

論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主 査） 教授 岩 田 幸 一

（副 査） 教授 植 田 耕一郎

教授 白 川 哲 夫

教授 鈴 木 直 人

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認められていない。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、 2×10^4 cells/cm² の密度で 6 穴プレートに播種し、コンフルエントを確認後、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/cm² または 60 mW/cm² 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, 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 染色法を用いて実験を行なった。

その結果、以下の結論を得ている。

1. LIPUS は、ERK1/2 のリン酸化によるシグナル伝達を促進させた。
2. LIPUS は、sox9 の発現を促進させることで増殖軟骨細胞や肥大軟骨細胞への分化が誘導され、ECM の産生を促進させた。
3. LIPUS は、MMP13 や ALPase を抑制することにより、軟骨内骨化を遅延させた。
4. LIPUS は、Aggrecan の代謝を早めることでリモデリングを促進させた。
5. LIPUS の至適出力は、骨芽細胞 (30mW/cm²) よりも軟骨細胞 (60mW/cm²) の方が大きい。

以上のことから、LIPUS は軟骨細胞の分化を促進し軟骨内骨化を遅延させることで、ECM 合成および代謝を促進させることが明らかとなった。

以上のように、本論文は LIPUS が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。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 31 年 3 月 12 日