


学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	下出 輝		
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部教授	堀田 正人	
	(副 査) 朝日大学歯学部教授	江尻 貞一	
	(副 査) 朝日大学歯学部教授	田沼 順一	
	(外部審査) 武庫川女子大学大学院健康スポーツ科学研究科教授	山添 光芳	
論文題目			
低出力パルス超音波のマウス筋芽細胞の分化に対する影響			
論文内容の要旨			
<p>【目的】</p> <p>インプラント治療は長期にわたり顎口腔機能を改善させるだけでなく、義歯と比較して患者の心理面においても良い影響を与える治療法として認知されている。しかし、一般的に顎骨にインプラントを埋入してから上部構造の装着まではインプラント体と周囲骨組織との結合期間を設けるため患者によっては治療期間が長くなる。口腔内には様々な組織が存在し、その組織の再生を早めることができれば患者の負担を大幅に軽減できる。</p> <p>一方、低出力パルス超音波 (low-intensity pulsed ultrasound:以下 LIPUS と略す) は組織再生を促進すると考えられ、臨床の分野で応用されている。しかし口腔内には様々な組織があり、それぞれの細胞において LIPUS の影響があるかどうかは詳細に報告されていない。どのような細胞の分化過程に影響があるかわかれば今後 LIPUS が再生医療の一助となるかもしれない。そこで今回筋肉細胞へ分化する過程における LIPUS の作用に着目した。</p> <p>【方法】</p> <p>1. 細胞培養</p> <p>接着細胞であるマウス筋芽細胞株 C2C12 (以下 C2C12) を DMEM 培地 (非働化した牛胎児血清 10%を含む) を用いて 37℃, 炭酸ガス濃度 5%にて培養した。継代は 0.25%trypsin で 37℃, 5 分間処理し 8 倍希釈した。筋細胞への分化誘導は 5%馬血清を含む DMEM 培地で行った。細胞密度は細胞懸濁液に 0.5%トリパンプルー溶液を 1/25 倍量加え, Burker-Turk 式血球計算盤で決定した。</p> <p>2. LIPUS 照射</p> <p>伊藤超短波 (株) 製 BR ソニック-Pro を使用した。プローブ (直径約 1.8cm) の上にゲルを塗布し, その上に 12 穴マルチウェルプレートに乗せ固定した。照射は 15 分間で行った。</p> <p>3. C2C12 細胞の生存率に対する影響</p> <p>C2C12 細胞を 12 穴マルチウェルプレートに 2×10^4 cells/cm² の密度で播種した。1 日培養した後, 分化誘導用の培地に交換し, 翌日 LIPUS を照射した。非照射群をコントロールとし, 照射群は 2 種類の周波数 (3MHz, 5MHz), で 3 段階の出力 (45mW/cm², 70mW/cm², 90mW/cm²) で照射し, 生存率を評価した。</p>			

4. C2C12 細胞の分化誘導に対する影響

C2C12 細胞を 12 穴マルチウェルプレートに 1.26×10^3 cells/cm² の密度で播種して 1 日培養し翌日分化誘導を行った。さらに 1 日培養し翌日 LIPUS を照射した。非照射群をコントロールとし、照射群は周波数 3MHz 出力 70mW/cm² ないし 90mW/cm² で 1 日 15 分ずつ 7 日間照射し、その後 7 日間培養を継続した。分化誘導をかけた日を 0 日目とし、7 日目と 14 日目の形態を位相差顕微鏡にて観察した。また分化に要する刺激回数を知るために周波数 3MHz 出力 70mW/cm² で 1 日 15 分 1 回～8 回まで異なる回数で連日照射した。分化誘導をかけた日を 0 日目とし 8 日目から形態の変化を位相差顕微鏡にて観察した。

5. 筋細胞分化における遺伝子発現の検討

C2C12 細胞を 12 穴マルチウェルプレートに 2×10^4 cells/cm² の密度で播種した。1 日培養した後、分化誘導用の培地に交換を行った。翌日 LIPUS を周波数 3MHz 出力 70mW/cm² で照射し、1 時間後・24 時間後に Sepasol-RNA I SuperG(ナカライテスク) を用い total RNA を抽出した。抽出した total RNA を 4 μ g から, Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR(invitrogen) を用いて cDNA を作製した。各遺伝子の転写量は Light Cycler Nano (Roche) を使用して解析した。

【結果】

C2C12 の生存率は 3MHz と 5MHz では生存率に影響はなかった。また出力違いでは生存率に変化はみられなかった。分化誘導に対する影響はコントロールと比較し照射群では 7 日目で細胞融合が多く観察され、14 日目においては分化した筋管細胞様の束になり、一方向に整列している像が観察された。出力の違いでは形態の分化像に違いはみとめられなかった。また照射回数の異なる検討では周波数 3MHz 出力 70mW/cm² で 1 回だけの LIPUS 照射でも十分に分化促進作用があることがわかった。遺伝子発現は筋細胞分化誘導によって ERK5, Klf4, Sp1, Cdh15, P21, MyoD, Myogenin, MEF2a, BMP2, Cot/Tpl2, ERK2, RunX2 の発現量が時間を追うごとに増大した。また LIPUS 照射によって MyoD, BMP2 の転写が 1 時間後に有意に増強したが、24 時間後では逆に抑制された。一方 Myogenin, Cot/Tpl2 の転写は LIPUS によって影響を受けなかった。

【考察および結論】

3MHz の LIPUS 照射では C2C12 細胞の分化が有意に促進された。この促進効果は 1 回だけの照射でも十分であったことから、LIPUS は分化誘導の初期段階の遺伝子発現に影響を及ぼすことが予想された。MyoD, BMP2 の発現量が LIPUS 照射初期に増強しており、このシグナル増強が筋細胞の分化過程を促進しているのではないかと考えられた。

周波数 3MHz の LIPUS はマウス筋芽細胞の分化を促進することが分かった。したがって LIPUS は再生医療の一助となる可能性が示唆された。