



Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone morphogenetic protein expression of human mandibular fracture haematoma-derived cells

Huang, W.

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6539号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006539>

※ 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

Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone morphogenetic protein expression of human mandibular fracture haematoma-derived cells

低出力超音波パルスの下顎骨骨折血腫細胞の BMP 発現における効果

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)

黄 文蘇

Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone morphogenetic protein expression of human mandibular fracture haematoma-derived cells

低出力超音波パルスの下顎骨骨折血腫細胞の BMP 発現における効果

黄 文蘇, 長谷川 巧実, 今井 佑輔, 武田 大介, 明石 昌也, 古森 孝英
神戸大学大学院医学研究科 口腔外科学

【緒言】

低出力超音波パルス Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) 骨折の保存的な治療方法として臨床利用されており、その原理として、音波刺激が生体の組織に機械的刺激として変換されることで骨折治癒を促進するとされている。多くの研究で、LIPUS が骨芽細胞や骨髄間質細胞を含む多くの細胞の分化を調節することで種々のサイトカインや成長因子の発現を増加せることが示されているが、その詳しい機序はまだ不明な部分もある。

Bone morphogenetic proteins (BMPs) は骨誘導能があり、また間葉細胞の骨芽細胞への分化を促進するといわれており、骨形成や骨折治癒において重要な役割を担うサイトカインとして知られている。20 種類以上ある BMPs の中でも、特に BMP-2,4,7 は骨折治癒において重要である。

我々は以前の研究で、ヒト下顎骨骨折部位由来の血腫細胞 Human mandibular fracture haematoma-derived cells (MHCs) が下顎骨の骨折治癒に関与しており、さらに LIPUS によって治癒が促進されることを証明した。

他の in vitro 研究で、LIPUS は BMPs の発現を進め、さらに LIPUS が歯周組織細胞の BMP-2 シグナル発現を通して骨分化を促すことも示されている。しかしながら、骨折治癒過程において LIPUS がいかに BMPs 発現に関与しているかは明らかになっておらず、特に下顎骨の骨折においては不明点も多く、本研究は、LIPUS が MHCs の BMPs 発現に与える影響について調べた。

【方法】

細胞培養：

6 人の下顎骨折患者の骨折部位から術中に採取した血腫を培養し、未分化間葉細胞である MHCs を得た。手術は受傷後 1-9 日に行われた。

LIPUS 処置：

LIPUS 群とコントロール群に分け、細胞を骨分化培地にて培養し、LIPUS 群には毎日 20 分の照射(1.5MHz, パースト幅 200μs, 繰り返し周波数 1.0kHz, 30mW/cm²)をし、それぞれ 4, 8, 14, 20 日培養した後解析した。

real-time PCR 解析：

Table1.に示す primer を使用し、Day4, 8, 14, 20 日目の細胞の BMP-2,4,7 発現を解析した。

蛍光免疫染色：

それぞれの群の Day4, 8, 14, 20 日目の細胞の BMP-2,4,7 発現を蛍光免疫染色で調べた。

石灰化分析：

Day20 で LIPUS 群とコントロール群の Alizarin Red S 染色を行った。

【結果】

real-time PCR:

BMP-2：Day20 で LIPUS 群の BMP-2 発現が有意に高かった。

BMP-4：Day8 で LIPUS 群の BMP-2 発現が有意に高かった。

BMP-7：Day14,20 で LIPUS 群の BMP-2 発現が有意に高かった。

(fig 1 a,b,c 参照)

蛍光免疫染色：

それぞれのタイムポイントで real-time PCR と同様の傾向が見られた(BMPs 発現は赤)。

(fig 2 a,b,c 参照)

石灰化分析：

Day20 で LIPUS 群はコントロール群に比較し高度な石灰化が見られた。

(fig 3.参照)

【考察】

この実験の結果から、MHCs の BMP-2,4,7 の発現が LIPUS によって促進されたことが示された。これは、LIPUS が骨折治癒を促進する過程で BMP-2,4,7 発現が関与していることを示唆している。

BMP-2,4,7 は骨折治癒や歯周組織の形成に影響することが様々な研究にて既に知られており、LIPUS が様々な骨分化マーカー (COX-2, RUNX2, osteopontin, osteonectin, osteocalcin) や骨芽細胞の RANKL 分化を増進させ、長管骨や下顎骨の治癒に関与していることも以前の研究で明らかとなっている。これらの結果から、我々は LIPUS は BMPs の発現をコントロールすることで下顎骨骨折治癒に寄与していると仮定した。他の動物の細胞を使用した研究でもこの仮説が証明されているが、今回はヒト由来細胞 (MHCs) を使用したことで、ヒト下顎骨

の骨折治癒過程においても LIPUS は BMP-2,4,7 の発現を促すことが明らかとなった。また BMP-4 においては、コントロール群の Day4,8 でも高い発現が認められ、骨折治癒の早期で発現する可能性が示唆された。LIPUS 群の結果からは、BMP-4 は晩期の Day14,20 においても発現が増強され、BMP-2 は晩期の Day20 において、BMP-7 は比較的早期である Day8 において LIPUS によって発現が増強されたことが判明した。BMP-2 発現のタイミングはほかの実験結果と異なるが、これは使用した細胞の違いが影響していると考えられる。BMP-4,7 の結果はこの実験によって初めて明らかとなった。

【結語】

LIPUS は MHCs の BMP-2,4,7 の発現を促進した。これは LIPUS の下顎骨骨折治癒促進過程において、BMP-2,4,7 関連経路が関係していることを示唆している。

Table 1.
Details of the primers used for real-time PCR amplification.

Gene	Primer sequences (5' to 3')
BMP-2	F: 5' GGAACGGACATTTCGGTCCT 3'
	R: 5' GGAAGCAGCAACGCTAGAAG 3'
BMP-4	F: 5' TCACTGCAACCGTTCAGAGGTC 3'
	R: 5' CCAATCTTGAACAACTTGCTGGA 3'
BMP-7	F: 5' ACCAGAGGCAGGCCTGTAAGA 3'
	R: 5' CTCACAGTAGTAGGCGGCGTAG 3'
GAPDH	F: 5' CCACCCATGGCAAATTCATGG 3'
	R: 5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCA 3'

BMP, bone morphogenetic protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

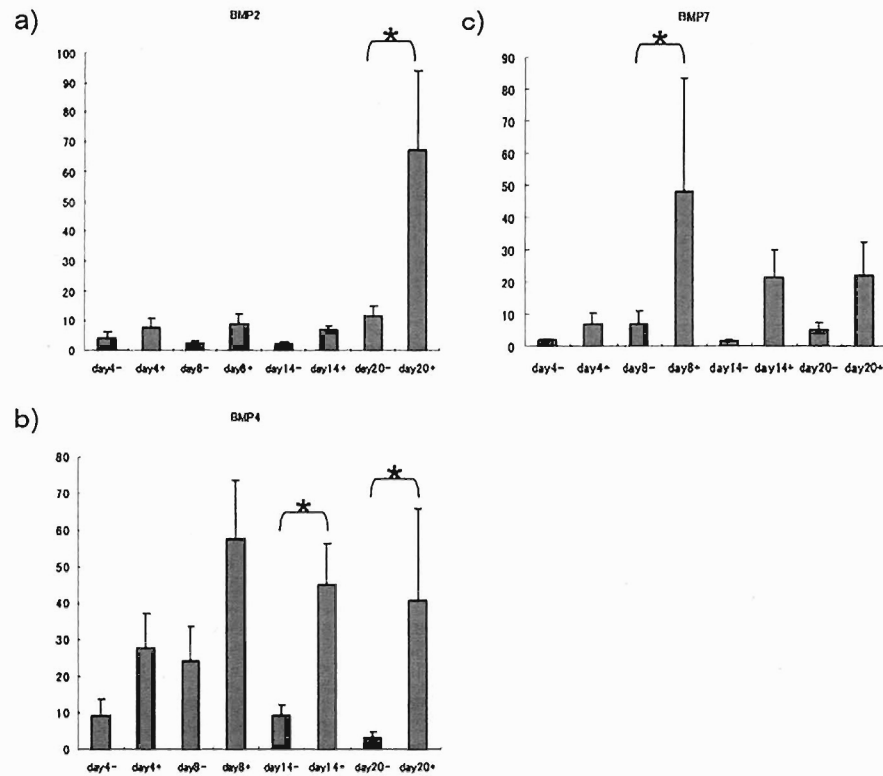


Fig. 1. Results of the real-time PCR analysis of gene expression. Mean and standard error of the changes in expression of (a) BMP-2, (b) BMP-4, and (c) BMP-7 genes in the control (-) and LIPUS-treated (+) groups, measured by real-time PCR (*P < 0.05).

Fig. 2. Immunofluorescence staining of BMPs. Photomicrographs showing immunofluorescence staining of (a) BMP-2, (b) BMP-4, and (c) BMP-7 (red) in the LIPUS (-) control group and the LIPUS (+) group. The nuclei were visualized by staining with DAPI (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Mineralization

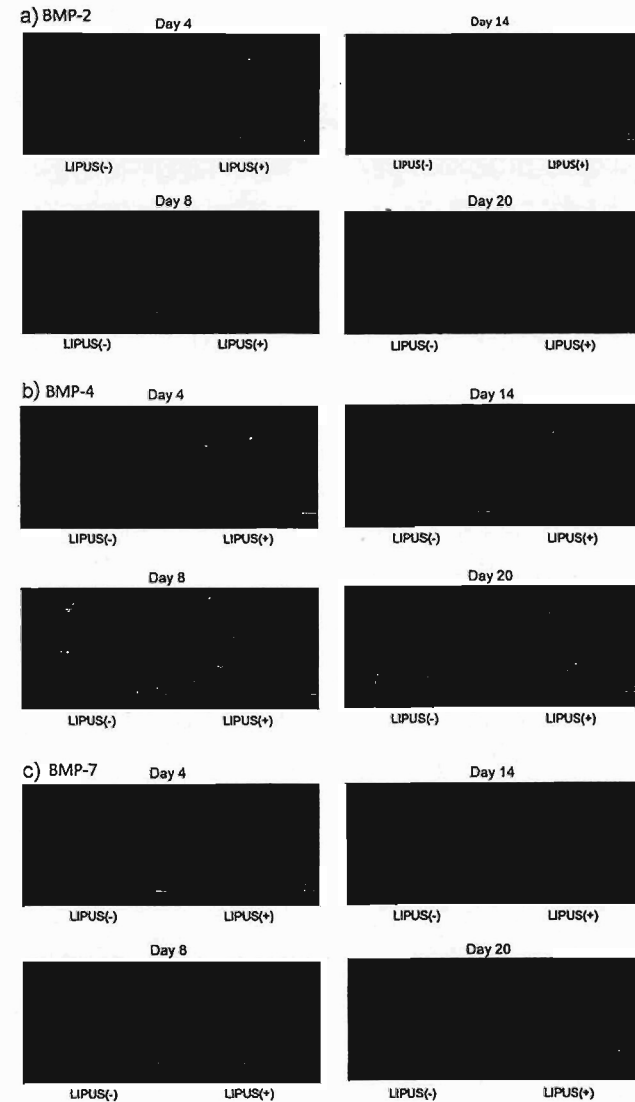


Fig. 2. Immunofluorescence staining of BMPs. Photomicrographs showing immunofluorescence staining of (a) BMP-2, (b) BMP-4, and (c) BMP-7 (red) in the LIPUS (-) control group and the LIPUS (+) group. The nuclei were visualized by staining with DAPI (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

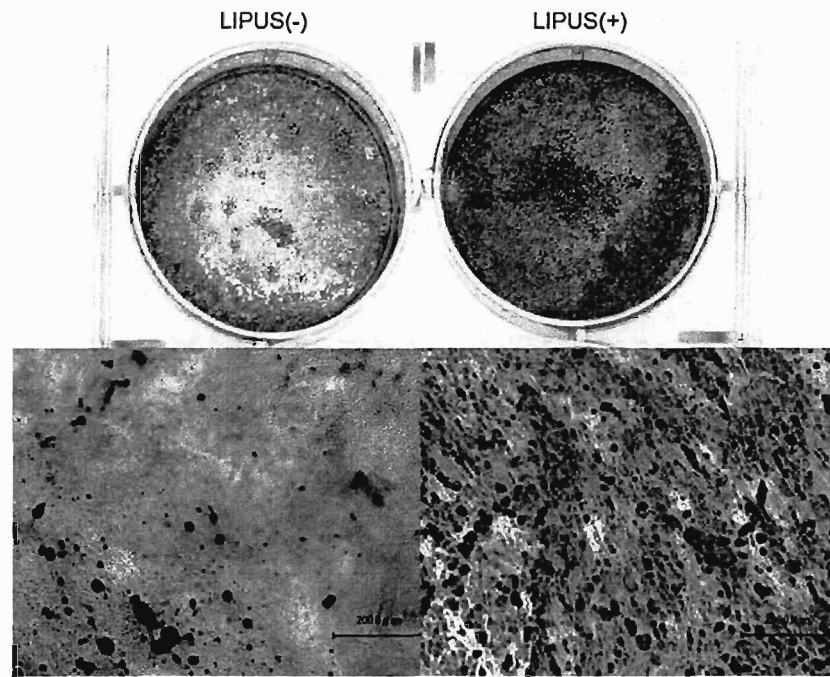


Fig. 3.

Alizarin Red S staining of cells following LIPUS treatment. Photographs of Alizarin Red S staining of mandibular fracture haematoma-derived cells (MHCs) in the LIPUS (-) control group and LIPUS (+) group on day 20.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2565 号	氏 名	黄 文 蘇
論文題目 Title of Dissertation	<p>Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone morphogenetic protein expression of human mandibular fracture haematoma-derived cells</p> <p>低出力超音波パルスの下顎骨骨折血腫細胞の BMP 発現における効果</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 黒 坂 昌 弘 Chief Examiner</p> <p>副 査 南 康 博 Vice-examiner</p> <p>副 査 寺 師 浩 人 Vice-examiner</p>		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

低出力超音波パルス Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)は、骨折の保存的な治療方法として臨床利用されており、多くの研究で、LIPUS が骨芽細胞や骨髄間質細胞を含む多くの細胞の分化を調節することで種々のサイトカインや成長因子の発現を増加せることが示されているが、その詳しい機序はまだ不明である。Bone morphogenetic proteins (BMPs) は骨誘導能があり、骨形成や骨折治癒において重要な役割を担うサイトカインとして知られている。以前の研究では、ヒト下顎骨骨折部位由来の血腫細胞 Human mandibular fracture haematoma-derived cells (MHCs) が下顎骨の骨折治癒に関与しており、さらに LIPUS によって治癒が促進されることはすでに証明されている。

また、他の研究でも、LIPUS は BMPs の発現を進め、さらに LIPUS が歯周組織細胞の BMP-2 シグナル発現を通し骨分化を促すことも示されている。しかしながら、骨折治癒過程において LIPUS がいかに BMPs 発現に関与しているかは明らかになっておらず、特に下顎骨の骨折においては不明点も多い。本研究は、LIPUS が MHCs の BMPs 発現に与える影響について検討した。

「材料と方法」

細胞培養：

6 人の下顎骨骨折患者の骨折部位から術中に採取した血腫を培養し、未分化間葉細胞である MHCs を得た。手術は受傷後 1-9 日に行われた。

LIPUS 処置：

LIPUS 群とコントロール群に分け、細胞を骨分化培地にて培養し、LIPUS 群には毎日 20 分の照射 (1.5MHz, パースト幅 200μ/s, 繰り返し周波数 1.0kHz, 30mW/cm²) を行い、それぞれ 4, 8, 14, 20 日培養した後解析した。

real-time PCR 解析：

primer を使用し、Day4, 8, 14, 20 日目の細胞の BMP-2, 4, 7 発現を解析した。

蛍光免疫染色：

それぞれの群の Day4, 8, 14, 20 日目の細胞の BMP-2, 4, 7 発現を蛍光免疫染色で調べた。

石灰化分析：

Day20 で LIPUS 群とコントロール群の Alizarin Red S 染色を行った。

「結果」

real-time PCR：

BMP-2：Day20 で LIPUS 群の BMP-2 発現が有意に高かった。

BMP-4：Day14, 20 で LIPUS 群の BMP-4 発現が有意に高かった。

BMP-7：Day8 で LIPUS 群の BMP-7 発現が有意に高かった。

蛍光免疫染色：

それぞれのタイムポイントで real-time PCR と同様の傾向が見られた。

石灰化分析：

Day20 で LIPUS 群はコントロール群に比較し高度な石灰化が見られた。

本研究の結果から、MHCs の BMP-2,4,7 の発現が LIPUS によって促進されたことが示された。これは、LIPUS が骨折治癒を促進する過程で BMP-2,4,7 発現が関与していることを示唆している。

BMP-2,4,7 は骨折治癒や歯周組織の形成に影響することが様々な研究にて既に知られており、LIPUS が様々な骨分化マーカーや骨芽細胞の RANKL 分化を増進させ、長管骨や下顎骨の治癒に関与していることも以前の研究で明らかとなっている。これらの結果から、本研究では LIPUS は BMPs の発現をコントロールすることで下顎骨骨折治癒に寄与していると仮定した。他の動物の細胞を使用した研究でもこの仮説が証明されているが、この研究ではヒト由来細胞（MHCs）を使用したことで、ヒト下顎骨の骨折治癒過程においても LIPUS は BMP-2,4,7 の発現を促すことが明らかとなった。また BMP-4 においては、コントロール群の Day4,8 でも高い発現が認められ、骨折治癒の早期で発現する可能性が示唆された。LIPUS 群の結果からは、BMP-4 は晩期の Day14,20 においても発現が増強され、BMP-2 は晩期の Day20 において、BMP-7 は比較的早期である Day8 において LIPUS によって発現が増強されたことが判明した。BMP-2 発現のタイミングはほかの研究結果と異なるが、これは使用した細胞の違いが影響していると考えられる。BMP-4,7 の結果は本研究によって初めて明らかとなった。

本研究は、LIPUS が MHCs の BMP-2,4,7 の発現に与える影響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 LIPUS の下顎骨骨折治癒促進過程における BMP-2,4,7 発現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、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。