

[別紙1]

論文内容の要旨

論文題目 Study on the effects of magnetic fields on bone formation
in mice

和訳 骨形成に対する磁場の効果に関する研究

指導教官 上野 照剛 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 小谷 博子

近年、数テスラ(T)の強静磁場下における細胞や生体物質の諸現象が様々な研究から明らかにされている。磁場配向現象として、生体高分子であるフィブリンおよびコラーゲンが、反磁性磁気異方性によりそれぞれ磁力線方向に対して平行および垂直に配向し、また浮遊細胞である赤血球などの円盤状の細胞も、脂質膜の反磁性磁化率の異方性により磁力線方向に平行に配向するという報告がなされている。しかしながら、付着細胞に関しては、磁場配向したコラーゲンを足場として細胞が配向するという報告があるにすぎず、安定した強磁場発生制御、温度管理システムの構築、付着細胞の維持の難しさなどの理由から細胞そのものの磁場配向現象およびそれに伴う細胞の機能変化については、未だ

明らかにはされていない。

近年、臨床応用を目指した骨形成促進因子の研究が急速な進歩を遂げており、その代表的な因子として BMP(Bone Morphogenetic Protein)が挙げられる。しかしながら、生体内に骨形成を維持するためには大量の BMP が必要となる。また BMP 単独では骨形成の方向性の制御は不可能であり、多くの骨量を得ると同時に骨形成の方向を制御できる簡便な方法が求められている。

本研究では、最大 8 T の超電導マグネットを用い、まず *in vivo* 実験として、BMP ペレットによる異所性骨化モデルマウスを用いた静磁場による骨形成促進効果の有無について検討を行った。引き続き、*in vitro* 実験として付着細胞である骨芽細胞の磁場配向現象について検討し、その機能変化について検討を行った。

【方法および結果】

1. *In vivo* における骨形成に対する作用：

リコンビナントヒト BMP-2 (5 μ g) を I 型コラーゲン溶液 (150 μ g/50 μ l) に溶解、凍結乾燥の後、直径 3 mm の球状ペレットを作製し、5 週齢の ddy マウスの腰部皮下に移植した。その直後から 8.0 T 水平型超電導マグネット (Oxford 社、英国) の中心部にペレットが来るようにマウスを固定し、60 時間静磁場に曝露した (n=5)。対照として、同一部位に同時間固定のみを行ったマウスを用いた (n=5)。両群ともその後通常に飼育、21 日後にペレットを摘出し、軟 X 線写真撮影、骨量 (BMC ; bone mineral content) 測定、および組織学的検索を行った。静磁場曝露群においては非曝露群と比較して有意な骨形成促進作用が認められ、BMC はそれぞれ 6.70 \pm 1.58 および 3.58 \pm 0.37 mg (mean \pm SEM) であった。また、非曝露群の骨化組織はランダムな形状を呈したのに対し、曝露群で出来た骨化組織はそのすべてが磁場の方向に平行に長く伸びていた。組織学的には線維性骨を基調とした骨化組織として観察さ

れた。

2. In vitro における培養骨芽細胞に対する作用：

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を 9 cm² フラスコに播種し、これを上記の 8.0 T 水平型超電導マグネット (Oxford 社、英国) の中心部に静置し、静磁場に 60 時間連続曝露した。対照としては上記と同様に、同じ条件下で曝露のみしていない培養細胞を用いた。両群ともその後、通常に培養を行い、経時的にこれらの細胞形態の観察を行った。曝露群では培養 2 日目よりその形態に変化が現れ、非曝露群では細胞がランダムに配向しているのに対し、曝露群では全細胞が磁場方向とほぼ平行に配向していた。NIH Image を用いて細胞の配向方向と磁場方向との角度を計測したところ、配向係数 f_{2D} はそれぞれ曝露群で 0.92、非曝露群で 0.04 であり、曝露群は非曝露群に比べ著明に高い配向秩序を有していた。引き続き、同培養細胞の増殖および分化に対する静磁場の影響について検討した。BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) の取り込みを指標にした細胞増殖は、静磁場曝露によって影響を受けなかった。一方、アルカリフォスファターゼ (ALP ; Alkaline phosphatase) 活性を指標にして細胞の分化に対する影響を検討したところ、曝露群は非曝露群に比べて有意に高い活性を示した (0.30 ± 0.02 vs. 0.21 ± 0.01 nmol/ min/ μ g)。ALP 染色においても、非曝露群では骨芽細胞から分泌された細胞基質がランダムであったのに対し、曝露群では骨芽細胞から分泌された細胞基質は磁場方向と平行に配列していた。

【考察】

異所性骨化モデル動物を用いた *in vivo* 実験において、テスラ(T) 級の静磁場曝露により磁力線方向に平行に細長い形状のペレットが形成され、その骨量が有意に増加することが明らかとなった。一方、付着細胞である骨芽細胞を用いた *in vitro* の実験においても、静磁場曝露により骨芽細胞単独でも磁力線方向

に平行に配向が認められ、付着細胞にも磁場配向現象が認められることが明らかとなった。さらに磁場により配向現象を示した骨芽細胞は、その分化能が促進されることが明らかとなった。

付着細胞の磁場配向のメカニズムとしては、まず第一に付着細胞が棒状の磁化率異方性の大きな形状に変わり、磁気トルク回転により細胞が磁場配向した可能性があげられる。しかしながら、骨芽細胞のような付着細胞は培養フラスコの底面に付着しているため、摩擦力、付着力が反磁性回転力よりも大きく、磁気トルク回転を生じさせるのは難しい。そのことを考慮に入れると、磁場配向の第二のメカニズムとして、付着細胞の細胞膜あるいは微小管などの細胞内骨格蛋白の磁気異方性により磁場配向が生じたことが考えられる。

一方、異所性骨化モデル動物を用いた *in vivo* 実験においては、埋め込まれたペレット内で、BMP により間葉系細胞が骨芽細胞へと分化し、これらの骨芽細胞が磁場曝露により配向現象を示し、磁力線方向に平行に配向したと考えられる。*In vitro* 実験の結果で明らかのように、磁場方向に平行に配向した骨芽細胞から分泌される細胞基質は、細胞の配向方向と同じ方向に配向することから、*in vivo* 実験においても同様に、磁場方向に平行に配向したペレット内の骨芽細胞から、細胞基質が磁場方向と平行に産生され、*in vivo* に見られる細長い形状の骨化組織が形成されたと考えられる。また、*in vitro* 実験で裏付けされたように磁場配向により細胞の分化能が上昇することから、*in vivo* においても、磁場曝露群の細胞は分化促進誘導を受け、骨量が増加したと考えられる。

以上の結果から、静磁場は、強力な骨形成能を呈するのみでなく、BMP などの分化誘導化学物質と組み合わせることによってその形成方向を管理できる画期的な治療法となりうる可能性が示された。