

## 論文の内容の要旨

氏名：昔 農 淳 平

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Low-intensity pulsed ultrasound induces collagen matrix synthesis and aggrecan remodeling in chondrocytes

（低出力超音波は軟骨細胞のコラーゲン合成とアグリカンのリモデリングを促進させる）

骨の発育は膜内骨化と軟骨内骨化に分類される。膜内骨化は未分化間葉細胞が骨芽細胞に直接分化し、鎖骨や頭蓋冠を構成する骨の一部となる骨化の様式であり、軟骨内骨化は早期の軟骨形成といくつかの段階に分かれる軟骨細胞の分化と成熟が起こる骨化の様式である。成長板による軟骨形成に伴う軟骨内骨化は、それぞれの軟骨細胞分化の段階によって構造や産生する細胞外マトリックス (ECM) が異なることが特徴である。

低出力超音波 (LIPUS) は、整形外科分野において臨床応用されている。超音波による音響放射力、音響直進流および表面波伝播などの機械的刺激を患部に与えることで、骨折の治癒や骨増生を促進することが知られている。LIPUS は低出力のため生体為害性は無く、低周波によるキャビテーション効果や、連続刺激で起こる温熱効果も認められない。いくつかの関連する *in vivo* または *in vitro* の先行研究において、LIPUS は膝の関節炎に罹患した軟骨細胞に対して細胞学的に効果を有すると報告されている。しかしながら、軟骨細胞の ECM の合成における LIPUS の影響については不明な点が多い。そこで、本研究は軟骨細胞における継続的な LIPUS 刺激による軟骨の ECM 合成に及ぼす影響について細胞生物学的に検討した。

マウス軟骨前駆細胞株 (ATDC5 細胞) を、 $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 6 穴プレートに播種し、コンフルエントの状態を確認後、insulin-transferrin-sodium selenite (ITS) を添加した培地にて 14 日間培養した。LIPUS 刺激は、発振周波数 1.5 MHz、超音波出力 30 mW/cm<sup>2</sup> または 60 mW/cm<sup>2</sup> の条件で、培養液にプローブを直接接触させて 20 分/日刺激を与えた。コントロールの細胞は上記の条件と同様に播種されたが LIPUS 刺激は行わなかった。LIPUS 刺激開始後 3、5 および 7 日目にそれぞれのサンプルを回収し、sox9, collagen type II (Col II), collagen type X (Col X), aggrecan, matrix metalloproteinase-13 (MMP13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5) および alkaline phosphatase (ALP) の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて mRNA レベルで調べた。また、phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), Sox9, Col II, Col X, aggrecan, MMP13 および ADAMTS-5 のタンパク発現は Western blotting 法、軟骨の主要なプロテオグリカンである aggrecan は Alcian blue 染色法を用いて以下の実験を行なった。

1) ATDC5 細胞の LIPUS の細胞応答を明らかにするために、細胞内シグナルの下流経路である ERK1/2 のリン酸化を調べた。p-ERK1/2 は LIPUS 刺激後 180 分で出力依存的に有意に増加した。

ATDC5 細胞における軟骨細胞の分化調節因子である Sox9 の mRNA の発現は LIPUS 刺激 5 日目の 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加した。一方で、LIPUS 刺激 3 日目と 7 日目の刺激群ではコントロール群と比較して有意に減少した。Sox9 のタンパク発現はまた LIPUS 刺激 7 日目に出力依存的にコントロール群と比較して有意に増加した。

2) LIPUS 刺激の出力と ECM の遺伝子発現に対する影響を調べた。Col II の mRNA の発現は LIPUS 刺激 5 日目の 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加した。また、aggrecan の mRNA 発現は LIPUS 刺激 5 日目に出力依存的に、7 日目に 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加した。Col X の mRNA の発現は LIPUS 刺激 7 日目に 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加した。

3) LIPUS 刺激の出力と ECM のタンパク発現に対する影響を調べた。Col II のタンパク発現は LIPUS 刺激 5 日目に 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加した。aggrecan のタンパク発現は LIPUS 刺激 5 日目に出力依存的にコントロール群と比較して有意に増加した。Col X のタンパク発現は LIPUS 刺激 7 日目に出力依存的にコントロール群と比較して増加した。

4) 肥大軟骨細胞から軟骨骨化への分化のマーカーとなる MMP13 および ALP の発現と、aggrecan を基質とするプロテアーゼである ADAMTS-5 発現に及ぼす LIPUS の影響を調べた。MMP13 の mRNA 発現は LIPUS 刺激 3 日目, 7 日目, タンパク発現は LIPUS 刺激 7 日目に 30 mW/cm<sup>2</sup> および 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に低下した。一方で, LIPUS 刺激 7 日目で ADAMTS-5 の mRNA 遺伝子発現は 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加し, タンパク発現は 30 mW/cm<sup>2</sup> および 60 mW/cm<sup>2</sup> でコントロール群と比較して有意に増加した。しかしながら, ALP の mRNA 遺伝子発現は LIPUS の影響は認められなかった。また aggrecan を染色する Alcian blue 染色には, LIPUS 刺激の影響は認められなかった。

機械的な刺激は筋骨格系の調整や結合組織の恒常性を維持するのに重要な要因の一つである。機械的な負荷は, 骨や筋, 軟骨細胞, 靭帯, 腱といった多数の結合組織に影響を与える。これらの結合組織は, 重力や持続時間, 自然な機械的刺激に対して感受性を有している。過去の多くの研究では LIPUS の機械的刺激はラットやウサギの軟骨細胞の ECM の合成や MMP13 の発現低下が報告されている。これらの結果から LIPUS は軟骨の ECM 合成, 特に変形性関節症を含む軟骨細胞のコラーゲンの産生増加に影響を及ぼすことが示されている。

本研究より, LIPUS は ERK1/2 のリン酸化を介して軟骨細胞の分化と ECM 合成を促進させることが示唆された。興味深いことに LIPUS による軟骨細胞のコラーゲン合成および aggrecan 発現の促進は骨芽細胞で大きな効果が見られる 30 mW/cm<sup>2</sup> の出力よりも大きい 60 mW/cm<sup>2</sup> の出力において影響を及ぼすことが明らかとなった。

過去の研究では, MMP13-null mice では肥大軟骨細胞としての期間が延長し, 軟骨内骨化を遅延させコラーゲンの蓄積が有意に促進すると報告しているが, aggrecan を選択的に染色する Alcian blue 染色において明確な違いが認められなかった。本研究では, LIPUS は ATDC5 の Col II と Col IX 発現を増加させるが, MMP13 の発現は減少させた。さらに LIPUS は Alcian blue 染色によって測定した aggrecan はコントロールと比較して影響が認められなかったが, LIPUS は aggrecan の mRNA とタンパク発現を増加させた。そこで, LIPUS が軟骨細胞の aggrecan 産生量を増加させない理由を明らかにするために, aggrecan を分解する主なプロテアーゼである ADAMTS-5 の発現に対する LIPUS の影響を検討した。LIPUS 刺激後 7 日目に ADAMTS-5 の mRNA 発現が著しく増加した。この結果は, LIPUS が aggrecan 発現を増加させる一方で aggrecan を分解するプロテアーゼの発現も促進されることによって aggrecan のリモデリングを促進させる可能性を示した。

以上のことより, LIPUS が ERK1/2 のリン酸化を介して軟骨細胞のコラーゲン合成および aggrecan のリモデリングを促進させる一方で, MMP13 の発現を減少させることが示された。さらにこれらの影響は骨芽細胞で用いられている LIPUS の出力よりも高い出力によって促進することが明らかとなった。

LIPUS は軟骨前駆細胞の肥大軟骨細胞分化を促進することでコラーゲン合成を促進させる一方で, MMP13 の発現を抑制し軟骨内骨化を遅延させることによって, 結果的に軟骨細胞による軟骨の ECM 合成および代謝を促進させる可能性が示唆された。これらの知見より, LIPUS は骨折の治療だけではなく, 変形性関節症, 顎関節症や膝の機能障害などの軟骨の ECM 再生が必要な様々な疾患に対する治療法となる可能性が示された。