



## The osteogenic activity of human mandibular fracture haematoma-derived cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound in vitro

Imai, Y

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6268号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006268>

※ 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。



課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

The osteogenic activity of human mandibular fracture haematoma-derived cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound *in vitro*

下顎骨骨折血腫由来細胞の骨分化能に対する低出力超音波パルス (LIPUS) の効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
口腔外科学  
(指導教員: 古森 孝英 教授)

今井 佑輔

### 緒言

下顎骨骨折は顔面部骨折のなかで 2 番目に多いとされている。発生学的に下顎骨は膜性骨化を主体としており、下顎骨折治癒形態は軟骨内骨化ではなく膜性骨化が主体と考えられている。膜性骨は骨折後、骨膜由来の間葉系幹細胞が直接骨芽細胞に分化し、石灰化を行っていく。下顎骨治癒過程で軟骨形成すなわち内軟骨性骨化をしていると報告もなされているが、主として膜性骨化ではないかと考えられている。

水野らは長管骨骨折の血腫が治癒に重要な役割を果たしており、内在的に骨形成能を有していると報告している。また、Grundnes らは骨折部の血腫を除去すると骨治癒が損なわれたと述べている。以前、我々の研究では長管骨血腫の中には多官能性間葉系幹細胞 (long bone fracture haematoma-derived cells; LBHCs) が含まれており、血腫は軟骨内骨化、膜性骨化のどちらにも関与していることが示唆されたと報告した。近年、我々は下顎骨骨折部血腫より分離した細胞 (mandibular fracture haematoma cells; MHCs) に骨分化する能力があり、膜性骨化へ寄与していることを明らかにした。さらに MHCs による軟骨形成は、LBHCs よりも劣っていた。これらの結果は、MHCs が下顎骨の治癒形態である膜性骨化を反映していることを示唆している。

低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultra sound; LIPUS) は、組織を破壊することのない非温熱性の超音波で、パルス化した微弱な超音波刺激を非侵襲的に生体外から対象骨に照射することで機械的刺激を与える装置である。一般的に超音波による微小な機械的刺激は骨折治癒を促進することができると知られている。LIPUS は現在臨床的に確立され広く使用されており、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は骨形成を促進するため長管骨骨折や偣関節の治療への使用を承認している。LIPUS は *in vitro* の実験において BMSCs、骨膜細胞や骨芽細胞などの骨分化を促進することが示されているが、下顎骨骨折の LIPUS を使用するための臨床適応がない。LBHCs に LIPUS を照射すると骨分化能が増加したというのは以前我々が示したが、骨折治癒過程には長管骨 (軟骨内および膜内骨化) と下顎骨 (主に膜内骨化) の間で異なることが知られている。現在までに MHCs の LIPUS に対する効果を調査する報告はない。

下顎骨骨折に LIPUS 治療の適用の可能性を探る目的に、MHCs の骨分化能が LIPUS によって増加されるかどうかを評価した。

### 方法

下顎骨骨折血腫は 5 人の患者で、平均年齢が 26.4 歳 (15~65 歳)、受傷後平均 4 日後 (1~7 日) の血腫を採取した。骨折部位は下顎骨正中部 3 例と下顎骨体部 2 例であった。3 ヶ月以内に抗凝固剤、ステロイド、または非ステロイド性抗炎症薬を服用している患者は本研究から除外した。本研究は、神戸大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得ており、すべての患者さんから同意を得た。

創部より採取した下顎骨骨折血腫をメスにて細分化し、シャーレ上の維持培地中に浸し、

分離培養を行った。得られた血腫の平均重量は 1.03g (0.30~1.94g) だった。

LIPUS 照射は帝人ファーマ製の 6well plate 適合型照射装置を使用した。照射設定として出力 30mW/cm<sup>2</sup>、周波数 1.5MHz、繰り返し周波数 1.0KHz、バースト幅 200 μsec の設定で使用し、この設定は帝人ファーマ社製超音波骨折治療器 SAPHIS と同様の設定とした。LIPUS 照射群 (LIPUS (+) 群) では、LIPUS は 37°Cで 20 分間培養プレートの底部を介して 20 日間毎日照射した。6well plate に 1wellあたり 5×10<sup>4</sup>個 MHCs を播種した。コントロール群は LIPUS 非照射群 (LIPUS (-) 群) とした。

- ① 細胞増殖能：播種後 3 日培養した後、細胞増殖能について 0、4、8 日後に cell count 法にて評価した。
- ② 骨分化能：骨分化をかけた後、0、4、8、14、20 日後の RNA を採取し、Real-time PCR 法にて alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), runt-related gene 2 (Runx2), osterix (OSX), osteopontin (OPN), parathyroid hormone receptor 1 (PTH-R1) の骨分化マーカーを計測した。
- ③ 石灰化度：骨分化 20 日目の石灰化度について Alizarin red S 染色を用いて定量を行った。

## 結果

- ① 細胞増殖能：4、8 日目において LIPUS (+) 群と LIPUS (-) 群に有意差は認められなかった。
- ② 骨分化能：ALP に関して 14、20 日目において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群が有意に上昇した。OC に関して 14、20 日目において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群が有意に上昇した。Runx2 に関して 4 日目において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群が有意に上昇した。OSX に関して 4 日目において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群が有意に上昇した。OPN に関して 20 日目において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群が有意に上昇した。PTH-R1 に関して 14、20 日目において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群が有意に上昇した。
- ③ 石灰化度：Alizarin red S 染色において LIPUS (-) 群に比べて LIPUS (+) 群は有意に石灰化度が上昇した。

## 考察

本研究は LIPUS によって MHCs の骨分化能が上昇することを実証した最初の研究である。LIPUS 照射によって MHCs は骨分化マーカー遺伝子発現レベルと石灰化度が有意に上昇されたが、細胞増殖能に関しては影響を受けなかった。

*in vitro* において LIPUS の効果についての報告はいくつか存在する。たとえば、CD-1 マウスの骨芽細胞に LIPUS 照射することで OPN と Runx2 の RNA の発現が上昇したという報告やヒト骨芽細胞に照射することで石灰化上昇、コラーゲン生成上昇、ALP 活性の上昇が報告

されている。ヒトでも動物の細胞でも LIPUS で骨分化促進するという報告がなされており、これらの結果は以前我々が報告した LBHCs に対する LIPUS 照射での骨分化能の上昇と同様の結果である。

細胞増殖能に関して本結果では LIPUS 照射しても MHCs の増殖能には有意差は認めなかつた。いくつかの報告には細胞増殖能が上昇するというものもあるが、影響がないという報告の方が多く、本結果からも細胞増殖能より骨分化能に影響があるという結果となった。

一方で、LIPUS のメカニズムについては未だに不明な点も多いが、いくつかの報告も散見される。Parvizi らは LIPUS 照射することで数秒以内の内に細胞内に Ca<sup>2+</sup>が誘導されることで細胞が刺激され治癒を促進すると報告している。Wang らは BMSCs に照射すると、細胞外シグナル制御キナーゼのリン酸化が増加することで骨分化能が上昇するとしている。Bandow らは心筋細胞の受容体として知られるアンギオテンシン 1 受容体を介して骨分化マーカーが上昇するとしている。

動物モデルの下頸骨骨折に対し、LIPUS を用いた報告がされている。Erdogan らは LIPUS がウサギの下頸骨骨折後の骨治癒を促進したことを示した。三点曲げ試験、デジタル放射線密度測定的分析、組織学的および組織形態学的検査では、LIPUS 照射によって骨強度、密度等が増加したという報告もある。El-Bialy らは LIPUS が仮骨延長術における骨再生を促進したと報告している。Wu らはビーグル犬の下頸小白歯部の水平歯槽骨欠損に対して LIPUS 照射することで骨欠損部治癒を促進する可能性があることを述べている。これらの報告は本結果を支持するものである。

近年、マウスの下頸骨由来骨芽細胞に対して LIPUS 照射することで、ALP や線維芽細胞成長因子 23 などの骨形成マーカーの発現が上昇したと報告された。これらの報告はヒト由来のものではなく、我々の研究は実際の人間の下頸骨骨折部位から分離された細胞 MHCs が LIPUS 照射によって骨分化能が促進されることを明らかにした。

Mathog らの報告では下頸骨骨折の偽関節発症率は 2.8%とされている。同様の報告で、Haug と Schwimmer らは 3.2%、Bochlogyros は 3.9%と報告している。殆どの場合、下頸骨偽関節を生じると、プレート固定、骨ネジ等による再固定手術が必要になる。外科的再アプローチにより患者の QOL が低下してしまう。その点、LIPUS は下頸骨治癒促進に繋がることができるため、再手術を回避できるかもしれない。

本研究では、下頸骨骨折治癒を促進する LIPUS の臨床応用の有用性を示す重要な証拠である。LIPUS の臨床応用は下頸骨骨折治療において臨床成績を改善するために推奨されるべきである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2465 号	氏名	今井 佑輔
論文題目 Title of Dissertation			The osteogenic activity of human mandibular fracture haematoma-derived cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound in vitro 下顎骨骨折血腫由来細胞の骨分化能に対する低出力超音波パルス(LIPUS)の効果
審査委員 Examiner			主査 Chief Examiner 帝人 副査 Vice-examiner 井生 副査 Vice-examiner 飾織 47年
(要旨は1,000字~2,000字程度)			

下顎骨骨折は顔面部骨折のなかで2番目に多いとされている。発生学的に下顎骨は膜性骨化を主体としており、下顎骨骨折治癒形態は膜性骨化が主体と考えられている。膜性骨は骨折後、骨膜由来の間葉系幹細胞が直接骨芽細胞に分化し、石灰化がなされていく。議論の余すところであるが、下顎骨治癒過程は主として膜性骨化ではないかと考えられている。

一方で、長管骨骨折部の血腫に重要な役割を果たしており、内在的に骨形成能を有していると報告されており、長管骨骨折血腫の中には多能性間葉系幹細胞 (long bone fracture haematoma-derived cells; LBHCs) が含まれており、血腫は軟骨内骨化、膜性骨化のどちらにも関与していることが証明されている。近年、研究者は下顎骨骨折部血腫より多分化能を有する細胞を分離した。また、下顎骨骨折血腫由来細胞 (mandibular fracture haematoma cells; MHCs) は、長管骨骨折血腫由来の細胞に比較し、軟骨分化能が低く、下顎骨骨折の主な治癒過程である膜性骨化を強く反映していることが示唆された。

低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound; LIPUS) は、組織を破壊することのない非温熱性の超音波で、パルス化した微弱な超音波刺激を非侵襲的に生体外から対象骨に照射することで機械的刺激を与える装置であり、一般的に超音波による微小な機械的刺激は骨折治癒を促進することができると知られている。LIPUS は現在臨床的に確立され、主に整形外科領域において広く使用されている。LIPUS は in vitro において骨髄間葉系幹細胞、骨膜細胞や骨芽細胞など様々な細胞の骨分化を促進することが示されているが、下顎骨由来の細胞に対しての LIPUS の効果を調査した報告はない。また、現在下顎骨骨折に対する LIPUS の臨床適応は認められていない。

本研究では、MHCs の骨分化能が LIPUS によってどのように影響されるかについて検討した。

下顎骨骨折血腫を 5 人の骨折患者の骨折部より採取し、MHCs を分離培養行った。LIPUS 照射は帝人ファーマ製の 6well plate 適合型照射装置を使用し、設定は帝人ファーマ社製超音波骨折治療器 SAFHS と同様の設定とし、LIPUS 照射を 20 日間 1 日 20 分毎日行った。細胞増殖能と骨分化能について検討した。細胞増殖能について 4、8 日目において LIPUS 照射群と LIPUS 非照射群に有意差は認められなかった。

骨分化能に関して、RNA レベルにおいて骨形成マーカーである alkaline phosphatase (ALP)、osteocalcin、転写因子である runt-related gene 2 (Runx2)、osterix、その他にも osteopontin (OPN)、parathyroid hormone receptor 1 に関して LIPUS 非照射群に比べて LIPUS 照射群が有意に上昇した。石灰化を Alizarin red S 染色を用いて定量すると LIPUS 非照射群に比べて LIPUS 照射群が有意に上昇した。

本研究で LIPUS 照射によって MHCs は骨分化マーカー遺伝子発現レベルと石灰化度が有意に上昇されたが、細胞増殖能に関しては影響を受けなかった。in vitro において LIPUS の効果について報告は散見されるが、具体的にはマウス骨芽細胞に LIPUS 照射することで OPN と Runx2 の RNA の発現が上昇したという報告やヒト骨芽細胞に照射することで石灰化上昇、コラーゲン生成上昇、ALP 活性の上昇が報告されている。細胞増殖能に関してもいくつか議論の余地がある所ではあるが変化しないとの報告が多い。本結果では LIPUS 照射しても MHCs の増殖能には有意差は認めなかった。一方、LIPUS のメカニズムについては未だに不明な点も多いが、Parvizian らは LIPUS 照射することで数秒以内の内に細胞内に  $Ca^{2+}$  が誘導されることで細胞が刺激され治癒を促進すると報告している。In vivo において Erdogan らは LIPUS がウサギの下顎骨骨折後骨治癒を促進し、骨強度、密度が増加したと報告している。

臨床における下顎骨骨折の偽関節発症率は 2.8% と Mathog らが報告しており、下顎骨偽関節を生じる

と再固定手術が必要になる。その点、LIPUS は下顎骨治癒促進に繋げることができるために、再手術を回避できるかもしれない。本研究は、下顎骨折治癒を促進する LIPUS の臨床応用の有用性を示す重要な証拠である。LIPUS の臨床応用は下顎骨折治療において臨床成績を改善するために推奨されるべきである。

本研究は MHCs の骨分化能について、その臨床意義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つた、LIPUS と MHCs の骨分化能との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。