

Effect of mechanical stress by ultra-sound stimulation on osteoblasts and osteoclasts

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42943

超音波によるメカニカルストレスの骨芽及び破骨細胞に対する影響

鈴木信雄

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: Effect of mechanical stress by ultra-sound stimulation on osteoblasts and osteoclasts

骨組織には骨を作る細胞（骨芽細胞）と骨を壊す細胞（破骨細胞）があり、骨形成を調節している。骨芽細胞の培養は容易であるが、破骨細胞を培養することは難しく、コラーゲン等の骨基質タンパク質も共存させて培養するシステムは未だ開発されていない。さらに物理的な刺激には、骨基質が重要な役割を担っており、このことが*in vitro*（試験管内）での細胞培養の開発を困難にしている。最近超音波が骨形成を促進させることがわかってきたが、骨芽細胞・破骨細胞・骨基質を共存させたモデルシステムが欠如しているため、超音波の骨に対する作用を正確に評価できていない。そこで本研究では、骨芽細胞・破骨細胞・骨基質が共存した魚のウロコの培養システム（*in vitro*）を用い、骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した。さらに、ホルモンやホルモン受容体の遺伝子発現も調べた。

材料としてキンギョ（*Carassius auratus*）を用い、以下3種類の実験を行った。

実験1：超音波の条件設定

本研究では、市販の超音波治療器（UX-301: Celcom Inc.）の振動子の上にシャーレを置き、その中に培地（4ml）を入れ、培地の中にキンギョ（メス、体重30-40g）のウロコを入れて超音波を照射した。その後、15℃で18時間培養し、ホルマリンで固定し、ウロコの細胞の活性をSuzuki and Hattori (2002)の方法に従って測定した。本研究では、まず骨芽細胞の活性（アルカリフォスファターゼ活性：ALP活性）を指標に1) 超音波の強度、2) 超音波の刺激頻度、3) 温度上昇の影響を評価した。

実験2：超音波の骨組織に対する作用（細胞活性及び遺伝子発現の解析）

実験1で決定した条件で、骨芽細胞と破骨細胞に対する影響をこれらのマーカーであるALP及び酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性を指標に評価した。さらにそのウロコからmRNAを抽出し、骨芽細胞の増殖・分化に関与するホルモン（insulin-like growth factor-I: IGF-I）やホルモン受容体（estrogen receptor: ER）の発現をRT-PCRで調べた。

実験3：骨代謝亢進ウロコによる解析

右側のウロコを取ると、左側のウロコの骨吸収・骨修復が進行し、骨芽及び破骨細胞の活性が上昇し、3日経過した時が最も高いことを見出した。そこでキンギョの右側のウロコを取り、3日後の左側のウロコを用いて、骨芽及び破骨細胞に対する超音波の影響を解析した。

1MHzで40、60、165及び275mW/cm²I_{SATA}の強度の超音波を照射した結果、40及び165mW/cm²I_{SATA}ではコントロールとの間に有意差は認められなかった。しかしながら、60mW/cm²I_{SATA}の強度の時にALP活性が有意に上昇し、275mW/cm²I_{SATA}の強度では逆に低下した。したがって、骨芽細胞の活性を上昇させる超音波の強度は、60mW/cm²I_{SATA}が最適であることがわかった。

次に、超音波の刺激頻度に対する影響を調べた。1MHzで60mW/cm²I_{SATA}の強度の超音波を1秒間照射し、その後1秒間照射しないというサイクルを1回とし、60、120、180、300及び600回照射した。その結果、180回行った時に骨芽細胞の活性がプラトーに達し、その後回数を増やしても変化がなかった。したがって、超音波の刺激頻度は180パルスとした。

さらに、超音波照射による温度上昇の影響についても調べた。1MHzで60mW/cm²I_{SATA}の強度の超

音波を 180 パルス照射し、培地の温度変化を調べた。その結果、温度は 3℃しか上昇せず、コントロールは室温より 3℃高い温度で培養することにした。

実験 1 で検討した条件（超音波の強度：60mW/cm²I_{SATA}；超音波の刺激頻度：180パルス；コントロールは室温より3℃高い温度で培養）で骨芽及び破骨細胞の変化を調べた。その結果、骨芽細胞の活性は有意に上昇したが、破骨細胞の活性は変化しなかった。

超音波照射により骨芽細胞の活性が上昇したので、骨芽細胞で特異的に発現しているマーカー遺伝子である IGF-I と ER の遺伝子発現を RT-PCR により調べた。ER の mRNA レベルは、超音波刺激後、培養 3 時間では変化しなかったが、18 時間では有意に増加した。IGF-I の mRNA レベルは、3 時間培養で有意に増加し、18 時間培養では有意に変化しなかった。したがって、超音波刺激により IGF-I の mRNA 発現は、ER の mRNA 発現よりも早期に起こり、骨芽細胞を活性化していることが示された。

一方、片側のウロコを除去すると、残りのウロコ (ontogenic scale) の骨芽細胞及び破骨細胞の活性が上昇し、3 日経過した時が最も高いことを最近見出した。そこでそのウロコ (骨代謝亢進ウロコ) を用いて、超音波刺激による骨芽及び破骨細胞活性への影響を解析した。その結果、15℃で 18 時間培養後、骨代謝亢進ウロコの骨芽細胞の活性は 4 個体中 3 個体において有意に増加し、破骨細胞の活性は 4 個体すべてにおいて有意に低下した (Figure 1)。

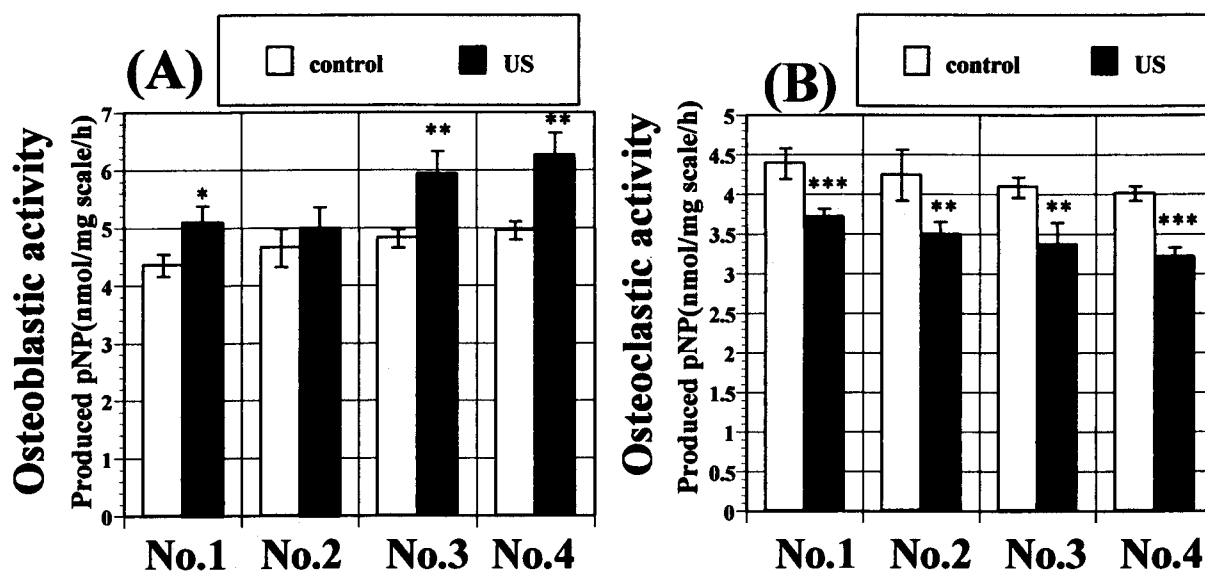


Figure 1. Changes in osteoblastic (A) and osteoclastic (B) activities by ultra-sound (US) stimulation using the ontogenic scales in the left side at 3 days after removal of scales in the right side.

Values are the means \pm SEM (N=8). *, **, *** indicate statistically significant differences from the control scales at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

超音波による刺激 (メカニカルストレス) により骨芽細胞活性は上昇することが判明した。さらに骨代謝亢進ウロコにおいて、骨芽細胞活性は上昇し、破骨細胞活性は低下した。骨代謝亢進ウロコは、骨粗鬆症とよく似た状況を作り出しており、本研究の成果はその治療に貢献できると思われる。

謝辞

本研究は、(財)日本宇宙フォーラム及び平成17年度学長戦略経費の援助により行われた。