

低出力超音波パルスは患者由来の骨髄間葉系幹細胞において *DLX* 遺伝子の発現と骨分化を促進する

大久保敦子, 石川正和, 中佐智幸, 安永裕司, 安達伸生, 望月由, 越智光夫

【はじめに】

近年, 再生医学分野での研究が盛んに行われている。組織の回復力では解決できない状況に対し培養細胞移植が行われるようになったが, 多分化能を持ち, かつ培養で大量に製造可能である体性幹細胞はそのための有用な細胞ソースである。本研究では低出力超音波 (low-intensity pulsed ultrasound: 以下 LIPUS) がヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells: 以下 hMSCs) の骨分化に与える影響を検討した。LIPUS は骨分化促進作用があることが知られ, 遷延治癒骨折に使用される FDA 認可の治療機器である。この機序に関する *in vitro* 実験系は複数みられるが, 大部分が動物細胞や株化細胞を用いた検討である。刺激への反応性が高く明確な結果を得やすい株化細胞に比べ, 初代培養細胞は増殖が遅く培養継続により脱分化しやすいなど, 培養維持が比較的難しい。しかし, 正常性が高く元臓器と類似した性質をもつ患者由来細胞を用いた研究は, 実際の生体反応を反映するものとして重要である。従って我々は, 骨分化誘導下の患者由来 hMSCs に対し LIPUS 照射が及ぼす作用の検討を行った。また遺伝子発現解析においては, 骨芽細胞分化指標として注目される 2 つのホメオボックス遺伝子 *distal-less homeobox 3* (以下 *DLX3*) と *distal-less homeobox 5* (以下 *DLX5*) 遺伝子の発現に着目した。

【材料と方法】

本研究は広島大学倫理委員会の認可のもと, 全対象者から説明に基づく同意を得て行われた。人工股関節全置換術施行の成人女性 4 名の腸骨稜より骨髄液を採取し, 赤血球溶解後, 密度勾配遠心分離により単核球の分画を得た。この細胞を 10% 仔ウシ血清を含む培地中に播種して培養した後, 接着細胞を 2 継代し, フローサイトメトリー解析を行って hMSCs とした。これを骨分化誘導培地で培養し, 培養皿底面よりカップリング剤を介して連日 LIPUS 照射 (20 分, 周波数 1.5 MHz, 1 kHz パルス波, 平均強度 30 mW/cm²) を行った。照射から 7 日, 14 日で hMSCs より全 RNA を抽出して逆転写し, real-time PCR 解析を行った。解析項目は osteocalcin (以下 *OCN*), Alkaline Phosphatase (以下 *ALP*), Runt-related transcription factor (以下 *RUNX2*), *DLX3*, *DLX5* とした。数値は平均値 ± 標準偏差で示し, 解析には Bonferroni 補正 t 検定を使用した。有意水準は 5% とした。また, 同タイムポイントのサンプルのタンパク質を抽出し, ウェスタンブロットにより *OCN* タンパク質の発現量を分析した。照射 14 日後の石灰化指標としてアリザリンレッド S 染色を行った。

【結果】

フローサイトメトリー解析より、hMSCs は表面抗原 CD44, CD105 が陽性、かつ CD133, CD34, CD45 が陰性であり、過去報告とも一致した。real-time PCR 解析から、hMSCs における *OCN*, *RUNX2*, *DLX3*, *DLX5*, *ALP* の mRNA 発現は骨分化誘導により上昇することが示されたが、LIPUS 照射により、7 日目での *DLX3* mRNA が非照射の場合の約 5 倍の発現量となった。他の遺伝子発現も LIPUS 照射 14 日目には顕著に上昇した。*ALP*, *RUNX2*, *DLX3*, *DLX5* の mRNA 発現量自体は骨分化誘導 14 日では 7 日目より低下したが、LIPUS 照射によりこの発現量が増加することが示された。細胞の成熟と共に増加した *OCN* の mRNA 発現も、LIPUS 照射により大幅に増加することが示された。なお、*OCN* タンパク質の発現量も LIPUS 照射により 7 日後、14 日後に著しく増加した。ただしアリザリンレッド S 染色の結果では、14 日目の石灰化の状態に照射による変化は認められなかった。

【考察】

培養細胞移植の最終目的は、移植細胞の効率的な生着と、目的細胞への確実な分化・機能である。体内での間葉系細胞増殖には長期間を要するため、現段階では MSCs と足場を組み合わせ、適切な分化促進処置下で培養することで、人工骨を生体外で作成し移植・生着させることが現実的と考えられている。本研究での LIPUS 照射による骨分化関連遺伝子発現や *OCN* 発現の促進は過去報告と一致する結果であり、初代培養細胞においてこれを確認できたことは意義深い。機械的刺激による患者由来 hMSCs の骨分化活性化は、前述のような細胞工学的手法に対しても、細胞増殖や分化をリスクなく促進できる技術として有用となる可能性を示している。

また、これまで *DLX3*, *DLX5* は骨分化に重要とされてはいたが、リモデリングにどう関わるかの詳細は不明であった。骨組織では骨形成と骨吸収が同時に生じているだけでなく、骨梁と皮質骨ではその反応性が違うため、1 つの因子がどちら側に働くかを判断することが容易でない。近年、*DLX3* が負の調節因子として骨の恒常性維持に関わることが解明された。本研究は、細胞外からの機械的刺激により *DLX3* が上昇することを初めて示したものである。この事実は、*in vivo* で示される骨量増加という結果のみからは検出できなかったと考えられる。*DLX3* の発現上昇は、骨芽細胞の成熟を制御し、骨芽細胞とその前駆細胞が増殖できる状態を保つために有用だったのではないかと考察される。今後、microRNA 等を用いた *DLX3* 抑制と LIPUS を併用することによる骨形成促進効果についての検討と研究展開が課題と考えられる。