた。これをメスにて細分化し、標準培地( $\alpha$ -MEM/10%FBS/2mM-L-glutamine)で培養し、骨折血腫細胞を分離した。分離した細胞を6well plateに $5 \times 10^4$ /wellで播種後、subconfluentになった時点から、骨分化培地にて骨分化誘導を行った。control(非照射)群、2日、4日、7日、14日、28日LIPUS照射群(出力30mW/cm<sup>2</sup>、周波数1.5MHz、繰り返し周波数1.0KHz、パースト幅200 $\mu$ sec、20分間/日)に対して、サンプルを回収した。

2日、4日、7日非照射、照射群において、0.05% trypsin-0.02% EDTA溶液を用いて、

骨折血腫細胞を遊離させ、cell countを行い、増殖能について比較検討した。

骨分化能の比較検討では、alkaline phosphatase (ALP) 酵素活性、osteocalcin 濃度、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)によるmRNA (bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), runt-related gene 2 (Runx2), Osterix (OSX), parathyroid hormone receptor (PTH-R))の発現を測定した。また、28日非照射、照射群において、alizarin red S染色を行い、その色素を10% etylpyridinium chlorideで抽出し、吸光度計にて測定し、比較検討した。すべての測定結果はStat View-J 4.5 software (HULINKS Inc., Tokyo, Japan)で、5%の有意差検定を行った。

【結果】 ALP酵素活性は、2日、4日、7日、14日LIPUS照射群で有意に高値を示した。Osteocalcin濃度は4日、7日、14日、28日LIPUS照射群で有意に高値を示した。RT-PCR (BSP, OPN, Runx2, OSX, PTH-R)はいずれも2日、4日、7日、14日、28日LIPUS照射群で有意に高値を示した。alizarin red S染色では28日LIPUS照射群で有意に高値を示し、著明に石灰化していた。cell countでは、2日、4日、7日において、両群に有意な差はなかった。

【考察】 今回、申請者らのグループは初めてヒトの骨折血腫細胞においてLIPUSが骨分化を促進することをin vitroで証明した。ALP酵素活性、Osteocalcin濃度、RT-PCR (BSP, OPN, Runx2, OSX, PTH-R)、alizarin red S染色で、いずれもLIPUS照射群が有意に高値を示し、骨折血腫細胞の骨分化能はLIPUSによって上昇すると考えられた。骨形成促進に関するLIPUSの作用機序は未だ詳細には解明されていないが、本研究により骨折治癒過程において、LIPUSが血腫細胞に作用し、骨癒合などの促進に関与している可能性が示唆された。また、Runx2やOSXの発現の上昇により、骨形成が促進する可能性が示された。

LIPUSによる増殖能の影響については、未だ議論の余地のあるところだが、本研究においては、cell countでは、有意な差はなかったことから、骨折血腫細胞の増殖能はLIPUSによる影響を受けないことが示された。

本研究は、ヒトの骨折血腫細胞の骨分化能へのLIPUSの効果について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった。今回の実験で得られた知見は、ヒトの骨折治癒促進作用に対するLIPUSの作用機序の一部が解明されたと考えられ、今後の骨折治療において、重要な役割をはたすものと考えられる。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。