

氏 名	むか い しょう ご 向 井 章 悟
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論医博第 1904 号
学位授与の日付	平成 18 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Transforming growth factor-beta 1 mediates the effects of Low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. (トランスフォーミング増殖因子ベータ 1 は軟骨細胞における低出力パルス超音波の効果を伝達する。)
論文調査委員	(主 査) 教授 戸口田 淳也 教授 堤 定美 教授 開 祐司

論 文 内 容 の 要 旨

近年、臨床に用いられるようになった低出力パルス超音波 (low-intensity pulsed ultrasound; LIPUS) は骨折後偽関節の癒合を促進するほか、新鮮骨折においても癒合までの期間を短くするとの報告がされている。骨折モデルを用いた動物実験においては LIPUS により骨折部の架橋仮骨形成が有意に早くなる、仮骨領域の aggrecan 遺伝子の発現が増大しているとの報告があり、軟骨培養系においては LIPUS 刺激が aggrecan 遺伝子の発現を亢進させる、chondroitin sulfate 合成を増大させるなどの報告が散見される。しかしながら現時点では、LIPUS が軟骨細胞に対してどのような効果を持っているのか、その作用機序を含めていまだ解明されていない点が多い。

本研究では LIPUS を培養軟骨細胞に照射して、増殖や分化に対する効果を解析し、その作用機序についての考察を行った。出生 2 日目のラット大腿骨より採取した成長軟骨細胞を遠心後そのまま静置して培養を続けると aggregate が形成されるが、マーカー遺伝子の発現、組織学的所見、生化学的実験などの解析から、この aggregate culture system が軟骨細胞の terminal differentiation のモデルとなりうると考えた。この培養系において LIPUS を連日照射したところ、対照群と比して LIPUS 照射群では type X collagen の発現上昇が一時的に抑制され、type II collagen, aggrecan の発現低下が一時的に遅延していた。さらに培養 7 日目から 7 日間照射したところ、LIPUS 照射群において有意に DNA 量が増大している一方、ALP 活性が抑制されていた。さらに LIPUS 照射 2 時間後には細胞内の transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) の発現が対照群に比して有意に亢進していること、照射 12 時間後には ELISA アッセイにより培養液中の TGF- β 1 タンパクの濃度が有意に上昇していることが確認できた。これらの結果から LIPUS 刺激による反応に TGF- β 1 が関与している可能性が考えられた。そこでヒト合成 TGF- β 1 タンパクを培養 10 日目の培養液中加入したところ、濃度依存性に LIPUS 照射と同様のマーカー遺伝子の変化を再現することが可能であった。さらに LIPUS 照射群に抗 TGF- β 1 抗体を連日投与したところ、LIPUS 照射群に見られた遺伝子発現の変化および DNA 量や ALP 活性の変化をもブロックすることが可能であった。以上の結果から、LIPUS 刺激が軟骨細胞に TGF- β 1 シグナルの亢進をもたらす増殖や分化に影響を与えていることが示唆された。

LIPUS は低エネルギーであるが短間隔でパルス状に伝わる密度の変化をもった波であり、細胞に対して熱反応を惹起するよりもメカニカルストレスとして作用して、細胞膜上の stretch-activated channel や integrin といったレセプターの活性化を起こすとされている。TGF- β 1 はこうしたレセプターの mechano-transduction pathway の下流に位置する伝達因子であると同時に、骨折治癒を促進する因子の一つでもある。こうした事実から、骨折仮骨中の軟骨細胞に対して LIPUS がメカニカルストレスとして作用し、TGF- β 1 シグナルが亢進した結果、骨折治癒の促進という臨床的效果が得られている可能性が推測される。

論文審査の結果の要旨

低出力パルス超音波 Low-intensity pulsed ultrasound LIPUS は、骨折部の骨癒合を促進するため、臨床的にも使用されているが、その軟骨に対する効果については未解明である点も多い。本研究では成長軟骨細胞の三次元培養系に対して LIPUS 照射を行い、軟骨細胞の分化や増殖への効果とその作用機序についての考察を行った。

Aggregate chondrocyte culture において LIPUS を連日照射したところ、Type X collager の遺伝子発現が増大するのを遅延させ、Type II collagen と aggrecan の遺伝子発現が低下するのを遅延させる効果があった。さらに、DNA 量を増大させ、ALPase 活性を抑制させる効果があったため、LIPUS には軟骨細胞の増殖を促進し肥大化軟骨への分化を抑制する作用があることが示された。また単回の LIPUS 照射後に TGF- β 1 の遺伝子発現、およびタンパク分泌が亢進していること、TGF- β 1 の投与で LIPUS と同様の効果を再現できること、抗 TGF- β 1 抗体の投与によって LIPUS による効果をブロックできることなどから、TGF- β 1 が軟骨細胞における LIPUS の効果伝達に深く関与していることが示された。

以上の研究は、LIPUS の軟骨に対する直接的な効果を明らかにし、骨折治癒促進のメカニズムの解明に寄与し、新しい骨折治療の開発に貢献する。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年5月9日実施の論文内容とそれに関した試問を受け、合格と認められたものである。